BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ QUỐC PHÒNG

**HỌC VIỆN QUÂN Y**

TRẦN QUANG TRUNG

**NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ VIÊN NIFEDIPIN GIẢI PHÓNG KÉO DÀI THEO CƠ CHẾ BƠM THẨM THẤU**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC**

**HÀ NỘI - NĂM 2021**

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ QUỐC PHÒNG

**HỌC VIỆN QUÂN Y**

TRẦN QUANG TRUNG

**NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ VIÊN NIFEDIPIN GIẢI PHÓNG KÉO DÀI THEO CƠ CHẾ BƠM THẨM THẤU**

Chuyên ngành: CÔNG NGHỆ DƯỢC PHẨM VÀ BÀO CHẾ THUỐC

Mã số: 9720202

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC**

Hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Trịnh Văn Lẩu

2. GS.TS. Nguyễn Thanh Hải

**HÀ NỘI - NĂM 2021**

**LỜI CẢM ƠN**

*Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc*:

***PGS. TS. Trịnh Văn Lẩu***

***GS. TS. Nguyễn Thanh Hải***

Người thầy đã tận tình hướng dẫn và hết lòng giúp đỡ tôi trong thời gian thực hiện luận án vừa qua.

Tôi xin chân thành cảm ơn **PGS. TS. Trịnh Nam Trung** cùng toàn thể các đồng nghiệp, các anh chị em kỹ thuật viên Viện Đào tạo Dược \_ Học viện Quân y đã nhiệt tình giúp đỡ, tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành luận án này.

Trân trọng cảm ơn sự giúp đỡ, tạo điều kiện của **GS.TS. Phạm Thị Minh Huệ** và các thầy cô giáo cùng các anh chị kỹ thuật viên Bộ môn Bào chế \_ Trường Đại học Dược Hà Nội.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của Đại học Y Dược \_ Trường Đại học Quốc gia Hà Nội, Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc Gia, Viện Nghiên cứu Y – Dược học Quân sự, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung Ương, Trung tâm kiểm nghiệm thuốc, mỹ phẩm, thực phẩm Hà Nội, Công ty Cổ phần Dược phẩm Traphaco, Công ty CPDP Hà Tây đã tạo điều kiện giúp tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban Giám đốc – Học viện Quân y, GS. TS Nguyễn Lĩnh Toàn, TS. Đào Hồng Dương cùng các chuyên viên phòng Đào tạo sau đại học đã quan tâm giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin cảm ơn những người thân trong gia đình, bạn bè và đồng nghiệp đã luôn động viên và tạo điều kiện để tôi hoàn thành luận án.

*Hà Nội*, *ngày tháng năm*2021

**Trần Quang Trung**

**LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào.

**Tác giả**

**Trần Quang Trung**

**MỤC LỤC**

**Trang phụ bìa**

**Lời cảm ơn**

**Lời cam đoan**

**Mục lục**

**Danh mục chữ viết tắt**

**Danh mục bảng**

**Danh mục hình**

[ĐẶT VẤN ĐỀ 1](#_Toc78181376)

[CHƯƠNG 1.](#_Toc78181377) [TỔNG QUAN 3](#_Toc78181378)

[1.1. TỔNG QUAN VỀ NIFEDIPIN 3](#_Toc78181379)

[1.1.1. Công thức, tên khoa học 3](#_Toc78181380)

[1.1.2. Tính chất lý hóa 3](#_Toc78181381)

[1.1.3. Phương pháp định lượng 4](#_Toc78181382)

[1.1.4. Dược động học 5](#_Toc78181383)

[1.1.5. Tác dụng dược lý 5](#_Toc78181384)

[1.1.6. Chỉ định, liều dùng 5](#_Toc78181385)

[1.1.7. Tác dụng không mong muốn 6](#_Toc78181386)

[1.1.8. Một số chế phẩm chứa nifedipin trên thị trường Việt Nam 6](#_Toc78181387)

[1.1.9. Một số nghiên cứu về hệ thuốc giải phóng kéo dài chứa nifedipin 7](#_Toc78181388)

[1.2. THUỐC GIẢI PHÓNG KÉO DÀI THEO CƠ CHẾ BƠM THẨM 18](#_Toc78181397)

[THẤU KÉO – ĐẨY 18](#_Toc78181398)

[1.2.1. Cấu tạo và cơ chế giải phóng dược chất 18](#_Toc78181399)

[1.2.2.Ưu nhược điểm 20](#_Toc78181402)

[1.2.3. Thành phần cấu tạo 21](#_Toc78181403)

[1.3. NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG VÀ TƯƠNG ĐƯƠNG SINH HỌCCÁC CHẾ PHẨM CHỨANIFEDIPIN 25](#_Toc78181404)

[1.3.1. Các nghiên cứu đánh giá khả năng giải phóng *in vitro* 25](#_Toc78181405)

[USP 38 trong chuyên luận viên nén NIF GPKD quy định 8 test thử hòa tan cho viên nén NIF GPKD. 27](#_Toc78181406)

[1.3.2. Nghiên cứu sinh khả dụng *in vivo* 27](#_Toc78181407)

[CHƯƠNG 2.](#_Toc78181408) [ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 33](#_Toc78181409)

[2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU 33](#_Toc78181410)

[2.1.1. Nguyên liệu, hóa chất 33](#_Toc78181411)

[2.1.2. Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu 34](#_Toc78181412)

[2.1.3. Thuốc đối chiếu và thuốc thử 36](#_Toc78181413)

[2.1.4. Động vật thí nghiệm 36](#_Toc78181414)

[2.1.5. Địa điểm nghiên cứu và thời gian thực hiện 36](#_Toc78181415)

[2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 36](#_Toc78181416)

[2.2.1. Phương pháp nghiên cứu xây dựng công thức bào chế 36](#_Toc78181417)

[2.2.2. Phương pháp bào chế 39](#_Toc78181422)

[2.2.3. Thẩm định quy trình bào chế viên nén nifedipin 30 mg dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy ở quy mô 2000 viên/mẻ 44](#_Toc78181423)

[2.2.4. Phương pháp đánh giá tiêu chuẩn chất lượng 44](#_Toc78181424)

[2.2.5. Phương pháp đánh giá độ ổn định 49](#_Toc78181425)

[2.2.6. Phương pháp đánh giá sinh khả dụng viên nén nifedipin 30 mg giải phóng kéo dài trên chó thực nghiệm 50](#_Toc78181426)

[2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu 59](#_Toc78181427)

[CHƯƠNG 3.](#_Toc78181428) [KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU 60](#_Toc78181429)

[3.1.KẾT QUẢ XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG NIFEDIPIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO 60](#_Toc78181430)

[3.1.1. Xây dựng phương pháp định lượng nifedipin bằng phương pháp HPLC 60](#_Toc78181431)

[3.1.2.Thẩm định phương pháp định lượng nifedipin bằng phương pháp HPLC 62](#_Toc78181432)

[3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG CÔNG THỨC BÀO CHẾ 65](#_Toc78181433)

[3.2.1. Kết quả đánh giá tương tác dược chất – tá dược 65](#_Toc78181434)

[3.2.2. Kết quả đánh giá độ ổn định với ánh sáng của nifedipin trong các môi trường 66](#_Toc78181435)

[3.2.3. Kết quả thử độ hòa tan của viên đối chiếu 69](#_Toc78181436)

[3.3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG CÔNG THỨC VIÊN NIFEDIPIN GIẢI PHÓNG KÉO DÀI THEO CƠ CHẾ BƠM THẨM THẤU KÉO – ĐẨY 70](#_Toc78181437)

[3.3.1. Nghiên cứu xây dựng công thức viên nhân 71](#_Toc78181438)

[3.3.2. Nghiên cứu xây dựng công thức màng bao thẩm thấu 75](#_Toc78181439)

[3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của đường kính miệng giải phóng đến tốc độ giải phóng thuốc 78](#_Toc78181440)

[3.4. KẾT QUẢ XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH BÀO CHẾ VIÊN NÉN NIFEDIPINDẠNG BƠM THẨM THẤU KÉO – ĐẨY QUY MÔ 2000 VIÊN/MẺ 80](#_Toc78181441)

[3.4.1. Mô tả quy trình bào chế viên nén nifedipin 30mg dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy ở quy mô 2000 viên/mẻ 80](#_Toc78181442)

[3.4.2. Thẩm định quy trình bào chế viên nén nifedipin 30mg dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy ở quy mô 2000 viên/mẻ 82](#_Toc78181443)

[3.5. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘ ỔN ĐỊNH VIÊN NÉN NIFEDIPIN THẨM THẤU KÉO –ĐẨY 90](#_Toc78181445)

[3.5.1. Kết quả nghiên cứu xây dựng một số chỉ tiêu chất lượng viên nifedipin dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy 90](#_Toc78181446)

[3.5.2. Kết quả đánh giá độ ổn định 92](#_Toc78181447)

[3.6. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG VIÊN NÉN NIFEDIPIN THẨM THẤU KÉO – ĐẨY 95](#_Toc78181448)

[3.6.1. Kết quả đánh giá tương đương hòa tan *in vitro* 95](#_Toc78181449)

[3.6.2. Kết quả thẩm định phương pháp UPLC-MS/MS để định lượng nifedipin trong huyết tương chó 96](#_Toc78181450)

[3.6.3. Kết quả đánh giá sinh khả dụng của viên nén nifedipin 30 mg thẩm thấu kéo – đẩy trên chó thực nghiệm 109](#_Toc78181451)

[CHƯƠNG 4.](#_Toc78181452) [BÀN LUẬN 117](#_Toc78181453)

[4.1. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ 117](#_Toc78181454)

[4.1.1. Lựa chọn dạng giải phóng kéo dài 117](#_Toc78181455)

[4.1.2. Xây dựng công thức bào chế 120](#_Toc78181456)

[4.1.3. Xây dựng quy trình bào chế viên nifedipin giải phóng kéo dài 131](#_Toc78181457)

[4.2. XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ ĐỘ ỔN ĐỊNH VIÊN NÉN NIFEDIPIN30MG GIẢI PHÓNG KÉO DÀI 134](#_Toc78181458)

[4.2.1. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở 134](#_Toc78181459)

[4.2.2. Đánh giá độ ổn định 134](#_Toc78181462)

[4.3. BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG 135](#_Toc78181467)

[4.3.1. Kết quả xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép nối khối phổ 2 lần để định lượng nifedipin trong huyết tương chó 135](#_Toc78181468)

[4.3.2. Sinh khả dụng viên nén nifedipin 30mg giải phóng kéo dài 140](#_Toc78181471)

[KẾT LUẬN 144](#_Toc78181483)

[KIẾN NGHỊ 146](#_Toc78181484)

[TÀI LIỆU THAM KHẢO](#_Toc78181485)

**PHỤ LỤC**

**DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT TRONG LUẬN ÁN**

| **TT** | **Phần viết tắt** | **Phần viết đầy đủ** |
| --- | --- | --- |
| 1 | ACN | Acetonitril |
| 2 | ASTT | Áp suất thẩm thấu |
| 3 | AUC | Area Under the Curve |
|  |  | (Diện tích dưới đường cong – thời gian) |
| 4 | AUMC | Area under the first moment curve |
|  |  | (Diện tích dưới đường cong × thời gian – thời gian) |
| 5 | CA | Cellulose acetat |
| 6 | CS | Cộng sự |
| 7 | CV | Coefficient of Variation |
|  |  | (Hệ số biến thiên) |
| 8 | DC | Dược chất |
| 9 | DĐH | Dược động học |
| 10 | DĐVN | Dược điển Việt Nam |
| 11 | EC | Ethyl cellulose |
| 12 | EOP | Elementary Osmotic Pump |
|  |  | (Hệ bơm thẩm thấu quy ước) |
| 13 | FDA | Food and Drug Administration |
|  |  | (Cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm Mỹ) |
| 14 | GLI | Glibenclamid |
| 15 | GPKD | Giải phóng kéo dài |
| 16 | GPKS | Giải phóng có kiểm soát |
| 17 | GPTN | Giải phóng theo nhịp |
| 18 | HPLC | High performance liquid chromatography |
|  |  | (Sắc ký lỏng hiệu năng cao) |
| 19 | HPTR | Hệ phân tán rắn |
| 20 | HPMC | Hydroxy propyl methyl celulose |
| 21 | HQC | High quality control sample |
|  |  | (Mẫu kiểm tra nồng độ cao) |
| 22 | IPA | Isopropyl alcohol |
| 23 | IS | Internal standard |
|  |  | (Chuẩn nội) |
| 24 | KL/KL | Khối lượng/khối lượng |
| 25 | KLMB | Khối lượng màng bao |
| 26 | KLPT | Khối lượng phân tử |
| 27 | KLR | Khối lượng riêng |
| 28 | KLRBK | Khối lượng riêng biểu kiến |
| 29 | KLTB | Khối lượng trung bình |
| 30 | KTTP | Kích thước tiểu phân |
| 31 | LC | Liquid chromatography |
|  |  | (Sắc ký lỏng) |
| 32 | LLOQ | Lower limit of quantification |
|  |  | (Giới hạn định lượng dưới) |
| 33 | LOD | Limit of detection |
|  |  | (Giới hạn phát hiện) |
| 34 | LOQ | Limit of quantification |
|  |  | (Giới hạn định lượng) |
| 35 | LQC | Low quality control sample |
|  |  | (Mẫu kiểm tra nồng độ thấp) |
| 36 | MCC | Microcrystalline cellulose |
| 37 | MeOH | Methanol |
| 38 | MOTS | Monolithic osmotic tablet system |
|  |  | (Hệ viên nén thẩm thấu đồng nhất) |
| 39 | MQC | Medium quality control sample |
|  |  | (Mẫu kiểm tra nồng độ trung bình) |
| 40 | MS | Mass Spectrometry |
|  |  | (Khối phổ) |
| 41 | MRT | Mean residence time |
|  |  | (Thời gian lưu trú trung bình của 1 phân tử thuốc) |
| 42 | NIF | Nifedipin |
| 43 | PEG | Polyethylen glycol |
| 44 | PEO | Polyethylen Oxid |
| 45 | PPOP | Push – Pull Osmotic Pump |
|  |  | (Bơm thẩm thấu kéo đẩy) |
| 46 | PVP | Polyvinyl Pyrrolidon |
| 47 | RSD | Relative Standard Deviation |
|  |  | (Độ lệch chuẩn tương đối) |
| 48 | SCMC | Sodium carboxymethylcellulose |
|  |  | (Natri carboxymethylcelulose) |
| 49 | SD | Standard Deviation |
|  |  | (Độ lệch chuẩn) |
| 50 | SEOP | Swellable Elementary Osmotic Pump |
|  |  | (Bơm thẩm thấu trương nở sơ cấp) |
| 51 | SKD | Sinh khả dụng |
| 52 | SLS | Sodium Lauryl Sulfat |
|  |  | (Natri lauryl sulfat) |
| 53 | SOTS | Sandwiched Osmotic Tablet System |
|  |  | (Viên thẩm thấu dạng sandwich) |
| 54 | SSG | Sodium starch glycolat |
|  |  | (Natri starch glycolat) |
| 55 | TD | Tá dược |
| 56 | TDKMM | Tác dụng không mong muốn |
| 57 | TĐSH | Tương đương sinh học |
| 58 | Tlag | Lag time |
|  |  | (Thời gian tiềm tàng) |
| 59 | UPLC-MS/MS | Ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection |
|  |  | (Sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép nối khối phổ 2 lần) |
| 60 | USP | The United States Pharmacopoeia |
|  |  | (Dược điển Mỹ) |
| 61 | v/v | Volume/volume |
|  |  | (Thể tích/thể tích) |
| 62 | WHO | World Health Organisation |
|  |  | (Tổ chức Y tế thế giới) |

