

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN THANH HÀ

**XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG VÀ ĐÁNH GIÁ
KHẢ NĂNG PHÂN BỐ SINH HỌC CỦA PACLITAXEL TỪ
CHẾ PHẨM THUỐC TIÊM SẢN XUẤT TẠI VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH - NĂM 2020

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN THANH HÀ

**XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG VÀ ĐÁNH GIÁ
KHẢ NĂNG PHÂN BỐ SINH HỌC CỦA PACLITAXEL TỪ
CHẾ PHẨM THUỐC TIÊM SẢN XUẤT TẠI VIỆT NAM**

NGÀNH: KIỂM NGHIỆM THUỐC VÀ ĐỘC CHẤT

MÃ SỐ: 62720410

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. PGS. TS. LÊ MINH TRÍ

2. PGS.TS. NGUYỄN THIÊN HẢI

TP.HỒ CHÍ MINH, Năm 2020

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được công bố ở bất kỳ nơi nào.

Tác giả luận án

Nguyễn Thanh Hà

MỤC LỤC

	Trang
LỜI CAM ĐOAN	i
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT VÀ THUẬT NGỮ ANH VIỆT	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG	vi
DANH MỤC CÁC HÌNH, SƠ ĐỒ, ĐỒ THỊ	x
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN	3
1.1. PACLITAXEL	3
1.2. ĐỊNH HƯỚNG CẢI TIẾN CÔNG THỨC BÀO CHẾ THUỐC TIÊM PACLITAXEL	5
1.3. HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN	13
1.4. KIỂM NGHIỆM THUỐC TIÊM DẠNG DUNG DỊCH ĐẬM ĐẶC VÀ BỘT ĐÔNG KHÔ - KHẢO SÁT ĐỘ ỔN ĐỊNH	16
1.5. NGHIÊN CỨU TIỀN LÂM SÀNG	17
1.6. MỘT SỐ CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU	19
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	27
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	27
2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU, THIẾT BỊ	27
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	29
Chương 3. KẾT QUẢ	48
3.1 XÂY DỰNG CÔNG THỨC VÀ QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ THUỐC TIÊM CHỨA PTX VỚI HAI DẠNG BÀO CHẾ DUNG DỊCH ĐẬM ĐẶC VÀ BỘT ĐÔNG KHÔ PHA TIÊM TRUYỀN	48
3.2. XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA HAI CHẾ PHẨM NGHIÊN CỨU	60
3.3. NGHIÊN CỨU THÔNG SỐ DƯỢC ĐỘNG HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ PHÂN BỐ SINH HỌC TRONG MỘT SỐ MÔ ĐỘNG VẬT THỬ NGHIỆM	69

CỦA HAI CHẾ PHẨM BÀO CHẾ CHỨA PTX SO VỚI CHẾ PHẨM ĐỐI CHỨNG

Chương 4. BÀN LUẬN	103
4.1. BÀO CHẾ THUỐC TIÊM CHỨA PTX DẠNG DUNG DỊCH ĐẬM ĐẶC VÀ BỘT ĐÔNG KHÔ	103
4.2. TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG VÀ ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA CHẾ PHẨM PHA TIÊM CHỨA PTX	107
4.3. NGHIÊN CỨU THÔNG SỐ DƯỢC ĐỘNG HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ PHÂN BỐ SINH HỌC TRONG MỘT SỐ MÔ CỦA HAI DẠNG BÀO CHẾ SO VỚI THUỐC ĐỐI CHỨNG	108
ĐIỂM MỚI CỦA ĐỀ TÀI	118
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	119
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN	122
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT VÀ THUẬT NGỮ ANH VIỆT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
BCS	Biopharmaceutical classification system	Hệ thống phân loại sinh dược phẩm
LBMW	lecithin: butanol: myvacet: nước	
CMW	capmul: myvacet: nước	
CyD	Cyclodextrin	
HP- β -CyD	Hydroxylpropyl- β - Cyclodextrin	
PVP K30	Polyvinylpyrrolidone K30	
Polysorbate	Polyoxyethylene sorbitan monooleate	
HPMC	Hydroxypropyl methylcellulose	
API	Active Pharmaceutical Ingredients	Dược chất
FPP	Finished Pharmaceutical Product	Thành phẩm
MTD	Maximal tolerated dose	Liều dung nạp tối đa
LD ₅₀	Lethal Dose 50	Liều gây chết 50% thú thử nghiệm
LD ₁₀₀	Lethal Dose 100	Liều gây chết 100% thú thử nghiệm
LD ₀	Lethal Dose 0	Liều thử nghiệm
AUC	Area under curve	Diện tích dưới đường cong
T _{max}		Thời gian để đạt được nồng độ tối đa
C _{max}		Nồng độ tối đa trong huyết tương
AS	Analyst substance	Chất chuẩn
IS	Internal substance	Nội chuẩn

HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
M		Khối lượng phân tử
N		Số đĩa lý thuyết
k'		Hệ số dung lượng
A_s		Hệ số bất đối
LLE	Liquid–Liquid Extraction	Chiết lỏng – lỏng
LLOQ	Lower Limit of Quantitation	Giới hạn định lượng dưới
PTX	Paclitaxel	
CAR	Carbamazepin	
DZP	Diazepam	
RSD	Relative standard deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
R_t	Retention time	Thời gian lưu
SD	Standard deviation	Độ lệch chuẩn
SPE	Solid Phase Extraction	Chiết pha rắn
RH	Relative humidity	Độ ẩm tương đối
K/E	Kolliphor/ Ethanol	Dung dịch K
T80/E	Tween 80/ Ethanol	Dung dịch T
A	Acid citric	

DANH MỤC CÁC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1. Giới hạn tạp chất trong chế phẩm PTX dùng đường tiêm	5
Bảng 1.2. Các yếu tố dung môi và tá dược khảo sát trong bào chế dạng đông khô	11
Bảng 1.3. Một số hệ đệm dùng trong công thức đông khô	12
Bảng 1.4. Tính chất lý hóa của một số dẫn xuất CyD trong dược phẩm	14
Bảng 1.5. Một số chế phẩm thuốc tiêm có chứa cyclodextrin	15
Bảng 1.6. Phân loại vùng và điều kiện bảo quản	17
Bảng 1.7. Thông số áp dụng trong thẩm định quy trình định lượng dược chất trong dịch sinh học	19
Bảng 1.8. Giá trị AUC_{0-8h} của Taxol [®] khi tiêm cho chuột với liều 15 mg/kg	23
Bảng 1.9. Giá trị AUC_{0-8h} ($\mu\text{g/g.giờ}$) của PTX hỗn dịch sau khi tiêm với liều 15 mg/kg	23
Bảng 1.10. Giá trị AUC_{0-12h} của PTX hỗn dịch sau khi tiêm liều với 10 mg/kg	25
Bảng 2.1. Thông tin thuốc đối chứng	27
Bảng 2.2. Thông tin về động vật thí nghiệm	27
Bảng 2.3. Thông tin chuẩn đối chiếu	27
Bảng 2.4. Hóa chất, dung môi	28
Bảng 2.5. Trang thiết bị dùng trong bào chế và kiểm nghiệm	29
Bảng 2.6. Tỷ lệ và thành phần các công thức khảo sát	31
Bảng 2.7. Thành phần công thức bột đông khô khảo sát	32
Bảng 2.8. Điều kiện bảo quản mẫu, đánh giá độ ổn định và thời điểm lấy mẫu	38
Bảng 2.9. Liều tiêm và thời điểm lấy máu động vật thí nghiệm	40
Bảng 2.10. Liều tiêm và thời điểm lấy mẫu mô động vật thí nghiệm	40

Bảng 3.1. Kết quả định lượng PTX (%) các dung dịch (S) sau khi pha loãng từ Stragen® trong dung dịch NaCl 0,9% và glucose 5%	48
Bảng 3.2. Kết quả cảm quan và hàm lượng PTX (%) các dung dịch sau khi pha loãng 10 lần từ dung dịch đậm đặc trong NaCl 0,9%	49
Bảng 3.3. Kết quả cảm quan và hàm lượng PTX (%) các dung dịch sau khi pha loãng 10 lần từ dung dịch đậm đặc trong glucose 5%	49
Bảng 3.4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của acid citric đến cảm quan và hàm lượng PTX (%) các dung dịch sau khi pha loãng ở các nồng độ trị liệu trong NaCl 0,9%	50
Bảng 3.5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của acid citric đến cảm quan và hàm lượng PTX (%) các dung dịch sau khi pha loãng ở các nồng độ trị liệu trong glucose 5%	51
Bảng 3.6. Kết quả cảm quan và định lượng PTX (%) các dung dịch có acid citric sau khi pha loãng trong dung dịch NaCl 0,9% và glucose 5%	52
Bảng 3.7. Kết quả về cảm quan, pH, hàm lượng PTX, tạp liên quan, nội độc tố, độ vô khuẩn của chế phẩm	53
Bảng 3.8. Tỷ lệ PVP K30 sử dụng	54
Bảng 3.9. Kết quả đánh giá cảm quan dung dịch đậm đặc	55
Bảng 3.10. Kết quả pH và hàm lượng PTX (%) từ các công thức khảo sát	57
Bảng 3.11. Kết quả khảo sát lặp lại lô bột đông khô pha tiêm	58
Bảng 3.12. Kết quả về cảm quan, pH, hàm lượng PTX, tạp liên quan, nội độc tố, độ vô khuẩn của chế phẩm bột đông khô	60
Bảng 3.13. Điều kiện sắc ký của phương pháp định lượng PTX và tạp liên quan	58
Bảng 3.14. Kết quả thẩm định tính phù hợp hệ thống của mẫu chuẩn và mẫu thử dung dịch đậm đặc và bột đông khô trong phương pháp định lượng PTX	61

Bảng 3.15. Kết quả độ đúng phương pháp định lượng PTX trong chế phẩm	62
Bảng 3.16. Kết quả thẩm định độ chính xác phương pháp định lượng PTX	63
Bảng 3.17. Điều kiện sắc ký của phương pháp định lượng tạp trong chế phẩm	63
Bảng 3.18. Kết quả thẩm định tính phù hợp hệ thống của tạp chuẩn 10-DAP và chuẩn PTX của phương pháp định lượng tạp	65
Bảng 3.19. Kết quả thẩm định độ chính xác phương pháp định lượng tạp	66
Bảng 3.20. Kết quả pH, đồng đều khối lượng, hàm lượng nước, định lượng và tạp liên quan của chế phẩm bột đông khô chứa PTX	67
Bảng 3.21. Kết quả độ ổn định của chế phẩm dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX ở điều kiện bảo quản dài hạn	68
Bảng 3.22. Kết quả độ ổn định của chế phẩm dung dịch đậm đặc và đông khô pha tiêm truyền chứa PTX ở điều kiện lão hóa cấp tốc	69
Bảng 3.23. Kết quả dữ liệu thăm dò liều thử độc tính cấp dung dịch đậm đặc, bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX và thuốc đối chứng Anzatax®	70
Bảng 3.24. Kết quả thẩm định tính phù hợp hệ thống của phương pháp định lượng PTX trong huyết tương thỏ và chuột	75
Bảng 3.25. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, LLOQ, độ chính xác và độ đúng	75
Bảng 3.26. Kết quả thẩm định tỷ lệ thu hồi và hiệu suất chiết CAR và PTX trong huyết tương thỏ và huyết tương chuột	76
Bảng 3.27. Kết quả thẩm định độ ổn định của PTX trong huyết tương thỏ và chuột	77
Bảng 3.28. Kết quả thẩm định độ ổn định ngắn hạn và dài hạn của dung dịch chuẩn	77

Bảng 3.29. Kết quả thẩm định tính phù hợp hệ thống phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô đồng nhất thỏ và chuột	83
Bảng 3.30. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô gan thỏ	83
Bảng 3.31. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết từ mô thận thỏ	84
Bảng 3.32. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết từ mô phổi thỏ	84
Bảng 3.33. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết từ mô buồng trứng thỏ	85
Bảng 3.34. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô gan chuột	85
Bảng 3.35. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô thận chuột	86
Bảng 3.36. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô phổi chuột	86
Bảng 3.37. Kết quả thẩm định tỷ lệ thu hồi và hiệu suất chiết PTX và CAR/DZP từ dịch chiết mô đồng nhất thỏ và chuột	87
Bảng 3.38. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô thỏ	87
Bảng 3.39. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác tại LLOQ phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô thỏ	88
Bảng 3.40. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác phương pháp định lượng PTX trong mô chuột	88
Bảng 3.41. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác tại LLOQ phương pháp định lượng PTX trong mô chuột	89
Bảng 3.42. Kết quả thẩm định độ ổn định PTX trong dịch chiết từ mô thỏ ở các điều kiện bảo quản	89

Bảng 3.43. Kết quả thẩm định độ ổn định PTX trong dịch chiết từ mô chuột	90
Bảng 3.44. Kết quả khảo sát nồng độ PTX ($\mu\text{g}/\text{mL}$) trong huyết tương thỏ sau khi tiêm thuốc đối chứng Stragen [®] , dung dịch đậm đặc và bột đông khô	91
Bảng 3.45. So sánh các thông số dược động học trong huyết tương thỏ của thuốc đối chứng với chế phẩm dung dịch đậm đặc và bột đông khô	93
Bảng 3.46. Bảng so sánh nồng độ PTX tại từng thời điểm giữa chế phẩm bào chế và thuốc đối chiếu Anzatax [®]	94
Bảng 3.47. Bảng so sánh các thông số dược động học giữa chế phẩm bào chế và thuốc đối chiếu Anzatax [®]	94
Bảng 3.48. Nồng độ PTX ($\mu\text{g}/\text{g}$) trong mô thỏ ($\text{TB} \pm \text{SD}$) của thuốc đối chứng (A)	95
Bảng 3.49. Nồng độ PTX ($\mu\text{g}/\text{g}$) ($\text{TB} \pm \text{SD}$) trong các mô thỏ	96
Bảng 3.50. So sánh AUC _{0,5-8h} của PTX trong mô thỏ giữa thuốc đối chứng và dung dịch đậm đặc ($\text{TB} \pm \text{SD}$)	98
Bảng 3.51. Nồng độ PTX ($\mu\text{g}/\text{g}$) ($\text{TB} \pm \text{SD}$) trong mô chuột của thuốc đối chứng	98
Bảng 3.52. Nồng độ PTX ($\mu\text{g}/\text{g}$) ($\text{TB} \pm \text{SD}$) trong mô khi tiêm dung dịch đậm đặc	99
Bảng 3.53. So sánh AUC _{0-8h} của PTX trong mô chuột giữa thuốc đối chứng và dung dịch đậm đặc với liều 12 mg/kg ($\text{TB} \pm \text{SD}$)	102

DANH MỤC CÁC HÌNH, SƠ ĐỒ, ĐỒ THỊ

	Trang
Hình 1.1. Công thức cấu tạo paclitaxel	3
Hình 1.2. Tổng quát hướng nghiên cứu cải thiện độ tan paclitaxel	6
Hình 1.3. Biểu đồ pha áp suất-nhiệt độ của một chất, điểm tới hạn khí-lỏng (vapor-liquid critical point)	11
Hình 1.4. Cấu trúc β -CyD và các dẫn xuất	14
Hình 1.5. So sánh phân bố của PTX trong một số mô chuột thử nghiệm giữa chế phẩm Taxol [®] và DOMC-FA/PTX	24
Hình 1.6. Đồ thị phân bố nồng độ PTX trong mô theo thời gian	25
Hình 3.1. Sơ đồ quy trình pha chế dung dịch đậm đặc chứa PTX quy mô 50 l	53
Hình 3.2. Quy trình bào chế dạng bột đông khô pha tiêm chứa PTX	59
Hình 3.3. Sắc ký đồ của mẫu chuẩn PTX, mẫu placebo, mẫu thử của dung dịch đậm đặc (a) và bột đông khô (b)	61
Hình 3.4. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh của phương pháp định lượng PTX trong chế phẩm	62
Hình 3.5. Sắc ký đồ tạp chuẩn 10-DAP (a) và hỗn hợp PTX-tạp chuẩn 10-DAP (b)	64
Hình 3.6. Sắc ký đồ mẫu placebo, mẫu thử của dung dịch đậm đặc (a ₁ , a ₂) và bột đông khô (b ₁ , b ₂)	64
Hình 3.7. Đồ thị tỷ lệ % chết theo tần số tích lũy của thuốc đối chứng, dung dịch đậm đặc và bột đông khô tiêm truyền chứa PTX.	71
Hình 3.8. (a) Sắc ký đồ của mẫu placebo, (b) CAR nồng độ 4 μ g/mL trong methanol, (c) PTX nồng độ 25 μ g/mL trong methanol	73
Hình 3.9. (d) Sắc ký đồ PTX nồng độ 50 μ g/mL (e) hỗn hợp 4 μ g CAR/mL và 25 μ g PTX/mL, (f) hỗn hợp 4 μ g CAR/mL và 50 μ g PTX/mL trong huyết tương thỏ	74
Hình 3.10. Sắc ký đồ PTX và CAR trong mẫu placebo (a), mẫu huyết tương chuột chứa CAR 1 μ g/mL (b), PTX 10 μ g/mL (c) và hỗn hợp (d)	74

Hình 3.11. Sắc ký đồ mẫu placebo các mô buồng trứng, gan, phổi, thận của thỏ	79
Hình 3.12. Sắc ký đồ PTX và CAR trong mô thỏ	80
(a) Sắc ký đồ chuẩn PTX và nội chuẩn CAR trong methanol, (b) chuẩn PTX và nội chuẩn CAR trong mẫu thử tự tạo, (c) mẫu mô phổi tại thời điểm 0,5 giờ sau khi cho thỏ dùng thuốc với liều 6 mg/kg.	
Hình 3.13. Sắc ký đồ chuẩn PTX và DZP trong methanol (a), trong mẫu thử tự tạo mô đồng nhất (b) và mẫu mô sau khi tiêm thuốc 1 giờ (c)	81
Hình 3.14. Sắc ký đồ mẫu placebo từ dịch chiết các mô gan, thận, phổi của chuột	82
Hình 3.15. Biểu đồ nồng độ thuốc PTX của thuốc đối chứng (1), dung dịch đậm đặc (2) và bột đông khô (3) trong huyết tương thỏ theo thời gian	92
Hình 3.16. Biểu đồ nồng độ PTX trung bình của thuốc đối chứng (1) và dung dịch đậm đặc (2) trong huyết tương chuột nhất theo thời gian	94
Hình 3.17. Đường biểu diễn nồng độ PTX trong các mô theo thời gian sau khi tiêm tĩnh mạch thuốc đối chứng (A) với liều 6 mg/kg (TB \pm SD)	96
Hình 3.18. Đường biểu diễn nồng độ PTX trong các mô theo thời gian sau khi tiêm tĩnh mạch dung dịch đậm đặc (B) với liều 6 mg/kg (TB \pm SD)	96
Hình 3.19. Phân bố trong mô của PTX sau khi tiêm tĩnh mạch liều 6 mg/kg thuốc đối chứng (A) và dung dịch đậm đặc (B) trên thỏ thử nghiệm (TB \pm SD)	97
Hình 3.20. Đường biểu diễn nồng độ PTX (TB \pm SD) trong mô chuột theo thời gian khi tiêm thuốc đối chứng	99
Hình 3.21. Đường biểu diễn nồng độ PTX trong mô chuột theo thời gian sau khi tiêm dung dịch đậm đặc (TB \pm SD)	100
Hình 3.22. So sánh phân bố PTX (μ g/ g) trong mô gan (a), thận (b), phổi (c) của chuột sau khi tiêm thuốc đối chứng và chế phẩm thử dung dịch đậm đặc chứa PTX	101

MỞ ĐẦU

Paclitaxel (PTX), hoạt chất chiết từ vỏ cây thông đỏ (*Taxus brevifolia*) với những nghiên cứu ban đầu những năm 60 cho thấy khả năng gây độc tế bào, tạo sự quan tâm từ các nhà khoa học trong lĩnh vực dược phẩm. Năm 1967, Monroe E. Wall và Mansukh C. Wani phân lập từ thông đỏ (*Taxus brevifolia*) chất PTX. Viện Ung thư Quốc gia Mỹ phát hiện hoạt chất này có tính năng cản trở việc phân hủy bình thường của vi ống, ổn định vi ống, từ đó ức chế phân bào [53]. Công ty Bristol Myers Squibb (BMS) đã dùng hoạt chất trên bào chế ra thuốc TAXOL® [53]. Năm 1992, FDA chính thức phê duyệt dùng Taxol điều trị ung thư buồng trứng, vú, phổi (dạng tế bào không nhỏ) và ung thư cổ tử cung. PTX trong các nghiên cứu khác nhau cho thấy là tác nhân chống ung thư có hiệu quả trong điều trị ung thư phổi, vú, buồng trứng, giảm bạch cầu và ung thư gan. PTX có vai trò trong việc điều trị các loại ung thư khác nhau bằng cách nhắm vào ống tubulin hoặc gây ức chế tế bào. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới, với nhu cầu ngày càng tăng cũng như việc sử dụng phổ biến trong phác đồ điều trị của loại thuốc chống ung thư này [53], các chế phẩm chứa PTX vẫn được tiếp tục nghiên cứu cải tiến dạng bào chế. Riêng ở Việt Nam, bước đầu có những nghiên cứu thành công về bào chế dạng chế phẩm tiêm chứa PTX tuy nhiên chưa có công bố nghiên cứu dạng bột đông khô. Ưu điểm của dạng bột đông khô có thể chứa hàm lượng nhỏ trong mỗi đơn vị bào chế nên có thể dùng 1 lần/ 1 đơn vị theo chỉ định mà không cần phải chia nhỏ liều như dạng dung dịch đậm đặc pha tiêm truyền thông thường. Bên cạnh đó, trong quá trình nghiên cứu bào chế, nghiên cứu tiền lâm sàng trên động vật thí nghiệm là hết sức cần thiết. Việc nghiên cứu đầy đủ cơ chế dược động học của thuốc trên động vật thí nghiệm sẽ tiên đoán một số định hướng về hiệu quả tác động đích và độc tính của thuốc. Cả Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Mỹ (FDA) và Cục Sức khỏe Canada (Health Canada) đều yêu cầu các thử nghiệm động vật được tiến hành trước khi con người được thử nghiệm một thuốc mới [43]. Hơn nữa, thông tin thử nghiệm tiền lâm sàng sẽ tránh các thử nghiệm không cần thiết trên lâm sàng, do đó cho phép đưa ra nhanh nhất có thể các sản phẩm thuốc chống ung thư vào thử nghiệm lâm sàng mà không ảnh hưởng đến tính an toàn của thuốc [14]. Các mô hình nghiên cứu trên

động vật thí nghiệm bước đầu đang được tiến hành tại Việt Nam và thường đi theo xu hướng đánh giá trên động vật thí nghiệm bị gây bệnh [1], [3]. Với những lý do trên, đề tài: “Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng và nghiên cứu khả năng phân bố sinh học của paclitaxel từ chế phẩm thuốc tiêm sản xuất tại Việt Nam” được thực hiện nhằm nghiên cứu bào chế dạng bột đông khô chứa PTX, xây dựng quy trình đánh giá chất lượng và nghiên cứu khả năng phân bố sinh học, góp phần phát triển mô hình nghiên cứu tiền lâm sàng của dạng bào chế chứa PTX sản xuất tại Việt Nam. Luận án được tiến hành với các mục tiêu nghiên cứu cụ thể sau:

- Xây dựng công thức và quy trình điều chế thuốc tiêm truyền chứa PTX với hai dạng bào chế dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền
- Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng và nghiên cứu độ ổn định của chế phẩm
- Nghiên cứu thông số dược động học và đánh giá phân bố sinh học trong một số mô của chế phẩm chứa PTX so sánh với chế phẩm thương mại.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ PACLITAXEL

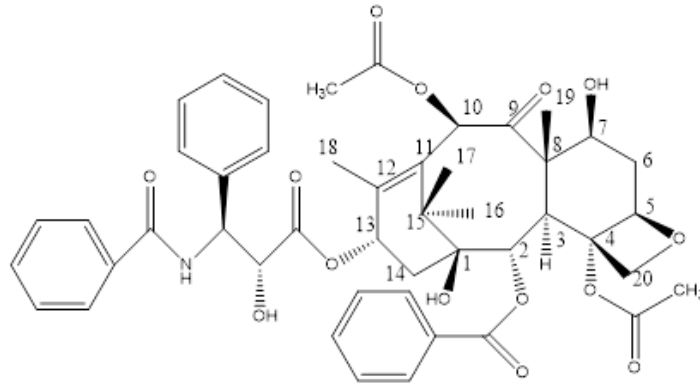
1.1.1. Tên, công thức phân tử, công thức cấu tạo và tính chất

Tên hóa học: (5 β ,20-Epoxy-1,2 α ,4,7 β ,13 α -hexahydroxytax-11-en-9-one4,10-diacetate2-benzoate13-ester with (2R,3S)-N-benzoyl-3-phenyllisoserine) [8], [60]

Công thức phân tử: C₄₇H₅₁NO₁₄

Phân tử lượng: 853,91 [60]

Công thức cấu tạo được trình bày ở Hình 1.1



Hình 1.1. Công thức cấu tạo paclitaxel

“Nguồn: Dược điển Mỹ, 2014” [60]

PTX có khung taxan là khung cấu trúc của các dược chất chống ung thư nên được xếp vào nhóm taxan, cùng cơ chế tác dụng trong phân loại thuốc chống ung thư. [2]

Tính chất: PTX không tan trong nước, tan rất kém trong hầu hết các dung môi dùng trong dược phẩm, tan trong methanol. Tan trong ethanol khoảng 46 mM, trong methylen chlorid hoặc acetonitril khoảng 20 mM, trong isopropanol khoảng 14 mM.

Log P = 3. Nhiệt độ nóng chảy: 216 - 217 °C. Bảo quản ở điều kiện 2 - 8 °C.

1.1.2. Phương pháp định tính, định lượng paclitaxel và tạp liên quan trong thuốc tiêm chứa PTX theo Dược điển hiện hành

Sử dụng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) [8] [60].

Định tính: sắc ký đồ mẫu thử phải có thời gian lưu của đỉnh paclitaxel tương ứng với thời gian lưu của mẫu chuẩn.

Định lượng: Hàm lượng PTX (C₄₇H₅₁NO₁₄) không được thấp hơn 90 % và không được vượt quá 110 % hàm lượng trên nhãn.

- Dung môi hòa tan mẫu: dung dịch 0,02% acid acetic băng trong methanol.
- Pha động: Nước - acetonitril (11 : 9) (tt/tt) được lọc và khử khí.
- Mẫu chuẩn: dung dịch chứa paclitaxel RS trong dung môi hòa tan mẫu với nồng độ 0,6 mg/mL.
- Mẫu thử: pha loãng mẫu thử trong dung môi hòa tan mẫu để thu được dung dịch có nồng độ PTX khoảng 0,6 mg/ mL.
- Điều kiện sắc ký:

Cột sắc ký: cột L43 (PFP) 250 mm x 4 mm, 5 μ m.

Bước sóng phát hiện: 227 nm

Thể tích tiêm: 10 μ L.

Tốc độ dòng: 1,5 mL/phút.

Giới hạn tạp phân hủy: tạp xác định phải đạt yêu cầu như trong Bảng 1.1. Tạp phân hủy khác không được quá 0,1%; tổng tạp không quá 2,0%.

- Dung môi hòa tan mẫu: acetonitril

- Pha động:

Dung dịch A: Nước - acetonitril (3:2) (tt/tt)

Dung dịch B: Acetonitril

Chương trình dung môi:

Thời gian	Dung dịch A (%)	Dung dịch B (%)	Rửa giải
0 → 26	100	0	Đẳng dòng
26 → 66	100 → 17	0 → 83	Gradient
66 → 67	17 → 100	83 → 0	Gradient
67 → 75	100	0	Đẳng dòng

- Mẫu chuẩn: dung dịch chứa Paclitaxel RS và tạp chuẩn (tạp B) trong acetonitril với nồng độ tương ứng 1,2 mg/ mL và 0,006 mg/mL.
- Mẫu thử: pha loãng mẫu thử trong dung môi pha loãng để thu được dung dịch có nồng độ PTX khoảng 1,2 mg/ mL.
- Điều kiện sắc ký:

Cột sắc ký: cột L1 (C18) 250 mm x 4,6 mm x 3 μ m, nhiệt độ cột 35 °C

Bước sóng phát hiện: 227 nm

Thể tích tiêm: 10 μ L.

Tốc độ dòng: 1,2 mL/ phút.

Bảng 1.1. Giới hạn tạp chất trong chế phẩm PTX dùng đường tiêm

Tên tạp chất	Thời gian lưu tương đối so với paclitaxel	Giới hạn cho phép (%)
Baccatin III	0,19	0,8
Dẫn xuất Ethyl ester	0,21	0,4
10-Deacetylpaclitaxel	0,50	0,8
10-Deacetyl-7-epipaclitaxel	0,95	0,5
7-Epipaclitaxel	1,40	0,6

“Nguồn: Dược điển Mỹ, 2014” [60]

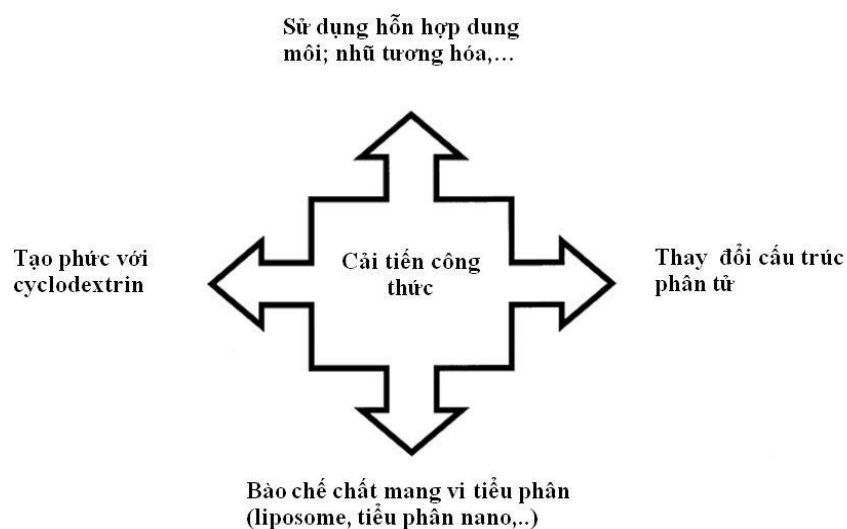
1.1.3. Một số chế phẩm thuốc tiêm có chứa PTX trên thị trường

- Dung dịch đậm đặc pha tiêm (100mg/16,7ml hoặc 30mg/5ml): Taxol[®] (Bristol-Myers Squibb), Paclitaxel “Ebewe” (Ebewe Pharma), Paclitaxel Injection (Teva Health Systems), Intaxel[®] (Fresenius Kabi), Anzatax[®] (Mayne Pharm), Stragen[®] (Haupt Pharma Woftratshausen), Paxus (PT Dankos Farma), Canbaxel 30 (Bidiphar), Canbaxel 100 (Bidiphar).
- Bột pha tiêm: Abraxane[®] (Celgene)

1.2. ĐỊNH HƯỚNG CẢI TIẾN CÔNG THỨC BÀO CHẾ THUỐC TIÊM CHỨA PACLITAXEL

1.2.1. Định hướng cải thiện độ tan PTX trong nghiên cứu công thức bào chế

Căn cứ vào độ tan và tính thấm của PTX, xu hướng cải thiện độ tan của PTX trong quá trình bào chế được mô tả ở Hình 1.2 [33], [34]. Paclitaxel có độ tan và tính thấm tương tự dược chất nhóm IV của hệ thống phân loại BCS nên thiết lập công thức bào chế sẽ theo định hướng để cải thiện độ tan và tăng tính thấm của dược chất. Theo một số nghiên cứu, các phương pháp tiếp cận hiện tại đang được áp dụng trong bào chế thuốc nhóm II, với việc sử dụng tá dược tăng cường hấp thu, có thể được áp dụng để nghiên cứu công thức bào chế dạng thuốc tiêm đối với các dược chất nhóm IV [33] và do vậy có thể áp dụng trong nghiên cứu công thức bào chế PTX.



Hình 1.2. Tổng quát hướng nghiên cứu cải thiện độ tan Paclitaxel

1.2.2. Nghiên cứu công thức thuốc tiêm chứa PTX

Công thức thuốc tiêm chứa PTX được sử dụng rộng rãi nhất trong lâm sàng là dạng dung dịch đậm đặc pha tiêm truyền (thuốc gốc và thuốc generic), được pha loãng trước khi tiêm tĩnh mạch. Công thức có chứa Cremophor[®] EL và ethanol khan. Tuy nhiên, tá dược này có liên quan với các tác dụng phụ như co thắt phế quản, hạ huyết áp và các triệu chứng quá mẫn. Thành phần của tá dược này có thể giải phóng histamin và gây hạ huyết áp và phản ứng quá mẫn sau khi tiêm truyền nhanh hoặc sau tiêm tĩnh mạch. Hướng nghiên cứu công thức bào chế trên thế giới cho đến nay chủ yếu thay đổi thành phần tá dược nhưng vẫn đảm bảo tăng độ tan của PTX. Một số phương pháp cải tiến phổ biến:

1.2.2.1. Đồng dung môi

Tarr và Yalkowsky (1987) đã bào chế hệ đồng dung môi PTX (5 mg/mL) chứa ethanol, tween 80, và pluronic L64 theo tỷ lệ 3: 1: 6 (tt/tt/tt), thay cho công thức của Taxol. Dung dịch này ổn định về mặt hóa học và thể chất trong 3 tháng, nhưng khi pha loãng đến nồng độ 3,45 mM chỉ ổn định trong 3 ngày [42].

1.2.2.2. Hệ hỗn dịch

Tarr và Yalkowsky (1987) đã bào chế PTX dạng dầu/ nước bằng cách dùng triacetin làm trung gian hòa tan. Nghiên cứu cho thấy PTX hòa tan tốt trong triacetin (75 mg/ mL). Mặc dù vậy thuốc kết tủa khi nhũ tương được pha loãng khoảng chín lần

với dextrose 5%. Tarr và đồng sự đã bào chế hỗn dịch dạng tiêm đầu tiên của PTX chứa 10 - 15 mg PTX/ mL trong một công thức bao gồm 50% triacetin, 1,5% lecithin đậu nành, 1,5% pluronic F68, và 2,0% ethyl oleat. Khoảng 10% glycerol được thêm vào để ngăn ngừa tách pha. Hỗn hợp này ổn định trong khoảng thời gian 6 tháng khi được bảo quản ở 4 °C. Tuy nhiên lượng triacetin cần thiết để bào chế PTX với liều điều trị được phát hiện là độc hại khi tiêm tĩnh mạch cho chuột và không có hoạt tính chống ung thư nào được báo cáo [58]. Lundberg (2005) đã bào chế một hỗn dịch với triolein là pha dầu và dipalmityl-phosphatidylcholin làm chất nhũ hóa chính. Tween 80 và PEG-dipalmitoyl osphatidylethanolamin được sử dụng làm chất ổn định. Đông khô hỗn dịch này với dextrose 5% tạo thành một sản phẩm ổn định, có thể tạo dung dịch hợp thành với nước pha tiêm [39].

Constantinides và cộng sự (2000) đã bào chế và đánh giá một công thức vi nhũ tương PTX với nồng độ 8 - 10 mg/ mL, dự đoán ít phản ứng quá mẫn hơn. Dược chất giải phóng từ sản phẩm này chậm hơn so với Taxol[®], cả khi có hay không có sự hiện diện của albumin huyết thanh người. Các nhũ tương chứa tocopherol được dung nạp tốt hơn và hiệu quả hơn so với Taxol[®] trong các mô hình khối u ác tính ở chuột thí nghiệm. Các thử nghiệm quá mẫn được thực hiện trên lợn Ghine cho thấy Taxol[®] gây ra hiện tượng mũi thường xuyên bị chảy nước, run rẩy, hắt hơi, rụng tóc, co giật hoặc khó thở, với mức độ quá mẫn tương đương với cấp độ 3 trong khi dạng vi nhũ tương có triệu chứng rụng tóc và ít run rẩy hơn, với cấp độ 1 [57].

Adwoa O.Nornoo và cộng sự (2008) đã nghiên cứu bào chế hai vi nhũ tương không chứa cremophor bao gồm lecithin: butanol: myvacet: nước (LBMW) và capmul: myvacet: nước (CMW) với PTX để tiêm tĩnh mạch. Sáu chất hoạt động bề mặt và bốn loại dầu được sàng lọc với cách kết hợp khác nhau cho độ tan PTX tối đa. Các dạng vi nhũ tương sau đó được xác định trong gián đồ ba pha. Độc tính gây độc tế bào trên dòng tế bào ung thư vú người MDA-M231 và khả năng tán huyết được đánh giá so với Taxol[®]. Độ tan PTX trong dầu myvacet đã tăng lên 1389 lần so với độ tan trong nước. LBMW có diện tích vi nhũ tương lớn hơn (46,5% trên gián đồ bậc ba) so với CMW (18,6%) [48].

1.2.2.3. Tiền chất

Mellado và cộng sự (1984) trong quá trình phát triển acetyl-paclitaxel đã ghi nhận rằng nhóm -OH ở vị trí C-2 được ưu tiên nhất vì nó có thể thủy phân dễ dàng bằng enzym hoặc cơ chế hóa học. Một số dẫn chất PTX ester hóa C-2^L với acid succinic, acid glutaric và acid sulfonic đã cải thiện độ tan trong nước và có tác dụng *in vivo* tuy nhiên chúng không ổn định trong môi trường nước. Một số dẫn xuất phosphat C-2^L và C-7^L của PTX được tổng hợp bởi Nuijen, Vyas và cộng sự (2014) đã cải thiện độ tan nhưng các nghiên cứu phóng thích hoạt chất *in vitro* không có kết quả, và hoạt tính *in vivo* ở chuột mang khối u M109 là không đáng kể [42].

Ueda và cộng sự (1993) tổng hợp các dẫn xuất của PTX có nhóm este phosphonoxyphenyl-propionat ở vị trí C-2^L và C-7^L, cải thiện độ hòa tan và dễ dàng phóng thích PTX. Dẫn xuất C-7^L cho thấy hoạt tính tương đương với PTX trên mô hình khối u M109. Nhóm nghiên cứu cũng bào chế tiền chất 2' -Oxycarbonyl paclitaxel, có sự ổn định hơn khi có tác nhân hóa học và enzym thủy phân. Đây là một mô hình phóng thích hoạt chất *in vitro* rất tốt với sự tích lũy nhanh PTX trong tế bào ung thư đại tràng HCT 116 ở người [42].

Nicolaou và cộng sự (1993) nghiên cứu một nhóm các dẫn xuất được gọi là "protaxol", làm tăng độ hòa tan và khả năng cho PTX thực hiện phân tách riêng từ hỗn hợp *in-situ*. Khả năng gây độc tế bào *in vitro* của các protaxol này tương đương với PTX tự do, nhưng chúng vẫn chưa có được hoạt tính *in vivo* [42].

Steven và cộng sự (2004) đã bào chế Paclitaxel-7-carbonyl-cholesterol (Tax-Chol), một tiền chất PTX tính thân dầu. Sản phẩm của quá trình tổng hợp tạo thành công thức nano lipid (LN), cũng chứa folate-polyethylene glycol-cholesterol (f-PEG) -Chol) là phối tử nhắm vào thụ thể folate đánh dấu khối u (FR). Công thức mới này được thiết kế để kéo dài thời gian vận chuyển và nhắm đích có chọn lọc đến các tế bào khối u với biểu hiện FR khuếch đại [57].

1.2.2.4. Tiểu phân nano và hỗn dịch nano

Để giảm các tác động độc hại liên quan đến công thức thông thường được mô tả ở trên và giảm thiểu rủi ro kết tủa PTX khi pha loãng, một dạng bào chế tiểu phân nano

với PTX đã được nghiên cứu thành công và đưa ra thị trường vào năm 2005 với tên thương mại Abraxane[®]. Công nghệ cho sự hình thành tiểu phân nano liên quan đến một quá trình gắn kết chuyên biệt của albumin chưa bị biến đổi với phân tử PTX tạo ra khối liên hợp kích thước ~130nm. Hơn thế nữa, nab-paclitaxel có thời gian tiêm truyền là ngắn hơn nhiều so với dạng công thức PTX với cremophor[®] EL. Khi phối hợp PTX thành các hạt nano, các nghiên cứu đã chứng minh được tăng cường hoạt động của dược chất do những thay đổi trong phân bố mô và dược động học. Ngoài ra, các hạt nano có thể tránh được sự bắt giữ của hệ thống lưới nội mô và có thể ưu tiên tích tụ trong các khối u rắn. Nghiên cứu chỉ ra thuốc được phân phối trong các chất mang hạt nano dẫn đến kéo dài nồng độ của thuốc trong các khối u, giảm bớt sự phát triển của khối u và kéo dài thời gian sống của đối tượng thử nghiệm [44].

Li Mu và Sizhe Feng (2003) đã nghiên cứu việc sử dụng d- α -tocopheryl polyethylen- glycol 1000 succinat (vitamin E TPGS hoặc TPGS) như một chất nhũ hoá và chất nền mới để bào chế hạt nano. Các hạt nano bắt giữ PTX bằng kỹ thuật chiết xuất bay hơi dung môi cải tiến trong nhũ tương. Dạng bào chế cho phép đưa PTX đến các cơ quan đích như gan, lá lách, phổi, và lưu thông trong bạch huyết đến một mức độ nhất định, bằng cách sử dụng các hạt có kích thước khác nhau và thông qua các con đường khác nhau. Thí nghiệm dòng tế bào ung thư HT-29 cho thấy sau 24 giờ, tỷ lệ tiêu diệt tế bào khi sử dụng theo công thức hạt nano có thể cao hơn 13 lần so với thuốc thông thường trong điều kiện tương tự [21].

1.2.2.5. Bào chế cấu trúc liposom

Sharma và Straubinger (1994) đã bào chế công thức liposom chứa PTX sử dụng phospholipid với phosphatidylcholin (PC) tỷ lệ mol 1:33; với phosphatidylglycerol (PG chuyển hóa từ PC) tỷ lệ 9: 1. Các liposom ổn định trong hơn 2 tháng ở 4 °C và 1 tháng ở 20 °C [39].

Sampedro và cộng sự (1994) bào chế liposom dùng hỗn hợp của phospholipid là L-dimyristoyl phosphatidylcholin (DMPC) và L-dimyristoylphosphatidyl glycerol (DMPG), có hoặc không có cholesterol, theo phương pháp bay hơi/ hydrat hóa. Sự kết hợp hai phospholipid theo tỷ lệ 7 : 3 và 9 : 1, với việc bổ sung 5% cholesterol (kl/kl),

mang lại kết quả tối ưu. Độc tính trên tế bào của các công thức liposom trên tế bào L1210 cho thấy là lớn hơn đáng kể so với PTX thông thường [42].

Crosasso và cộng sự (2000) đã bào chế các liposom chứa PTX có đặc tính ổn định. Nhóm nghiên cứu cũng so sánh PTX dạng liposom thông thường với liposom nạp PTX trong điều kiện nghiên cứu ổn định dài hạn và vô trùng. Mặt khác, những liposom này có thể lưu thông trong máu trong thời gian dài. Các liposom PEGylated được điều chế bằng cách sử dụng PTX với phospholipid và cholesterol theo tỷ lệ mol là 1 : 30 (dược chất : lipid). Công thức chứa phosphatidylcholin lòng đỏ trứng (PC) và phosphatidylglycerol (PG chuyển hóa từ PC) theo tỷ lệ 9 : 1 và PTX và lipid trong tỷ lệ mol là 1 : 30 được tìm thấy có hiệu quả kết hợp là 95%. Công thức này giữ được 90% hàm lượng thuốc trong thời gian nghiên cứu 2 tháng ở 4 °C [12].

1.2.2.6. Dạng micel

Sung Chung Kim và cộng sự (2001) đã bào chế PTX chứa các micel dạng polyme phân hủy sinh học bằng cách sử dụng chất xúc tác trọng lượng phân tử thấp, không độc hại. Polyme phân hủy sinh học được gọi là monomethoxy poly (ethylen glycol) -block-poly (D, L-lactide) (mPEG-PDLLA), và thông số dược động học đã được đánh giá. Các micel polymer đã được bào chế bằng kỹ thuật phân tán rắn. Hiệu quả chống ung thư *in vivo* đã được đánh giá trên khối u buồng trứng và khối u vú được cấy ghép trên chuột. Ở những con chuột được dùng dạng micel polymer có phản ứng đáp ứng chống ung thư cao gấp ba lần so với Taxol® [58].

1.2.2.7. Sử dụng dẫn chất của Cyclodextrin

Cserhati và cộng sự (1995) đã cải thiện độ tan PTX bằng cách sử dụng hydroxylpropyl- β -cyclodextrin (HP- β -CyD). Nghiên cứu đã chỉ ra rằng do PTX có cấu trúc khung taxan lớn nên tạo được phức bao với β - và γ -CyD là những chất có các khoang thân dầu lớn so với α -CyD. Các phức hợp hình thành với HP- β -CyD ổn định hơn các phức với HP- γ -CyD hoặc γ -CyD. Tuy nhiên, nghiên cứu cũng cho thấy một lượng lớn cyclodextrin (CyD) là cần thiết để phối hợp đủ liều lâm sàng của PTX, do đó gây ra độc tính đáng kể cho thận và gây tan huyết [42].

1.2.2.8. Dạng đông khô

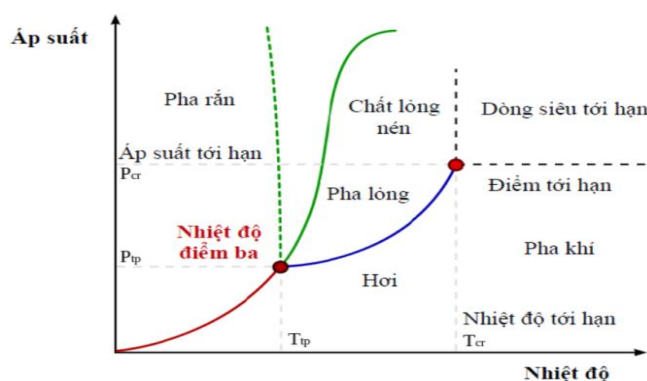
Các nghiên cứu về thuốc ung thư PTX dạng đông khô chưa được tiến hành nghiên cứu đầy đủ, đa số ứng dụng ở các loại dược chất khác. Chế phẩm thuốc ung thư nếu bào chế dạng đông khô có nhiều ưu điểm là tiến hành ở nhiệt độ thấp nên tốc độ phản ứng phân hủy dược chất ở mức thấp, thuốc dễ dàng hòa tan nhanh, tính ổn định của sản phẩm cao, nên có nhiều triển vọng trong sản xuất thuốc tiêm. Quá trình đông khô phụ thuộc vào tính chất của hoạt chất, tá dược và điều kiện của quá trình đông lạnh và làm khô. Một công thức có thể chứa một hoặc nhiều tá dược và các tá dược đảm nhiệm một hay nhiều chức năng [5], [35], [44], [46] như trong Bảng 1.2.

Bảng 1.2. Các yếu tố dung môi và tá dược khảo sát trong bào chế dạng đông khô

Yếu tố	Thành phần khảo sát	Tác dụng lên quá trình đông khô
Dung môi	Ethanol, DMSO, Tert-butanol	Dùng phổ biến để hòa tan các dược chất khó tan và tá dược để đông khô
Tá dược tạo phức	HP- β -CyD	Sử dụng phổ biến cải thiện độ tan cho thuốc tiêm
Tá dược ổn định	Tween 80, Ploxamer HPMC, PVP K30 PEG 400	Chất diện hoạt Tăng độ nhớt Trợ tan
Tá dược tạo khối	Manitol, Lactose, Leucin, Arginin	Là những tá dược phổ biến dùng tạo khối xốp khi đông khô.

a. Quá trình đông khô

Quá trình đông khô có thể chia làm 3 giai đoạn chính là đông lạnh, làm khô sơ cấp và làm khô thứ cấp theo nguyên tắc giản đồ 3 pha (Hình 1.3).



Hình 1.3. Giản đồ pha áp suất-nhiệt độ của một chất, điểm tới hạn khí-lỏng (vapor-liquid critical point).

- Đông lạnh: Trong giai đoạn này cần nghiên cứu hạ nhiệt độ mẫu xuống thấp hơn nhiệt độ điểm ba (triple point - nhiệt độ mà tại đó pha rắn và pha lỏng cùng tồn tại).

- Làm khô sơ cấp: Trong giai đoạn này, áp suất được làm giảm xuống còn khoảng vài millibar, nhiệt độ tăng lên từ từ để nước thăng hoa. Khoảng 95% nước (nước tự do) thăng hoa trong giai đoạn này.

- Làm khô thứ cấp: Mục tiêu của giai đoạn này là loại bỏ các phân tử nước không đóng băng, nước hấp phụ. Trong giai đoạn này, nhiệt độ tăng lên so với giai đoạn làm khô sơ cấp, có thể trên 0 °C, nhằm phá vỡ tương tác hóa lý hình thành giữa phân tử nước và vật liệu [46], [47].

b. Tá dược

- Dung môi

+ Ethanol: có khả năng hòa tan PTX tốt nhưng lại có nhiều hạn chế như nhiệt độ đông đặc của ethanol là -120 °C nên cần điều kiện nhiệt độ thấp và thời gian dài trong giai đoạn tiền đông, ngoài ra, dung dịch phức PTX và HP- β -CyD trong dung môi ethanol không bền (xuất hiện tủa sau 15 phút mặc dù đã sử dụng HP- β -CyD với lượng tối đa cho phép và tá dược tăng độ nhớt PVP K30) [35].

+ Tert-butanol: nhiều nghiên cứu đã chứng minh tert-butanol có thể thay thế ethanol vì khả năng đông rắn tốt, tạo điều kiện thuận lợi cho giai đoạn làm khô [35].

+ DMSO: có khả năng hòa tan PTX tốt và một vài trường hợp được sử dụng làm dung môi hòa tan trong các chế phẩm đông khô [35].

- Hệ đệm

Hệ đệm làm tăng độ ổn định của dược chất trong quá trình đông khô, thành phẩm và dung dịch pha lại trước khi sử dụng. Tùy theo bản chất dược chất, độ ổn định của hoạt chất, sử dụng hệ đệm thích hợp theo Bảng 1.3 [32], [35].

Bảng 1.3. Một số hệ đệm dùng trong công thức đông khô

Hệ đệm	Khoảng pH	Hệ đệm	Khoảng pH
Acetat-acetic	3,8 - 5,8	Phosphat	3,0 - 8,0
Benzoat-benzoic	6,0 - 7,0	Glycin	8,8 - 10,8
Citrat-citric	2,1 - 6,2	Tromethamin (TRIS, THAM)	7,1 - 9,1
Lactat-lactic	2,1 - 4,1		

- Tá dược tạo khối/ độn

Trong một số công thức đông khô, tỷ lệ hoạt chất rắn hòa tan trong dung môi ở mức thấp, vì vậy cần có thêm tá dược độn. Mặt khác, yêu cầu của khối bột sau đông khô cần xốp, dễ hòa tan hoặc phân tán lại, vì vậy cần phải có một tá dược tạo khung. Các tá dược độn thường dùng là manitol, lactose, glucose, maltose, sorbitol, glycin, PEG, natri clorid, cyclodextrin (CyD) và dẫn chất hoặc hỗn hợp tá dược. Tá dược có cấu trúc tinh thể tạo khối thuốc đông khô đẹp, tính chất cơ học tốt [35], [47].

- Tá dược ổn định phức

Để ổn định phức tạo thành theo thời gian đạt yêu cầu trị liệu, một số polymer được sử dụng trong công thức đông khô như polysorbat 80 (tween 80), hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) hoặc polyvinyl pyrrolidon K30 (PVP K30), polyethylen glycol 400 (PEG 400), poloxamer 188 [35] với vai trò làm tăng độ nhớt (PVP K30), trợ tan (PEG 400), chất điện hoạt (tween 80, poloxamer 188).

- Chất tạo sự đẳng trương

Trong vài trường hợp, cần có một công thức đẳng trương để an toàn cho việc sử dụng thuốc đường tiêm hay để ổn định dược chất. Các tá dược như manitol, sucrose, glycin, glycerol và natri clorid là những chất tạo sự đẳng trương thường dùng. Tá dược tạo đẳng trương thường được pha sẵn trong dung môi để pha loãng khi sử dụng hơn là có mặt trực tiếp trong thành phần công thức đông khô [35].

1.3. HYDROXYPROPYL- β -CYCLODEXTRIN

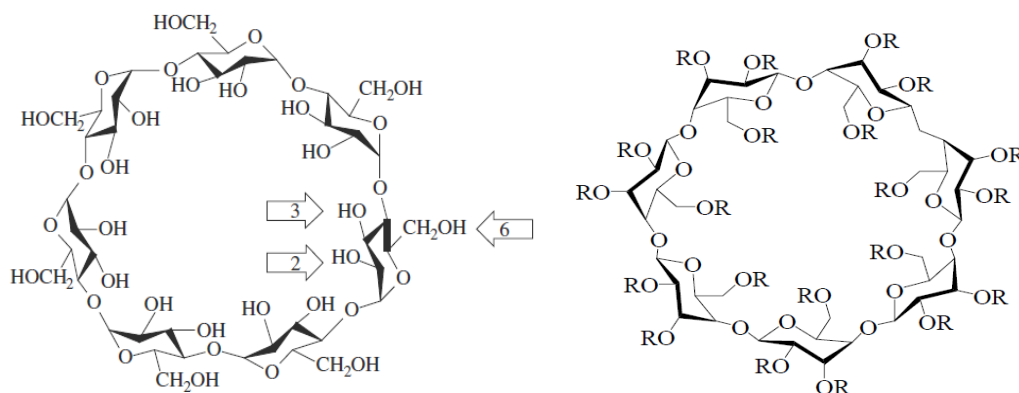
Trong các phương pháp trên, cải thiện độ tan của PTX trong nghiên cứu bào chế dạng thuốc tiêm bằng cách sử dụng dung môi, chất trợ tan và cách tạo phức với dẫn chất của β -cyclodextrin là hai trong các phương pháp có tính khả thi được lựa chọn áp dụng trong điều kiện Việt Nam.

1.3.1 Cấu trúc, công thức và tính chất của cyclodextrin

1.3.1.1. Cấu trúc

- Cyclodextrin (CyD) là oligosaccharid dạng vòng gồm 6 (α -CyD), 7 (β -CyD), 8 (γ -CyD) hoặc nhiều đơn vị glucopyranose liên kết với nhau qua nối $\alpha - (1,4)$. Trong các CyD, β -CyD và dẫn xuất của nó được dùng phổ biến nhất. Các glucopyranose có 1

nhóm –OH bậc 2 ở vị trí C₂, C₃ và 1 nhóm –OH bậc 1 ở vị trí C₆ là cơ sở để điều chế các dẫn xuất CyD (Hình 1.4) [11] [56].



Hình 1.4. Cấu trúc β -CyD và các dẫn xuất
 “Nguồn *Scientia Pharmaceutical, 2008*” [56]

- Dẫn xuất CyD đã được tổng hợp nhằm khắc phục độ tan kém trong nước của các CyD tự nhiên (đặc biệt là β -CyD). Các dẫn xuất được tạo thành từ phản ứng amin hóa, ester hóa hoặc ether hóa các nhóm Hydroxyl của CyD (bậc 2 ở C₂, C₃ và bậc 1 ở C₆). Một số tính chất của CyD và các dẫn xuất trình bày trong Bảng 1.4. Tùy thuộc vào nhóm thế, các dẫn xuất CyD có độ tan khác nhau. Dẫn xuất CyD giúp cải thiện độ tan, độ ổn định của phức trước ánh sáng, sự oxy hóa và giúp tăng hoạt lực của hoạt chất [56].

Bảng 1.4. Tính chất lý hóa của một số dẫn xuất CyD trong dược phẩm

Cyclodextrin	Nhóm thế R	M (Da)	Độ tan trong nước, 25 °C (mg/mL)
α -CyD	-H	972	145
β -CyD	-H	1135	18,5
2-Hydroxypropyl- β -CyD	-CH ₂ CHOHCH ₃	1400	> 600
Natri Sulfobutylether β -CyD	-(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻ Na ⁺	2163	> 500
Methyl- β -CD	-CH ₃	1312	> 500
6-O-Maltosyl- β -CyD	Maltosyl ⁻	1459	> 1500
γ -CyD	-H	1297	232
2-Hydroxypropyl- γ -CyD	-CH ₂ CHOHCH ₃	1576	> 500

“Nguồn *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2012*” [11]

1.3.1.2. Tính chất HP- β -CyD

- Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin (HP- β -CyD) được tạo thành từ phản ứng giữa propylen oxyd với β -CyD dưới tác nhân bazơ.
- HP- β -CyD là bột vô định hình màu trắng, phân tử có đường kính khoang bên trong khoảng 0,62 nm. Dẫn xuất này tan rất tốt trong nước (65 g/100 mL nước ở 25 °C), tan trong propylen glycol và PEG 400, tan ít trong ethanol và ether, hầu như không tan trong chloroform và aceton.
- HP- β -CyD trợ tan PTX tốt nhất so với các CyD cùng nhóm (độ tan của PTX trong nước có thể tăng lên 2000 lần khi tạo phức với HP- β -CyD trong khi các CyD chỉ từ 200 - 800 lần) nên được ứng dụng nhiều trong việc nâng cao độ tan của các dược chất khó tan dùng trong chế phẩm tiêm và tiêm truyền tĩnh mạch [11].

1.3.2. Một số chế phẩm đường tiêm sử dụng CyD và dẫn chất CyD

CyD và dẫn chất được sử dụng trong nhiều công thức thuốc tiêm, thuốc nhỏ mắt trên thị trường tuy nhiên chưa thấy ứng dụng cho chế phẩm PTX (Bảng 1.5) [30].

Bảng 1.5. Một số chế phẩm thuốc tiêm có chứa cyclodextrin

Hoạt chất/CD	Tên biệt dược	Đường sử dụng	Nhà sản xuất (Thị trường)
<i>α-Cyclodextrin</i>			
Alprostadil	Caverject Dual	i.v	Pfizer (Châu Âu)
	Prostavastin	i.v	Ono (Nhật), Schwarz (Châu Âu)
<i>2-Hydroxypropyl-β-Cyclodextrin</i>			
Itraconazole	Sporanox	i.v	Janssen (Châu Âu, Mỹ)
Mitomycin	MitoExtra MitoZytrex	i.v	Novartis (Châu Âu)
<i>Sulfobutylether β-cyclodextrin</i>			
Aripiprazole	Abilify	i.m	Bristol-Myers Squibb (Mỹ) Otsuka Pharm. (Mỹ)
Maropitant	Cerenia	i.v	Pfizer Animal Health (Mỹ)
Voriconazole	Vfend	i.v	Pfizer (Mỹ, Châu Âu, Nhật)
Ziprasidone mesylate	Geodon, Zeldox	i.m	Pfizer (Mỹ, Châu Âu)
<i>2-Hydroxypropyl-γ-cyclodextrin</i>			
Tc-99 Teoboroxime	Cardio Tec	i.v	Bracco (Mỹ)

1.4. KIỂM NGHIỆM THUỐC TIÊM DẠNG DUNG DỊCH ĐẬM ĐẶC VÀ BỘT ĐÔNG KHÔ - KHẢO SÁT ĐỘ ỔN ĐỊNH

1.4.1. Kiểm nghiệm thuốc tiêm

1.4.1.1. Chỉ tiêu chất lượng

a. Sơ bộ đánh giá chất lượng sản phẩm

- Đánh giá cảm quan:

+ Dạng dung dịch phải trong [60].

+ Bột đông khô phải đảm bảo đạt các yêu cầu chung của chế phẩm đông khô gồm hình thức khối thuốc, tốc độ tan, độ trong sau khi pha loãng với dung môi [50].

- pH dung dịch sau pha loãng; độ ổn định trong 24, 48 và 72 giờ sau khi pha loãng.

b. Định lượng tạp và hàm lượng hoạt chất sau khi hoàn nguyên trong dung môi

+ Mức chất lượng tương ứng chuyên luận riêng của dạng chế phẩm tiêm truyền chứa cùng loại hoạt chất được quy định trong Dược điển hiện hành.

+ Bột đông khô sau khi hoàn nguyên trong dung môi được định lượng hoạt chất tương ứng chuyên luận riêng quy định trong Dược điển hiện hành của dạng chế phẩm tiêm truyền chứa cùng loại hoạt chất được.

c. Nội độc tố và độ vô khuẩn: Theo mức chất lượng Dược điển hiện hành đối với thuốc tiêm truyền chứa cùng loại hoạt chất.

1.4.1.2. Thẩm định phương pháp

- Thông số thẩm định được tiến hành trong phương pháp định lượng và xác định tạp.

- Các thông số bao gồm [60]: Tính phù hợp hệ thống; Tính đặc hiệu; Tính tuyến tính và khoảng xác định; Độ chính xác; Độ đúng; Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng đối với chỉ tiêu xác định tạp

1.4.2. Độ ổn định thành phẩm

Độ ổn định được tiến hành để đảm bảo tính toàn vẹn của dược chất trong dạng bào chế và trong quá trình tiến hành thử nghiệm nghiên cứu tiền lâm sàng. Thành phẩm thuốc (Finished Pharmaceutical Product - FPP) phải duy trì đặc tính lý, hóa, giới hạn vi sinh vật, hàm lượng tương đương ở nồng độ tác dụng và mức độ độc tính trong thời hạn sử dụng. Thử nghiệm độ ổn định của các thành phần dược chất mới và thành phẩm

đã được hòa hợp ở cấp độ toàn cầu bao gồm hướng dẫn của WHO và ICH [29] [41] [64].

1.4.2.1. Chỉ tiêu đánh giá chung

Các nghiên cứu về tính ổn định nên bao gồm việc kiểm tra các chỉ tiêu cho biết tính ổn định của thành phẩm thuốc, tức là những chỉ tiêu dễ bị thay đổi trong quá trình lưu trữ và có khả năng ảnh hưởng đến chất lượng, an toàn và hiệu quả.

- Đối với dạng thuốc tiêm thể tích nhỏ, chỉ tiêu đánh giá bao gồm độ trong (dạng dung dịch), màu sắc, giới hạn tiểu phân, pH, độ vô trùng, nội độc tố.

- Đối với dạng bột pha tiêm, cần tiến hành thêm chỉ tiêu dung dịch hợp thành và đánh giá độ ổn định trong suốt thời gian sử dụng của dung dịch hoàn nguyên như khuyến cáo trên nhãn.

1.4.2.2. Thông số của điều kiện đánh giá độ ổn định đối với chế phẩm

Trong điều kiện Việt Nam, qui định áp dụng điều kiện nhiệt độ và độ ẩm cho vùng IVB [29] [64].

Bảng 1.6. Phân loại vùng và điều kiện bảo quản

Vùng	Loại khí hậu	Bảo quản thường	Bảo quản lạnh	Bảo quản cấp đông
I	Ôn đới	21 °C ± 2 °C 45 % ± 5% RH		
II	Địa trung Hải/ Cận nhiệt đới	25 °C ± 2 °C 60 % ± 5% RH		
III	Nóng, khô	30 °C ± 2 °C 35 % ± 5% RH	5 °C ± 3 °C	-15 °C ± 5 °C
IVA	Nóng ẩm/ nhiệt đới	30 °C ± 2 °C 65 % ± 5% RH		
IVB	Nóng/ độ ẩm cao	30 °C ± 2 °C 75 % ± 5% RH		

1.5. NGHIÊN CỨU TIỀN LÂM SÀNG

Trong quá trình nghiên cứu bào chế thuốc, giai đoạn nghiên cứu tiền lâm sàng thường sử dụng thuốc đối chứng là một chế phẩm thương mại thường là thuốc gốc hoặc thuốc biệt dược được đánh giá đạt chất lượng so sánh với chế phẩm bào chế.

1.5.1. Động vật thí nghiệm

Giai đoạn nghiên cứu tiền lâm sàng trên động vật thí nghiệm thường sử dụng nhiều

hơn một loài. Thỏ và chuột là 02 loài phổ biến trong các nghiên cứu này [14] [43].

