

NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ DUNG DỊCH RỬA VÀ BẢO QUẢN TẠNG VINA-CELSIOR

Phan Văn Bình;
Cao Tiến Hy*;
Nguyễn Đức Cường**

TÓM TẮT

Dựa vào nguyên tắc chung về kỹ thuật bào chế thuốc tiêm truyền và kết quả nghiên cứu thực nghiệm: tiến hành khảo sát độ bền vững của dung dịch histidin, lactobionat, glutathion, xác định quy cách đóng gói và quy trình kỹ thuật bào chế Vina-Celsior. Kết quả: đã bào chế được chế phẩm đạt yêu cầu chất lượng đề ra.

* Từ khóa: Vina-Celsior; Dung dịch; Rửa và bảo quản tim; Kỹ thuật bào chế.

RESEARCH ON PREPARATION OF ORGAN PRESERVATION SOLUTION VINA-CELSIOR

SUMMARY

Based on general principles of formulation for the large volume parenteral and results of experimental research: studies of histidine, lactobionate, glutathione solutions stability at sterilization temperature, the authors had determined the packing procedures and technical process of Vina-Celsior preparation. Product has satisfied the quantity requirements.

* *Key words: Vina-Celsior solution; Solution of heart preservation; Technical process.*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Dung dịch (DD) rửa và bảo quản (RBQ) tạng là vật liệu thiết yếu trong phẫu thuật ghép tạng. Trong các dung dịch bảo quản hiện có, celsior của hãng Genzyme Pháp thích hợp nhất cho bảo quản tim. Quy trình bào chế celsior chưa có tài liệu nào công bố, nhưng công thức thành phần được công bố như sau [7]:

Na⁺: 100 mmol/lít; histidine 30 mmol/lít;
K⁺: 15 mmol/lít; lactobionate: 80 mmol/lít;
Mg⁺⁺: 13 mmol/lít; glutamat: 20 mmol/lít;
Ca⁺⁺: 0,25 mmol/lít; glutathione: 3 mmol/lít;

Cl⁻: 41,5 mmol/lít; pH: 7,2 - 7,4; mannitol: 60 mmol/lít; độ nhớt 1,3.

Để phục vụ nghiên cứu ghép tim thực nghiệm tại Học viện Quân y, cần phải có DD RBQ tim, tuy nhiên, DD trên phải nhập khẩu khá tốn kém (250 - 300 USD/lít) và không chủ động. Vì vậy, các tác giả đặt vấn đề nghiên cứu bào chế DD RBQ tạng có công thức như celsior và đặt tên là Vina-Celsior nhằm:

- Xây dựng quy trình kỹ thuật bào chế dung dịch Vina-Celsior.

- Bước đầu đánh giá chất lượng của chế phẩm về một số tiêu chuẩn lý, hoá.

* Bệnh viện 103

Phản biện khoa học: PGS. TS. Ngụ Văn Hoàng Linh

TS. Trịnh Cao Minh

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu và điều kiện kỹ thuật cơ bản.

- Các hoá chất được dụng theo công thức bào chế (CTBC) DD celsior [5].

- Hoá chất phân tích, kiểm nghiệm đạt tiêu chuẩn hóa chất tinh khiết phân tích.

- Cơ sở, trang thiết bị pha chế; các máy: đo pH, đo áp lực thẩm thấu, đo điện giải và những dụng cụ cần thiết khác.

2. Phương pháp nghiên cứu.

** Xác định quy cách đóng gói và kỹ thuật bào chế:*

- Xác định tính bền vững của DD: histidin, lactobionat và glutathion ở nhiệt độ tiệt khuẩn:

+ Đối với histidin và lactobionat: pha dung dịch các chất trên có pH: 6,0; 7,0 và 8,0. Ở mỗi giá trị pH, chia làm 10 mẫu, 5 mẫu để nguyên, 5 mẫu còn lại hấp tiệt khuẩn 110°C. Đo góc quay cực các mẫu dung dịch.

+ Đối với glutathion (GSH): pha 50 ml dung dịch GSH 6% (DD A), lấy 20 ml pha loãng gấp đôi và đóng lẻ thành 4 lọ 10 ml (1 lọ để nguyên, 3 lọ hấp tiệt khuẩn 110°C trong 30 phút). Lấy 30 ml DD A điều chỉnh đến pH = 7,0 bằng NaOH 5% và thêm nước vừa đủ 60 ml. Đóng lẻ dung dịch pha được thành 6 lọ x 10 ml (1 lọ để nguyên, 5 lọ hấp tiệt khuẩn 10°C trong 30 phút). Làm các thí nghiệm sau đối với tất cả mẫu thu được:

. Đo áp suất thẩm thấu.