**DANH MỤC BẢNG**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Bảng** | **Tên bảng** | **Trang** |

[1.1. Một số chế phẩm chứanifedipin 6](#_Toc73519390)

[2.1. Các nguyên liệu và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu 33](#_Toc73519391)

[2.2. Các thiết bị bào chế và sản xuất 34](#_Toc73519392)

[2.3. Các thiết bị và dụng cụ đánh giá 35](#_Toc73519393)

[2.4. Các thông số của detector khối phổ để định tính, định lượng](#_Toc73519394)[nifedipin và chuẩn nội glibenclamid 51](#_Toc73519395)

[2.5. Mô hình thử thuốc trên chó thí nghiệm 56](#_Toc73519396)

[3.1. Kết quả khảo sát hiệu lực cột 60](#_Toc73519398)

[3.2. Kết quả khảo sát thành phần pha động 61](#_Toc73519399)

[3.3. Kết quả khảo sát tỷ lệ thành phần pha động MeOH:nước 61](#_Toc73519400)

[3.4. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống 62](#_Toc73519401)

[3.5. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp 63](#_Toc73519403)

[3.6. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian 64](#_Toc73519404)

[3.7. Kết quả khảo sát độ đúng 64](#_Toc73519405)

[3.8. Sự phân hủy của nifedipin trong dung dịch đệm pH 7,5 67](#_Toc73519406)

[3.9. Sự phân hủy của nifedipin trong môi trường pH 1,2 chứa 0,5% SLS 68](#_Toc73519408)

[3.10. Tỷ lệ (%) nifedipin giải phóng từ viên đối chiếu 69](#_Toc73519409)

[3.11. Các mẫu viên nifedipin với các loại polymer khác nhau](#_Toc73519410)[trong lớp dược chất và lớp đẩy 71](#_Toc73519411)

[3.12. Công thức lớp dược chất của viên nifedipin thẩm thấu với tỷ lệ natri cloridkhác nhau 73](#_Toc73519412)

[3.13. Công thức lớp đẩy của viên nifedipin thẩm thấu với tỷ lệ natri clorid khác nhau 74](#_Toc73519413)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Bảng** | **Tên bảng** | **Trang** |

[3.14. Công thức màng bao viên với các tỷ lệchất hóa dẻo so với khối lượng celulose acetat khác nhau 75](#_Toc73519414)

[3.15. Công thức màng bao viên với tỷ lệ chất hóa dẻo so với khối lượng celulose acetatlà 10% 77](#_Toc73519415)

[3.16. Công thức cho mẻ 2000 viên 80](#_Toc73519417)

[3.17. Phân bố kích thước tiểu phân nguyên liệu nifedipin 82](#_Toc73519418)

[3.18. Độ đồng đều hàm lượng nifedipin khi trộn bột kép lớp dược chất ở quy mô 2000 viên/mẻ 83](#_Toc73519419)

[3.19. Tỷ trọng bột lớp đẩy sau khi trộn bột kép ở quy mô 2000 viên/mẻ 83](#_Toc73519420)

[3.20. Độ ẩm của hạt lớp dược chất với thời gian sấy khác nhau ở quy mô 2000 viên/mẻ 84](#_Toc73519421)

[3.21. Độ ẩm của hạt lớp đẩy với thời gian sấy khác nhau ở quy mô 2000 viên/mẻ 84](#_Toc73519422)

[3.22. Phân bố kích thước hạt lớp dược chất sau khi trộn hoàn tất ở quy mô 2000 viên/mẻ 85](#_Toc73519423)

[3.23. Một số đặc tính hạt lớp dược chất sau khi trộn hoàn tất ở quy mô 2000 viên/mẻ 85](#_Toc73519424)

[3.24. Phân bố kích thước hạt lớp đẩy sau khi trộn hoàn tất ở quy mô 2000 viên/mẻ 85](#_Toc73519425)

[3.25. Một số đặc tính hạt lớp đẩy sau khi trộn hoàn tất ở quy mô 2000 viên/mẻ 85](#_Toc73519426)

[3.26. Đặc tính của viên tại các thời điểm với tốc độ dập 1(2,5vòng/phút) ở quy mô 2000 viên/mẻ 86](#_Toc73519427)

[3.27. Đặc tính của viên tại các thời điểm với tốc độ dập 2 (5 vòng/phút) ở quy mô 2000 viên/mẻ 86](#_Toc73519428)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Bảng** | **Tên bảng** | **Trang** |

[3.28. Đặc tính của viên tại các thời điểm với tốc độ dập 3 (10 vòng/phút) ở quy mô 2000 viên/mẻ 87](#_Toc73519429)

[3.29. Ảnh hưởng của 1 số thống số của quy trình bao đến độ đồng đều khối lượng màng bao 88](#_Toc73519430)

[3.30. Kết quả khảo sát thông số khoan miệng giải phóng dược chất 89](#_Toc73519431)

[3.31. Một số đặc tính của hạt lớp dược chất và lớp đẩy ở quy mô 2000 viên/mẻ 89](#_Toc73519432)

[3.32. Một số đặc tính của viên nhân và viên thẩm thấu ở quy mô 2000 viên/mẻ 90](#_Toc73519433)

[3.33. Độ đồng đều khối lượng của 3 mẻ viên bao 91](#_Toc73519434)

[3.34. Kết quả độ hòa tan của 3 mẻ nghiên cứu 91](#_Toc73519435)

[3.35. Hàm lượng nifedipin (%) của 3 mẻ nghiên cứu 91](#_Toc73519436)

[3.36. Đề xuất một số tiêu chuẩn chất lượng cho viên nén](#_Toc73519437)[nifedipin 30 mg giải phóng kéo dài 92](#_Toc73519438)

[3.37. Hàm lượng nifedipin (%) của 3 mẻ ở điều kiện lão hóa cấp tốc 93](#_Toc73519473)

[3.38. Hàm lượng nifedipin (%) của 3 mẻ ở điều kiện thực 93](#_Toc73519475)

[3.39. Hàm lượng tạp chất (%) của 3 mẻsau 3 tháng ở điều kiện lão hóa cấp tốc 94](#_Toc73519477)

[3.40. Hàm lượng tạp chất (%) của 3 mẻsau 6 tháng ở điều kiện lão hóa cấp tốc 94](#_Toc73519478)

3.41. Hàm lượng tạp chất (%) của 3 mẻ sau 12 tháng ở điều kiện thực 94

[3.42. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ viên thử và viên đối chiếu ở 3 môi trường hòa tan 95](#_Toc73519479)

[3.43. Kết quả kiểm tra sự phù hợp của hệ thống UPLC-MS/MS 96](#_Toc73519480)

[3.44. Ảnh hưởng của mẫu trắng tại thời gian lưu của nifedipin và](#_Toc73519481)[chuẩn nội glibenclamid 98](#_Toc73519482)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Bảng** | **Tên bảng** | **Trang** |

[3.45. Độ đúng của các mẫu chuẩn 99](#_Toc73519489)

[3.46. Đáp ứng mẫu zero so với LLOQ 100](#_Toc73519490)

[3.47. Kết quả xác định giá trị LLOQ của phương pháp 101](#_Toc73519491)

[3.48. Kết quả khảo sát độ đúng, độ chính xác trong ngày 101](#_Toc73519522)

[3.49. Kết quả khảo sát độ đúng, độ chính xác khác ngày 102](#_Toc73519523)

[3.50. Kết quả khảo sát tỷ lệ thu hồi của NIF và chuẩn nội GLI 103](#_Toc73519524)

[3.51. Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu 104](#_Toc73519525)

[3.52. Kết quả đánh giá độ nhiễm chéo 104](#_Toc73519526)

[3.53. Độ ổn định dung dịch chuẩn nội làm việc 105](#_Toc73519527)

[3.54. Độ ổn định của mẫu huyết tương sau 3 chu kỳ đông – rã đông 106](#_Toc73519528)

[3.55. Độ ổn định của mẫu huyết tương ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ 107](#_Toc73519529)

[3.56. Độ ổn định của mẫu sau xử lý trong autosampler 107](#_Toc73519530)

[3.57. Độ ổn định dài ngày của mẫu huyết tương 108](#_Toc73519531)

[3.58. Nồng độ nifedipin trong huyết tương chó sau khi uống liều đơn thuốc thử (T) 109](#_Toc73519532)

[3.59. Nồng độ nifedipin trong huyết tương chó sau khi uống liều đơn thuốc đối chiếu (R) Adalat LA 30 mg 110](#_Toc73519533)

[3.60. Các thông sốdược động học của chế phẩm thử 112](#_Toc73519534)

[3.61. Các thông sốdược động học của chế phẩm đối chiếu 112](#_Toc73519535)

[3.62. Phân tích phương sai với biến phụ thuộc là ln[Cmax] 113](#_Toc73519536)

[3.63. Phân tích phương sai với biến phụ thuộc là ln[AUC0-∞] 114](#_Toc73519537)

[3.64. Phân tích phương sai với biến phụ thuộc là ln[MRT] 115](#_Toc73519538)

[3.65. So sánh giá trị Tmax theo phương pháp thống kê phi tham số 116](#_Toc73519539)

**DANH MỤC HÌNH**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Hình** | **Tên hình** | **Trang** |

[1.1. Cấu tạo bơm thẩm thấu kéo - đẩy 19](#_Toc73520438)

[1.2. Quá trình giải phóng dược chất của bơm thẩm thấu kéo - đẩy 19](#_Toc73520440)

[3.1. Phổ hấp thụ tử ngoại của dung dịch NIF chuẩn 150 µg/mL 60](#_Toc73520442)

[3.2. Đường chuẩn của nifedipin trong pha động MeOH 63](#_Toc73520443)

[3.3. Đồ thị biểu diễn sự phân hủy của nifedipin](#_Toc73520444) [trong môi trường pH 7,5. 67](#_Toc73520445)

[3.4. Đồ thị biểu diễn sự phân hủy của nifedipin trong môi trường](#_Toc73520446)[pH 1,2chứa 0,5% SLS. 68](#_Toc73520447)

[3.5. Đồ thị giải phóng của viên đối chiếu Adalat LA. 70](#_Toc73520449)

[3.6. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các mẫu viên có các loại polymer khác nhau trong lớp dược chất và lớp đẩy viên bào chế và viên đối chiếu 72](#_Toc73520451)

[3.7. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các mẫu viên có tỷ lệ natri clorid khác nhautrong lớp dược chất viên bào chế và viên đối chiếu 73](#_Toc73520452)

[3.8. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các mẫu viên có tỷ lệ natri clorid khác nhau trong lớp đẩy viên bào chế và viên đối chiếu 74](#_Toc73520453)

[3.9. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các viên bao có các tỷ lệ chất hóa dẻo PEG 4000 khác nhau 76](#_Toc73520454)

[3.10. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các mẫu viên có độ dày màng bao](#_Toc73520455)[khác nhau 77](#_Toc73520456)

[3.11. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các mẫu viên có độ dày màng bao 10%, 12% và có đường kính miệng giải phóng khác nhau 78](#_Toc73520457)

[3.12. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng 97](#_Toc73520460)

[3.13. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng có pha chuẩn nifedipin ở nồng độ LLOQ (0,5 ng/mL) và chuẩn nội glibenclamid (40 ng/mL) 97](#_Toc73520461)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Hình** | **Tên hình** | **Trang** |

[3.14. Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ nifedipin và tỷ lệ diện tích pic NIF/GLI trong các ngày khác nhau 99](#_Toc73520462)

[3.15. Đường cong nồng độ thuốc trung bình theo thời gian của 6 cá thể chó sau khi uống liều đơn thuốc thử và thuốc đối chiếu 110](#_Toc73520463)

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, xu hướng tập trung đầu tư nghiên cứu lĩnh vực bào chế nhằm nâng cao chất lượng dạng thuốc và đưa ra các chế phẩm bào chế mới từ các dược chất gốc ngày càng phát triển. Trên cơ sở cải tiến nhằm nâng cao chất lượng của các dạng thuốc quy ước, nhiều thế hệ các dạng thuốc mới đã được đưa ra thị trường. Thuốc giải phóng kéo dài ra đời từ những năm 50 [[1](#_ENREF_1)] của thế kỷ XX, đến nay nó đang được phát triển mạnh mẽ với nhiều đặc tính ưu việt.