1.5.2. Chỉ tiêu và thông số trong thử nghiệm tiền lâm sàng

1.5.2.1. Đánh giá độc tính [22]

- Bao gồm thiết lập liều dung nạp tối đa (Maximal tolerated dose MTD) dựa trên liều chết tối thiểu gần đúng từ đó xác định liều khởi đầu trong các thử nghiệm pha I.
- Độc tính cấp trên động vật thí nghiệm chủ yếu là xác định liều chết trung bình, tức là liều làm chết 50% số con vật thí nghiệm trong những điều kiện thí nghiệm nhất định và ký hiệu LD₅₀ (Lethal Dose 50).
- Ngoại suy liều LD₁₀₀: Trường hợp đã dùng 4 liều trở lên rồi mà liều cao nhất vẫn không làm chết 100% các con vật trong nhóm (chưa có liều LD₁₀₀). Nhưng nếu liều cao nhất đó đã làm chết khoảng từ 90% trở lên các con vật trong nhóm thì có thể ngoại suy ra là: thêm một nhóm nữa dùng liều bằng liều cao nhất đã thử, cộng thêm một bước nhảy liều thì các con vật sẽ chết 100%.
- Ngoại suy liều LD₀: Trường hợp đã dùng 4 nhóm liều trở lên rồi mà liều thấp nhất vẫn có con chết, nhưng tỉ lệ này không quá 10% thì có thể tính toán mà không cần thử thêm liều thấp hơn; hoặc có thể ngoại suy bằng làm thêm một nhóm, dùng liều bằng liều thấp nhất đã thử, trừ đi một bước nhảy liều thì các con vật sẽ sống 100%.

1.5.2.2. Nghiên cứu dược động học và phân bố thuốc trong huyết tương và trên mô động vật thí nghiệm

Việc đánh giá các thông số động học, ví dụ như nồng độ đỉnh trong huyết tương (C_{max}) và diện tích dưới đường cong (AUC), ở liều gần với liều dung nạp tối đa (MTD) trên các loài động vật trong nghiên cứu tiền lâm sàng có thể tạo điều kiện tăng liều trong giai đoạn nghiên cứu pha I. Thông tin thêm về quá trình hấp thu, phân bố, thải trừ hoặc chuyển hóa (ADME) trên động vật thường được cung cấp trước khi tiến hành các nghiên cứu pha II/ III [14] [52] .

a. Xử lý mẫu trong phân tích

Thời điểm thuốc trong máu giảm nhanh có thể chọn làm thời điểm lấy mô vì ở giai đoạn này, thuốc có xu hướng thoát ra khỏi lòng mạch và phân bố vào mô. Trước khi đưa mẫu sinh học vào phân tích, mẫu (nguồn gốc huyết tương hoặc mô) phải được xử

lý và làm sạch. Có nhiều cách chiết mẫu khác nhau bao gồm kết tủa protein (PP), chiết lỏng - lỏng (LLE) và chiết pha rắn (SPE). Lượng thuốc trong mẫu phải được chiết ra với độ phục hồi cao nhất có thể [26] [39] [63].

b. Thẩm định quy trình định lượng dược chất trong dịch sinh học

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) là một trong những kỹ thuật tốt nhất để định lượng dược chất trong dịch sinh học bởi tính đặc hiệu, khả năng tách, độ nhạy và độ ổn định cao cũng như mức độ trang bị phổ biến tại các phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, quá trình phân tích dược chất trong dịch sinh học chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như nồng độ dược chất thấp, nhiều tạp nội sinh (lipid, protein, chất chuyển hóa) và sự khác nhau giữa các cá thể, vì thế phương pháp định lượng cần phải được thẩm định để bảo đảm độ tin cậy [4] [16] [17] [19].

Bảng 1.7. Thông số áp dụng trong thẩm định quy trình định lượng trong dịch sinh học

STT	Yêu cầu thẩm định	FDA	EMA
1	Tính phù hợp hệ thống	+	+
2	Tính đặc hiệu	+	+
3	Tính tuyến tính và khoảng xác định	+	+
4	Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)	+	+
5	Độ đúng, độ chính xác trong ngày và liên ngày	+	+
6	Tỷ lệ thu hồi - hiệu suất chiết	+	Không đề cập
7	Độ ổn định dung dịch chuẩn gốc và mẫu phân tích trong dịch sinh học ở điều kiện tiến hành và bảo quản	+	+

1.6. MỘT SỐ CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU VỀ PACLITAXEL

1.6.1. Chế phẩm thương mại hóa từ nghiên cứu thành phần công thức bào chế

1.6.1.1. Dung dịch tiêm

Abraxane[®]: PTX gắn với albumin hình thành hạt nano tạo sự thuận lợi cho sự phân bố và hiệu quả chống ung thư của PTX trong tế bào. Abraxane[®] có liên quan với một tỷ lệ quá mẫn và có thể liên quan đến sự tăng hấp thu bên trong khối u. Abraxane[®] đã được chứng minh hiệu quả trong ung thư tuyến tiền liệt và di căn tiên triển, được chấp thuận đơn trị liệu trong ung thư vú di căn [44].

Paclitaxel poliglumex (PPX) hay CT-2103 (tên thương mại Xytotax[®] hay gần đây là Opaxio[®]): Một dạng polymer phân hủy sinh học mới từ liên kết PTX và axit α -poly-L-glutamic. Dạng bào chế được thiết kế để tăng cường độ hòa tan của PTX phần kỵ nước và tăng tính thấm khối u chọn lọc. Công thức mới này của PTX không chứa CrEL và do đó chỉ định ban đầu với steroid và thuốc kháng histamin là không cần thiết, và hợp chất này có thể được truyền một cách an toàn bằng đường một tĩnh mạch ngoại vi trên 10-20 phút mỗi 3 tuần [45].

EndoTAG-1 (EndoTAG + Paclitaxel): PTX dạng liposom được cation hóa. EndoTAG-1 không chứa Cremophor[®]EL (CrEL) được thiết kế với cùng một mục đích như doxorubicin dạng liposom, với mục tiêu cuối cùng là cải thiện hiệu quả và giảm độc tính trên cấu tạo của hợp chất nguyên thủy CrEL – paclitaxel. Ngoài ra dữ liệu tiền lâm sàng của EndoTAG-1 cho thấy các liposome cation hóa nhắm vào các tế bào nội mô tạo máu trong các khối u. EndoTAG-1 có liên quan đến sự ảnh hưởng lên vi mạch khối u bằng cách gây suy giảm chức năng hoạt động tế bào [45].

Polymeric-micellar paclitaxel (Genexol-PM[®]): Một công thức có thể coi như làm mới gốc taxan của PTX với một hạt nano polymer-micellar phân hủy sinh học. Về mặt lý thuyết, lượng copolymer dư làm tăng độ tan trong nước của phần kỵ nước và cho phép phân bố liều cao PTX. *In vitro*, tác dụng chống ung thư rõ rệt hơn so với CrEL-PTX thông thường trong một loạt các dòng tế bào khối u [45].

DHA-paclitaxel (Taxoprexin[®]): Một axit béo tự nhiên, axit docosahexaenoic (DHA) thông qua một liên kết ester với PTX 2'-oxy tạo dạng axit béo PTX kết hợp (DHA-paclitaxel). Tiền đề cho nghiên cứu này là giả thiết rằng một số axit béo tự nhiên sẽ được cung cấp nhiều cho các khối u để sử dụng như tiền chất sinh hóa và là nguồn năng lượng. Giả thiết này cuối cùng đã được thử nghiệm thông qua liên kết DHA, một axit béo tự nhiên và PTX để tạo ra một liên kết hóa học mới có khả năng nhắm vào các khối u tốt hơn và giảm độc tính đối với các mô bình thường [45].

Nhận xét: Những nghiên cứu cải tiến công thức bào chế dạng dung dịch tiêm hầu hết triển khai nghiên cứu tiền lâm sàng *in situ* so sánh với thuốc đối chứng để đánh giá hiệu quả trên tế bào dòng khối u hoặc trên bệnh nhân.

1.6.1.2. Bột đông khô pha tiêm: Rất ít nghiên cứu bột đông khô chứa PTX được công bố. Các nghiên cứu bào chế dạng này chứa được chất thuộc nhóm thuốc điều trị ung thư cũng theo hướng có báo cáo thử nghiệm tiền lâm sàng trong quá trình nghiên cứu J. Q. Zhang, Z. R. Zhang và cộng sự (2005) đã nghiên cứu bào chế đông khô PTX dạng liposom từ tính. Nghiên cứu cho thấy rằng dạng đông khô của liposom từ tính này có hiệu quả khi nhắm tới khối u và tạo ra hoạt tính chống ung thư đáng kể với ít tác dụng phụ hơn trong mô hình động vật được cấy ghép khối u (xenograft) [69].

Nhận xét: Từ các công trình trên, cải thiện độ tan của PTX bằng cách sử dụng dung môi, chất trợ tan và cách tạo phức với dẫn chất của cyclodextrin là hai trong các phương pháp có tính khả thi có thể áp dụng trong nghiên cứu công thức bào chế thuốc tiêm chứa PTX dạng dung dịch đậm đặc và bột pha tiêm. Độ ổn định của chế phẩm sẽ khảo sát sau khi pha vào dung môi pha tiêm và trong lọ tiêm ở điều kiện vùng IVB. Một số chỉ tiêu khác của dạng bột đông khô như độ ẩm, dung dịch hợp thành cũng sẽ được khảo sát trong quá trình nghiên cứu.

1.6.2. Nghiên cứu tiền lâm sàng trong xây dựng công thức thuốc tiêm PTX

1.6.2.1. Quy trình định lượng PTX trong dịch sinh học

Guo Wei, Jenifer L. Johnson và cộng sự (2005) định lượng PTX trong huyết tương và mô chuột sau khi tiêm dạng bào chế liposom của PTX. Dịch đồng nhất hoá được thêm vào dung môi chiết acetonitril chứa 0,1% acid acetic. Thêm nội chuẩn doxetaxel vortex, ly tâm, phần dịch được lấy để tiến hành sắc ký. Điều kiện sắc ký là Cột ODS₃, pha động methanol - nước - tetrahydrofuran (70 : 27,5 : 2,5), tốc độ dòng 1 mL/phút và phát hiện ở bước sóng 230 nm [26].

Ling Zhao, Wei Yu-Meng và cộng sự (2009) xác định phân bố trong mô thỏ của PTX sau khi tiêm chế phẩm chứa PTX. Kỹ thuật chiết pha rắn (SPE) đã được sử dụng để tách chiết PTX từ mô và tiến hành sắc ký ở điều kiện cột pha tĩnh C, pha động acetonitril - methanol - đệm ammonium acetat (pH 5.0) 0.02 M (20 : 47.5 : 32.5), và phát hiện ở bước sóng 230 nm [39].

Shane Bermingham (2010) xác định PTX trong huyết tương bệnh nhân với phương pháp chiết pha rắn (SPE) để tách PTX và phương pháp sắc ký lỏng với đầu dò UV

bước sóng 234 nm. Chương trình pha động gradient với pha A gồm acid formic 0,1 % trong hỗn hợp nước/ acetonitril pH 3,5 (90 : 10) và pha B gồm acid formic 0,1 % trong hỗn hợp acetonitril/ nước (90/ 10) [6].

Wang Ying, Ke-Chun Wu và cộng sự (2011) xác định phân bố PTX trong mô của thỏ sau khi tiêm PTX dạng nhũ dịch và chế phẩm thương mại. Điều kiện sắc ký sử dụng Cột RP8, pha động acetonitril-methanol-nước (4:1:5) chứa 0.01M ammonium acetat (pH 5); tốc độ dòng 1 ml/phút, phát hiện ở bước sóng 227 nm [63].

Liu Xiangrui, Sun Jiabei và cộng sự (2012) tiến hành xác định nồng độ PTX trong mô thỏ với điều kiện sắc ký là Cột C18, pha động acetonitril - methanol - ammonium acetat (pH 5; 0,02 M) (20 : 47,5 : 32,5). Nhiệt độ cột 30 °C, tốc độ dòng 1 mL/ phút, phát hiện ở bước sóng 230 nm [40].

Nhận xét: Từ các công trình nghiên cứu được công bố, điều kiện phân tích sắc ký để định lượng PTX trong dịch sinh học phù hợp với điều kiện thiết bị của phòng thí nghiệm sẽ được lựa chọn.

1.6.2.2. So sánh dược động học trên động vật thí nghiệm của thuốc tiêm chứa PTX

Bartoli và cộng sự (1990) so sánh hiệu quả của PTX trong cả hai công thức hạt nano và liposom với các dung dịch PTX trong DMSO và CrEL cả *in vitro* và *in vivo* trong các mô hình bệnh bạch cầu P388 và L1210. Nghiên cứu đã kết luận rằng công thức liposom PTX vượt trội hơn trên *in vitro* và *in vivo*, trong khi công thức nano thấy có độc tính chủ yếu là do thành phần các tá dược công thức.

Fujita và cộng sự (1994) nghiên cứu dược động học PTX trên động vật thí nghiệm với thông số trong máu [24] và nồng độ phân bố trong mô [25]. Kết quả thông số PTX trong huyết tương ở thỏ (7 mg /kg, 1 giờ tiêm truyền tĩnh mạch) là hai pha với thời gian bán thải là 0,36 và 6,36 giờ; AUC là 9,46 µg.hr/ml. Giá trị K_{12} lớn hơn K_{21} và V_2 lớn hơn V_1 , cho thấy PTX phân bố thuận lợi trong mô. AUC cao nhất được nhìn thấy ở gan, và tương đối cao ở tuyến tụy, thận, tuyến ức, ruột, dạ dày và phổi. Nồng độ PTX trong mô khối u không cao trong thời gian đầu, nhưng duy trì trong thời gian dài với thời gian bán thải là 12,3 giờ. Nồng độ thuốc trong não rất thấp.

Wang Feihu và cộng sự (2013) thử nghiệm sự phân bố PTX trong mô chuột. PTX (Taxol[®] và dạng bào chế DOMC-FA) được tiêm tĩnh mạch đuôi chuột với liều 9 mg/kg. Khi tiêm PTX liều 9 mg/kg, nồng độ PTX giảm dần theo thời gian trong các mô lần lượt gan > phổi > thận > lách [20].

Liu Xiangrui và cộng sự (2012) nghiên cứu phân bố PTX trên chuột nhắt với liều tiêm 15 mg/kg [40]. Dựa vào Bảng 1.8 và Bảng 1.9 cho thấy với liều tiêm tĩnh mạch duy nhất, nồng độ thuốc trong máu và mô giảm nhanh. Đến thời điểm 12 giờ, nồng độ thuốc trong hầu hết các cơ quan rất thấp hoặc không phát hiện được. Các mô có hệ số tưới máu lớn như gan, phổi, thận có nồng độ thuốc tập trung cao. Các mô khác như tụy, dạ dày, ruột, tim có nồng độ thuốc trung bình đến thấp. Ở não, nồng độ PTX là rất thấp. Ngoài ra, các thông số dược động học chính như $t_{1/2}$, K_{12} , K_{21} , K_{10} , V_c , CL cũng được tiến hành đánh giá trong nghiên cứu.

Bảng 1.8. Giá trị AUC_{0-8h} của Taxol[®] khi tiêm cho chuột với liều 15 mg/kg

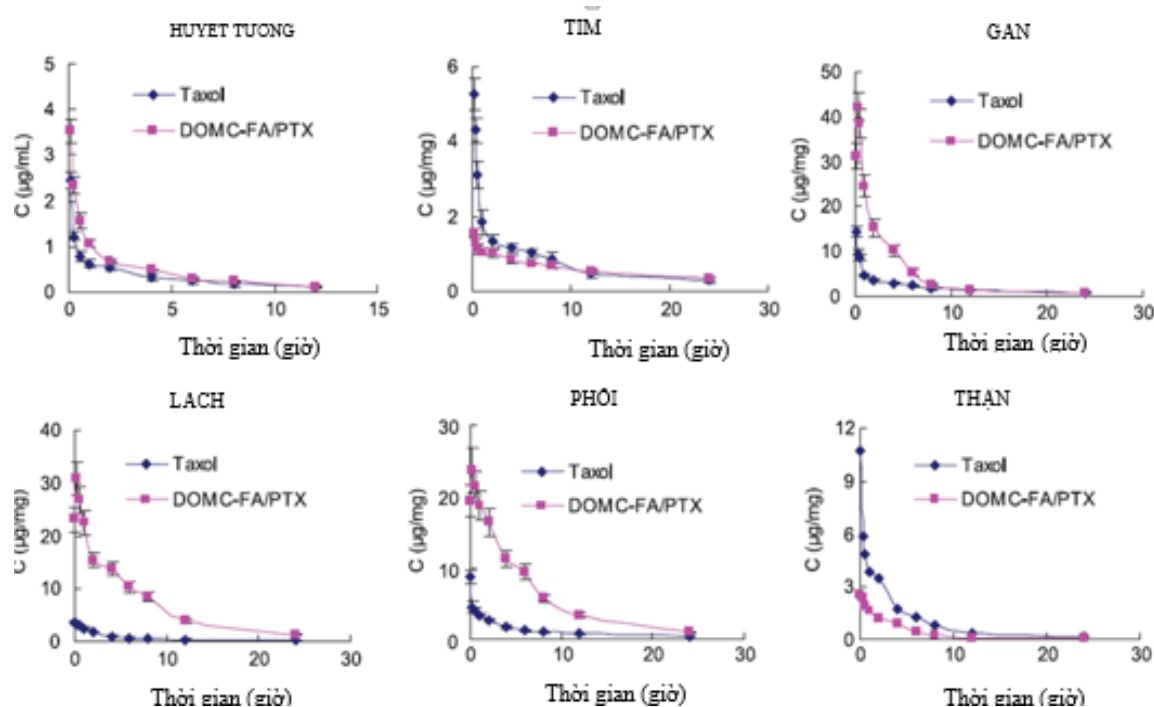
Cơ quan	AUC_{0-8h} ($\mu\text{g/g} \cdot \text{giờ}$)	Cơ quan	AUC_{0-8h} ($\mu\text{g/g} \cdot \text{giờ}$)
Gan	$58,55 \pm 12,04$	Buồng trứng	$4,43 \pm 0,65$
Thận	$34,94 \pm 3,02$	Tim	$16,54 \pm 3,27$
Phổi	$28,52 \pm 5,17$	Cơ	$9,67 \pm 0,39$
Lách	$33,70 \pm 11,29$	Ruột non	$25,53 \pm 0,96$

“Nguồn: *Journal of pharmacy and pharmacology, 2012*” [40]

Bảng 1.9. Giá trị AUC_{0-8h} ($\mu\text{g/g} \cdot \text{giờ}$) của PTX hỗn dịch khi tiêm với liều 15 mg/kg

Cơ quan	PTX hỗn dịch	Taxol	Cơ quan	PTX hỗn dịch	Taxol
Gan	$54,84 \pm 9,10$	$59,62 \pm 8,16$	Lách	$23,13 \pm 2,05$	$25,95 \pm 1,95$
Thận	$31,62 \pm 1,94$	$34,49 \pm 2,56$	Tim	$13,10 \pm 1,05$	$13,94 \pm 1,36$
Phổi	$23,81 \pm 2,58$	$27,48 \pm 3,97$	Buồng trứng	15,20	16,58

“Nguồn: *Journal of pharmacy and pharmacology, 2012*” [40]



Hình 1.5. So sánh phân bố của PTX trong một số tổ chức mô chuột thử nghiệm giữa chế phẩm Taxol® và DOMC-FA/PTX

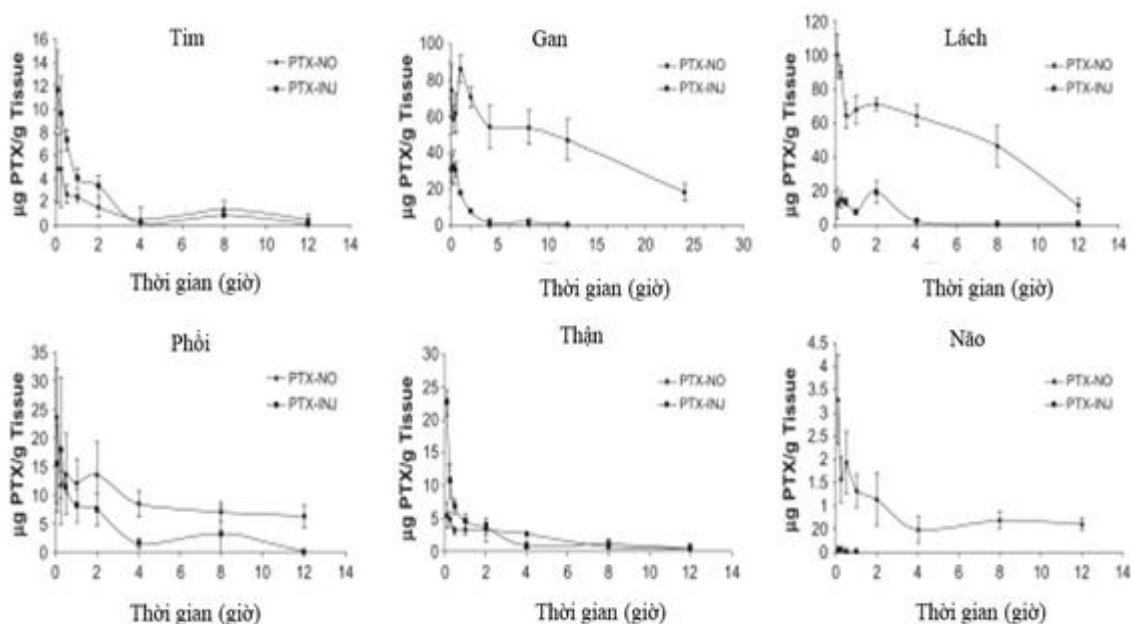
“Nguồn: *Journal of drug target*, 2013” [20]

Yonglu Wang và cộng sự (2011) đã nghiên cứu so sánh thông số dược động học của dạng bào chế hỗn dịch chứa PTX (PTX-NO) và chế phẩm thương mại (PTX-INJ) trên chuột [62]. Kết quả so sánh giữa 02 chế phẩm được mô tả ở Hình 1.6. Thông số $AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g/g} \cdot \text{giờ}$) cũng được đánh giá so sánh, kết quả có ở Bảng 1.10. Nghiên cứu cũng tiến hành trên mô đồng nhất (tim, gan, thận, phổi, lách, não) sau khi tiêm tĩnh mạch chuột với liều 10 mg PTX/ kg thể trọng. Kết quả phân bố sinh học trên các mô theo thời gian thể hiện ở Hình 1.6.

Bảng 1.10. Giá trị AUC_{0-12h} của PTX hỗn dịch sau khi tiêm liều 10 mg/kg

Cơ quan	PTX -NO	PTX-INJ
Tim	14,51 ± 6,21	18,02 ± 5,84
Gan	687,58 ± 117,56	60,45 ± 20,49
Lách	613,06 ± 218,34	53,52 ± 29,55
Phổi	104,48 ± 24,73	43,92 ± 34,92
Thận	21,91 ± 10,93	22,68 ± 9,47
Não	9,48 ± 3,45	0,03 ± 0,03

“Nguồn: *International Journal of nanomedicine*, 2011” [62]



Hình 1.6. Đồ thị phân bố nồng độ PTX trong mô theo thời gian

“Nguồn: *International Journal of nanomedicine, 2011*” [62]

Yang T. và cộng sự (2007) đã tiến hành nghiên cứu đánh giá *in vitro* và *in vivo* của công thức bằng cách gắn kết PTX dạng liposom. Các giá trị của $t_{1/2\beta}$, MRT, AUC đã được tìm thấy là cao hơn nhiều cho dạng bào chế PTX liposom so với Taxol[®]. AUC, MRT và $t_{1/2\beta}$. PTX kết hợp trong các liposome PEGylated tăng đáng kể so với những liposom thông thường ($p < 0,05$) (tương ứng là 4,4; 6,0 và 3,5 lần).

Trong mô cơ thể hấp thu PTX đã được đánh giá sau khi tiêm tĩnh mạch của mỗi công thức (Taxol[®], liposom thông thường và PEGylated) trong mô hình chuột gây ung thư vú. Ung thư vú đã được gây thành công trên những con chuột sau 2–3 tuần tiêm dòng tế bào MDA-MB-231. Trong trường hợp của Taxol[®], nồng độ trong huyết tương của PTX gần như không đáng kể ở 6 giờ và nhanh chóng bị hấp thu và thanh thải ở gan, lá lách và phổi. Tuy nhiên, khi PTX được bao trong liposome, nồng độ trong huyết tương được duy trì đến 24h. Với liposom dạng PEGylated cho thấy nồng độ huyết tương cao hơn so với liposom thông thường, phù hợp với kết quả từ nghiên cứu dược động học ở chuột [67].

Tại Việt Nam, các công trình nghiên cứu tiền lâm sàng trong quá trình nghiên cứu dạng bào chế chứa PTX chủ yếu khảo sát theo mô hình tác động trên động vật

mạng khối u. Trần Như Nguyễn và cộng sự (2017) đã xây dựng mô hình ung thư gan bằng tế bào HepG2 trên chuột *Swiss albino* và khảo sát tác động kháng khối ung thư của chế phẩm liposom PTX (PTX-Monta) [1]. Đỗ Thị Hồng Tươi và cộng sự (2017) tiến hành khảo sát tác dụng kháng ung thư phổi của thuốc tiêm liposom PTX trên chuột nhắt trắng gây ung thư phổi bằng benzopyren. Chuột *Swiss albino* đực, 20-25g, cho uống benzopyren (BaP) pha trong dầu bắp (0,1 mL/10 g, liều 50 mg/kg, 2 lần/tuần x 4 tuần liên tiếp). Nhóm sinh lý uống dầu bắp. Sau 12 tuần, chuột uống BaP được chia thành 4 lô lần lượt tiêm *i.v* thuốc liposom PTX (10mg/kg) và Anzatax (10mg/kg) (0,2 mL/10g trong 2 phút mỗi 3 ngày/lần x 5 lần) pha loãng trong NaCl 0,9%. Sau liều cuối 2 tuần, giết chuột, tách lấy phổi khảo sát mức độ tổn thương, số lượng và kích thước khối u, phân tích vi thể [2].

Nhận xét: Từ các công trình nghiên cứu tiền lâm sàng của thuốc tiêm chứa PTX trên động vật thí nghiệm sẽ làm cơ sở cho việc xây dựng quy trình xác định thông số dược động học của thỏ, chuột; phân bố sinh học của PTX trên thỏ và chuột sau khi tiêm thuốc chứa PTX bào chế trong phòng thí nghiệm. Mô lựa chọn phổ biến là gan, thận, phổi, buồng trứng. Kết quả ứng dụng quy trình xác định phân bố sinh học trên động vật thí nghiệm của thuốc tiêm chứa PTX là tính mới của đề tài mà hiện nay chưa có phòng thí nghiệm nào trong nước thực hiện.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Chế phẩm thử

- Dạng dung dịch đậm đặc pha tiêm 30mg PTX/ 5mL
- Dạng đông khô 24mg PTX/ lọ

2.1.2. Thuốc đối chứng

Bảng 2.1. Thông tin thuốc đối chứng

Tên thuốc	Hàm lượng	Nhà sản xuất - Số lô/HD
Dung dịch tiêm Anzatax [®] (PTX 30mg/ 5mL)	99,5%	Hospira Australia Pty. Ltd. (Úc) VN-13010-11 A046840AA HD: 07/2015
Dung dịch tiêm Stragen [®] (PTX 30mg/ 5mL)	100,1%	Haupt Pharma Woftratshausen GmbH (Đức) VN1 – 423 – 11 X070 HD: 10/2014

2.1.3. Động vật thí nghiệm

Bảng 2.2. Thông tin về động vật thí nghiệm

Loại	Giống	Trọng lượng	Nguồn gốc
Thỏ trắng	cái	2-2,5 kg	Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM
Chuột nhắt trắng (Swiss albino)	cái/ đực	20-22 g/ 30 – 40 g	Viện Pasteur TP.HCM

2.2. NGUYÊN VẬT LIỆU, THIẾT BỊ

2.2.1. Chất chuẩn đối chiếu

Bảng 2.3. Thông tin chuẩn đối chiếu

Tên	Hàm lượng (%)	Số lô	Nguồn gốc
Paclitaxel	100,7 99,4	- Batch 2	Viện KNT Tp.HCM EDQM (Pháp)
Diazepam	99,9	QT192 030412	Viện KNT Tp.HCM
Carbamazepin	99,51	QT181 020213	Viện KNT Tp.HCM
Tạp liên quan B của Paclitaxel (10-deacetyl-7-epipaclitaxel)	100,0	I0J243	USP (Mỹ)

2.2.2. Nguyên liệu, hóa chất, dung môi

Bảng 2.4. Hóa chất, dung môi

Tên hóa chất	Tiêu chuẩn	Hãng sản xuất/Quốc gia
Paclitaxel	USP 35	Trung Quốc
Kolliphor ELP®	EP	BASF (Đức)
Polysorbat 80 (Tween 80)	PA	Merck (Đức)
Ethanol	PA	Prolabo (Pháp)
Acid citric	PA	Merck (Đức)
Natri clorid 0,9%	nhà sản xuất	Mekophar (Việt Nam)
Glucose 5%	nhà sản xuất	Mekophar (Việt Nam)
Acetonitril	PA	J.T Baker (Mỹ)
Methanol	PA	J.T Baker (Mỹ)
2-hydroxypropyl- β -CyD (Kleptose®)	nhà sản xuất	Carbosynth (Mỹ)
Polyetylen glycol 400	PA	Merck (Đức)
Polyvinyl pyrrolidon K30 (PVP K30)	nhà sản xuất	Sigma (Mỹ)
D-Manitol (Pearliol®)	nhà sản xuất	Sigma (Mỹ)
Ammonium acetat	PA	Merck (Đức)
Tert-butanol	PA	Merck (Đức)
Dimethyl sulfoxid	PA	Fisher (Mỹ)
Poloxamer 188	nhà sản xuất	Sigma (Mỹ)
Lactose	nhà sản xuất	Sigma (Mỹ)
Nước cất	Dược điển Việt Nam	Việt Nam
Diethyl ether	PA	J.T Baker (Mỹ)
Kali dihydrophosphat	PA	Fisher (Anh)
Huyết tương chuột nhắt	Ly trích từ máu chuột nhắt	Viện Pasteur TP.HCM
Huyết tương thỏ	Ly trích từ máu thỏ	Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM

2.2.3. Nơi thực hiện và trang thiết bị

Danh sách nơi thực hiện đề tài

- Bộ môn Công nghiệp Dược - Khoa dược, Đại học Y dược Tp.Hồ Chí Minh
- Bộ môn Dược lý - Khoa Dược, Đại học Y Dược Tp.Hồ Chí Minh
- Khoa Dược lý - Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.Hồ Chí Minh
- Khoa Vi sinh - Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp.Hồ Chí Minh

- Khoa Vật lý đo lường - Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp.Hồ Chí Minh

Bảng 2.5. Trang thiết bị dùng trong bào chế và kiểm nghiệm

Dụng cụ và trang thiết bị	Hãng sản xuất / Quốc gia
Hệ thống sắc kí lỏng hiệu năng cao LC-20A	Shimadzu (Nhật)
Máy đông khô Delta 2-24 LSC Plus	Christ (Nhật)
Cân kỹ thuật	Sartorius (Đức)
Cân phân tích	Mettler Toledo (Đức)
Máy đo pH	Mettler Toledo (Đức)
Máy siêu âm phá tế bào	QSONICA 125 (Mỹ)
Máy khuấy từ gia nhiệt IKA® C-MAG HS7	IKA (Đức)
Bơm hút chân không	BUCHI (Thụy Sĩ)
Bộ lọc áp suất giảm	Alltech (Mỹ)
Màng lọc 0,45 µm	Sartorius (Đức)
Bể siêu âm Power Sonic	Hwashin (Hàn Quốc)
Bộ đuổi khí dung môi	MCR (Israel)
Máy lắc ống nghiệm	Talboys (Mỹ)
Máy ly tâm	Dynamica (Trung Quốc)
Tủ lạnh -20°C	Sanyo (Nhật)
Tủ đông -80°C	Sanyo (Nhật)
Eppendorf 1,5 ml	Eppendorf (Đức)
Ống tráng EDTA 1%	HTM (Việt Nam)
Kim tiêm 1 ml đầu G30 và G23	VINAHANKOOK (Việt Nam)
Ống thủy tinh ly tâm có nắp 12 ml, becher, pipet, micropipet, bình định mức, và các dụng cụ thí nghiệm khác	

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Xây dựng công thức và quy trình điều chế thuốc tiêm chứa PTX với hai dạng bào chế dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền

2.3.1.1. Nghiên cứu bào chế dung dịch đậm đặc chứa PTX

a. Khảo sát tính chất lý hóa của chế phẩm đối chứng

- Thu thập mẫu đối chứng, khảo sát các chỉ tiêu về cảm quan, hàm lượng (USP 36) [60] độ ổn định ít nhất 24 giờ sau khi pha loãng trong NaCl 0,9% hoặc glucose 5% ở các nồng độ 0,3; 0,6 và 1,2 mg/ mL theo hướng dẫn sử dụng trị liệu.

- Định lượng PTX trong chế phẩm dung dịch đậm đặc và dung dịch sau khi pha loãng bằng HPLC theo quy trình đã thẩm định. Lượng PTX được tính theo công thức sau:

- Công thức xác định hàm lượng PTX:
$$M_t = \frac{S_t}{S_c} \times \frac{M_c}{D_c} \times D_t$$

Trong đó: M_t là lượng PTX tìm thấy dựa vào kết quả phân tích HPLC (mg)

S_t là diện tích đỉnh trung bình của mẫu thử sau 2 lần tiêm mẫu

S_c là diện tích đỉnh trung bình của mẫu chuẩn sau 3 lần tiêm mẫu

M_c là lượng cân của chất chuẩn (mg)

D_c là độ pha loãng của mẫu chuẩn.

D_t là độ pha loãng của mẫu thử

b. Xây dựng công thức và qui trình bào chế dung dịch đậm đặc chứa PTX

Dựa trên công bố thành phần của thuốc đối chứng[13] [32], khảo sát lựa chọn chất diện hoạt (Tween 80, Kolliphor® ELP), chất ổn định (acid citric), dung môi hòa tan (ethanol khan) để bào chế dung dịch đậm đặc có nồng độ PTX 6 mg/ mL (lọ 5 mL) đạt độ ổn định sau khi pha loãng như thuốc đối chứng. Phương pháp bào chế là hòa tan đơn giản. Hòa tan PTX, chất ổn định vào ethanol khan, sau đó hòa tan tiếp chất diện hoạt vào. Dem sản phẩm đánh giá cảm quan, hàm lượng PTX sau khi pha loãng trong dung dịch tiêm truyền ở các nồng độ trị liệu tương ứng.

* Khảo sát tỷ lệ chất diện hoạt

- PTX tan trong ethanol khan nên việc bào chế dung dịch đậm đặc PTX trong ethanol khan chỉ là hòa tan đơn giản. Tuy nhiên PTX hầu như không tan trong nước và dung dịch pha tiêm truyền nên cần khảo sát tỷ lệ chất diện hoạt đủ đảm bảo sau khi pha loãng dung dịch đậm đặc chứa PTX trong các dung môi này ở nồng độ trị liệu phải đảm bảo ổn định ít nhất 24 giờ.

- Sử dụng 2 chất diện hoạt là Tween 80 (T80) và Kolliphore ELP (K), dung môi ethanol khan (E).

+ Pha chế các công thức với các tỷ lệ khác nhau thể hiện trong Bảng 2.6 thu được các dung dịch đậm đặc

+ Pha loãng các dung dịch đậm đặc chứa PTX trên với NaCl 0,9% hoặc Glucose 5% để có hàm lượng PTX ở liều điều trị (0,3 - 0,6 - 1,2 mg/ mL), nhận xét cảm quan và xác định hàm lượng PTX trong dung dịch khi mới pha xong và sau khi pha

Bảng 2.6. Tỷ lệ và thành phần các công thức khảo sát

Thành phần	T1 (1:4)	T2 (1:3)	T3 (1:2)	T4 (1:1)	T5 (2:1)	T6 (3:1)	T7 (4:1)	K1 (1:4)	K2 (1:3)	K3 (1:2)	K4 (1:1)	K5 (2:1)	K6 (3:1)	K7 (4:1)
PTX (mg)	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
T80/ E với tỷ lệ khác nhau vđ (ml)	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
K/ E với tỷ lệ khác nhau vđ (ml)	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1

24 giờ. Lựa chọn công thức có tỉ lệ Tween 80 hoặc Kolliphor trong hỗn hợp thấp nhất mà dung dịch đạt độ ổn định hàm lượng sau khi pha loãng theo thời gian.

* Khảo sát nồng độ của chất ổn định (acid citric)

Nhằm mục đích cải thiện độ ổn định của dung dịch sau khi pha loãng theo thời gian, acid citric được lựa chọn làm chất ổn định sau khi pha loãng của dung dịch đậm đặc. Từ các công thức thử nghiệm đạt yêu cầu về tính ổn định sau khi pha loãng của Bảng 2.6, tiến hành thêm acid citric vào với nồng độ 0,01M. Đánh giá độ ổn định sau khi pha loãng theo thời gian của các dung dịch dưới điều kiện ánh sáng bình thường, nhiệt độ 25 °C ở các thời điểm 0, 24, 48 và 72 giờ.

* Khảo sát độ lặp lại

Khảo sát lặp lại trên cỡ lô 150 mL. Pha loãng với NaCl 0,9% và glucose 5% để có 3 mức nồng độ 0,3 mg/ mL, 0,6 mg/mL và 1,2 mg/ mL. Đánh giá hàm lượng PTX tại các thời điểm sau khi pha loãng.

2.3.1.2. Nghiên cứu bào chế dạng bột đông khô chứa PTX

Nguyên tắc xây dựng công thức tạo dung dịch đậm đặc chứa PTX đạt độ ổn định sau khi pha loãng trong NaCl 0,9% hoặc glucose 5% ở các nồng độ 0,3; 0,6 và 1,2 mg/ mL theo hướng dẫn trị liệu. Chọn lựa các dung dịch đậm đặc đạt yêu cầu sau khi pha loãng. Nghiên cứu đông khô các dung dịch đậm đặc đạt yêu cầu này bằng cách đông khô trực tiếp dung dịch đậm đặc hoặc phối hợp thêm chất tạo khối bột đông khô. Bột đông khô

chứa PTX đạt độ ổn định hàm lượng các thời điểm sau khi pha loãng như thuốc đối chứng.

- Định lượng PTX trong chế phẩm bột đông khô và trong dung dịch sau khi pha loãng bằng HPLC theo quy trình đã thẩm định.

a. Xây dựng công thức và qui trình bào chế bột đông khô chứa PTX

Dựa trên một số công trình nghiên cứu về tác dụng của các tá dược dạng thuốc đông khô và giới hạn nồng độ các tá dược trong dung dịch tiêm truyền [5] [6] [7] [13] [27] [32] [35] [39] [48], công thức dự kiến thành phần 1 lọ bột đông khô với các tá dược khảo sát được trình bày trong Bảng 2.7.

Bảng 2.7. Thành phần công thức bột đông khô khảo sát

TT	Thành phần	Hàm lượng 1 lọ (mg)	Chức năng
1	Paclitaxel	6 – 9	Dược chất
2	HP - β - CyD	khảo sát	Tạo phức bao
3	PVP K30	khảo sát	Ổn định phức
4	PEG 400	khảo sát	Ổn định, trợ tan
5	Tween 80	khảo sát	Ổn định, trợ tan
6	Lactose, sorbitol, glucose, leucin, manitol	khảo sát	Tạo khối
7	Dung môi	khảo sát	Hòa tan

* Khảo sát tỷ lệ HP- β -CyD

- HP- β -CyD là tá dược được sử dụng tạo phức bao, cải thiện độ tan của các dược chất khó tan dùng cho thuốc tiêm và thuốc nhỏ mắt. PTX rất kém tan trong nước, sự có mặt của nước khi pha loãng trong các dung dịch tiêm truyền làm PTX tủa lại, vì vậy dùng một lượng nước tối thiểu (thuận tiện cho quá trình đông khô sau này) để hòa tan tối đa HP- β -CyD với các nồng độ khác nhau và dùng dung dịch này cải điều chế dung dịch đậm đặc cải thiện độ tan và độ ổn định sau khi pha loãng của PTX.

- HP- β -CyD được khảo sát cải thiện độ tan của PTX với các nồng độ 0,1 – 0,4%.

* Tá dược ổn định phức

- Công thức được lựa chọn với tỉ lệ HP- β -CyD : PTX thích hợp sẽ được khảo sát độ ổn định khi có mặt Polyvinyl pyrrolidon (PVP K30), tween 80 và Polyethylen glycol 400 (PEG 400) với các tỷ lệ khác nhau trong giới hạn cho phép tính trên thể tích dung dịch

pha loãng (bằng NaCl 0,9%) đến nồng độ PTX là 0,6 mg/ mL (thăm dò).

- Dung dịch sau khi pha loãng được ghi nhận thời gian duy trì độ trong
Yêu cầu dung dịch phải trong tại thời điểm quan sát và duy trì ít nhất sau 24 giờ. Từ đó chọn khoảng nồng độ thích hợp các tá dược có khả năng ổn định phức (duy trì độ trong).

* Tá dược tạo khối : Lactose, sorbitol, glucose, leucin, manitol với vai trò là tá dược tạo khối được lựa chọn thêm vào tạo thuận lợi quá trình đông khô.

* Dung môi

- Hòa tan PTX lần lượt trong 3 dung môi khảo sát là ethanol, tert-butanol và DMSO ở nồng độ 6 mg/ mL thành dung dịch đồng nhất. Hòa tan các chất tạo phức, chất ổn định với các tỷ lệ khác nhau vào nước trên thể tích ước tính 10 mL dung dịch NaCl 0,9% sẽ sử dụng pha loãng để có nồng độ PTX khoảng 0,6 mg/ mL. Quan sát khả năng hòa tan PTX, độ ổn định của dung dịch phức.

- Sau khi đã khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình đông khô bao gồm thời gian tiền đông, áp suất giai đoạn làm khô sơ cấp và thứ cấp. Bào chế lô đông khô để đánh giá cảm quan sản phẩm sau đó tiếp tục nâng tỷ lệ các tá dược để được nồng độ 9 - 12 mg PTX/ mL (thể tích dung dịch pha loãng tương ứng 15 - 20 mL).

Yêu cầu: Xác định khoảng thời gian dung dịch phức ổn định; Khối bột mịn, khô.

* Khảo sát độ lặp lại

Khảo sát lặp lại trên cỡ lô 05 lọ/ lô trên 03 lô. Pha loãng với NaCl 0,9% đến nồng độ 0,6 mg/ mL. Đánh giá hình thức khối thuốc, pH, hàm lượng nước, dung dịch hợp thành và hàm lượng PTX tại các thời điểm 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ sau khi pha loãng.

Yêu cầu: Đạt theo chuyên luận thuốc tiêm PTX và thuốc bột pha tiêm của USP.

b. Lựa chọn thể tích bao bì

Với mục đích bào chế dạng chế phẩm đa liều (tăng lượng PTX trong mỗi đơn vị), sử dụng lọ thủy tinh dung tích 20 mL với lượng dung dịch trước khi đông khô có thành phần tỷ lệ các tá dược đã khảo sát tương ứng lượng PTX tăng dần (từ 9 mg).

2.3.1.3. Nâng cấp cỡ lô, xây dựng quy trình và đánh giá chất lượng hai sản phẩm bào chế dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm chứa PTX

a. Nâng cỡ lô, xây dựng quy trình bào chế 2 sản phẩm

Tiến hành nâng lô qui mô 50 lọ, thực hiện trên 3 lô liên tiếp, xây dựng quy trình bào chế của 2 sản phẩm.

b. Đánh giá chất lượng của 2 sản phẩm

b₁. Hình thức cảm quan:

Dạng dung dịch đậm đặc pha tiêm chứa PTX phải trong

Dạng bột đông khô pha tiêm chứa PTX phải đạt các yêu cầu chung của chế phẩm đông khô như hình thức bánh thuốc, tốc độ tan, độ trong của dung dịch hoàn nguyên.

b₂. pH và hàm lượng:

- Dung dịch 1/10 có pH nằm trong khoảng từ 3 - 7

- Dung dịch pha loãng trong NaCl hoặc glucose có nồng độ PTX sau 24 giờ đạt trên 90% so với ban đầu.

Công thức lựa chọn được đánh giá hàm lượng PTX, xác định pH (theo chuyên luận thuốc tiêm PTX của USP hiện hành) tại thời điểm sau khi pha và theo dõi hàm lượng trong thời gian 24, 48 và 72 giờ. Mục tiêu của đánh giá này để xác định khả năng duy trì hàm lượng PTX đáp ứng trị liệu của dung dịch pha loãng.

Tiến hành: Công thức lựa chọn được pha loãng tại nồng độ 0,6 mg PTX/ mL với NaCl 0,9%. Dung dịch thu được được lọc qua màng 0,45 µm. Định lượng PTX trong mẫu bằng phương pháp HPLC tại thời điểm 0 giờ, 24 giờ, 48 giờ và 72 giờ sau khi pha loãng theo qui trình thẩm định.

2.3.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng và đánh giá độ ổn định của hai chế phẩm nghiên cứu

2.3.2.1. Xây dựng quy trình định lượng PTX và tạp liên quan trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC

a. Quy trình định lượng PTX trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC

a₁. Phương pháp HPLC định lượng PTX trong chế phẩm

Do sự phối hợp thành phần các tá dược theo điều kiện phòng thí nghiệm sẽ thay đổi so với công thức công bố của thuốc đối chứng, dựa trên cơ sở quy trình định lượng trong chuyên luận thuốc tiêm PTX (USP 36 và BP 2014) [8] [60], dự kiến quy trình định lượng bằng HPLC với điều kiện sắc ký khảo sát bao gồm lựa chọn cột sắc ký C18; Dung môi hòa tan mẫu; Thể tích tiêm mẫu; Tốc độ dòng; Bước sóng phát hiện; tỷ lệ pha động.

- Mẫu chuẩn: Chất chuẩn đối chiếu PTX với dung môi hòa tan mẫu, pha loãng nếu cần để thu được dung dịch có nồng độ PTX khoảng 0,6 mg/ mL.

- Mẫu thử: Chế phẩm được hòa tan thành dung dịch đậm đặc với nước muối sinh lý đến nồng độ PTX khoảng 1,2 mg/ mL rồi được pha loãng 2 lần trong dung môi hòa tan mẫu đến nồng độ 0,6 mg/ mL.

- Mẫu placebo: Hỗn hợp tá dược tương ứng trong dung môi hòa tan mẫu theo tỷ lệ giống mẫu thử.

a₂. Thảm định quy trình định lượng PTX trong chế phẩm

* Tính đặc hiệu

Tiến hành với mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu placebo.

Yêu cầu: Kết quả sắc ký đồ phân tích mẫu thử phải có đỉnh PTX như mẫu chuẩn với cùng thời gian lưu, sắc ký đồ mẫu placebo phải không có đỉnh PTX tại thời gian lưu như mẫu chuẩn và thử.

* Tính phù hợp hệ thống

- Xác định giá trị và độ lặp lại của các thông số sắc ký của hệ thống khi tiến hành sắc ký mẫu chuẩn và mẫu thử với ít nhất 6 lần tiêm mẫu liên tiếp. Tính phù hợp hệ thống được khảo sát với các thông số sắc ký thời gian lưu (t_R); diện tích pic (S); hệ số đối xứng (A_S); số đĩa lý thuyết (N).

- Xử lý thống kê số liệu các giá trị thu được.

Yêu cầu: Quy trình đạt tính tương thích hệ thống khi các thông số sắc ký trong cả hai mẫu chuẩn (tiêm lặp lại 06 lần) và mẫu thử (tiêm lặp lại 02 lần) có $RSD \leq 2\%$. * Tính tuyến tính

- Chuẩn bị dãy dung dịch chuẩn: PTX được hòa tan trong dung môi hòa tan mẫu để được dãy nồng độ khoảng từ 100 $\mu\text{g/mL}$ đến 1400 $\mu\text{g/mL}$.

- Tiến hành sắc ký 2 lần cho mỗi mẫu. Ghi lại sắc ký đồ và giá trị diện tích pic.

+ Xác định sự tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của các dung dịch.

+ Vẽ đường biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ và diện tích pic.

+ Sử dụng “phân tích hồi quy” với trắc nghiệm t để kiểm tra ý nghĩa của các hệ số và trắc nghiệm t, F để kiểm tra tính thích hợp của phương trình hồi quy.

* Độ chính xác

Tiến hành phân tích 06 dung dịch mẫu thử đã được mô tả trong mục a₁.

Yêu cầu: phương pháp định lượng đạt độ chính xác khi tính giá trị thống kê hàm lượng hoạt chất được xác định trên 6 mẫu có $\text{RSD} \leq 2\%$.

* Độ đúng

- Tiến hành thêm một lượng chất chuẩn vào mẫu placebo. Lượng chất chuẩn thêm vào tương đương với 80 %, 100 %, 120 % của hàm lượng hoạt chất trong mẫu thử.

- Tỷ lệ phục hồi (%): $Y = (X / \mu) \times 100\%$

Trong đó: Y là tỷ lệ phục hồi, μ là lượng lý thuyết và X là lượng tìm thấy

Yêu cầu: Phương pháp định lượng đạt độ đúng khi tỷ lệ phục hồi thực nghiệm nằm trong giới hạn cho phép 98 – 102 % so với lượng lý thuyết.

b. Quy trình định lượng tạp liên quan trong chế phẩm bằng HPLC

b₁. Phương pháp định lượng tạp liên quan của PTX trong chế phẩm

Dựa trên cơ sở quy trình định lượng tạp trong chuyên luận thuốc tiêm PTX (USP 36 và BP 2014), dự kiến với điều kiện sắc ký khảo sát bao gồm lựa chọn cột sắc ký; Dung môi hòa tan mẫu; Thể tích tiêm mẫu; Tốc độ dòng; Bước sóng phát hiện; tỷ lệ pha động và chương trình dung môi.

- Cột sắc ký: C18, khảo sát nhiệt độ cột

- Dung môi hòa tan mẫu: Acetonitril.

- Thể tích tiêm mẫu: 10 - 40 μL

- Tốc độ dòng: 1,0 - 1,5 mL/phút

- Đầu dò PDA và bước sóng phát hiện 227 nm - 230 nm.

- Pha động: hỗn hợp nước : acetonitril, rửa giải theo chương trình

- Chuẩn bị mẫu:

Mẫu chuẩn: Hòa tan một lượng chuẩn đối chiếu PTX và 10-deacetyl-7-epipaclitaxel (tạp 10-DAP) trong acetonitril để thu được dung dịch chuẩn có nồng độ PTX là 1,2 mg/ mL và tạp 10-DAP là 0,006 mg/ mL.

Mẫu thử: Chế phẩm được hòa tan hoàn toàn trong nước muối sinh lý đến nồng độ PTX khoảng 1,2 mg/ mL.

Hàm lượng tạp được tính toán theo công thức: $100 \times (C_S/C_U) \times (S_i/S_s)$

Trong đó: C_S là nồng độ (mg/ mL) của tạp chuẩn B trong dung dịch chuẩn;

C_U là nồng độ (mg/ mL) của PTX trong dung dịch thử,

S_i là diện tích đỉnh của tạp phân hủy trong dung dịch thử,

S_s là diện tích đỉnh của tạp chuẩn 10-DAP trong dung dịch chuẩn.

Yêu cầu: Giới hạn các tạp theo USP 36; không được có tạp chất nào khác có hàm lượng vượt quá 0,1 % và tổng hàm lượng các tạp không được quá 2,0 %. [7]

b2. Thảm định quy trình định lượng tạp trong chế phẩm chứa PTX

Theo quy định USP 36 [60], đối với quy trình định lượng tạp ngoài các thông số cần thảm định tính đặc hiệu, tính phù hợp hệ thống, cần thảm định thêm giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) và độ chính xác tại LOD.

- Giới hạn phát hiện (LOD)

+ Tiến hành đo tín hiệu thu được từ mẫu trắng và mẫu chuẩn nồng độ biết trước.

+ Tín hiệu thu được từ mẫu trắng là N, tín hiệu thu được từ mẫu chuẩn là S.

LOD là nồng độ thấp nhất của chất cần thử còn phát hiện được bằng quy trình phân tích đang được thảm định tương ứng với tín hiệu của mẫu chuẩn gấp 2-3 lần tín hiệu mẫu trắng.

- Giới hạn định lượng (LOQ) được tính bằng cách suy ra từ giới hạn phát hiện (LOD)

theo công thức: $LOQ = \frac{10}{3} \times LOD$

2.3.2.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng sản phẩm bào chế

- Tiêu chuẩn chất lượng dung dịch đậm đặc tiêm truyền chứa PTX được áp dụng theo chuyên luận riêng được điển USP hiện hành và điều chỉnh thông số của điều kiện định lượng theo thực tế.

- Tiêu chuẩn chất lượng của dạng chế phẩm bột đông khô được xây dựng dựa theo chuyên luận thuốc tiêm truyền dạng bột của ĐĐVN V, chuyên luận dung dịch tiêm truyền chứa PTX của USP hiện hành và kết quả khảo sát thực tế chỉ tiêu tính chất, pH, định tính, hàm lượng nước, độ trong, giới hạn tiểu phân, độ đồng đều khối lượng, định lượng, tạp chất.

2.3.2.3. Khảo sát độ ổn định của 2 chế phẩm bào chế

- Từ điều kiện bảo quản của các dạng bào chế tương tự, sản phẩm bào chế dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX dự kiến được bảo quản theo điều kiện trình bày trong Bảng 2.8.

Bảng 2.8. Điều kiện bảo quản mẫu, đánh giá độ ổn định và thời điểm lấy mẫu

Sản phẩm bào chế	Dung dịch đậm đặc (< 30 °C)	Bột đông khô (2 - 8 °C)
Điều kiện dài hạn	30 °C ± 2 °C/ 75% ± 5% RH	5 °C ± 3 °C
Thời điểm lấy mẫu	0; 3; 6; 12; 18 và 24 tháng	0; 3; 6; 12; 18 và 24 tháng
Điều kiện lão hóa	40 °C ± 2 °C/ 75% ± 5% RH	25 °C ± 2 °C/ 60% ± 5% RH
Thời điểm lấy mẫu	0; 3; 6 tháng	0; 3; 6 tháng

- Đánh giá độ ổn định của chế phẩm với các chỉ tiêu: Cảm quan, pH, hàm lượng, tạp liên quan (trong các giai đoạn), nội độc tố và độ vô khuẩn (giai đoạn đầu và cuối) để đảm bảo chất lượng của chế phẩm trong suốt quá trình nghiên cứu thử nghiệm tiền lâm sàng và đánh giá độ ổn định của quy trình bào chế.

- Số lượng mẫu thử tối thiểu từ 03 lọ tại mỗi thời điểm.

2.3.3. Nghiên cứu thông số dược động học và đánh giá phân bố sinh học trong một số mô của hai chế phẩm bào chế chứa PTX so với chế phẩm đối chứng

2.3.3.1. Xác định độc tính cấp của 2 chế phẩm

Độc tính cấp LD₅₀ được xác định dựa vào phương pháp Karber và Behrens.

Thử nghiệm được tiến hành theo các bước sau:

- Thăm dò liều cao nhất không gây độc (LD_0) và liều thấp nhất gây độc (LD_{100}) 100% chuột thí nghiệm: Thử trên 60 chuột, chia thành 15 nhóm, mỗi nhóm 04 chuột, điều kiện tiêm tĩnh mạch là 0,1 mL/20 g chuột, liều tiêm thay đổi theo nhóm là 6, 9, 12, 15, 18, 24, 30, 36, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60 mg/ kg .

- Xác định LD_{50} : Từ kết quả liều thăm dò, thử tiếp trên 64 con chuột, chia ngẫu nhiên chuột thí nghiệm thành 8 nhóm mỗi nhóm 08 con, điều kiện tiêm tĩnh mạch là 0,1 mL/ 20 g chuột, liều tiêm thay đổi theo nhóm là 12, 18, 24, 30, 36, 42, 48, 54 mg/ kg. Theo dõi hoạt động của chuột thí nghiệm sau khi dùng thuốc, ghi lại những biểu hiện ngộ độc và mức độ nghiêm trọng, sự xuất hiện độc tính, tiến triển dẫn tới phục hồi hoặc chết trong thời gian theo dõi là 72 giờ. Tính kết quả LD_{50} theo phương pháp Karber và Behrens.

2.3.3.2. Xây dựng quy trình định lượng PTX trong huyết tương và mô của thỏ và chuột thử nghiệm

a. Quy trình chiết dược chất PTX từ mẫu huyết tương, mô của thỏ và chuột thử nghiệm

a₁. Chiết mẫu

- Lựa chọn phương pháp chiết. Khảo sát dung môi chiết, thông số quá trình ly tâm tách dịch chiết, nhiệt độ bay hơi dung môi tạo cặn và lựa chọn dung môi hòa tan mẫu.

- Dung dịch đồng nhất mẫu sử dụng NaCl 0,9 %.

- Dung môi chiết PTX từ mẫu: Acetonitril hoặc ethyl ether

- Nhiệt độ bay hơi tạo cặn từ 30 °C trở lên.

a₂. Mẫu huyết tương

- Thuốc thử nghiệm: Từ chế phẩm bào chế và thuốc đối chứng PTX hàm lượng 6 mg/ mL, pha loãng với dung dịch NaCl 0,9% để có dung dịch PTX 1 mg/ mL - 2 mg/ mL.

- Từ các công trình nghiên cứu đã công bố [26], [36], [37], [38], [39], [40] và kết quả thử độc tính cấp, xác định liều thăm dò trên động vật thí nghiệm và thời điểm lấy máu sau khi tiêm ở Bảng 2.9.

- Lựa chọn mẫu chuẩn bao gồm chuẩn PTX (AS) và nội chuẩn (IS) từ các công trình đã công bố [10], [40].

- Mẫu placebo là mẫu huyết tương không có AS, IS.

Bảng 2.9. Liều tiêm và thời điểm lấy máu động vật thí nghiệm

Động vật thí nghiệm	Liều tiêm thăm dò (mg/ kg)	Thời điểm lấy máu sau khi tiêm (phút)	Thể tích máu lấy cho mỗi mẫu
Thỏ	3 - 6	5-10-15-20-30-60-120-240-360	Tối thiểu 1,2 mL
Chuột	6 - 12 - 24	5-10-15-30-60-120-180-360	Tối thiểu 0,8 mL

- Mẫu thử: Mẫu máu lấy ở tai (thỏ) và trực tiếp từ tim (chuột) sau khi tiêm PTX được chuyển vào ống tráng sẵn EDTA 1%. Mẫu sau khi chống đông tiến hành ly tâm tách huyết tương và bảo quản ở - 80 °C.

- Mẫu thử tự tạo: Mẫu huyết tương có AS, IS

a₃. Mẫu mô

- Từ chế phẩm thử nghiệm và thuốc đối chứng PTX hàm lượng 6mg/mL, pha loãng với dung dịch NaCl 0,9% để có dung dịch PTX 1 mg/ mL (thỏ), 0,6 mg/ mL (chuột) thử nghiệm tiêm cho động vật thí nghiệm.

- Từ các công trình đã công bố [20], [25], [38], [39], [40], [68] mẫu mô gan, thận, phổi sẽ được lựa chọn khảo sát sau khi tiêm chế phẩm và thuốc đối chứng.

- Từ kết quả xác định liều thăm dò trên động vật thí nghiệm với tín hiệu tương ứng trên sắc ký đồ phân tích, thời điểm lấy mẫu mô sau khi tiêm như Bảng 2.10.

Bảng 2.10. Liều tiêm và thời điểm lấy mẫu mô động vật thí nghiệm

Động vật thí nghiệm	Liều tiêm (mg/ kg)	Thời điểm lấy mô sau khi tiêm
Thỏ	6	0,5 - 2 - 4 - 8 giờ
Chuột	12	0,5 - 1,0 - 2,0 - 4,0 - 6,0 - 8,0 giờ

- Lựa chọn mẫu chuẩn bao gồm chuẩn PTX (AS) và nội chuẩn (IS) từ các công trình đã công bố và khảo sát. Nồng độ PTX (AS) và IS trong mẫu chuẩn gốc 500 µg/ mL methanol.

- Mẫu trắng: Dịch đồng nhất các mô động vật không tiêm thuốc, không thêm AS & IS và được chiết theo quy trình.

- Mẫu thử tự tạo: mẫu trắng được thêm chuẩn (AS) và nội chuẩn (IS)

- Mẫu thử: Mẫu mô sau khi lấy được rửa bằng dung dịch NaCl 0,9 %, thấm giấy lọc để loại bỏ dịch thừa, cân khối lượng, thêm dung dịch NaCl 0,9 % theo tỷ lệ 1mL : 1g

(mô thỏ); 5mL : 1g (mô chuột), đồng nhất mẫu. Dịch đồng nhất được bảo quản lạnh - 20 °C đến khi đưa vào chiết.

b. Xây dựng quy trình định lượng PTX trong huyết tương và trong mô của thỏ và chuột thử nghiệm

b₁. Phương pháp định lượng PTX trong huyết tương của thỏ và chuột thử nghiệm

Từ các công trình nghiên cứu đã công bố [6], [10], [26], [40] và kết quả khảo sát, dự kiến điều kiện sắc ký như sau:

- Cột: C18

- Pha động: Đệm phosphat 0,02 M pH 5,0 - methanol - acetonitril với tỷ lệ phù hợp

- Tốc độ dòng: 1 - 1,5 mL/ phút.

- Đầu dò PDA: bước sóng 227 - 230 nm.

- Thể tích tiêm mẫu: 10 - 40 μ L

- Nhiệt độ buồng chứa mẫu: 15 - 30 °C.

- Nhiệt độ buồng cột sắc ký: 15 - 30 °C

b₂. Thẩm định quy trình định lượng PTX trong huyết tương của thỏ và chuột thử nghiệm [15], [16]

* Tính đặc hiệu

- Chuẩn bị mẫu placebo, huyết tương chứa PTX, huyết tương chứa IS và huyết tương chứa đồng thời PTX và IS.

- Chiết và xử lý theo quy trình.

- Tiêm dịch chiết từ mẫu placebo, mẫu huyết tương chứa PTX, IS và các mẫu thử tự tạo. Xác định tín hiệu trên sắc ký đồ của dịch chiết sinh học tại thời gian lưu (t_R) của AS, IS.

Yêu cầu: Trên sắc ký đồ của mẫu placebo không xuất hiện pic tại thời điểm tương ứng thời gian lưu của AS và IS trên các sắc ký đồ. Hai pic AS và IS trên cùng 01 sắc ký đồ có sự tách rõ rệt.

* Tính phù hợp của hệ thống

- Mẫu thử tự tạo có AS và IS

- Xử lý mẫu theo quy trình. Tiêm lặp lại 6 lần.

Yêu cầu: giá trị RSD của diện tích đỉnh và thời gian lưu của AS (PTX) và IS không vượt quá 2%, độ phân giải R_s lớn hơn 2.

* Xây dựng đường chuẩn

- Chuẩn bị mẫu placebo: là mẫu huyết tương không thêm AS, IS.
- Chuẩn bị mẫu chuẩn và mẫu thử tự tạo ở các nồng độ tương ứng
- Chiết và xử lý các mẫu thử tự tạo theo quy trình. Xây dựng đường biểu diễn nồng độ theo tỉ lệ diện tích AS và diện tích IS.

Yêu cầu: Độ lệch tại LLOQ không quá 20 % so với nồng độ lý thuyết và không quá 15 % ở các nồng độ khác. Giá trị bình phương của hệ số tương quan (R^2) của đường chuẩn không được thấp hơn 0,98 [19].

* Xác định giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

- Phân tích mẫu placebo, mẫu chuẩn và mẫu thử tự tạo ở nồng độ thấp nhất trong dãy tuyến tính. Xác định diện tích đỉnh của mẫu chuẩn và mẫu thử tự tạo. Tính nồng độ PTX trong mẫu huyết tương, từ đó xác định độ đúng bằng cách so sánh với giá trị thực có trong mẫu.

Yêu cầu: Diện tích đỉnh PTX mẫu thử tự tạo ít nhất gấp 5 lần so với mẫu phân tích; độ đúng, độ chính xác trong giới hạn ± 20 % giá trị ban đầu [17], [19].