. Làm phản ứng định tính với các thuốc thử: dung dịch iod 2%, bạc nitrat 2%, quan sát hỗn hợp bằng mắt thường sau khi làm phản ứng 3 phút.

. Định lượng GSH bằng phương pháp đo iod [1, 2, 3].

** Xác định kỹ thuật bào chế:*

Dựa vào kết quả phân tích độ ổn định của một số thành phần trong celsior ở các mục trên để xác định:

+ Quy cách đóng bao bì của chế phẩm.

+ Kỹ thuật bào chế.

** Xác định một số chỉ tiêu lý hoá của chế phẩm:*

Sau khi pha chế, xác định các chỉ tiêu sau:

- Đối với DD celsior-A:

+ Độ trong và màu sắc (DD trong, màu vàng chanh).

+ Độ vô khuẩn: theo phụ lục 10.8 - Dược điển Việt Nam III.2002 (ĐXVN III.2002).

+ Nồng độ ion Na⁺, K⁺: đo trực tiếp trên máy trên máy đo điện giải [3, 6].

+ pH DD: đo trực tiếp trên máy đo pH, ĐXVN III 2002, phụ lục 5.9.

+ Độ nhớt: ĐXVN III 2002, phụ lục 5.11.

+ Áp suất thẩm thấu: 310 - 330 mOsm/l, đo trên Osmometer.

- Đối với DD celsior-B:

+ Độ trong và màu sắc (DD trong, không màu).

+ Độ vô khuẩn: theo phụ lục 10.8 - ĐXVN III.2002.

+ Đo pH DD: đo trực tiếp trên máy đo pH, ĐXVN III 2002, phụ lục 5.9.

+ Định lượng glutathion dạng khử bằng quang phổ sau khi cho thêm thuốc thử enmall.

So sánh với mẫu chuẩn, tính kết quả theo công thức [1]:

$$\text{GSH (g/10ml)} = \frac{E_x \times m \times 20}{E_c \times 10} = E_x/E_c \times 2$$

Trong đó:

E_x : độ hấp thụ của mẫu thử đo được trên máy tại bước sóng 412 nm.

E_c : độ hấp thụ của mẫu chuẩn đo được trên máy tại bước sóng 412 nm.

m : khối lượng mẫu chuẩn GSH.

* Phương pháp xử lý số liệu:

Xử lý số liệu thực nghiệm theo phương pháp thống kê y học bằng chương trình Excel 2003. Sử dụng thuật toán so sánh số trung bình nhóm và kỳ vọng đối với cỡ mẫu nhỏ.

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

1. Kết quả xác định quy cách đóng gói và kỹ thuật bào chế.

* Kết quả xác định tính bền vững của DD: histidin, lactobionat ở nhiệt độ tiệt khuẩn:

Bảng 1: Kết quả đo góc quay cực DD lactobionat.

ĐIỀU KIỆN THỰC NGHIỆM HẤP TIỆT KHUẨN (TK)		DD LACTOBIONAT			DD HISTIDIN		
		\bar{X}	SD	SD%	\bar{X}	SD	SD%
pH = 6,0	Không TK	1,421	0,013	0,92	- 0,177	0,002	1,23
	Có TK	1,402	0,004	0,29	- 0,182	0,004	2,39
pH = 7,0	Không TK	1,411	0,003	0,36	- 0,374	0,003	0,77
	Có TK	1,403	0,009	0,63	- 0,373	0,004	1,21
pH = 8,0	Không TK	1,299	0,006	0,46	- 0,326	0,01	3,30
	Có TK	1,272	0,003	0,26	- 0,325	0,002	0,70

- Hướng quay cực của hai chất đều không thay đổi.
- Độ lớn của góc quay cực thay đổi khi giá trị pH DD thay đổi (pH < 0,001).
- Ở cùng giá trị pH, DD histidin và lactobionat không tiệt khuẩn so với có tiệt khuẩn bằng nhiệt ẩm đều có góc quay cực như nhau (pH > 0,05).