Thuốc giải phóng kéo dài dưới dạng bơm thẩm thấu (hay còn gọi là thuốc giải phóng có kiểm soát, hệ điều trị trong đường tiêu hóa) đã thu hút được sự quan tâm lớn của các nhà nghiên cứu và điều trị trong suốt 30 năm qua do có khả năng giải phóngthuốc với tốc độ không phụ thuộc vào pH và thủy động lực học của môi trường hòa tan [[2](#_ENREF_2)], dự đoán tốc độ giải phóng thuốc *in vivo* dựa trên các dữ liệu *in vitro* [[3](#_ENREF_3)], tránh được hiện tượng đỉnh – đáy, giảm số lần dùng thuốc qua đó cải thiện được sự tuân thủ điều trị của người bệnh và mang lại rất nhiều lợi ích so với các dạng thuốc giải phóng kéo dài dạng cốt, đặc biệt đối với các dược chất khó tan, nhiều tác dụng không mong muốn.

Nifedipin là thuốc chẹn kênh calci thuộc nhóm dihydropyridin, được biết đến là 1 thuốc điều trị các bệnh tim mạch, lần đầu tiên được đưa vào lâm sàng để điều trị suy tĩnh mạch vành từ năm 1969 [[4](#_ENREF_4)], nhưng chủ yếu dùng để điều trị bệnh tăng huyết áp, chứng đau thắt ngực có hiệu quả và được dung nạp tốt [[5](#_ENREF_5)], [[6](#_ENREF_6)], [[7](#_ENREF_7)]. Nifedipin được hấp thu nhanh và hoàn toàn qua đường tiêu hóa. Tuy nhiên, nifedipinkhông tan trong nước, thời gian bán thải ngắn khoảng 2 - 4 giờ [[8](#_ENREF_8)], hiện nay dạng thuốc giải phóng ngay và giải phóng kéo dàidạng cốt ít được chỉ định trong lâm sàng do có nhiều tác dụng không mong muốn, nồng độ thuốc trong huyết tương không ổn định dẫn đến khó khăn trong việc kiểm soát những cơn tăng huyết áp và đau thắt ngực trên lâm sàng. Viên giải phóng kéo dài dạng bơm thẩm thấu áp dụng cho nifedipin chưa được nghiên cứu toàn diện và đưa vào sản xuất ở trong nước dẫn tới không sử dụng được hiệu quả dược chất này.

Xuất phát từ thực tế trên, tiến hành đề tài luận án: “**Nghiên cứu bào chế viên nifedipin giải phóng kéo dài theo cơ chế bơm thẩm thấu**” với các mục tiêu sau:

1. Xây dựng được công thức, quy trình bào chế viên nén nifedipin 30mg giải phóng kéo dài 24 giờ ở quy mô 2000 viên/mẻ.
2. Xây dựng được tiêu chuẩn chất lượng và bước đầu đánh giá được độ ổn định của viên nén nifedipin 30 mg giải phóng kéo dài.
3. Bước đầu đánh giá được sinh khả dụng của viên nén nifedipin 30 mg giải phóng kéo dài trên chó thực nghiệm.

CHƯƠNG 1

TỔNG QUAN

1.1. TỔNG QUAN VỀ NIFEDIPIN

1.1.1. Công thức, tên khoa học

- Công thức phân tử: C17H18N2O6

- Khối lượng phân tử (KLPT): 346,3

- Công thức cấu tạo:



\**Nguồn: Bộ Y tế (2017*)[[9](#_ENREF_9)]

- Tên khoa học: dimethyl2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-1,4 -dihydropyridin-3,5-dicarboxylat.

1.1.2. Tính chất lý hóa

- Bột màu vàng, thực tế không tan trong nước. Nhiệt độ nóng chảy: 171 - 1750C. Ở 200C, nifedipin (NIF) có độ tan trong aceton là 250g/l, methylen clorid là 160g/l, cloroform là 140g/l, ethylacetat là 50g/l, methanol (MeOH) là 26g/l. Ở 37C, độ tan của NIF trong các dung dịch đệm có pH khác nhau như sau: pH 4 (0,0058 g/l), pH 7 (0,0056 g/l), pH 9 (0,0078 g/l), pH 13 (0,006 g/l) [[10](#_ENREF_10)].



- NIF thuộc phân nhóm II theo hệ thống phân loại sinh dược học với đặc tính độ tan kém, tính thấm tốt nên dẫn đến sinh khả dụng (SKD) đường uống thấp mặc dù NIF được hấp thu nhanh trong đường tiêu hóa. Do đó, khi xây dựng công thức viên NIF giải phóng kéo dài (GPKD) không chỉ tập trung vào vấn đề kéo dài giải phóngthuốcmà còn cần phải cải thiện độ hòa tan và khả năng hấp thu trong đường tiêu hóa.

- Độ ổn định đối với ánh sáng và nhiệt độ: NIF không bền với ánh sáng khi ở trạng thái rắn và rất không bền khi ở dạng dung dịch [[11](#_ENREF_11)]. Sự phân hủy bởi ánh sáng phụ thuộc vào cường độ và độ dài của sóng ánh sáng[[11](#_ENREF_11)]. Dưới tác dụng của ánh sáng ban ngày và các bước sóng nhất định của ánh sáng nhân tạo, NIF bị phân hủy thành dẫn chất nitrosophenylpyridin. Khi tiếp xúc với ánh sáng tử ngoại thì sản phẩm phân hủy là dẫn xuất nitrophenylpyridin. Do đó, tất cả các thí nghiệm với dung dịch NIF như là khi thử nghiệm hòa tan với dạng thuốc GPKD cần thử trong nhiều giờ phải được tiến hành trong bóng tối hoặc dưới ánh sáng có bước sóng lớn hơn 450nm, tốt nhất là ánh sáng đỏ (bước sóng 630 – 760nm). Cũng có thể sử dụng ánh sáng vàng của đèn natri (bước sóng khoảng 589nm).NIF không nên bảo quản ở nhiệt độ trên 250C.

1.1.3. Phương pháp định lượng

Định lượng NIF trong nguyên liệu và chế phẩm:

- Phương pháp hóa học [[12](#_ENREF_12)].

- Phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại: NIF có 2 cực đại hấp thụ là 236nm và 350nm. Phương pháp này được ứng dụng để định lượng hoạt chất trongviên nén[[13](#_ENREF_13)] và xác định tốc độ giải phóng dược chất (DC) từ viên nang [[14](#_ENREF_14)], viên GPKD[[15](#_ENREF_15)], [[16](#_ENREF_16)], [[17](#_ENREF_17)].Ngoài ra, có thể tạo dẫn xuất có màu của NIF để đo quang trong vùng khả kiến[[18](#_ENREF_18)], [[19](#_ENREF_19)].

- Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC): định lượng NIF trong nguyên liệu, viên nang, viên nén GPKD [[14](#_ENREF_14)], định lượng trong viên nén [[20](#_ENREF_20)].

Ngoài ra có thể định lượng NIF trong dịch sinh học bằng các phương pháp như: HPLC, sắc ký khí[[21](#_ENREF_21)],[[22](#_ENREF_22)], [[23](#_ENREF_23)], [[24](#_ENREF_24)].

1.1.4. Dược động học

NIF được hấp thu nhanh trong đường tiêu hóa, tuy nhiên, SKD thấp (45-75%) do bị chuyển hóa qua gan lần đầu mạnh [[5](#_ENREF_5)]. Tỷ lệ NIF gắn với protein huyết tương cao (92-98%)[[5](#_ENREF_5)], chuyển hóa gần như hoàn toàn ở gan thành chất không có hoạt tính. NIF được thải trừ chủ yếu qua nước tiểu (80%), ngoài ra qua phân và mật (20%) [[5](#_ENREF_5)], [[7](#_ENREF_7)].

1.1.5. Tác dụng dược lý

NIF chủ yếu có tác dụng chống tăng huyết áp, ngoài ra còn chống cơn đau thắt ngực và điều trị bệnh Raynaud[[5](#_ENREF_5)].

Cơ chế tác dụng của NIF là ức chế chọn lọc dòng ion calci đi vào trong tế bào bằng cách tương tác đặc hiệu với kênh calci ở màng tế bào, mà không làm thay đổi nồng độ ion calci trong máu. Do giảm nồng độ calci trong tế bào nên nó có tác dụng giãn động mạch, tiểu động mạch và có thể làm giảm nhịp tim [[7](#_ENREF_7)]. Thuốc có tác dụng tương đối chọn lọc trên cơ trơn mạch máu, ít có tác dụng hơn đối với tế bào cơ tim. Vì vậy, ở liều điều trị, thuốc không ảnh hưởng trực tiếp trên co bóp và dẫn truyền xung động tim.

1.1.6. Chỉ định, liều dùng

***1.1.6.1. Chỉ định***:

- Dự phòng đau thắt ngực, đặc biệt khi có yếu tố co mạch như trong đau thắt ngực kiểu Prinzmetal.

- Tăng huyết áp.

- Hội chứng Raynaud.

***1.1.6.2. Cách dùng***

- Dạng GPKS: Liều 20mg/lần, dùng 2 lần trong 1 ngày hoặc liều 30, 60, 90mg/lần, dùng 1 lần trong ngày.

Liều dùng phụ thuộc vào dạng thuốc sử dụng, có thể tăng dần tùy theo mức độ đáp ứng và khả năng chịu thuốc của người bệnh đến khi huyết áp có thể được kiểm soát tốt nhất. Liều dùng cần được điều chỉnh giảm ở người già hay những người có chức năng gan kém[[7](#_ENREF_7)].

1.1.7. Tác dụng không mong muốn

Các tác dụng không mong muốn (TDKMM) thường xảy ra ở giai đoạn đầu dùng thuốc và giảm dần sau vài tuần hoặc sau khi điều chỉnh lại liều điều trị. Các dạng viên nén thường ít gây TDKMMhơn dạng viên nang. Viên nang tác dụng ngắn, nhanh có thể gây hạ huyết áp quá mức và gây tim đập nhanh do phản xạ nên có thể dẫn đến thiếu máu cục bộ cơ tim hoặc não. Ngoài ra, thường gặp: đau đầu, mệt mỏi, chóng mặt, nóng đỏ bừng mặt, đánh trống ngực,buồn nôn, ỉa chảy hoặc táo bón.

1.1.8. Một số chế phẩm chứa nifedipin trên thị trường Việt Nam

Bảng 1.1.Một số chế phẩm chứanifedipin

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Tên thuốc** | **Dạng bào chế** | **Hàm lượng** | **Nhà SX** |
| 1 | Adalat | Viên nang mềm | 10mg NIF | Bayer Pharma AG |
| 2 | Adalat LA | Viên nén GPKD theo cơ chế bơm thẩm thấu | 20mg, 30mg, 60mg NIF |
| 3 | Adalat retard | Viên nén bao phim GPKD theo cơ chế tạo cốt | 20mg NIF |
| 4 | Nifedipin Hasan 20 Retard | Viên nén bao film GPKD | 20mg NIF | Hasan – Dermapharm  (Việt Nam) |
| 5 | Nifedipin STADA | Viên bao film | 10mg NIF | STADA-VN J.V |
| 6 | Avensa LA | Viên nén GPKS | 30mg, 60mg NIF | Vellpharm (Việt Nam) |

\* *Nguồn: theo Cục quản lý Dược (2020*)[[25](#_ENREF_25)]

1.1.9. Một số nghiên cứu về hệ thuốc giải phóng kéo dài chứa nifedipin

***1.1.9.1. Nghiên cứu tăng độ tan cho dược chất***

Kanagale P. và CS [[26](#_ENREF_26)] đã nghiên cứu phát triển hệ phân tán rắn (HPTR) để làm cơ sở cho việc bào chế hệ bơm thẩm thấu quy ước (EOP) để phân phối thuốc có độ tan kém trong nước là NIF và phân phối NIF tuân theo động học bậc 0 với 1 khoảng thời gian kéo dài. HPTR được bào chế theo phương pháp đun chảy ở nhiệt độ cao sử dụng Poloxamer-188 với các tỷ lệ khác nhau của thuốc và polymer (1/1, 1/5 và 1/10 theo khối lượng) và nghiên cứu độ tan. Các viên nén nhân sử dụng HPTR được bào chế, bao bằng celulose acetat (CA) và polyethylen glycol (PEG) 400 và được khoan lỗ giải phóng bằng tay. Hệ bơm thẩm thấu được tạo ra có thể phân phối NIF với tốc độ tuân theo quá trình động học bậc 0 trong khoảng thời gian là 20 giờ. Sự giải phóng thuốc từ công thức bào chế được phát triển không phụ thuộc vào pH và tốc độ khuấy trộn.