* Độ đúng, độ chính xác

Độ đúng, độ chính xác trong ngày và liên ngày

- Pha mẫu thử tự tạo PTX ở trong huyết tương tối thiểu 3 khoảng nồng độ.
- Chuẩn bị 6 mẫu cho mỗi nồng độ. Chiết và xử lý các mẫu theo quy trình.
- Thực hiện lại phép phân tích độ đúng và độ chính xác đã nêu phía trên thêm 3 lần nữa vào 2 ngày khác nhau.
- So sánh SD (%) kết quả thu được của ngày 2 và 3 với kết quả của ngày đầu.

Yêu cầu: SD của các mẫu ở nồng độ cao không vượt quá 15 %, riêng tại LLOQ không vượt quá 20 %. Tỷ lệ thu hồi nằm trong khoảng 85-115 %, với LLOQ trong khoảng 80 – 120 % [18], [19].

* Hiệu suất chiết

- Chuẩn bị mẫu chuẩn và mẫu thử tự tạo trong huyết tương ở tối thiểu 4 nồng độ. Mẫu thử tự tạo có tối thiểu 3 mẫu mỗi nồng độ.

- Chiết và xử lý mẫu theo quy trình. Hiệu suất chiết (%) của AS và IS tính bằng tỉ số của diện tích đo được ở các mẫu thử tự tạo so với diện tích đo ở mẫu chuẩn.

Yêu cầu: SD giữa các mẫu thử cùng nồng độ không vượt quá 15 %, giữa 03 nồng độ khác LLOQ không vượt quá 10 % [18], [19].

* Độ ổn định của dung dịch chuẩn

Độ ổn định dài hạn ở -20 °C của dung dịch chuẩn gốc PTX 500 µg/ mL

- Dùng dung dịch chuẩn gốc PTX 500 µg/ mL pha loãng thành dung dịch chuẩn PTX 100 µg/ mL như quy trình. Từ dung dịch này pha mẫu chuẩn PTX 10 µg/ mL như quy trình để tiến hành định lượng. Chuẩn gốc bảo quản trong tủ lạnh -20 °C.

- Sau 60 ngày, tiến hành pha lại dung dịch chuẩn PTX 100 µg/ mL mới từ chuẩn gốc đã rã đông. Từ dung dịch chuẩn PTX 100 µg/ mL vừa pha, pha 6 mẫu chuẩn PTX 10 µg/ mL như quy trình để tiến hành định lượng.

Yêu cầu: chênh lệch giữa nồng độ PTX của các mẫu chuẩn sau 60 ngày và mẫu chuẩn ban đầu trước khi bảo quản chuẩn gốc không vượt quá 10 % [18], [19].

Độ ổn định ngắn hạn ở nhiệt độ phòng của mẫu chuẩn PTX 100 µg/ mL

- Chuẩn bị mẫu chuẩn PTX 10 µg/ mL từ dung dịch chuẩn gốc PTX 100 µg/ mL và tiến hành sắc kí. Dung dịch chuẩn PTX 100 µg/ mL để ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Sử dụng dung dịch chuẩn này tiến hành pha 6 mẫu chuẩn PTX 10 µg/ mL.

Yêu cầu: Ở hai mức nồng độ LQC và HQC chênh lệch nồng độ tìm lại so với nồng độ lý thuyết không quá 15 % [18], [19].

* Độ ổn định của hoạt chất trong mẫu phân tích

Độ ổn định sau 24 giờ ở nhiệt độ phòng của mẫu phân tích

- Chuẩn bị 7 mẫu thử tự tạo PTX 10 µg/ mL, 1 mẫu phân tích ngay, 6 mẫu còn lại để ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ rồi tiến hành theo quy trình xử lý mẫu và phân tích

- Mẫu ổn định khi kết quả phân tích tương tự nhau. Nếu không đạt thẩm định lại trong khoảng thời gian ngắn hơn như 12 giờ, 6 giờ. Bố trí quy trình xử lý mẫu nhanh hơn và giới hạn số mẫu xử lý mỗi đợt phù hợp với thời gian mẫu ổn định.

Yêu cầu: chênh lệch nồng độ 6 mẫu sau thời gian bảo quản so với mẫu ban đầu không vượt quá 15 % [18], [19].

Độ ổn định sau 24 giờ trong buồng tiêm mẫu tự động (autosampler) tại 15 °C

- Xử lý 7 mẫu thử tự tạo PTX 10 µg/ mL đưa vào phân tích. Một mẫu phân tích ngay, 6 mẫu phân tích sau 24 giờ bảo quản trong autosampler ở 15 °C.

- Mẫu ổn định khi kết quả phân tích tương tự nhau. Nếu không đạt phải thẩm định lại ở thời gian 12 giờ rồi 6 giờ. Bố trí lượng mẫu và số lần tiêm mẫu phù hợp trong thời gian mẫu phân tích ổn định trong khay autosampler.

Yêu cầu: chênh lệch nồng độ 6 mẫu sau thời gian bảo quản so với mẫu ban đầu không vượt quá 15 % [18], [19].

* Độ ổn định ở điều kiện đông lạnh rồi rã đông

- Chuẩn bị 7 mẫu thử tự tạo PTX 10 µg/ mL, 1 mẫu xử lý phân tích ngay, 6 mẫu còn lại tiến hành 3 chu kỳ cấp đông rồi rã đông (cấp đông ở nhiệt độ -76 °C trong 24 h, sau đó để yên ở nhiệt độ phòng đến khi rã đông hoàn toàn là kết thúc 1 chu kỳ). Tiến hành xử lý 6 mẫu sau 3 chu trình cấp đông và rã đông rồi phân tích ngay.

Yêu cầu: độ lệch nồng độ ban đầu và sau 3 chu kỳ không vượt quá 15 % [18], [19].

b₃. Tính kết quả

- Nồng độ PTX (µg/ mL) trong mẫu thử được xác định bằng phương pháp chuẩn nội (IS). Từ tỉ số diện tích đỉnh AS/ IS thu được từ sắc ký đồ mẫu thử và dựa vào phương trình hồi qui tuyến tính của đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ AS với tỉ số diện tích đỉnh AS/ IS của mẫu chuẩn, tính được nồng độ AS của mẫu thử.

- Mẫu kiểm soát (QC) sử dụng mẫu chuẩn ở 03 mức nồng độ (LOQ, MQC và HQC) được tiêm xen kẽ vào giữa và cuối mỗi quy trình phân tích. Mẫu QC phải đạt nồng độ $\leq \pm 15 \%$ so với nồng độ lý thuyết.

c. Xây dựng quy trình định lượng PTX trong mô của thỏ và chuột thử nghiệm bằng phương pháp HPLC

c₁. Phương pháp định lượng PTX trong mô của thỏ và chuột thử nghiệm

Từ các công trình nghiên cứu đã công bố [10] [20] [26] và kết quả khảo sát, dự kiến điều kiện sắc ký như sau:

- Cột: C18
- Pha động:
 - + Thỏ: Đệm phosphat 0,02 M pH 5,0 - methanol - acetonitril với tỷ lệ phù hợp
 - + Chuột: Đệm phosphat 0,02 M pH 5,0 - acetonitril với tỷ lệ phù hợp
- Tốc độ dòng: 1 - 1,5 mL/ phút.
- Đầu dò PDA: bước sóng 227 - 230 nm.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 - 40 μ L
- Nhiệt độ buồng chứa mẫu: 15 - 30 $^{\circ}$ C.
- Nhiệt độ buồng cột sắc kí: 15 - 30 $^{\circ}$ C

c2. Thẩm định quy trình định lượng PTX trong mô của thỏ và chuột thử nghiệm

* Các thông số thẩm định bao gồm

- Tính đặc hiệu
- Tính phù hợp của hệ thống
- Xây dựng đường chuẩn
- Xác định giới hạn định lượng dưới (LLOQ)
- Độ đúng, độ chính xác trong ngày, liên ngày
- Độ ổn định của hoạt chất trong mẫu phân tích

* Tiến hành chuẩn bị các mẫu tương tự mục a₂. Yêu cầu về thông số thẩm định theo EMA và FDA [15], [16].

2.3.3.3 Tính kết quả

a. Xác định tỉ trọng thô của dịch mô

Thực nghiệm tiến hành trên 10 mẫu mô sinh thiết (chính xác khoảng 1,000g/ mẫu) từ mô gan, thận, phổi của 03 cá thể. Cân lượng mẫu sau khi đồng nhất hóa với NaCl 0,9% và xác định thể tích dịch mô thu được.

Tỉ trọng thô của dịch mô theo thực nghiệm được tính theo công thức:

$$d_A = \frac{\text{Khối lượng dịch mô (g)}}{\text{Thể tích dịch mô (mL)}}$$

Tỉ trọng dung dịch NaCl 0,9% cùng điều kiện:

$$d_o = \frac{\text{Khối lượng dung dịch (g)}}{\text{Thể tích dung dịch (mL)}}$$

b. Xác định nồng độ PTX trong mô

- Nồng độ PTX ($\mu\text{g/mL}$) (AS) trong dung môi hòa tan được xác định bằng phương pháp dùng chuẩn nội (IS). Từ tỉ số diện tích đỉnh AS/ IS thu được từ sắc ký đồ của mẫu thử và dựa vào phương trình hồi qui tuyến tính của đường chuẩn biểu thị mối tương quan giữa nồng độ AS với tỉ số diện tích đỉnh AS/ IS của mẫu chuẩn tính được nồng độ PTX trong mẫu thử.

- Dịch đồng nhất các mô sau khi được định lượng sẽ có đơn vị là $\mu\text{g PTX/ mL}$ dịch mô. Để đưa về đơn vị có ý nghĩa cho sự phân bố thuốc trong mô, mẫu được quy về đơn vị $\mu\text{g PTX/ g}$ mô [36] [65]. Công thức quy đổi như sau:

$$\text{Nồng độ PTX trong mô chuột} = \frac{\text{Nồng độ PTX trong dịch mô } (\mu\text{g/mL}) \times (1 + 5 \cdot d_o)}{d_A}$$

$$\text{Nồng độ PTX trong mô thỏ} = \frac{\text{Nồng độ PTX trong dịch mô } (\mu\text{g/mL}) \times (1 + d_o)}{d_A}$$

c. Xác định các thông số dược động học

- Kết quả định lượng nồng độ thuốc trong dân số (huyết tương và mô) được trình bày dưới dạng khoảng ước lượng chính xác cho 95% dân số: Trung bình \pm SD.

- Dựa trên phương pháp nghiên cứu đã xây dựng, động vật được tiêm tĩnh mạch nhanh một liều duy nhất nên xem nồng độ đỉnh đạt được trong máu là ngay sau khi tiêm thuốc: $t_{\max} \rightarrow 0$ và $C_{\max} \rightarrow C_o$.

- So sánh các thông số giữa hai chế phẩm

C_{\max} và t_{\max} : Để xác định các trị số này là dựa vào đường biểu diễn dược động học nồng độ thuốc theo thời gian.

Diện tích dưới đường cong trong khoảng 0 tới t ($AUC_{0 \rightarrow t}$):

$$AUC_{0 \rightarrow t} = \sum_{i=0}^{t-1} \frac{(C_i + C_{i+1}) \times (t_{i+1} - t_i)}{2}$$

Diện tích dưới đường cong trong khoảng 0 tới ∞ ($AUC_{0 \rightarrow \infty}$):

$$AUC_{0 \rightarrow \infty} = AUC_{0 \rightarrow t} + AUC_{t \rightarrow \infty} = \sum_{i=0}^{t-1} \frac{(C_i + C_{i+1}) \times (t_{i+1} - t_i)}{2} + \frac{C_t}{k}$$

t là thời điểm theo dõi cuối cùng của phương pháp nghiên cứu.

C_i , C_{i+1} , C_t nồng độ PTX tại thời điểm lấy mẫu i, i+1, t (giờ);

k là hằng số thải trừ (độ dốc của đường biểu diễn log nồng độ PTX theo thời gian)

- Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excel 2013; xác định bằng phương pháp trắc nghiệm t, khoảng tin cậy p = 0,05.

Nếu tỷ số của các giá trị trung bình $AUC_{0 \rightarrow \infty}$, C_{max} giữa thuốc nghiên cứu và thuốc đối chứng nằm trong khoảng 80 - 120% hoặc 80 - 125% (phân tích số liệu chuyển dạng ln) kết luận 2 thuốc tương tự dược động học trên động vật thí nghiệm.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ

3.1. XÂY DỰNG CÔNG THỨC VÀ QUY TRÌNH ĐIỀU CHẾ THUỐC TIÊM CHỨA PTX VỚI HAI DẠNG BẢO CHẾ DUNG DỊCH ĐẬM ĐẶC VÀ BỘT ĐÔNG KHÔ PHA TIÊM TRUYỀN

3.1.1. Nghiên cứu bào chế dung dịch đậm đặc chứa PTX

3.1.1.1. Khảo sát tính chất lý hóa của chế phẩm đối chứng

Chế phẩm Stragen® được đóng lọ thủy tinh kín (6 mg PTX/ mL - 5 mL). Kết quả tính ổn định theo thời gian của Stragen® sau khi pha loãng trong NaCl 0,9% hoặc glucose 5% theo nồng độ chỉ định 0,3; 0,6 và 1,2 mg PTX/ mL bảo quản ở điều kiện nhiệt độ 2 - 8 °C được trình bày trong Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả định lượng PTX (%) các dung dịch (S) sau khi pha loãng từ Stragen® trong dung dịch NaCl 0,9% và glucose 5%

Mẫu pha trong NaCl 0,9%	Hàm lượng PTX (%)				Mẫu pha trong glucose 5%	Hàm lượng PTX (%)			
	0 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ		0 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
S ₁	97,53	95,70	95,66	95,61	S ₄	99,28	98,73	98,43	98,17
S ₂	100,10	99,07	98,24	97,40	S ₅	100,67	94,57	92,14	90,30
S ₃	99,28	98,88	98,15	97,43	S ₆	98,77	96,47	96,54	94,90

S₁ S₂ S₃: Nồng độ 1,2 - 0,6 - 0,3mg PTX / mL trong NaCl 0,9%

S₄ S₅ S₆: Nồng độ 1,2 - 0,6 - 0,3mg PTX / mL trong glucose 5%

Nhận xét: Chế phẩm đạt chỉ tiêu theo USP 36 về hàm lượng (90 - 110%), độ ổn định của dung dịch pha loãng ở nồng độ theo chỉ định ổn định đến 72 giờ (hàm lượng vẫn đạt > 90%).

3.1.1.2. Xây dựng công thức và quy trình bào chế dung dịch đậm đặc chứa PTX

Kết quả khảo sát thành phần công thức với tỷ lệ sử dụng 2 chất diện hoạt Tween 80 (T80) và Kolliphore ELP (K) trong ethanol khan và chỉ tiêu về cảm quan, hàm lượng PTX sau khi pha loãng trong NaCl 0,9% hoặc glucose 5% theo nồng độ chỉ định (0,6 mg/ mL) được trình bày trong Bảng 3.2 và Bảng 3.3.

Bảng 3.2. Kết quả cảm quan và hàm lượng PTX (%) các dung dịch sau khi pha loãng 10 lần từ dung dịch đậm đặc trong NaCl 0,9 %

Công thức	Thời điểm sau pha loãng	Tỷ lệ thành phần chất điện hoạt trong dung môi						
		T1 (1:4)	T2 (1:3)	T3 (1:2)	T4 (1:1)	T5 (2:1)	T6 (3:1)	T7 (4:1)
T80/E	0 giờ	-	-	-	+ (92,73)	+ (98,93)	+ (99,14)	+ (95,70)
	24 giờ	-	-	-	- (68,01)	+ (97,21)	+ (93,15)	+ (91,96)
K/E	0 giờ	-	-	± (88,60)	+ (98,64)	+ (95,34)	+ (97,84)	+ (97,70)
	24 giờ	-	-	- (60,33)	+ (93,89)	+ (94,64)	+ (95,41)	+ (96,34)

(-): dung dịch tủa đục (+): dung dịch trong (±): dung dịch đục mờ

Bảng 3.3. Kết quả cảm quan và hàm lượng PTX (%) các dung dịch sau khi pha loãng 10 lần từ dung dịch đậm đặc trong glucose 5 %

Công thức	Thời điểm sau pha loãng	Tỷ lệ thành phần chất điện hoạt trong dung môi						
		T1 (1:4)	T2 (1:3)	T3 (1:2)	T4 (1:1)	T5 (2:1)	T6 (3:1)	T7 (4:1)
T80/E	0 giờ	-	-	-	+ (103,82)	+ (100,82)	+ (93,98)	+ (95,87)
	24 giờ	-	-	-	- (86,12)	+ (97,70)	+ (93,71)	+ (94,12)
K/E	0 giờ	-	-	± (90,01)	+ (99,17)	+ (93,85)	+ (102,49)	+ (95,63)
	24 giờ	-	-	- (83,57)	+ (94,69)	+ (92,74)	+ (98,40)	+ (94,52)

Nhận xét: Khi dùng T80/ E cho các công thức T5, T6 và T7 với các tỉ lệ tương ứng (2:1) (3:1) (4:1) và K/ E cho các công thức K4, K5, K6 và K7 với các tỉ lệ tương ứng (1:1) (2:1) (3:1) (4:1), các dung dịch đậm đặc từ các công thức này khi được pha loãng 10 lần (nồng độ 0,6 mg/ mL – dùng để sàng lọc) với dung môi pha tiêm

truyền NaCl 0,9 % và glucose 5 % đều đạt được sự ổn định trong vòng 24 giờ về cảm quan và hàm lượng trong giới hạn cho phép (> 90 %). Ở các tỷ lệ khác, các dung dịch đều bị tủa. Cụ thể với các công thức T1, T2 T3 và K1, K2 dung dịch bị tủa trong vòng 30 - 60 phút sau khi pha loãng. T4 sau 24 giờ dung dịch bị tủa và không đạt giới hạn cho phép. Tương tự, K3 khi pha loãng với glucose 5% thì ổn định khoảng 3 giờ, sau đó cũng bị tủa. Hai công thức T5 (T80/ E (2:1)) và K4 (K/ E (1:1)) được lựa chọn để tiếp tục khảo sát với sự ảnh hưởng của nồng độ acid citric (0,01M) lên độ ổn định của sản phẩm sau khi pha loãng.

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của acid citric với nồng độ 0,01 M (+AC) đến độ ổn định của các dung dịch sau khi pha loãng ở các nồng độ hướng dẫn trị liệu (0,3; 0,6 và 1,2 mg/ mL) từ 2 công thức khảo sát về cảm quan và hàm lượng PTX (%) theo thời gian được thể hiện ở Bảng 3.4 - 3.5.

Bảng 3.4. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của acid citric đến cảm quan và hàm lượng PTX (%) các dung dịch sau khi pha loãng ở các nồng độ trị liệu trong NaCl 0,9%

Công thức	Dung dịch pha loãng	Hàm lượng PTX (%)			
		0 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
K4	K4₁	97,31	93,27	62,39 ⁽⁻⁾	56,22 ⁽⁻⁾
	K4₂	100,58	95,59	91,60	71,43 ^(±)
	K4₃	98,29	93,57	82,80 ^(±)	75,37 ^(±)
K4 + AC	K4₁+AC	96,11	95,05	90,67 ^(±)	82,43 ^(±)
	K4₂+AC	99,48	98,25	94,52	93,46
	K4₃+AC	99,75	98,78	95,61	92,14
T5	T5₁	96,73	94,07	94,01	93,93
	T5₂	98,33	96,36	94,58	94,37
	T5₃	101,89	99,26	95,76	93,60
T5 + AC	T5₁+AC	96,98	94,26	93,94	93,62 [*]
	T5₂+AC	98,32	97,66	96,76	95,85 [*]
	T5₃+AC	101,89	99,26	96,98	94,69

(-): dung dịch tủa đục (±): dung dịch đục mờ (*): dung dịch tủa li ti màu trắng
 1-2-3: Nồng độ lần lượt tương ứng 1,2 - 0,6 - 0,3 mg PTX /mL +AC: acid citric 0,01M

Bảng 3.5. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của acid citric đến cảm quan và hàm lượng PTX (%) các dung dịch sau khi pha loãng ở các nồng độ trị liệu trong glucose 5%

Công thức	Dung dịch pha loãng	Hàm lượng PTX (%)			
		0 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
K4	K4₁	98,53	97,26	83,52 ^(±)	63,25 ⁽⁻⁾
	K4₂	100,00	92,94	85,78 ^(±)	76,87 ^(±)
	K4₃	97,11	96,60	91,06	86,73 ^(±)
K4 + AC	K4₁+AC	101,03	95,08	93,56	86,09 ^(±)
	K4₂+AC	98,05	97,63	94,63	90,68
	K4₃+AC	101,64	98,60	96,37	93,04
T5	T5₁	103,10	99,43	92,93	92,25
	T5₂	96,02	95,58	95,05	92,37
	T5₃	103,47	97,52	97,26	93,62
T5 + AC	T5₁+AC	98,10	97,16	95,02	92,88
	T5₂+AC	98,90	98,30	97,82	97,71
	T5₃+AC	101,82	100,02	98,22	95,83

(-): dung dịch tủa đục

(±): dung dịch đục mờ

1-2-3: Nồng độ lần lượt tương ứng 1,2 - 0,6 - 0,3 mg PTX/ mL

+AC: acid citric 0,01M

Nhận xét:

Việc thêm acid citric với nồng độ thường được sử dụng trong các chế phẩm pha tiêm truyền chứa PTX (+AC) cho dung dịch sau pha loãng đạt độ ổn định về hàm lượng trong giới hạn cho phép trong vòng 72 giờ.

- Công thức K/E (1:1) có acid citric 0,01 M (K4 + AC) có acid citric 0,01 M (nồng độ thường được sử dụng trong các chế phẩm pha tiêm chứa PTX) cho dung dịch pha loãng đạt ổn định về hàm lượng trong giới hạn cho phép trong vòng 72 giờ.

- Công thức dùng K4 + AC cho 03 nồng độ dung dịch pha loãng có độ ổn định trong vòng 48 giờ sau khi pha loãng, sau đó thì nồng độ 1,2 mg /mL bắt đầu giảm dần và vượt ra khỏi giới hạn cho phép (80 – 90%).

- Đối với công thức T80/E có acid citric 0,01 M không cho thấy sự cải thiện hơn so với công thức không dùng acid citric. Tất cả các dung dịch khi pha loãng đều trong và có hàm lượng hoạt chất trong giới hạn quy định trong khoảng thời gian khảo sát. Do đó lựa chọn công thức với tỉ lệ T80/ E (2:1) & K/ E (1:1) có acid citric 0,01 M; để tiếp tục khảo sát so sánh với thuốc đối chứng.

3.1.1.3. Khảo sát lặp lại công thức lựa chọn với lượng pha chế lớn

Kết quả nghiên cứu pha chế 2 công thức lựa chọn K4 và T5 có acid citric 0,01 M với lượng lớn gấp 30 lần (150 ml dung dịch đậm đặc) được thể hiện ở Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Kết quả cảm quan và định lượng PTX (%) các dung dịch có acid citric sau khi pha loãng trong dung dịch NaCl 0,9% và glucose 5%

Mẫu pha trong NaCl 0,9 %	Hàm lượng PTX (%)				Mẫu pha trong glucose 5 %	Hàm lượng PTX (%)			
	0 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ		0 giờ	24 giờ	48 giờ	72 giờ
K4₁+AC	98,21	96,44	96,44	92,52 ^(*)	K4₄+AC	98,62	97,61	96,37	91,75 ^(*)
K4₂+AC	103,03	101,82	98,52	95,92	K4₅+AC	98,89	98,86	96,00	95,43
K4₃+AC	101,55	100,38	99,32	96,68	K4₆+AC	103,14	102,56	101,87	96,70
T5₁+AC	96,22	94,17	94,14	93,91	T5₄+AC	99,55	94,81	93,97	91,41
T5₂+AC	97,97	96,14	96,03	95,51	T5₅+AC	101,91	98,61	97,12	93,28
T5₃+AC	104,75	98,37	97,23	95,60	T5₆+AC	103,84	99,61	95,04	94,38

(*): dung dịch tủa li ti màu trắng

1-2-3: Nồng độ lần lượt tương ứng 1,2 - 0,6 - 0,3 mg PTX/ mL trong NaCl 0,9%

4-5-6: Nồng độ lần lượt tương ứng 1,2 - 0,6 - 0,3 mg PTX/ mL trong glucose 5%

Nhận xét: theo thông tin được ghi kèm theo sản phẩm đối chứng, điều kiện là dung dịch pha loãng sẽ ổn định (tương ứng với hàm lượng trong khoảng cho phép) trong vòng 24 giờ sau khi pha loãng. Công thức K/E (1:1) acid citric 0,01 M được lựa chọn cho thử nghiệm chế tạo quy mô lớn hơn (50 lọ - 250 mL, tiến hành 3 lô), do:

+ Công thức cho dung dịch đậm đặc và dung dịch pha loãng đạt độ ổn định ít nhất 24 giờ sau khi pha khi so sánh đồng thời kết quả với chế phẩm đối chứng Stragen®.

+ Công thức T80/E (2:1) khi pha loãng ở nồng độ 1,2 mg/ mL thì nồng độ tween là 13 % cao hơn mức được FDA cho phép (> 8 %).

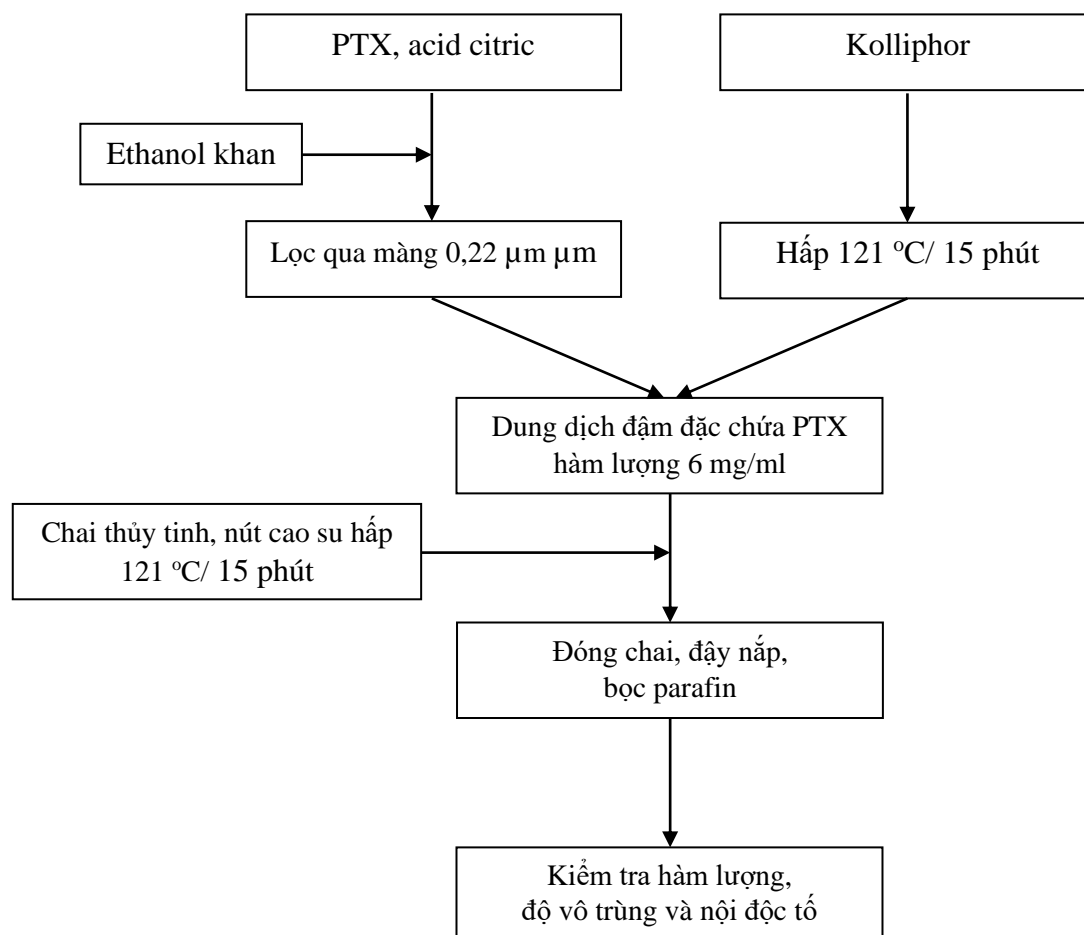
+ Dung dịch có độ nhớt nhỏ hơn độ nhớt của công thức dùng T80/E (2:1).

3.1.1.4. Khảo sát sản phẩm quy trình bào chế nâng cấp cỡ lô

- Công thức pha chế 250 mL dung dịch đậm đặc chứa PTX:

Paclitaxel	1500 mg
Acid citric	500 mg
Kolliphor ELP và ethanol khan (1:1)	vđ 250 mL

- Phương pháp tiệt trùng phù hợp cho từng thành phần trong công thức và pha chế trong khu vực vô trùng (cấp A). Quy trình được mô tả theo Hình 3.1 và xem chi tiết Phụ lục 4. Kết quả các chỉ tiêu chất lượng tại thời điểm ban đầu và 24 giờ sau khi pha loãng được trình bày trong Bảng 3.7.



Hình 3.1. Sơ đồ quy trình pha chế dung dịch đậm đặc chứa PTX qui mô 50 lọ
Bảng 3.7. Kết quả về cảm quan, pH, hàm lượng PTX, tạp liên quan, nội độc tố, độ vô khuẩn của chế phẩm

Chỉ tiêu	0 giờ (n = 3)	24 giờ (n = 3)
Cảm quan	Dung dịch thu được trong suốt, hơi nhớt	
Hàm lượng PTX (%)	100,77	98,79
pH	3,62	4,74
Tạp liên quan	Đạt	Đạt
Nội độc tố	(Phụ lục 13.4 – DĐVN IV) - Đạt	
Độ vô khuẩn	Phương pháp màng lọc (Phụ lục 13.7 – DĐVN IV) - Đạt	

Nhận xét: Chế phẩm dạng dung dịch đậm đặc bào chế trong phòng thí nghiệm đạt yêu cầu chất lượng theo các chỉ tiêu trên nên có thể sử dụng tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

3.1.2. Nghiên cứu bào chế dạng bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX

3.1.2.1. Xây dựng công thức và qui trình bào chế bột đông khô chứa PTX

a. Khảo sát ảnh hưởng của HP- β -CyD lên khả năng cải thiện độ tan của PTX

- Sử dụng tỷ lệ phối hợp nồng độ HP- β -CyD với 12 mg PTX từ 0,2 % (công thức F1)- 0,3% (F2) - 0,35 % (F3) - 0,4 % (F4) (kl/tt) trong dung môi hoàn nguyên dựa vào độ trong của dung dịch đậm đặc và dung dịch pha loãng sau 1 giờ để lựa chọn nồng độ HP- β -CyD (chi tiết Phụ lục 4).

Nhận xét: với lượng HP- β -CyD thấp (nồng độ sử dụng từ 0,3 % trở xuống) dung dịch phức tủa ngay khi phối hợp. Với nồng độ HP- β -CyD là 0,35 % và 0,4 %, dịch pha loãng tại thời điểm lúc đầu trong, chứng tỏ lượng HP- β -CyD sử dụng đủ để tạo phức bao với PTX. Tuy nhiên khi quan sát thêm khoảng hơn 10 phút, dung dịch có nồng độ HP- β -CyD 0,35 % tủa, trong khi dung dịch có nồng độ 0,4 % hơn 30 phút mới tạo tủa. Dung dịch tủa chứng tỏ phức tạo thành không ổn định và cần phải sử dụng thêm tá dược để ổn định phức. Tỷ lệ nồng độ HP- β -CyD lựa chọn sử dụng là 0,4% (F4).

b. Khảo sát ảnh hưởng của tá dược ổn định phức

Hòa tan PVP K30 vào dung dịch HP- β -CyD trước khi tạo phức với PTX. Khảo sát nồng độ (công thức F5-F7) dựa trên độ trong của dung dịch sau khi pha loãng với NaCl. Kết quả ở Bảng 3.8 và chi tiết Phụ lục 4.

Bảng 3.8. Tỷ lệ PVP K30 sử dụng

Thành phần	F5 (1%)	F6 (1,5%)	F7 (2%)
PTX (mg)	9	9	9
HP- β -CyD (mg)	60	60	60
PVP K30 (mg)	150	225	300
Dung dịch NaCl 0,9%	Vừa đủ 15 ml	Vừa đủ 15 ml	Vừa đủ 15 ml
Thời gian ổn định độ trong	30 phút	30 phút	1,5 giờ

Nhận xét: Thời gian duy trì độ ổn định phức (dung dịch phải trong) tỉ lệ thuận với nồng độ PVP K30 sử dụng. Theo quan sát để duy trì độ trong của dung dịch đến khoảng 2 giờ, PVP K30 tối thiểu phải là 2%. Lựa chọn nồng độ PVP K30 2% trong công thức theo Bảng 3.9.

c. Khảo sát ảnh hưởng của chất trợ tan

PEG 400 và Tween 80 là chất trợ tan phổ biến trong bào chế thuốc tiêm. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của hai chất trợ tan với các tỷ lệ khác nhau (công thức F8 - F18) được trình bày tại Bảng 3.9.

Bảng 3.9. Kết quả đánh giá cảm quan dung dịch đậm đặc

Thời gian (giờ)	Công thức	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18
	PEG 400 (%)	10	10	10	0	2	2	3	3	4	4	5
	Tween 80 (%)	0	2	5	8	8	7	7	6	6	5	5
0		-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
24		**	-	+	**	+	+	+	-	+	+	+
48		**	**	+	**	+	-	+	**	+	-	+
72		**	**	+	**	+	**	+	**	+	-	+

(+): dung dịch trong (-): dung dịch tủa đục (**): dung dịch tủa nhiều

Nhận xét:

- Các công thức chỉ sử dụng một loại chất trợ tan PEG 400 hoặc Tween 80 đều cho thấy tính kém bền của dung dịch (tối đa đến 24 giờ có tủa xuất hiện), chứng tỏ cần có sự phối hợp của cả 2 chất trợ tan này.

- Kết quả khảo sát các công thức với tỷ lệ tween 80 từ 5 - 8% (F10, F12, F14, F16 và F18) cho thấy giới hạn của PEG 400 tối thiểu (2%) cần sử dụng giúp duy trì dung dịch trong đến 72 giờ.

d. Dung môi

- Lượng nước sử dụng

+ PTX rất kém tan trong nước, sự có mặt của nước có thể khiến PTX tủa trở lại, vì vậy nên dùng một lượng nước tối thiểu để hòa tan các tá dược.

+ Từ kết quả khảo sát, lượng nước tối đa sử dụng hòa tan các tá dược 4,0 mL (xem chi tiết Phụ lục 4).

Nhận xét: Trong quá trình khảo sát các dung môi ethanol, tert-butanol và DMSO, dung môi tert-butanol được lựa chọn vì:

- + Phức tạo ra với nồng độ PTX 9 mg/ mL có độ ổn định cao (> 120 phút) so với ethanol (15 phút).
- + Dung dịch được làm đông hoàn toàn trong giai đoạn tiền đông nên không bị sôi ở các giai đoạn làm khô so với DMSO.
- + Nồng độ PTX 9 mg/ mL vẫn hòa tan tốt (ethanol không hòa tan hết PTX ở nồng độ này).
- Nồng độ PTX 12 mg/ mL dung môi không hòa tan hết PTX nên chọn nồng độ PTX 9 mg/ mL đưa vào khảo sát tiếp.

e. Khảo sát công thức và quy trình điều chế bột đông khô PTX pha tiêm truyền

- Chọn các công thức đã khảo sát sơ bộ tỷ lệ PEG 400 và tween 80 cho dung dịch pha loãng bền đến 72 giờ, phối hợp thêm manitol với lượng tối đa cho phép sử dụng để khảo sát các thông số của quy trình đông khô (tỷ lệ tá dược tương ứng 10-5 (F10), 2-8 (F12), 3-7 (F14), 4-6 (F16), 5-5 (F18)).
- Đông khô theo hai quy trình A và B ứng với thời gian tiền đông là 48 giờ, giai đoạn làm khô với áp suất lần lượt là 0,0394 mbar – 0,0108 mbar (quy trình A) và 0,0108 mbar – 0,0026 mbar (quy trình B).

Nhận xét:

- Quy trình đông khô với áp suất thấp (quy trình B) cho chất lượng khối thuốc khô, rắn chắc và mịn hơn so với quy trình A, thời gian duy trì độ trong của dung dịch sau khi hòa tan lại cũng dài hơn.
- Pha chế các công thức với các tỷ lệ tá dược thay đổi từ công thức đã khảo sát ở trên, đông khô theo quy trình B. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.10.

Bảng 3.10. Kết quả pH và hàm lượng PTX (%) từ các công thức khảo sát

Công thức	pH dung dịch sau pha loãng	Thời gian hòa tan (phút)	Hàm lượng (%) PTX trong dung dịch sau pha loãng tại các thời điểm (giờ)				Hình thức bánh đông khô
			0	24	48	72	
F10 (10-5)	4,32	3	93,53	92,31	91,98	90,88	Khối thuốc nứt, dễ vỡ
F12 (2-8)	4,05	2	90,95	89,52	88,15	85,82	Khối thuốc chắc, hơi rạn bề mặt
F14 (3-7)	4,08	3	90,14	88,57	87,40	85,04	Khối thuốc nứt nhiều
F16 (4-6)	4,25	3-4	90,04	88,91	87,74	84,89	Khối thuốc hơi rạn bề mặt
F18 (5-5)	4,25	2	98,24	95,08	93,62	91,30	Khối thuốc chắc, rạn nứt ít
F19 (5-6)	4,26	2	96,35	95,71	93,74	91,38	Khối thuốc chắc, không rạn nứt

Nhận xét:

- Kết quả định lượng PTX trong dung dịch sau khi pha loãng với NaCl 0,9% ở các thời điểm cho thấy các công thức có lượng PEG 400 từ 5% trở lên đều duy trì được hàm lượng PTX đến 90% sau 72 giờ pha loãng. Dựa trên tiêu chí lựa chọn lượng tá dược thấp nhất cho sản phẩm đông khô có hình thức đẹp, mịn, chắc, thời gian hòa tan lại nhanh, duy trì được độ trong và hàm lượng PTX trong giới hạn (từ 90 – 110 %) được hơn 24 giờ, công thức với tỷ lệ tá dược 5-6 (F19) được chọn.

3.1.2.2. Khảo sát lặp lại công thức

Công thức 1 lọ

Paclitaxel	9 mg
Hydroxypropyl – β – cyclodextrin	40 mg
Polyvinyl pyrrolidon K30	200 mg
Polyetylen glycol 400	0,5 ml
Tween 80	0,6 ml
Manitol	0,75 g
Dung môi	vừa đủ

Sản phẩm đạt các chỉ tiêu về mặt cảm quan, hàm lượng nước, tạp và hàm lượng PTX trình bày ở Bảng 3.11.

Bảng 3.11: Kết quả khảo sát lặp lại lô bột đông khô pha tiêm

Lô	Hình thức cảm quan	Hàm lượng nước (%)	Tạp liên quan	Hàm lượng PTX trong dung dịch sau pha loãng (%)		
				24 giờ	48 giờ	72 giờ
1	Khối thuốc trắng mịn, chắc, không rạn nứt	6,4	Đạt	94,39	93,74	91,14
		6,7	Đạt	94,36	93,68	91,08
		6,4	Đạt	94,41	93,77	91,34
	TB			94,39	93,73	91,19
	RSD			0,025	0,046	0,14
2	Khối thuốc trắng mịn, chắc, không rạn nứt	6,5	Đạt	94,09	93,53	91,01
		6,5	Đạt	94,59	93,85	91,32
		6,6	Đạt	94,28	93,66	91,26
	TB			94,32	93,68	91,20
	RSD			0,25	0,16	0,16
3	Khối thuốc trắng mịn, chắc, không rạn nứt	6,1	Đạt	94,78	93,90	91,52
		6,3	Đạt	94,63	93,87	91,47
		6,2	Đạt	94,80	93,95	91,58
	TB			94,74	93,91	91,52
	RSD			0,093	0,040	0,055

3.1.2.3. Lựa chọn thể tích bao bì

- Dung tích thông thường của lọ thuốc tiêm là 10 mL, với công thức ở mục 3.1.2.2 từ quá trình khảo sát các tá dược và quy trình đông khô, chúng tôi đã lựa chọn chai thủy tinh có dung tích gấp đôi 20 mL.

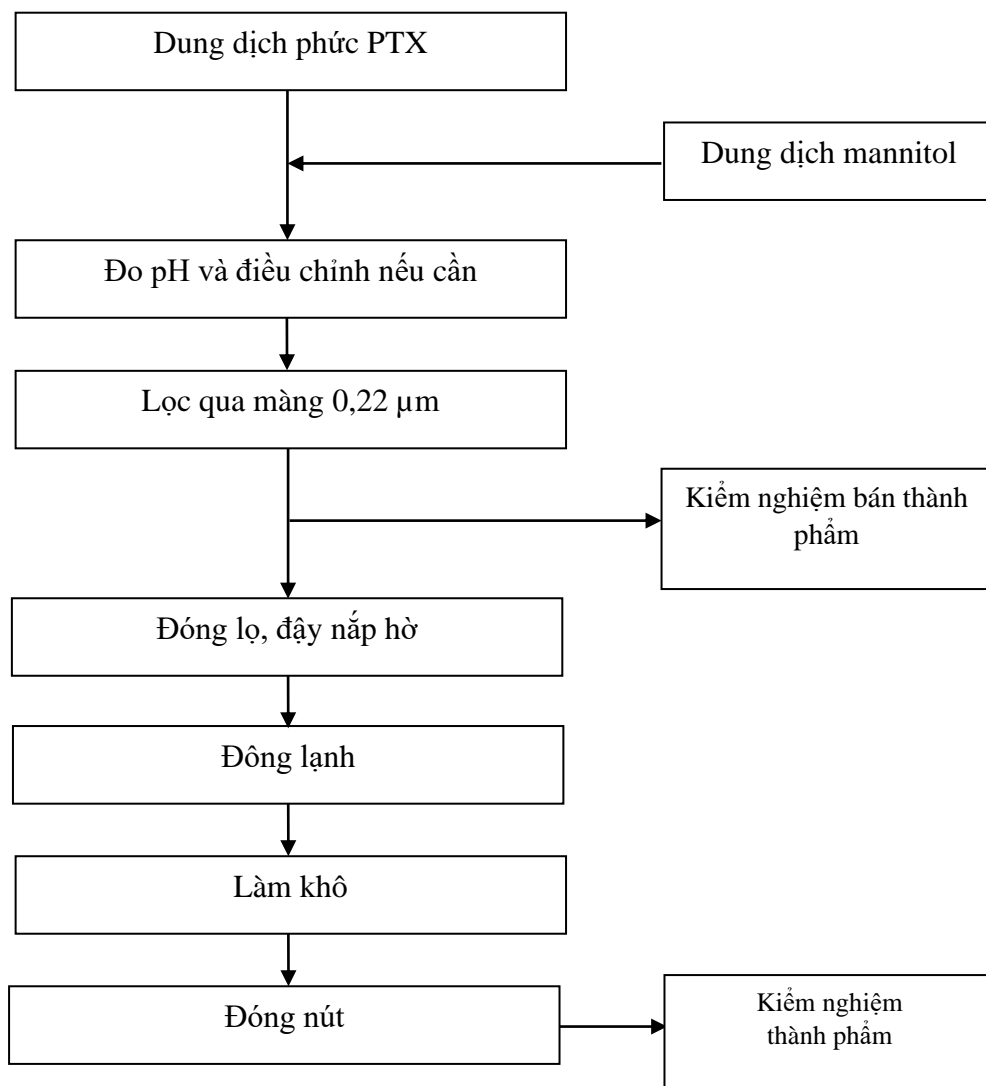
- Để đảm bảo mức chiều cao dung môi trước khi đông khô không quá 1cm, công thức mới tăng lượng PTX lên đến 24 mg/ lọ.

3.1.2.4. Khảo sát sản phẩm quy trình bào chế nâng cấp cỡ lô

- Quy trình bào chế trình bày theo Hình 3.2 và Phụ lục 6. Kết quả các chỉ tiêu chất lượng được trình bày trong Bảng 3.12.

Công thức 1 lọ:

Paclitaxel	24 mg
Hydroxypropyl – β – cyclodextrin	107 mg
Polyvinyl pyrrolidon K30	533 mg
Polyetylen glycol 400	1,3 ml
Tween 80	1,6 ml
Manitol	1,97 g
Dung môi	vừa đủ



Hình 3.2. Quy trình bào chế dạng bột đông khô pha tiêm chứa PTX cỡ lô 50 lọ

Bảng 3.12. Kết quả về cảm quan, pH, hàm lượng PTX, tạp liên quan, nội độc tố, độ vô khuẩn của chế phẩm bột đông khô

Chỉ tiêu	Kết quả
Cảm quan	Bánh thuốc màu trắng, không rạn nứt.
Hàm lượng PTX (%)	99,74
pH	4,15
Dung dịch hợp thành	Sau khi hòa tan vào NaCl 0,9 %, dung dịch trong không có tiểu phân nhìn thấy bằng mắt thường.
Tạp liên quan	Theo Dược điển USP 36 - Đạt
Nội độc tố	Không quá 0,67 EU/ mg - Đạt
Độ vô khuẩn	Chế phẩm vô khuẩn

Nhận xét: Chế phẩm dạng dung dịch đậm đặc bào chế trong phòng thí nghiệm có thể sử dụng tiến hành các thử nghiệm tiếp theo.

3.2. XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA HAI CHẾ PHẨM NGHIÊN CỨU

3.2.1. Xây dựng quy trình định lượng PTX và tạp liên quan trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC

3.2.1.1. Xây dựng qui trình định lượng PTX trong chế phẩm

a. Qui trình định lượng PTX trong chế phẩm

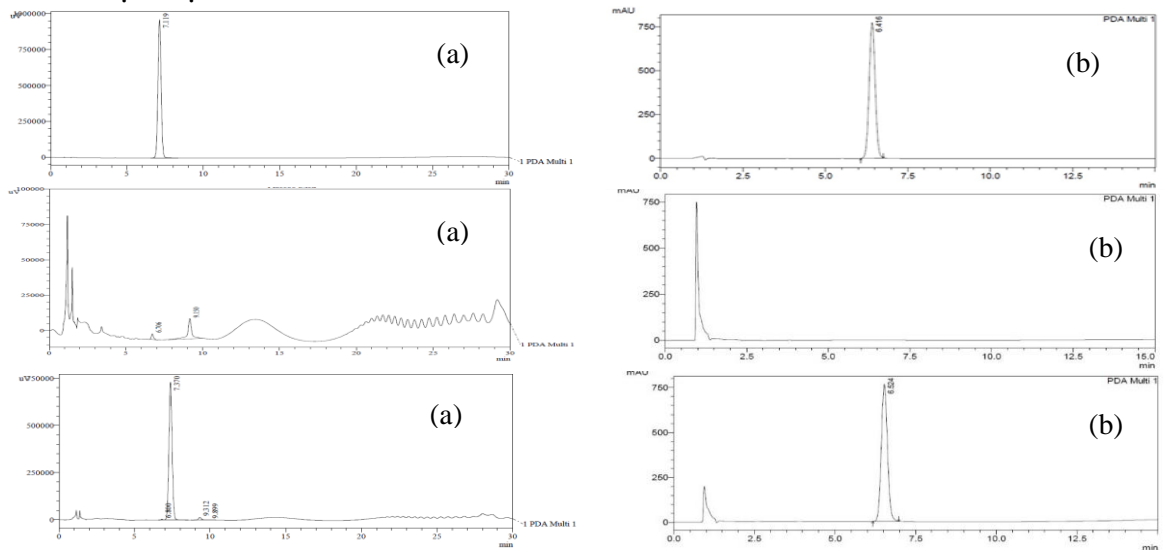
Từ kết quả khảo sát các thông số của điều kiện phân tích PTX trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC, kết hợp tham khảo chuyên luận về định lượng và tạp liên quan của thuốc tiêm truyền chứa PTX theo USP và nguyên liệu PTX theo BP; các thông số của chương trình sắc ký được trình bày ở Bảng 3.13.

Bảng 3.13. Điều kiện sắc ký của phương pháp định lượng PTX trong chế phẩm

TT	Thông số	Định lượng PTX
1	Cột sắc ký	Luna® PFP 150 x 4,6 mm, 5 μ m, nhiệt độ cột 25 °C
2	Thể tích tiêm mẫu	10 μ L
3	Tốc độ dòng	1,2 mL/ phút
4	Đầu dò PDA (λ_{\max})	227 nm
5	Pha động	Nước - acetonitril (50 : 50), rửa giải đẳng dòng.

b. Thẩm định quy trình định lượng PTX trong chế phẩm

b₁. Tính đặc hiệu



Hình 3.3. Sắc ký đồ của mẫu chuẩn PTX, mẫu placebo, mẫu thử của dung dịch đậm đặc (a) và bột đông khô (b)

Nhận xét: Sắc ký đồ mẫu chuẩn, mẫu placebo và mẫu thử của dung dịch đậm đặc (a) và bột đông khô (b) trong Hình 3.3 cho thấy các pic tách riêng biệt. Sự có mặt của tá dược trong công thức không ảnh hưởng đến khả năng định lượng hoạt chất PTX. Quy trình định lượng đạt tính đặc hiệu.

b₂. Tính phù hợp của hệ thống (SST)

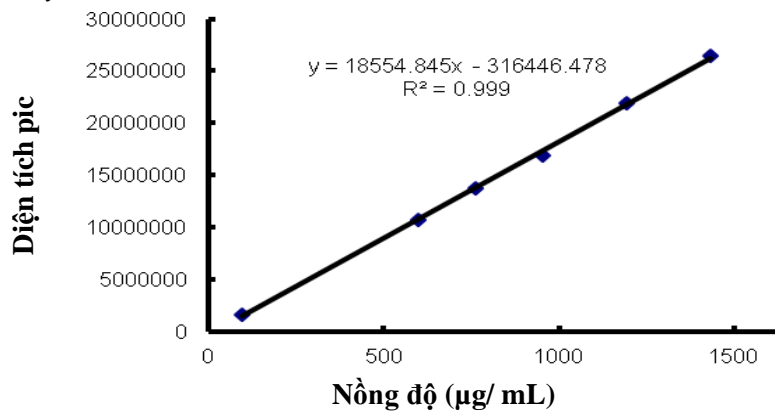
Kết quả được thể hiện ở Bảng 3.14 (xem chi tiết Phụ lục 7, Phụ lục 8).

Bảng 3.14. Kết quả thẩm định tính phù hợp hệ thống của mẫu chuẩn và mẫu thử dung dịch đậm đặc và bột đông khô trong phương pháp định lượng PTX

Mẫu (n = 6)	Thông số	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
Mẫu chuẩn	TB	7,16	13981485	5288	1,05
	RSD (%)	0,98	0,32	-	0,11
Dung dịch đậm đặc	TB	7,33	10886686	5423	1,06
	RSD (%)	0,58	0,15	-	-
Mẫu chuẩn	TB	6,41	9874568	5388	1,07
	RSD (%)	0,23	0,32	-	0,22
Bột đông khô	TB	6,40	10272560	5281	1,09
	RSD (%)	0,98	0,83	-	-

Nhận xét: Độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của các thông số thời gian lưu và diện tích pic của mẫu chuẩn và mẫu thử đều nhỏ hơn 1,5% và hệ số đối xứng nằm trong khoảng 0,8 - 1,2 [60] nên hệ thống có tính phù hợp với quy trình định lượng đã lựa chọn áp dụng trên mẫu thử.

b3. Tính tuyến tính



Hình 3.4. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh của phương pháp định lượng PTX trong chế phẩm

Nhận xét: Có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thụ của PTX tại bước sóng 227 nm trong khoảng nồng độ từ 95,42 µg/ mL đến 1431,36 µg/ mL (xem chi tiết Phụ lục 7).

b3. Độ đúng

Kết quả thẩm định độ đúng được thể hiện ở Bảng 3.15 (chi tiết Phụ lục 7, Phụ lục 8).

Bảng 3.15. Kết quả độ đúng phương pháp định lượng PTX trong chế phẩm

Độ đúng	Tỷ lệ phục hồi PTX (%)	
	Dung dịch đậm đặc	Bột đông khô
80%	101,32	101,10
100%	101,64	101,40
120%	101,95	100,90
TB	101,64	101,13
RSD (%)	0,3	0,3

Nhận xét: Kết quả cho thấy độ phục hồi các mẫu đều trong khoảng cho phép (100 % ± 2 %). Vậy phương pháp định lượng PTX trên dạng mẫu dung dịch đậm đặc và bột đông khô bằng HPLC đạt yêu cầu về độ đúng của một quy trình định lượng.

b₄. Độ chính xác

Kết quả thẩm định độ chính xác (độ lặp lại) được thể hiện ở Bảng 3.16.

Bảng 3.16. Kết quả thẩm định độ chính xác phương pháp định lượng PTX

Mẫu	Dung dịch đậm đặc		Bột đông khô	
	Diện tích pic	Hàm lượng (%)	Diện tích pic	Hàm lượng (%)
1	10903761	101,00	10903761	104,68
2	10904507	101,01	10904507	105,16
3	10865269	100,64	10865269	104,29
4	10872635	100,71	10872635	103,14
5	10884806	100,82	10884806	103,77
6	10889141	100,86	10889141	103,14
RSD (%)		0,15		0,87
X _{tb}		100,84		104,03

Nhận xét: Kết quả cho thấy hàm lượng các mẫu đều trong khoảng cho phép (100 % ± 2 %) với RSD < 2,0 %. Vậy phương pháp định lượng PTX đạt yêu cầu về độ chính xác của một quy trình định lượng.

3.2.1.2. Xây dựng qui trình định lượng tạp liên quan trong chế phẩm

a. Qui trình định lượng tạp liên quan trong chế phẩm

Từ kết quả khảo sát các thông số của điều kiện phân tích tạp liên quan trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC, kết hợp tham khảo chuyên luận về định lượng và tạp liên quan của thuốc tiêm truyền chứa PTX theo USP và nguyên liệu PTX theo BP; các thông số của chương trình sắc ký được trình bày ở Bảng 3.17.

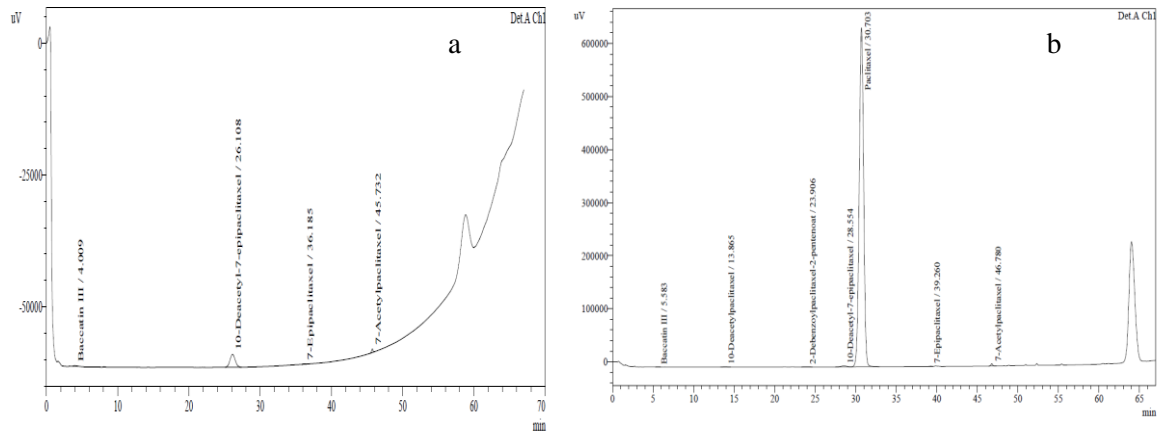
Bảng 3.17. Điều kiện sắc ký của phương pháp định lượng tạp trong chế phẩm

TT	Thông số	Định lượng tạp 10-DAP
1	Cột sắc ký	Gemini® NX 150 x 4,6 mm, 5 μ m, nhiệt độ cột 25 °C
2	Thể tích tiêm mẫu	10 μ L
3	Tốc độ dòng	1,0 mL/ phút
4	Đầu dò PDA (λ_{\max})	227 nm
5	Pha động	Nước - acetonitril, rửa giải theo chương trình.

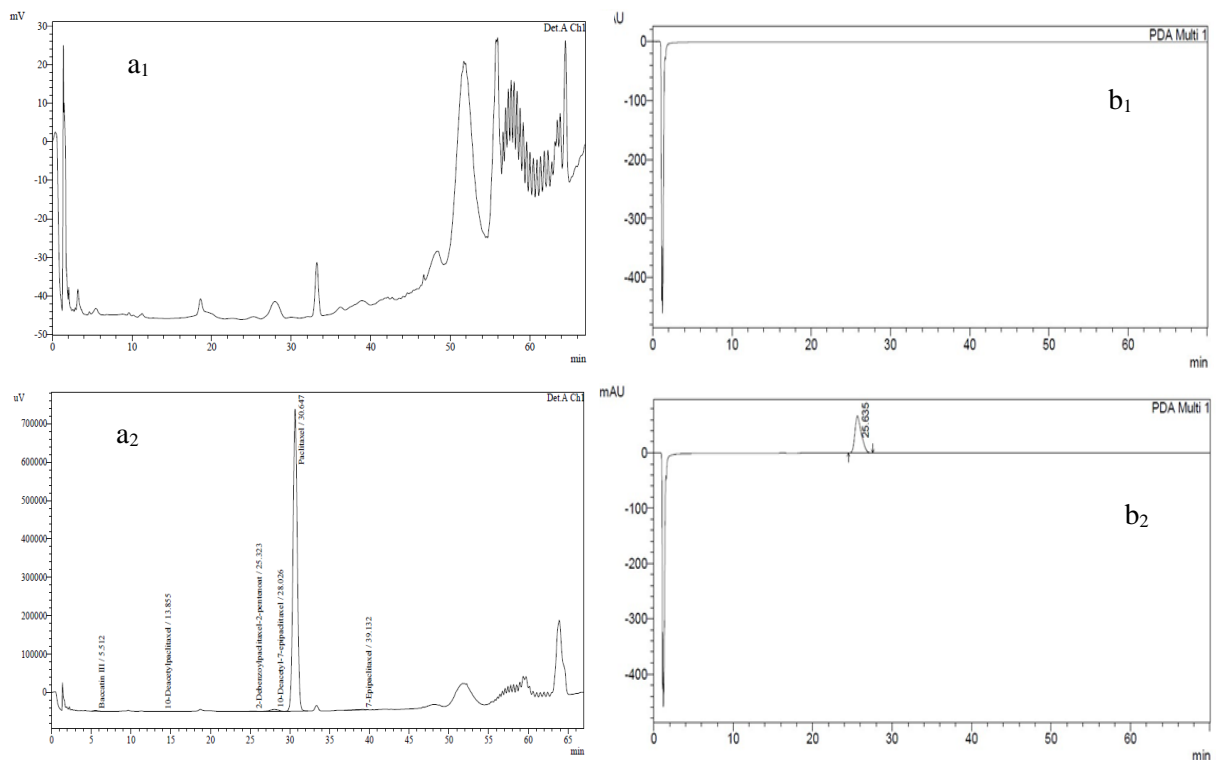
b. Thẩm định qui trình định lượng tạp liên quan trong chế phẩm

b₁. Tính đặc hiệu

Kết quả sắc ký đồ mẫu chuẩn, thử và placebo được trình bày trong Hình 3.5 và 3.6



Hình 3.5. Sắc ký đồ tạp chuẩn 10-DAP (a) và hỗn hợp PTX-tạp chuẩn 10-DAP (b)



Hình 3.6. Sắc ký đồ mẫu placebo, mẫu thử của dung dịch đậm đặc (a₁, a₂) và bột đông khô (b₁, b₂)

Kết quả từ Hình 3.5 và Hình 3.6 cho thấy:

- Thời gian lưu tương đối của chuẩn PTX so với tạp chuẩn 10-DAP trong hỗn hợp (nền placebo dung dịch đậm đặc và placebo bột đông khô) là 1,1.
- Thời gian lưu tương đối của PTX trong dung dịch chuẩn và thử lần lượt là 0,99 (dung dịch đậm đặc); 1,00 (đông khô).
- Mẫu placebo và mẫu trắng (dung môi hòa tan) không cho đỉnh có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của PTX và tạp chuẩn 10-DAP trong dung dịch chuẩn, dung dịch thử dạng dung dịch đậm đặc và dạng đông khô.
- Hệ số rửa giải giữa đỉnh 10-DAP và PTX lớn hơn 1,2.

Nhận xét: Trong sắc ký đồ của mẫu placebo không có đỉnh tại thời gian lưu của PTX chuẩn và tạp chuẩn. Đỉnh của PTX và đỉnh của tạp chuẩn tách nhau rõ. Thời gian lưu của PTX trong sắc ký đồ mẫu thử và chuẩn là như nhau. Quy trình định lượng có tính đặc hiệu với PTX và tạp chuẩn .

b.2. Tính phù hợp hệ thống (SST)

Kết quả tiêm lặp lại hỗn hợp dung dịch chuẩn có nồng độ PTX 1,2 mg/ mL và tạp chuẩn (10-DAP) 0,006 mg/ mL trong acetonitril được trình bày ở Bảng 3.18.

Bảng 3.18. Kết quả thẩm định tính phù hợp hệ thống của tạp chuẩn 10-DAP và chuẩn PTX của phương pháp định lượng tạp liên quan

Chuẩn	Mẫu (n = 6)	Thông số	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
Tạp chuẩn 10-DAP	Dung dịch đậm đặc	TB	28,54	85322	7650	0,94
		RSD (%)	0,32	1,33	-	-
	Bột đông khô	TB	23,46	505350	6705,51	1,09
		RSD (%)	0,37	1,20	-	-
PTX	Dung dịch đậm đặc	TB	30,69	24425526	13935	1,00
		RSD (%)	0,22	0,62	-	-
	Bột đông khô	TB	25,49	3749718	5401,81	1,35
		RSD (%)	0,47	0,09	-	-

Nhận xét: Kết quả thu được cho thấy phương pháp có tính phù hợp hệ thống đạt cho việc phân tích 10-deacetyl-7-epipaclitaxel (10-DAP) và các tạp liên quan trong chế phẩm có chứa PTX với cả 02 dạng chế phẩm dung dịch đậm đặc và đông khô.

b₃. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Kết quả khảo sát cho thấy tín hiệu thu được từ mẫu tạp chuẩn 10-DAP có nồng độ là 0,15 µg/ mL (0,0125 % so với hàm lượng PTX trong mẫu chuẩn) trên sắc ký đồ là nồng độ thấp nhất của tạp chuẩn đọc được kết quả. Áp dụng cách tính LOD từ sắc đồ mẫu trắng và chuẩn.

Từ sắc đồ thu từ mẫu trắng (N) có độ nhiễu đo được là 1,14 cm. Tín hiệu thu từ mẫu chuẩn (S): Khoảng cách từ đỉnh tạp xuống đường nền đo được là 2,4 cm.

Ta có $S/N = 2,11$ (nằm trong khoảng 2 - 3). Vậy giới hạn phát hiện (LOD) của tạp khoảng bằng 0,0125 % hàm lượng PTX trong chế phẩm.

Giới hạn định lượng (LOQ)

$$LOQ = \frac{10}{3} \times LOD \% = 0,0417 \% (0,5 \mu\text{g/ mL})$$

b₄. Độ chính xác tại LOD

Kết quả thẩm định độ chính xác (độ lặp lại) với hàm lượng tạp 0,15 µg/ mL (0,0125 % so với hàm lượng PTX chuẩn) được thể hiện ở Bảng 3.19.

Bảng 3.19. Kết quả thẩm định độ chính xác phương pháp định lượng tạp liên quan

Mẫu	Dung dịch đậm đặc		Bột đông khô	
	Diện tích pic	Hàm lượng (%)	Diện tích pic	Hàm lượng (%)
1	85727	100,12	50067	100,13
2	84998	101,41	51092	102,18
3	83851	101,42	49702	99,40
4	84299	99,30	51018	102,04
5	86717	99,95	50250	100,50
6	86342	96,98	51084	102,17
RSD (%)		1,65		1,27
X _{tb}		99,86		101,07

Nhận xét: Kết quả cho thấy hàm lượng 10-DAP trong các mẫu có RSD < 2,0 %. Vậy độ chính xác tại LOD đạt yêu cầu.