* Kết quả xác định tính bền vững của DD glutathion ở nhiệt độ tiệt khuẩn:

Bảng 2:

LÔ	THUỐC THỬ	IOD 2%	BẠC NITRAT	ÁP LỰC THÂM THẤU (n = 5)		
				\bar{X}	SD	SD%
GSH	Không TK	Mất màu iod	Không phản ứng	122,8	0,84	0,69
	Có TK	Mất màu iod	Đục*	171,0	2,45	2,45
GSH trung tính	Không TK	Mất màu iod	Không phản ứng	194,6	1,14	0,59
	Có TK	Mất màu iod	Đục*	272,0	6,21	2,29

- Cả 4 lô GSH thực nghiệm đều làm cho phản ứng làm mất màu DD iod. Iod là chất oxy hoá, vậy chất phản ứng với iod phải là chất khử. Phản ứng này cho thấy: ở cả 4 lô DD thực nghiệm đều còn GSH. Như vậy, phản ứng oxy hoá GSH bởi oxy tự nhiên ở điều kiện thường cũng như ở nhiệt độ tiệt khuẩn cần có thời gian nhất định.

- Với $AgNO_3$ chỉ có 2 lô DD GSH có hấp tiệt khuẩn cho phản ứng (DD bị đục). Phản

ứng này cho thấy: phân tử GSH có sự thay đổi sau khi hấp tiệt khuẩn.

- Áp suất thẩm thấu của DD GSH sau tiệt khuẩn bằng nhiệt ẩm tăng lên so với trước (kết quả thống kê cho thấy có sự khác biệt với $pH < 0,001$), tăng khoảng 50%. Thực nghiệm này cho thấy: trong quá trình tiệt khuẩn, phân tử GSH bị cắt thành những phân tử nhỏ hơn.

Bảng 3: Nồng độ (%) GSH trong DD các lô thực nghiệm.

LÔ		% GSH ĐƯA VÀO	NỒNG ĐỘ GSH TÌM THẤY (%)					\bar{X}	Δ	SD%
			1	2	3	4	5			
GSH	Không TK	3,0	2,95	2,95				2,95	-0,05	
	Có TK	3,0	2,38	2,32	2,29			2,33	-0,67	
GSH trung tính	Không TK	3,0	2,91	2,89				2,90	-0,1	
	Có TK	3,0	2,47	2,40	2,43	2,33	2,43	2,41	-0,59	2,16

- Nồng độ GSH tìm thấy đều thấp so với nồng độ đưa vào. Thực nghiệm này cho thấy: trong quá trình pha chế, một lượng nhỏ GSH đã bị oxy hoá thành GSSG (glutathion dạng oxy hoá).

- DD lactobionat và histidin bền vững và GSH bị phân huỷ ở nhiệt độ tiệt khuẩn. Vì vậy, phải áp dụng kỹ thuật pha chế vô khuẩn đối với DD có chứa glutathion.

* *Kết quả xác định quy trình kỹ thuật bào chế:*

- Quy cách đóng gói:

Thực nghiệm cho thấy: glutathion bị phân huỷ ở nhiệt độ tiệt khuẩn, các thành phần còn lại của DD Vina - celsior đều ổn định ở nhiệt độ tiệt khuẩn. Như vậy, trong điều kiện cơ sở pha chế hiện có, cần chia DD thành 2 đơn vị đóng gói riêng biệt, chúng tôi tạm đặt tên là celsior-A và celsior-B. Mỗi

đơn vị đóng gói có quy trình kỹ thuật bào chế riêng: celsior-A pha chế có tiệt khuẩn bằng nhiệt ẩm và celsior-B phải được pha chế vô khuẩn và lọc tiệt khuẩn. Trộn vô khuẩn với nhau thành Vina - celsior ngay trước khi sử dụng.

+ Công thức DD celsior-A 500 ml DD chứa:

Na^+ : 48 mmol; histidine: 15,3 mmol; K^+ : 7,65 mmol; glutamat: 10,2 mmol; Mg^{++} : 6,63 mmol; mannitol: 30,6 mmol; Ca^{++} : 0,1275

mmol; lactobionat: 40,8 mmol; Cl⁻: 41 mmol; pH: 7,30 ± 0,20.

+ Công thức DD celsior-B: 10 ml DD Vina - Celsior chứa: glutathion: 1,53 mmol; Na⁺: 3,0 mmol; pH: 7,30 ± 0,20.

2. Quy trình kỹ thuật bào chế.

* Quy trình kỹ thuật bào chế DD celsior-A:

- Công thức bào chế 10 lít DD celsior-A:

xít lactobionic: 292,37 gam; histidin: 47,48 gam; axit glutamic: 30,015 gam; mannitol: 111,5 gam; magnesi clorid hexahydrat: 26,92 gam; canxi clorid dihydrat: 0,375 gam; natri hydroxyd: 38,35 gam; kali clorid: 11,399 gam; nước cất pha tiêm vừa đủ: 10 lít.