Phạm Thị Minh Huệ [[15](#_ENREF_15)] đã tiến hành nghiên cứu bào chế HPTR để làm cơ sở bào chế viên nén NIF dạng cốt tác dụng kéo dài 12 giờ. Tác giả đã nghiên cứu biện pháp cải thiện độ tan và tốc độ hòa tan của NIF bằng kỹ thuật tạo HPTR với các chất mang PEG, polyvinyl pyrrolidon (PVP) và hydroxy propyl methyl celulose (HPMC). Khảo sát ảnh hưởng của tỷ lệ chất mang, KLPT chất mang, phương pháp chế tạo HPTR đến tốc độ và khả năng hòa tan của NIF. Kết quả cho thấy: HPTR với chất mang PVP được chế tạo bằng phương pháp dung môi có khả năng cải thiện độ tan và tốc độ hòa tan của NIF nhiều hơn cả và được sử dụng vào trong bào chế viên NIF tác dụng kéo dài.

Misra M. và CS [[27](#_ENREF_27)] đã nghiên cứu bào chế hệ tự nhũ hóa rắn của NIF để làm cơ sở bào chế viên nén bơm thẩm thấu chứa NIF GPKD 12 giờ. Hệ tự nhũ hóa của NIF được tác giả bào chế nhằm cải thiện độ tan của NIF trước khi sử dụng để bào chế viên nén dạng bơm thẩm thấu. Nghiên cứu bào chế viên nén NIF dạng bơm thẩm thấu được tiến hành bằng cách tạo hạt các tá dược (TD): silicon dioxid, lactose, mannitol, PVP, acid citric và natri bicacbonat với hệ tự nhũ hóa của NIF đã được bào chế ở trên. Kết quả cho thấy: viên nén bơm thẩm thấu với hệ tự nhũ hóa (SEOPT) không chỉ cải thiện độ hòa tan của NIF bằng hiệu ứng tự nhũ hóa (SEDDS) mà còn kiểm soát giải phóng thuốc nhờ cấu trúc dạng EOP. Các nghiên cứu về giải phóng thuốc cho thấy: sự giải phóng NIF từ viên nén bào chế được tuân theo biểu đồ giải phóng của động học bậc 0 trong 12 giờ không phụ thuộc vào cường độ khuấy với giải phóng lũy tích là 83,85%.

Nguyễn Ngọc Chiến và CS [[28](#_ENREF_28)] đã tiến hành bào chế HPTR chứa NIF để làm cơ sở bào chế viên nén NIF GPTN với thời gian tiềm tàng (Tlag) 6 giờ. Tác giả đã tiến hành cải thiện độ tan và tốc độ hòa tan của NIF thông qua chế tạo HPTR với chất mang PVP ở các tỷ lệ khác nhau của NIF và PVP là 1:1, 1:2, 1:3 bằng cách hòa tan NIF và PVP trong MeOH với tỷ lệ của NIF và MeOH là 1:50 và thêm 5% natri laurylsulfat (SLS); phun sấy trong máy BUCHI với các thông số: tốc độ khí 95%, nhiệt độ làm việc 70oC, tốc độ bơm 7 vòng/phút. Kết quả cho thấy: độ hòa tan của NIF từ HPTR được cải thiện rõ rệt so với nguyên liệu và HPTR với tỷ lệ của PVP và NIF là 1:1 và 5% SLS được sử dụng vào trong bào chế viên NIF GPTN. Viên nhân sử dụng HPTR được bào chế bằng phương pháp tạo hạt ướt với các TD : tinh bột, lactose, natri starch glycolat (SSG); sau đó trộn hạt đã sửa với HPTR và tá dược trơn. Viên nhân được bao vỏ bao kiểm soát giải phóng bằng phương pháp dập kép. Viên nén bào chế được được thử độ hòa tan 1 giờ đầu trong môi trường HCl 0,1N pH 1,2 và các giờ tiếp theo trong môi trường đệm pH 6,8. Kết quả cho thấy: viên có thời gian tiềm tàng (Tlag) là 6 giờ và giải phóng hoàn toàn DC trong vòng 1 giờ sau pha tiềm tàng.

***1.1.9.2. Nghiên cứu về bào chế nifedipin giải phóng kéo dài dạng cốt***

*a. Dạng viên nén giải phóng kéo dài*

Akhtar S.và CS [[29](#_ENREF_29)]đã nghiên cứu bào chế viên nén NIF dạng cốt GPKD bằng phương pháp dập thẳng. Tác giả đã xây dựng và tối ưu hóa công thức viên nén NIF dạng cốt GPKD sử dụng các nồng độ HPMC khác nhau (HPMC - K100 và HPMC - K4). Các công thức được đánh giá về đặc tính lý hóa, thời gian nổi tiềm tàng, thời gian nổi và khả năng giải phóng thuốc *in vitro*. Kết quả cho thấy: công thức bào chế tối ưu với các thành phần NIF.HCl, HPMC K100, lactose, talc, magnesi stearat trong dung dịch HCl 0,1N ở pH 1,2 và môi trường đệm phosphat pH 6,8 ở nhiệt độ 37±0,5oC cho các viên nổi ngay lập tức và duy trì trong vòng 12 giờ mà không rã. Sự giải phóng thuốc từ các công thức tuân theo động học Higuchi. Các dữ liệu thu được từ viên nén dạng cốt của NIF cho thấy sự GPKD.

BarzegarJ.M. và CS [[30](#_ENREF_30)]đã nghiên cứu bào chế viên nén NIF hydrocloriddạng cốt GPKD sử dụng các polymer thân nướcHPMC và ethyl celulose (EC). Viên nén dạng cốt GPKD của NIF được bào chếtheo phương pháp dập thẳng, đánh giá về độ đồng đều hàm lượng, độ mài mòn và so sánh khả năng giải phóng thuốc*in vitro* với thuốc đối chiếu Procardia dựa vào yếu tố tương đồng (f2) và yếu tố khác nhau (f1). Kết quả nghiên cứu cho thấy: các mẫu viên có độ đồng đều hàm lượng nằm trong giới hạn cho phép và đạt chỉ tiêu về độ mài mòn. Mẫu viên chứa HPMC và EC với tỷ lệ 88,5/5 cho thấy đặc điểm về độ hòa tan phù hợp so với viên đối chiếu. Mô hình động học giải phóng thuốc*in vitro* phù hợp nhất đối với viên nén dạng cốt bào chế được và viên Procardia lần lượt là động học bậc 0 và mô hình Weibull.

Thakare V.M. và CS [[31](#_ENREF_31)] đã nghiên cứu bào chế viên 2 lớp chứa NIF, trong đó có 1 lớp giải phóng nhanh giống như liều ban đầu và lớp thứ 2 là liều duy trì. Viên nén 2 lớp được bào chế bằng cách tạo hạt khô lớp giải phóng nhanh gồm: NIF, β cyclodextrin, SSG, microcrystalline celulose (MCC), lactose, aerosil, magnesi stearat, oxid sắt đỏ và tạo hạt ướt lớp GPKD gồm: NIF, HPMC K15M, HPMC K100M, MCC, PVP K30, magnesi stearat, isopropyl alcohol (IPA); trong đó, các polymer thân nước HPMC K15M và K100M với vai trò là TD kéo dài giải phóngNIF,SSGđược sử dụng cho lớp tạo ra tác dụng giải phóng nhanh NIFsau đó, hai lớp được dập với nhau. Các mẫu viên được đánh giá về độ đồng đều khối lượng, độ mài mòn, động học giải phóng. Kết quả cho thấy: các mẫu viên đều có độ đồng đều khối lượng, độ mài mòn nằm trong giới hạn cho phép, mô hình giải phóng phù hợp với mô hình Korsmeyer – Peppas, có cơ chế giải phóng tuân theo định luật Fick.

Phạm Thị Minh Huệ [[15](#_ENREF_15)] đã tiến hành nghiên cứu bào chế viên nén NIF dạng cốt tác dụng kéo dài 12 giờ. Viên nén được bào chế bằng phương pháp xát hạt ướt với các TD: PVP K-25, HPMC E-5, avicel PH101, lactose, magnesi stearat, aerosil và các TD kéo dài giải phóng DC được khảo sát là : EC, carbopol, sáp carnauba. Kết quả nghiên cứu cho thấy: đồ thị giải phóng*in vitro* của công thức viên tối ưu với TD kéo dài giải phóng DC carbopol tương đồng với viên đối chiếu Adalat retard.

Vũ Thị Huỳnh Hân [[32](#_ENREF_32)] với mục đích đáp ứng yêu cầu điều trị trong nước, thay thế các chế phẩm NIF GPKD nhập ngoại giá thành cao, đã tiến hành nghiên cứu bào chế viên NIF 20 mg GPKD 12 giờ ở quy mô pilot. Viên được bào chế theo phương pháp xát hạt ướt với các TD: carbopol, lactose, avicel, aerosil, magnesi stearat, dicloromethan và các TD tạo cốt: PVP, HPMC có khả năng kiểm soát GPKD. Nghiên cứu đã đánh giá ảnh hưởng của 2 tá dược kiểm soát giải phóng PVP và HPMC đến độ hòa tan của viên thực nghiệm sau 3 giờ, 6 giờ, 12 giờ và đưa ra được công thức tối ưu dựa trên phần mềm Design-Expert 6.06.Công thức tối ưu được bào chế 3 lô ở quy mô pilot 5000 viên/mẻ và đánh giá tốc độ giải phóng NIF trong môi trường nước có chứa SLS 10% với tốc độ khuấy 50 vòng/phút. Kết quả cho thấy: hàm lượng NIF giải phóng đạt yêu cầu theo DĐVN III và USP 27.

Lâm Huệ Quân và CS [[33](#_ENREF_33)]đã nghiên cứu bào chế 2 công thức viên nén NIF 30 mg GPKD dạng cốt khuếch tán ăn mòn sử dụng 1 loại polymer kiểm soát giải phóng là HPMC 100000 và kết hợp 2 loại polymer kiểm soát giải phóng là HPMC 100000, Eudragit RS PO 100. Viên được bào chế theo phương pháp xát hạt ướt với các TD: PEG 6000, natri carboxymethylcelulose (SCMC), avicel pH 101, avicel pH 102, lactose DC, aerosil, magnesi stearat và các TD kiểm soát giải phóng được khảo sát là HPMC 100000, eudragit RS PO 100. Các viên được đánh giá tốc độ giải phóng NIF theo test 4 USP 30 trong môi trường pH 1,2 chứa 0,5%SLS với tốc độ khuấy 100 vòng/phút và so sánh với viên đối chiếu Adalat LA 30 mg. Kết quả cho thấy: Viên NIF 30 mg GPKD được bào chế với polymer kiểm soát giải phóng HPMC 100000 cho thấy có tốc độ giải phóng DC tương đương với viên đối chiếu Adalat LA 30mg trong 24 giờ. Trong khi đó, khi sử dụng hỗn hợp polymer kiểm soát giải phóng là HPMC 100000 và Eudragit RS PO 100 lại cho thấy viên NIF 30 mg GPKD có tốc độ giải phóng DC đạt yêu cầu của chuyên luận USP 30.

*b. Dạng pellet giải phóng kéo dài*

Akelesh T. và CS [[34](#_ENREF_34)]đã nghiên cứu bào chế viên nang NIF GPKD bằng phương pháp tạo pellets. Trong số các công thức pellet khác nhau được bào chế thì công thức F9 gồm: NIF, HPMC E5, SSG, SLS, titanium dioxid được bao màng kéo dài giải phóng với thành phần dịch bao có nồng độ EC N20 là 0,5% và nồng độ HPMC E5 là 20% có biểu đồ hòa tan phù hợp nhất. Nghiên cứu so sánh sự giải phóng thuốc từ pellet NIF GPKD trong viên nang theo công thức F9 với công thức viên nén GPKD lưu hành trên thị trường cho thấy: giải phóng thuốc từ viên nén là 98,27%, giải phóng thuốc từ pellet là 98,80%. Độ ổn định của viên nang chứa pellet GPKD bào chế được là 99,18%. Điều đó cho thấy: viên nang chứa pellet NIF GPKD bào chế theo công thức F9 tốt hơn so với công thức viên nén GPKD được lưu hành trên thị trường.

Ige P.P. và CS[[35](#_ENREF_35)]đã nghiên cứu bào chế pellet NIF kết dính sinh học bằng phương pháp đùn – tạo cầusử dụng HPMC K15M và k-carrageenan với cellulose vi tinh thể. Phương pháp thiết kế theo mô hình mặt hợp tử tại tâm 2 yếu tố có thể quay một cách ngẫu nhiên đã được áp dụng để đánh giá ảnh hưởng của 2 biến số độc lập là: nồng độ của k-carrageenan và HPMC K15M đến các biến số phụ thuộc. Công thức NF6 với nồng độ k-carrageenan 20% và HPMC K15M 10% được lựa chọn là công thức tối ưu dựa trên tiêu chí về tính cầu gần với 1,0 nhất với phần trăm giải phóng thuốc lũy tích lớn nhất. Các kết quả nghiên cứu thu được cho thấy: sử dụng k-carrageenan, celulose vi tinh thể và HPMC K15M với tỷ lệ 20/35/10 (khối lượng/khối lượng)(KL/KL)có thể tạo ra một chất mang hiệu quả để tăng cường tính cầu và sự GPKD của các pellet dạng cốt.