3.2.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX

Cảm quan

Bột đông khô màu trắng

Đồng đều khối lượng

Kết quả kiểm nghiệm độ đồng đều khối lượng được trình bày trong Bảng 3.20

Độ trong

Không có tiểu phân không tan khi kiểm tra bằng mắt thường dung dịch pha loãng trong nước đến nồng độ 6 ml PTX/ mL.

Giới hạn kích thước tiểu phân đạt yêu cầu với trên 90% số tiểu phân có kích thước < 15 μm , không quá 10% số tiểu phân kích thước 15-20 μm và không có tiểu phân kích thước lớn hơn 20 μm .

Định tính

Thời gian lưu của pic chính trong sắc ký đồ của dung dịch thử tương ứng với thời gian lưu của pic paclitaxel trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn

pH, Hàm lượng nước, định lượng và tạp liên quan

Kết quả kiểm nghiệm được trình bày trong Bảng 3.20

Nội độc tố

Chế phẩm đạt yêu cầu về nội độc tố không quá 0,4 EU/ mg.

Độ vô khuẩn

Chế phẩm đạt độ vô khuẩn.

Bảng 3.20. Kết quả chỉ tiêu pH, đồng đều khối lượng, hàm lượng nước, định lượng và tạp liên quan của chế phẩm bột đông khô chứa PTX

Chỉ tiêu	Kết quả		
	Lô 1	Lô 2	Lô 3
pH	4,05	4,05	4,05
Hàm lượng nước	2,5 %	3,2 %	2,8 %
Đồng đều khối lượng	2,1202 g	2,0115 g	2,1010 g
Định lượng	101,0	101,01	99,42
Tạp 10-DAP	Không phát hiện	Không phát hiện	Không phát hiện
Tạp không xác định	< 0,1 %	< 0,1 %	< 0,1 %
Tổng tạp	< 2,0 %	< 2,0 %	< 2,0 %

3.2.3. Khảo sát độ ổn định của chế phẩm bào chế

3.2.3.1. Độ ổn định dài hạn của dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX

Kết quả đánh giá độ ổn định của 02 chế phẩm ở điều kiện bảo quản dài hạn được trình bày trong Bảng 3.21

Bảng 3.21. Kết quả độ ổn định của chế phẩm dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX ở điều kiện bảo quản dài hạn^(*)

Tháng Lô	Cảm quan		pH (3,0 – 7,0)		Định Lượng (90 – 110%)		Tạp liên quan		Nội độc tố		Độ vô khuẩn		
	DD	ĐK	DD	ĐK	DD	ĐK	DD	ĐK	DD	ĐK	DD	ĐK	
0	1	Đạt	Đạt	3,33	4,05	101,0	99,78	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	2	Đạt	Đạt	3,33	4,05	101,01	99,68	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	3	Đạt	Đạt	3,33	4,05	99,42	99,75	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
3	1	Đạt	Đạt	3,33	4,15	99,87	99,72	-	-	-	-	-	-
	2	Đạt	Đạt	3,30	4,15	99,39	99,71	-	-	-	-	-	-
	3	Đạt	Đạt	3,30	4,15	100,64	99,58	-	-	-	-	-	-
6	1	Đạt	Đạt	3,35	4,20	100,14	99,68	-	-	-	-	-	-
	2	Đạt	Đạt	3,35	4,40	99,04	99,53	-	-	-	-	-	-
	3	Đạt	Đạt	3,35	4,20	99,15	9,62	-	-	-	-	-	-
12	1	Đạt	Đạt	3,33	4,30	99,22	98,18	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	2	Đạt	Đạt	3,35	4,30	99,04	98,56	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	3	Đạt	Đạt	3,35	4,30	99,02	98,42	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
18	1	Đạt	Đạt	3,35	4,40	99,10	96,67	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	2	Đạt	Đạt	3,35	4,40	99,04	96,54	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	3	Đạt	Đạt	3,35	4,40	99,02	97,25	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
24	1	Đạt	Đạt	3,35	4,60	98,51	95,25	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	2	Đạt	Đạt	3,35	4,60	98,42	94,89	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	3	Đạt	Đạt	3,35	4,60	98,19	94,11	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

^(*) Dung dịch đậm đặc ($30 \pm 2^\circ\text{C}$; $75 \pm 5\% \text{RH}$); Bột đông khô ($5 \pm 3^\circ\text{C}$)

Nhận xét: Ở điều kiện dài hạn, dung dịch đậm đặc và bột đông khô (sau 24 tháng) có các chỉ tiêu cảm quan, pH, hàm lượng, tạp liên quan, nội độc tố và độ vô khuẩn đạt yêu cầu theo dược điển USP.

3.2.3.2. Độ ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc của dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX

Kết quả đánh giá độ ổn định của 02 chế phẩm ở điều kiện lão hóa cấp tốc được trình bày trong Bảng 3.22.

Bảng 3.22. Kết quả độ ổn định của chế phẩm dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX ở điều kiện lão hóa cấp tốc^(*)

Tháng	Lô	Cảm quan		pH (3,0 – 7,0)		Định Lượng (90 – 110%)		Tạp liên quan		Nội độc tó		Độ vô khuẩn	
		DD	ĐK	DD	ĐK	DD	ĐK	DD	ĐK	DD	ĐK	DD	ĐK
0	1	Đạt	Đạt	3,33	4,05	100,71	99,78	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	2	Đạt	Đạt	3,33	4,05	100,82	99,68	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	3	Đạt	Đạt	3,33	4,05	100,76	99,75	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
3	1	Đạt	Đạt	3,40	4,30	99,33	98,24	-	-	-	-	-	-
	2	Đạt	Đạt	3,40	4,30	99,49	98,57	-	-	-	-	-	-
	3	Đạt	Đạt	3,40	4,30	99,36	97,89	-	-	-	-	-	-
6	1	Đạt	Đạt	3,95	4,40	96,93	96,42	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	2	Đạt	Đạt	3,95	4,40	96,68	96,87	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	3	Đạt	Đạt	3,95	4,40	96,54	95,76	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

^(*)Dung dịch đậm đặc ($40 \pm 2^{\circ}\text{C}$; $75 \pm 5\% \text{RH}$); Bột đông khô ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$; $60 \pm 5\% \text{RH}$)

Nhận xét: Ở điều kiện cấp tốc sau 6 tháng, dung dịch đậm đặc và bột đông khô có các chỉ tiêu cảm quan, pH, hàm lượng, tạp liên quan đạt yêu cầu theo dược điển USP (dung dịch đậm đặc) và tiêu chuẩn cơ sở (bột đông khô).

3.3. NGHIÊN CỨU THÔNG SỐ DƯỢC ĐỘNG HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ PHÂN BỐ SINH HỌC TRONG MỘT SỐ MÔ ĐỘNG VẬT THỬ NGHIỆM CỦA HAI CHẾ PHẨM BÀO CHẾ CHỨA PTX SO VỚI CHẾ PHẨM ĐỐI CHỨNG

3.3.1. Xác định độc tính cấp của chế phẩm

3.3.1.1. Thăm dò liều gây độc

a. Thăm dò liều cao nhất không gây độc (LD_0) và liều thấp nhất gây độc (LD_{100}) 100% chuột thí nghiệm

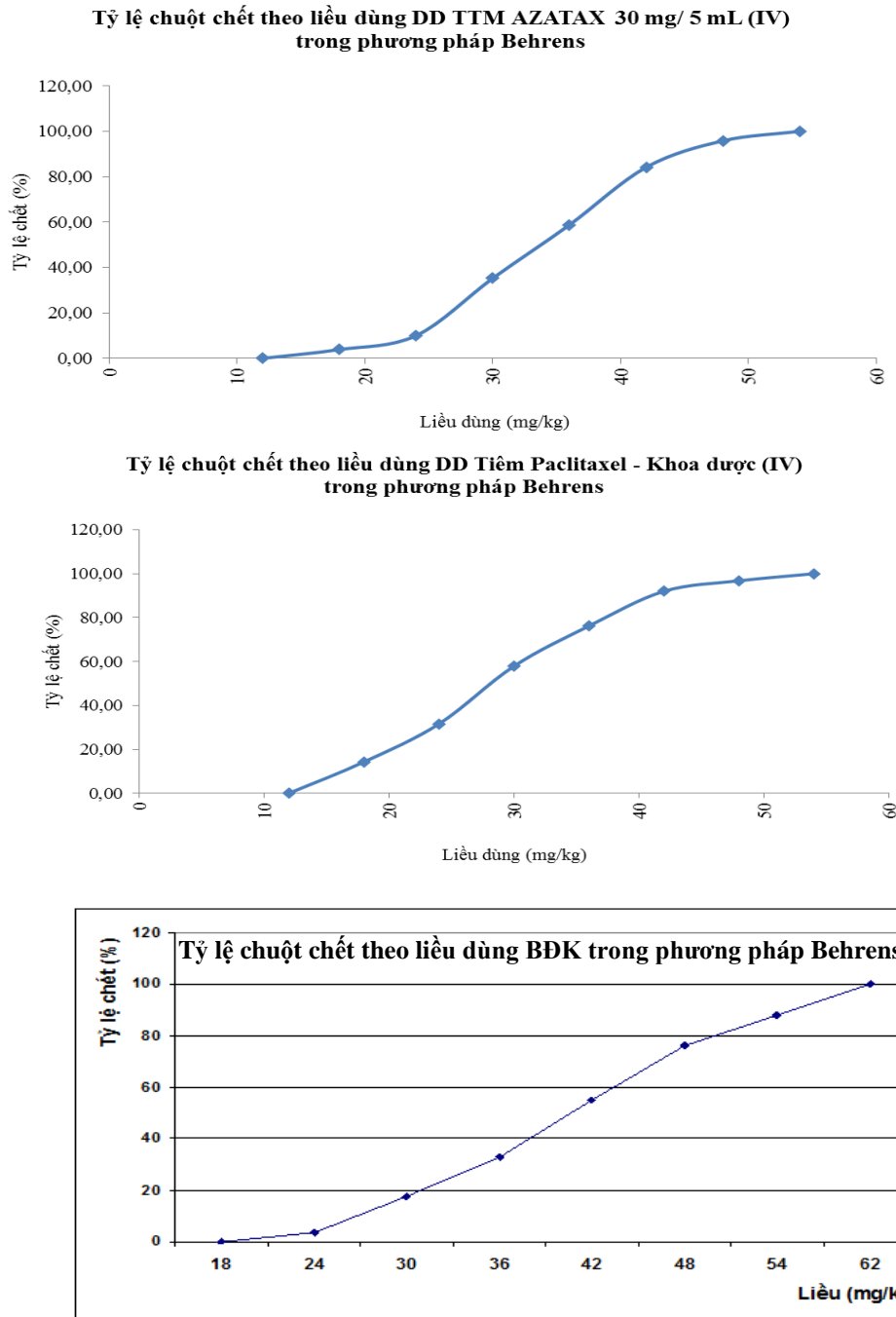
Kết quả thăm dò liều độc của dung dịch đậm đặc, bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX và thuốc đối chứng Anzatax[®] được trình bày trong Bảng 3.23.

Bảng 3.23. Kết quả dữ liệu thăm dò liều thử độc tính cấp dung dịch đậm đặc, bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX và thuốc đối chứng Anzatax®

Nhóm	Liều dùng (mg/kg)	Số liệu thực tế			Theo tần số tích lũy			
		Tổng số (con)	Số chết (con)	Số sống (con)	Số chết (con)	Số sống (con)	Tổng số (con)	(%) chết
Dung dịch đậm đặc								
1	12,00	8	0	8	0	26	26	0,00
2	18,00	8	3	5	3	18	21	14,29
3	24,00	8	3	5	6	13	19	31,58
4	30,00	8	5	3	11	8	19	57,89
5	36,00	8	5	3	16	5	21	76,19
6	42,00	8	7	1	23	2	25	92,00
7	48,00	8	7	1	30	1	31	96,77
8	54,00	8	8	0	38	0	38	100,00
Bột đông khô								
1	18,00	8	0	8	0	34	34	0,00
2	24,00	8	1	7	1	26	27	3,7
3	30,00	8	3	5	4	19	23	17,39
4	36,00	8	3	5	7	14	21	33,0
5	42,00	8	4	4	11	9	20	55,0
6	48,00	8	5	3	16	5	21	76,2
7	54,00	8	6	2	22	2	25	88,0
8	62,00	8	8	0	30	0	30	100,0
Thuốc đối chứng								
1	12,00	8	0	8	0	33	33	0,00
2	18,00	8	1	7	1	25	26	3,85
3	24,00	8	1	7	2	18	20	10,00
4	30,00	8	4	4	6	11	17	35,29
5	36,00	8	4	4	10	7	17	58,82
6	42,00	8	6	2	16	3	19	84,21
7	48,00	8	7	1	23	1	24	95,83
8	54,00	8	8	0	31	0	31	100,0

b. Xác định LD₅₀ của thuốc đối chứng, dung dịch đậm đặc và bột đông khô: Dựa vào 02 liều gần với liều chết 50% (D₁, D₂) tính tỷ lệ chết tương ứng (a, b). Từ đồ thị trực

hoành là liều dùng và trục tung là tỷ lệ % chết theo tần số tích lũy (Hình 3.7), theo phương pháp Behrens, kết quả LD₅₀ trình bày ở Bảng 3.24.



Hình 3.7: Đồ thị tỷ lệ % chết theo tần số tích lũy của thuốc đối chứng, dung dịch đậm đặc và bột đông khô tiêm truyền chứa PTX.

Bảng 3.24: Kết quả LD₅₀ của thuốc đối chứng, dung dịch đậm đặc và bột đông khô

TT	Thông số	Thuốc đối chứng	Dung dịch đậm đặc	Bột đông khô
1	D ₁ (mg/ kg)	30,00	24,00	36,00
2	D ₂ (mg/ kg)	36,00	30,00	42,00
3	a (%)	35,29	18,42	33,00
4	b (%)	58,82	57,89	55,00
5	d = D ₁ - D ₂	6,00	6,00	6,00
6	LD ₅₀ (mg/ kg)	33,75	34,20	40,60
7	LD ₁₆ (mg/ kg)	25,80	18,60	27,00
8	LD ₈₄ (mg/ kg)	42,00	38,60	52,05
9	LD ₅₀ ± μ	33,75 ± 3,92	34,20 ± 4,36	40,60 ± 4,88

$LD_{50} = D_1 + [(50 - a)d : (b - a)]$; LD₁₆: liều gây chết 16 %; LD₈₄: liều gây chết 84 %

Nhận xét:

Thuốc đối chứng có LD₅₀ (29,84 - 38,56 mg/ kg) so với chế phẩm dạng dung dịch đậm đặc (29,83 - 37,67 mg/ kg) là tương tự; thấp hơn so với chế phẩm dạng đông khô (35,72 - 45,48 mg/ kg).

3.3.2. Xây dựng quy trình định lượng PTX trong huyết tương và trong mô của thỏ và chuột thử nghiệm bằng phương pháp HPLC

3.3.2.1. Quy trình định lượng PTX trong huyết tương của thỏ và chuột thử nghiệm

a. Quy trình chiết PTX từ mẫu huyết tương của thỏ và chuột

Quy trình chiết PTX từ huyết tương động vật thí nghiệm được mô tả theo sơ đồ ở Phụ lục 11. Dung môi chiết sử dụng diethyl ether, thời gian lắc 5 phút, tốc độ ly tâm 4000 vòng/ phút trong 10 phút. Nhiệt độ gia nhiệt tạo cặn ở 40 °C. Sau khi cặn hòa tan vào pha động tiếp tục lắc, ly tâm và sẽ lọc qua giấy lọc kích thước 0,45 μm.

b. Quy trình định lượng PTX trong huyết tương thỏ và chuột

b₁ Lựa chọn chuẩn nội

Kết quả khảo sát và kết hợp công bố trước đây cho thấy carbamazepin (CAR) phù hợp được chọn là chuẩn nội.

b₂ Điều kiện sắc ký

Tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự tách, áp suất bơm, thời gian phân tích như tỷ lệ pha động, kích thước cột, nhiệt độ cột và buồng tiêm mẫu.

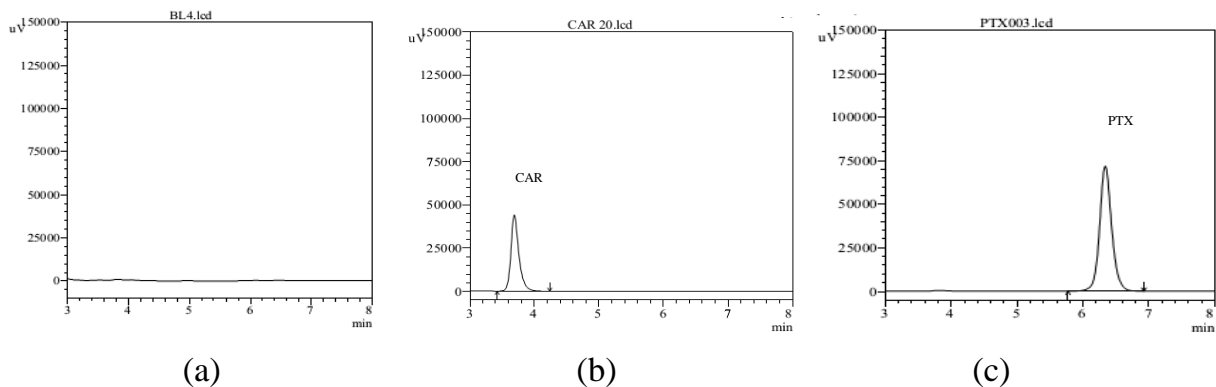
Kết quả thực nghiệm đã xác định điều kiện sắc ký thích hợp để phân tích PTX trong huyết tương thô và chuột thử nghiệm như sau:

- Cột: C18, 250 x 4,60 mm x 5 μ m.
- Pha động: Đệm phosphat 0,02 M pH 5,0 - methanol - acetonitril
- + Thở: tỷ lệ tương ứng (36:22:42)
- + Chuột: tỷ lệ tương ứng (40 : 22 : 38)
- Tốc độ dòng: 1,2 mL/ phút (thở); 1 mL/ phút (chuột).
- Đầu dò PDA: bước sóng 227 nm.
- Thể tích tiêm mẫu: 40 μ L
- Nhiệt độ buồng chứa mẫu: 15 $^{\circ}$ C.
- Nhiệt độ buồng cột sắc kí: 30 $^{\circ}$ C.

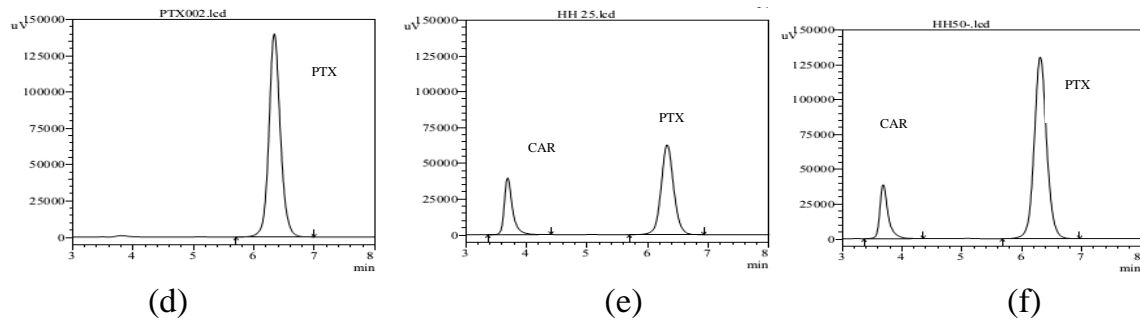
b₃ Thẩm định quy trình định lượng PTX trong huyết tương thô và chuột

* Tính đặc hiệu

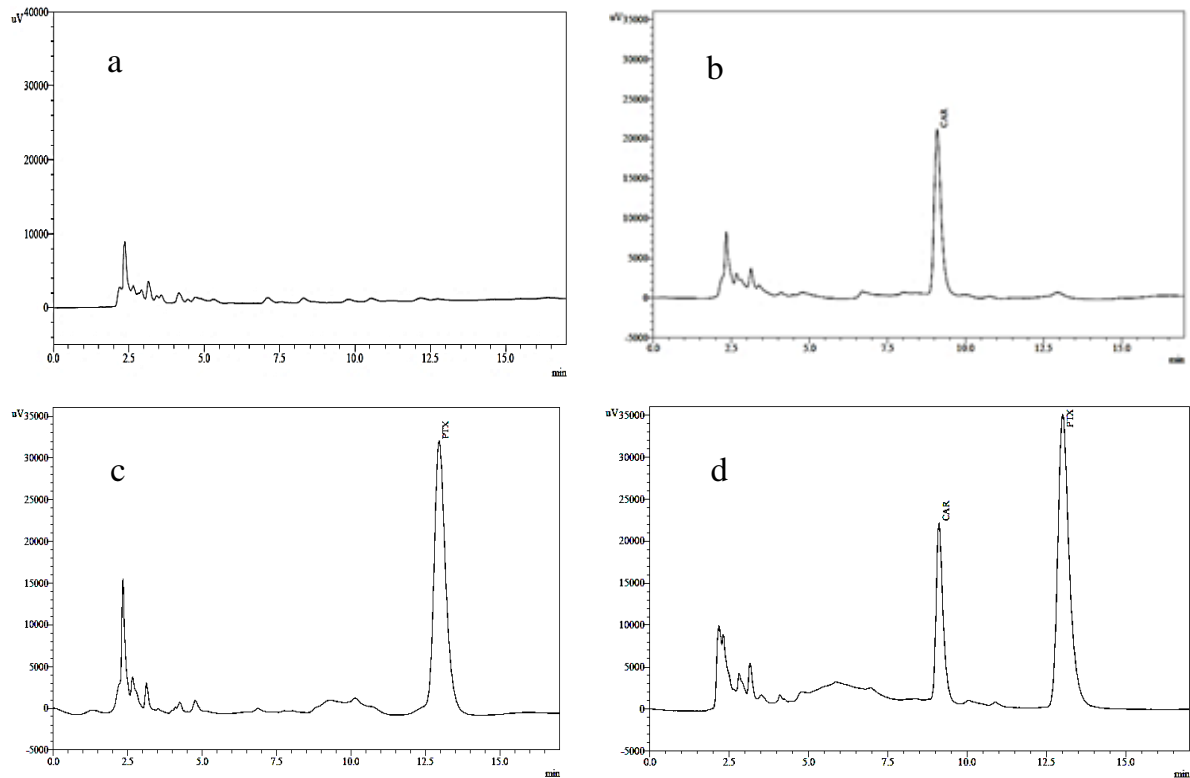
Kết quả sắc kí mẫu placebo, mẫu thử tự tạo và mẫu chuẩn pha trong methanol có nồng độ tương ứng với mẫu thử tự tạo trình bày ở Hình 3.8.



Hình 3.8. (a) Sắc kí đồ mẫu placebo, (b) CAR nồng độ 2 μ g/mL trong methanol, (c) PTX nồng độ 25 μ g/mL trong methanol



Hình 3.9. (d) Sắc ký đồ PTX nồng độ 50 $\mu\text{g/mL}$ (e) hỗn hợp 2 $\mu\text{g CAR/mL}$ và 25 $\mu\text{g PTX/mL}$, (f) hỗn hợp 2 $\mu\text{g CAR/mL}$ và 50 $\mu\text{g PTX/mL}$ trong huyết tương thỏ



Hình 3.10. Sắc ký đồ PTX và CAR trong mẫu placebo (a), mẫu huyết tương chuột chứa CAR 2 $\mu\text{g/mL}$ (b), PTX 25 $\mu\text{g/mL}$ (c) và hỗn hợp (d)

Nhận xét: Mẫu chuẩn và mẫu tự tạo có các pic PTX và CAR trên các sắc ký đồ tách hoàn toàn với tỷ số thời gian lưu tương đối 2,36 (thỏ) và 1,4 (chuột).

* Tính phù hợp hệ thống (SST)

Khảo sát dung dịch chuẩn nồng độ 25 $\mu\text{g PTX/mL}$ và 2 $\mu\text{g CAR/mL}$ trong huyết tương thỏ và huyết tương chuột.

Kết quả tính phù hợp hệ thống được thể hiện qua các thông số trong Bảng 3.24, chi tiết Phụ lục 11.

Bảng 3.24. Kết quả thẩm định tính phù hợp hệ thống của phương pháp định lượng PTX trong huyết tương thỏ và chuột

Động vật thử nghiệm		Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
Carbamazepin (IS1) (n = 6)					
Thỏ	TB	4,218	347826	10790	1,320
	RSD (%)	0,11	1,85	-	-
Chuột	TB	9,033	271592	7928	1,460
	RSD (%)	0,054	1,59	-	-
Paclitaxel (AS) (n = 6)					
Thỏ	TB	9,955	931258	5232	1,120
	RSD (%)	0,05	1,08	-	-
Chuột	TB	12,857	787408	6495	1,381
	RSD (%)	0,073	0,46	-	-

Nhận xét: Các thông số thỏa mãn yêu cầu chung về tính phù hợp của quy trình định lượng (RSD < 2,0 %).

* Tính tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, độ chính xác và độ đúng

Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, độ đúng và độ chính xác được tóm tắt trong Bảng 3.25 và chi tiết Phụ lục 11.

Bảng 3.25. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, LLOQ, độ chính xác và độ đúng

	Thông số thẩm định	Kết quả
Thỏ	<i>Phương trình hồi quy</i>	$y = 0,1037x - 0,0066; R^2 = 0,9998$
	<i>Khoảng tuyến tính</i>	0,5 - 50 µg/mL
	<i>Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)</i>	0,5 µg/mL
	<i>LQC, MQC, HQC: 1,0; 10,0; 20,0 µg/mL</i>	
	- Độ đúng (Tỷ lệ phục hồi)	85,61 % - 102,77 %;
	- Độ chính xác (CV)	7,69 %
	Độ đúng và độ chính xác trong ngày	
	<i>LLOQ, LQC, MQC, HQC</i>	93,24 % - 105,17 %
	<i>0,5; 1,0; 10,0; 20,0 µg/mL</i>	1,29 % - 7,69 %
	Độ đúng và độ chính xác giữa các ngày	
<i>0,5; 1,0; 10,0; 20,0 µg/mL</i>	85,91 % - 108,76 % 1,29 % - 14,61 %	

	Phương trình hồi quy	$y = 0,2367x; R^2=0,993$
	Khoảng tuyến tính	0,1 - 50 µg/ mL
	Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)	0,1 µg/ mL
	LQC, MQC, HQC: 1,0; 10,0; 20,0 µg/mL	
Chuột	- Độ đúng (Tỷ lệ phục hồi)	102,69 % - 109,40 %;
	- Độ chính xác (CV)	2,74 %
	Độ đúng và độ chính xác trong ngày	99,05 % - 103,04 %
	LLOQ, LQC, MQC, HQC	1,81 %- 3,44 %
	0,1;1,0; 25,0; 50,0 µg/mL	
	Độ đúng và độ chính xác giữa các ngày	96,38 % - 107,80 %;
LLOQ, LQC, MQC, HQC	0,64 % - 4,21 %	
0,1;1,0; 25,0; 50,0 µg/mL		

Nhận xét:

Độ đúng LLOQ trong khoảng 80 - 120%; LQC, MQC, HQC: 85 - 115%; độ chính xác (CV) của LLOQ < 20 % và LQC, MQC, HQC < 15% đạt yêu cầu.

* Tỷ lệ thu hồi – Hiệu suất chiết

Kết quả hiệu suất chiết chuẩn PTX và chuẩn nội được tóm tắt trong Bảng 3.26.

Bảng 3.26. Kết quả thẩm định tỷ lệ thu hồi và hiệu suất chiết CAR và PTX trong huyết tương thỏ và huyết tương chuột

Nồng độ PTX (µg/mL)	Nồng độ CAR (µg/mL)	Hiệu suất chiết (%)			
		PTX	CV	CAR	CV
Thỏ					
0,5		98,35 ± 3,25	3,30	98,63 ± 1,05	0,90
1,0	2	87,93 ± 0,98	0,72	91,08 ± 2,45	2,98
25		97,72 ± 0,36	0,37	95,30 ± 1,30	1,22
50		88,86 ± 7,90	7,82	86,21 ± 3,99	4,81
Chuột					
0,1		116,36 ± 1,76	1,51	98,18 ± 2,44	2,49
10	2	101,28 ± 0,54	0,53	98,55 ± 0,24	0,25
25		97,66 ± 1,82	1,86	100,83 ± 3,11	3,08
50		104,41 ± 0,28	0,27	101,15 ± 2,33	2,31

Nhận xét: Tại các hiệu suất chiết tại nồng độ CV < 15% đạt yêu cầu.

* Độ ổn định của mẫu thử

Khảo sát trên mẫu PTX ở nồng độ 25 µg/ mL trong huyết tương thỏ và 10 µg/ mL trong huyết tương chuột ở các điều kiện, kết quả được trình bày ở Bảng 3.27.

Bảng 3.27. Kết quả thẩm định độ ổn định của PTX trong huyết tương thỏ và chuột

Động vật thử nghiệm	Nồng độ tìm lại ($\mu\text{g/mL}$)	% tìm lại	Độ lệch (%)
Thỏ			
	Sau 6 giờ ở 15 °C trong autosampler		
	24,25 \pm 6,89	97,00	6,77
TB ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD (%)	Sau 6 giờ ở nhiệt độ phòng		
	25,09 \pm 1,37	100,38	1,19
	Sau 3 chu kì đông và rã đông		
	24,66 \pm 2,63	98,63	2,88
Chuột			
	Sau 6 giờ ở 15 °C trong autosampler		
	8,44 \pm 6,89	97,00	11,4
TB ($\mu\text{g/ml}$) \pm SD (%)	Sau 24 giờ ở nhiệt độ phòng		
	9,61 \pm 5,78	88,6	4,4
	Sau 3 chu kì đông và rã đông		
	9,18 \pm 4,36	96,32	3,96

Nhận xét: Độ lệch nồng độ PTX trong các mẫu sau bảo quản < 15% đạt yêu cầu.

* Dung dịch chuẩn: Kết quả khảo sát trên mẫu chuẩn có nồng độ 10 μg PTX/mL được pha từ dung dịch chuẩn gốc 100 μg PTX/ mL được trình bày ở Bảng 3.28.

Bảng 3.28. Kết quả thẩm định độ ổn định ngắn hạn và dài hạn của dung dịch chuẩn

	Nồng độ tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Độ lệch (%)
	Độ ổn định dài hạn sau 60 ngày		
TB	9,6890	96,89	3,11
\pm SD (%)	0,28	-	
	Độ ổn định ngắn hạn sau 24 giờ		
TB	10,1709	101,71	2,36
\pm SD (%)	2,67	-	

Nhận xét: Giá trị nồng độ trung bình và giá trị từng mẫu pha từ dung dịch chuẩn gốc được bảo quản ở nhiệt độ lạnh -20 °C sau 60 ngày không chênh lệch quá 10% so với nồng độ ban đầu, tại nhiệt độ phòng sau 24 giờ không chênh lệch quá 10% so với nồng độ lúc mới pha từ chuẩn gốc, như vậy điều kiện bảo quản chuẩn gốc đạt yêu cầu.

3.3.2.2 Quy trình định lượng PTX trong mô thỏ và chuột

a. Quy trình chiết PTX từ mẫu mô

Quy trình chiết PTX từ mô động vật thí nghiệm với các thông số tương tự với quy trình chiết từ huyết tương. Sử dụng IS phù hợp với mô thỏ (CAR) và mô chuột (DZP), dung môi acetonitril.

b. Quy trình định lượng

b₁ Lựa chọn chuẩn nội

Kết quả khảo sát và kết hợp công bố trước đây cho thấy carpamazepin (CAR) phù hợp được chọn là chuẩn nội trong phân tích mô thỏ, diazepam (DZP) phù hợp được chọn là chuẩn nội trong phân tích mô chuột.

b₂ Điều kiện sắc ký

Tiến hành khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến sự tách, áp suất bơm, thời gian phân tích như tỷ lệ pha động, kích thước cột, nhiệt độ cột và buồng tiêm mẫu.

Kết quả thực nghiệm đã xác định điều kiện sắc ký thích hợp để phân tích PTX trong mô thỏ và chuột thử nghiệm:

- Cột: C18, 250 x 4,60 mm x 5 µm.

- Pha động:

+ Thỏ: Đệm acetat 0,02 M pH 5,0: MeOH : ACN (32,5: 47,5: 20)

+ Chuột: Đệm acetat 0,02 M pH 5,0: ACN (53: 47)

- Tốc độ dòng: 1 mL/phút.

- Đầu dò PDA:

+ Thỏ: 230 nm

+ Chuột : 227 nm

- Thể tích tiêm mẫu: 40 µL

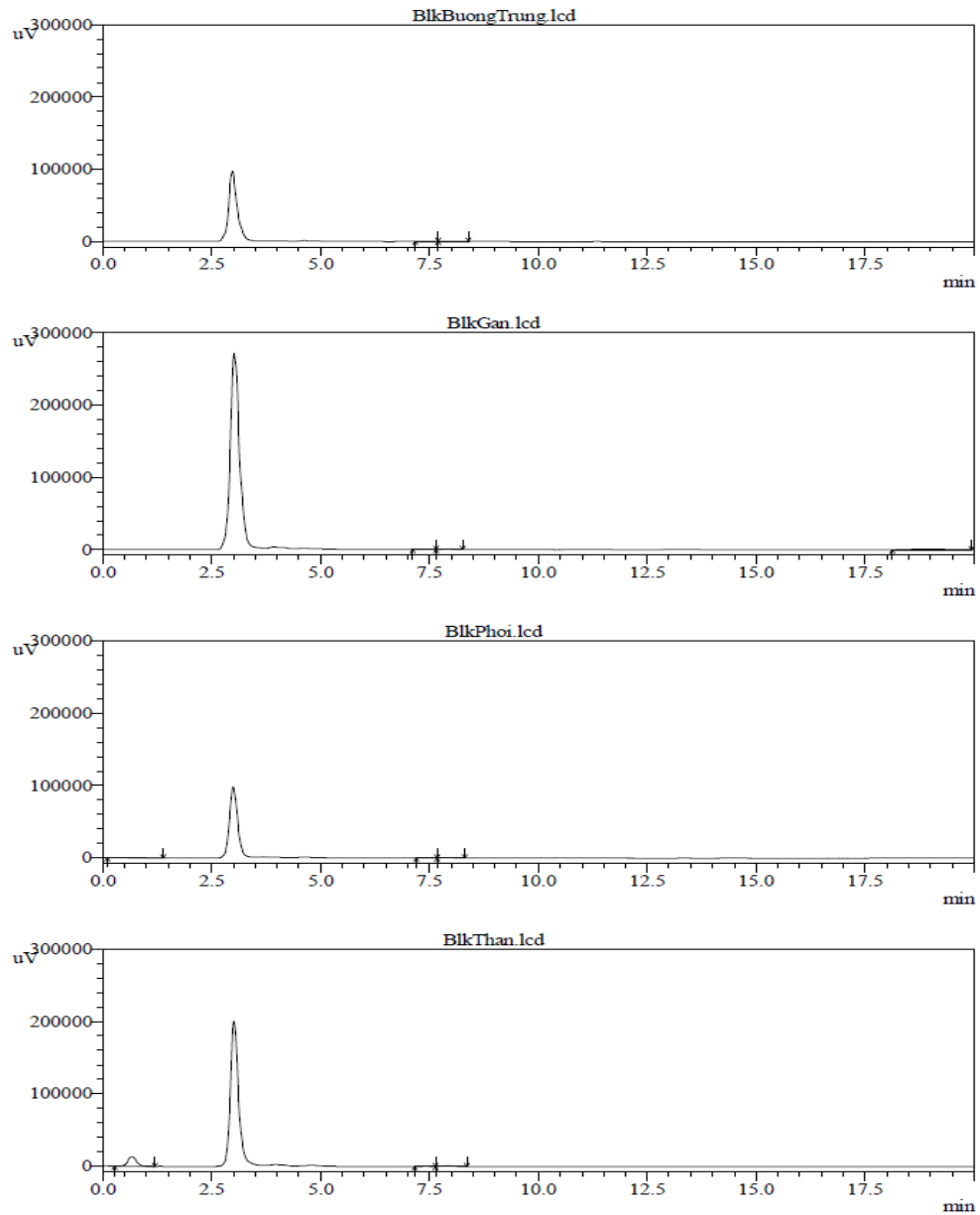
- Nhiệt độ buồng chứa mẫu: 20 °C.

- Nhiệt độ buồng cột sắc kí: 30 °C.

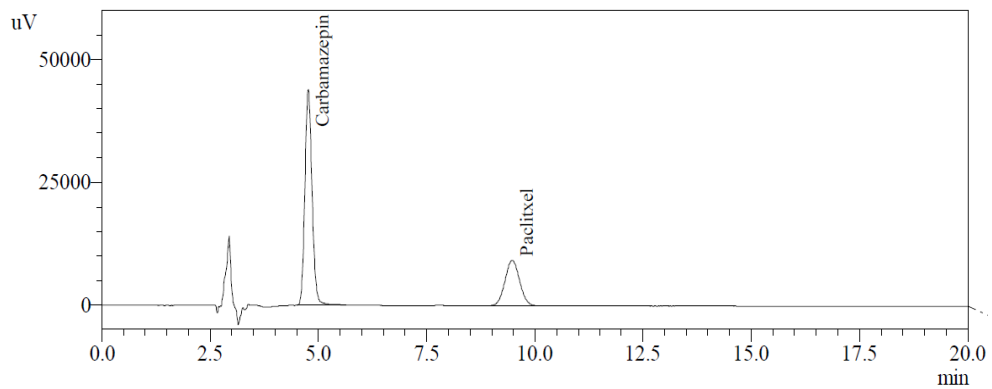
b₃. Thăm định quy trình định lượng PTX trong mô thỏ và chuột

*Tính đặc hiệu

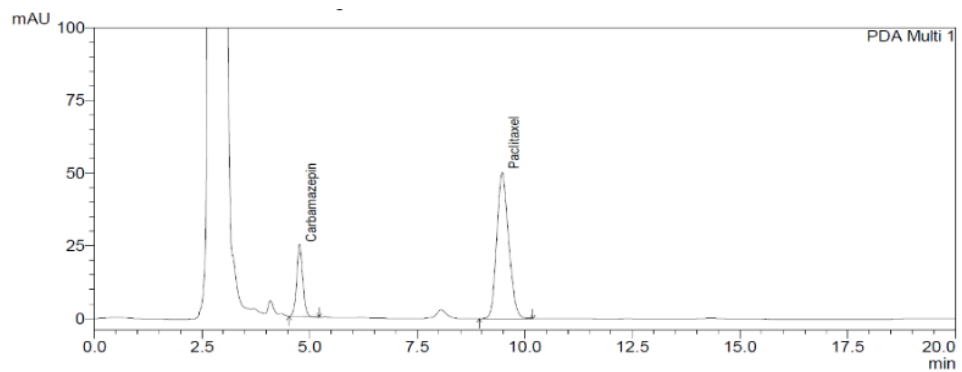
Sắc ký đồ các mẫu placebo (dịch chiết từ mô thỏ không tiêm PTX) thể hiện ở Hình 3.11; Sắc ký đồ các mẫu chứa AS (PTX), IS1 (CAR) trong methanol; mẫu mô placebo có AS, IS1 và mẫu mô phổi của thỏ sau khi tiêm PTX thể hiện ở Hình 3.12.



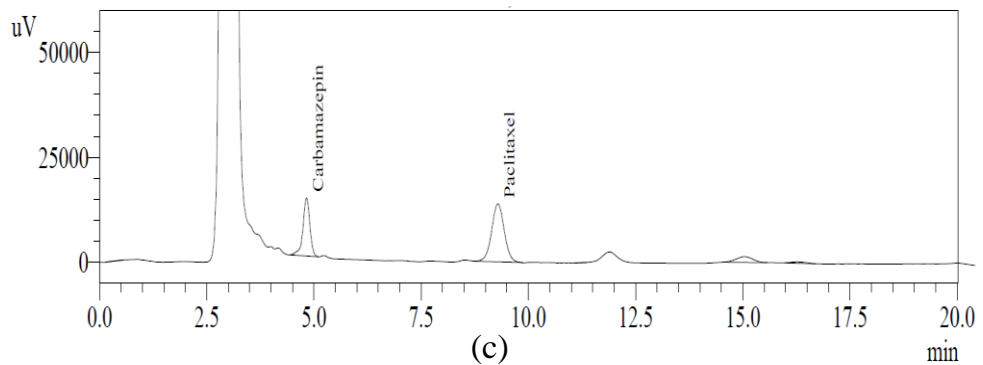
Hình 3.11. Sắc ký đồ mẫu placebo các mô buồng trứng, gan, phổi, thận của thỏ



(a)



(b)



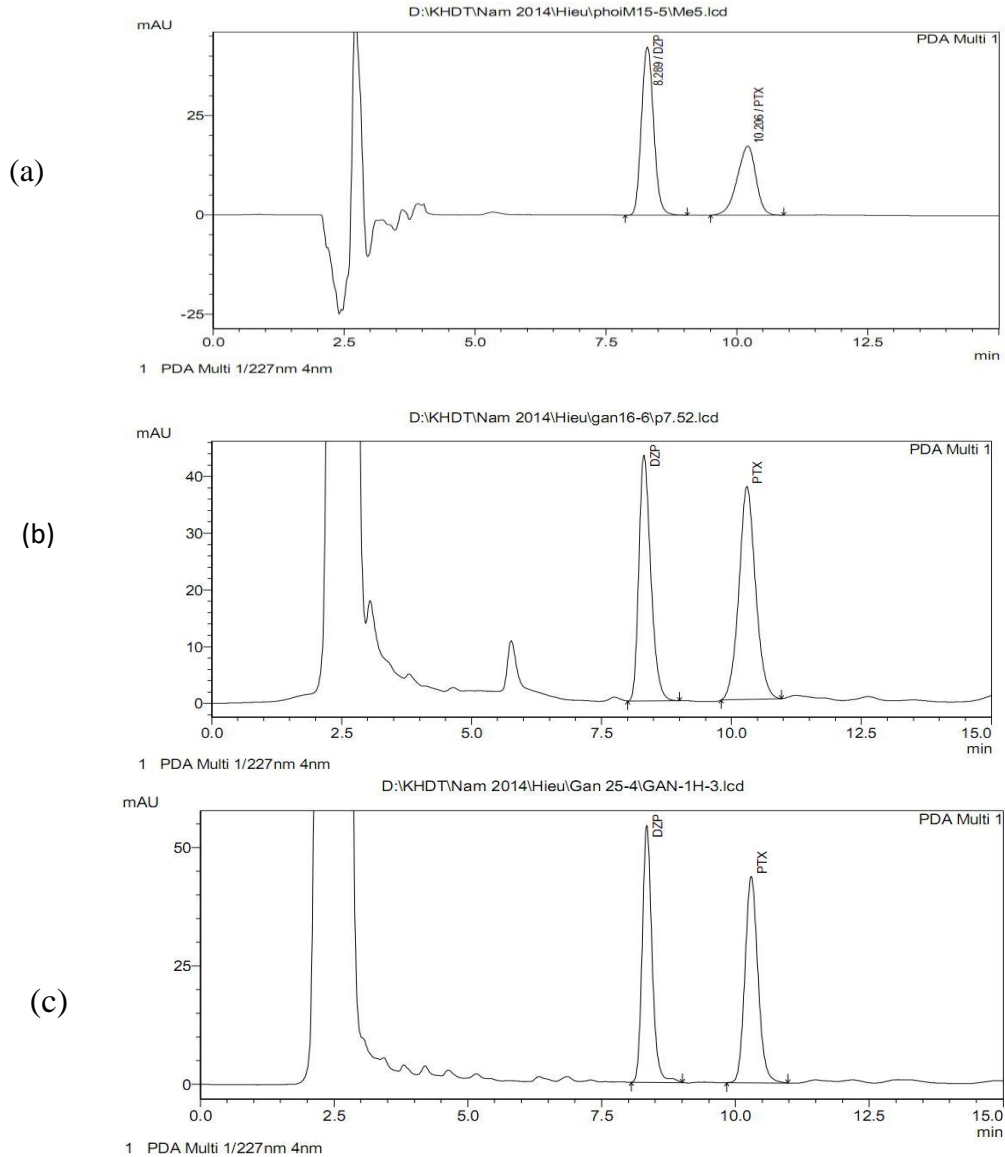
(c)

Hình 3.12. Sắc ký đồ PTX và CAR trong mô thỏ

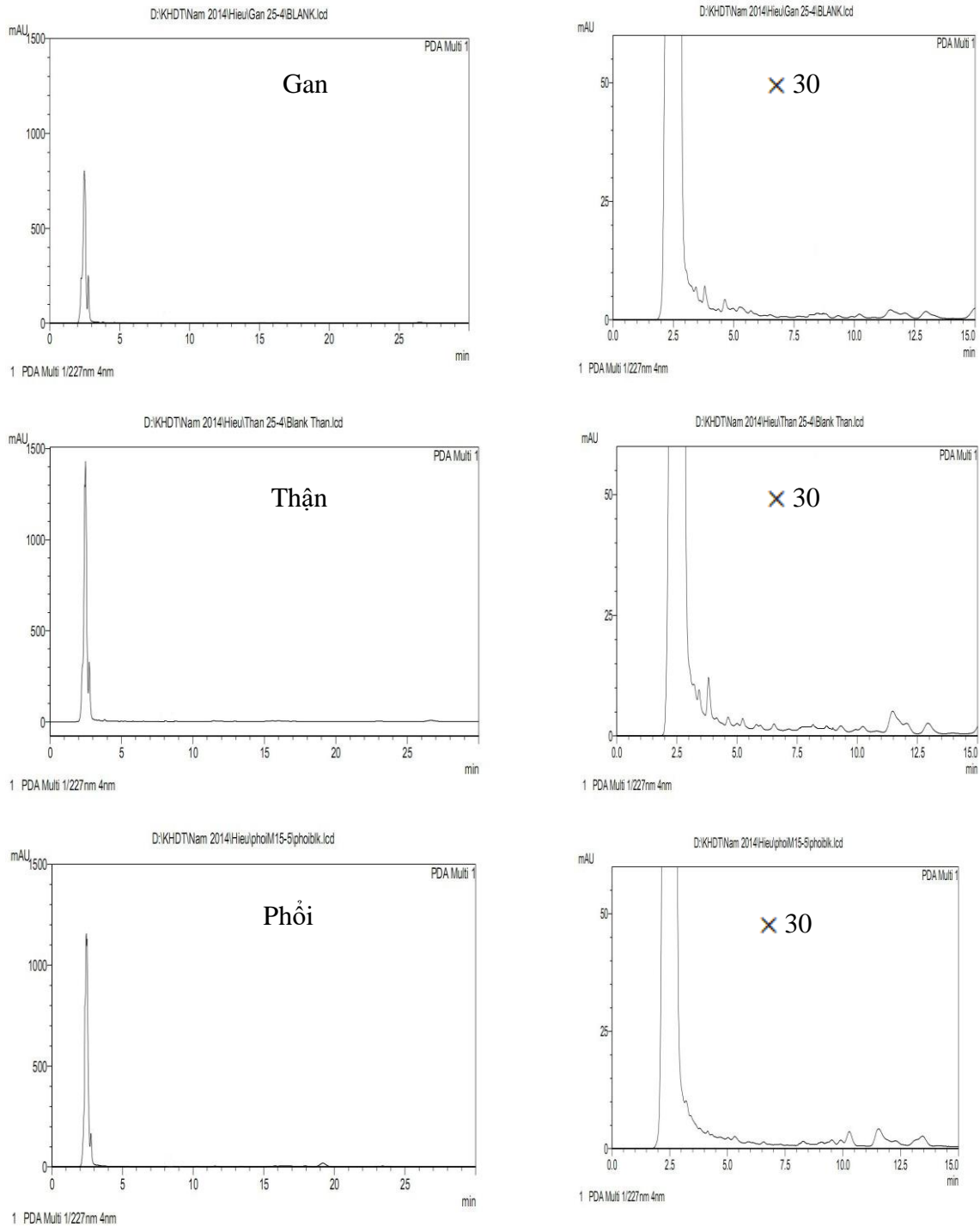
(a) Sắc ký đồ chuẩn PTX và nội chuẩn CAR trong methanol, (b) chuẩn PTX và nội chuẩn CAR trong mẫu thử tự tạo, (c) mẫu mô phổi tại thời điểm 0,5 giờ sau khi cho thỏ dùng thuốc với liều 6 mg/kg.

Nhận xét: Pic của PTX và CAR tách hoàn toàn với nhau và với các pic không xác định khác trên sắc ký đồ. Sắc ký đồ trên các mẫu mô trắng không có pic lạ hiện diện tại thời gian lưu của CAR (khoảng 4 phút) và PTX (khoảng 9 phút). Như vậy, quy trình đã chứng minh được tính đặc hiệu.

Sắc ký đồ trên mẫu trắng của 3 mô chuột: gan, thận, phổi và mẫu thử tự tạo (chọn mô đồng nhất) và mẫu chuẩn (chứa AS (PTX) và IS2 (DZP)) được pha trong dung môi methanol thể hiện ở Hình 3.13 và Hình 3.14.



Hình 3.13. Sắc ký đồ chuẩn PTX và DZP trong methanol (a), trong mẫu thử tự tạo mô đồng nhất (b) và mẫu mô sau khi tiêm thuốc 1 giờ (c)



Hình 3.14. Sắc ký đồ mẫu placebo từ dịch chiết các mô gan, thận, phổi của chuột
Nhận xét: Phổ UV-Vis tại thời gian lưu của PTX và DZP (IS2) trong mẫu tự tạo giống phổ UV-Vis tại thời gian lưu của PTX và DZP trong mẫu chuẩn pha trong methanol, pic của PTX và DZP tách hoàn toàn với nhau và với các pic không xác định khác trên sắc ký đồ. Sắc ký đồ trên các mẫu placebo không có pic hiện diện tại

thời gian lưu của DZP (khoảng 8 phút) và PTX (khoảng 10 phút). Như vậy, quy trình đã chứng minh được tính đặc hiệu.

* Tính phù hợp hệ thống

Bảng 3.29. Kết quả thẩm định tính phù hợp hệ thống phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô đồng nhất thỏ và chuột

	t_R (phút)	Diện tích pic	k	A_S
Thỏ				
Carbamazepin (IS1) (n=6)				
TB	4,758	502666	0,59	1,173
RSD (%)	0,08	0,76	-	-
Paclitaxel (AS) (n=6)				
TB	9,474	215632	2,16	1,056
RSD (%)	0,04	0,54	-	-
Chuột				
Diazepam (IS2) (n = 6)				
TB	8,257	720467	0,521	1,351
RSD (%)	0,03	0,08	-	-
Paclitaxel (AS) (n = 6)				
TB	10,185	530670	0,234	1,062
RSD (%)	0,04	0,27	-	-

Nhận xét: Các thông số có RSD < 5,0%; quy trình đạt yêu cầu tính phù hợp hệ thống.

* Tính tuyến tính và miền giá trị

- Mô thỏ: Kết quả trình bày tóm tắt ở Bảng 3.30 - 3.33 và Phụ lục 11.

Bảng 3.30. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô gan thỏ

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	SD (%)
	AS	IS	AS/IS		
0,1	3984	195670	0,0204	0,0917	8,33
0,5	20456	189063	0,1082	0,4872	2,57
1	38906	187450	0,2076	0,9345	6,55
2,5	88000	186904	0,4708	2,1199	15,20
5,0	177718	189536	0,9376	4,2217	15,57
7,5	308044	192305	1,6019	7,2123	3,84

10,0	428157	198430	2,1577	9,7151	2,85
20,0	878116	198118	4,4323	19,9563	0,22
$y = 0,2221x; R^2 = 0,9985$					

Bảng 3.31. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết từ mô thận thỏ

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	SD (%)
	AS	IS	AS/IS		
0,1	4071	236890	0,0172	0,0843	15,68
0,5	20467	220780	0,0927	0,4549	9,03
1	41640	210017	0,1983	0,9729	2,71
1,5	65906	219395	0,3004	1,4740	1,73
2,5	103707	216780	0,4784	2,3474	6,10
5,0	221513	222377	0,9961	4,8877	2,25
10,0	458119	224994	2,0361	9,9909	0,091
15,0	709097	231243	3,0665	15,0464	0,3
20,0	963429	237757	4,0522	19,8830	0,59
$y = 0,2038x; R^2 = 0,9999$					

Bảng 3.32. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết từ mô phổi

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	SD (%)
	AS	IS	AS/IS		
0,1018	3985	199058	0,0200	0,0903	11,338
0,509	20014	184788	0,1083	0,4883	4,064
1,018	42461	191970	0,2212	0,9972	2,040
1,527	59951	194552	0,3081	1,3893	9,017
2,545	100485	197101	0,5098	2,2985	9,684
5,09	211675	187873	1,1267	5,0798	0,201
10,18	429150	192103	2,2340	10,0719	1,061
15,27	654508	183056	3,5755	16,1202	5,568
20,36	834886	190977	4,3717	19,7099	3,193
$y = 0,2038x; R^2 = 0,9999$					

Bảng 3.33. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết từ mô buồng trứng thỏ

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	SD (%)
	AS	IS	AS/IS		
0,098	4012	195680	0,0205	0,0799	18,50
0,48	20456	189063	0,1082	0,4215	12,19
0,98	41436	171041	0,2423	0,9437	3,70
2,45	103379	172689	0,5986	2,3321	4,81
4,9	140396	120222	1,1678	4,5493	7,16
9,8	489848	191844	2,5534	9,9469	1,50
14,7	694962	190002	3,6577	14,2488	3,07
19,6	881872	174322	5,0589	19,7073	0,55

$y = 0,2567x; R^2 = 0,9992$

Nhận xét: Độ lệch tại LLOQ nhỏ hơn 20%, tại các nồng độ khác đều nhỏ hơn 15%. Phương trình hồi quy có $R^2 > 0,99$ do đó khoảng nồng độ tuyến tính đạt yêu cầu trong các mô đã khảo sát.

- Mô chuột

Kết quả khoảng xác định của nồng độ PTX tóm tắt ở Bảng 3.34 - 3.36 và Phụ lục 11

Bảng 3.34. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô gan chuột

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	SD (%)
	AS	IS	AS/IS		
0,1	7605	696389	0,0109	0,0901	9,85
0,5	41621	728650	0,0571	0,4715	5,69
1	86294	778074	0,1109	0,9155	8,45
2,5	226993	766240	0,2962	2,4455	2,18
5	472521	749725	0,6303	5,2028	4,06
7,5	659646	713658	0,9243	7,6302	1,74
10	918720	743671	1,2354	10,1981	1,98
20	1761279	731610	2,4074	19,8731	0,63

$y = 8,255x - 0,028; R^2 = 0,9996$

Bảng 3.35. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô thận chuột

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	SD (%)
	AS	IS	AS/IS		
0,1	9602	775872	0,0124	0,1092	9,23
0,5	47501	751916	0,0632	0,5567	11,35
1	86139	719504	0,1197	1,0544	5,44
2,5	226788	758913	0,2988	2,6321	5,29
5	452856	767014	0,5904	5,2008	4,02
7,5	691838	764804	0,9046	7,9686	6,25
10	863481	776394	1,1122	9,7974	2,03
20	1830632	803478	2,2784	20,0704	0,35

$y = 8,809x - 0,099$; $R^2 = 0,9991$

Bảng 3.36. Kết quả thẩm định tính tuyến tính trong phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô phổi chuột

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	SD (%)
	AS	IS	AS/IS		
0,1	726480	9630	0,0146	0,1137	13,75
0,5	711005	52235	0,0735	0,6304	26,08
1	756800	92005	0,1216	1,0432	4,32
2,5	755280	257232	0,3406	2,9225	16,90
5	748564	458783	0,6129	5,2592	5,18
7,5	746210	677242	0,9076	7,7879	3,84
10	765883	887880	1,1593	9,9479	0,52
20	778579	1828482	2,3485	20,1524	0,76

$y = 8,581x - 0,157$; $R^2 = 0,9995$

Nhận xét: Độ lệch tại LLOQ đều nhỏ hơn 20 %, tại các nồng độ khác đều nhỏ hơn 15%. < 6/8 điểm đạt yêu cầu độ lệch trong đó có LLOQ và điểm giới hạn trên. Do đó chấp nhận đường chuẩn trong các mô đã khảo sát.

* Tỷ lệ thu hồi - hiệu suất chiết

Kết quả hiệu suất chiết chuẩn và nội chuẩn của phương pháp định lượng PTX trong mô thỏ và chuột thử nghiệm trình bày tóm tắt ở Bảng 3.37 và chi tiết Phụ lục 11.

Bảng 3.37. Kết quả thẩm định tỷ lệ thu hồi và hiệu suất chiết PTX và CAR /DZP từ dịch chiết mô đồng nhất thỏ và chuột

Nồng độ PTX khảo sát ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Kết quả	Hiệu suất chiết (%)			
		Thỏ		Chuột	
		PTX	CAR	PTX	DZP
1	TB	98,20	101,25	90,48	97,00
	RSD%	3,31	2,34	2,95	1,53
10	TB	107,72	104,13	94,70	94,78
	RSD%	4,17	3,22	5,60	5,26
20	TB	102,94	105,78	88,85	96,90
	RSD%	1,01	2,96	2,76	2,99

Nhận xét: Quy trình định lượng có tỷ lệ thu hồi PTX và CAR trong khoảng 85% - 115 %. RSD tương ứng với các mức nồng độ thấp, trung bình, cao < 15,0%. Quy trình chiết đạt yêu cầu.

* Độ đúng và độ chính xác

- Mô thỏ:

+ Độ đúng và độ chính xác được thực hiện trong mô đồng nhất. Kết quả trong và liên ngày trình bày ở Bảng 3.38 và chi tiết Phụ lục 11.

Bảng 3.38. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô thỏ

Nồng độ khảo sát ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Ngày 1		Ngày 2		Ngày 3	
	Tỷ lệ phục hồi (%)	SD (%)	Tỷ lệ phục hồi (%)	SD (%)	Tỷ lệ phục hồi (%)	SD (%)
1,0	103,04	3,44	88,56	1,44	100,8	4,21
10	101,86	2,46	94,30	1,31	105,39	0,72
20	99,05	1,81	98,52	0,64	98,95	2,99
Liên ngày	Tỷ lệ phục hồi = 97,47 % - 100,52 %; SD = 1,81 % - 3,03 %					

+ Độ đúng và độ chính xác tại giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

LLOQ được chọn ở 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và kết quả trình bày tóm tắt ở Bảng 3.39.

Bảng 3.39. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác tại LLOQ phương pháp định lượng PTX trong dịch chiết mô thỏ

Mẫu	Diện tích pic		AS/IS	Nồng độ PTX	Nồng độ PTX	Tỷ lệ phục hồi (%)	SD (%)
	AS	IS		thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)		
1	4092	174951	0,0234		0,1055	103,59	3,59
2	3996	172770	0,0231		0,1043	102,43	2,43
3	4193	172590	0,0242	0,1018	0,1095	107,60	7,60
4	3636	168357	0,0215		0,0974	95,65	4,35
5	3969	167950	0,0236		0,1065	104,66	4,66
6	3621	166433	0,0218		0,0981	96,36	3,64
TB					0,1035	101,71	4,37
RSD					0,005	-	-

Nhận xét: Ở các nồng độ khảo sát tỷ lệ hồi phục đạt yêu cầu cho phép khi lớn hơn 85% và nhỏ hơn 115%. Độ chính xác tại LLOQ < 20%, tại các nồng độ khác < 15%.

- Mô chuột

+ Độ đúng và độ chính xác

Độ đúng và độ chính xác được thực hiện trong mô đồng nhất. Kết quả ở nồng độ 1, 5, 10 $\mu\text{g/mL}$ tương ứng với 3 mức nồng độ cao, trung bình, thấp theo đường chuẩn tuyến tính và trong 3 ngày được tóm tắt ở Bảng 3.40 và chi tiết Phụ lục 11.

Bảng 3.40. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác phương pháp định lượng PTX trong mô chuột

Nồng độ khảo sát ($\mu\text{g/mL}$)	Ngày 1		Ngày 2		Ngày 3	
	Tỷ lệ phục hồi (%)	SD (%)	Tỷ lệ phục hồi (%)	SD (%)	Tỷ lệ phục hồi (%)	SD (%)
1	97,01	2,27	95,5	4,63	101,04	0,78
5	105,44	5,16	105,36	3,45	107,82	3,99
10	100,64	3,19	103,91	3,12	108,25	4,75
Liên ngày	Tỷ lệ phục hồi = 97,85 % - 106,21 %; SD = 2,56 % - 4,20 %					

Nhận xét: Độ chính xác trong ngày và khác ngày ở các nồng độ khảo sát đạt yêu cầu cho phép vì có RSD nhỏ hơn 15%. Tỷ lệ hồi phục, ở các nồng độ khảo sát, trong khoảng 91,26 - 112,16%, đạt yêu cầu trong khoảng 85% - 115%.

+ Độ đúng và độ chính xác tại giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

LLOQ của quy trình định lượng từ điểm cuối đường tuyến tính là 0,1 µg/ mL. Kết quả trình bày tóm tắt trong Bảng 3.41 và Phụ lục 11.

Bảng 3.41. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác tại LLOQ phương pháp định lượng PTX trong mô chuột

Mẫu	Diện tích pic		AS/IS	Nồng độ PTX thực tế (µg/ mL)	Nồng độ PTX tìm thấy (µg/ mL)	Tỷ lệ phục hồi (%)	SD (%)
	AS	IS					
1	9865	698324	0,0141	0,1	0,1031	103,11	3,11
2	9673	684340	0,0141		0,1032	103,17	3,17
3	8984	685302	0,0131		0,0957	95,69	4,31
4	9174	693420	0,0132		0,0966	96,57	3,43
5	9734	695464	0,0140		0,1022	102,16	2,16
6	9298	689434	0,0135		0,0984	98,44	1,56
TB						99,86	
RSD						3,38	

Nhận xét: Độ chính xác: RSD 2 < 20 %; Độ đúng: tỷ lệ hồi phục nằm trong giới hạn 80 – 120 % đạt yêu cầu của một quy trình phân tích dịch sinh học.

* Độ ổn định

- Mô thử: Độ ổn định PTX được khảo sát ở nồng độ 1,0 µg/mL và 20,0 µg/mL, kết quả trình bày tóm tắt ở Bảng 3.42 và chi tiết Phụ lục 11.

Bảng 3.42. Kết quả thẩm định độ ổn định PTX trong dịch chiết từ mô thử ở các điều kiện bảo quản

Nồng độ PTX (µg/mL)	Kết quả	Nồng độ tìm thấy (µg/mL)	Tỷ lệ phục hồi (%)	SD (%)
24 giờ ở nhiệt độ phòng				
1,31	Trung bình	1,30	98,98	1,53
	RSD (%)	1,61	1,61	
19,78	Trung bình	19,71	99,66	0,37
	RSD (%)	0,36	0,36	

Sau 3 chu kỳ đông – rã đông				
1,31	Trung bình	1,32	100,51	1,02
	RSD (%)	1,16	1,16	
19,78	Trung bình	19,74	99,78	0,49
	RSD (%)	0,56	0,56	
Sau 30 ngày ở nhiệt độ -20 °C				
1,31	Trung bình	1,31	100,25	0,76
	RSD (%)	0,88	0,88	
19,78	Trung bình	19,85	100,35	0,35
	RSD (%)	0,33	0,33	

Nhận xét: Tỷ lệ % phục hồi PTX từ 98,6 – 101,36% và giá trị RSD < 15% nên chấp nhận độ đúng và độ chính xác của phép đo độ ổn định của mẫu thử.

- Mô chuột: Kết quả khảo sát ở hai nồng độ 1,0 và 10,0 µg/mL. Kết quả tóm tắt ở Bảng 3.43 và chi tiết Phụ lục 11.