- Điều kiện cơ sở kỹ thuật: pha chế trong phòng pha chế vô khuẩn đạt tiêu chuẩn GMP (WHO) dành cho các chế phẩm vô khuẩn có tiệt khuẩn sản phẩm cuối.

- Tiêu chuẩn nguyên, phụ liệu, bao bì đóng gói: các hóa chất đạt tiêu chuẩn dược dụng. Chai thủy tinh dung tích 500 ml và nút cao su y tế đã được xử lý và tiệt khuẩn, nước cất pha tiêm mới.

- Mô tả quy trình bào chế:

+ Giai đoạn 1: hòa tan dược chất.

. Pha 2000 ml DD NaOH 2,5%, xác định chính xác nồng độ NaOH (DD kiềm).

. Hoà tan 0,375 gam CaCl₂.2H₂O và 26,92 gam MgCl₂.6H₂O và 11,399 gam trong 2 lít nước cất pha tiêm (DD muối).

. Hoà tan 30,015 gam axit glutamic và 292,37 gam axit lactobionic trong 4 lít nước cất, thêm từ từ một lượng DD kiềm chứa 38 gam NaOH, hoà tan tiếp 111,5 gam mannitol và 47,48 gam histidin. Thêm từ từ, vừa thêm vừa khuấy toàn bộ DD muối.

Thêm nước đến khoảng 9,5 lít, khuấy đều.

+ Giai đoạn 2: điều chỉnh pH và thể tích: lấy khoảng 20 ml DD đã pha, đo pH. Thêm từ từ từng giọt DD NaOH 2,5% cho đến khi pH ổn định ở pH = 7,3 trong 30 phút. Tính số ml DD NaOH 2,5% phải thêm cho toàn bộ 9,5 lít DD đã pha. Thêm DD NaOH 2,5% theo tính toán, khuấy đều, để yên 10 phút và kiểm tra lại pH (pH phải ở trong khoảng 7,10 - 7,50). Thêm nước vừa đủ 10.000 ml.

+ Giai đoạn 3: lọc và đóng chai: nén lọc DD qua màng lọc 0,22 mcm, đóng chai đúng 500 ml, đẩy nút cao su, siết nút nhôm.

+ Giai đoạn 4: tiệt khuẩn 105⁰C trong 45 phút.

+ Giai đoạn 5: hoàn thành thành phẩm:

. Kiểm tra độ trong và dán nhãn theo quy chế.

. Bảo quản chế phẩm celsior-A, tránh ánh sáng ở nhiệt độ phòng.

+ Giai đoạn 6: kiểm nghiệm:

Đánh giá chất lượng theo dự thảo tiêu chuẩn cơ sở.

* Quy trình kỹ thuật bào chế dung dịch celsior-B:

- Công thức bào chế 220 ml dung dịch celsior-B: glutathion: 10,35 gam; natri hydroxyd: 2,64 gam; nước cất pha tiêm vừa đủ: 220 ml.

- Điều kiện cơ sở kỹ thuật: pha chế trong phòng pha chế đạt tiêu chuẩn GMP (WHO) cho các chế phẩm vô khuẩn, lọc tiệt khuẩn, đóng lọ trong buồng pha chế vô khuẩn.

- Tiêu chuẩn nguyên, phụ liệu, bao bì đóng gói: các hóa chất đạt tiêu chuẩn dược dụng. Tiệt khuẩn lọ thủy tinh, nút cao su, nước cất, dụng cụ lọc và tất cả các dụng cụ

pha chế trước khi thực hiện pha chế, nước cất pha tiêm mới.

- Mô tả quy trình bào chế:

+ Giai đoạn 1: pha chế thử.

+ Pha 300 ml DD NaOH 2,5%, xác định nồng độ NaOH.

+ Pha 20 ml DD CSB: hoà tan 0,9404 gam glutathion trong 5 ml nước cất pha tiêm, thêm 9/10 số ml DD NaOH 2,5% theo công thức (tính theo nồng độ thực), điều chỉnh pH = 7,30 bằng DD NaOH, thêm nước vừa đủ 20 ml, đo lại pH. Xác định số ml DD NaOH đã dùng. Tính thể tích DD NaOH cần cho vào 220 ml DD CSB.