Zheng W. và CS [[36](#_ENREF_36)]đã nghiên cứu bào chế viên nang NIF dạng cốt GPKD dùng một lần/ngày bằng cách kết hợp kỹ thuật tạo HPTR và kỹ thuật bào chế hệ giải phóng thuốc có kiểm soát. Viên được bào chế bằng phương pháp tạo hạt ướt sử dụng HPMC (tá dược thân nước kéo dài giải phóng thuốc) và EC hòa tan trong ethanol tạo HPTRvới PVP và acid stearic. Mô hình động học giải phóng thuốc *in vitro* của viên nang bào chế được tuân theo động học bậc 0 trong khoảng thời gian từ 0 - 6h và động học bậc 1 trong khoảng 6 – 24h. SKD tương đối của viên nang bào chế được được xác định trên thỏ sau khi cho uống viên nén đối chiếu GPKS có sẵn trên thị trường. Các kết quả về dược động học (DĐH) cho thấy: không có sự khác biệt có ý nghĩa của Cmax , MRT và AUC024h. Giá trị SKD tương đối đường uống của viên nang bào chế được so với viên đối chiếu là : 97,12%. Các kết quả của cả nghiên cứu *in vivo* và *in vitro* đều cho thấy : viên nang dạng cốt GPKD dùng liều 1 lần/ngày được bào chế từ công thức tối ưu thể hiện tác dụng giải phóng kéo dài rất tốt và có SKD tương đối theo đường uống cao.

*c. Dạng vi cầu, vi hạt giải phóng kéo dài*

Zhao L. và CS[[37](#_ENREF_37)]đã nghiên cứu bào chế vi cầu rỗng chứa NIF nhằm cải thiện khả năng giải phóng *in vitro* của thuốc có độ tan trong nước kém như NIF để sử dụng cho hệ phân phối thuốc GPKS dạng nổi. Các vi cầu rỗng chứa NIF được bào chế từ hỗn hợp polymer là PVP và EC bằng phương pháp bay hơi – khuếch tán dung môi, sử dụng các tỷ lệ khác nhau của PVP và EC được hòa tan đồng thời với thuốc trong hỗn hợp dung môi ethanol/ether (5/1, thể tích/thể tích)(v/v). Vi cầu rỗng có thể nổi trong môi trường giải phóng trong hơn 24 giờ và khả năng nổi không bị ảnh hưởng bởi việc trộn với PVP.Tốc độ giải phóng của vi cầu cho thấy mô hình động học xấp xỉ bậc 0. Do đó, vi cầu rỗng được bào chế từ hỗn hợp polymer PVP và EC với tỷ lệ 1,5/8,5 (KL/KL) có thể phù hợp cho hệ phân phối thuốc GPKS dạng nổi để sử dụng NIF theo đường uống.

Bashir S. và CS[[38](#_ENREF_38)]đã nghiên cứu bào chế vi hạt (microbeads) GPKD chứa NIF để phân phối thuốc kéo dài. Vi hạt NIF được bào chế bằng phương pháp tạo gel - ion hóa sử dụng natri alginat và pectin với các tỷ lệ khác nhau. Các vi hạt được đánh giá hình thái bề mặt và hình dạng bằng kính hiển vi điện tử quét, các đặc tính vi mô, khả năng tạo vi nang và giải phóng thuốc *in vitro*. Kết quả nghiên cứu về phổ hồng ngoại gần và đo nhiệt vi sai chỉ ra rằng không có bất cứ tương tác nào giữa thuốc và polymer sử dụng. Đặc tính lưu biến tốt được chứng minh với góc chảy < 30o, chỉ số Carr và chỉ số Hausner lần lượt < 10% và 1,12. Kích thước vi hạt, hiệu suất và khả năng bẫy lần lượt trong khoảng 695 - 733 µm, 69 - 75% và 54 - 63%. Kết quả soi kính hiển vi điện tử quét cho thấy: các vi hạt rời rạc, phần lớn là hình cầu và có độ chảy tự do. Do đó, công thức vi hạt là phù hợp để bào chế dạng GPKD chứa NIF.

***1.1.9.3. Những nghiên cứu về bào chế nifedipingiải phóng kéo dài theo cơ chế thẩm thấu***:

*a. Dạng bơm thẩm thấu quy ước*

Nokhodchi A. và CS [[39](#_ENREF_39)] đã nghiên cứu thiết kế 1 loại bơm thẩm thấu quy ước mới (SEOP) để phân phối hiệu quả các thuốc không tan và kém tan trong nước như NIF. Tác giả cũng đã nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến sự giải phóng thuốc từ hệ SEOP. Ảnh hưởng của TD trương nở và chất diện hoạt, kích thước miệng giải phóng, nồng độ của TDthẩm thấu và chất hóa dẻo sơ nước đã được nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cho thấy: động học giải phóng bậc 0 của NIF đạt được sau khi tối ưu hóa nồng độ của TDtrương nở, TDthẩm thấu, chất diện hoạt, kích thước miệng giải phóng và độ dày màng bán thấm trong hệ SEOP.Giải phóng tuân theo động học bậc không kéo dài trong khoảng 10 giờ ở môi trường hòa tan pH 6,8. Hệ SEOP được thiết kế ở trên được đề xuất là 1 hệ kiểm soát thuốc có hiệu quả để phân phối theo đường uống các thuốc có độ tan trong nước kém như NIF.

*b. Dạng bơm thẩm thấu kéo đẩy*

Liu L. và CS[[40](#_ENREF_40)]đã tiến hành nghiên cứu bào chế viên nén bơm thẩm thấu nhân 2 lớp chứa NIF mà không cần khoan laser để tạo thành miệng phân phối thuốc. Viên nhân gồm có 2 lớp: lớp đẩy và lớp thuốc, được bào chế bằng phương pháp tạo hạt ướt và được dập thành viên sử dụng chày trên được cải tiến để tạo ra 1 lỗ ở giữa bề mặt của lớp thuốc. Các viên nén có lỗ giải phóng được bao bằng nồi bao truyền thống.Tác giả đã sử dụng natri clorid là TD thẩm thấu, PVP là TDdính, natri croscarmellose là TDtrương nở. Viên nhân đục lỗ được bao bằng EC dưới dạng màng bao bán thấm có chứa PEG 400 để kiểm soát tính thấm của màng. Công thức viên nhân được tối ưu hóa bằng thiết kế trực giao và biểu đồ giải phóng của các công thức khác nhau được đánh giá bằng yếu tố tương đồng f2. Kết quả cho thấy, viên nén bơm thẩm thấu được tối ưu hóa có thể phân phối NIF gần với động học bậc không đến 24 giờ, không phụ thuộc vào cả hai yếu tố là tốc độ khuấy trộn và môi trường giải phóng. Việc bào chế viên nén bơm thẩm thấu nhân 2 lớp được đơn giản hóa bằng cách bao viên nhân đục lỗ, bằng công nghệ nhận diện lớp thuốc và không cần khoan laser.

*c. Hệ tự tạo lỗ giải phóng*

Kumaravelrajan R. và CS [[41](#_ENREF_41)] đã nghiên cứu bào chế viên nén GPKD theo cơ chế bơm thẩm thấu tự tạo lỗ xốp để phân phối có kiểm soát NIF và metoprolol trong vòng 12 giờ. Viên được bào chế bằng cách phối hợp 2 thuốc trên trong nhân và được bao bằng các loại polymer khác nhau (PVP, PEG 400 và HPMC) và nồng độ khác nhau (30%, 40% và 50% của polymer) của chất tạo lỗ với mức tăng khối lượng là 8, 12 và 15%. Kết quả cho thấy: sự giải phóng thuốc tỷ lệ nghịch với khối lượng màng bao (KLMB) nhưng tỷ lệ thuận với nồng độ của chất tạo lỗ. Độ bền của lớp vỏ đã hết thuốc tỷ lệ nghịch với nồng độ chất tạo lỗ nhưng tỷ lệ thuận với KLMB. Kết quả nghiên cứu trên kính hiển vi điện tử quét cho thấy : sự hình thành các lỗ trên màng, nơi mà sự giải phóng thuốc diễn ra.

Patel C.J. và CS [[42](#_ENREF_42)] đã nghiên cứu phát triển và đánh giá viên nén NIF thẩm thấu theo cơ chế hình thành lỗ xốp. Nghiên cứu được tiến hành trải qua 2 giai đoạn : Xây dựng công thức viên nhân và bao nhân viên, sử dụng CA là một polymer tạo màng mỏng cùng với PEG 400 với vai trò là chất hóa dẻo. KCl có vai trò là TD tạo lỗ xốp. Aceton và MeOH được sử dụng với vai trò là các dung môi. Sự kết hợp giữa manitol-sucrose, manitol-lactose, dextrose-sucrose với vai trò là các TD thẩm thấu. Các viên nhân được đánh giá về độ đồng đều hàm lượng, độ cứng và sự biến thiên khối lượng. Các viên nén sau khi bao được đánh giá về độ dày màng bao và nghiên cứu sự giải phóng thuốc *in vitro*. Khảo sát ảnh hưởng của sự thay đổi nồng độ TD tạo lỗ xốp và các TD thẩm thấu khác nhau đến tốc độ giải phóng thuốc. Kết quả nghiên cứu cho thấy: sự giải phóng thuốc gần với động học bậc 0, công thức F4 với các thành phần: NIF, sucrose, manitol, PVP K30, magnesi stearat, talc giải phóng thuốc lớn nhất tại thời điểm kết thúc giờ thứ 12 và khá hằng định tại giờ thứ 13.

*d. Hệ bơm thẩm thấu dạng sandwich*

Kumaravelrajan R. và CS [[43](#_ENREF_43)] đã nghiên cứu phân phối đồng thời NIF và Metoprolol tartrat sử dụng hệ viên nén bơm thẩm thấu dạng sandwich(SOTS). Hệ SOTSbao gồm: 1 lớp đẩy ở giữa và các lớp thuốc của NIF và metoprolol tartrat được gắn vào. Polyethylen oxid (PEO) 600.000 và 8000.000 g/mol lần lượt được sử dụng với vai trò TD độn của lớp thuốc và hydrogel trương nở của lớp đẩy. Nghiên cứu đã cho thấy: lượng PEO và kali clorid của lớp thuốc và lớp đẩy có ảnh hưởng lớn đến sự giải phóng của NIF và metoprolol. Sự giải phóng của các thuốc được tối ưu hóa bởi kích thước của lỗ giải phóng thuốc, nồng độ của TD hóa dẻo và độ dày của màng bao. Viên nén bơm thẩm thấu được tối ưu hóa đã cho thấy có thể phân phối cả 2 thuốc với tốc độ gần với động học bậc 0 trong khoảng thời gian lên đến 16 giờ, không phụ thuộc vào pH và cường độ khuấy trộn nhưng phụ thuộc vào áp lực thẩm thấu của môi trường giải phóng. Hệ SOTS này có tác dụng kéo dài tốt khi so sánh với chế phẩm quy ước. Do đó, hệ có thể áp dụng với những sự kết hợp khác nhau của các thuốc sử dụng để điều trị các bệnh tim mạch, tiểu đường…

Liu L. và CS [[44](#_ENREF_44)]đã tiến hành nghiên cứu bào chế hệ SOTS để phân phối có kiểm soát NIF. Ảnh hưởng của các biến số trong công thức viên, kích thước miệng giải phóng và các biến số màng bao đến giải phóng của NIF từ hệ SOTS đã được nghiên cứu. Kết quả nghiên cứu cho thấy, hàm lượng của kali clorid trong lớp đẩy và lượng PEO trong lớp thuốc có ảnh hưởng tích cực và rõ rệt đến giải phóng của NIF. Kích thước miệng giải phóng thích hợp đã được nghiên cứu trong khoảng từ 0,5 – 1,41 mm. Tốc độ giải phóng thuốc từ hệ SOTS có thể tăng lên bằng cách phối hợp chất hóa dẻo thân nước vào trong màng bao, trong khi đó nó giảm đi với chất hóa dẻo kỵ nước. Kết quả cũng cho thấy hệ SOTS có các đặc tính giải phóng *in vitro* tương đối giống so với hệ bơm thẩm thấu kéo – đẩy (PPOP) được lưu hành trên thị trường như là tốc độ gần nhưkhông đổi đến 24 giờ và không phụ thuộc vào môi trường giải phóng và tốc độ khuấy trộn. Việc miễn phải nhận dạng bề mặt cần khoan trước khi khoan làm cho việc bào chế hệ SOTS sẽ dễ dàng hơn so với hệ bơm thẩm thấu kéo – đẩy.

*e. Dạng viên thẩm thấu đồng nhất*

Liu L. và CS [[45](#_ENREF_45)] đã phát triển hệ viên nén thẩm thấu đồng nhất (MOTS) để phân phối NIF. Tác giả đã nghiên cứu ảnh hưởng của các biến số của công thức viên nén như : KLPT, lượng PEO, lượng KCl và lượng tinh bột gạo cũng như lượng NIF đưa vào công thức viên. Nghiên cứu ảnh hưởng của kích thước lỗ giải phóng thuốc và các biến số màng bao gồm có: bản chất và lượng TD hóa dẻo cũng như độ dày màng bao đến sự giải phóng thuốc. Biểu đồ giải phóng*in vitro* của công thức viên tối ưu được đánh giá trong các môi trường giải phóng khác nhau, tốc độ khuấy khác nhau và so sánh với viên nang quy ước và viên nén thẩm thấu kéo-đẩy đang được lưu hành. Kết quả cho thấy: PEO với KLPT 300.000g/mol thích hợp sử dụng làm TD độn. Kích thước lỗ giải phóng tối ưu là trong khoảng 0,25-1,41mm. Hệ MOTS cho thấy có thể phân phối NIF với tốc độ tuân theo động học bậc 0 trong khoảng thời gian lên đến 24 giờ, không phụ thuộc vào môi trường hòa tan và tốc độ khuấy trộn, và về cơ bản có thể so sánh được với viên nén PPOP.