Bảng 3.43. Kết quả thẩm định độ ổn định PTX trong dịch chiết từ mô chuột

Nồng độ PTX (µg/ mL)	Kết quả	Nồng độ tìm thấy (µg/ mL)	Tỷ lệ phục hồi (%)	SD (%)
24 giờ ở nhiệt độ phòng				
1	Trung bình	1,03	102,67	2,67
	RSD (%)	2,45	2,45	
10	Trung bình	9,85	98,47	1,53
	RSD (%)	0,94	0,94	
Sau 3 chu kỳ đông – rã đông				
1	Trung bình	0,94	94,33	5,67
	RSD (%)	2,45	2,45	
10	Trung bình	9,21	92,13	7,87
	RSD (%)	0,60	0,60	
Sau 30 ngày ở nhiệt độ -20 °C				
1	Trung bình	0,90	90,33	9,67
	RSD (%)	2,56	2,56	
10	Trung bình	9,67	96,67	3,33
	RSD (%)	1,35	1,35	39,15

Nhận xét: % tìm lại PTX từ 88,70 - 105,46 % và giá trị SD < 15 % nên chấp nhận độ đúng và độ chính xác của quy trình thẩm định độ ổn định của mẫu thử tại các điều kiện.

3.3.3. Thông số dược động học và đánh giá phân bố sinh học trong một số mô thỏ và chuột của hai chế phẩm bào chế chứa PTX so với chế phẩm đối chứng

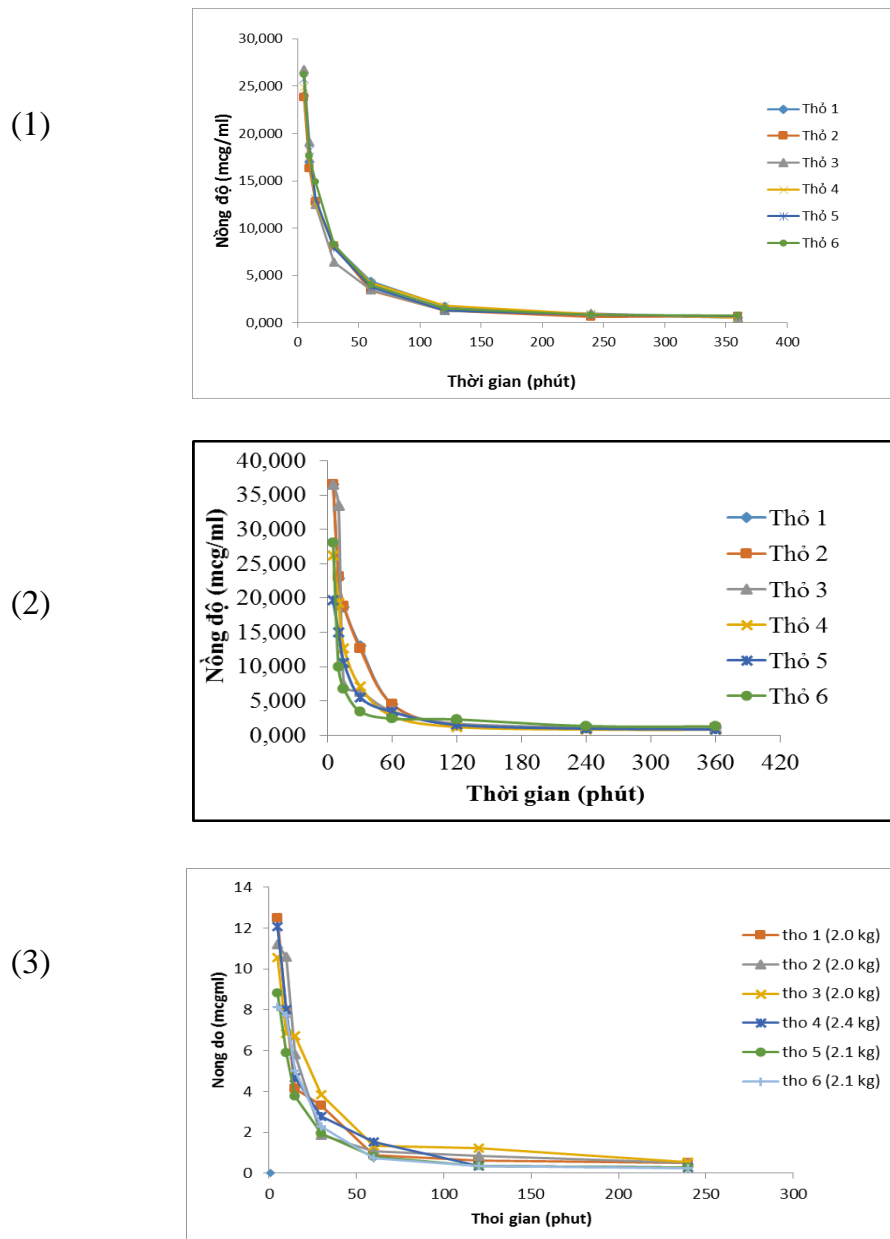
3.3.3.1. Kết quả thực nghiệm nồng độ PTX trong huyết tương thỏ

Nồng độ thuốc PTX trong huyết tương thỏ sau khi tiêm các chế phẩm theo thời gian được thể hiện trong Bảng 3.44, Hình 3.15 và chi tiết ở Phụ lục 11.

Bảng 3.44. Kết quả khảo sát nồng độ PTX trong huyết tương thỏ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) sau khi tiêm thuốc đối chứng Stragen[®], dung dịch đậm đặc và bột đông khô

Thời điểm (phút)	Khoảng ước lượng \pm SD		
	Thuốc đối chứng	Dung dịch đậm đặc	Bột đông khô
5	24,837 \pm 4,116	30,589 \pm 7,455	10,538 \pm 1,756
10	17,473 \pm 3,513	20,624 \pm 8,439	7,816 \pm 1,578
15	12,673 \pm 0,390	12,501 \pm 5,568	5,030 \pm 1,099
30	7,542 \pm 2,485	8,042 \pm 4,084	2,675 \pm 0,794
60	3,756 \pm 1,393	3,521 \pm 0,889	1,063 \pm 0,319
120	1,458 \pm 0,700	1,622 \pm 0,394	0,625 \pm 0,361
240	0,839 \pm 0,404	1,067 \pm 0,180	0,390 \pm 0,129
360	0,595 \pm 0,181	1,029 \pm 0,170	0,000

Nhận xét: Thực nghiệm khảo sát nồng độ PTX trong huyết tương của dạng bột đông khô cũng thể hiện một sự giảm nồng độ liên tục theo thời gian trong huyết tương thỏ. Nồng độ thuốc giảm mạnh trong 1 giờ đầu và ổn định từ 2 giờ trở đi, đối với bột đông khô đến thời điểm 6 giờ gần như không còn thuốc trong huyết tương nữa.



Hình 3.15. Biểu đồ nồng độ thuốc PTX của thuốc đối chứng (1), dung dịch đậm đặc (2) và bột đông khô (3) trong huyết tương thỏ theo thời gian

Kết quả so sánh thông số dược động học giữa thuốc đối chứng, dạng dung dịch đậm đặc và dạng bột đông khô trình bày tóm tắt ở Bảng 3.45 và chi tiết Phụ lục 11.

Bảng 3.45. So sánh các thông số dược động học trong huyết tương thô của thuốc đối chứng với chế phẩm dung dịch đậm đặc và bột đông khô

Thông số		AUC ₀₋₆ ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	AUC _{0-∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	t _{1/2} (giờ)	V _d (lít/kg)
Thuốc đối chứng		14,71 \pm 2,31	15,70 \pm 2,07	1,15 \pm 0,04	0,25 \pm 0,01
Dạng dung dịch đậm đặc		16,33 \pm 2,53	18,38 \pm 2,42	1,36 \pm 0,21	0,21 \pm 0,06
Dạng đông khô		5,60 \pm 1,19	5,55 \pm 1,38	0,87 \pm 0,09	0,57 \pm 0,10
So sánh giữa thuốc chứng và dung dịch đậm đặc	t	-1,27	-2,05	-2,04	1,91
	t _{0,05}	2,45	2,45	2,57	2,57
So sánh giữa thuốc chứng và dạng đông khô	t		13,21	7,06	-7,84
	t _{0,05}		2,45	2,45	2,57

Nhận xét: Nồng độ đỉnh trong huyết tương của dạng đông khô khá thấp (trung bình 11,412 $\mu\text{g}/\text{mL}$) so với dạng dung dịch đậm đặc (30,589 $\mu\text{g}/\text{mL}$) và thuốc đối chứng (24,837 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Các thông số dược động AUC_{0->6}, AUC_{0-> ∞} , t_{1/2} của dạng đông khô được cải thiện so với dạng dung dịch đậm đặc. So sánh giữa thuốc đối chứng và dạng đông khô có khác biệt có ý nghĩa thống kê khi $t > t_{0,05}$.

3.3.3.2. Kết quả thực nghiệm nồng độ PTX trong huyết tương chuột

Kết quả thực nghiệm được trình bày tóm tắt ở Bảng 3.46, so sánh ở Bảng 3.47 và Hình 3.16.

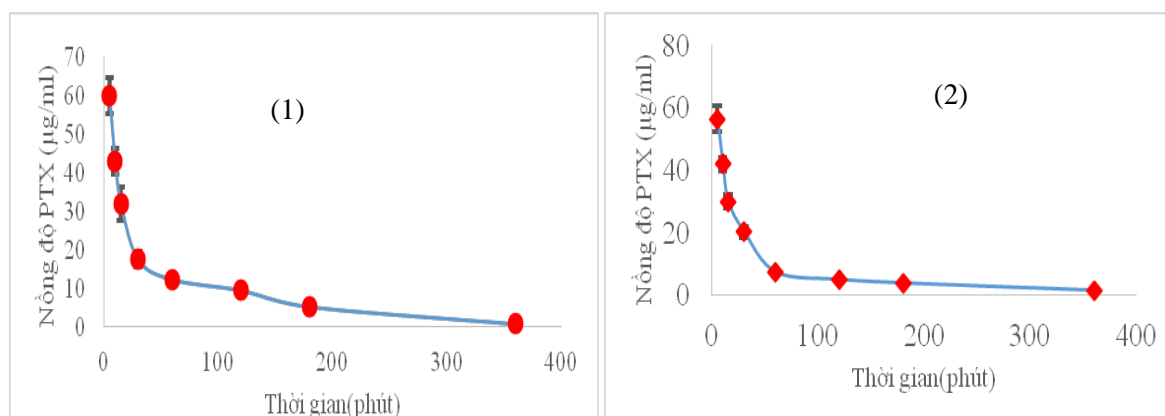
Bảng 3.46. Bảng so sánh nồng độ PTX trong huyết tương chuột tại từng thời điểm giữa chế phẩm bào chế và thuốc đối chiếu Anzatax[®]

Thời điểm	Dung dịch đậm đặc	Anzatax [®]	t	t _{0,05}	Khác biệt có ý nghĩa thống kê
5	56,477 ± 4,218	59,769 ± 4,583	1,36	2,23	Không có ý nghĩa
10	41,946 ± 2,269	42,827 ± 3,242	0,57	2,23	Không có ý nghĩa
15	29,969 ± 2,124	31,945 ± 4,313	1,06	2,23	Không có ý nghĩa
30	20,262 ± 1,704	17,485 ± 2,092	2,64	2,23	Có ý nghĩa
60	7,330 ± 0,721	12,306 ± 1,272	9,04	2,23	Có ý nghĩa
120	4,991 ± 0,467	9,526 ± 0,762	13,04	2,23	Có ý nghĩa
180	3,875 ± 0,330	5,262 ± 0,624	5,11	2,23	Có ý nghĩa
360	1,506 ± 0,116	0,826 ± 0,061	12,48	2,23	Có ý nghĩa

Bảng 3.47. Bảng so sánh các thông số dược động học trên chuột giữa chế phẩm bào chế và thuốc đối chiếu Anzatax[®]

Thông số	Dung dịch đậm đặc	Anzatax [®]	Tỉ lệ (%)
C _{max} (µg/mL)	59,434	63,483	93,62
AUC _{0→6} (µg.h/mL)	43,733	53,595	81,60
AUC _{0→∞} (µg.h/mL)	46,192	54,737	84,39
t _{1/2} (h)	1,132	0,958	118,13
V _d (l/kg)	0,202	0,189	106,81

Nhận xét: Khi tiêm cùng liều 12mg/ kg chế phẩm bào chế và thuốc đối chiếu Anzatax[®] vào chuột nhắt cái, nồng độ thuốc đạt được trong huyết tương của chế phẩm bào chế luôn nhỏ hơn thuốc đối chiếu trong 3 giờ đầu và tại thời điểm 6 giờ thì cao hơn hẳn. Vào các thời điểm 5 phút, 10 phút và 15 phút sau khi tiêm, khác biệt nồng độ này không có ý nghĩa thống kê. Tại các thời điểm theo dõi sau đó, sự khác biệt nồng độ này có ý nghĩa thống kê. Dựa vào các thông số dược động học trên chuột nhắt cái trong Bảng 3.47, so với thuốc đối chiếu Anzatax[®], chế phẩm bào chế có các thông số dược động học có mức khác biệt, nồng độ đạt được trong máu thấp hơn so với thuốc đối chiếu nhưng thời gian lưu giữ lại lâu hơn.



Hình 3.16. Biểu đồ nồng độ PTX trung bình của thuốc đối chứng (1) và dung dịch đậm đặc (2) trong huyết tương chuột nhắt theo thời gian

Nhận xét: Nồng độ thuốc trong huyết tương chuột giảm theo thời gian, sự giảm này rõ ràng nhất trong 1 giờ đầu và có xu hướng chậm dần ở những giờ kế tiếp. Sự chênh lệch nồng độ PTX giữa các cá thể khác nhau trong cùng một lô thử nghiệm không lớn, xấp xỉ trong khoảng 10%.

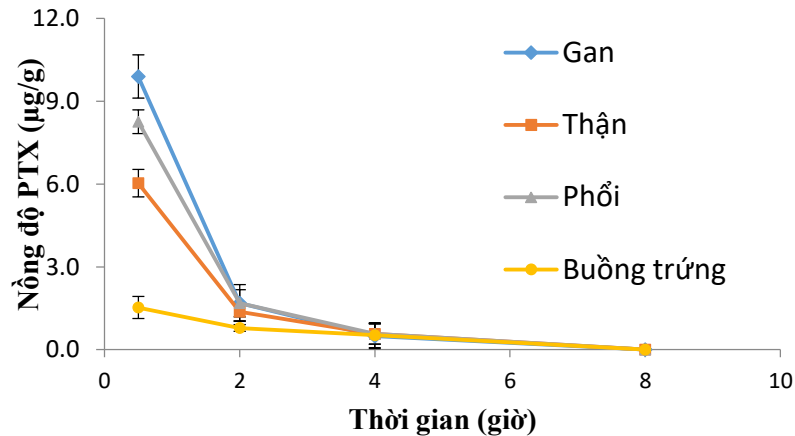
3.3.3.3. Kết quả phân bố PTX trong mô thử

a. Thuốc đối chứng

Kết quả phân tích nồng độ PTX phân bố trong mô thử sử dụng phương pháp phân tích đã được thẩm định, trình bày tóm tắt ở Bảng 3.48 và Hình 3.17.

Bảng 3.48. Nồng độ PTX ($\mu\text{g/g}$) trong mô thử ($\text{TB} \pm \text{SD}$) của thuốc đối chứng (A)

Thời gian	Gan	Thận	Phổi	Buồng trứng
0,5 giờ	$9,90 \pm 0,78$	$6,03 \pm 0,50$	$8,26 \pm 0,43$	$1,53 \pm 0,40$
2 giờ	$1,69 \pm 0,67$	$1,37 \pm 0,33$	$1,68 \pm 0,49$	$0,78 \pm 0,12$
4 giờ	$0,49 \pm 0,45$	$0,57 \pm 0,37$	$0,57 \pm 0,37$	$0,52 \pm 0,45$
8 giờ	0,00	0,00	0,00	0,00



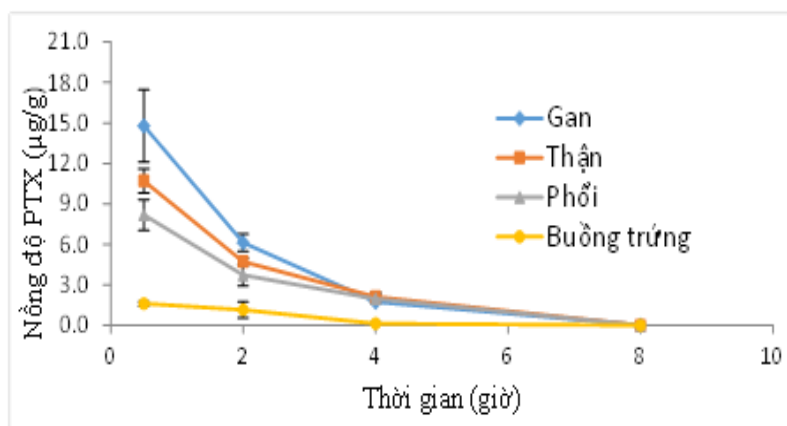
Hình 3.17. Đường biểu diễn nồng độ PTX trong các mô theo thời gian sau khi tiêm tĩnh mạch thuốc đối chứng (A) với liều 6 mg/kg (TB ± SD)

Nhận xét: Với liều tiêm 6 mg/kg, nồng độ PTX phân bố vào mô thử nghiệm khá cao. Nồng độ thuốc tập trung trong mô gan > phổi > thận > buồng trứng. Thuốc giảm nhanh trong 4 giờ đầu. Từ thời điểm 8 giờ, nồng độ thuốc không còn đủ để phát hiện. Các mô có hệ số tưới máu cao có nồng độ thuốc tập trung lớn (gan, phổi, thận).

b. Dạng bào chế dung dịch đậm đặc

Bảng 3.49. Nồng độ PTX (µg/g) (TB ± SD) trong các mô thử

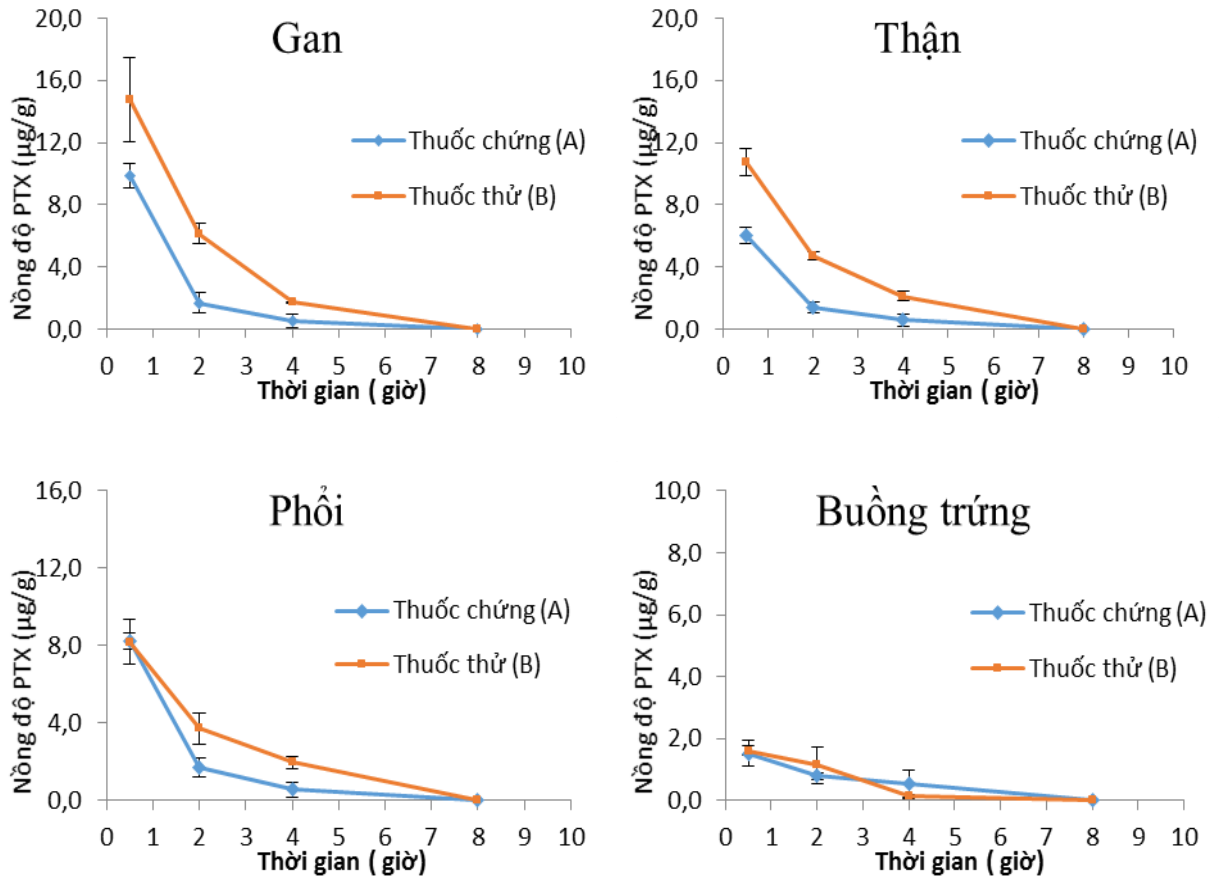
Thời gian	Gan	Thận	Phổi	Buồng trứng
0,5 giờ	14,78 ± 2,69	10,71 ± 0,89	8,19 ± 1,14	1,61 ± 0,16
2 giờ	6,13 ± 0,64	4,71 ± 0,27	3,72 ± 0,83	1,15 ± 0,59
4 giờ	1,73 ± 0,04	2,12 ± 0,31	1,96 ± 0,30	0,14 ± 0,03
8 giờ	0,00	0,00	0,00	0,00



Hình 3.18. Đường biểu diễn nồng độ PTX trong các mô theo thời gian sau khi tiêm tĩnh mạch dung dịch đậm đặc (B) với liều 6 mg/kg (TB ± SD)

c. So sánh thuốc đối chứng và dung dịch đậm đặc

Kết quả tóm tắt trình bày ở Hình 3.19 và Bảng 3.50.



Hình 3.19. Phân bố trong mô của PTX sau khi tiêm tĩnh mạch liều 6 mg/kg thuốc đối chứng (A) và dung dịch đậm đặc (B) trên thỏ thử nghiệm (TB ± SD)

Nhận xét: Với cùng điều kiện thí nghiệm, liều tiêm 6 mg/kg, nồng độ PTX tập trung vào mô gan nhiều nhất, buồng trứng thấp nhất, các mô thận, phổi có mức phân bố thuốc tương đương nhau. Từ thời điểm 8 giờ, nồng độ thuốc không còn đủ để phát hiện. So sánh sự phân bố PTX trong các mô giữa 2 thuốc, từ 0,5 giờ đến 4 giờ, nồng độ PTX của dung dịch đậm đặc (B) đều cao hơn so với thuốc đối chứng (A). Với cùng điều kiện thí nghiệm, liều tiêm 6 mg/kg, nồng độ PTX tập trung vào mô gan nhiều nhất, buồng trứng thấp nhất, các mô thận, phổi có mức phân bố thuốc tương đương nhau.

Bảng 3.50. So sánh $AUC_{0,5-8h}$ của PTX trong mô thỏ giữa thuốc đối chứng và dung dịch đậm đặc (TB \pm SD)

Mô	Thuốc chứng (A)	Dung dịch đậm đặc (B)	Tỷ số $AUC_{0,5-8h}$
Gan	11,83 \pm 3,04	27,00 \pm 2,87	2,28
Thận	8,63 \pm 1,97	22,64 \pm 1,26	2,62
Phổi	10,84 \pm 2,12	18,53 \pm 1,59	1,71
Buồng trứng	4,08 \pm 1,13	3,64 \pm 1,11	0,89
Tổng cộng	35,39 \pm 8,26	71,81 \pm 6,83	2,01

Nhận xét: Giá trị $AUC_{0,5-8h}$ của dung dịch đậm đặc (B) cao hơn thuốc so với thuốc chứng (A), tỷ số $AUC_{0,5-8h}$ thuốc thử/ $AUC_{0,5-8h}$ thuốc chứng tương ứng với các mô gan, thận, phổi, buồng trứng, tổng cộng các mô là 2,28; 2,62; 1,71; 0,89 và 2,01.

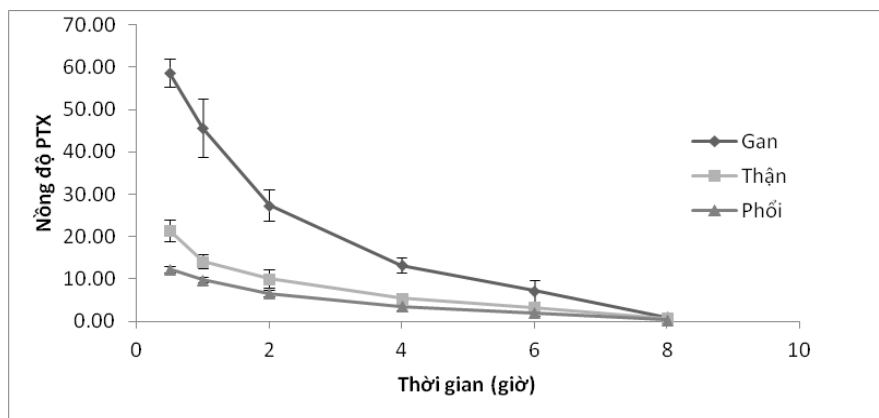
3.3.3.4. Kết quả phân bố PTX trong mô chuột

a. Thuốc đối chứng

Phương pháp phân tích thẩm định đạt yêu cầu được áp dụng khảo sát nồng độ PTX trong mô chuột sau khi tiêm thuốc đối chứng ở Bảng 3.51 và Hình 3.20.

Bảng 3.51. Nồng độ PTX ($\mu\text{g/g}$) (TB \pm SD) trong mô chuột của thuốc đối chứng

Thời gian (giờ)	Gan ($\mu\text{g/g}$)	Thận ($\mu\text{g/g}$)	Phổi ($\mu\text{g/g}$)
0,5	58,70 \pm 3,25	21,53 \pm 2,56	12,32 \pm 0,75
1	45,65 \pm 6,90	14,14 \pm 1,62	9,79 \pm 0,67
2	27,32 \pm 3,71	10,03 \pm 2,11	6,56 \pm 0,79
4	13,27 \pm 1,67	5,39 \pm 1,18	3,48 \pm 0,95
6	7,26 \pm 2,54	3,29 \pm 0,96	2,02 \pm 0,71
8	0,17 \pm 0,16	0,45 \pm 0,21	0,32 \pm 0,09



Hình 3.20. Đường biểu diễn nồng độ PTX (TB ± SD) trong mô chuột theo thời gian khi tiêm thuốc đối chứng

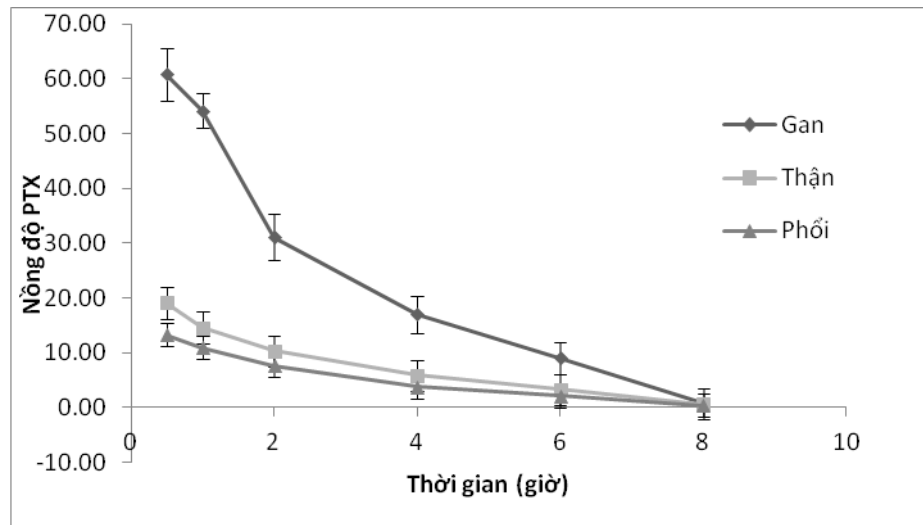
Nhận xét: Với liều tiêm 12 mg/ kg, nồng độ PTX phân bố vào mô chuột thử nghiệm cao. Nồng độ thuốc tập trung trong mô gan > thận > phổi. Thuốc giảm nhanh trong 4 giờ đầu. Từ thời điểm 8 giờ, nồng độ thuốc không còn đủ để phát hiện. Các mô có hệ số tưới máu cao có nồng độ thuốc tập trung lớn như gan, thận, phổi. Điều này phù hợp khi so sánh với các công trình nghiên cứu trên chuột thử nghiệm.

b. Dạng dung dịch đậm đặc

Phương pháp phân tích thẩm định đạt yêu cầu được áp dụng khảo sát nồng độ PTX trong mô chuột sau khi tiêm dạng dung dịch đậm đặc chứa PTX ở Bảng 3.52 và Hình 3.21.

Bảng 3.52. Nồng độ PTX (µg/ g) (TB ± SD) trong mô khi tiêm dung dịch đậm đặc

Thời gian (giờ)	Gan (µg/ g)	Thận (µg/ g)	Phổi (µg/ g)
0,5	60,80 ± 4,74	19,13 ± 2,71	13,32 ± 0,89
1	54,20 ± 3,24	14,61 ± 0,54	10,94 ± 1,14
2	31,09 ± 4,24	10,31 ± 0,97	7,71 ± 0,72
4	17,05 ± 3,43	5,85 ± 1,47	3,81 ± 0,98
6	9,11 ± 2,93	3,28 ± 0,73	2,16 ± 0,74
8	0,16 ± 0,04	0,33 ± 0,14	0,43 ± 0,23



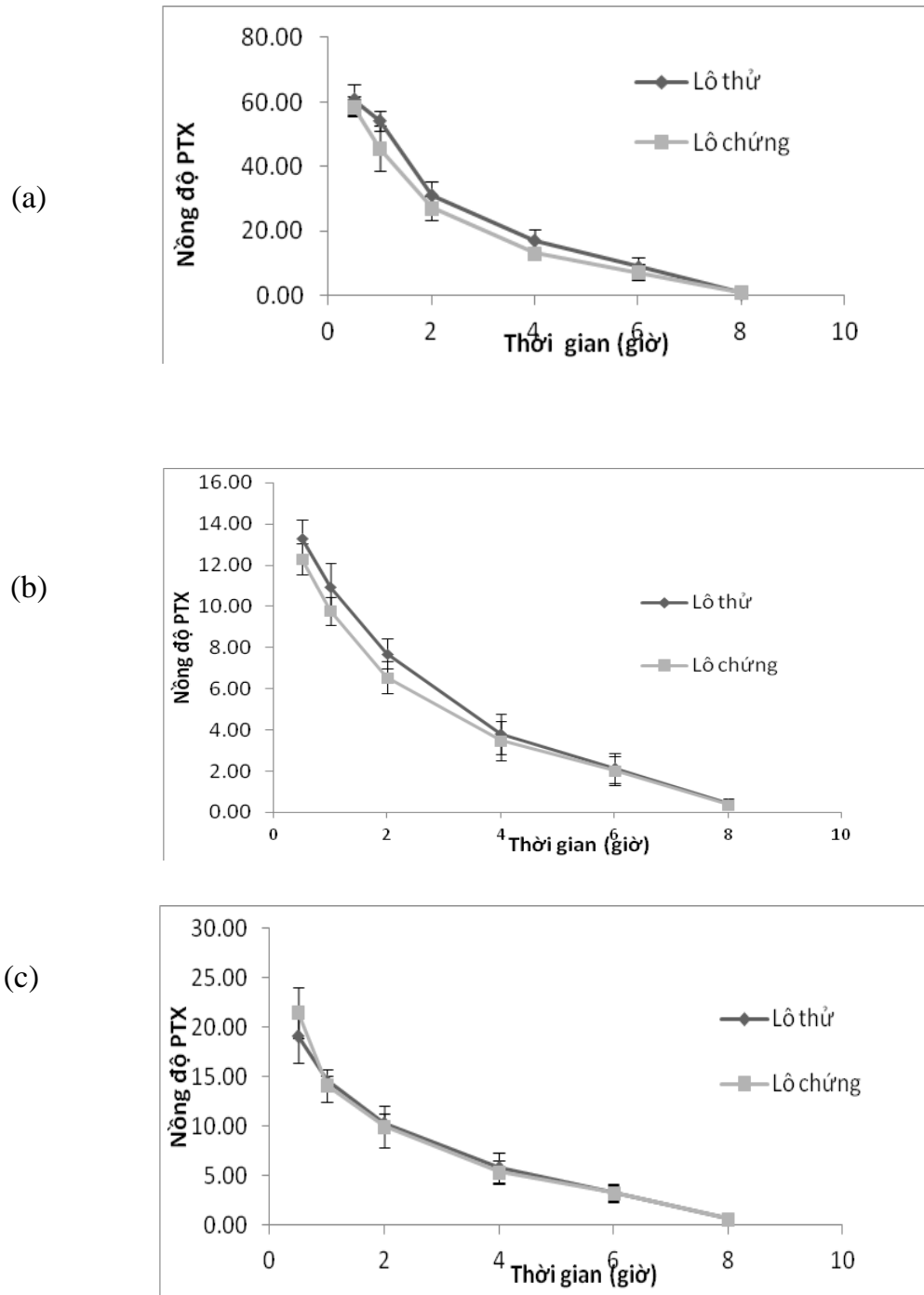
Hình 3.21. Đường biểu diễn nồng độ PTX trong mô chuột theo thời gian sau khi tiêm dung dịch đậm đặc ($TB \pm SD$)

Nhận xét: Với cùng điều kiện thí nghiệm, liều tiêm 12 mg/ kg. Dung dịch đậm đặc cho nồng độ PTX tập trung cao nhất ở mô gan, sau đó đến thận và thấp nhất là phổi. Giống như lô thử thuốc đối chứng, thuốc giảm nhanh trong 4 giờ đầu.

Dựa vào độ lệch chuẩn SD của các mô gan, thận, phổi, nghiên cứu cho thấy mô gan là mô có dãy biến thiên rộng nhất ($4,74 \mu\text{g/g}$ tại thời điểm 0,5 giờ), ở mô thận cũng khá cao ($2,71 \mu\text{g/g}$ tại thời điểm 0,5 giờ). Ở hai mô này thuốc phân bố kém đồng đều giữa các chuột thử nghiệm trên cùng một thời điểm. Tuy nhiên thuốc vẫn phân bố khá đều ở mô phổi (với lệch chuẩn cao nhất $1,14 \mu\text{g/g}$ ở thời điểm 1 giờ).

c. So sánh phân bố PTX trên mô chuột của dạng dung dịch đậm đặc (chế phẩm thử) với thuốc đối chứng

Kết quả khảo sát nồng độ PTX phân bố trong các mô theo thời gian thể hiện ở Hình 3.21 và tóm tắt so sánh các giá trị ở Bảng 3.53.



Hình 3.22. So sánh phân bố PTX ($\mu\text{g/g}$) trong mô gan (a), thân (b), phổi (c) của chuột sau khi tiêm thuốc đối chứng và chế phẩm thử dung dịch đậm đặc chứa PTX

Bảng 3.53. So sánh AUC_{0-8h} của PTX trong mô chuột giữa thuốc đối chứng và dung dịch đậm đặc với liều 12 mg/kg (TB ± SD)

Mô	Thuốc đối chứng ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{g}$)	Dung dịch đậm đặc ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{g}$)	P
Gan	131,90 ± 15,02	155,62 ± 16,82	0,0453 (< 0,05)
Thận	49,05 ± 5,83	50,12 ± 5,08	0,5752 (> 0,05)
Phổi	31,65 ± 2,31	35,46 ± 3,13	0,0453 (< 0,05)
Tổng cộng	212,60 ± 18,86	241,20 ± 16,26	0,0453 (< 0,05)

Nhận xét: So sánh sự phân bố PTX trong các mô giữa 2 thuốc, từ 0,5 giờ đến 4 giờ, nồng độ PTX của dung dịch đậm đặc đều cao hơn so với thuốc đối chứng ở mô gan và phổi. Còn ở mô thận thời điểm 0,5 giờ nồng độ PTX trong thuốc đối chứng cao hơn so với thuốc thử, tuy nhiên sau đó, tại các thời điểm 1, 2, 4 giờ nồng độ PTX của dung dịch đậm đặc lại cao hơn so với thuốc đối chứng. Từ thời điểm 8 giờ, nồng độ PTX thấp, không thể phát hiện trên sắc ký đồ đối với cả hai chế phẩm.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. BÀO CHẾ THUỐC TIÊM CHỨA PTX DẠNG DUNG DỊCH ĐẬM ĐẶC VÀ BỘT ĐÔNG KHÔ

4.1.1. Khảo sát tính chất lý hóa của chế phẩm đối chiếu

Stragen[®] được lựa chọn là chế phẩm đối chiếu vì tại thời điểm nghiên cứu đây là dạng chế phẩm dung dịch đậm đặc pha tiêm chứa PTX sử dụng phổ biến tại các bệnh viện. Hàm lượng PTX sau khi pha loãng trong dung dịch tiêm truyền NaCl 0,9% và glucose 5% đạt từ 100,67 % đến 90,30% trong yêu cầu giới hạn của Dược điển USP [59] [60]. Chế phẩm đối chiếu Stragen[®] đã được cấp số đăng ký với tiêu chuẩn chất lượng (theo USP 36) được chấp thuận theo quy định của Bộ Y tế nhưng trong quá trình nghiên cứu công thức bào chế dạng dung dịch đậm đặc và dạng đông khô vẫn thực hiện quy trình khảo sát chỉ tiêu cảm quan, pH (pha loãng với NaCl 0,9% đến liều điều trị), hàm lượng và độ ổn định các dung dịch sau khi pha loãng trong vòng 72 giờ sau khi pha để so sánh với chế phẩm thử trong từng giai đoạn bào chế. Đây cũng được coi như tiêu chuẩn quan trọng của chế phẩm về mặt bào chế đảm bảo ổn định phân liều sau khi pha loãng trong thời gian qui định.

Quá trình khảo sát tính chất lý hóa và hàm lượng của chế phẩm đối chiếu song song với chế phẩm thử trong quá trình xây dựng công thức sau khi pha loãng trong dung môi theo chỉ định, cũng như ghi nhận độ ổn định của các thông số khảo sát trong vòng 72 giờ là cần thiết vì sẽ dự kiến được sơ bộ thành phần, tỷ lệ tá dược trong công thức bào chế của chế phẩm thử.

4.1.2 Nghiên cứu công thức bào chế dung dịch đậm đặc

4.1.2.1. Khảo sát thành phần công thức

PTX được sử dụng điều trị ung thư bằng pha loãng dung dịch đậm đặc PTX (6 mg/mL – lọ 5 mL) trong dung dịch tiêm truyền NaCl 0,9% hoặc glucose 5% ở 3 nồng độ trị liệu là 0,3; 0,6 và 1,2 mg/mL. Tuy nhiên do đặc tính khó tan trong nước của PTX nên sản phẩm sau khi pha loãng thường không ổn định vì vậy phải sử dụng chất diện hoạt với nồng độ lớn để đảm bảo PTX được hòa tan và ổn định sau khi pha loãng trong ít nhất 24 giờ. Các chất diện hoạt được nghiên cứu để hòa tan và ổn định dung

dịch sau khi pha là Kolliphor ELP và Tween 80. Đây là 2 chất dùng phổ biến cho thuốc tiêm PTX (Kolliphor ELP) và dẫn chất Docetaxel (Tween 80) trên thị trường. Dung môi phối hợp với chất diện hoạt để điều chế dung dịch đậm đặc là ethanol (E) tuyệt đối, một dung môi hữu cơ tương đối an toàn so với các dung môi hữu cơ khác để hòa tan PTX tạo dung dịch đậm đặc. Kết quả cho thấy công thức chứa tween 80 đạt yêu cầu đề ra và có nhiều triển vọng, cần có nghiên cứu cải thiện thêm để có thể ứng dụng vào thực tiễn. Đây cũng là một công thức mới chưa thấy có trong sản phẩm tiêm nào chứa PTX. Việc sử dụng Kolliphor ELP tạo dung dịch sau khi pha loãng ổn định hơn tween 80. Bên cạnh đó nồng độ Kolliphor ELP sử dụng trong khoảng giới hạn của FDA ($< 52,5\%$), trong khi sử dụng T80/ E (2 : 1) khi pha loãng ở nồng độ 1,2 mg/ mL thì nồng độ tween là 13% cao hơn giới hạn FDA (8%). Ngoài ra công thức sử dụng Kolliphore có độ nhớt thấp hơn công thức sử dụng tween. Yếu tố độ nhớt sẽ ảnh hưởng đến quá trình lọc tiệt trùng và khó khăn khi tiêm mẫu cho động vật thử nghiệm. Công thức sử dụng Kolliphor ELP làm chất trung gian hòa tan với tỉ lệ K/E là (1:1) được chọn lựa. Kết quả bào chế dung dịch đậm đặc 6mg/ mL sau khi pha loãng đạt độ ổn định về cảm quan và hàm lượng hoạt chất trong vòng ít nhất 24 giờ. Việc thêm acid citric 0,01 M vào thành phần của công thức này mang lại sự cải thiện hơn và cụ thể là hàm lượng PTX ổn định, dung dịch hợp thành chậm xuất hiện tủa hơn và độ ổn định sau khi pha loãng kéo dài đến 72 giờ tương đương với thuốc đối chiếu. Công thức cũng được khảo sát độ lặp lại bằng cách nâng lô lên quy mô 150 mL, kết quả cho thấy có sự lặp lại chứng tỏ qui trình ổn định.

4.1.2.2. Qui trình bào chế dung dịch đậm đặc pha tiêm truyền

Qui trình bào chế dung dịch đậm đặc pha tiêm nhìn chung là hòa tan đơn giản. Tuy nhiên do yêu cầu vô khuẩn nên cần phải tiệt khuẩn sản phẩm. Hai phương pháp tiệt khuẩn phổ biến đối với thuốc tiêm hiện nay là tiệt khuẩn sản phẩm sau khi đóng lọ (đối với sản phẩm chịu được nhiệt độ, áp suất) và lọc tiệt khuẩn kết hợp pha chế trong môi trường vô khuẩn (cấp độ A/ B). Việc tiến hành lọc tiệt khuẩn qua màng lọc 0,22 μm gặp nhiều khó khăn do dung dịch đậm đặc có độ nhớt lớn nên khó thực hiện ở qui mô phòng thí nghiệm. Vì vậy để đảm bảo việc vô khuẩn cho chế phẩm cần thực

hiện tiết khuẩn cho từng công đoạn với qui trình cụ thể như sau: PTX và dung dịch acid citric lọc qua màng lọc kích thước 0,22 μm ; Kolliphor ELP, lọ, nút hấp tiệt trùng ở 121 °C/ 15 phút; quá trình pha chế tiến hành trong khu vực vô trùng, cấp sạch A/B. Khi nâng cấp lô 50 lọ trong một lô pha chế, kết quả về mặt cảm quan, pH, độ vô trùng, nội độc tố và hàm lượng PTX đạt yêu cầu dược điển [59] [60]. Như vậy chất lượng dung dịch đậm đặc tương ứng với thuốc đối chứng phù hợp đưa vào thử nghiệm tiền lâm sàng trên động vật thí nghiệm. Dung dịch đậm đặc được điều chế thành công với thành phần tương tự thuốc đối chứng.

4.1.3. Nghiên cứu bào chế dạng bột đông khô

4.1.3.1. Khảo sát thành phần công thức

Do PTX khó tan trong nước, để đảm bảo độ tan, HP- β -CyD được dùng để tạo phức bao với PTX cải thiện khả năng tan trong nước. Qua thăm dò khảo sát, tỉ lệ HP- β -CyD phù hợp được sử dụng để tạo phức với PTX là 0,4%. Đây cũng là giới hạn cao nhất của HP- β -CyD trong thuốc tiêm tuy nhiên dung dịch sau khi pha loãng chỉ ổn định tối đa trong vòng 1 giờ do đó cần phối hợp thêm chất ổn định giúp dung dịch bền vững ít nhất 24 giờ. Nhiều polymer được dùng để tạo ổn định cho phức bao trong đó PVP K30 thường được sử dụng. Kết quả khi sử dụng PVP K30 thì độ bền của phức được duy trì. Điều này phù hợp với giả thuyết cho rằng các polymer tan trong nước tạo thành một dạng phức bậc 4 với phức hợp thuốc - cyclodextrin làm tăng độ ổn định biểu kiến của phức hợp thuốc-cyclodextrin. Sử dụng thêm PEG 400 phối hợp với tween 80 với tỷ lệ thích hợp cho giúp tăng độ tan PTX trong dung dịch đậm đặc và đảm bảo sự ổn định sau khi pha loãng trong dịch truyền đến ít nhất 24 giờ. Kết quả nghiên cứu cho thấy các công thức chỉ sử dụng một loại chất trợ tan PEG 400 hoặc tween 80 đều thể hiện dung dịch sau khi pha loãng kém bền (tối đa đến 24 giờ xuất hiện vẩn đục trong khi thuốc đối chứng lên đến 72 giờ), chứng tỏ cần có sự phối hợp của cả 2 chất trợ tan này.

Thực hiện đông khô trên các dung dịch đậm đặc đạt yêu cầu sau khi pha loãng cho thấy khả năng đông rắn của dung dịch khó do lượng tá dược lỏng trong công thức chiếm tỷ lệ cao, do đó các tá dược tạo khối cho bột đông khô như lactose, sorbitol,

glucose, arginin, leucin và manitol được lựa chọn thêm vào dung dịch với vai trò tá dược độn và tạo khối thuốc cho sản phẩm đông khô. Kết quả cho thấy công thức F 20 với tỷ lệ PEG 400 và tween 80 sử dụng lần lượt là 5% và 6% và manitol (một tá dược dùng phổ biến cho tạo khối dung dịch đông khô) cho khả năng tạo khối tốt (sản phẩm đông khô có bề mặt khô, mịn, chắc, không rạn nứt).

Việc thay thế dung môi ethanol bằng tertbutanol cho thấy quá trình đông khô cải thiện hơn về thời gian (rút ngắn) và tính chất khối bột đông khô vẫn đạt yêu cầu đề ra, đặc biệt là khả năng tải hoạt chất gấp 1,5 lần.

4.1.3.2. Quy trình điều chế bột đông khô pha tiêm truyền

Kết quả thử nghiệm sơ bộ trên 3 lô của mỗi công thức ứng với thời gian tiền đông thay đổi lần lượt là 12, 24, 48 giờ cho thấy lô 3 với thời gian tiền đông dài (48 giờ) dung dịch thuốc được đông rắn hoàn toàn hơn, cho sản phẩm đông khô đồng đều và tốt hơn hai mẻ còn lại; hình thức khối thuốc mịn, ít rạn nứt và rắn chắc hơn. Dung dịch sau khi pha loãng ổn định đến ít nhất 12 giờ.

- Đông khô hai lô ứng với thời gian tiền đông là 48 giờ, giai đoạn làm khô với áp suất lần lượt là 0,0394 mbar – 0,0108 mbar (quy trình A) và 0,0108 mbar – 0,0026 mbar (quy trình B). Quy trình đông khô với áp suất thấp - quy trình B cho chất lượng khối thuốc khô, rắn chắc và mịn hơn so với quy trình A, thời gian duy trì độ trong của dung dịch sau khi hòa tan lại cũng dài hơn. Lựa chọn quy trình đông khô B với thời gian đông lạnh 48 giờ, áp suất giai đoạn làm khô sơ cấp và thứ cấp là 0,0108 mbar và 0,0026 mbar để tiến hành thực nghiệm khảo sát tối ưu tá dược.

- Pha chế 3 lô công thức F20 và tiến hành đông khô theo quy trình trên để khảo sát tính ổn định của quy trình. Sản phẩm đạt các chỉ tiêu về mặt cảm quan, hàm lượng tương tự chế phẩm đối chứng. Nâng cấp số lượng 50 lọ trong một lô pha chế, tiến hành trên 3 lô kết quả về mặt cảm quan, hàm lượng PTX và tạp đạt yêu cầu theo chỉ tiêu Dược điển, chuyên luận riêng thuốc tiêm PTX [59] [60]. Như vậy chất lượng bột đông khô tương ứng với thuốc đối chứng phù hợp đưa vào thử nghiệm tiền lâm sàng trên động vật thí nghiệm. Công thức và quy trình bào chế bột đông khô pha tiêm truyền là sản phẩm nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam về mặt bào chế. Quy trình điều chế cho

thấy có sự ổn định, có triển vọng áp dụng vào thực tiễn.

4.2. TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG VÀ ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA CHẾ PHẨM PHA TIÊM CHỨA PTX

4.2.1 Tiêu chuẩn chất lượng

USP hiện hành (USP 42) đã có tiêu chuẩn của dung dịch đậm đặc pha tiêm truyền chứa PTX. Đối với chế phẩm bột đông khô pha tiêm PTX là dạng bào chế mới, chưa có công bố nên chưa có chuyên luận riêng trong các Dược điển, kể cả USP và BP hiện hành do vậy tiêu chuẩn cơ sở của sản phẩm bột đông khô chứa PTX được xây dựng theo hướng dẫn của các phụ lục 1.19 - Thuốc tiêm, thuốc tiêm truyền của ĐĐVN V và USP 42.

Các chỉ tiêu của tiêu chuẩn cơ sở đều đặc trưng cho chất lượng của chế phẩm, bao gồm: tính chất cảm quan, độ đồng đều khối lượng/độ đồng đều thể tích, giới hạn pH, độ vô khuẩn, nội độc tố vi khuẩn, độ trong, dung dịch hợp thành, hàm lượng nước, định tính, tạp chất và hàm lượng PTX.

Các yêu cầu chất lượng của từng chỉ tiêu được xây dựng tham khảo theo USP 42. Riêng chỉ tiêu hàm lượng nước được thực hiện bằng phương pháp Karl-Fisher, kết quả hàm lượng nước chính xác hơn phương pháp khối lượng. Đây cũng là một trong các điểm mới của luận án.

Các chỉ tiêu của bột đông khô pha tiêm PTX được thẩm định bởi Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh. Với kết quả này, luận án có thể đóng góp thêm chuyên luận mới cho Dược điển Việt Nam, chuyên luận thuốc bột đông khô pha tiêm PTX.

4.2.2. Độ ổn định

- Thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm dung dịch đậm đặc được bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc ($40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / 75\% \pm 5\% \text{ RH}$) và điều kiện dài hạn ($30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / 75\% \pm 5\% \text{ RH}$). Thử nghiệm độ ổn định của chế phẩm đông khô được bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C} / 60\% \pm 5\% \text{ RH}$) và điều kiện dài hạn ($5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$). Quá trình thử nghiệm độ ổn định nhằm khảo sát chất lượng của chế phẩm bào chế và đảm bảo độ ổn định của lô chế phẩm với một số chỉ tiêu chính trong suốt quá

trình nghiên cứu trên động vật thí nghiệm, không nhằm mục đích tính hạn dùng, do vậy thời gian nghiên cứu độ ổn định rút ngắn hơn so với quy định khảo sát độ ổn định để tính toán hạn dùng.

- Trong điều kiện bảo quản dài hạn, hàm lượng PTX của lô chế phẩm dung dịch đậm đặc và của lô chế phẩm đông khô vẫn ở mức hàm lượng yêu cầu từ 90 - 110 %. Như vậy lô chế phẩm bào chế đưa vào thử nghiệm trên động vật thí nghiệm nếu bảo quản trong lọ kín, nhiệt độ $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối $75\% \pm 5\%$ RH áp dụng với dung dịch đậm đặc pha tiêm; nhiệt độ $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ áp dụng với bột đông khô sẽ đảm bảo ổn định chất lượng chế phẩm thử trong suốt thời gian nghiên cứu 24 tháng

4.3. NGHIÊN CỨU THÔNG SỐ DƯỢC ĐỘNG HỌC VÀ ĐÁNH GIÁ PHÂN BỐ SINH HỌC TRONG MỘT SỐ MÔ CỦA HAI DẠNG BÀO CHẾ SO VỚI THUỐC ĐỐI CHỨNG

4.3.1. Đánh giá độc tính cấp của hai dạng bào chế

- Thuốc ~~PTX~~ đối chứng Anzatax[®] có LD₅₀ (29,84 – 38,56 mg/ kg) so với chế phẩm dạng dung dịch đậm đặc khoảng tin cậy ở ngưỡng p = 0,05 là tương tự nhau (29,83 – 37,67 mg/ kg). Thuốc bột đông khô có LD₅₀ trong khoảng 35,72 – 45,75 mg/ kg cao hơn với thuốc đối chứng là 29,83 – 37,67 mg/ kg ở ngưỡng p = 0,05; kết quả gợi ý dạng bột đông khô ít độc hơn so với thuốc dạng dung dịch. Như vậy, việc không sử dụng tá dược Kolliphor ELP (có độc tính) góp phần làm giảm độc tính của sản phẩm trên thử nghiệm động vật.

- Từ giá trị LD₅₀ của thuốc đối chứng, dung dịch đậm đặc, bột đông khô và LD₅₀ được Paramveer S. (2010) báo cáo [49], đề tài chọn liều tiêm dùng trong thử nghiệm khảo sát sự phân bố của PTX trên chuột nhắt của dung dịch đậm đặc là 6 mg/ kg - 12 mg/ kg - 24 mg/ kg; từ đó ngoại suy liều thử nghiệm trên thỏ của dung dịch đậm đặc và bột đông khô là 3 mg/ kg - 6 mg/ kg dựa trên hệ số chuyển đổi liều giữa chuột nhắt và thỏ là 4.

PTX được pha trong NaCl 0,9% thành dung dịch có nồng độ 1 mg/ mL để tăng thể tích tiêm, giảm độc tính trên động vật thí nghiệm cũng như giúp thao tác tính thể tích tiêm thuận lợi. Nồng độ dung dịch trung gian này phù hợp với báo cáo của [Lian FH](#).

(2018³) [37], Liu Xiangrui (2012) [40], Wang Ying (2011) [63].

Kết quả không có động vật thử nghiệm nào bị chết cùng với tín hiệu trên sắc đồ phân tích bằng HPLC cho thấy liều tiêm trên tỏ thích hợp cho khảo sát sự phân bố của PTX là 6 mg/ kg; phù hợp với các báo cáo trước đây về liều tiêm khoảng 5 mg/ kg [40], 7 mg/ kg [24] và 8 mg/ kg [37]. Đối với liều tiêm trên chuột nhất, kết quả cho thấy liều thích hợp là 12 mg/kg, tương tự như các báo cáo về liều trong khoảng 5 - 15 mg/kg [36], [62], 20 mg/ kg [61] và 30 mg/ kg [24].

Như vậy, giá trị LD₅₀ thu được giúp gợi ý về khả năng giảm độc tính của sản phẩm bằng cách thay đổi công thức bào chế và định hướng liều thích hợp cho các thử nghiệm khảo sát sự phân bố của PTX.

4.3.2. Phân bố PTX trong huyết tương động vật thí nghiệm

4.3.2.1. Chiết mẫu

Quy trình chiết lỏng-lỏng (LLE) được sử dụng chiết tách PTX từ huyết tương thỏ vì cũng là quy trình chiết đã và đang áp dụng phổ biến nghiên cứu nồng độ thuốc trong huyết tương người trong các nghiên cứu tương đương sinh học tại Việt Nam. Các nghiên cứu công bố về nghiên cứu nồng độ PTX trong huyết tương của động vật cũng đều sử dụng quy trình chiết lỏng - lỏng [26] [38] [54], [65], [66]. Chiết pha rắn (SPE) cho hiệu năng tốt, công suất lớn hơn và có thể tự động hoá tuy nhiên nhược điểm là thời gian tiến hành lâu, khó thực hiện khi lượng mẫu nhỏ và số lượng nhiều mẫu (huyết tương) như trong đề cương nghiên cứu. Trong quá trình nghiên cứu, hiệu suất chiết từ huyết tương thỏ của IS (CAR) trong khoảng 86,21 % - 98,63 % và AS (PTX) trong khoảng 77,93 % - 98,35 %; Hiệu suất chiết từ huyết tương chuột của AS (97,66 - 117,36 %) và IS (98,18 - 101,15 %) đạt so với yêu cầu chung FDA [19] nên phương pháp chiết lỏng - lỏng phù hợp với đối tượng mẫu là huyết tương thỏ và chuột thử nghiệm.

4.3.2.2. Thử nghiệm trên thỏ

Thẩm định quy trình

Đề tài xây dựng quy trình định lượng PTX trong huyết tương thỏ bằng HPLC dựa theo nghiên cứu của Rajender G. [54] và hướng dẫn của FDA [16] [17]. Guo W.

(2005) [23], Fu-Heng và cộng sự (2015) [26] báo cáo có thể áp dụng phương pháp LC/ MS; tuy nhiên thiết bị này chưa được trang bị phổ biến trong các phòng thí nghiệm Việt Nam nên đề tài định hướng áp dụng phương pháp HPLC đầu dò PDA. Theo hướng dẫn của FDA (2018) [19], một phương pháp phân tích sinh học cần thẩm định tính đặc hiệu, độ chính xác trong ngày (độ lặp lại) và liên ngày (độ chính xác trung gian), độ đúng, giới hạn định lượng (LLOQ), đường chuẩn và khoảng tuyến tính, độ phục hồi và ổn định ngắn hạn, dài hạn, sau các chu kỳ rã đông. Đề tài đã triển khai thẩm định tất cả các thông số này trên động vật thử nghiệm giúp cung cấp cơ sở khoa học một cách hệ thống về phương pháp phân tích PTX trong nghiên cứu trên động vật thử nghiệm.

Trong các nghiên cứu thử nghiệm chế phẩm chứa PTX trên động vật đã công bố của Fujita H. và cộng sự (1994) không công bố chuẩn nội [24], [25]; Rajender G. (2009) sử dụng carbamazepin [54], Guo W. (2005), Fu-Heng và cộng sự (2015) Wang Y. (2011) sử dụng docetaxel [23] [26] [62]; Usha K.W. và cộng sự (2013) công bố chuẩn nội α -naphthoflavon [61], Liang Taigang Y. (2012) công bố chuẩn nội osthole [38]. Nghiên cứu đã lựa chọn chuẩn nội carbamazepin vì là chất đối chiếu hóa học sẵn có, giá thành rẻ và kết quả trong quá trình thẩm định cho thấy việc sử dụng chất chuẩn nội carbamazepin đảm bảo độ đúng và tính chính xác cho quy trình định lượng PTX trong dịch sinh học.

So với những báo cáo về quy trình phân tích PTX trong huyết tương thỏ đã được công bố còn hạn chế, quy trình thẩm định phương pháp xác định nồng độ PTX trong dịch chiết từ huyết tương thỏ đạt các thông số theo yêu cầu chung dành cho huyết tương người của FDA (2018) [19] nên có thể áp dụng để xác định nồng độ PTX trong dịch chiết.

Mẫu với nồng độ 25 μg PTX/ mL (MOQ) có độ ổn định ngắn hạn trong autosampler và trong điều kiện phòng với tỷ lệ hồi phục từ 98,07 % - 100,06 %. Độ ổn định của chuẩn gốc (500 μg PTX/ mL) đạt yêu cầu về tỷ lệ hồi phục trong điều kiện bảo quản -20 °C trong 30 ngày. Mẫu huyết tương thỏ ổn định nồng độ PTX sau 3 chu kỳ đông rồi rã đông ở -80 °C trong 60 ngày với tỷ lệ hồi phục 98,66 %. Áp dụng bảo quản

mẫu chuẩn gốc PTX ở điều kiện -20 °C trong 30 ngày và mẫu huyết tương có PTX ở điều kiện -80 °C trong 60 ngày trong quá trình tiến hành nghiên cứu là phù hợp.

Phân bố PTX trong huyết tương thỏ

Trên thỏ, kết quả cho thấy liều 6 mg/ kg không gây chết và không thể hiện dấu hiệu của độc tính cấp, tín hiệu đáp ứng của PTX trên sắc ký đồ HPLC rõ và ổn định. Do vậy, liều 6 mg /kg được chọn khảo sát sự phân bố PTX trong huyết tương so sánh với thuốc đối chứng Anzatax®.

Nồng độ PTX trong huyết tương thỏ khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai mẫu thử (dung dịch đậm đặc, bột đông khô) so với thuốc đối chứng dẫn đến sự khác biệt về các thông số dược động học, cụ thể như sau:

- So với thuốc đối chứng AUC_{0-6} , $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$ lần lượt là 14,71 $\mu\text{g.giờ/ mL}$; 15,70 $\mu\text{g.giờ/ mL}$; 1,15 giờ, dung dịch đậm đặc có các thông số cao hơn (16,33 $\mu\text{g.giờ/ mL}$; 18,38 $\mu\text{g.giờ/ mL}$; 1,36 giờ) trong khi dạng bột đông khô có các thông số này thấp hơn (5,60 $\mu\text{g.giờ/ mL}$; 5,55 $\mu\text{g.giờ/ mL}$; 0,87 giờ) ở ngưỡng $p = 0,05$. Ở thời điểm 6 giờ, không định lượng được PTX trong huyết tương đối với cả 3 chế phẩm.

- Dung dịch đậm đặc có V_d 0,21 L/ kg tương tự thuốc đối chứng (0,25 L/ kg) và thấp hơn bột đông khô ($V_d = 0,57$ L/ kg), gợi ý khả năng phân bố thuốc vào mô thỏ của bột đông khô tốt hơn. Sự khác biệt này có thể giải thích là do thành phần và tỷ lệ tá dược ở mỗi dạng bào chế đã thay đổi. Dạng dung dịch đậm đặc, tá dược chính là Kolliphor ELP và ethanol khan trong khi ở dạng đông khô, tá dược gồm hỗn hợp hydroxypropyl- β -cyclodextrin, PVP K30, PEG 400, Tween 80 và ethanol khan. Việc không sử dụng Kolliphor EL ở dạng đông khô có thể góp phần làm giảm độc tính của chế phẩm. Kết quả này bước đầu gợi ý có thể nghiên cứu phát triển dạng bột đông khô để ứng dụng trên lâm sàng.

4.3.2.3. Thử nghiệm trên chuột

Thẩm định quy trình

Phương pháp định lượng PTX trong huyết tương chuột nhất bằng HPLC với đầu dò PDA, nội chuẩn CAR tiếp tục được sử dụng trong quá trình thẩm định và đạt yêu cầu

của một quy trình định lượng thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của FDA [19] và tương tự với một số nghiên cứu đã công bố.

Điều kiện bảo quản chuẩn gốc và mẫu thử (với chuẩn gốc ở -20° trong 30 ngày và với mẫu thử ở -80°C trong 60 ngày) đạt theo điều kiện bảo quản của dịch sinh học.

Mẫu phân tích ổn định nồng độ khi bảo quản trong autosampler trong 24 giờ ở 15°C với tỷ lệ phục hồi trung bình 88,62 % (SD = 2,19 %) đảm bảo quá trình phân tích mẫu qua đêm không ảnh hưởng kết quả.

So với các báo cáo trước đây, độ chính xác trong ngày của phương pháp đã xây dựng (0,48 - 3,39 %) tương tự kết quả của He Lian (2013) ($< 9,64\%$) [37], Taigang Liang (2012) (2,91- 8,82 %) [38], Yonglu Wang (2011) (3,3 %) [62] và tốt hơn so với công bố của Xiangrui Liua (2015) (6,65 – 11,9 %) [65]. Ngoài ra, độ chính xác liên ngày thu được (2,96 - 8,21 %) tương tự công bố của Taigang Liang (2012) (4,07 – 11,25 %) [38], Yonglu Wang (2011) (3,7 %) [62] và tốt hơn kết quả của Xiangrui Liua (2015) (8,23 – 9,88 %) [65]. Khoảng tuyến tính của phương pháp có $R^2 = 0,9993$ tương tự công bố Guo W. (2005) ($> 0,99$) [26], Taigang Liang (2012) (0,9991) [38], Yonglu Wang (2011) (0,9992) [62]. Độ đúng tại LLOQ (98,51 %) tương tự với công bố Guo W. (2005) (99,0 %) [26], tốt hơn so với He Lian (2013) (107,96 %) [37] và Xiangrui Liua (2015) (105,0 %) [65]. Hiệu suất chiết AS (97,66 - 117,36 %) và IS (98,18 - 101,15 %) cao hơn so với công bố He Lian (2013) (AS: 88,3 - 90,15% %; IS: 90,31%) [37], của Taigang Liang (2012) (As: 82,07 - 88,63 %; IS $> 80\%$) [38], tương tự của Yonglu Wang (2011) (AS: 97,7 %) [62].