+ Giai đoạn 2: hòa tan dược chất: hoà tan đúng 10,35 gam glutathion trong 50 ml nước cất, thêm từ từ, vừa thêm vừa khuấy số ml DD NaOH 2,5% (tính sau pha chế thử). Thêm nước vừa đủ 220 ml.

+ Giai đoạn 3: lọc tiệt khuẩn và đóng lọ: lọc dung dịch qua màng lọc 0,22 mcm và dẫn thẳng dịch lọc vào lọ đủ 10,5 ml/lọ, đậy nút cao su và siết nút nhôm.

+ Giai đoạn 4: hoàn thành chế phẩm: dán nhãn đúng quy chế, bảo quản celsior-B tránh ánh sáng ở 2 - 8°C.

+ Giai đoạn 5: kiểm nghiệm: đánh giá chất lượng chế phẩm theo tiêu chuẩn cơ sở.

* *Kết quả phân tích một số chỉ tiêu lý hoá của chế phẩm:*

- DD celsior-A:

+ DD trong, màu vàng chanh.

+ Vô khuẩn.

+ Na⁺ = 93 mmol/l; (tiêu chuẩn: 95,9 ± 4,8 mmol/l).

+ K⁺ = 14,8 mmol/l (tiêu chuẩn: 15,3 ± 0,765 mmol/l).

+ pH = 7,25; (tiêu chuẩn: 7,1 - 7,5).

- DD celsior-B:

+ DD trong, không màu.

+ Vô khuẩn.

+ pH = 7,32 (tiêu chuẩn: 7,1 - 7,5).

+ Nồng độ glutathion dạng khử: 0,475 g/10 ml (tiêu chuẩn: 0,94 - 0,047 g/10 ml).

- DD Vina-Celsior:

+ DD trong, màu vàng chanh.

+ pH = 7,28 (tiêu chuẩn: 7,1 - 7,5).

+ Độ nhớt: 1,26 (tiêu chuẩn: 1,3 ± 0,065).

+ Áp suất thẩm thấu 316 mOsm/l. (tiêu chuẩn: 310 - 330 mOsm/l).

Các tiêu chuẩn của DD Vina-Celsior trên tương đương với tiêu chuẩn của DD celsior của hãng Genzyme Pháp mà chúng tôi tham khảo [7].

Tiêu chuẩn về nồng độ chất thành phần trong DD Vina-Celsior cần được tiếp tục nghiên cứu xây dựng.

KẾT LUẬN

Đã xác định được quy cách đóng gói và quy trình kỹ thuật bào chế DD rửa và BQT Vina-Celsior. Vina-Celsior được bào chế thành 2 đơn vị thành phẩm riêng biệt celsior-A và celsior-B; celsior-A: chai 500 ml, bào chế theo quy trình pha tiêm có tiệt khuẩn sản phẩm cuối bằng nhiệt ẩm; celsior-B: lọ 10 ml, bào chế trong điều kiện vô khuẩn và lọc tiệt khuẩn.

Sơ bộ đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng của Vina-Celsior và các đơn vị thành phẩm celsior-A, celsior-B, các tiêu chuẩn: cảm quan,

lý, hoá và vi sinh của các sản phẩm đều đạt theo dự thảo tiêu chuẩn cơ sở.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Phan Văn Bình, Nguyễn Hưng Phúc, Trần Thế Tăng. Nghiên cứu định lượng glutathion trong dung dịch Wisconsin-B bằng phương pháp quang phổ VIS. Tạp chí Y-Dược học quân sự. Học viện Quân y. 2003, (5), tr.13-16.

2. Phan Văn Bình, Nguyễn Hưng Phúc, Trần Thế Tăng. Ảnh hưởng của khí oxy đối với độ ổn định của dung dịch glutathion. Tạp chí Dược học. Bộ Y tế. 2003, (8), tr.22-24.

3. Phan Văn Bình. Nghiên cứu bào chế và xây dựng tiêu chuẩn kiểm nghiệm dung dịch Wisconsin-V. Luận án Tiến sỹ Dược học. 2004.

4. Astier A, Paul M. Instability of reduced glutathione in commercial Benzer cold storage solution. Lancet (2). 1989, pp.556-557.

5. Budavari Susan et al. The Merck Index. 14th Edition. 2004.

6. D. Pereda, M. Castella. Elective cardiac surgery using Celsior or St. Thomas No. 2 solution: a prospective, single-center, randomized pilot study. Eur J Cardiothorac Surg, 2007, September 1, 32 (3), pp.501-506.

7. Genzyme corporation. Celsior® Cold Storage Solution (Direction for preparation and use). 2007.