Thakor R. và CS [[46](#_ENREF_46)] đã phát triển và đánh giá hệ MOTS kiểm soát phân phối thuốc theo đường uống sử dụng công nghệ màng bao không đối xứng. Cấu trúc xốp của màng bao được xác định bằng kính hiển vi điện tử quét. Nghiên cứu đã đánh giá ảnh hưởng của các TD thẩm thấu khác nhau đến sự giải phóng của thuốc. Các nghiên cứu giải phóng thuốc *in vitro* đã cho thấy: khi nồng độ của các TD thẩm thấu tăng thì sự giải phóng thuốc cũng tăng. Sự giải phóng thuốc từ hệ MOTSđược phát triển không phụ thuộc vào sự khuấy trộn bên ngoài và pH của môi trường hòa tan. Áp lực thẩm thấu được sinh ra trong hệ này được xác định bằng cách sử dụng thẩm thấu kế điểm đông. Áp lực thẩm thấu cho thấy tỷ lệ tuyến tính với thời gian và nồng độ của TD thẩm thấu.

***1.1.9.4. Những nghiên cứu về bào chế nifedipingiải phóng có kiểm soát***

Garg V. [[47](#_ENREF_47)] đã nghiên cứu xây dựng công thức dạng bào chế GPKS theo đường uống của NIF. Trong nghiên cứu này, tác giả đã tiến hành bào chế viên nén NIF GPKS giải phóng thuốc nhanh và kéo dài trong 1 khoảng thời gian. HPTR của NIF với PVP 40T và PEG 8000 được bào chế để làm tăng độ hòa tan và polypropylen siêu xốp chứa 75% khoảng trống đã được sử dụng để kiểm soát giải phóng ở mức độ mong muốn. Các tỷ lệ khác nhau của 2 polymer này đã được nghiên cứu. Kết quả cho thấy rằng: kỹ thuật tạo HPTR là 1 phương pháp tốt để cải thiện độ hòa tan của NIF. Tuy nhiên, polymer polypropylen được sử dụng với vai trò 1 cốt phân tán đồng nhất thì không tạo ra tốc độ giải phóng tuân theo động học bậc 0 ở các nồng độ thấp.

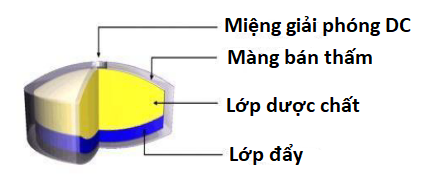
1.2. THUỐC GIẢI PHÓNG KÉO DÀI THEO CƠ CHẾ BƠM THẨM

THẤU KÉO – ĐẨY

1.2.1. Cấu tạo và cơ chế giải phóng dược chất

***1.2.1.1. Cấu tạo***

Hệ PPOPlà một loại EOPcải tiến gồm một viên nhân hai hoặc ba lớp, trong đó có một lớp đẩy và một hoặc nhiều lớp chứa DC.Thông thường PPOP được bào chế dưới dạng viên hai lớp[[2](#_ENREF_2)], [[48](#_ENREF_48)], [[49](#_ENREF_49)], [[50](#_ENREF_50)],[[51](#_ENREF_51)]: *Lớp thứ nhất* (lớp DC) chứa DC, polymer phân tán DC, TD tạo áp suất thẩm thấu (ASTT) và các TD khác (thường chiếm 60-80% khối lượng viên). *Lớp thứ hai* (lớp đẩy) gồm polymer trương nở, TD tạo ASTT, TD tạo màu và các TD thích hợp khác (thường chiếm 20-40% khối lượng viên).Hai lớp được chuẩn bị riêngvà được dập với nhau để tạo thành viên nhân hai lớp. Viên nhân được bao bằng màng bán thấm cấu tạo bởi polymer không tan (thường sử dụng CA) kết hợp với chất hóa dẻo để điều chỉnh tốc độ thấm nước[[48](#_ENREF_48)], [[50](#_ENREF_50)], [[52](#_ENREF_52)], [[53](#_ENREF_53)]. Sau khi bao, một lỗ nhỏ được khoan xuyên qua màng bằng cách khoan laser hoặc khoan cơ học ở chính giữa bề mặt lớp chứa DC của viên (Hình 1.1)



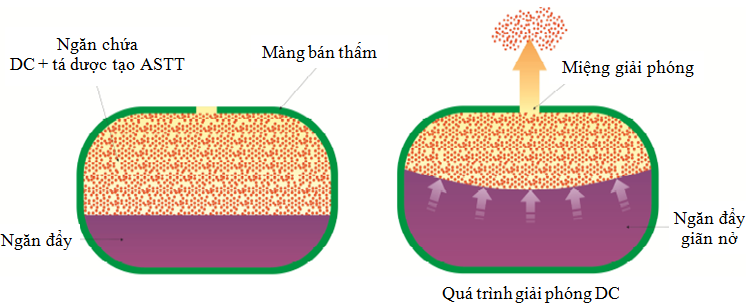
**Hình 1.1.** Cấu tạo bơm thẩm thấu kéo - đẩy

*\* Nguồn: theo Prasoon P. và CS (2014)[*[*48*](#_ENREF_48)*]*

Viên PPOP ba lớp chứa hai lớp DC có hàm lượng khác nhau và một lớp đẩy, bao ngoài bởi một màng bán thấm (EC hoặc CA). DC được giải phóng thông qua lỗ khoan laser nằm trên bề mặt lớp DC thứ nhất của viên. PPOP ba lớp với đặc tính giải phóng khác nhau có thể tạo thành bằng cách điều chỉnh hàm lượng DC ở các lớp khác nhau[[48](#_ENREF_48)], [[50](#_ENREF_50)], [[54](#_ENREF_54)].

*1.2.1.2. Cơ chế giải phóng dược chất*

Khi viên PPOP hai lớptiếp xúc với dịch sinh lý, nước được thấm đồng thời qua màng vào hai ngăn bên trong viên nhờ quá trình thẩm thấu được tạo ra bởi TD thẩm thấu có trong hai lớp để hydat hóa các polymer của cả lớp DC và lớp đẩy và tạo thành dạng hỗn dịch thuốc trong ngăn lớp DC. Đồng thời, do ngăn lớp đẩy không có lỗ nên sẽ giãn nở thể tích và đẩy màng ngăn đàn hồi về phía ngăn lớp DC, bằng cách nàyđẩy hỗn dịch thuốc ra ngoài qua miệng giải phóng thuốc (Hình 1.2)[[55](#_ENREF_55)].



**Hình 1.2.** Quá trình giải phóng dược chất của bơm thẩm thấu kéo - đẩy

*\* Nguồn: theo Shahithi C. và CS (2015)[*[*56*](#_ENREF_56)*]*

Cơ chế giải phóng từ PPOP cho phép DC được phân phối độc lập với các đặc tính của DC và điều kiện sinh lý bên ngoài. PPOP có thể phân phối cả thuốc dễ tan trong nước và thuốc ít tan trong nước với tốc độ không đổi [[2](#_ENREF_2)], [[48](#_ENREF_48)], [[57](#_ENREF_57)], [[58](#_ENREF_58)].

1.2.2.Ưu nhược điểm

***1.2.2.1.Ưu điểm***

Được đề cập trong các tài liệu[[48](#_ENREF_48)], [[59](#_ENREF_59)], [[60](#_ENREF_60)], [[61](#_ENREF_61)], [[62](#_ENREF_62)]như sau:

- Có thể phân phối các DC có độ tan trong nước khác nhau.

- Dễ duy trì tốc độ giải phóng DC theo động học bậc không đến khi giải phóng hết DC.

- Giải phóng thuốc từ hệ PPOP độc lập với pH của môi trường, nhu động đường tiêu hóa.

- Ít chịu ảnh hưởng nhất bởi thức ăn trong đường tiêu hóa.

- Tốc độ giải phóng cao hơn có thể đạt được so với các hệ phân phối thuốc có kiểm soát theo cơ chế khuếch tán.

- Tốc độ phân phối thuốc độc lập với kích thước miệng giải phóng trong giới hạn.

- Có thể bào chế dưới dạng giải phóng muộn, GPTN hoặc giải phóng theo chương trình nếu cần.

- Có thể giảm tần suất liều dùng.

- Cải thiện sự tuân thủ của bệnh nhân.

- Giảm tác dụng phụ.

- Tương quan *in vivo* - *in vitro* đạt được ở mức cao.

***1.2.2.2. Nhược điểm***

Theo các tài liệu[[63](#_ENREF_63)], [[64](#_ENREF_64)], [[65](#_ENREF_65)], [[66](#_ENREF_66)], [[67](#_ENREF_67)] như sau:

- Cần thiết bị dập viên hai lớp.

- Cần thiết bị đặc biệt để tạo miệng giải phóng.

- Cần sử dụng thêm TD màu để phân biệt hai lớp hoặc thiết bị tạo miệng giải phóng DC có khả năng xác định đúng mặt cần khoan.

- Tlag dài.

- Nếu quá trình bao không được kiểm soát tốt, lớp bao không đều sẽ dẫn đến mô hình giải phóng thuốc khác nhau giữa các lô và có nguy cơ hỏng màng baocó thể dẫn đến bùng liều.

- Có khả năng gây tắc đường tiêu hóa.

- Có nguy cơ kích ứng hoặc loét (do giải phóng dung dịch bão hòa DC).

- Chi phí sản xuất cao.

1.2.3. Thành phần cấu tạo

***1.2.3.1. Thành phần viên nhân***

*a. Dược chất*

DC ít tan hoặc có độ tan trung bình trong nước với thời gian bán thải ngắn, sử dụng trong điều trịdài ngày là lựa chọn hoàn hảo cho PPOP. Các loại thuốc dùng trong điều trị các bệnh mạn tính như NIF, glipizid, prazosin, diltiazem, verapamil… đã được bào chế thành công dưới dạng PPOP[[48](#_ENREF_48)].

b.*Tá dược tạo áp suất thẩm thấu*

TD tạo ASTT là thành phần thiết yếu của bơm thẩm thấu, có vai trò duy trì gradient áp suất qua màng, có tác dụng hút nước và giúp duy trì sự phân phối thuốc ổn định trong hệ đã hydrat hóa. TD tạo ASTT trong các hệ thẩm thấu gồm các muối tan trong nước của acid vô cơ (kali clorid, natri clorid, kali sulfat...) và muối tan trong nước của acid hữu cơ (kali acetat, natri acetat..), carbohydrat (glucose, lactose...), amino acid tan trong nước (glycin, leucin..) và các polymer hữu cơ (HPMC, PVP, PEO...) [[55](#_ENREF_55)]. Để duy trì gradient thẩm thấu cho hệ PPOP và đảm bảo đồ thị giải phóng mong muốn, natri clorid thường được sử dụng làm TD thẩm thấu vì sẵn có, không phản ứng và tạo ASTT cao qua màng bán thấm.Các TD tạo ASTT thường được sử dụng trong PPOP là natri clorid và kali clorid. Đối với TD tạo ASTT, hai đặc tính quan trọng nhất là tính thấm và độ tan trong nước[[48](#_ENREF_48)], [[55](#_ENREF_55)], [[68](#_ENREF_68)].

c.*Tá dược phân tán và tá dược trương nở*

Hệ PPOP thường sử dụng TD phân tán trong lớp DC để tăng khả năng phân tán đều DC và TD trương nở vào lớp đẩy phối hợp cùng với TD tạo ASTT để đạt được động học giải phóng mong muốn. Các polymertrương nở có thể được sử dụng gồm: carbopol, HPMC, SCMC, PVP K30, PEO[[55](#_ENREF_55)], [[64](#_ENREF_64)], [[65](#_ENREF_65)], [[69](#_ENREF_69)], [[70](#_ENREF_70)], [[71](#_ENREF_71)]. Trong đó, PEO là polymer phù hợp nhất sử dụng trong lớp DC và lớp đẩy của hệ PPOP do độc tính thấp, độ trơn chảy và tính chịu nén tốt, tính thân nước và có khả năng trương nở cao.Sử dụng PEO trong hệ PPOP cũng là lựa chọn tốt để điều chỉnh đặc tính hòa tan cũng như giúp phân tán lớp DC tốt hơn khi hàm lượng DC cao, mà không làm mất đi động học giải phóng bậc không cùng sự phân phối độc lập với pH và điều kiện thủy động lực học.

PEO sử dụng trong lớp DC của PPOP thường có KLPTthấp từ 100.000 – 600.000 g/mol, trong khi PEO dùng trong lớp đẩy thường có KLPTcao hơn từ 4.000.000 – 8.000.000 g/mol[[57](#_ENREF_57)], [[72](#_ENREF_72)], [[73](#_ENREF_73)], [[74](#_ENREF_74)], [[75](#_ENREF_75)]. Tỷ lệ PEO thích hợp sẽ giúp tăng tốc độ giải phóng và duy trì giải phóng DC theo động học bậc không [[48](#_ENREF_48)], [[76](#_ENREF_76)].

d.*Tá dược thấm hút*

Trong hệ PPOP, TD thấm hút có chức năng kéo nước từ môi trường bên ngoài vào hệ, từ đó hình thành kênh chứa nước làm tăng diện tích bề mặt tiếp xúc.TD thấm hút trong PPOP giúp làm tăng tốc độ giải phóng DC qua miệng giải phóng [[76](#_ENREF_76)]. TD thấm hút thường được sử dụng trong PPOP bao gồm: titan dioxid, silicon dioxid và PVP [[48](#_ENREF_48)], [[60](#_ENREF_60)].

***1.2.3.2. Thành phần màng bao***

a.*Màng bán thấm*

Màng bán thấm là 1 thành phần quan trọng của hệ PPOP. Màng bán thấm chỉ cho nước đi qua, không thấm chất tan (DC và TD). Do đó, nó có tác dụng ngăn cách quá trình hòa tan diễn ra trong hệ PPOP khỏi tác động của môi trường bên ngoài. Đây chính là yếu tố đem lại các đặc tính giải phóng thuốc không phụ thuộc vào pH môi trường hòa tan [[55](#_ENREF_55)], [[77](#_ENREF_77)]và tốc độ giải phóng thuốc không phụ thuộc vào vị trí của hệ PPOP trong đường tiêu hóa.