Với kết quả thẩm định quy trình phân tích PTX trong huyết tương chuột nhắt bằng HPLC với đầu dò PDA, nội chuẩn CAR đạt yêu cầu theo hướng dẫn của FDA, quy trình phù hợp ứng dụng để khảo sát sự phân bố PTX trong huyết tương chuột nhắt.

Phân bố PTX trong huyết tương chuột

- Feihu (2013) [20] Fujita (1994) [24] [25] đã báo cáo sự phân bố PTX trong huyết tương chuột cống với ưu điểm lượng mẫu lấy được nhiều. Nghiên cứu này sử dụng chuột nhắt trắng vì tính phổ biến tại các phòng thí nghiệm và đang được nuôi, nhân giống theo quy trình đạt yêu cầu GLP tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp. Hồ Chí Minh.

Từ kết quả khảo sát LD₅₀ cho thấy với liều 24 mg/kg, chuột giảm vận động, phản xạ chậm, với liều 12 mg/kg chuột không có dấu hiệu bất thường, tín hiệu đáp ứng của PTX trên sắc ký đồ rõ và ổn định hơn liều 6 mg/kg; do đó đề tài chọn liều 12 để khảo sát sự phân bố PTX trong huyết tương chuột.

- Đề tài đã thiết lập được đường biểu diễn nồng độ PTX trong huyết tương chuột theo thời gian tại các thời điểm 5 - 10 - 30 - 60 - 120 - 180 - 360 (phút) sau khi tiêm chế phẩm dung dịch đậm đặc và thuốc đối chứng Anzatax[®]. So với khoảng cách giữa các thời điểm lấy mẫu đã được báo cáo trước đây của Ying Wang (2010) (0 - 2 - 4 - 6 - 8 giờ) [63], khoảng cách giữa các thời điểm ban đầu ngắn hơn nên việc tăng số điểm lấy mẫu giúp dự đoán chiều hướng thay đổi nồng độ PTX trong huyết tương và gợi ý thời điểm thuốc phân bố vào mô chính xác hơn.

- Từ kết quả thu được cho thấy nồng độ PTX trong huyết tương tại các thời điểm 5, 10, 15 (phút) không khác biệt giữa 2 mẫu thử; sự khác biệt tại các thời điểm 30, 60, 120, 180 và 360 (phút) về giá trị nồng độ trung bình cũng như các thông số dược động học theo mô hình dược động học tuyến tính giữa dung dịch đậm đặc và thuốc đối chiếu nằm trong khoảng cho phép (80 % - 125 % - chuyển dạng ln). Từ đó, có thể kết luận 2 chế phẩm được xem là tương tự dược động học trên chuột nhất cái khi tiêm tĩnh mạch liều duy nhất. Kết quả cũng cho thấy nồng độ PTX trong huyết tương giảm mạnh từ thời điểm 30 phút; gợi ý khả năng PTX được phân bố vào mô. Từ đó, đề tài chọn thời điểm lấy mẫu mô từ 30 phút sau khi tiêm thuốc trong quy trình khảo sát nồng độ PTX trong mô.

- Khi so sánh dược động học của PTX trên chuột nhắt và trên thỏ của chế phẩm dung dịch đậm đặc tiêm tĩnh mạch nhanh một liều duy nhất, đường đồ thị biểu diễn nồng độ PTX trong huyết tương theo thời gian trong khoảng từ 5 đến 360 phút sau khi tiêm trên chuột liều 12 mg/kg và trên thỏ liều 6 mg/kg tương tự nhau, cụ thể: nồng độ giảm nhanh trong 1 giờ đầu sau khi tiêm, từ 2 giờ trở đi, nồng độ PTX giảm chậm. Quan sát này phù hợp với các báo cáo trước đây của Feihu W. (2013) [20], Li F. (2018) [36], Liu Xiangrui (2009) [40], Yinglu Wang (2011) [63]. Tuy nhiên, tại thời điểm 360 phút sau khi tiêm, đề tài không thể xác định được nồng độ PTX trong huyết

tương chuột [dưới LLOQ (0,1 µg/ mL)] trong khi vẫn xác định nồng độ PTX trong huyết tương thỏ là $1,029 \pm 0,170$ µg/ mL. Kết quả này có thể gợi ý tốc độ thải trừ PTX trên chuột nhanh hơn so với trên thỏ.

- Đề tài tiến hành khảo sát nồng độ PTX trong huyết tương trên cả chuột nhắt và thỏ nhằm cung cấp bổ sung dữ liệu cho các báo cáo về khảo sát nồng độ thuốc trong huyết tương thỏ còn hạn chế, đồng thời cung cấp cơ sở so sánh dược động học của cùng một mẫu thử trên hai loại động vật thử khác nhau.

4.3.3. Phân bố PTX trên mô động vật thí nghiệm

4.3.3.1. Trên mô thỏ

Thẩm định quy trình

- Quy trình phân tích nồng độ PTX trong mô thỏ bằng phương pháp HPLC - PDA được xây dựng dựa trên nghiên cứu của Yumeng Wei (2014) [68] với nội chuẩn carbamazepin và các thông số thẩm định theo yêu cầu của FDA [19].

- Kết quả thẩm định và khảo sát nồng độ PTX phân bố trên mô gan, thận, phổi và buồng trứng của thỏ: Quá trình thẩm định áp dụng yêu cầu về thông số thẩm định đối với phân tích dịch sinh học bao gồm: tính tuyến tính của nồng độ PTX trong các dịch chiết từ mô gan, thận, phổi và buồng trứng. Giới hạn định lượng dưới (LLOQ) cũng được xác định từ đường tuyến tính ở nồng độ 0,1 µg/ mL và độ lệch tại LLOQ trên mẫu mô gan, thận, phổi, buồng trứng đều < 20 %. Độ chính xác trong ngày có RSD % và khác ngày có RSD % ở các nồng độ khảo sát đạt yêu cầu khi so với các nghiên cứu hiện đang áp dụng tại Việt Nam khi thẩm định quy trình định lượng thuốc trong huyết tương người tình nguyện. Như vậy, phương pháp định lượng PTX bằng HPLC với điều kiện sắc ký đã thẩm định khả thi để áp dụng trên thỏ thử nghiệm trong điều kiện phòng thí nghiệm tại Việt Nam.

- Hiệu suất chiết PTX trong khoảng 96,4 - 111,1 (%) với RSD % tương ứng với các mức nồng độ thấp (1 µg/ mL), trung bình (10 µg/ mL), cao (20 µg/mL) là 3,3 %; 4,1 % và 1,0 %. Độ đúng có tỷ lệ hồi phục liên ngày tại 03 mức nồng độ lần lượt trong khoảng 88,1 - 103,0 (%); 94,3 - 105,4 (%) và 98,5 - 99,0 (%). Tại LLOQ có tỷ lệ hồi phục 101,7 %. Như vậy, phương pháp chiết PTX từ dịch sinh học từ mô thỏ có độ

chính xác và tỷ lệ phục hồi cao. Các kết quả này chưa được tìm thấy trong các công bố của các công trình nghiên cứu trước đây.

- Kết quả khảo sát độ ổn định của nồng độ PTX trong mô thận tại mức nồng độ 1,0 $\mu\text{g/g}$ và 20,0 $\mu\text{g/g}$ ở điều kiện ngắn hạn (24 giờ) tỷ lệ phục hồi tương ứng 99,7 % và 99,7 %; ở điều kiện dài hạn (30 ngày) tương ứng 100,4 % và 100,3 %; ở điều kiện đông-rã đông tương ứng 100,8 %; 99,8 %. Phân tích thống kê cho thấy các giá trị trung bình của mỗi nồng độ khác nhau không có ý nghĩa. Khi tiếp tục các giai đoạn thẩm định tiếp theo và khảo sát trên các mô gan, phổi, buồng trứng cũng đạt yêu cầu tương tự với yêu cầu của quy trình thẩm định thuốc trong huyết tương người. Do đó, mẫu mô chứa PTX có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ và ở điều kiện nhiệt độ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 30 ngày và ổn định nồng độ PTX sau 3 chu kỳ đông – rã đông. Điều này đảm bảo quá trình phân tích kéo dài vẫn duy trì độ ổn định nồng độ PTX trong mẫu ở điều kiện bảo quản dự kiến.

Phân bố PTX trên mô thỏ

- Với liều tiêm 6 mg/kg của cả 2 mẫu thử (dung dịch đậm đặc và thuốc đối chiếu) nồng độ PTX tập trung ở mô gan cao nhất, buồng trứng thấp nhất, các mô thận, phổi có mức phân bố tương tự nhau. Từ thời điểm 8 giờ, nồng độ PTX trong các mô không thể phát hiện tín hiệu khi phân tích trên sắc đồ.

- Trong khoảng thời gian từ 0,5 giờ đến 4 giờ, nồng độ PTX trong tất cả các mô khảo sát của dạng dung dịch đậm đặc cao hơn so với thuốc đối chứng. Ngoài ra, tỷ số $\text{AUC}_{0,5-8\text{h}}$ chế phẩm thử/ $\text{AUC}_{0,5-8\text{h}}$ thuốc đối chứng ở các mô gan, thận, phổi, buồng trứng và tổng các mô lần lượt là 2,28; 2,62; 1,71; 0,89 và 2,01. Các kết quả này gợi ý dạng dung dịch đậm đặc có khả năng phân bố vào mô cao hơn so với thuốc đối chứng khoảng 2 lần.

4.3.3.2 .Trên mô chuột

Thẩm định quy trình

- Kết quả thẩm định và khảo sát nồng độ PTX phân bố trên mô gan, thận và phổi. Sau khi mô được đồng nhất hóa, tiếp tục sử dụng phương pháp chiết lỏng - lỏng để được

dịch chiết sinh học đưa vào phân tích. Quá trình thẩm định áp dụng yêu cầu về thông số thẩm định đối với một quy trình phân tích dược chất trong dịch sinh học.

- Quy trình HPLC đầu dò PDA để xác định nồng độ PTX trong mô chuột được xây dựng dựa trên các nghiên cứu của Feihu Wang [20], Guo W. [26], Rezazadeh M. [65] với nội chuẩn diazepam và các thông số thẩm định theo yêu cầu của FDA (2018) [19]. Nội chuẩn carbamazepin không áp dụng được với nghiên cứu định lượng PTX phân bố trên mô chuột dù đã áp dụng khả thi trong qui trình định lượng nồng độ PTX trong huyết tương thỏ, mô thỏ, huyết tương chuột do trong quá trình khảo sát, tín hiệu trên sắc ký đồ của nội chuẩn CAR không tách được khỏi các tín hiệu nhiễu đường nền và pic PTX. Nội chuẩn diazepam cũng là một chuẩn đối chiếu sẵn có và giá thành không đắt như các nội chuẩn khác (Doxetaxel) [37].

- Quá trình thẩm định tham khảo từ quy trình định lượng thuốc trong huyết tương người tình nguyện [19] bao gồm: Xác định giới hạn định lượng dưới (LLOQ) từ đường tuyến tính và độ lệch tại LLOQ ($0,1 \mu\text{g}/\text{mL}$) trên mẫu mô gan, thận, phổi (đều $< 20\%$) tương tự báo cáo của Guo W. [26], Rezazadeh M. [65]; Hiệu suất chiết PTX với giá trị RSD từ $87,8 - 99,1\%$ tương ứng với các mức nồng độ thấp ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$), trung bình ($5 \mu\text{g}/\text{mL}$), cao ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) chưa thấy có trong các công bố trước đây; độ đúng có tỷ lệ hồi phục liên ngày tại 03 mức nồng độ ($95,0 - 108,2\%$) và tại LLOQ ($99,9\%$) tương tự báo cáo của Guo W. ($96,4 - 107,0\%$ và $98,9 - 103,0\%$) [26]; độ chính xác ở các nồng độ khảo sát trong ngày ($1,7 - 6,8\%$) và khác ngày ($3,5\%$) tương tự báo cáo của Guo W. ($6,8 - 12,5\%$ và $8,7 - 14,0\%$) [26]; đạt yêu cầu thẩm định đối với một phương pháp phân tích dược chất trong dịch sinh học. Các thông số thẩm định đã tham khảo từ các báo cáo của Guo W. [26], Rezazadeh M. [65] cũng khảo sát thông số tương tự trên động vật thí nghiệm tuy nhiên công bố không đầy đủ.

- Kết quả phân tích thống kê độ ổn định của nồng độ PTX khảo sát trong mô thận ở điều kiện ngắn hạn là 24 giờ; điều kiện dài hạn là 30 ngày; ở điều kiện đông - rã đông. Kết quả thống kê cho thấy các giá trị trung bình của mỗi nồng độ khác nhau không có ý nghĩa. Do đó, mẫu mô chuột chứa PTX có thể bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, ở nhiệt độ $- 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ trong 30 ngày và ổn định sau 3 chu kì đông - rã đông.

Phân bố PTX trên mô chuột

- Đề tài không dùng giá trị RSD % để biểu thị mức độ đồng đều của nồng độ thuốc trong mô giữa các chuột thử nghiệm tại một thời điểm, vì độ biến thiên lớn ở các thời điểm cuối. Thông số SD (%) được sử dụng trong các nghiên cứu lâm sàng nên cũng được áp dụng trong nghiên cứu. Kết quả SD ở thời điểm 0,5 giờ tương ứng với mô gan (3,25), thận (2,56), phổi (0,75) cho thấy gan là mô có dải biến thiên rộng nhất có thể là do sự chuyển hóa thuốc ở gan thay đổi đáng kể giữa cá thể riêng lẻ.

- Đối với cả 2 mẫu thử, tại thời điểm 0,5 giờ nồng độ PTX ở các mô khảo sát là cao nhất, từ 2 – 4 giờ nồng độ PTX trong mô giảm nhanh. Giá trị AUC_{0-8h} cả 2 chế phẩm ở gan là cao nhất (thuốc đối chứng: 131,9 $\mu\text{g.h/g}$; dung dịch đậm đặc: 155,62 $\mu\text{g.h/g}$) tiếp sau đó là thận (49,05 $\mu\text{g.h/g}$ và 50,12 $\mu\text{g.h/g}$) và thấp nhất là phổi (31,65 $\mu\text{g.h/g}$ và 35,46 $\mu\text{g.h/g}$). Điều này cho thấy mức độ PTX phân bố vào các mô lần lượt gan > thận > phổi. AUC_{0-8h} chế phẩm thử ở gan và phổi cao hơn thuốc đối chứng có ý nghĩa. Như vậy, chế phẩm thử nghiệm có khả năng phân bố vào 2 mô gan, phổi tốt hơn thuốc đối chứng với độ tin cậy 95 %. AUC_{0-8h} ở thận của chế phẩm thử và thuốc đối chứng không khác nhau có ý nghĩa, dẫn đến khả năng phân bố ở thận của chế phẩm thử và thuốc đối chiếu tương tự nhau.

ĐIỂM MỚI CỦA ĐỀ TÀI

Nghiên cứu bào chế bột đông khô pha tiêm chứa PTX trong điều kiện thí nghiệm có độ ổn định dài hạn ở điều kiện bảo quản 2 - 8 °C. Hàm lượng PTX ổn định ở các lô thử nghiệm. Tiêu chuẩn chất lượng của bột đông khô đã được thẩm định và đạt các thông số yêu cầu của 01 tiêu chuẩn chất lượng theo dược điển. Như vậy dạng bột đông khô đạt yêu cầu chất lượng của chế phẩm bột pha tiêm chứa PTX. Nếu tiếp tục nâng cỡ lô, đánh giá độ ổn định dài hạn và dự đoán hạn dùng phù hợp, tiêu chuẩn có thể đề xuất ban hành chuyên luận dược điển.

Nghiên cứu đánh giá phân bố sinh học của thuốc tiêm chứa PTX bào chế trong phòng thí nghiệm và so sánh với thuốc đối chứng là chế phẩm dạng dung dịch đậm đặc. Sản phẩm là các dịch chiết từ huyết tương và mô động vật thí nghiệm được đánh giá theo yêu cầu thẩm định quy trình phân tích của dịch sinh học, kết quả các thông số đạt yêu cầu, quy trình xử lý mẫu ổn định. Áp dụng trên các chế phẩm kết quả ban đầu cho thấy có sự khác biệt về nồng độ PTX trong huyết tương và phân bố trong một số mô của động vật thí nghiệm giữa chế phẩm bào chế và thuốc đối chứng. Như vậy, quy trình có thể áp dụng trong quá trình nghiên cứu tiền lâm sàng các dạng bào chế mới trước khi đưa vào nghiên cứu lâm sàng.

Trong nghiên cứu đã áp dụng phương pháp chiết lỏng - lỏng và kỹ thuật HPLC là thiết bị phổ biến trong các phòng thí nghiệm tại Việt Nam nên hướng phát triển phương pháp phân tích nồng độ thuốc trong dịch sinh học chiết từ huyết tương và mô động vật thử nghiệm với kỹ thuật này là khả thi trong nghiên cứu tiền lâm sàng.

KẾT LUẬN

Từ những kết quả nghiên cứu, luận án đã hoàn thành các nội dung đặt ra. Các kết quả nghiên cứu đạt được như sau:

1. Xây dựng công thức và quy trình điều chế thuốc tiêm truyền chứa PTX với hai dạng bào chế dung dịch đậm đặc và bột đông khô pha tiêm truyền tương đương chế phẩm đối chiếu Stragen®.

Dung dịch đậm đặc chứa PTX dùng để pha truyền tĩnh mạch được điều chế theo quy trình đạt yêu cầu về độ vô khuẩn và chất gây sốt có thành phần:

Paclitaxel	30 mg
Acid citric	10 mg
Kolliphor ELP và ethanol khan (1:1)	vỡ 5 ml

Thuốc bột đông khô pha truyền tĩnh mạch chứa PTX có thành phần:

Paclitaxel.....	24 mg
Hydroxypropyl – β – Cyclodextrin.....	107 mg
Polyvinyl pyrrolidon K30	533 mg
Polyethylen glycol 400	1,3 ml
Tween 80.....	1,6 ml
Manitol.....	1,97 g

Đã nâng cỡ lô và xác định quy trình bào chế bột đông khô 50 lọ/ lô ; và kết quả nghiên cứu chất lượng trên 03 lô liên tiếp đã chứng tỏ quy trình ổn định.

2. Đã xây dựng được qui trình quy trình định lượng PTX và tạp liên quan trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC và thẩm định đạt yêu cầu theo ICH và đã áp dụng kiểm nghiệm cho cả dạng dung dịch đậm đặc và dạng bột đông khô chứa PTX. Chế phẩm dung dịch đậm đặc pha tiêm truyền chứa PTX đạt tiêu chuẩn USP 42, ổn định sau 24 tháng ở điều kiện bảo quản dài hạn (30 ± 2 °C/ $75 \pm 5\%$ RH). Chế phẩm bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX đạt tiêu chuẩn thuốc bột pha tiêm của Dược điển Việt Nam V, ổn định sau 24 tháng ở điều kiện bảo quản dài hạn (5 ± 3 °C). Tiêu chuẩn chất lượng bột đông khô pha tiêm truyền chứa PTX đã được Viện Kiểm nghiệm Thuốc Tp. Hồ Chí Minh thẩm định.

3. Đã nghiên cứu thông số dược động học và đánh giá phân bố sinh học trong một số mô của hai chế phẩm bào chế chứa PTX so sánh với chế phẩm đối chứng với các kết quả cụ thể sau:

- Đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng PTX trong huyết tương và mô (gan, thận, phổi, buồng trứng) của thỏ và chuột bằng phương pháp HPLC. Các thông số thẩm định đạt yêu cầu của quy trình phân tích thuốc trong dịch sinh học theo EMA và FDA. Áp dụng quy trình định lượng xác định các thông số dược động học và nồng độ PTX trong huyết tương và phân bố trong các mô theo thời gian. Đối với dung dịch đậm đặc, các thông số dược động AUC_{0-6} , $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$ tương tự so với thuốc đối chứng trong khi dạng bột đông khô cho thấy sự khác nhau có ý nghĩa thống kê ở các thông số dược động $AUC_{0-\infty}$, $t_{1/2}$ và ở thời điểm 6 giờ hầu như không còn định lượng được PTX trong huyết tương. Xu hướng thay đổi thông số dược động học có thể dự đoán xu hướng phân bố thuốc vào mô nếu định hướng tác dụng thuốc trên một số cơ quan. Ở nghiên cứu dạng đông khô có thông số V_d tăng hơn so với thuốc đối chứng sẽ dự đoán khả năng phân bố thuốc vào mô sẽ lớn hơn.

- Quy trình khảo sát phân bố thuốc PTX trong mô động vật thí nghiệm là nghiên cứu đầu tiên tại Việt Nam có thể áp dụng phù hợp với các nghiên cứu tiền lâm sàng trong nghiên cứu bào chế thuốc quy mô phòng thí nghiệm tại Việt Nam.

KIẾN NGHỊ

Để hoàn thiện đề tài, cần thực hiện thêm các nội dung sau:

- Nghiên cứu nâng cấp cỡ lô qui mô pilot dạng bào chế đông khô và tối ưu quy mô sản xuất pilot.
- Yêu cầu về chất lượng của các chỉ tiêu trong tiêu chuẩn chất lượng cần được tiếp tục khảo sát trên cỡ lô pilot để xây dựng thành chuyên luận dược điển Việt Nam.
- Đánh giá độ ổn định của dạng đông khô ở điều kiện bảo quản dài hạn và lão hóa cấp tốc theo thời gian quy định và đề xuất hạn dùng.
- Khảo sát dạng phân bố sinh học của dạng đông khô từ quy trình sản xuất pilot trên mô thử và chuột thí nghiệm để có sự đánh giá về phân bố so với thuốc đối chứng cùng dạng bào chế.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN

1. *Nguyễn Thanh Hà, Lê Minh Trí, Lê Nguyễn Nguyệt Minh, Nguyễn Thiện Hải* (2014), Nghiên cứu bào chế thuốc tiêm Paclitaxel dạng dung dịch pha tiêm truyền và dạng bột đông khô, Tạp chí Kiểm nghiệm Thuốc số 3A.
2. *Nguyễn Thanh Hà, Lê Minh Trí, Nguyễn Thiện Hải, Lương Khánh Duy, Lê Nguyễn Nguyệt Minh* (2014), Nghiên cứu cải thiện độ tan của paclitaxel bằng phương pháp tạo phức với hydroxylpropyl- β -cyclodextrin, Tạp chí Y học Tp.HCM tập 18, phụ bản số 2.
3. *Nguyễn Thanh Hà, Lương Khánh Duy, Lê Minh Trí, Nguyễn Thiện Hải, Lê Nguyễn Nguyệt Minh* (2014), Xây dựng phương pháp định lượng paclitaxel trong phức chất với hydroxypropyl- β -cyclodextrin của thuốc tiêm truyền 30 mg/5 ml, Tạp chí Y Học Tp.HCM, tập 18, phụ bản số 2.
4. *Nguyễn Thanh Hà, Lê Minh Trí, Trần Mạnh Hùng, Nguyễn Thiện Hải, Lê Nguyễn Nguyệt Minh, Nguyễn Tuấn Kiệt* (2013), Evaluation of paclitaxel distribution in rabbit tissues from a novel paclitaxel intravenous injection formulation (Đánh giá phân bố của paclitaxel trên mô thỏ của chế phẩm tiêm chứa paclitaxel), Hội nghị Pharma-Indochina VIII.
5. *Nguyễn Thanh Hà, Lê Minh Trí, Nguyễn Thiện Hải, Trần Mạnh Hùng, Lê Nguyễn Nguyệt Minh, Đồng Quỳnh Như* (2013), Investigation of pharmacokinetic parameters of two intravenous injection formulas containing paclitaxel in rabbits (Nghiên cứu thông số dược động học của hai chế phẩm tiêm chứa paclitaxel trên thỏ), Hội nghị Pharma-Indochina VIII.
6. *Nguyễn Thanh Hà, Lê Minh Trí, Trần Mạnh Hùng, Phùng Hoàng Hiếu, Nguyễn Thiện Hải, Nguyễn Minh Phúc* (2016), Sự phân bố của paclitaxel trong chế phẩm tiêm trên mô chuột thử nghiệm, Tạp chí Dược học số 4.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

- [1] Trần Như Nguyễn, Trần Thị Phương Uyên, Trương Công Trị, Đỗ Thị Hồng Tươi (2017), “Xây dựng mô hình ung thư gan trên chuột nhắt bằng tế bào HepG2 và khảo sát tác động kháng ung thư của chế phẩm liposom paclitaxel”, *Tạp chí Dược học*. **57** (499), 82-86.
- [2] Đỗ Thị Hồng Tươi, Lê Xuân Lộc, Lê Minh Huy, và cộng sự (2017), “Khảo sát tác dụng kháng ung thư phổi của thuốc tiêm liposome paclitaxel trên chuột nhắt gây ung thư phổi bằng benzo(a) pyren”, *Tạp chí Y học Tp. Hồ Chí Minh*. **21**.

TIẾNG ANH

- [3] ASEAN (2015), Asean Guidelines for the conduct bioequivalence studies, 1-43.
- [4] Baheti Ankit, Kumar Lokesh, Bansal Arvin K. (2016), “Excipients used in lyophilization of small molecules”, *Journal of Excipients and Food Chemicals*. **1** (1), 1135.
- [5] Babu Bairu, Dundigalla Avinash (2017), “Formulation and in-vitro evaluation of anti cancer formulation using lyophilization technique with cyclodextrin derivative”, *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*. **6** (8), 2534-2551.
- [6] Bermingham S. (2010), “Development of novel extraction and separation methods for the determination of anthracyclines and taxanes simultaneously from biological matrices”, *Dublin City University*
- [7] Brewster ME, Loftsson T. (2007), “Cyclodextrins as pharmaceutical solubilizers”, *Advanced drug delivery reviews*. **59** (7), 645-666.
- [8] British Pharmacopoeia (2014), “Paclitaxel”, 1186.
- [9] Brouwer E., Verweij J., De Bruijn P., Loos WJ, Pillay M., Buijs D., Sparreboom A. (2000), “Measurement of fraction unbound paclitaxel in human plasma”, *Drug metabolism and disposition*. **28** (10), 1141-1145.

- [10] Chen N., Brachmann C., Liu X., Daniel W. Pierce, Dey J., William S. Kerwin, Yan Li, Zhou S., Shihe Hou et al. (2015), "Albumin-bound nanoparticle (nab) paclitaxel exhibits enhanced paclitaxel tissue distribution and tumor penetration", *Cancer chemotherapy and pharmacology*. **76** (4), 699-712.
- [11] Chordiya M., Senthilkumaran K. (2012), "Cyclodextrin in drug delivery: A review", *Research and Reviews: Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 1, 19-29.
- [12] Crosasso P., Ceruti M., Brusa P., Arpicco S., Dosio F., Cartel L. (2000), "Preparation, characterization and properties of sterically stabilized paclitaxel-containing liposomes", *Journal of Controlled Release*. **63** (1-2), 19-30.
- [13] Dordunoo Stephan K., Helen M. Burt (1996), "Solubility and stability of taxol: effects of buffers and cyclodextrins", *International Journal of Pharmaceutics*. **133** (1-2), 191-201.
- [14] European Medicines Agency (1998), "Noted for Guidance on the pre-clinical evaluation of anticancer medicinal products", *Committee for proprietary medicinal products* (CPMP/SWP/997/96).
- [15] European Medicines Agency (2010), Guideline on the investigation of bioequivalence, CPMP/EWP/QWP/1401/98 Rev 1.
- [16] FDA-CDER (2001), "Bioanalytical method validation, Guidance for industry".
- [17] FDA-CDER (2001), "Statistical approaches to establishing bioequivalence, Guidance for industry".
- [18] FDA (2011), "Approved Drugs Therapeutic Equivalence", **31 Edition**.
- [19] FDA (2018), "Bioavailability and bioequivalence requirements", 21 CFR 320.1.
- [20] Feihu W., Dianrui Z., al. e, (2013), "Tissue distribution and pharmacokinetics evaluation of DOMC-FA micelles for intravenous delivery of PTX", *Journal of drug targeting*. **21** (2), 137-145.

- [21] Feng S.-S., Mu L., Win K. Y., Huang G. (2004), "Nanoparticles of biodegradable polymers for clinical administration of paclitaxel", *Current medicinal chemistry*. **11** (4), 413-424.
- [22] Florence A. T. (2010), *An introduction to clinical pharmaceuticals*, Pharmaceutical Press.
- [23] Fu-Heng Yang Q. Z., Qian-Ying Fiang, Sheng-Qi Wang, Bo-Xin Zhao, Ya-Tian Wang, Yun Cai and Guo-Feng Fi (2015), "Bioavailability Enhancement of Paclitaxel via a Novel Oral Drug Delivery System: Paclitaxel-Loaded Glycyrrhizic Acid Micelles", *Molecules*. **20**.
- [24] Fujita H., Okamoto M., Takao A., Mase H., Kojima H. (1994), "Pharmacokinetics of paclitaxel in experimental animals. Part 1. Blood level", *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy*. **21** (5), 653-658.
- [25] Fujita H., Okamoto M., Takao A., Mase H., Kojima H. (1994), "Pharmacokinetics of paclitaxel in experimental animals. Part 2. Tissue distribution", *Gan to kagaku ryoho. Cancer & chemotherapy*. **21** (5), 659-664.
- [26] Guo W., Johnson JL., Khan S., Ahmad A., Ahmad I. (2005), "Paclitaxel quantification in mouse plasma and tissues containing liposome- entrapped paclitaxel by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to a pharmacokinetics study", *Analytical biochemistry*. **336** (2), 213-220.
- [27] Hajare Ashok A., H. N. More (2018), "Design of the Lyophilization Process of a Doxorubicin Formulation Based on Thermal Properties", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **79** (6), 907-913.
- [28] Hashem Montaseria, Fakhreddin Jamali, J.A. Rogers and R.G. Micetich (2005), "The effect of temperature, pH, and different solubilizing agents on stability of taxol", *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*. **1(1)**, 43-51.
- [29] ICH (2003), *Stability Testing of New Drug Substances and Products*, Q1A (R2), ed.

- [30] Jambhekar S., Breen P. (2016), "Cyclodextrins in pharmaceutical formulations II: solubilization, binding constant, and complexation efficiency", *Drug discovery today*. **21** (2), 363-368.
- [31] Kalepu S., Nekkanti V. (2015), "Insoluble drug delivery strategies: review of recent advances and business prospects", *Acta Pharmaceutica Sinica B*. **5** (5), 442-453.
- [32] Kasper J. C., Winter G., Friess W. (2013), "Recent advances and further challenges in lyophilization", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. **85** (2), 162-169.
- [33] Kawabata Y., Wada K., Nakatani M., Yamada S., Onoue S. (2011), "Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: basic approaches and practical applications", *International journal of Pharmaceutics*. **420** (1), 1-10.
- [34] Khadka P, Ro J., Kim H., Kim I., Kim J. T., Kim H., Cho J. M, Yun G., Lee J. (2014), "Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability", *Asian journal of Pharmaceutical Sciences*. **9** (6), 304-316.
- [35] Korey D. J., Schwartz J. B. (1989), "Effects of excipients on the crystallization of pharmaceutical compounds during lyophilization", *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. **43** (2), 80-83.
- [36] Li F., Zhang H., He M., Liao J., Chen N., Li Y., Zhou S., Palmisano M., Yu A., Pai M. P. (2018), "Different nanoformulations alter the tissue distribution of paclitaxel, which aligns with reported distinct efficacy and safety profiles", *Molecular pharmaceutics*. **15**(10), 4505-4516.
- [37] Lian H., Sun J., Zhang T. (2013), "A rapid and sensitive determination of paclitaxel in rat plasma by UPLC-MS/MS method: application to a pharmacokinetic study", *Asian journal of pharmaceutical sciences*. **8** (3), 199-205.
- [38] Liang Taigang Y. W., Du Xue, Ren Luhui, Li Qingshan (2012), "Pharmacokinetics and Tissue Distribution Study of Praeruptorin D from

- Radix Peucedani in Rats by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)”, *International Journal of Molecular Sciences*. **13**, 9129-9141.
- [39] LingZhao Y., Wei Y.M., Xiao-dong Zhong et al. (2009), “PK and tissue distribution of docetaxel in rabbits after i.v. administration of liposomal and injectable formulations”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. **49**, 989-996.
- [40] Liu Xiangrui, Xianme Chen, Jiabei Sun, Shashan Wang (2012), “Pharmacokinetics, tissue distribution and anti-tumour efficacy of paclitaxel delivered by polyvinylpyrrolidone solid dispersion”, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **64** (6), 775-782.
- [41] Loftsson Thorstein (2014), *Drug stability for pharmaceutical scientists*, Academic Press. 1st Edition.
- [42] Madhu S. Surapaneni, Sudip. K. Das and Nandita G. Das (2012), “Designing Paclitaxel Drug Delivery Systems Aimed at Improved Patient Outcomes: Current Status and Challenges”, *International Scholarly Research Network*.
- [43] Mak I. W., Evaniew N., Ghert M. (2014), “Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment”, *American journal of translational research*. **6** (2), 114.
- [44] Miele E., Spinelli G. P., Miele E., Tomao F., Tomao S. (2009), “Albumin-bound formulation of paclitaxel (Abraxane® ABI-007) in the treatment of breast cancer”, *International Journal of Nanomedicine*. **4**, 99-105.
- [45] Nehate C J. S., Saneja A, Khare V, Alam N, Dubey RD, Gupta PN (2014), “Paclitaxel formulations: challenges and novel delivery options”, *Current Drug Delivery*. **11**(6).
- [46] Nikolaeva L., Gulyakin I., Orlova O., Polozkova A., Oborotova N., Sanarova E., Lantsova A., Khlamov V., Bunyatyan N. (2017), “Lyophilization as a Method for Stabilizing Pharmaceuticals”, *Pharmaceutical Chemistry Journal*. **51** (4), 307-311.
- [47] Nireesha G., Divya L., Sowmya C., Venkateshan N., Babu M. N.,

- Lavakumar V. (2013), "Lyophilization/freeze drying-an review", *International journal of novel trends in pharmaceutical sciences*. **3** (4), 87-98.
- [48] Nornoo Adwoa O., Osborne David W., Diana Shu-Lian Chow (2008), "Cremophor-free intravenous microemulsions for paclitaxel: I: Formulation, cytotoxicity and hemolysis", *International journal of pharmaceutics*. **349** (1-2), 108-116.
- [49] Paramveer S., Chanchal K., Mavani P., Asha R., Shrivastava B., Nema R. K. (2010), "Effective alternative methods of LD50 help to save number of experimental animals", *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **2** (6), 450-453.
- [50] Patel S. M., Nail S. L., Pikal M. J., Geidobler R., Winter G., Hawe A., Davagnino J., Gupta S. R. (2017), "Lyophilized drug product cake appearance: what is acceptable?", *Journal of pharmaceutical sciences*. **106** (7), 1706-1721.
- [51] Patil J. S., Kadam D. V., Marapur S. C., Kamalapur M. V. (2010), "Inclusion complex system: A novel technique to improve the solubility and bioavailability of poorly soluble drugs: A review", *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*. **2** (2).
- [52] Penner N., Xu L., Prakash C. (2012), "Radiolabeled absorption, distribution, metabolism, and excretion studies in drug development: why, when, and how?", *Chemical research in toxicology*. **25** (3), 513- 531.
- [53] Priyadarshini K., Keerthi A. U. (2012), "Paclitaxel against cancer: a short review", *Med chem*. **2** (7), 139-141.
- [54] Rajender G., Narayanan N. (2009), "Sensitive and validated HPLC method for determination of paclitaxel in human serum", *Indian Journal of Science and Technology*. **2** (5), 52-54.
- [55] Rasheed A. (2008), "Cyclodextrins as drug carrier molecule: a review", *Scientia Pharmaceutica*. **76** (4), 567-598.
- [56] Stevens P. J., Sekido M., Lee R. J. (2004), "A folate receptor-targeted lipid

- nanoparticle formulation for a lipophilic paclitaxel prodrug”, *Pharmaceutical research*. **21** (12), 2153-2157.
- [57] Surapaneni M. S., Das S. K., Das N. G. (2012), “Designing Paclitaxel drug delivery systems aimed at improved patient outcomes: current status and challenges”, *ISRN pharmacology*. **2012**.
- [58] Tarr B., Sambandan T., Yalkowsky S. (1987), “A new parenteral emulsion for the administration of taxol”, *Pharmaceutical research*. **4** (2), 162-165.
- [59] The United States Pharmacopoeia (USP 35) (2013), “Paclitaxel Injection”.
- [60] The United States Pharmacopoeia (USP 36) (2014), “Paclitaxel Injection”.
- [61] Usha Katragadda W. F., Yingzhe Wang, Quincy Teng, Chalet Tan (2013), “Combined Delivery of Paclitaxel and Tanespimycin via Micellar Nanocarriers: Pharmacokinetics, Efficacy and Metabolomic Analysis”, *PLOS ONE*
- [62] Wang Y., Li X., Wang L., Xu Y., Cheng X., Wei P. (2011), “Formulation and pharmacokinetic evaluation of a paclitaxel nanosuspension for intravenous delivery”, *International journal of nanomedicine*. **6**, 1497-1507.
- [63] Wang Ying, Ke-Chun W., Zhao Bing-Xiang, Zhao Xin, Wang Xin e. a. (2011), “A novel paclitaxel microemulsion containing a reduced amount of Cremophor EL: pharmacokinetics, biodistribution, and in vivo antitumor efficacy and safety”, *BioMed Research International*.
- [64] WHO (2018), Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products, *TRS 1010*.
- [65] Xiangrui Liua J. S., Rezazadeh M., Emami J., Rostami M., Hassanzadeh F., Sadeghi H. et al. (2015), “A rapid and sensitive HPLC method for quantitation of paclitaxel in biological sample using liquid-liquid extraction and UV detection: Application to Pharmacokinetics and Tissues distribution study of paclitaxel liaded targeted polymeric micelles in tumor bearing mice”, *Journal of pharmacy & pharmaceutical science*. **18** (5), 647-660.

- [66] Yan F., Tang S., Fu Q. (2012), "Pharmacokinetics and Biodistribution of Paclitaxel-loaded Microspheres", *Arzneimittelforschung*. 62 (04), 176-180.
- [67] Yang Tao, Fu-De Cui, Min-Koo Choi, Jei-Won Cho., Suk-Jae Chung, Chang-Koo Shim, Dae-Duk Kim (2007), "Enhanced solubility and stability of PEGylated liposomal paclitaxel: *in vitro* and *in vivo* evaluation", *International journal of Pharmaceutics*. **338** (1-2), 317-326.
- [68] Yumeng W., Zengkai X., Ling Z. (2014), "Pharmacokinetic and tissue distribution of paclitaxel in rabbits assayed by LC-UV after intravenous administration of its novel liposomal formulation", *Biomedical Chromatography*. **28**, 204-2012.
- [69] Zhang J., Zhang Z., Yang H., Tan Q., Qin S., Qiu X. (2005), "Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: *in vitro* and *in vivo* studies", *Pharmaceutical research*. **22** (4), 573-583.
- [70] Zhang Y., Huang Y., Li S. (2014), "Polymeric micelles: nanocarriers for cancer-targeted drug delivery", *AAPS PharmSciTech*. **15** (4), 862-871.

DANH MỤC PHỤ LỤC

	Trang
PHỤ LỤC 1.	PL-1
CoA CHUẨN ĐỐI CHIẾU, CHUẨN LÀM VIỆC VÀ NỘI CHUẨN	
PHỤ LỤC 2	PL-6
CoA NGUYÊN LIỆU PACLITAXEL	
PHỤ LỤC 3	PL-7
THUỐC ĐỐI CHỨNG VÀ CHẾ PHẨM THỬ	
PHỤ LỤC 4	PL-9
DUNG DỊCH ĐẬM ĐẶC PHA TIÊM CHỨA PTX	
PHỤ LỤC 5	PL-14
BỘT ĐÔNG KHÔ PHA TIÊM CHỨA PTX	
PHỤ LỤC 6	PL-20
TIÊU CHUẨN CƠ SỞ BỘT ĐÔNG KHÔ CHỨA PTX	
PHỤ LỤC 7	PL-29
KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG PTX TRONG DUNG DỊCH ĐẬM ĐẶC	
PHỤ LỤC 8	PL-26
KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG PTX TRONG CHẾ PHẨM BỘT ĐÔNG KHÔ	
PHỤ LỤC 9	PL-31
KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG TẠP TRONG CHẾ PHẨM CHỨA PTX	
PHỤ LỤC 10	PL-36
KẾT QUẢ ĐỘ ỔN ĐỊNH CHẾ PHẨM	
PHỤ LỤC 11	PL-38
KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM	

PHỤ LỤC 1

CoA CHUẨN ĐỐI CHIẾU, CHUẨN LÀM VIỆC VÀ NỘI CHUẨN

Mã số: DC/P-QA-03/F02



HỘI Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
TP. HỒ CHÍ MINH
200 Củ Bắc - Q.1 - TP.HCM
☎ 38368453 - Fax: 38367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập - Tự Do - Hạnh Phúc





PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số : 0162/VKN-NB2013

Mẫu kiểm nghiệm : Paclitaxel W.S
Nơi sản xuất : Shanghai Jinhe Bio - Technology Co. Ltd. - China
Số lô : ST1007001 **Hạn dùng** : -
Số đăng ký kiểm nghiệm : 32NB0162 **Số đăng ký** : -
Đơn vị gửi mẫu : Phòng Khoa Học & Đào Tạo
Người giao mẫu : Nguyễn Thanh Hà
Người nhận mẫu : Nguyễn Thị Phương Uyên
Ngày giao nhận mẫu : 24/07/2013
Yêu cầu kiểm nghiệm : Đánh giá chuẩn làm việc
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : USP 35
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đựng đóng trong lọ màu nâu dán nhãn tạm. Lượng mẫu gói 50 lọ.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất		Bột mịn màu trắng
Định tính		
HPLC	Paclitaxel	Đúng
Phổ hồng ngoại	Paclitaxel	Đúng
Góc quay cực	- 49,0° đến - 55,0°	Đạt (-52,0°)
Định lượng		
Paclitaxel	97,0 % - 102,0 % C47H51NO14 tính trên chế phẩm khan	Đạt (100,7 %)

KẾT LUẬN: Mẫu thử đạt yêu cầu chất chuẩn làm việc về các chỉ tiêu như trên theo USP 35./-

Ngày 26 tháng 7 năm 2013
Viện Trưởng



Nguyễn Ngọc Vinh

Tr. 1 / 1 - 32NB0162



European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare
European Pharmacopoeia (Ph. Eur.)
7, Allée Kastner CS 30026, F-67081 Strasbourg (France)
Tel. +33 (0)3 88 41 20 35 Fax. + 33 (0)3 88 41 27 71
For any questions: www.edqm.eu (HelpDesk)

Ph. Eur. Reference Standard - LEAFLET

PACLITAXEL CRS batch 2

Intended use

This leaflet supplements the currently valid European Pharmacopoeia monograph(s) and/or general chapter(s) describing the suitable use of this Reference Standard.

Further information about the Reference Standards is available in the on-line catalogue currently at <http://crs.edqm.eu> (such as, batch validity statement and material safety data sheet).

Instruction

For use with monograph paclitaxel (1794) the percentage content of paclitaxel CRS batch 2 is 99.4 % $C_{47}H_{51}NO_{14}$.



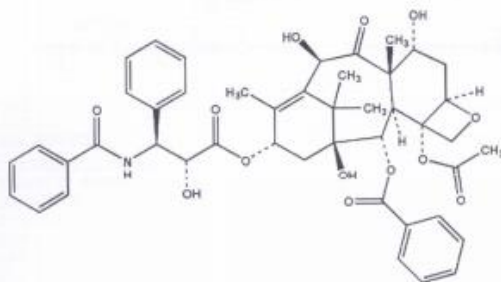
* 0 0 Y 0 0 0 0 6 9 8 0 1 . 0 *



U.S. Pharmacopeia
The Standard of Quality™

USP Certificate

Paclitaxel Related Compound B LOT J0L381



Molecular Formula

C₄₅H₄₉O₁₃N

Molecular Weight

811.87

CAS Number

78454-17-8

LABEL TEXT



REFERENCE STANDARD

PACLITAXEL RELATED COMPOUND B 20mg
(10-deacetyl-7-epipaclitaxel)

WARNING! Suspected of causing cancer and of damaging fertility or the unborn child.

Do not dry. For quantitative applications, use a value of 0.96 mg of paclitaxel related compound B per mg of material on the as is basis. Keep container tightly closed. Material is hygroscopic. Protect from light. Store in a refrigerator.

USP, 12601 Twinbrook Pkwy, Rockville, MD, +1-301-881-0666
CAT. NO. 1491354 Material mfd. in China

For use with specified USP compendial tests.
Not for use as a drug. NCE05 available on
www.usp.org



Alisa Liu

QA Director

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TP HCM

GLP
ISO/IEC 17025
VILAS 108



PHIẾU KẾT QUẢ PHÂN TÍCH
CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU
CARBAMAZEPIN $C_{15}H_{12}ON_2$
SKS QT 192 030415

Mô tả	: Bột kết tinh màu trắng.
Phổ hồng ngoại	: Có các đỉnh đặc trưng giống với phổ chuẩn carbamazepin.
Điểm chảy	: Đạt (191,1 °C)
Giới hạn acid-kiềm	: Đạt
Mất khối lượng do làm khô	: Đạt (0,02 %)
Tạp chất liên quan HPLC	: Đạt
Tro sulfat	: Đạt
Giới hạn clorid	: Đạt
Định lượng	: 99,67 % $C_{15}H_{12}ON_2$ trên chế phẩm nguyên trạng. Xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao nội chuẩn carbamazepin EP lot N ^o 5
Mục đích sử dụng	: Định lượng hoá học và định tính
Độ không đảm bảo đo	: U = 0,099
Mục đích sử dụng	: Định tính và định lượng hoá học
Điều kiện bảo quản	: Dựng trong lọ thủy tinh nâu, nút kín, bảo quản ở 2-8 °C, tránh ánh sáng.

Sau ngày 30.04.2018 mọi yêu cầu, hay những thông tin cần biết về chất đối chiếu (Reference standard) của Viện Kiểm Nghiệm Thuốc liên hệ Khoa Thiết lập chất đối chiếu- Viện Kiểm Nghiệm Thuốc TP HCM, 200 Cơ Bắc Quận 1 T/p HCM

Điện thoại: 84.8.8389600 Fax: 84.8.8367900

Email: hadienly@yahoo.com

Website: <http://www.idqc.hcm.gov.vn>

Hoặc website <http://www.nhutthanh.info>

Đun

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TP HCM



GLP
ISO/IEC 17025
VILAS 108

PHIẾU KẾT QUẢ PHÂN TÍCH
CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU
DIAZEPAM C₁₆H₁₃ClN₂O

SKSQ181 020213

Mô tả	:	Bột kết tinh trắng.
Phổ hồng ngoại	:	Có các đỉnh đặc trưng giống với phổ chuẩn Diazepam.
Độ trong và màu sắc	:	Đạt
Điểm chảy	:	Đạt (132,6 °C)
Tro sulphat	:	Đạt
Mất khối lượng do sấy khô	:	Đạt (0,01%)
Tạp chất liên quan	:	Đạt
Định lượng	:	99,49% C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O tính trên chế phẩm nguyên trạng. Xác định bằng phương pháp chuẩn độ điện thế T90.
Mục đích sử dụng	:	Định tính và định lượng hoá học
Điều kiện bảo quản	:	Đựng trong lọ thủy tinh nâu, nút kín, bảo quản ở 2-8°C, tránh ánh sáng

Sau ngày 28.02.16 mọi yêu cầu, hay những thông tin cần biết về chất đối chiếu (Reference standard) của Viện Kiểm Nghiệm Thuốc liên hệ Khoa Thiết lập chất đối chiếu- Viện Kiểm Nghiệm Thuốc TP HCM, 200 Cô Bắc Quận 1 T/p HCM

Điện thoại: 84.8.8389600 Fax: 84.8.8367900

Email: hadiely@yahoo.com

Website: <http://www.idqc.info>

PHỤ LỤC 2

CoA NGUYÊN LIỆU PACLITAXEL

Certificate of analysis

Product Name	Paclitaxel	Batch Number	20091201
Quantity	1091.245g	Test Standard	National Standard YBH06802009
Manufacturer Date	December, 2009	Expiry Date	December, 2010
Material Number	CP0201M-20091201	Analysis Date	December, 23,2009
Analysis Number	CP0201T-091201	Report Date	January, 01,2010
Test Items	Specifications		Results
Appearance	White crystalline power.		Conforms
Dissolubility	Completely dissolved in methanol, alcohol, or chloroform; slightly dissolved in ether, little dissolved in water.		Conforms
Specific Rotation	-48°~-56°		-54°
Identification	The UV spectrum exhibits the maximum absorption at 227nm		Conforms
	Infrared Absorption: in accordance with the reference Standard spectrum of paclitaxel		Conforms
	The retention time of the major peak in the chromatogram of the Assay preparation corresponds to that in the chromatogram of the Standard preparation, as obtained in the Assay.		Conforms
Color and Clarity	The methanol solution should be clean and achroic.		Conforms
Related Impurities	7-Epipaclitaxel	≤0.5%	0.4%
	10-Deacetyl-7-epi-paclitaxel	≤0.5%	0.09%
	Other single impurity	≤0.1%	Not Detected
	Total impurities	≤1.5%	0.5%
Residual Solvents	Methanol	≤3000ppm	Conforms
	Acetonitrile	≤410ppm	Conforms
	Acetone	≤5000ppm	Conforms
	Dichloromethane	≤800ppm	Conforms
	Chloroform	≤800ppm	Conforms
Weight Loss on Drying	≤1.0%		0.3%
Assay	98.0%~102.0%		99.6%
Conclusion	Conforms to National Standard YBH06802009.		
Analyst:	Sun Min, Hu Xinmei	Checked: Gong Lidong	Approval: Xu Xiaobing

Manufacturer: Jiangsu yew pharmaceutical Co., Ltd.
Address: Hongdou Industrial District, Donggang Town, Wuxi, Jiangsu

PHỤ LỤC 3

HÌNH ẢNH THUỐC ĐỐI CHỨNG VÀ CHẾ PHẨM THỬ



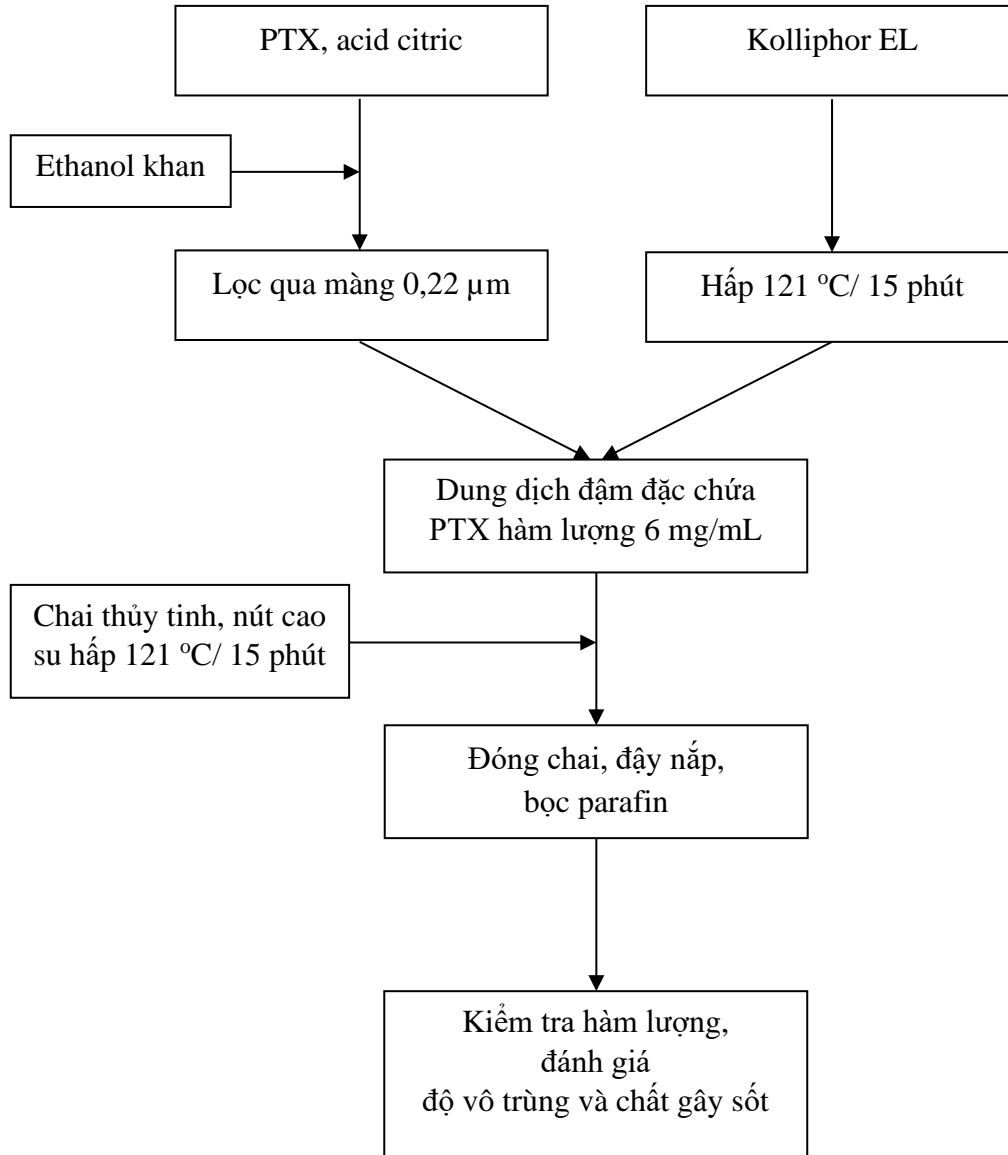
Hình PL 3.1. Thuốc đối chứng Anzatax® và Stragen®



Hình PL 3.2. Chế phẩm dung dịch đậm đặc pha tiêm chứa PTX (6mg/ mL - 5 mL)



Hình PL 3.3. Chế phẩm bột đông khô pha tiêm chứa PTX (24 mg/ lọ)

PHỤ LỤC 4**DUNG DỊCH ĐẬM ĐẶC PHA TIÊM CHỨA PTX****A. SƠ ĐỒ CÁC GIAI ĐOẠN PHA CHẾ****Hình PL 4.1.** Sơ đồ quy trình pha chế

B - MÔ TẢ CÁC CÔNG ĐOẠN SẢN XUẤT

B.1. QUI ĐỊNH CHUNG

- Trong quá trình sản xuất, hồ sơ lô luôn đi cùng với sản phẩm.
- Kiểm tra các nguyên liệu đầu vào để đảm bảo các nguyên liệu này đúng và phù hợp với tên, số lượng, số lô kiểm soát,... vào thời điểm sản xuất.
- Thuốc tiêm vô trùng phải được sản xuất ở khu vực vô trùng với sự kiểm soát đặc biệt và chú ý loại vi sinh vật và sự nhiễm các tiểu phân. Tất cả các nguyên tắc, chỉ dẫn và kỹ thuật vô trùng phải được giám sát ở tất cả các giai đoạn.
- Kiểm tra rằng khu vực sản xuất và tất cả các thiết bị cần thiết được vệ sinh sạch và không còn bất kỳ dấu vết nào từ các sản phẩm trước đó khi chúng được sử dụng.
- Tất cả các thiết bị cần thiết cho sản xuất và thiết bị lọc vô trùng phải được tiệt trùng trong nồi hấp ở nhiệt độ 121°C trong 20 phút.
- Phải mặc đúng trang bị bảo hộ lao động, vệ sinh sạch sẽ trước khi vào phòng vô trùng.

B.2. QUI TRÌNH SẢN XUẤT

1. Các bước chuẩn bị trước quá trình sản xuất

1. Kiểm tra và phân loại tất cả các nguyên vật liệu đóng gói theo yêu cầu để bảo đảm sự chính xác, phù hợp về tên, số lượng, số lô kiểm soát, màu sắc, nội dung, hình thức...
2. Kiểm tra và bảo đảm phòng đóng ở tình trạng vô trùng.
3. Tiệt trùng bơm đóng, kim đóng, dây silicon dẫn dịch thuốc của máy đóng lọ và đầu nút cao su, dụng cụ cân, ... trong nồi hấp ở 121°C trong 20 phút trước khi dùng.
4. Kiểm tra khu vực pha chế, đóng thuốc, đóng gói và tất cả các thiết bị gồm bộ phận đóng thuốc và đầu nút cao su, máy đóng lọ, máy xiết nắp nhôm, máy in phun, máy dán nhãn, máy gấp đơn được vệ sinh sạch và không còn bất kỳ dấu vết nào của sản phẩm trước đó.
5. Hộp carton, nhãn và bao bì đóng gói trong phải được kiểm tra, phân loại và để trong các thùng giấy cứng có dán nhãn với ghi chú về số lượng.
6. Sản phẩm phải được dán nhãn ở tất cả các công đoạn đóng thuốc và đóng gói.

2. Xử lý bao bì đóng gói sơ cấp

2.1. Xử lý lọ thủy tinh

- Lọ thủy tinh được rửa bằng máy rửa siêu âm JCXP III và tiệt trùng qua hầm sấy HSTRUCK ở nhiệt độ 350°C trong 45 phút.
- Lọ sau khi ra khỏi hầm sấy được để nguội và chuyển sang máy đóng lọ. Lọ vô trùng chỉ được sử dụng trong vòng 24 giờ sau khi sấy.

2.2. Xử lý nút cao su

- Nút cao su được rửa 3 lần với nước cất và đem hấp tiệt trùng bằng máy hấp nút cao su 2 cửa XG1.DWS.0,24B ở 121°C trong 20 phút, thời gian làm khô 45 phút.
- Để nguội rồi chuyển vào phòng đóng vô trùng. Các nút cao su vô trùng chỉ sử dụng trong vòng 24 giờ sau khi sấy.

2.3. Xử lý nắp nhôm

- Cho nắp nhôm vào dung dịch Natri laurylsulphat 0,1%, khuấy đảo trong 1 phút. Rửa lại bằng nước máy 4 lần, nước tinh khiết 2 lần và tráng lại 2 lần bằng nước

cát.

- Đem sấy khô ở 80°C trong 4 giờ bằng tủ sấy nắp nhôm CD03.
- Để nguội và chuyển vào phòng xiết nắp nhôm.

3. Pha chế

3.1. Cân nguyên liệu

- Các nguyên liệu đều phải có phiếu kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn.
- Cân các nguyên liệu theo công thức ở phần P.3.1. Để riêng từng loại, ghi nhãn.

3.2. Pha chế

- Cho lượng cremophor RH 40 đã cân vào bình pha chế Pharmatec. Gia nhiệt lên nhiệt độ khoảng 60°C (cremophor sẽ chảy lỏng).
- Bật cánh khuấy, cho từ từ lượng paclitaxel đã cân vào bình pha chế. Khuấy cho đến khi nguyên liệu tan hoàn toàn.
- Làm mát dung dịch trong bình pha chế xuống nhiệt độ khoảng 30°C.
- Cho từ từ lượng ethanol vào bình pha chế cho tới thể tích yêu cầu. Khuấy tiếp trong 15 phút để dung dịch đồng nhất hoàn toàn.

4. Lọc tiệt trùng

- Cấp khí nén đã lọc vô trùng, áp suất 0,5 - 2,0 bar vào bình pha chế Pharmatec để đẩy dung dịch thuốc chảy qua hệ thống lọc 0,45µm và 0,22µm.
- Kiểm tra bán thành phẩm:
 - + Độ trong, màu sắc: Dung dịch trong suốt, không màu đến màu vàng nhạt, không có vật thể lạ nhìn thấy bằng mắt thường.
 - + pH: 3,0 - 7,0.
 - + Định lượng: Hàm lượng paclitaxel trong chế phẩm phải từ 90,0% - 110,0% so với hàm lượng ghi trên nhãn.
- Bán thành phẩm đạt tiêu chuẩn được đem đóng lọ.

5. Đóng lọ - đậy nút cao su - xiết nắp nhôm

- Vận hành máy đóng lọ Auto AMPACK theo SOP T1QTVH016. Quá trình đóng dịch và đậy nút cao su được thực hiện dưới LAF vô trùng của máy đóng lọ.
- Kiểm tra thể tích thuốc đóng vào lọ khoảng 60 phút một lần và ghi lại vào bản theo dõi thể tích đóng.
Thể tích đóng theo tiêu chuẩn: 5,0 ml/lọ (giới hạn 5,0 – 5,5 ml/lọ).
- Kiểm tra độ trong của dung dịch thuốc đóng trong lọ khoảng 60 phút một lần và ghi lại vào bản kiểm soát trong quá trình.
- Các lọ sau khi được đóng dịch thuốc và đậy nút cao su được chuyển vào các khay và chuyển qua tủ chuyển sang phòng xiết nắp nhôm để xiết nắp.

6. Soi

- Soi kiểm tra thuốc bằng máy V90 – AVSB/60 LR.
- Vận hành máy soi theo SOP T1QTVH007.
- Loại bỏ lọ không đạt yêu cầu: Lọ có vật thể lạ, lọ xiết nắp hỏng, lọ nút vỡ...
- Thông báo với phòng kiểm nghiệm lấy mẫu kiểm nghiệm toàn bộ các chỉ tiêu theo tiêu chuẩn số: 04Z1 - 042 - 12.

7. Đóng gói

- Tiến hành in nhãn lọ theo yêu cầu in (số lô SX, hạn dùng).

PL-12

- Dán nhãn lên các lọ đã được kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn.
- Kiểm tra tờ hướng dẫn sử dụng, tiến hành gấp đơn.
- Kiểm tra nội dung in trên mỗi hộp carton (ngày sản xuất, số lô SX, hạn dùng).
- Cho 01 lọ thuốc tiêm truyền Radicel 30 đã được dán nhãn kèm 01 tờ hướng dẫn sử dụng thuốc vào 01 hộp carton đã được in đầy đủ nội dung.
- Xếp các hộp thuốc vào thùng carton. Số lượng hộp thuốc phải phù hợp với số lượng ghi trên nhãn thùng. Trên nhãn thùng ghi rõ: tên thuốc, số lượng, số lô SX, ngày SX, hạn dùng, nơi SX, người đóng gói.
- Sau khi đóng thùng xong dán nhãn chờ kiểm nghiệm.
Thông báo với phòng kiểm nghiệm lấy mẫu kiểm nghiệm toàn bộ các chỉ tiêu theo tiêu chuẩn số: 04Z1 - 042 - 12.

8. Nhập kho

- Thành phẩm có phiếu kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn được nhập kho.
- Bảo quản: Nơi khô, dưới 30°C, tránh ánh sáng.



BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
TP. HỒ CHÍ MINH
200 Cô Bắc - Q.1 - TP.HCM
☎ 38368453 - Fax: 38367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập - Tự Do - Hạnh Phúc



VILAS 108

PHIẾU PHÂN TÍCH

(Kết quả được đảm bảo theo mẫu gửi tới kiểm nghiệm)

Số : 0920/VKN-YC2013

Mẫu kiểm nghiệm : Thuốc tiêm NC-PTX (Độ ổn định 25°C)
Nơi sản xuất : Khoa Dược - ĐHY Dược Tp. HCM
Số lô : NC020513 **Hạn dùng** : -
Số đăng ký kiểm nghiệm : 32G0920 **Số đăng ký** : -
Đơn vị gửi mẫu : Khoa Dược - ĐHY Dược TP.HCM
Người giao mẫu : Lê Nguyễn Nguyệt Minh
Người nhận mẫu : Nguyễn Thị Phương Uyên
Ngày giao nhận mẫu : 03/09/2013
Yêu cầu kiểm nghiệm : Định tính, định lượng, tạp chất liên quan, nội độc tố vi khuẩn, độ vô khuẩn
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : USP 35
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đóng trong lọ thủy tinh nút kín, có dán nhãn m. Lượng mẫu gửi 4 lọ (lọ x 5ml).

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất		Dung dịch màu vàng nhạt, trong suốt, hơi nhớt
Định tính <i>HPLC</i>	Paclitaxel	Đúng
Tạp chất liên quan <i>Baccatin III</i>	Không quá 0,8 %	Đạt (Không phát hiện; LOD = 0,0125 %)
<i>10-Deacetylpaclitaxel</i>	Không quá 0,8 %	Đạt (Không phát hiện; LOD = 0,0125 %)
<i>10-Deacetyl-7-epipaclitaxel</i>	Không quá 0,5 %	Đạt (Không phát hiện; LOD = 0,0125 %)
<i>7-Epipaclitaxel</i>	Không quá 0,6 %	Đạt (Không phát hiện; LOD = 0,0125 %)
<i>Tổng tạp</i>	Không quá 2,0 %	Đạt (0,006 %)
Định lượng <i>Paclitaxel</i>	90,0 % - 110,0 % C ₄₇ H ₅₁ NO ₁₄ so với hàm lượng ghi trên nhãn	Đạt (99,33 %)
Độ vô khuẩn	Theo USP 35	Đạt
Nội độc tố vi khuẩn	Không quá 0,67 EU/mg	Đạt

Tr. 1 / 2 - 32G0920

Ghi chú:

- Chỉ tiêu thử nghiệm có dấu (*) là chưa đăng ký với VILAS
- Chỉ tiêu thử nghiệm có dấu (**) là được thực hiện bởi nhà thầu phụ
- Mẫu chỉ được lưu 60 ngày kể từ ngày có kết quả kiểm nghiệm

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
----------	----------------	---------

Ngày 23 tháng 07 năm 2011
 Viện Trưởng



(Handwritten signature in blue ink)

Nguyễn Ngọc Vinh

PHỤ LỤC 5

BỘT ĐÔNG KHÔ CHỨA PTX

1. KHẢO SÁT TÁ DƯỢC CỦA CÔNG THỨC ĐÔNG KHÔ

Bảng PL 5.1. Kết quả khảo sát dung môi

Tiêu chí đánh giá	Dung môi khảo sát		
	Ethanol	Tert-butanol	DMSO
Khả năng hòa tan PTX	***	**	***
Độ ổn định của dung dịch phức	* (15 phút)	*** (>120 phút)	*** (>120 phút)
Cảm quan sản phẩm	Mịn, ướt	Mịn, khô	Sôi, không tạo thành khối thuốc
	* <i>Kém</i>	** <i>Bình thường</i>	*** <i>Tốt</i>

(Sự đánh giá mang tính định tính, chỉ sử dụng để tìm ra dung môi tối ưu)

Bảng PL 5.2. Thời gian ổn định của chế phẩm (giờ) ứng với từng nồng độ HP- β -CyD và PVP K30

HP- β -CyD	PVP K30			
	0,5%	1,0%	1,5%	2,0%
0,1%	0,5	1,5	3	5
0,2%	2	5	8	10
0,3%	5	8	12	18
0,4%	12	17	24	> 24

Bảng PL 5.3. Khảo sát mối liên quan giữa nồng độ HP- β -CyD và lượng nước đối với độ bền của dung dịch phức

Độ bền	0,1%	0,1%	0,4%	0,4%
	10 mg/125 μ L	10 mg/2000 μ L	40 mg/500 μ L	40 mg/2000 μ L
Sau 30 phút	+	+	+	+
Sau 60 phút	+	-	+	+
Sau 120 phút	+	-	+	-

+ *Dung dịch bền* - *Dung dịch tủa đục*

Bảng PL 5.4. Khảo sát tá dược tạo khối độ

Tiêu chí đánh giá	Tá dược khảo sát							Dạng phối hợp
	Mannitol	Lactose	Sorbitol	Glucose	Glycin	Leucin	Arginin	
Khả năng tan trong nước	*	**	-2	***	**	-3	**	**
Cảm quan sản phẩm	***	-1	-2	**	**	-3	**	-4

(-1): Dung dịch phức bị sôi và tan chảy, không tạo được cấu trúc dạng khối sau khi đông khô.

(-2): Sorbitol sử dụng ở dạng lỏng, khi thêm vào dung dịch phức thì dung dịch tách lớp, không phân tán vào nhau, đặc biệt dung dịch phức không đông đặc được ở -80°C .

(-3): Leucin có sức căng bề mặt lớn, không tan được trong nước nên không thích hợp sử dụng trong trường hợp này.

(-4): Dạng phối hợp cho chất lượng cảm quan trung bình. Ví dụ: Khi kết hợp mannitol và lactose, khối thuốc có cảm quan tốt hơn khi dùng lactose nhưng kém hơn khi dùng mannitol. Các kết hợp khác cũng cho kết quả tương tự.

Bảng PL 5.5. Khảo sát hàm lượng manitol sử dụng và lượng nước hòa tan

Tiêu chí đánh giá	0,75g/ 3,5 mL	0,75 g/ 5 mL	0,5 g/ 2,3 mL	0,5 g/ 3,3 mL	0,25 g/ 1,2 mL	0,25 g/ 1,7 mL
Cảm quan khối thuốc	***	***	**	**	*	*
Độ ổn định của dung dịch sau khi hoàn nguyên	+++	-	+++	--	++	--

*** : Khối thuốc mịn, không nứt

** : Khối thuốc tương đối mịn, bắt đầu xuất hiện vết nứt đặc biệt ở đáy.

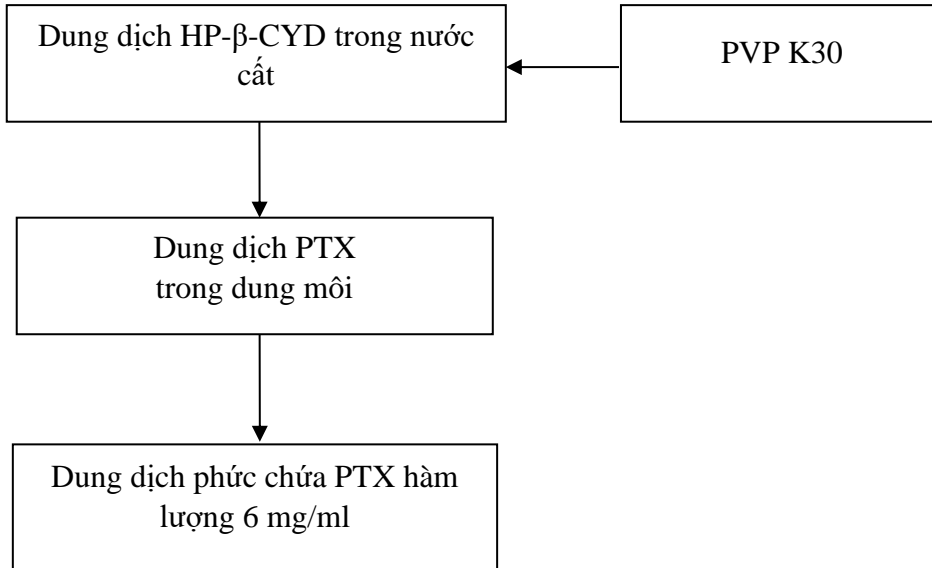
* : Khối thuốc xuất hiện nhiều vết nứt ở bề mặt và đáy.

+++ Dung dịch bền trong 24 giờ. ++ Dung dịch bền trong 6 giờ.

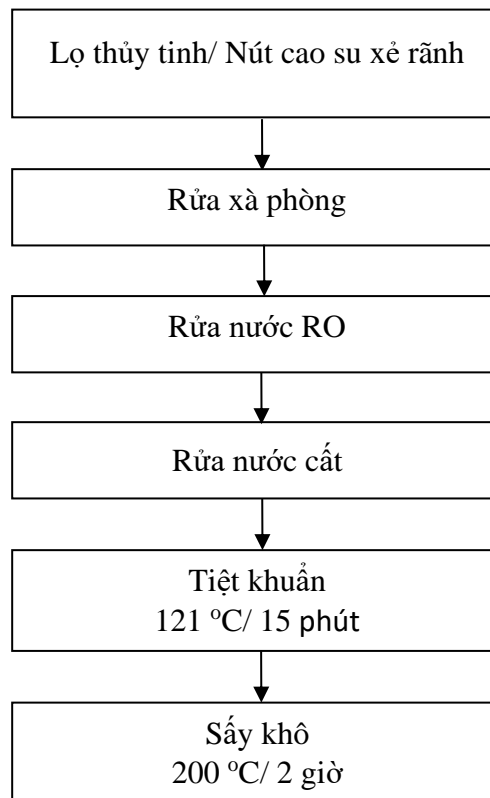
- Dung dịch tủa lại trong 2 giờ. -- Dung dịch tủa lại trong 30 phút.

2. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ

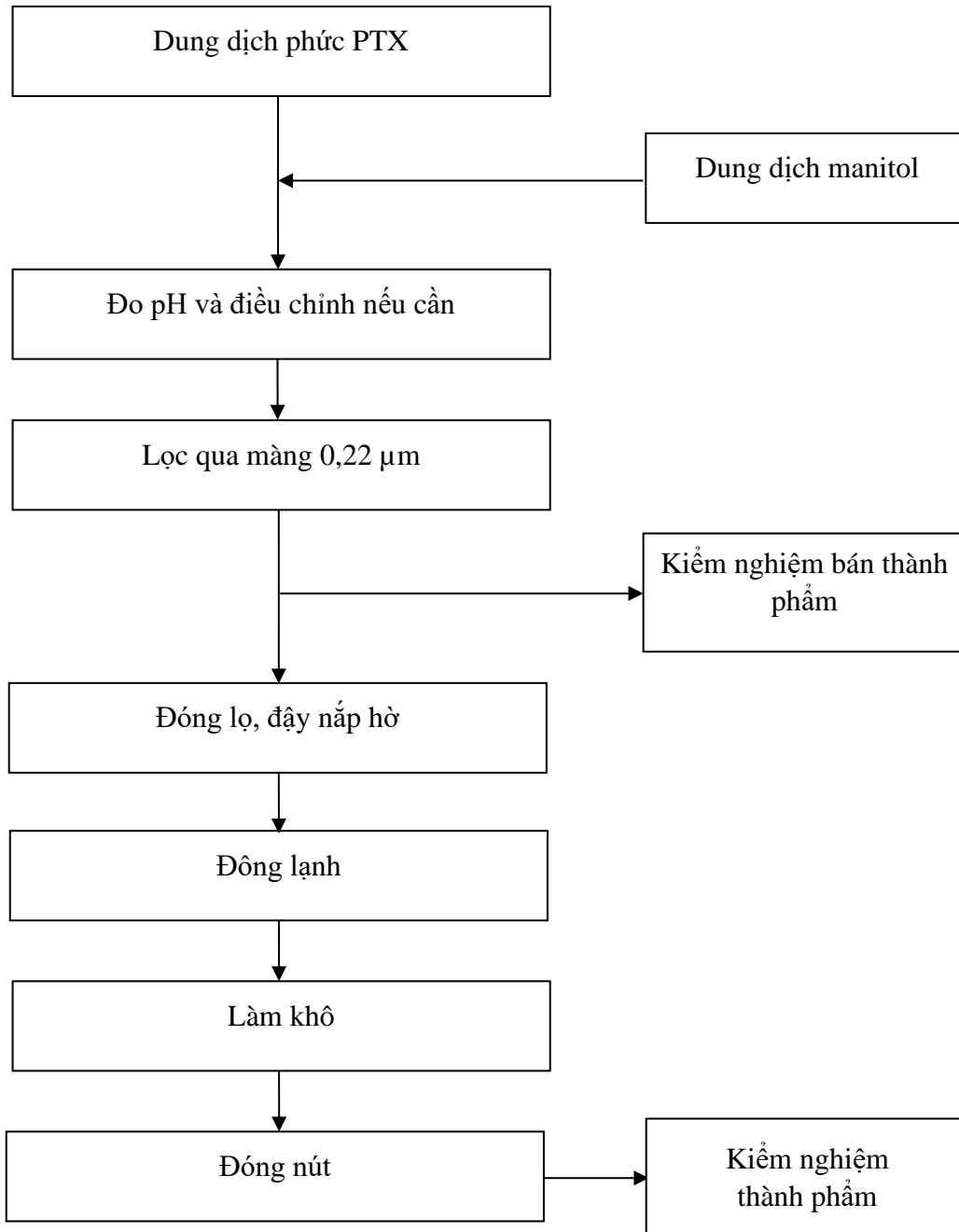
A. SƠ ĐỒ CÁC GIAI ĐOẠN



Hình PL 5.1. Sơ đồ phối hợp PVP 30 tạo hỗn hợp phức



Hình PL 5.2. Sơ đồ quy trình xử lý nút và bao bì



Hình PL 5.3. Sơ đồ quy trình bào chế bột đông khô

B - MÔ TẢ CÁC CÔNG ĐOẠN SẢN XUẤT

B.1. QUI ĐỊNH CHUNG

- Trong quá trình sản xuất, hồ sơ lô luôn đi cùng với sản phẩm.
- Kiểm tra các nguyên liệu đầu vào để đảm bảo các nguyên liệu này đúng và phù hợp với tên, số lượng, số lô kiểm soát,... vào thời điểm sản xuất.
- Thuốc tiêm vô trùng phải được sản xuất ở khu vực vô trùng với sự kiểm soát đặc biệt và chú ý loại vi sinh vật và sự nhiễm các tiểu phân. Tất cả các nguyên tắc, chỉ dẫn và kỹ thuật vô trùng phải được giám sát ở tất cả các giai đoạn.
- Kiểm tra rằng khu vực sản xuất và tất cả các thiết bị cần thiết được vệ sinh sạch và không còn bất kỳ dấu vết nào từ các sản phẩm trước đó khi chúng được sử dụng.
- Tất cả các thiết bị cần thiết cho sản xuất và thiết bị lọc vô trùng phải được tiệt trùng trong nồi hấp ở nhiệt độ 121⁰C trong 20 phút.
- Phải mặc đúng trang bị bảo hộ lao động, vệ sinh sạch sẽ trước khi vào phòng vô trùng.

B.2. QUI TRÌNH SẢN XUẤT

1. Các bước chuẩn bị trước quá trình sản xuất

1. Kiểm tra và phân loại tất cả các nguyên vật liệu đóng gói theo yêu cầu để bảo đảm sự chính xác, phù hợp về tên, số lượng, số lô kiểm soát, màu sắc, nội dung, hình thức...
2. Kiểm tra và bảo đảm phòng đóng ở tình trạng vô trùng.
3. Tiệt trùng bơm đóng, kim đóng, dây silicon dẫn dịch thuốc của máy đóng lọ và đậy nút cao su, dụng cụ cân, ... trong nồi hấp ở 121⁰C trong 20 phút trước khi dùng.
4. Kiểm tra khu vực pha chế, đóng thuốc, đóng gói và tất cả các thiết bị gồm bộ phận đóng thuốc và đậy nút cao su, máy đóng lọ, máy xiết nắp nhôm, máy in phun, máy dán nhãn, máy gấp đơn được vệ sinh sạch và không còn bất kỳ dấu vết nào của sản phẩm trước đó.
5. Hộp carton, nhãn và bao bì đóng gói trong phải được kiểm tra, phân loại và để trong các thùng giấy cứng có dán nhãn với ghi chú về số lượng.
6. Sản phẩm phải được dán nhãn ở tất cả các công đoạn đóng thuốc và đóng gói.

2. Xử lý bao bì đóng gói sơ cấp

2.1. Xử lý lọ thủy tinh

- Lọ thủy tinh được rửa bằng máy rửa siêu âm JCXP III và tiệt trùng qua hầm sấy HSTRUCK ở nhiệt độ 350⁰C trong 45 phút.
- Lọ sau khi ra khỏi hầm sấy được để nguội và chuyển sang máy đóng lọ. Lọ vô trùng chỉ được sử dụng trong vòng 24 giờ sau khi sấy.

2.2. Xử lý nút cao su

- Nút cao su được rửa 3 lần với nước cất và đem hấp tiệt trùng bằng máy hấp nút cao su 2 cửa XG1.DWS.0,24B ở 121⁰C trong 20 phút, thời gian làm khô 45 phút.
- Để nguội rồi chuyển vào phòng đóng vô trùng. Các nút cao su vô trùng chỉ sử dụng trong vòng 24 giờ sau khi sấy.

2.3. Xử lý nắp nhôm

- Cho nắp nhôm vào dung dịch Natri laurylsulphat 0,1%, khuấy đảo trong 1 phút. Rửa lại bằng nước máy 4 lần, nước tinh khiết 2 lần và tráng lại 2 lần bằng nước

cát.

- Đem sấy khô ở 80 °C trong 4 giờ trong tủ sấy.

- Để nguội và chuyển vào phòng.

3. Pha chế

3.1. Cân nguyên liệu

- Các nguyên liệu đều phải có phiếu kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn

- Cân các nguyên liệu theo công thức như ở phần 1.

3.2. Pha chế

Trong becher thủy tinh 2 lít đã được tiệt trùng trước, cho vào lượng PTX đã cân, cho tiếp lượng vừa đủ ethanol khan (khoảng 20 ml), khuấy để hòa tan hoàn toàn (1)

Cho hydroxypropyl- β -cyclodextrin vào 300 ml nước cất pha tiêm, khuấy hòa tan, cho tiếp PVP K30 vào, khuấy hòa tan hoàn toàn (2).

Cho (1) vào (2), khuấy mạnh để tạo dung dịch phức PTX.

Cho mannitol đã cân vào 400 ml nước cất, hòa tan. Cho tiếp dung dịch này vào dung dịch trên, khuấy đều.

4. Lọc tiệt trùng

Lọc qua màng lọc 0,22 μ m.

Kiểm tra bán thành phẩm

- Độ trong và màu sắc: dung dịch trong suốt, có màu vàng nhạt, không có vật thể lạ nhìn bằng mắt thường.

- pH : từ 3,0 đến 7,0

- Định lượng: hàm lượng PTX trong chế phẩm phải từ 90,0% đến 110% so với hàm lượng ghi trên nhãn.

Đem bán thành phẩm chiết vào lọ, mỗi lọ khoảng 16-18 ml

5. Đông khô theo quy trình sau

Các thông số kỹ thuật của quy trình đông khô khảo sát

Giai đoạn	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	Áp suất (mbar)
Giai đoạn tiền đông	-80 °C	12, 24, 48	1000
Làm khô sơ cấp	-60 °C	3	0,0394 hay 0,0108
	-55 °C	3	0,0394 hay 0,0108
	-50 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108

PL-20

	-45 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	-40 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	-35 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	-30 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	-25 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	-20 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	-15 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	-10 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	-5 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	0 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	5 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	10 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	15 °C	2:30	0,0394 hay 0,0108
	20 °C	3	0,0394 hay 0,0108
Làm khô thứ cấp	20 °C	3	0,0108 hay 0,0026
	25 °C	3	0,0108 hay 0,0026

6. Đóng lọ - Đậy nút cao su – Xiết nắp nhôm

- Đóng bằng tay và đậy nắp, xiết nắp nhôm bằng máy thủ công.
- Kiểm tra bằng cân, trọng lượng khối thuốc phải từ 1,2-1,45 g.

7. Đóng gói

- Dán nhãn
- Cho vào hộp
- Thông báo cho bộ phận kiểm nghiệm theo TCCS

8. Bảo quản

Khô mát, tránh ánh sáng, nhiệt độ < 10 °C

PL-21
PHỤ LỤC 6

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
TP HỒ CHÍ MINH

ĐÃ THẨM ĐỊNH
Ngày 20 tháng 01 năm 2020

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ BỘT ĐÔNG KHÔ PACLITAXEL

1. YÊU CẦU KỸ THUẬT

1.1. Công thức (cho một lọ)

Paclitaxel	24 mg
Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin	107 mg
Polyvinyl pyrrolidon K30	533 mg
Polyethylen glycol 400	1,3 ml
Tween 80	1,6 ml
Mannitol	1,97 g

1.2. Tiêu chuẩn nguyên phụ liệu

Stt	Nguyên phụ liệu	Đạt tiêu chuẩn
1	Paclitaxel	USP 40
2	Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin	Dược điển châu Âu 7.0
3	Polyvinyl pyrrolidon K30	Dược điển châu Âu 7.0
4	Polyethylen glycol 400	Dược điển châu Âu 7.0
5	Tween 80	Dược điển châu Âu 7.0
6	Mannitol	Dược điển châu Âu 7.0

1.3. Tiêu chuẩn thành phẩm

Stt	Chỉ tiêu	Yêu cầu
1.	Cảm quan	Bột đông khô pha tiêm màu trắng đục trong lọ thủy tinh.
2.	pH	3,0 – 7,0
3.	Hàm lượng nước	Không quá 5,0 %
4.	Độ trong	Không có tiểu phân không tan khi kiểm tra bằng mắt thường.
5.	Giới hạn tiểu phân	Trên 90% số tiểu phân có kích thước nhỏ hơn 15 μ m, không quá 10% số tiểu phân kích thước 15 μ m đến 20 μ m và không có tiểu phân kích thước lớn hơn 20 μ m.

lul

ĐÃ THẨM ĐỊNH

Ngày 20 tháng 01 năm 2020

6.	Định tính	Phải có phản ứng định tính của paclitaxel
7.	Định lượng	90% -110% $C_{47}H_{51}NO_{14}$ hàm lượng trên nhãn.
8.	Đồng đều khối lượng	$\pm 10 \%$ khối lượng trung bình bột thuốc trong lọ
9.	Tạp chất liên quan	- 10-Deacetyl-7-epipaclitaxel $\leq 0,5\%$ - Tạp không xác định $\leq 0,1 \%$ - Tổng tạp $\leq 2,0\%$
10.	Độ vô khuẩn	Phải vô khuẩn
11.	Nội độc tố	$\leq 0,4$ EU/mg paclitaxel

2. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1. Tính chất

Bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

2.2. pH

Cân chính xác khoảng 30 mg paclitaxel vào bình định mức 5 mL, pha loãng vừa đủ với nước, lắc đều. Tiếp tục pha loãng 1/10 dung dịch thu được. Xác định chỉ số pH theo Phụ lục 6.2, ĐĐVN V.

2.3. Hàm lượng nước

Tiến hành với 0,5 g chế phẩm. Phụ lục 10.3, ĐĐVN V.

2.4. Độ trong

Cân chính xác khoảng 30 mg paclitaxel vào bình định mức 5 mL, pha loãng vừa đủ với nước, lắc đều. Không có tiểu phân không tan khi kiểm tra bằng mắt thường (Phụ lục 11.8, mục B, ĐĐVN V).

2.5. Giới hạn tiểu phân: theo Phụ lục 11.8, mục A, ĐĐVN V.

2.6. Định tính

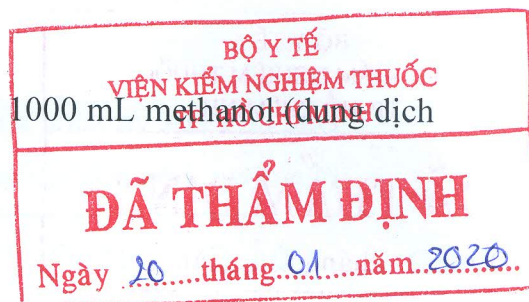
Trong mục định lượng, thời gian lưu của pic chính trong sắc ký đồ của dung dịch thử phải tương ứng với thời gian lưu của pic paclitaxel trong sắc ký đồ của dung dịch chuẩn.

2.7. Định lượng

Điều kiện sắc ký

- Cột sắc kí: PFP (pentafluorophenyl) 150 x 4,6 mm, 5 μ m, nhiệt độ cột 25 °C

luel



- Dung môi hòa tan mẫu: 200 μ l acid acetic băng trong 1000 mL methanol (dung dịch A).
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μ L
- Tốc độ dòng: 1,2 mL/phút
- Đầu dò PDA và bước sóng phát hiện 227 nm
- Pha động: hỗn hợp nước : acetonitrile (50:50), rửa giải đẳng dòng trong 15 phút

Mẫu chuẩn: Hòa tan một lượng chính xác chất chuẩn đối chiếu PTX với dung môi pha mẫu, pha loãng nếu cần để thu được dung dịch có nồng độ PTX khoảng 0,6 mg/mL. Dung dịch sau khi pha được lọc qua màng 0,45 μ m trước khi tiêm vào hệ thống.

Mẫu thử: Chế phẩm được hòa tan thành dung dịch đậm đặc với nước muối sinh lý đến nồng độ PTX khoảng 1,2 mg/mL rồi được pha loãng 2 lần trong dung dịch A đến nồng độ 0,6 mg/mL. Dung dịch sau khi pha được lọc qua màng 0,45 μ m trước khi tiêm vào hệ thống.

Tính phù hợp hệ thống: Tiêm lặp lại 06 lần mẫu chuẩn, RSD của diện tích đỉnh giữa các lần phân tích không quá 1,5 %.

Hàm lượng PTX trong mỗi lọ (%) được tính theo công thức

$$X (\%) = \frac{S_c \times m_c \times C}{S_t \times m_t \times m} \times M \times 100\%$$

Trong đó: S_c diện tích đỉnh PTX trên sắc đồ mẫu chuẩn

S_t diện tích đỉnh PTX trên sắc đồ mẫu thử

m_c khối lượng chuẩn (mg)

m_t khối lượng mẫu (mg)

C: Hàm lượng chuẩn PTX (%)

M: Khối lượng trung bình bột thuốc trong lọ (mg)

m: Lượng PTX trong lọ trên nhãn

2.8. Tạp chất liên quan

Điều kiện sắc ký

- Cột sắc kí: C18, 150 x 4,6 mm x 5 μ m, nhiệt độ cột 25 °C
- Dung môi hòa tan mẫu: Acetonitril.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μ L
- Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút

Handwritten signature

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
TP. HỒ CHÍ MINH

Dầu đo PDA và bước sóng phát hiện 227 nm.

ĐÃ THẨM ĐỊNH

Pha động: hỗn hợp nước - acetonitril, rửa giải theo chương trình sau

Ngày 20 tháng 01 Thời gian 2020
(phút)

	Acetonitril (%)	Nước (%)	Rửa giải
0-26 phút	40	60	Đẳng dòng
26-66 phút	40-85	60-15	Gradient
66-67 phút	85-40	15-60	Gradient
67-70 phút	40	60	Đẳng dòng

Mẫu chuẩn tạp: Hòa tan một lượng chuẩn đối chiếu PTX và 10-deacetyl-7-epipaclitaxel (tạp B) trong acetonitril để thu được dung dịch chuẩn có nồng độ PTX là 1,2 mg/mL và tạp B là 0,006 mg/mL.

Mẫu thử: Chế phẩm được hòa tan hoàn toàn trong nước muối sinh lý đến nồng độ PTX khoảng 1,2 mg/mL.

Tính phù hợp hệ thống: Tiêm lặp lại 06 lần mẫu chuẩn tạp, RSD của diện tích đỉnh giữa các lần phân tích không quá 2,0 %. Hệ số rửa giải giữa pic paclitaxel và tạp B không nhỏ hơn 1,2.

Hàm lượng tạp được tính toán theo công thức:

$$100 \times (C_S/C_U) \times (S_i/S_s)$$

Trong đó: C_S là nồng độ (mg/mL) của tạp chuẩn B trong dung dịch chuẩn;
 C_U là nồng độ (mg/mL) của PTX trong dung dịch thử,
 S_i là diện tích đỉnh của tạp đơn trên sắc đồ mẫu thử,
 S_s là diện tích đỉnh của tạp chuẩn B trên sắc đồ mẫu chuẩn tạp.

2.9. Đồng đều khối lượng

Tiến hành với 20 lọ, theo Phụ lục 11.3, ĐĐVN V, phương pháp 3.

2.10. Độ vô khuẩn

Tiến hành thử theo Phụ lục 13.7, ĐĐVN V, phương pháp màng lọc.

2.11. Nội độc tố

Tiến hành thử theo Phụ lục 13.2, ĐĐVN V.

huc

PL-25

3. ĐÓNG GÓI - BẢO QUẢN

Đóng gói : Trong lọ thủy tinh trắng, dung tích 20 ml, nút kín.


Bảo quản : Nhiệt độ 2 °C - 8 °C

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
TP HỒ CHÍ MINH

ĐÃ THẨM ĐỊNH

Ngày 20 tháng 01 năm 2020

PHÊ DUYỆT


PGS.TS. Lê Minh Trí

BIÊN SOẠN


NGUYỄN THANH HÀ

VIỆN TRƯỞNG

Trần Việt Hùng





BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
200 Cô Bắc – Quận 1 – TP. Hồ Chí Minh
☎ 028. 38368453 – Fax: 028. 38367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc



PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số : 0655/VKN-NB2019

Mẫu kiểm nghiệm : Bột đông khô Paclitaxel pha tiêm
Nơi sản xuất : Khoa Dược, Đại học Y Dược TPHCM
Số lô : NC010615 Hạng dùng : -
Số đăng ký kiểm nghiệm : 38NB0655 Số đăng ký : -
Đơn vị gửi mẫu : Khoa Dược, Đại học Y Dược TPHCM
Người giao mẫu : Lê Minh Trí
Người nhận mẫu : Nguyễn Thị Phương Uyên
Ngày giao nhận mẫu : 21/11/2019
Yêu cầu kiểm nghiệm : Kiểm tra chất lượng
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : TCCS
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đựng trong lọ thủy tinh nút kín, dán nhãn in


Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất	Bột đông khô pha tiêm màu trắng đựng trong lọ thủy tinh	Đạt
pH	3,0 – 7,0	Đạt (4,2)
Định tính HPLC	Paclitaxel	Đúng
Hàm lượng nước	Không quá 5,0 %	Đạt (2,5 %)
Độ trong	Theo TCCS	Đạt
Giới hạn tiểu phân	Theo TCCS	Đạt
Độ đồng đều khối lượng	± 10 % so với KLTB bột thuốc trong lọ	Đạt (P = 2,1202 g)
Định lượng Paclitaxel	90 % - 110 % C ₄₇ H ₅₁ N ₁₄ O ₁₄ so với hàm lượng ghi trên nhãn	Đạt (99 %)
Tạp chất liên quan 10-Deacetyl-7epipaclitaxel	Không quá 0,5 %	Đạt (không phát hiện)
Tạp không xác định	Không quá 0,1 %	Đạt (không phát hiện)
Tổng tạp	Không quá 2,0 %	Đạt (0,3 %)

Ghi chú:

- Không được sao chép một phần phiếu kết quả này khi chưa
có được sự đồng ý của Viện trưởng bằng văn bản.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Nội độc tố vi khuẩn	Không quá 0,4 EU/mg	Đạt
Độ vô khuẩn	Theo TCCS	Đạt

KẾT LUẬN: Mẫu thử đạt yêu cầu chất lượng theo TCCS./-

Ngày 20 tháng 01 năm 2020
Viện Trưởng

Trần Việt Hùng

PHỤ LỤC 7

KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG PTX TRONG CHẾ PHẨM DUNG DỊCH ĐẬM ĐẶC

1. Tính tương thích của hệ thống

Tính tương thích của hệ thống được xác định bằng cách tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn có nồng độ PTX khoảng 0,6 mg/mL

Bảng PL 7.1. Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
1	7,256	14041606	5305,381	1,050
2	7,219	13932144	5294,031	1,051
3	7,177	13925844	5296,873	1,051
4	7,153	13980868	5283,222	1,050
5	7,119	13996019	5281,899	1,052
6	7,060	14012431	5268,858	1,053
TB	7,164	13981485	5288,377	1,051
RSD (%)	0,98	0,32	0,246	0,11

Kết quả thu được cho thấy điều kiện sắc ký phù hợp cho việc phân tích PTX trong chế phẩm (RSD \leq 1,5%).

2. Tính đặc hiệu

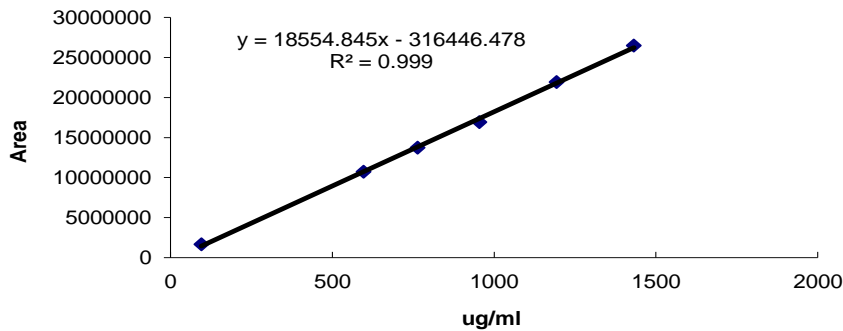
Bảng PL 7.2. Kết quả thời gian lưu của PTX

STT	Thời gian lưu mẫu chuẩn (phút)	Thời gian lưu mẫu thử (phút)
1	7,256	7,294
2	7,219	7,266
3	7,177	7,31
TB	7,217	7,290
RSD (%)	0,548	0,306

3. Tính tuyến tính

Bảng PL 7.3. Khảo sát tính tuyến tính của phương pháp

STT	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic
1	1431,36	26498060
2	1192,80	21938402
3	954,24	16930404
4	763,39	13739005
5	596,40	10731082
6	95,42	1662332



Hình PL 7.1. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic

Khảo sát sự tương quan giữa y (diện tích pic) và x (nồng độ).

$F = 6551,21 > F_{0,05} = 7,71$. Vậy phương trình hồi qui có tính tương thích

$t_0 = 0,385 < t_{0,05} = 2,776$. Vậy hệ số b_0 không có ý nghĩa.

$t_1 = 80,940 > t_{0,05} = 2,776$. Vậy hệ số a có ý nghĩa.

Kết luận: Có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic, phương trình hồi quy: $y = 18554,845x$; $r = 0,999$

4. Độ đúng

Bảng PL 7.4. Kết quả khảo sát độ đúng

Độ đúng	KL placebo (mg)	KL chuẩn (mg)	Nồng độ chuẩn (mg/mL)	Diện tích	Lượng chuẩn tìm thấy (mg/mL)	Tỷ lệ phục hồi (%)
80%	441,4	2,3856	0,4831	8692435	2,4155	101,3
	445,9	2,3856	0,4838	8704677	2,4189	101,4
	442,2	2,3856	0,4834	8697170	2,4168	101,3
100%	443,7	2,9820	0,6063	10909768	3,0317	101,7
	441,9	2,9820	0,6064	10910645	3,0319	101,7
	444,5	2,9820	0,6059	10901303	3,0293	101,6
120%	441,6	5,9640	1,2193	21938282	6,0963	102,2
	443,4	5,9640	1,2120	21808295	6,0602	101,6
	441,8	5,9640	1,2170	21897805	6,0851	102,0
TB						101,6
RSD (%)						0,3

5. Độ chính xác - độ lặp lại

Bảng PL 7.5. Kết quả khảo sát độ lặp lại

Mẫu thử	Diện tích	Nồng độ (mg/mL)	Hàm lượng (%)
1	10903761	0,6060	101,00
2	10904507	0,6060	101,01
3	10865269	0,6039	100,64
4	10872635	0,6043	100,71
5	10884806	0,6049	100,82
6	10889141	0,6052	100,86
TB			100,84
RSD			0,15

PHỤ LỤC 8

KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG PTX TRONG CHẾ PHẨM BỘT ĐÔNG KHÔ

1. Tính tương thích của hệ thống

Tính tương thích của hệ thống được xác định bằng cách tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn có nồng độ paclitaxel khoảng 0,6 mg/mL

Bảng PL 8.1. Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
1	6,416	9919509	5486,527	1,063
2	6,385	9868481	5398,652	1,067
3	6,411	9885694	5378,980	1,066
4	6,412	9889947	5364,867	1,066
5	6,417	9824969	5369,008	1,062
6	6,430	9858809	5330,762	1,068
TB	6,412	9874568	5388,133	1,065
RSD (%)	0,23	0,32	0,98	0,22

Kết quả thu được cho thấy hệ thống trên phù hợp cho việc phân tích PTX trong chế phẩm ($RSD \leq 1,5\%$)

2. Tính đặc hiệu

Bảng PL 8.2. Kết quả thời gian lưu của paclitaxel

STT	Thời gian lưu trong mẫu chuẩn (phút)	Thời gian lưu trong mẫu thử (phút)
1	6,416	6,493
2	6,385	6,398
3	6,411	6,357
TB	6,404	6,416
RSD (%)	0,26	1,28

3. Độ đúng

Bảng PL 8.4. Kết quả khảo sát độ đúng

Độ đúng	KL placebo (mg)	KL chuẩn (mg)	Nồng độ chuẩn (mg/mL)	Diện tích	Lượng chuẩn tìm thấy (mg/mL)	Tỷ lệ phục hồi (%)
80%	923,4	2,3856	0,4831	77690	2,4118	101,1
	922,0	2,3856	0,4838	79863	2,3999	100,6
	922,8	2,3856	0,4834	81645	2,4238	101,6
100%	923,0	2,9820	0,6063	110096	3,0029	100,7
	922,3	2,9820	0,6064	110440	3,0207	101,3
	921,9	2,9820	0,6059	109965	3,0476	102,2
120%	924,0	5,9640	1,2193	129208	5,9819	100,3
	922,9	5,9640	1,2120	128903	6,0296	101,1
	923,6	5,9640	1,2170	129346	6,0415	101,3
TB						101,1
RSD (%)						0,3

4. Độ chính xác - Độ lặp lại

Bảng PL 8.5. Kết quả khảo sát độ lặp lại

Mẫu thử	Diện tích	Nồng độ (mg/mL)	Hàm lượng (%)
1	10336219	0,628	104,68
2	10384513	0,631	105,16
3	10298493	0,626	104,29
4	10184837	0,619	103,14
5	10246580	0,623	103,77
6	10184721	0,619	103,14
TB			104,03
RSD			0,87

PHỤ LỤC 9

**KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG TẠP
TRONG CHẾ PHẨM CHỨA PTX**

I. DẠNG DUNG DỊCH ĐẶM ĐẶC**1. Tính tương thích của hệ thống**

Tính tương thích của hệ thống được xác định bằng cách tiêm lặp lại 6 lần hỗn hợp dung dịch chuẩn có nồng độ PTX là 1,2 mg/ mL và 10-deacetyl-7-epipaclitaxel (10-DAP) là 0,006 mg/ mL trong hỗn hợp dung môi hòa tan.

Bảng PL 9.1. Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống với pic 10-DAP

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
1	28.554	85727	8193.596	0.933
2	28.465	84998	7418.265	0.946
3	28.434	83851	7245.639	0.944
4	28.533	84299	7617.724	0.935
5	28.531	86717	7253.138	0.949
6	28.694	86342	8172.642	0.933
TB	28.535	85322	7650.167	0.940
RSD (%)	0.32 %	1.33 %	5.681	0.76 %

Bảng PL 9.2. Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống với pic paclitaxel

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
1	30.703	24232282	14995.361	0.989
2	30.640	24301217	13693.934	1.001
3	30.617	24368260	13328.738	1.005
4	30.690	24463348	13751.633	1.001
5	30.688	24583983	13222.242	1.009
6	30.814	24604071	14622.464	0.999
TB	30.692	24425527	13935.729	1.001
RSD (%)	0.22 %	0.62 %	5.14 %	0.67 %

Kết quả thu được cho thấy hệ thống phù hợp cho việc phân tích 10-deacetyl-7-epipaclitaxel và các tạp liên quan trong chế phẩm có chứa paclitaxel ($RSD \leq 2\%$)

2. Tính đặc hiệu

- Sử dụng sắc đồ đối chiếu của chuẩn Châu Âu và thời gian lưu tương đối của các tạp liên quan theo chuyên luận riêng Paclitaxel - USP để xác định các tạp tương ứng:

Impurity G = 10-Deacetylpaclitaxel - Thời gian lưu tương đối 0,50

Impurity A = 2-Debenzoypaclitaxel-2-pentenoat - Thời gian lưu tương đối 0,8

Impurity I = 7-acetylpaclitaxel - Thời gian lưu tương đối 1,54

Baccatin - Thời gian lưu tương đối 0,19

Tiêm lần lượt các dung dịch vào hệ thống sắc ký, kết quả:

- Thời gian lưu của 10-DAP trong dung dịch chuẩn là 28,5 phút

- Thời gian lưu của paclitaxel trong dung dịch mẫu chuẩn và thử lần lượt là 30,7 phút và 30,6 phút.

- Mẫu placebo và mẫu trắng (dung môi hòa tan) không cho pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của paclitaxel và 10-deacetyl-7-epipaclitaxel trong dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

- Hệ số rửa giải giữa pic 10-DAP và PTX lớn hơn 1,2.

Bảng PL 9.3. Kết quả thời gian lưu của 10-DAP

STT	Thời gian lưu trong mẫu chuẩn (phút)	Thời gian lưu trong mẫu thử (phút)
1	28.554	-
2	28.465	-
3	28.434	-
4	28.533	-
5	28.531	-
6	28.694	-
TB	28.535	-
RSD	0.32%	

Bảng PL 9.4. Kết quả thời gian lưu của paclitaxel

STT	Thời gian lưu trong mẫu chuẩn (phút)	Thời gian lưu trong mẫu thử (phút)
1	30.703	30.672
2	30.640	30.683
3	30.617	30.512
4	30.690	30.711
5	30.688	30.682
6	30.814	30.592
TB	30.692	30.642
RSD	0.22%	0.25%

Độ lệch thời gian lưu trung bình giữa chuẩn và thử: 0,01 %

Kết luận: Phương pháp có tính đặc hiệu khi áp dụng đối với thành phẩm.

II. BỘT ĐÔNG KHÔ

1. Tính tương thích của hệ thống

Tính tương thích của hệ thống được xác định bằng cách tiêm lặp lại 6 lần hỗn hợp dung dịch chuẩn có nồng độ paclitaxel là 1,2 mg/mL và 10-deacetyl-7-epipaclitaxel là 0,006 mg/mL.

Bảng PL 9.5. Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống với pic 10-DAP

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
1	23,568	50067	6712,245	1,087
2	23,546	51092	6756,923	1,088
3	23,355	49702	6589,268	1,088
4	23,368	51018	6624,972	1,090
5	23,454	50250	6807,425	1,086
6	23,449	51084	6742,209	1,082
TB	23,457	50536	6705,507	1,087
RSD (%)	0,38	1,20	1,24	0,25

Bảng PL 9.6. Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống với pic paclitaxel

STT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
1	25,635	3748321	5296,571	1,348
2	25,582	3750598	5439,891	1,345
3	25,531	3752824	5377,782	1,350
4	25,451	3753990	5452,683	1,345
5	25,387	3746854	5462,575	1,353
6	25,324	3745725	5381,373	1,347
TB	25,485	3749,719	5401,813	1,348
RSD (%)	0,47	0,08	1,17	0,23

Kết quả thu được cho thấy hệ thống trên phù hợp cho việc phân tích paclitaxel và 10-deacetyl-7-epipaclitaxel trong chế phẩm (RSD \leq 2%)

2. Tính đặc hiệu

Tiêm lần lượt các dung dịch trên vào hệ thống sắc ký, kết quả:

Thời gian lưu của 10-DAP trong dung dịch chuẩn là 23,568 phút.

Thời gian lưu của PTX trong dung dịch chuẩn là 25,662 phút và thử là 25,635 phút.

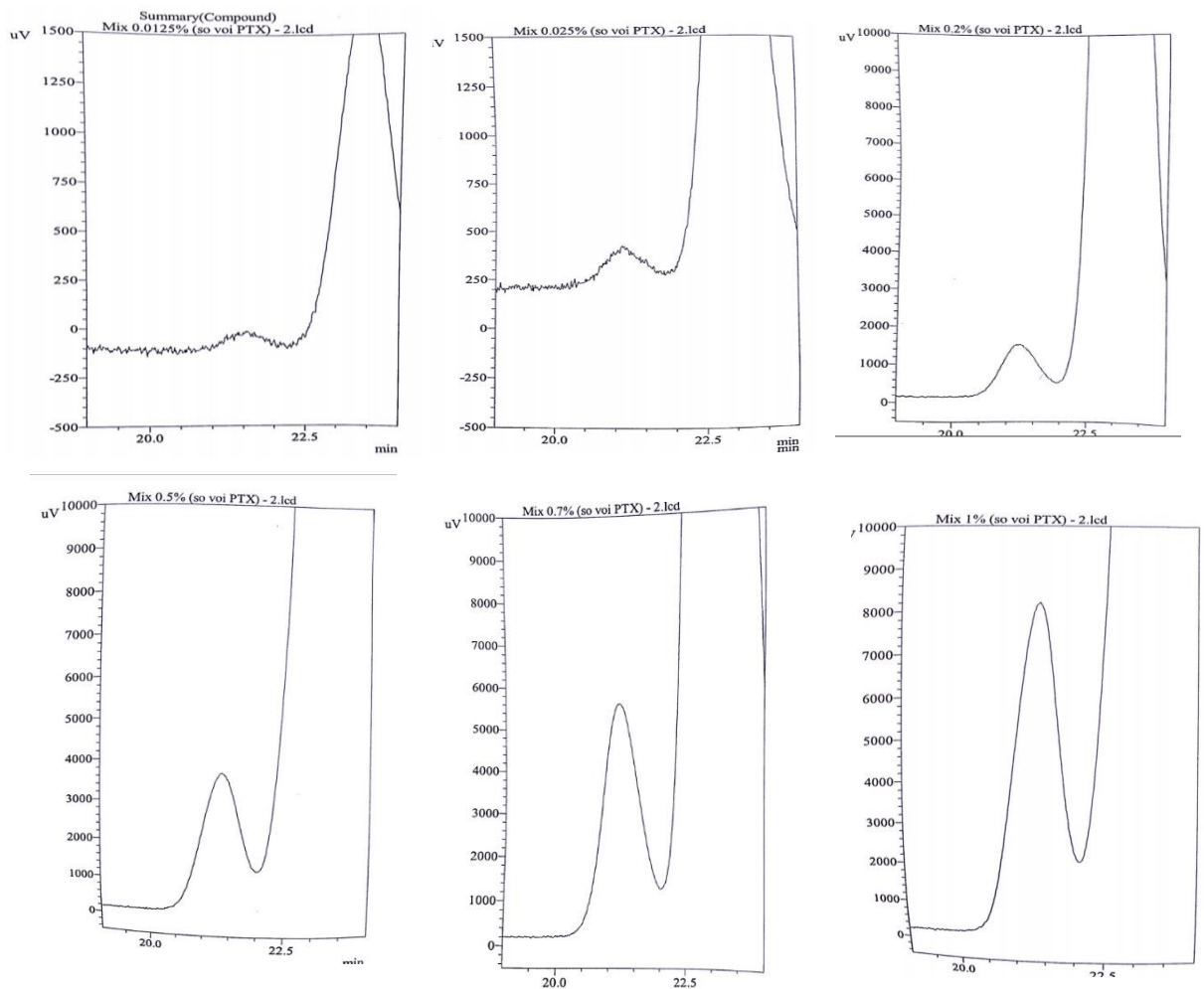
- Mẫu placebo không cho pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của PTX và 10-DAP trong dung dịch chuẩn và dung dịch thử.

3. Độ chính xác

Bảng PL 9.11. Kết quả thẩm định độ chính xác phương pháp định lượng tạp liên quan trong chế phẩm chứa PTX

Lần	Diện tích	Hàm lượng (%)	Xử lý thống kê
Dung dịch đậm đặc			
1	85727	100,12	
2	84998	101,41	
3	83851	101,42	N = 6
4	84299	99,30	X _{tb} = 99,86%
5	86717	99,95	RSD = 1,65%
6	86342	96,98	

Đồng khô			
1	50067	100,13	
2	51092	102,18	N = 6
3	49702	99,40	$X_{tb} = 101,07 \%$
4	51018	102,04	RSD = 1,27%
5	50250	100,50	
6	51084	102,17	



Hình PL9.1. Tín hiệu tạp chuẩn ở các nồng độ pha loãng 0,0125% - 1,0% (so với nồng độ PTX trong mẫu chuẩn - 1,2 mg/ mL)

PHỤ LỤC 10
KẾT QUẢ ĐỘ ỔN ĐỊNH CHẾ PHẨM

Bảng PL 10.1. Kết quả khảo sát độ ổn định của dung dịch đậm đặc chứa PTX

Tháng	Điều kiện thường						Điều kiện lão hóa cấp tốc					
	Lô 1 (NC0105)		Lô 2 (NC0205)		Lô 3 (NC0305)		Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3
PTX (%)	101,0	99,42	101,01	99,56	99,42	100,64	100,71	99,33	100,82	99,49	100,86	99,36
Tạp (%)	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-
pH	3,33	3,33	3,33	3,30	3,30	3,30	3,33	3,40	3,33	3,40	3,33	3,40
Chất gây sốt	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-
Độ vô trùng	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-

Tháng	Điều kiện thường						Điều kiện lão hóa cấp tốc		
	Lô 1		Lô 2		Lô 3		Lô 1	Lô 2	Lô 3
	6	12	6	12	6	12	6	6	6
PTX (%)	100,14	99,04	99,04	99,02	99,15	98,50	96,93	96,68	96,54
Tạp (%)	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
pH	3,35	3,35	3,35	3,35	3,35	3,35	3,95	3,95	3,95
Chất gây sốt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ vô trùng	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

Tháng	Điều kiện thường					
	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	18	24	18	24	18	24
PTX (%)	99,10	98,51	99,04%	98,42	99,02%	98,19
Tạp (%)	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
pH	3,35	3,35	3,35	3,35	3,35	3,35
Chất gây sốt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ vô trùng	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

Bảng PL 10.2. Kết quả khảo sát độ ổn định của bột đông khô pha tiêm chứa PTX

Tháng	Điều kiện thường						Điều kiện lão hóa cấp tốc					
	Lô 1 (NC0106)		Lô 2 (NC0206)		Lô 3 (NC0306)		Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3	0	3
PTX (%)	99,78	99,72	99,68	99,71	99,75	99,58	99,78	98,24	99,68	98,57	99,75	97,89
Tạp (%)	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-
pH	4,05	4,15	4,05	4,15	4,05	4,15	3,33	3,30	3,33	3,30	3,33	3,30
Chất gây sốt	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-
Độ vô trùng	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	-

Tháng	Điều kiện thường						Điều kiện lão hóa cấp tốc					
	Lô 1		Lô 2		Lô 3		Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	6	12	6	12	6	12	6	6	6	6	6	
PTX (%)	99,68	98,18	99,53	98,56	99,62	98,42	96,42		96,87		95,76	
Tạp (%)	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	Đạt		Đạt		Đạt	
pH	4,20	4,30	4,20	4,30	4,20	4,30	4,40		4,40		4,40	
Chất gây sốt	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	Đạt		Đạt		Đạt	
Độ vô trùng	-	Đạt	-	Đạt	-	Đạt	Đạt		Đạt		Đạt	

Tháng	Điều kiện thường					
	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	18	24	18	24	18	24
PTX (%)	96,67	95,15	96,54	94,89	97,25	94,11
Tạp (%)	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
pH	4,40	4,60	4,40	4,60	4,40	4,60
Chất gây sốt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Độ vô trùng	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

PHỤ LỤC 11

THỬ NGHIỆM TRÊN ĐỘNG VẬT THÍ NGHIỆM



BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
TP. HỒ CHÍ MINH
200 Cù Bắc - Q.1 - TP.HCM
☎ 38368453 - Fax: 38367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập - Tự Do - Hạnh Phúc

Mã số: DC/P-QA-03/F03



PHIẾU PHÂN TÍCH

(Kết quả được đảm bảo theo mẫu gửi tới kiểm nghiệm)

Số : 1805/VKN-YC2014

Mẫu kiểm nghiệm : Dung dịch truyền tĩnh mạch ANZATAX 30mg/5ml
Nơi sản xuất : Hospira Australia Pty, Ltd. (Úc)
Số lô : A046840AA **Hạn dùng** : 07/2015
Số đăng ký kiểm nghiệm : 33G1805 **Số đăng ký** : VN-13010-11
Đơn vị gửi mẫu : Khoa Dược - ĐHY Dược TP.HCM
Người giao mẫu : Lê Minh Trí
Người nhận mẫu : Nguyễn Thị Phương Uyên
Ngày giao nhận mẫu : 02/07/2014
Yêu cầu kiểm nghiệm : LD50
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : Phương pháp Behrens
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đóng trong lọ thủy tinh nút kín, có dán nhãn tạm. Lượng mẫu gửi 4 lọ.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất		Chất lỏng trong suốt, hơi ánh vàng
Độc tính cấp		LD50 = 33,75 ± 3,92 mg/kg ở P = 0,05

Ngày 22... tháng 7... năm 2014
Viện Trưởng...

Nguyễn Ngọc Vinh

Tr. 1 / 1 - 33G1805

Ghi chú:

- Chỉ tiêu thử nghiệm có dấu (*) là chưa đăng ký với VILAS
- Chỉ tiêu thử nghiệm có dấu (**) là được thực hiện bởi nhà thầu phụ
- Mẫu chỉ được lưu 60 ngày kể từ ngày có kết quả kiểm nghiệm

Hình PL 11.1. Kết quả LD₅₀ của thuốc đối chứng

Mã số: DC/P-QA-03/F03



BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
 TP. HỒ CHÍ MINH
 290 C4 Hồ - Q.1 - TP.HCM
 ☎ 38268453 - Fax: 38267980

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập - Tự Do - Hạnh Phúc





PHIẾU PHÂN TÍCH
(Kết quả được đảm bảo theo mẫu gửi tới kiểm nghiệm)

Số : 1804/VKN-YC2014

Mẫu kiểm nghiệm	: Dung dịch tiêm Paclitaxel	
Nơi sản xuất	: Bộ môn Hóa Dược - Khoa Dược - ĐHY Dược TP. HCM	
Số lô	: NC 2013	Hạn dùng : -
Số đăng ký kiểm nghiệm	: 33G1804	Số đăng ký : -
Đơn vị gửi mẫu	: Khoa Dược - ĐHY Dược TP.HCM	
Người giao mẫu	: Lê Minh Trí	
Người nhận mẫu	: Nguyễn Thị Phương Uyên	
Ngày giao nhận mẫu	: 02/07/2014	
Yêu cầu kiểm nghiệm	: LD50	
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng	: Phương pháp Behrens	
Tình trạng mẫu khi nhận	: Mẫu đóng trọng lượng thủy tinh nút kín, có dán nhãn tạm. Lượng mẫu gửi 4 lọ.	

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tinh chất		Chất lỏng trong suốt, hơi ánh vàng
Độc tính cấp		LD50 = 28,20 ± 4,36 mg/kg ở P = 0,05

Ngày 22... tháng 07... năm 2014

Viện Trưởng



Nguyễn Ngọc Vinh

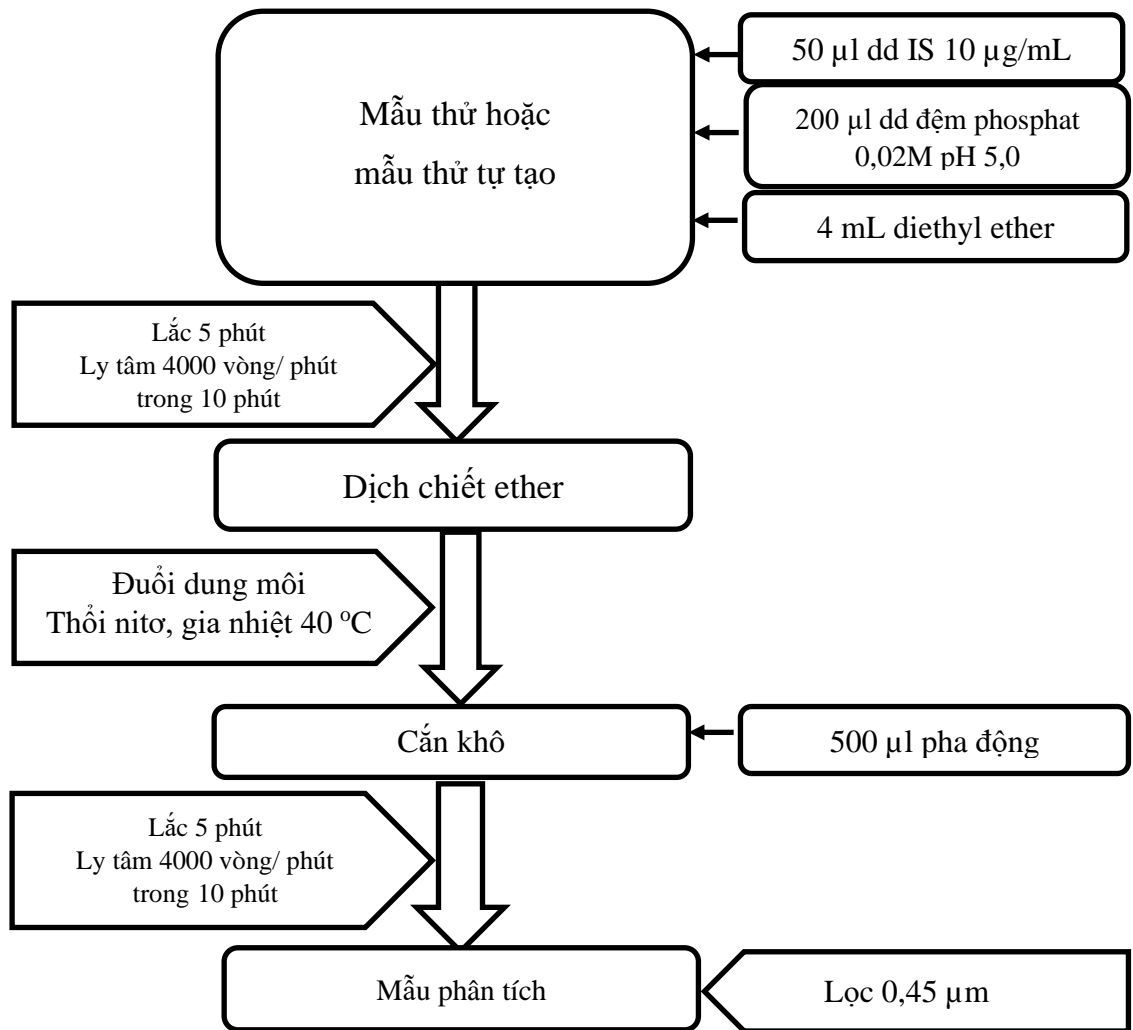
Tr. 1 / 1 - 33G1804

Ghi chú:

- Chỉ tiêu thử nghiệm có dấu (*) là chưa đăng ký với VTLAS
- Chỉ tiêu thử nghiệm có dấu (**) là được thực hiện bởi nhà thầu phụ
- Mẫu chỉ được lưu 60 ngày kể từ ngày có kết quả kiểm nghiệm

Hình PL 11.2. Kết quả LD₅₀ của dạng dung dịch đậm đặc

I. KHẢO SÁT PHÂN BỐ PTX TRONG HUYẾT TƯƠNG



Hình PL11.3. Sơ đồ chiết PTX từ huyết tương

1.1. KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH TRÊN THỎ**1.1.1 Tính phù hợp hệ thống****Bảng PL11.1 Thông số tương thích hệ thống**

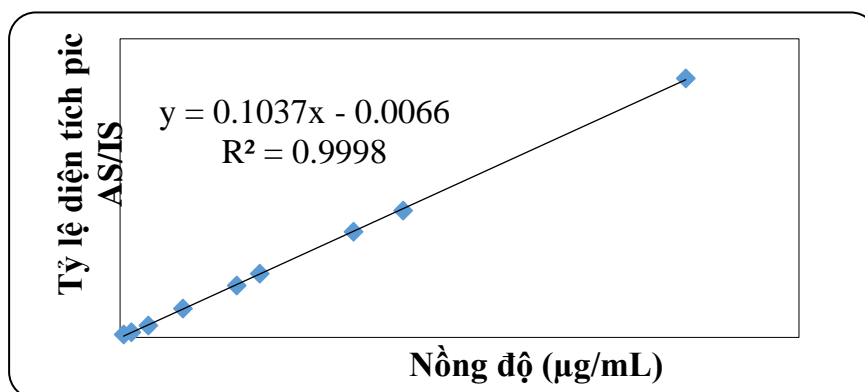
STT	Thông số							
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích đỉnh	Chiều cao đỉnh	Hệ số dung lượng	Hệ số bất đối	Số đĩa lý thuyết	Độ phân giải	
Carbamazepin	1	9,028	266069	17417	0,337	1,452	7967	3,506
	2	9,030	279394	17829	0,338	1,482	7763	3,577
	3	9,041	270581	17641	0,337	1,453	7935	3,520
	4	9,037	271411	17690	0,338	1,455	7989	3,537
	5	9,031	271063	17685	0,339	1,457	7958	3,560
	6	9,033	271035	17677	0,339	1,458	7956	3,573
Trung bình	9,033	271 592	17 657	0,338	1,460	7 928	3,546	
SD	0,005	4313,23	133,94	0,009	0,011	82,704	0,029	
RSD%	0,054	1,588	0,759	0,265	0,771	1,043	0,821	
Paclitaxel	1	12,851	781222	31590	0,904	1,384	6468	7,325
	2	12,844	785614	31897	0,903	1,377	6478	7,277
	3	12,871	790976	31940	0,904	1,387	6469	7,323
	4	12,863	790895	32037	0,904	1,380	6521	7,347
	5	12,856	788258	31968	0,907	1,381	6517	7,343
	6	12,856	787480	31992	0,906	1,379	6515	7,336
Trung bình	12,857	787 408	31 904	0,905	1,381	6 495	7,325	
SD	0,009	3663,40	160,91	0,002	0,004	25,508	0,025	
RSD%	0,073	0,465	0,504	0,166	0,262	0,393	0,347	

1.1.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Bảng PL11.2. Kết quả khảo sát nồng độ PTX trong MeOH và huyết tương

Nồng độ PTX trong methanol ($\mu\text{g/mL}$)	Nồng độ PTX trong huyết tương ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ diện tích pic AS/IS
0,500	0,311	0,056
1,000	1,000	0,105
2,500	2,485	0,236
5,000	5,546	0,579
10,000	10,305	1,043
12,500	12,346	1,282
20,000	20,616	2,123
25,000	25,000	2,546
50,000	50,000	5,201

$$y = 0,1037x - 0,0066; R^2 = 0,9998 ; \text{LLOQ} = 0,5 \mu\text{g/mL}$$



Hình PL 11.4. Đồ thị đường chuẩn và khoảng tuyến tính

- Trắc nghiệm Fischer $F = 39352,1 > F_{0,05} = 3,23$: phương trình hồi quy tương thích.

- Trắc nghiệm Student ($t_a = 198,37 > t_{0,05} = 2,36$, $t_b = -0,61 < t = 2,36$); hệ số a (độ dốc) có ý nghĩa về mặt thống kê và hệ số b (tung độ gốc) không có ý nghĩa về mặt thống kê => phương trình hồi quy có thể viết lại: $y = 0,1037x$.
- Đường chuẩn có $R^2 = 0,9998 > 0,9990$, trắc nghiệm F và t thỏa mãn yêu cầu chung. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính đạt yêu cầu.