Do đặc tính của màng bán thấm nên các polymer có thể được lựa chọn làm nguyên liệu bao màng trong hệ PPOP như: các este của celulose (như CA, celulose diacetat, celulose triacetat, celulose propionat, celulose acetat butyrat…), các ether của celulose (như EC). Trong số các polymer cellulose, màng CA được sử dụng chủ yếu do tính thấm nước tương đối cao và có thể điều chỉnh một cách dễ dàng bằng cách thay đổi mức độ acetyl hóa của polymer [[48](#_ENREF_48)], [[55](#_ENREF_55)], [[68](#_ENREF_68)].

Màng bán thấm lý tưởng phải đáp ứng một số tiêu chí sau[[48](#_ENREF_48)], [[60](#_ENREF_60)], [[78](#_ENREF_78)], [[79](#_ENREF_79)], [[80](#_ENREF_80)]:

- Đủ độ thấm nước và tương đối không thấm đối với các chất tan để TD thẩm thấu không bị mất do khuếch tán qua màng.

- Phải đủ độ cứng và không trương nở để giữ nguyên hình dạng và kích thước trong suốt thời gian hoạt động.

- Đủ dày để có thể chịu được áp lực bên trong dạng bào chế mà không bị nứt vỡ. Với mục đích đó, độ dày của màng thường được duy trì trong khoảng 200 - 300 µm[[55](#_ENREF_55)], [[69](#_ENREF_69)], [[81](#_ENREF_81)], [[82](#_ENREF_82)], [[83](#_ENREF_83)].

- Tương thích sinh học.

- Ổn định với cả môi trường bên trong và bên ngoài dạng bào chế.

b.*Chất hóa dẻo*

Chất hóa dẻo là nhựa hoặc polymer. Khi phối hợp với các polymer khác, chất hóa dẻo có khả năng làm thay đổi đặc tính của polymer như giảm nhiệt chuyển kính Tg, tăng tính linh hoạt, độ đàn hồi, độ bền..[[84](#_ENREF_84)] khiến polymer trở nên mềm dẻo hơn và tăng khả năng chịu các áp lực cơ học lên màng. Những thay đổi này có thể ảnh hưởng đáng kể đến tính thấm của màng polymer. Chất hoá dẻo thường được sử dụng để tạo màng có độ thấm thấp là các loại PEG, ethylen glycol monoacetat và diacetat; màng có độ thấm cao là triethyl citrat, diethyl tartarat hoặc diacetin[[48](#_ENREF_48)], [[55](#_ENREF_55)], [[62](#_ENREF_62)].

c.*Tá dược tạo lỗ.*

TD tạo lỗđược dùng để hình thành màng vi xốp bằng cách hòa tan hay ăn mòn trong quá trình hoạt động của hệ. Chất tạo lỗ có thể có bản chất hữu cơ hay vô cơ, rắn hay lỏng. Chất tạo lỗ thường được sử dụng là natri clorid, kali clorid, polyhydric alcol và PVP [[48](#_ENREF_48)].

d.*Tá dược chỉnh dòng*

Dùng để điều chỉnh tính thấm dịch lỏng của màng. TD chỉnh dòng thân nước như PEG (300-600 Da), polyalkylen glycol và polyhydric có thể được sử dụng để tăng tốc độ dòng. Trong khi TD chỉnh dòng kỵ nước như diethyl phthalat hoặc dimethoxy phthalat có thể dùng để làm giảm tốc độ dòng[[48](#_ENREF_48)].

e.*Dung môi bao*

Dung môi bao dùng để hòa tan hoặc phân tán polymer và các TD khác. Các dung môi trơ, rẻ tiền, độc tính thấp và dễ bay hơi thường được dùng làm dung môi bao như: methylen clorid, aceton, MeOH, ethanol, isopropyl, cyclohexan, nước... hay hỗn hợp dung môi với tỷ lệ thích hợp [[48](#_ENREF_48)], [[56](#_ENREF_56)], [[60](#_ENREF_60)].

***1.2.3.3. Miệng giải phóng***

Tùy thuộc vào quy mô yêu cầu, sử dụng các phương pháp khác nhau để tạo miệng giải phóng trên bề mặt lớp DC của viên như:

*a. Khoan cơ*

Chỉ phù hợp với quy mô phòng thí nghiệm. Không phù hợp với quy mô sản xuất công nghiệp [[55](#_ENREF_55)].

*b. Khoan laser*

Là phương pháp tạo miệng giải phóng phổ biến nhất, cho phép tạo lỗ kích thước nhỏ hơn 1 mm. Màng hấp thụ năng lượng của chùm tia laser và nóng lên, sau đó bốc hơi một lượng nhỏ vật chất trên bề mặt màng tạo thành miệng giải phóng. Có thể kiểm soát kích thước miệng giải phóng bằng cách thay đổi năng lượng chùm tia, thời gian bắn, kích thước của chùm tia tại màng và độ dày màng. Thường sử dụng chùm tia laser CO2 với bước sóng đầu ra là 10,6 μm cho độ tin cậy cao [[55](#_ENREF_55)], [[62](#_ENREF_62)], [[68](#_ENREF_68)], [[85](#_ENREF_85)].

c.*Sử dụng chày có cấu tạo đặc biệt*:

Viên được bào chế bằng phương pháp bao dập. TD bao được nạp vào khuôn nén và đặt một viên nhân lên trên nạp thêm TD bao vào khuôn và dập viên bằng chày trên có thiết kế đặc biệt có thể tạo lỗ đồng thời trong quá trình dập viên[[55](#_ENREF_55)].

Hoặc có thể tạo một lỗ trên viên trước khi bao bằng thiết bị dập viên có chày trên được thiết kế đặc biệt. Trong quá trình bao viên, miệng giải phóng được hình thành tự động do lỗ trên viên được tạo thành đủ rộng và sâu để ít nhất một phần không bị bao màng, do đó, thuốc được giải phóng trong suốt quá trình hoạt động của viên[[55](#_ENREF_55)].

1.3. NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG VÀ TƯƠNG ĐƯƠNG SINH HỌCCÁC CHẾ PHẨM CHỨANIFEDIPIN

1.3.1. Các nghiên cứu đánh giá khả năng giải phóng *in vitro*

NIF thuộc phân nhóm II trong hệ thống phân loại sinh dược học gồm những chất kém tan trong nước và tính thấm tốt, do đó độ tan là yếu tố hạn chế tốc độ hấp thu. Vì vậy, cần nghiên cứu khả năng giải phóng *in vitro* để đánh giá quá trình giải phóng, hòa tan NIF từ dạng thuốc.Đường tiêu hóa thông thường có chứa các chất diện hoạt như muối mật và lecithin, do đó thêm vào môi trường hòa tan các chất diện hoạt sẽ mô phỏng điều kiện *in vivo* tốt hơn[[86](#_ENREF_86)].

Panda S. K. và CS [[87](#_ENREF_87)]đã tiến hành nghiên cứu thử hòa tan *in vitro* hai chế phẩm GPKD là nifedipin ER và Procardia XL. Tác giả đã thử nghiệm theo test 3 chuyên luận NIF GPKD của USP 38 với thiết bị cánh khuấy có tốc độ khuấy 100 vòng/phút, thể tích môi trường hòa tan 900 mL, nhiệt độ môi trường 37 ± 0,5oC, môi trường hòa tan là đệm pH 7,5 trong 1 giờ (giai đoạn 1) và môi trường giả dịch dạ dày pH 1,2 có chứa 0,5% SLS trong các giờ tiếp theo (giai đoạn 2). Nồng độ NIF trong dịch hòa tan được xác định bằng phương pháp quang phổ dựa vào đường chuẩn ở bước sóng 238 nm. Kết quả nghiên cứu cho thấy: giải phóng thuốc *in vitro*từ hai chế phẩm là tương tự nhau.

Chaudhary R.S. và CS [[88](#_ENREF_88)]đã tiến hành nghiên cứu xây dựng 1 hệ thống hòa tan *in vitro*để đánh giá hòa tan của các công thức GPKD chứa NIF là biệt dược thương mại A và B và so sánh với viên Adalat SR của hãng Bayer. Tác giả đã sử dụng 2 hệ thống thiết bị: hệ thống 1 là thiết bị kiểu cánh khuấy theo USP XXII có tốc độ cánh khuấy 70 vòng/phút, môi trường hòa tan 900 mL nước cất chứa SLS với nồng độ 0,54%, nhiệt độ môi trường 37 ± 0,5oC. Hệ thống 2 là thiết bị kiểu cánh khuấy theo USP XXII được cải tiến thêm 1 cánh khuấy trên cùng 1 trục có tốc độ khuấy 70 vòng/phút, môi trường hòa tan là 1 hệ hai pha có tính acid gồm: 500 mL dung dịch mô phỏng dịch dạ dày và 400 mL octanol; nhiệt độ môi trường hòa tan là 37 ± 0,5oC. Định lượng NIF trong dịch hòa tan bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 340 nm. Kết quả nghiên cứu đã lựa chọn được hệ thống hòa tan số 2 là phù hợp để đánh giá tốc độ hòa tan *in vitro* của các dạng bào chế NIF GPKD do cho kết quả có độ lặp lại ổn định và có sự tương quan tốt so với loại thiết bị bơm tuần hoàn.

Liu X. và CS [[89](#_ENREF_89)]thực hiện nghiên cứu đánh giá *in vitro*viên nén MOTS GPKS chứa NIF. Nghiên cứu sử dụng thiết bị kiểu cánh khuấy với tốc độ khuấy 100 vòng/phút. Sử dụng 3 môi trường hòa tan có pH khác nhau là HCl 0,1N pH 1,2, đệm phosphat pH 6,8 và đệm phosphat pH 7,4. Nhiệt độ môi trường là 37 ± 0,5oC, thể tích môi trường 900 mL. Kết quả nghiên cứu cho thấy NIF giải phóng trong 3 môi trường tại các thời điểm 4 giờ, 12 giờ và 24 giờ lần lượt là: 6,53 – 6,74 mg; 18,16 – 18,57 mg và 27,93 – 28,26 mg.

Garbacz G. và CS [[90](#_ENREF_90)]đã tiến hành nghiên cứu thiết bị bắt chước các điều kiện thủy động học và cơ học trong đường tiêu hóa nhằm cải thiện khả năng dự đoán của phép thử độ hòa tan. Nghiên cứu thực hiện trên đối tượng là viên Adalat OROS hàm lượng 30 mg, 60 mg, viên Coral 60 mg và viên NIF Sandoz 40 mg. Tác giả đã sử dụng 4 thiết bị thử hòa tan khác nhau: thiết bị kiểu cánh khuấy (Apparatus 2) với tốc độ khuấy 50 vòng/phút; môi trường hòa tan sử dụng 3 môi trường: pH 1,2 chứa 1% SLS mô phỏng dịch dạ dày, đệm acetat pH 4,5 chứa 1% SLS và đệm phosphat pH 6,8 chứa 1% SLS; thể tích môi trường 900 mL; nhiệt độ môi trường 37 ± 0,5oC. Thiết bị kiểu xilanh – pitton (Apparatus 3) với tốc độ dao động của pitton 10 lần/phút; môi trường hòa tan sử dụng đệm pH 6,8; thể tích môi trường là 250 mL. Thiết bị thử hòa tan mới kiểu cốc quay với tốc độ quay 10 và 40 vòng/phút; môi trường hòa tan sử dụng 3 môi trường: dung dịch natri clorid 0,15M + 0,5% SLS, dung dịch natri clorid 0,15M + 0,5% SLS + 1,25% chất tăng cường độ nhớt Bermodul, dung dịch natri clorid 0,15M + 0,5% SLS + 2% chất tăng cường độ nhớt Bermodul; thể tích môi trường 2000 mL. Thiết bị cải tiến từ thiết bị thử hòa tan số 2 theo USP để thử ứng suất hòa tan,mô phỏng các đặc tính cơ học của đường tiêu hóa với tốc độ cánh khuấy 100 vòng/phút, môi trường hòa tan sử dụng đệm pH 6,8, thể tích môi trường là 1150 mL. NIF trong dịch hòa tan được định lượng bằng phương pháp quang phổ dựa trên phép vi sai ở hai bước sóng 330 nm và 450 nm. Kết quả nghiên cứu cho thấy: các đặc điểm phân phối thuốc ổn định của viên Adalat OROS được quan sát thấy trong nhiều nghiên cứu *in vivo* cũng đã được thể hiện trong tất cả các thử nghiệm hòa tan.

Wonnemann M. và CS [[91](#_ENREF_91)]đã tiến hành thử nghiệm hòa tan *in vitro* hai chế phẩm GPKD chứa NIF là viên nifedipina Merck và viên Adalat OROS. Tác giả sử dụng thiết bị kiểu cánh khuấy chuẩn với tốc độ 100 vòng/phút, môi trường hòa tan sử dụng 4 môi trường đệm có pH khác nhau: HCl 0,1M pH 1 chứa 1% SLS; đệm acetat pH 4,5 chứa 1% SLS; đệm phosphat pH 6,8 chứa 1% SLS; đệm phosphat pH 8 chứa 1% SLS. Nồng độ NIF trong môi trường được định lượng bằng phương pháp đo quang. Kết quả là sau Tlag khoảng 2 giờ, viên đối chiếu giải phóng tuân theo động học bậc 0 đến 18 giờ. Viên đối chiếu giải phóng 50% sau 12giờ, khoảng xấp xỉ 100% đạt được sau24giờ. Nghiên cứu cho thấy có sự phụ thuộc rõ rệt vào pH của chế phẩm generic và có sự khác nhau đáng kể về đặc tính hòa tan *in vitro* giữa 2 chế phẩm.