1.1.3. Độ đúng và chính xác ở LLOQ

Bảng PL11.3. Kết quả độ đúng và chính xác ở LLOQ

Nồng độ thực ($\mu\text{g/mL}$)	Nồng độ tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ phục hồi (%)	% độ lệch
0,500	0,461	92,14	7,86
	0,473	94,68	5,32
	0,460	91,99	8,01
	0,514	102,77	2,77
	0,428	85,61	14,39
	0,461	92,24	7,76
TB	0,543	93,238	7,686

1.1.4. Tỷ lệ thu hồi – Hiệu suất chiết CAR

Bảng PL11.4. Tỷ lệ thu hồi và hiệu suất chiết CAR

Nồng độ PTX ($\mu\text{g/mL}$)	Nồng độ CAR ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic trong huyết tương	Diện tích pic trong Methanol	Hiệu suất chiết (%)
0,5	2	297879	301578	98,77
		302167		100,20
		297250		98,56
		297048		98,50
		294113		97,52
		296141		98,20
TB		297433		98,63
1	2	296141	350050	98,20
		319279		91,21
		316467		90,41
		317509		90,70
		318670		91,04

TB		321788	91,93
		318808,7	91,08
25		323584	94,15
		324031	94,28
		324525	94,42
		329038	95,74
		331290	96,39
		332711	96,81
TB		327529,83	95,30
50		306919	83,27
		309256	83,90
		307742	83,49
		307831	83,51
		336814	91,38
		338107	91,73
TB		317778,17	86,21

1.1.5. Tỷ lệ thu hồi – Hiệu suất chiết PTX

Bảng PL11.5. Tỷ lệ thu hồi và hiệu suất chiết PTX trong huyết tương ở 4 nồng độ

Nồng độ PTX (µg/mL)	Diện tích pic trong huyết tương	Diện tích pic trong Methanol	Hiệu suất chiết (%)
0,5	18480		93,72
	20414		103,52
	19520	19719	98,99
	19562		99,20
	19230		97,52
	19160		97,17
TB	19394,33		98,35
1	35781		77,40
	36003		77,88
	36011	46227	77,90
	36351		78,64
	36285		78,49
	35711		77,25
TB	36023,67		77,93
25	918192	944683	97,20
	923520		97,76

PL-45

	926127		98,04
	926882		98,12
	919773		97,36
	924295		97,84
TB	<u>923131,5</u>		<u>97,72</u>
	1576486		84,22
	1582202		84,52
50	1577599	1871877	84,28
	1581246		84,47
	1827667		97,64
	1834504		98,00
TB	<u>1663284</u>		<u>88,86</u>

1.1.6. Độ chính xác trong ngày và khác ngày

Bảng PL11.6. Độ chính xác trong ngày và khác ngày

Trong ngày		Khác ngày				RSD (%) trong ngày và khác ngày	
Ngày 1		Ngày 2		Ngày 3			
Nồng độ thực (µg/mL)	Nồng độ tìm thấy (µg/mL)	Nồng độ thực (µg/mL)	Nồng độ tìm thấy (µg/mL)	Nồng độ thực (µg/mL)	Nồng độ tìm thấy (µg/mL)		
0,5			0,461		0,474	0,539	
				0,473		0,517	
			0,5	0,460	0,5	0,502	0,528
				0,514		0,504	0,448
				0,428		0,500	0,423
				0,461		0,495	0,554
1			1,067		0,859	1,092	
				1,028		0,861	1,104
			1	0,936	1	0,859	1,026
				1,087		0,864	1,102
				1,094		0,854	1,097
				1,045		0,857	1,088
25			25,447		25,809	26,482	
				25,390		25,923	26,666
			25	25,427	25	25,956	26,603
				25,266		25,621	22,919
				25,184		25,252	23,176
				25,213		25,268	23,236
50			47,717		50,572	53,485	
				48,971		50,371	53,670
			50	50,605	50	50,472	55,076
				57,276		50,574	54,429
				56,175		53,425	50,854
				54,766		53,420	50,638

1.1.7. Độ đúng trong ngày và khác ngày**Bảng PL11.7. Độ đúng trong ngày và khác ngày**

Nồng độ thực ($\mu\text{g/mL}$)	Trong ngày (Ngày 1)			Ngày 2			Ngày 3		
	Nồng độ tìm thấy($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ phục hồi(%)	% độ lệch	Nồng độ tìm thấy($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ phục hồi (%)	% độ lệch	Nồng độ tìm thấy($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ phục hồi (%)	% độ lệch
0,5	0,461	92,14	7,86	0,474	94,88	5,12	0,539	107,76	7,76
	0,473	94,68	5,32	0,517	103,32	3,32	0,545	108,96	8,96
	0,460	91,99	8,01	0,502	100,43	0,43	0,528	105,51	5,51
	0,514	102,77	2,77	0,504	100,72	0,72	0,448	89,56	10,44
	0,428	85,61	14,39	0,500	100,00	0,00	0,432	86,43	13,57
	0,461	92,24	7,76	0,495	98,95	1,05	0,554	110,76	10,76
TB		93,238	7,686		99,72	1,77		101,50	9,50
1	1,067	106,69	6,69	0,859	85,90	14,10	1,092	109,22	9,22
	1,028	102,80	2,80	0,861	86,15	13,85	1,104	110,40	10,40
	0,936	93,63	6,37	0,859	85,88	14,12	1,026	102,57	2,57
	1,087	108,65	8,65	0,864	86,38	13,62	1,102	110,21	10,21
	1,094	109,35	9,35	0,854	85,39	14,61	1,097	109,71	9,71
	1,045	104,47	4,47	0,857	85,73	14,67	1,109	110,89	10,89
TB		104,27	6,39		85,91	14,16		108,76	8,83
25	25,447	101,79	1,79	25,809	103,23	3,23	26,482	105,93	5,93
	25,390	101,56	1,56	25,923	103,69	3,69	26,666	106,66	6,66
	25,427	101,71	1,71	25,956	103,82	3,82	26,603	106,41	6,41
	25,266	101,06	1,06	25,621	102,48	2,48	22,919	91,68	8,32
	25,184	100,74	0,74	25,252	101,01	1,01	23,176	92,70	7,30
	25,213	100,85	0,85	25,268	101,07	1,07	23,236	92,94	7,06
TB		101,29	1,29		102,55	2,55		99,39	6,95
50	47,717	95,43	4,57	50,572	101,14	1,14	53,485	106,97	6,97
	48,971	97,94	2,06	50,371	100,74	0,74	53,670	107,34	7,34
	50,605	101,21	1,21	50,472	100,94	0,94	55,076	110,15	10,15
	57,276	114,55	14,55	50,574	101,15	1,15	54,429	108,86	8,86
	56,175	112,35	12,35	53,425	106,85	6,85	50,854	101,71	1,71
	54,766	109,53	9,53	53,420	106,84	6,84	50,638	101,28	1,28
TB		105,17	7,38		102,94	2,94		106,05	6,05

1.2. KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH TRÊN CHUỘT

1.2.1. Tính phù hợp hệ thống

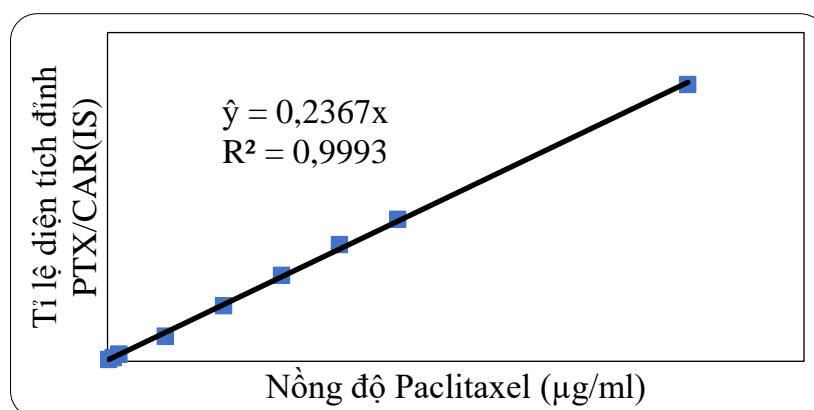
Bảng PL11.8. Thông số tương thích hệ thống

STT	Thông số							
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích đỉnh	Chiều cao đỉnh	Hệ số dung lượng	Hệ số bất đối	Số đĩa lý thuyết	Độ phân giải	
Carbamazepin	1	9,028	266069	17417	0,337	1,452	7967	3,506
	2	9,030	279394	17829	0,338	1,482	7763	3,577
	3	9,041	270581	17641	0,337	1,453	7935	3,520
	4	9,037	271411	17690	0,338	1,455	7989	3,537
	5	9,031	271063	17685	0,339	1,457	7958	3,560
	6	9,033	271035	17677	0,339	1,458	7956	3,573
Trung bình	9,033	271 592	17 657	0,338	1,460	7 928	3,546	
SD	0,005	4313,23	133,94	0,009	0,011	82,704	0,029	
RSD%	0,054	1,588	0,759	0,265	0,771	1,043	0,821	
Paclitaxel	1	12,851	781222	31590	0,904	1,384	6468	7,325
	2	12,844	785614	31897	0,903	1,377	6478	7,277
	3	12,871	790976	31940	0,904	1,387	6469	7,323
	4	12,863	790895	32037	0,904	1,380	6521	7,347
	5	12,856	788258	31968	0,907	1,381	6517	7,343
	6	12,856	787480	31992	0,906	1,379	6515	7,336
Trung bình	12,857	787 408	31 904	0,905	1,381	6 495	7,325	
SD	0,009	3663,40	160,91	0,002	0,004	25,508	0,025	
RSD%	0,073	0,465	0,504	0,166	0,262	0,393	0,347	

1.2.2. Đường chuẩn và khoảng tuyến tính

Bảng PL11.9. Kết quả đánh giá tính tuyến tính của phương pháp định lượng.

Nồng độ thực ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích đỉnh PTX	Diện tích đỉnh CAR(IS)	Tỉ số diện tích đỉnh PTX/CAR	Nồng độ xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)	Độ lệch (%)
0,1	21113	312804	0,0675	0,0828	17,21
0,5	49531	310885	0,1593	0,4707	5,85
1	92078	300559	0,3064	1,0919	9,19
5	332806	312932	1,0635	4,2907	14,19
10	753943	319957	2,3564	9,7528	2,47
15	1215442	332573	3,6547	15,2377	1,58
20	1617660	326064	4,9612	20,7574	3,79
25	1976798	327039	6,0445	25,3343	1,34
50	3371293	286152	11,7815	49,5715	0,86



Hình PL10.4. Đồ thị biểu diễn sự tương quan tuyến tính giữa tỉ lệ diện tích đỉnh PTX/CAR(AS/IS1) và nồng độ PTX trong huyết tương.

- Trắc nghiệm Student: kiểm tra ý nghĩa của các hệ số hồi quy

$t_a = 98,9030 > t_{0,05} = 2,3060$: Hệ số a có ý nghĩa thống kê.

$t_b = 0,9640 < t_{0,05} = 2,3060$: Hệ số b không có ý nghĩa thống kê.

- Trắc nghiệm Fisher: kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy

$F = 9781,8013 > F_{0,05} = 5,5914$: Phương trình hồi quy có tính tương thích.

- Khoảng tuyến tính được xác định ở nồng độ từ 0,1-50 µg/mL là phù hợp để định lượng PTX trong huyết tương.

1.2.3. Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Bảng PL11.10. Kết quả xác định giới hạn định lượng dưới (LLOQ).

STT	Diện tích đỉnh			Nồng độ tìm thấy (µg/mL)	Tỷ lệ phục hồi (%)
	PTX	CAR	PTX/CAR		
Trắng	1938	0			
Chuẩn	22285	293649	0,0759		
1	20434	260863	0,0815	0,1032	103,22
2	22486	270834	0,0830	0,1094	109,40
3	21879	265257	0,0826	0,1087	108,69
4	21628	263050	0,0822	0,1083	108,34
5	20551	263708	0,0779	0,1027	102,69
6	21228	264617	0,0802	0,1057	105,71
Trung bình	21368	264722	0,0807	0,1063	106,34
RSD%			2,7371	2,7371	2,7371

1.2.4. Độ chính xác

Bảng PL11.11. Kết quả độ chính xác trong ngày và khác ngày

Ngày	0,1 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL
I	0,1038	11,2445	23,8660	56,1123
	0,0993	10,7871	23,7788	54,1892
	0,0937	11,2018	22,7726	52,8988
	0,0973	11,1676	23,1829	51,6963
	0,0994	11,1442	23,1170	51,9815
	0,0974	11,1343	22,5304	51,4637
Trung bình	0,0985	11,1132	23,2080	53,0570
SD	0,0033	0,1648	0,5322	1,7994
RSD%	3,34	1,48	2,29	3,39
II	0,1032	9,0290	24,1655	52,6917
	0,1094	9,2273	24,3595	51,3473
	0,1087	9,1492	24,3844	52,6636

PL-51

	0,1083	9,5365	25,8160	49,6027
	0,1027	9,6470	25,6201	51,0781
	0,1057	9,6580	25,4656	51,0451
Trung bình	0,1063	9,3745	24,9685	51,4048
SD	0,0029	0,2730	0,7412	1,1599
RSD%	2,74	2,91	2,97	2,26
<hr/>				
	0,1177	10,2272	25,3347	50,8561
	0,1193	10,2339	24,4317	51,7915
	0,1198	10,2434	23,8562	51,7272
III	0,1193	10,3034	24,3487	51,8986
	0,1192	10,3495	23,4205	53,6639
	0,1159	10,3051	23,9763	49,8775
Trung bình	0,1185	10,2771	24,2280	51,6358
SD	0,0015	0,0494	0,6534	1,2582
RSD%	1,24	0,48	2,70	2,44
<hr/>				
Trung bình 3 ngày				
<hr/>				
Trung bình	0,1078	10,2549	24,1348	52,0325
SD	0,0088	0,7513	0,9602	1,5423
RSD%	8,21	7,33	3,98	2,96
<hr/>				

1.2.5. Độ đúng trong ngày và khác ngày

Bảng PL11.12 Số liệu khảo sát diện tích pic trong ngày và liên ngày.

Nồng độ khảo sát ($\mu\text{g/mL}$)	STT	Diện tích đỉnh								
		Ngày 1			Ngày 2			Ngày 3		
		PTX	CAR	PTX/CAR	PTX	CAR	PTX/CAR	PTX	CAR	PTX/CAR
0,1	Chuẩn	22068	302194	0,0730	22285	293649	0,0759	19653	291609	0,0674
	1	20329	268303	0,0758	20434	260863	0,0783	23350	294444	0,0793
	2	19439	267979	0,0725	22486	270834	0,0830	22918	284958	0,0804
	3	18058	263781	0,0685	21879	265257	0,0825	22881	283362	0,0807
	4	18995	267201	0,0711	21628	263050	0,0822	22488	279610	0,0804
	5	19481	268262	0,0726	20551	263708	0,0779	22467	279728	0,0803
	6	19054	267775	0,0712	21228	264617	0,0802	23108	295745	0,0781
10	Chuẩn	761243	302487	2,5166	738358	296013	2,4943	871405	309772	2,8131
	1	781222	276069	2,8298	695300	308727	2,2522	880420	306024	2,8770
	2	785614	289394	2,7147	695774	302300	2,3016	877594	304841	2,8789
	3	790976	280581	2,8191	690136	302410	2,2821	878306	304806	2,8815
	4	790895	281411	2,8105	703652	295809	2,3787	882656	304533	2,8984
	5	788258	281063	2,8046	713212	296396	2,4063	888163	305066	2,9114
	6	787480	281035	2,8021	712787	295879	2,4090	888216	306399	2,8989
25	Chuẩn	2108464	333143	6,3290	2128097	311311	6,8359	2102305	344444	6,1035
	1	1798797	297719	6,0419	1923786	291142	6,6077	2052287	331807	6,1852

PL-53

	2	1806620	301898	5,9842	1946840	292284	6,6608	2067444	346611	5,9647
	3	1829149	319168	5,7310	1945993	291859	6,6676	2083333	357701	5,8242
	4	1839053	315217	5,8342	1952271	276563	7,0590	2083090	350425	5,9445
	5	1845560	317234	5,8177	1947616	278013	7,0055	2052125	358897	5,7179
	6	1826542	322140	5,6700	1961704	281723	6,9632	1980380	338321	5,8536
	Chuẩn	4240078	319136	13,2861	4427899	310978	14,2386	4407892	315277	13,9810
	1	4338033	290942	14,9103	4434408	295526	15,0051	4608885	324104	14,2204
	2	4499369	312472	14,3993	4539227	310432	14,6223	4586982	316738	14,4819
50	3	4463917	317572	14,0564	4497254	299874	14,9971	4592142	317488	14,4640
	4	4396564	320056	13,7369	4480071	317162	14,1255	4610545	317708	14,5119
	5	4408032	319130	13,8127	4478720	307908	14,5456	4618821	307808	15,0055
	6	4368719	319466	13,6751	4588802	315680	14,5362	4595231	329484	13,9468

Bảng PL11.13. Kết quả thống kê độ đúng trong ngày và liên ngày.

Nồng độ khảo sát ($\mu\text{g/mL}$)	STT	Ngày 1			Ngày 2			Ngày 3		
		Nồng độ tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Độ lệch (%)	Nồng độ tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Độ lệch (%)	Nồng độ tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Độ lệch (%)
0,1	1	0,1038	103,76	3,76	0,1032	103,22	3,22	0,1177	117,67	17,67
	2	0,0993	99,33	0,67	0,1094	109,40	9,40	0,1193	119,34	19,34
	3	0,0937	93,75	6,25	0,1087	108,69	8,69	0,1198	119,81	19,81
	4	0,0973	97,35	2,65	0,1083	108,34	8,34	0,1193	119,34	19,34
	5	0,0994	99,44	0,56	0,1027	102,69	2,69	0,1192	119,17	19,17
	6	0,0974	97,44	2,56	0,1057	105,71	5,71	0,1159	115,94	15,94
	Trung bình	0,0985	98,51	2,74	0,1063	106,34	6,34	0,1185	118,54	18,54
10	1	11,2445	112,45	12,45	9,0290	90,29	9,71	10,2272	102,27	2,27
	2	10,7871	107,87	7,87	9,2273	92,27	7,73	10,2339	102,34	2,34
	3	11,2018	112,02	12,02	9,1492	91,49	8,51	10,2434	102,43	2,43
	4	11,1676	111,68	11,68	9,5365	95,37	4,63	10,3034	103,03	3,03
	5	11,1442	111,44	11,44	9,6470	96,47	3,53	10,3495	103,50	3,50
	6	11,1343	111,34	11,34	9,6580	96,58	3,42	10,3051	103,05	3,05
	Trung bình	11,1132	111,13	11,13	9,3745	93,75	6,25	10,2771	102,77	2,77
25	1	23,8660	95,46	4,54	24,1655	96,66	3,34	25,3347	101,34	1,34
	2	23,7788	94,55	5,45	24,3595	97,44	2,56	24,4317	97,73	2,27
	3	22,7726	90,55	9,45	24,3844	97,54	2,46	23,8562	95,42	4,58

PL-55

	4	23,1829	92,18	7,82	25,8160	103,26	3,26	24,3487	97,39	2,61
	5	23,1170	91,92	8,08	25,6201	102,48	2,48	23,4205	93,68	6,32
	6	22,5304	89,59	10,41	25,4656	101,86	1,86	23,9763	95,91	4,09
	Trung bình	23,2080	92,38	7,62	24,9685	99,87	2,66	24,2280	96,91	3,53
	1	56,1123	112,22	12,22	52,6917	105,38	5,38	50,8561	101,71	1,71
	2	54,1892	108,38	8,38	51,3473	102,69	2,69	51,7915	103,58	3,58
	3	52,8988	105,80	5,80	52,6636	105,33	5,33	51,7272	103,45	3,45
50	4	51,6963	103,39	3,39	49,6027	99,21	0,79	51,8986	103,80	3,80
	5	51,9815	103,96	3,96	51,0781	102,16	2,16	53,6639	107,33	7,33
	6	51,4637	102,93	2,93	51,0451	102,09	2,09	49,8775	99,75	0,25
	Trung bình	53,0570	106,11	6,11	51,4048	102,81	3,07	51,6358	103,27	3,35

1.3. KẾT QUẢ NỒNG ĐỘ PTX TRONG HUYẾT TƯƠNG THỎ VÀ CHUỘT

1.3.1. Thỏ

Bảng PL 11.14. Nồng độ PTX trong huyết tương thỏ sau khi tiêm thuốc đối chứng

Thời điểm (phút)	Nồng độ PTX ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	Thỏ 1	Thỏ 2	Thỏ 3	Thỏ 4	Thỏ 5	Thỏ 6
5	23,934	23,829	26,750	24,855	25,780	26,245
10	17,023	16,340	19,058	17,564	18,215	17,559
15	12,737	12,788	12,494	12,669	13,050	14,920
30	8,127	8,113	6,387	8,055	7,890	8,276
60	4,403	3,404	3,461	4,210	3,750	4,009
120	1,782	1,324	1,268	1,795	1,320	1,517
240	0,875	0,661	0,981	0,898	0,820	0,890
360	0,540	0,678	0,566	0,560	0,695	0,754

Bảng PL 11.15. Các thông số dược động của thuốc đối chứng trên thỏ

Thông số	AUC ₀₋₆ ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	AUC _{0-∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	t _{1/2} (giờ)	V _d (lít/kg)
Trung bình	14,71	15,70	1,15	0,251
Độ lệch chuẩn	0,99	0,90	0,02	0,003
Độ phân tán	0,07	0,06	0,02	0,01
Khoảng ước lượng	14,71 ± 2,31	15,70 ± 2,07	1,15 ± 0,04	0,251 ± 0,006

Bảng PL 11.16. Nồng độ PTX trong huyết tương thỏ sau khi tiêm dung dịch đậm đặc

Thời điểm (phút)	Nồng độ PTX ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	Thỏ 1	Thỏ 2	Thỏ 3	Thỏ 4	Thỏ 5	Thỏ 6
5	36,519	36,529	36,585	26,172	19,624	28,102
10	22,896	23,163	33,439	19,288	15,027	9,929
15	18,675	18,854	7,412	12,694	10,583	6,788
30	12,99	12,629	6,452	7,125	5,561	3,493
60	4,491	4,486	3,514	2,793	3,402	2,438
120	1,468	1,463	1,728	1,227	1,531	2,315
240	1,042	1,013	1,15	0,853	0,986	1,357
360	1,051	1,071	1,046	0,838	0,875	1,29

Bảng PL 11.17. Các thông số dược động của chế phẩm dung dịch đậm đặc trên thỏ

Thông số	AUC ₀₋₆ ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	AUC _{0-∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	t _{1/2} (giờ)	V _d (lít/kg)
Trung bình	16,33	18,38	1,36	0,208
Độ lệch chuẩn	3,08	2,94	0,25	0,06
Độ phân tán	0,19	0,16	0,18	0,27
Khoảng ước lượng	16,33± 0,19	18,38±0,16	1,36±0,18	0,208±0,27

Bảng PL 11.18. Nồng độ PTX trong huyết tương thỏ sau khi tiêm bột đông khô

Thời điểm (phút)	Nồng độ PTX ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	Thỏ 1	Thỏ 2	Thỏ 3	Thỏ 4	Thỏ 5	Thỏ 6
5	12,486	11,197	10,556	12,065	8,808	8,116
10	7,841	10,595	6,839	8,021	5,889	7,708
15	4,133	5,815	6,741	4,695	3,775	5,022
30	3,312	1,872	3,855	2,797	1,943	2,273
60	0,875	1,077	1,334	1,544	0,812	0,736
120	0,623	0,834	1,242	0,346	0,340	0,364
240	0,490	0,492	0,537	0,289	0,276	0,256
360	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000

Bảng PL 11.19. Các thông số dược động của chế phẩm bột đông khô trên thỏ

Thông số	AUC ₀₋₆ ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	AUC _{0-∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	t _{1/2} (giờ)	V _d (lít/kg)
Trung bình	5,06	5,55	0,87	0,57
Độ lệch chuẩn	1,19	1,38	0,09	0,10
Độ phân tán	0,24	0,25	0,11	0,18
Khoảng ước lượng	5,06 ± 0,24	5,55 ± 0,25	0,87 ± 0,11	0,57 ± 0,18

1.3.2. Chuột

Bảng PL 11.20. Nồng độ PTX trong huyết tương chuột sau khi tiêm thuốc đối chứng

Thời điểm (phút)	Nồng độ PTX ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	Chuột 1	Chuột 2	Chuột 3	Chuột 4	Chuột 5	Chuột 6
5	56,472	54,566	66,221	62,380	57,386	61,586
10	41,548	39,903	44,553	40,586	42,152	48,219
15	33,400	26,987	34,947	34,938	34,981	26,416
30	17,302	15,862	14,705	17,889	19,0417	20,110
60	13,074	10,915	12,523	13,452	13,199	10,675
120	10,207	10,014	10,127	9,046	8,375	9,387
180	4,832	5,393	4,932	5,302	4,753	6,357
360	0,875	0,807	0,828	0,913	0,769	0,766

Bảng PL 11.21. Các thông số dược động học của thuốc đối chứng trên chuột

Thông số	AUC ₀₋₆ ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	AUC _{0-∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	t _{1/2} (giờ)	V _d (lít/kg)
Trung bình	53,595	54,737	0,958	0,219
Độ lệch chuẩn	0,99	0,90	0,02	0,003
Khoảng ước lượng	53,60 ± 0,99	54,74 ± 0,9	0,96 ± 0,02	0,22 ± 0,006

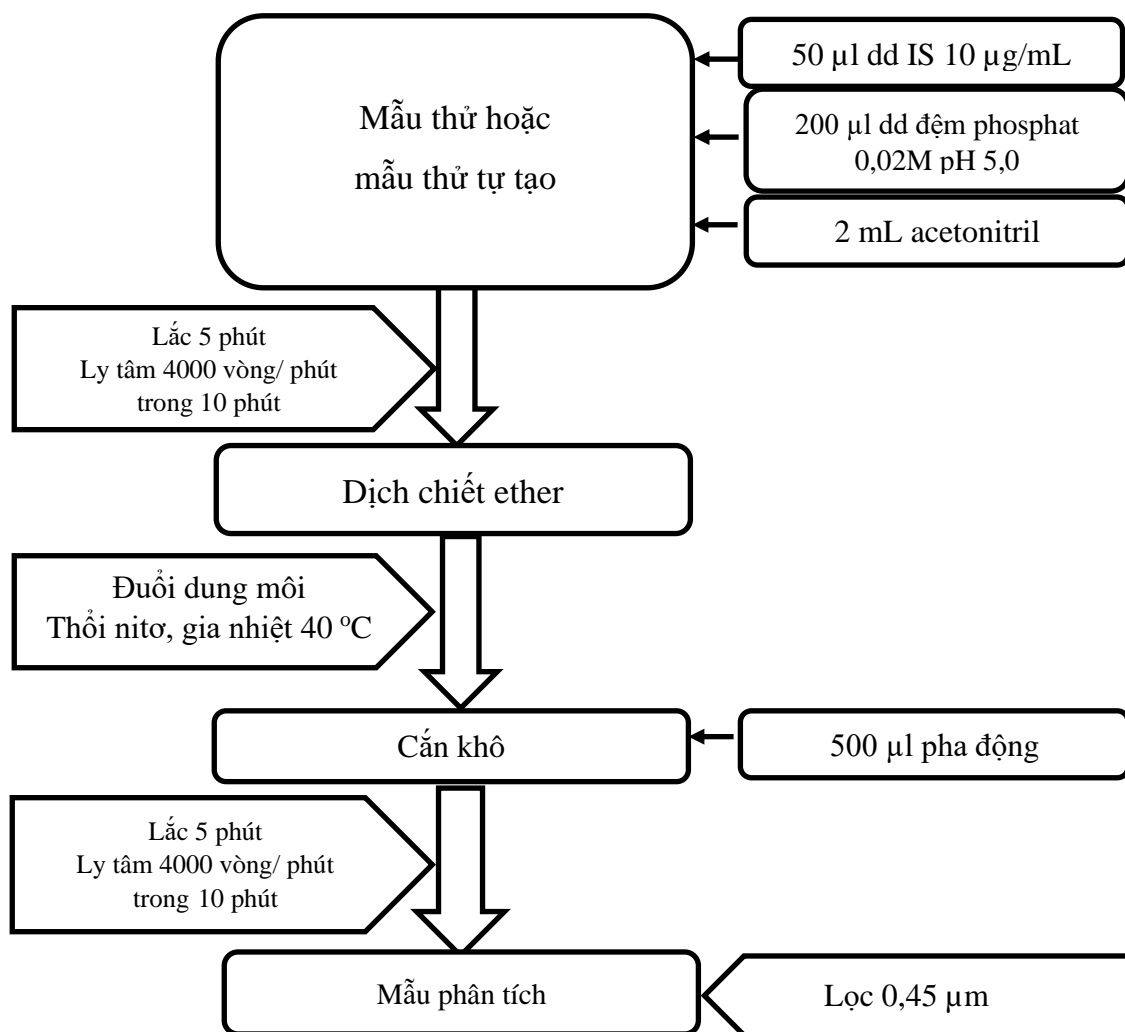
Bảng PL 11.22. Nồng độ PTX trong huyết tương chuột sau khi tiêm dung dịch đậm đặc

Thời điểm (phút)	Nồng độ PTX ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	Chuột 1	Chuột 2	Chuột 3	Chuột 4	Chuột 5	Chuột 6
5	60,941	51,777	61,530	56,777	53,814	54,021
10	41,205	43,769	41,044	43,173	38,396	44,085
15	27,242	30,889	29,608	28,165	31,269	32,637
30	21,348	17,927	18,717	21,719	20,174	21,686
60	6,978	7,459	6,825	6,697	7,883	8,136
120	4,438	4,984	5,292	4,476	5,264	5,493
180	3,632	3,575	3,726	4,047	4,406	3,754
360	1,356	1,403	1,499	1,519	1,693	1,567

Bảng PL 11.23. Các thông số dược động học của dung dịch đậm đặc trên chuột

Thông số	AUC ₀₋₆ ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	AUC _{0-∞} ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{mL}$)	t _{1/2} (giờ)	V _d (lít/kg)
Trung bình	43,733	46,192	1,132	0,202
Độ lệch chuẩn	0,99	0,90	0,02	0,003
Khoảng ước lượng	43,73 ± 0,07	46,19 ± 0,06	1,13 ± 0,02	0,20 ± 0,01

II. KẾT QUẢ KHẢO SÁT PHÂN BỐ PTX TRONG MÔ

**Hình PL11.2.** Sơ đồ chiết PTX từ mô

2.1. KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH TRÊN THỎ

2.1.1. Tính phù hợp hệ thống

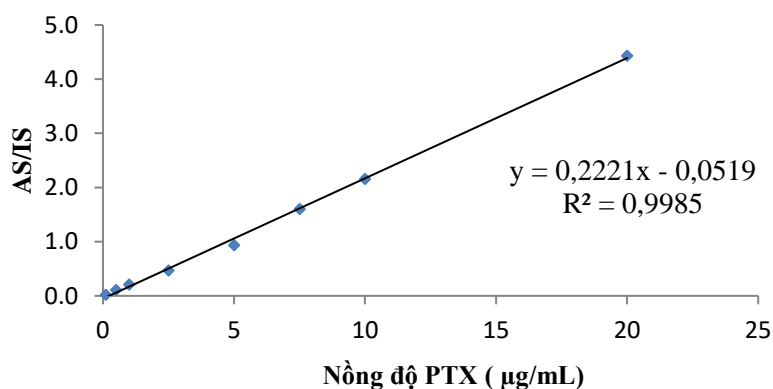
Bảng PL11.24. Số liệu thẩm định tính phù hợp hệ thống

n	IS				AS			
	t _R	Diện tích	k'	As	t _R	Diện tích	k'	As
1	4,759	505349	0,59	1,169	9,472	215961	2,16	1,056
2	4,762	504370	0,59	1,179	9,475	215216	2,16	1,065
3	4,759	503387	0,59	1,180	9,475	216168	2,16	1,057
4	4,757	505155	0,59	1,186	9,475	217437	2,16	1,067
5	4,757	495185	0,59	1,159	9,478	214123	2,16	1,044
6	4,751	502552	0,58	1,166	9,466	214884	2,16	1,049
TB	4,758	502666	0,59	1,173	9,474	215632	2,16	1,056
SD	0,004	-	-	-	0,004	-	-	-
RSD%	0,08	0,76	0,17	0,86	0,04	0,54	0,06	0,84
Yêu cầu	RSD ≤ 2%							
Kết luận	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

n: số lần tiêm lặp lại; t_R: thời gian lưu; As: hệ số bất đối; k': hệ số dung lượng.

2.1.2. Tính tuyến tính và miền giá trị

- Tính tuyến tính trong mô gan



Hình PL11.3. Đường biểu diễn nồng độ PTX theo tỷ số AS/IS trong mô gan

Đường chuẩn tuyến tính trong mô gan: $y = 0,2221x - 0,0519$, $R^2 = 0,9985$

$F = 3906 > F_{(0,05;6)} = 5,59$: Phương trình hồi quy tương thích với độ tin cậy 95%.

$t_a = 62,5 > t_{(0,05;6)} = 2,37$: Hệ số a có ý nghĩa thống kê.

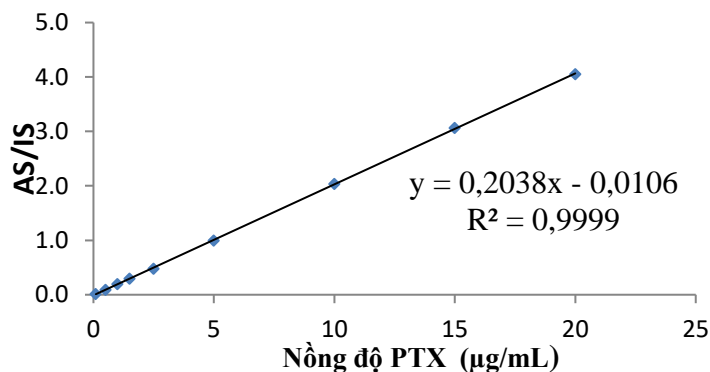
$t_b = -1,7 < t_{(0,05;6)} = 2,37$: Hệ số b không có ý nghĩa thống kê.

Bảng PL11.25. Số liệu thẩm định tuyến tính trong mô gan

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	Độ lệch (%)	Yêu cầu	Kết luận
	AS	IS	AS/IS				
0,1	3984	195670	0,0204	0,0917	8,33	Độ lệch $\leq 20\%$	Đạt
0,5	20456	189063	0,1082	0,4872	2,57		Đạt
1	38906	187450	0,2076	0,9345	6,55		Đạt
2,5	88000	186904	0,4708	2,1199	15,20	Độ lệch $\leq 15\%$	Không đạt
5,0	177718	189536	0,9376	4,2217	15,57		Không đạt
7,5	308044	192305	1,6019	7,2123	3,84		Đạt
10,0	428157	198430	2,1577	9,7151	2,85		Đạt
20,0	878116	198118	4,4323	19,9563	0,22		Đạt

Độ lệch tại LLOQ là 8,33 % nhỏ hơn 20%, tại các điểm khác đều nhỏ hơn 15%. 6/8 điểm đạt yêu cầu độ lệch trong đó có LLOQ và điểm giới hạn trên. Do đó chấp nhận đường chuẩn trong mô gan.

- Tuyến tính trong mô Thận

**Hình PL11.4.** Đường biểu diễn nồng độ PTX theo tỷ số AS/IS trong mô thận

Đường chuẩn tuyến tính trong mô thận: $y = 0,2038 x - 0,0106$, $R^2 = 0,9999$

$F = 3906 > F_{(0,05;7)} = 5,31$: Phương trình hồi quy tương thích với độ tin cậy 95%.

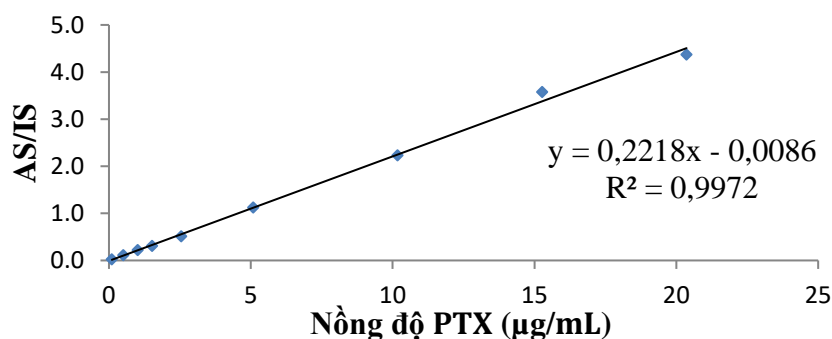
$t_a = 62,5 > t_{(0,05;7)} = 2,37$: Hệ số a có ý nghĩa thống kê.

$t_b = -1,7 < t_{(0,05;7)} = 2,37$: Hệ số b không có ý nghĩa thống kê.

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	Độ lệch (%)	Yêu cầu	Kết luận
	AS	IS	AS/IS				
0,1	4071	236890	0,0172	0,0843	15,676	Độ lệch $\leq 20\%$	Đạt
0,5	20467	220780	0,0927	0,4549	9,025		Đạt
1	41640	210017	0,1983	0,9729	2,714	Độ lệch $\leq 15\%$	Đạt
1,5	65906	219395	0,3004	1,4740	1,734		Đạt
2,5	103707	216780	0,4784	2,3474	6,105		Đạt
5,0	221513	222377	0,9961	4,8877	2,246		Đạt
10,0	458119	224994	2,0361	9,9909	0,091		Đạt
15,0	709097	231243	3,0665	15,0464	0,309		Đạt
20,0	963429	237757	4,0522	19,8830	0,585	Đạt	

Độ lệch tại LLOQ là 15,676% nhỏ hơn 20%, tại các điểm khác đều nhỏ hơn 15%. Do đó chấp nhận đường chuẩn trong mô thân.

- Tuyến tính trong mô phổi



Hình PL11.5. Đường biểu diễn nồng độ PTX theo tỷ số AS/IS trong mô phổi

Đường chuẩn tuyến tính trong mô phổi: $y = 0,2218x - 0,0086$. $R^2 = 0,9972$

$F = 2466 > F_{(0,05;7)} = 5,32$: Phương trình hồi quy tương thích với độ tin cậy 95%.

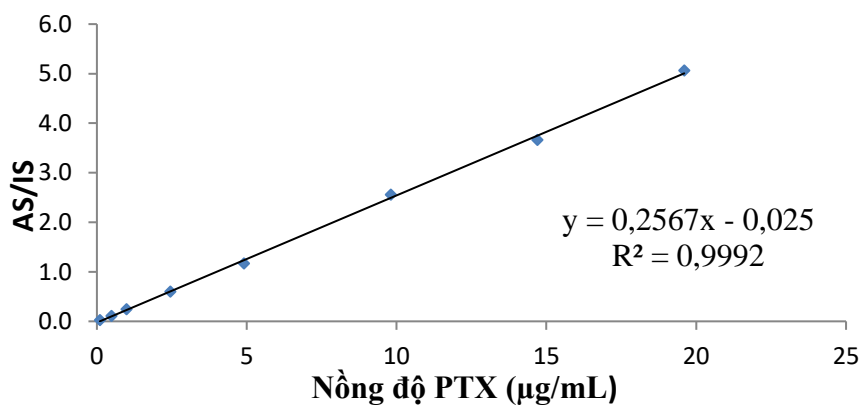
$t_a = 49,67 > t_{(0,05;7)} = 2,31$: Hệ số a có ý nghĩa thống kê.

$t_b = -0,2 < t_{(0,05;7)} = 2,31$: Hệ số b không có ý nghĩa thống kê.

Bảng PL11.27. Số liệu thẩm định tuyến tính trong mô phổi

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX xác định từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	Độ lệch (%)	Yêu cầu	Kết luận
	AS	IS	AS/IS				
0,1018	3985	199058	0,0200	0,0903	11,338	Độ lệch $\leq 20\%$	ĐẠT
0,509	20014	184788	0,1083	0,4883	4,064		ĐẠT
1,018	42461	191970	0,2212	0,9972	2,040	Độ lệch $\leq 15\%$	ĐẠT
1,527	59951	194552	0,3081	1,3893	9,017		ĐẠT
2,545	100485	197101	0,5098	2,2985	9,684		ĐẠT
5,09	211675	187873	1,1267	5,0798	0,201		ĐẠT
10,18	429150	192103	2,2340	10,0719	1,061		ĐẠT
15,27	654508	183056	3,5755	16,1202	5,568		ĐẠT
20,36	834886	190977	4,3717	19,7099	3,193	ĐẠT	

Độ lệch tại LLOQ 11,338% nhỏ hơn 20%, tại các điểm khác đều nhỏ hơn 15%. Do đó chấp nhận đường chuẩn trong mô phổi.



Hình PL11.6 Đường biểu diễn nồng độ PTX theo tỷ số AS/IS trong mô buồng trứng

Đường chuẩn tuyến tính trong mô buồng trứng : $y = 0,2567x - 0,025$, $R^2 = 0,9992$

$F = 7453 > F_{(0,05;6)} = 5,59$: Phương trình hồi quy tương thích với độ tin cậy 95%.

$t_a = 86,33 > t_{(0,05;6)} = 2,37$: Hệ số a có ý nghĩa thống kê.

$t_b = -0,88 < t_{(0,05;6)} = 2,37$: Hệ số b không có ý nghĩa thống kê.

Bảng PL11.28. Số liệu thẩm định tuyến tính trong mô buồng trứng

Nồng độ PTX thực tế (µg/mL)	Diện tích pic			Nồng độ PTX xác định từ đường chuẩn (µg/mL)	Độ lệch (%)	Yêu cầu	Kết luận
	AS	IS	AS/IS				
0,098	4012	195680	0,0205	0,0799	18,50	Độ lệch ≤ 20%	Đạt
0,48	20456	189063	0,1082	0,4215	12,19		Đạt
0,98	41436	171041	0,2423	0,9437	3,70		Đạt
2,45	103379	172689	0,5986	2,3321	4,81	Độ lệch ≤ 15%	Đạt
4,9	140396	120222	1,1678	4,5493	7,16		Đạt
9,8	489848	191844	2,5534	9,9469	1,50		Đạt
14,7	694962	190002	3,6577	14,2488	3,07		Đạt
19,6	881872	174322	5,0589	19,7073	0,55		Đạt

Độ lệch tại LLOQ là 18,50% nhỏ hơn 20%, tại các điểm khác đều nhỏ hơn 15%. Do đó chấp nhận đường chuẩn trong mô buồng trứng.

2.1.3. Tỷ lệ hồi phục (hiệu suất chiết)

Tỷ lệ hồi phục được thực hiện trong mô đồng nhất, chọn 3 nồng độ cao, trung bình, thấp của miền giá trị, mỗi nồng độ 5 mẫu. Định lượng và xác định tỷ lệ hồi phục theo tỷ số diện tích pic của mẫu sau chiết và diện tích pic của mẫu chuẩn trong methanol.

Bảng PL11.29. Bảng số liệu thẩm định tỷ lệ hồi phục

Nồng độ PTX thực tế (µg/mL)	Diện tích đỉnh PTX trong mô	Diện tích đỉnh PTX trong methanol	Tỷ lệ hồi phục (%)
1,002	41640	43192	96,41
	41872		96,94
	43616		100,98
	40810		94,49
	44136		102,19
Trung bình			98,20
RSD (%)			3,31
10,02	455990	444876	102,50
	492561		110,72

	494306		111,11
	494427		111,14
	458791		103,13
Trung bình			107,72
RSD (%)			4,17
	963429		101,43
	976103		102,76
20,04	987502	949850	103,96
	986755		103,89
	975154		102,66
Trung bình			102,94
RSD (%)			1,01

Quy trình định lượng PTX có tỷ lệ hồi phục trong khoảng 96,41 - 111,14%.

RSD tương ứng với các mức nồng độ thấp, trung bình, cao là 3,3%; 4,17%, 1,01%. Đạt yêu cầu (< 15%).

2.1.4. Độ đúng và độ chính xác

Độ đúng và độ chính xác được thực hiện trong mô đồng nhất. Chọn 3 nồng độ 20, 10, 1 µg/mL tương ứng với 3 mức nồng độ cao, trung bình, thấp theo đường chuẩn tuyến tính. Mỗi nồng độ 5 mẫu, định lượng trong 3 ngày để xác định độ đúng và độ chính xác trong ngày và liên ngày.

Bảng PL11.30. Bảng số liệu thẩm định độ đúng và độ chính xác trong ngày và liên ngày

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Ngày 1			Ngày 2			Ngày 3				
	Nồng độ tìm thấy	Tỷ lệ hồi phục %	% Độ lệch	Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Nồng độ tìm thấy	Tỷ lệ hồi phục %	% Độ lệch	Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Nồng độ tìm thấy	Tỷ lệ hồi phục %	% Độ lệch
1,002	1,025	102,28	0,74	1,002	0,971	96,88	2,85	0,982	0,849	86,48	1,86
	1,026	102,37	0,66		1,079	107,66	8,08		0,864	87,96	0,18
	0,981	97,95	4,95		1,014	101,25	1,58		0,876	89,17	1,19
	1,075	107,28	4,11		0,981	97,95	1,76		0,880	89,59	1,67
	1,056	105,35	2,24		0,999	99,69	0,00		0,858	87,39	0,82
Trung bình		103,05	2,54		100,69	2,85		88,12	1,14		
RSD%		3,44			4,21			1,45			
10,02	10,470	104,49	2,58	10,02	10,634	106,13	0,66	9,82	9,425	95,98	1,77
	10,045	100,25	1,59		10,464	104,43	0,96		9,155	93,23	1,15
	10,490	104,69	2,78		10,515	104,95	0,47		9,349	95,20	0,95
	9,992	99,72	2,10		10,639	106,18	0,70		9,154	93,22	1,15
	10,036	100,16	1,68		10,572	105,51	0,07		9,222	93,91	0,42
Trung bình		101,86	2,14		105,44	0,57		94,31	1,09		
RSD%		2,46			0,72			1,31			
20,04	20,157	97,14	1,81	20,04	19,467	97,14	1,81	19,64	19,423	98,89	0,38
	19,935	103,58	4,70		20,758	103,58	4,70		19,160	97,55	0,98
	19,421	100,18	1,27		20,076	100,18	1,26		19,468	99,12	0,61
	20,200	96,91	2,04		19,421	96,91	2,04		19,404	98,80	0,29
	19,524	96,83	2,12		19,404	96,83	2,12		19,289	98,22	0,31
Trung bình		98,93	2,39		98,93	2,39		98,52	0,51		
RSD%		2,99			2,99			0,64			

2.1.5. Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Bảng PL11.31. Bảng số liệu thẩm định độ đúng và độ chính xác tại nồng độ LLOQ

Thứ tự mẫu	Diện tích pic		AS/IS1	Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Nồng độ PTX tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)	Tỷ lệ hồi phục %	Độ lệch %
	AS	IS1					
1	4092	174951	0,0234	0,1018	0,1055	103,59	3,59
2	3996	172770	0,0231		0,1043	102,43	2,43
3	4193	172590	0,0242		0,1095	107,60	7,60
4	3636	168357	0,0215		0,0974	95,65	4,35
5	3969	167950	0,0236		0,1065	104,66	4,66
6	3621	166433	0,0218		0,0981	96,36	3,64

2.2. KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH TRÊN CHUỘT

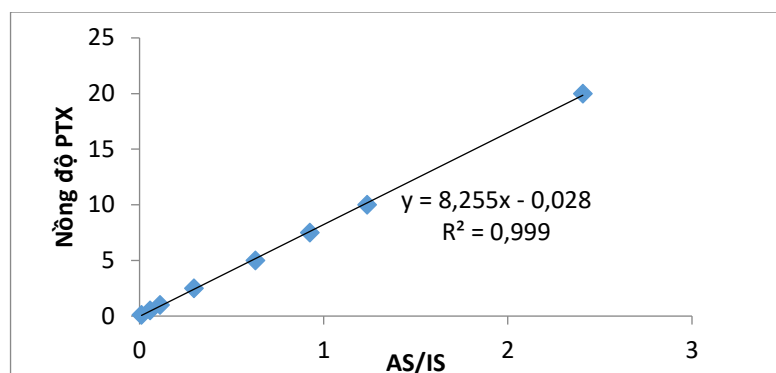
2.2.1. Tính phù hợp hệ thống

Bảng PL11.32. Số liệu thẩm định tính phù hợp hệ thống

N	IS			AS				
	R _t	Diện tích	k'	As	R _t	Diện tích	k'	As
1	8,257	721559	0,522	1,352	10,186	529557	0,234	1,065
2	8,253	720561	0,521	1,351	10,189	531612	0,235	1,066
3	8,256	720345	0,521	1,349	10,185	529973	0,234	1,061
4	8,260	719857	0,522	1,351	10,188	529125	0,234	1,060
5	8,257	720104	0,521	1,348	10,179	532986	0,234	1,057
6	8,258	720378	0,521	1,354	10,181	530768	0,235	1,064
TB	8,257	720467	0,521	1,351	10,185	530670	0,234	1,062
SD	0,002	587,873	0,000	0,002	0,004	1440,307	0,001	0,003
RSD%	0,03	0,08	0,09	0,16	0,04	0,27	0,22	0,32
Yêu cầu	RSD \leq 2%							
Kết luận	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

2.2.2. Tính tuyến tính & miền giá trị

- Tính tuyến tính trong mô gan



Hình PL11.9. Đường biểu diễn nồng độ PTX ($\mu\text{g/mL}$) theo tỷ số AS/IS trong mô gan

Đường chuẩn tuyến tính trong mô gan: $y = 8,255x - 0,028$, $R^2 = 0,9996$

$F = 16127,43 > F_{(0,05;6)} = 5,59$: Phương trình hồi quy tương thích có độ tin cậy 95%.

$T_a = 126,99 > t_{(0,05;6)} = 2,37$: Hệ số a có ý nghĩa thống kê.

$T_b = -0,42 < t_{(0,05;6)} = 2,37$: Hệ số b không có ý nghĩa thống kê.

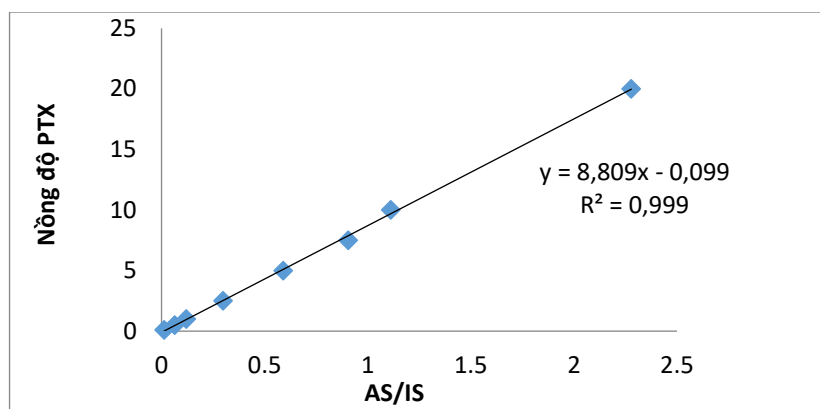
Phương trình hồi quy có thể viết lại : $y = 8,255x$.

Bảng PL11.33. Số liệu thẩm định tuyến tính trong mô gan

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	Độ lệch (%)	Yêu cầu	Kết luận
	AS	IS2	AS/IS2				
0,1	7605	696389	0,0109	0,0901	9,85	Độ lệch $\leq 20\%$	Đạt
0,5	41621	728650	0,0571	0,4715	5,69		Đạt
1	86294	778074	0,1109	0,9155	8,45		Đạt
2,5	226993	766240	0,2962	2,4455	2,18	Độ lệch $\leq 15\%$	Đạt
5	472521	749725	0,6303	5,2028	4,06		Đạt
7,5	659646	713658	0,9243	7,6302	1,74		Đạt
10	918720	743671	1,2354	10,1981	1,98		Đạt
20	1761279	731610	2,4074	19,8731	0,63		Đạt

Độ lệch tại LLOQ là 9,85% nhỏ hơn 20%, tại các điểm khác đều nhỏ hơn 15%. Do đó chấp nhận đường chuẩn trong mô gan.

- Tính tuyến tính trong mô thận



Hình PL11.10. Đường biểu diễn nồng độ PTX $\mu\text{g/mL}$ theo tỷ số AS/IS trong mô thận

Đường chuẩn tuyến tính trong mô thận: $y = 8,809x - 0,099$, $R^2 = 0,9991$

$F = 7557,78 > F_{(0,05;6)} = 5,59$: Phương trình hồi quy tương thích có độ tin cậy 95%.

$T_a = 86,94 > t_{(0,05;6)} = 2,37$: Hệ số a có ý nghĩa thống kê.

$T_b = -1,00 < t_{(0,05;6)} = 2,37$: Hệ số b không có ý nghĩa thống kê.

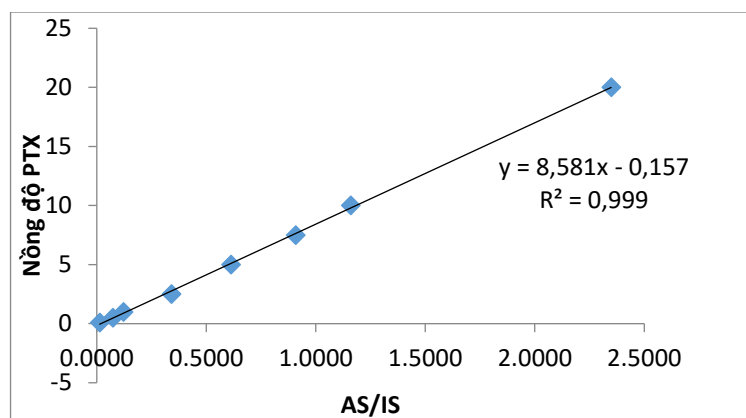
Phương trình hồi quy có thể viết lại : $y = 8,809x$.

Bảng PL11.34. Số liệu thẩm định trong mô thận

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX từ đường chuẩn ($\mu\text{g/m}$)	Độ lệch (%)	Yêu cầu	Kết luận
	AS	IS2	AS/IS2				
0,1	9602	775872	0,0124	0,1092	9,23	Độ lệch $\leq 20\%$	Đạt
0,5	47501	751916	0,0632	0,5567	11,35		Đạt
1	86139	719504	0,1197	1,0544	5,44		Đạt
2,5	226788	758913	0,2988	2,6321	5,29		Đạt
5	452856	767014	0,5904	5,2008	4,02	Độ lệch $\leq 15\%$	Đạt
7,5	691838	764804	0,9046	7,9686	6,25		Đạt
10	863481	776394	1,1122	9,7974	2,03		Đạt
20	1830632	803478	2,2784	20,0704	0,35		Đạt

Độ lệch tại LLOQ là 9,23% nhỏ hơn 20%, tại các điểm khác đều nhỏ hơn 15%. Do đó chấp nhận đường chuẩn trong mô thận.

- Tính tuyến tính trong mô phổi



Hình PL11.11. Đường biểu diễn nồng độ PTX ($\mu\text{g/ml}$) theo tỷ số AS/IS trong mô phổi

Đường chuẩn tuyến tính trong mô phổi: $y = 8,581x - 0,157$, $R^2 = 0,9995$

$F = 10811,38 > F_{(0,05;6)} = 5,59$: Phương trình hồi quy tương thích có độ tin cậy 95%.

$T_a = 103,98 > t_{(0,05;6)} = 2,37$: Hệ số a có ý nghĩa thống kê.

$T_b = -1,88 < t_{(0,05;6)} = 2,37$: Hệ số b không có ý nghĩa thống kê.

Phương trình hồi quy có thể viết lại : $y = 8,581x$.

Bảng PL11.35. Thống kê số liệu tuyến tính trong mô phổi

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic			Nồng độ PTX từ đường chuẩn ($\mu\text{g/mL}$)	Độ lệch (%)	Yêu cầu	Kết luận
	AS	IS	AS/IS				
0,1	726480	9630	0,0146	0,1137	13,75	Độ lệch $\leq 20\%$	Đạt
0,5	711005	52235	0,0735	0,6304	26,08		Không Đạt
1	756800	92005	0,1216	1,0432	4,32	Độ lệch $\leq 15\%$	Đạt
2,5	755280	257232	0,3406	2,9225	16,90		Không Đạt
5	748564	458783	0,6129	5,2592	5,18		Đạt
7,5	746210	677242	0,9076	7,7879	3,84		Đạt
10	765883	887880	1,1593	9,9479	0,52		Đạt
20	778579	1828482	2,3485	20,1524	0,76		Đạt

Độ lệch tại LLOQ là 13,75% nhỏ hơn 20%, tại các điểm khác đều nhỏ hơn 15%. 6/8 điểm đạt yêu cầu độ lệch trong đó có LLOQ và điểm giới hạn trên. Do đó chấp nhận đường chuẩn trong mô phổi.

2.2.3. Tỷ lệ phục hồi và hiệu suất chiết PTX

Bảng PL11.36. Số liệu thẩm định tỷ lệ hồi phục PTX

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic PTX trong mô	Diện tích pic PTX trong methanol	Tỷ lệ hồi phục (%)
1	87913	94028	93,50
	86194		91,67
	81176		86,33
	85599		91,04
	84497		89,86
Trung bình			90,48
RSD (%)			2,95
5	452783	511713	88,48
	495493		96,83
	505672		98,82
	510683		99,80
	458416		89,58
Trung bình			94,70
RSD (%)			5,60
10	891492	998576	89,28
	876452		87,77
	924625		92,59
	857675		85,89
	886135		88,74
Trung bình			88,85
RSD (%)			2,76

Quy trình định lượng PTX có tỷ lệ hồi phục trong khoảng 87,77-99,08%, các giá trị nằm trong khoảng 85-115%. RSD tương ứng với các mức nồng độ thấp, trung bình, cao là 2,95%; 5,60%; 2,76%. Đạt yêu cầu về độ đúng và độ chính xác khi nhỏ hơn 15%.

2.2.4. Tỷ lệ phục hồi và hiệu suất chiết diazepam (DZP)

Bảng PL11.37. Số liệu thẩm định tỷ lệ phục hồi DZP

Nồng độ DZP thực tế ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic DZP trong mô	Diện tích pic DZP trong methanol	Tỷ lệ hồi phục (%)
2	735194	744378	98,77
	732503		98,40
	716614		96,27
	714529		95,99
	711239		95,55
Trung bình RSD (%)			97,00 1,53
2	669682	718819	93,16
	686157		95,46
	682317		94,92
	733949		102,10
	634394		88,26
Trung bình RSD (%)			94,78 5,26
2	734447	751868	97,68
	693432		92,23
	749989		99,75
	740915		98,54
	724050		96,30
Trung bình RSD (%)			96,90 2,99

Quy trình định lượng DZP có tỷ lệ hồi phục trong khoảng 88,26-102,10%, các giá trị nằm trong khoảng 85-115%. RSD tương ứng với các mức nồng độ thấp, trung bình, cao là 1,53%; 5,26%; 2,99%. Đạt yêu cầu về độ đúng và độ chính xác khi nhỏ hơn 15%.

2.2.5. Độ đúng và độ chính xác

Bảng PL11.38. Bảng số liệu thẩm định độ đúng và độ chính xác trong ngày và liên ngày

Nồng độ PTX thực tế ($\mu\text{g/ml}$)	Ngày 1			Ngày 2			Ngày 3		
	Nồng độ tìm thấy	Tỷ lệ hồi phục (%)	Độ lệch (%)	Nồng độ tìm thấy	Tỷ lệ hồi phục (%)	Độ lệch (%)	Nồng độ tìm thấy	Tỷ lệ hồi phục (%)	Độ lệch (%)
1	0,9871	98,71	1,29	0,9497	94,97	5,03	1,0029	100,29	0,29
	0,9714	97,14	2,86	0,9126	91,26	8,74	1,0248	102,48	2,48
	0,9351	93,51	6,49	0,9712	97,12	2,88	1,0152	101,52	1,52
	0,9889	98,89	1,11	0,9136	91,36	8,64	1,0114	101,14	1,14
	0,9807	98,07	1,93	1,0182	101,82	1,82	1,0112	101,12	1,12
Trung bình		97,26			95,31			101,31	
RSD%		2,27			4,63			0,79	
5	4,8562	97,12	2,88	5,2589	105,18	5,18	5,5929	111,86	11,86
	5,4818	109,64	9,64	5,2650	105,30	5,30	5,5613	111,23	11,23
	5,3358	106,72	6,72	5,4593	109,19	9,19	5,3505	107,01	7,01
	5,5189	110,38	10,38	5,3558	107,12	7,12	5,3900	107,80	7,80
	5,1529	103,06	3,06	4,9725	99,45	0,55	5,0534	101,07	1,07
Trung bình		105,38			105,25			107,79	
RSD%		5,16			3,45			3,99	
10	10,0201	100,20	0,20	10,0245	100,25	0,25	11,0362	110,36	10,36
	10,4338	104,34	4,34	10,7373	107,37	7,37	11,3022	113,02	13,02
	10,1772	101,77	1,77	10,0769	100,77	0,77	11,2157	112,16	12,16
	9,5559	95,56	4,44	10,4507	104,51	4,51	10,2455	102,45	2,45
	10,1030	101,03	1,03	10,6408	106,41	6,41	10,2799	102,80	2,80
Trung bình		100,58			103,86			108,16	
RSD%		3,19			3,12			4,75	

Bảng PL11.41. Nồng độ PTX trong mô thỏ sau khi tiêm dung dịch đậm đặc

Mô	Thời điểm (giờ)	Nồng độ PTX ($\mu\text{g/g}$)						TB	SD
		Thỏ 1	2	3	4	5	6		
Gan	0,5	14,49	17,60	12,25	18,45	15,60	12,10	14,78	2,69
	2	6,70	6,25	5,44	6,70	6,25	5,44	6,13	0,64
	4	1,78	1,72	1,69	1,72	1,70	1,69	1,73	0,04
	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Thận	0,5	10,91	11,49	9,74	9,95	10,5	9,80	10,71	0,89
	2	4,80	4,41	4,93	4,58	4,14	4,87	4,71	0,27
	4	2,46	2,04	1,85	2,00	2,04	1,95	2,12	0,31
	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Phổi	0,5	7,11	9,39	8,06	8,24	9,19	7,87	8,19	1,14
	2	3,12	4,67	3,39	3,12	4,67	3,39	3,72	0,83
	4	2,04	1,62	2,21	2,04	1,62	2,21	1,96	0,30
	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Buồng trứng	0,5	1,43	1,72	1,68	1,43	1,72	1,68	1,61	0,16
	2	0,50	1,65	1,31	0,50	1,65	1,31	1,15	0,59
	4	0,17	0,15	0,10	0,17	0,15	0,10	0,14	0,03
	8	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

2.3.2. Chuột**Bảng PL11.42.** Nồng độ PTX trong mô chuột sau khi tiêm thuốc đối chứng

Mô	Thời điểm (giờ)	Nồng độ PTX ($\mu\text{g/g}$)						TB	SD (%)
		Chuột 1	2	3	4	5	6		
Gan	0,5	57,77	55,60	63,58	57,81	55,74	61,69	58,70	3,2
	1	41,43	33,86	52,99	48,00	47,78	49,81	45,65	6,9
	2	28,40	24,46	24,15	32,36	30,73	23,80	27,32	3,7
	4	11,09	11,54	13,51	15,25	13,44	14,76	13,27	1,7
	6	5,54	4,18	9,70	10,85	6,24	7,07	7,26	2,5
	8	0,03	0,27	0,01	0,04	0,38	0,29	0,17	0,2
Thận	0,5	25,52	21,03	21,47	23,30	19,19	18,69	21,53	2,6
	1	14,40	13,81	16,34	14,65	11,34	14,32	14,14	1,6
	2	8,72	7,13	11,17	13,12	9,25	10,80	10,03	2,1
	4	6,86	4,61	6,76	4,54	5,43	4,13	5,39	1,2
	6	1,89	3,33	4,03	4,63	2,81	3,02	3,29	1,0
	8	0,27	0,42	0,55	0,78	0,50	0,19	0,45	0,2
Phổi	0,5	12,05	13,06	12,44	11,09	12,17	13,10	12,32	0,7
	1	10,02	10,58	9,97	9,96	8,56	9,66	9,79	0,7
	2	6,38	6,59	7,44	5,60	7,49	5,85	6,56	0,8
	4	2,85	3,27	3,47	4,15	2,23	4,91	3,48	0,9

6	2,10	3,31	1,60	1,67	1,30	2,17	2,03	0,7
8	0,46	0,25	0,39	0,24	0,26	0,31	0,32	0,1

Bảng PL11.43. Nồng độ PTX trong mô chuột tiêm dung dịch đậm đặc

Mô	Thời điểm (giờ)	Nồng độ PTX ($\mu\text{g/g}$)						TB	SD (%)
		Chuột 1	2	3	4	5	6		
Gan	0,5	54,71	62,27	66,11	61,74	55,37	64,62	60,80	4,7
	1	51,76	49,06	54,52	57,84	55,59	56,40	54,20	3,2
	2	28,53	36,10	24,16	33,92	32,49	31,35	31,09	4,2
	4	15,05	22,94	13,83	18,74	17,32	14,44	17,05	3,4
	6	6,01	9,66	6,88	13,47	11,41	7,23	9,11	2,9
	8	0,19	0,15	0,17	0,09	0,19	0,17	0,16	0,0
Thận	0,5	21,84	20,02	21,66	19,53	15,18	16,58	19,14	2,7
	1	14,53	14,59	14,71	15,30	13,66	14,86	14,61	0,5
	2	9,26	9,98	9,78	10,06	10,80	12,02	10,32	1,0
	4	6,33	5,13	6,69	4,61	4,21	8,12	5,85	1,5
	6	3,00	2,50	3,73	3,03	2,89	4,53	3,28	0,7
	8	0,49	0,53	0,19	0,28	0,24	0,27	0,33	0,1
Phổi	0,5	13,64	13,94	14,58	12,71	12,17	12,86	13,32	0,9
	1	9,90	10,41	10,70	11,98	9,95	12,69	10,94	1,1
	2	7,92	7,78	6,53	7,53	7,73	8,75	7,71	0,7
	4	4,00	3,75	3,22	2,40	4,18	5,32	3,81	1,0
	6	1,86	2,79	1,67	3,27	1,30	2,04	2,16	0,7
	8	0,52	0,75	0,55	0,42	0,12	0,21	0,43	0,2