USP 38 trong chuyên luận viên nén NIF GPKD quy định 8 test thử hòa tan cho viên nén NIF GPKD.

1.3.2. Nghiên cứu sinh khả dụng *in vivo*

***1.3.2.1. Phương pháp định lượng nifedipin trong dịch sinh học***

Trong phân tích thuốc trong dịch sinh học, mẫu định lượng thường có nồng độ thấp, nền mẫu phức tạp, lượng mẫu thường ít nên việc tiến hành định lượng lặp lại nhiều lần là rất khó khăn. Do đó, để đánh giá SKD của các chế phẩm chứa NIF thì yêu cầu cấp thiết là phương pháp phân tích định lượng cần phải có độ nhạy, độ chọn lọc cao, giới hạn định lượng dưới (LLOQ) thấp, độ lặp lại tốt và thời gian phân tích một mẫu phải đủ ngắn.

Mặt khác, do tính chất của NIF không bền trong điều kiện ánh sáng mặt trời và ánh sáng đèn neon trong phòng thí nghiệm nên việc chuẩn bị và xử lý mẫu cần được tiến hành trong phòng tối hoặc dưới ánh sáng màu vàng. Các ống nghiệm, vial…có dung dịch và huyết tương chứa NIF phải được bọc bằng màng nhôm.

Đã có nhiều tài liệu đề cập đến các phương pháp phân tích NIF trong dịch sinh học khi nghiên cứu SKD và tương đương sinh học (TĐSH). Các nghiên cứu này cho thấy:

- *Về phương pháp chiết NIF từ dịch sinh học*: có thể sử dụng phương pháp tủa protein [[92](#_ENREF_92)], [[93](#_ENREF_93)], [[94](#_ENREF_94)]; chiết pha rắn[[95](#_ENREF_95)], [[96](#_ENREF_96)], [[97](#_ENREF_97)], [[98](#_ENREF_98)]; tuy nhiên thường gặp là phương pháp chiết lỏng-lỏng[[99](#_ENREF_99)], [[100](#_ENREF_100)], [[101](#_ENREF_101)], [[102](#_ENREF_102)], [[103](#_ENREF_103)].

- *Về phương pháp phân tích*: NIF là một chất không phân cực, được hấp thu hoàn toàn qua đường tiêu hóa nhưng lại có SKD rất thấp, chủ yếu là do chuyển hóa tiền hệ thống. NIF được sử dụng với liều đường uống là 20mg, 30mg cho SKD là 43% [[104](#_ENREF_104)], nồng độ NIF tối đa trong huyết tương trên người lần lượt là 64 ± 31ng/mL và 75 ± 30 ng/mL[[104](#_ENREF_104)]. Trên chó, sau khi uống 1 liều đơn viên nén NIF GPKS với hàm lượng 30mg, nồng độ NIF trong huyết tương có thể dưới 1ng/mL[[105](#_ENREF_105)]. Đó là một thách thức đối với các phương pháp phân tích hiện đại. Do đó, để phân tích NIF trong dịch sinh học, thường chọn các phương pháp có độ nhạy và độ chọn lọc cao. Hiện nay, đã có nhiều các kỹ thuật phân tích định lượng được sử dụng để định lượng NIF trong huyết tương như phương pháp sắc ký khí và sắc ký lỏng (LC) kết hợp với các loại detector khác nhau: sắc ký khí với detector cộng kết điện tử [[21](#_ENREF_21)], [[23](#_ENREF_23)], sắc ký khí phóng xạ với detector ion hóa ngọn lửa [[22](#_ENREF_22)], sắc ký khí ghép khối phổ [[24](#_ENREF_24)];LC pha đảo với detector UV [[96](#_ENREF_96)],[[97](#_ENREF_97)], [[106](#_ENREF_106)],[[107](#_ENREF_107)],[[108](#_ENREF_108)], LC pha thường với detector UV[[102](#_ENREF_102)], LC pha đảo với detector điện hóa [[109](#_ENREF_109)], [[110](#_ENREF_110)], HPLC với detector chuỗi diod [[97](#_ENREF_97)], LC ghép khối phổ 1 lần ion hóa hóa học [[103](#_ENREF_103)], LC ghép khối phổ 2 lần ion hóa hóa học [[92](#_ENREF_92)], [[105](#_ENREF_105)], [[111](#_ENREF_111)], LC pha đảo ghép khối phổ 2 lần ion hóa tia điện [[94](#_ENREF_94)], [[101](#_ENREF_101)], [[112](#_ENREF_112)], [[113](#_ENREF_113)], sắc ký lỏng siêu hiệu năngghép khối phổ 2 lần (UPLC-MS/MS)ion hóa tia điện [[98](#_ENREF_98)], [[114](#_ENREF_114)], HPLC ghép khối phổ 2 lần[[115](#_ENREF_115)]. Như vậy, để định lượng NIF trong huyết tương, về cơ bản các phương pháp được đề cập trong các tài liệu chủ yếu dựa trên phương pháp HPLC.Trong đó, kỹ thuật sắc ký lỏng ghép nối khối phổ 2 lần được sử dụng rộng rãi. Kỹ thuật UPLC-MS/MSlà kỹ thuật tối ưu hóa hơn so với kỹ thuật HPLC ghép nối khối phổ 2 lần, cho phép nâng cao độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chọn lọc cao, có giới hạn định lượng rất thấp, có khả năng phân tích được số lượng mẫu lớn, đồng thời rút ngắn được thời gian phân tích trên 1 mẫu.

- *Về điều kiện sắc ký lỏng*:

+ Cột sắc ký: cột pha đảo C18 được sử dụng chủ yếu trong định lượng NIF trong dịch sinh học[[101](#_ENREF_101)], [[103](#_ENREF_103)], [[111](#_ENREF_111)], [[113](#_ENREF_113)], [[114](#_ENREF_114)]. Hay có thể dùng cột C8 [[92](#_ENREF_92)], [[105](#_ENREF_105)].

+ Pha động: thường dùng hỗn hợp của acetonitril (ACN) với các dung môi khác như: acid formic[[94](#_ENREF_94)], [[105](#_ENREF_105)], đệm phosphat[[93](#_ENREF_93)], [[97](#_ENREF_97)], amoni acetat[[98](#_ENREF_98)], [[114](#_ENREF_114)], acid acetic băng[[101](#_ENREF_101)] do ACN là dung môi hữu cơ rẻ tiền, sẵn có và cho hiệu suất chiết cao. Ngoài ra, một số hỗn hợp pha động khác cũng được sử dụng như: MeOH và amoni acetat [[92](#_ENREF_92)], [[111](#_ENREF_111)], MeOH và acid formic [[113](#_ENREF_113)].

+ Chuẩn nội: chất chuẩn nội (IS) sử dụng trong định lượng NIF bằng phương pháp HPLC rất đa dạng gồm: NIF D6 [[92](#_ENREF_92)], [[98](#_ENREF_98)], nimodipin [[105](#_ENREF_105)], [[102](#_ENREF_102)], diazepam [[100](#_ENREF_100)], [[97](#_ENREF_97)], nitrendipin [[101](#_ENREF_101)], [[106](#_ENREF_106)], [[114](#_ENREF_114)], [[115](#_ENREF_115)], acetaminophen [[112](#_ENREF_112)], 11-ketoprogesteron[[96](#_ENREF_96)], carbamazepine[[99](#_ENREF_99)], hydroclorothiazid [[93](#_ENREF_93)], dimethoxanat[[103](#_ENREF_103)], zaferolukast[[94](#_ENREF_94)]. Trong đó, các đồng vị đánh dấu deuteri (như: NIF D6) thường là IS có lợi hơn (trong việc hiệu chỉnh ảnh hưởng của mẫu) so với các chất có cấu trúc hóa học tương tự (nimodipin, diazepam, nitrendipin, carbamazepine, …), tuy nhiên, chúng hiếm khi có sẵn trên thị trường và tốn kém để tổng hợp. Do đó, khi lựa chọn IS của NIF thường dựa trên sự có mặt của các nhóm chức giống nhau trong cấu trúc, sự tương đồng về tính chất lý hóa và trọng lượng phân tử.

+ Giới hạn định lượng dưới: dao động từ 0,1 – 1 ng/mL[[111](#_ENREF_111)], [[112](#_ENREF_112)], [[113](#_ENREF_113)], [[114](#_ENREF_114)], [[115](#_ENREF_115)].

Phương pháp UPLC ra đời trên cơ sở sự tối ưu hóa phương pháp sắc ký lỏng với nguyên tắc cơ bản là giảm kích thước hạt pha tĩnh dưới 2 µm vàtăng áp suất vận hành nên độ phân giải sắc ký tốt hơn, tốc độ phân tích cao, tín hiệu trên detector của chất phân tích cao hơn, giảm được thời gian phân tích mẫu, giảm được tiêu thụ dung môi[[116](#_ENREF_116)], [[117](#_ENREF_117)]. Do đó, lựa chọn xây dựng phương pháp UPLC-MS/MS đạt yêu cầu về độ đúng, độ đặc hiệu, độ chọn lọc, độ chính xác để định lượng NIF trong các mẫu huyết tương.

***1.3.2.2. Nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng in vivo các chế phẩm chứa nifedipin***

Xác định SKD của 1 chế phẩm là rất quan trọng trong suốt vòng đời của các chế phẩm thuốc trong đánh giá tính an toàn và sự hiệu quả của 1 chế phẩm thuốc. Các nghiên cứu xác định SKD của các chế phẩm chứa NIF cũng được đề cập trong một số các tài liệu.

Wonnemann M. và CS [[91](#_ENREF_91)]đã so sánh DĐH của NIF từ hai chế phẩm Nifedipina Merck 30 mg (chế phẩm generic của hãngValpharma, Italy) và Adalat OROS (chế phẩm GPKD theo cơ chế thẩm thấu dùng đường uống của hãng Bayer SpA, Milan, Italy). Thiết kế nghiên cứu mở, chéo đôi, hai giai đoạn, đơn liều, ở trạng thái no sau bữa ăn sáng giàu chất mỡ trên 12 người tình nguyện khỏe mạnh, có độ tuổi trong khoảng 21 – 42 tuổivới thời gian nghỉ giữa 2 giai đoạn ít nhất là 7 ngày. Mẫu máu được lấy tại các thời điểm trước và sau khi uống thuốc với 18 điểm lấy mẫu (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 15; 18; 24; 30; 36; 42 và 48 giờ). NIF được chiết từ huyết tương bằng phương pháp chiết lỏng – lỏng với hỗn hợp diethyl ether/hexan (80/20, v/v) và định lượng bằng phương pháp LC-MS/MS đã được thẩm định, sử dụng nimodipin làm IS. Đường chuẩn tuyến tính trong khoảng nồng độ NIF 0,1 – 500 ng/mL (R2> 0,99). Thực nghiệm cho thấy: sau khi uống cả hai chế phẩm ở trạng thái no, có sự khác nhau rõ rệt về tốc độ và mức độ hấp thu thuốc với AUC0–∞ (thuốc thử là 504,21 giờ.ng/mL;thuốc đối chiếu là 361,28 giờ.ng/mL), Cmax (thuốc thử là 76,46 ng/mL; thuốc đối chiếu là: 19,20 ng/mL). Điều đó chứng tỏ giữa 2 chế phẩm thử và đối chiếu có các đặc tính DĐH khác nhau mặc dù cả hai chế phẩm đều được dung nạp tốt bởi tất cả người tình nguyện.

Guo Y. và CS [[103](#_ENREF_103)] đã tiến hành đánh giá TĐSH của viên nén NIF 20mg GPKD bào chế được (chế phẩm thử của công ty DiSha, thành phố Uy Hải, Trung Quốc) với viên nén đối chiếu NIF 20mg GPKD (chế phẩm của công ty Quốc Phong, thành phố Thanh Đảo, Trung Quốc). Nghiên cứu tiến hành trên 20 người tình nguyện nam khỏe mạnh được uống 1 liều đơn 20mg trong 1 thiết kế nghiên cứu mở, chéo đôi, ngẫu nhiên, 2 giai đoạn, ở trạng thái đói với thời gian nghỉ giữa 2 giai đoạn là 8 ngày. Mẫu máu được lấy tại các thời điểm trước và sau khi uống thuốc với 15 điểm lấy mẫu (0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 15; 24 và 36 giờ). NIF được chiết từ huyết tương bằng phương pháp chiết lỏng – lỏng với diethyl ethervà định lượng bằng phương pháp APCI-LC-MS, sử dụng dimethoxanat làm IS. Đường chuẩn tuyến tính trong khoảng nồng độ NIF 1 – 100 ng/mL (R2> 0,99). Kết quả cho thấy: Khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ các giá trị Cmax, AUC0-t và AUC0-∞nằm trong khoảng cho phép của Cục Thuốc và Thực phẩm, Trung Quốc (80-125% đối với AUC, 70-143% đối với Cmax ). Hai chế phẩm viên nén NIF GPKD là TĐSH về tốc độ và mức độ hấp thu, do đó có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Wei L.J. và CS[[118](#_ENREF_118)]đã tiến hành nghiên cứu TĐSH của dạng viên nén NIF 20 mg GPKD và dạng thuốc đối chiếu. Nghiên cứu tiến hành trên 20 người tình nguyện nam khỏe mạnh được uống 1 liều đơn hay đa liều dạng thuốc thử hay thuốc đối chiếu trong 1 thiết kế nghiên cứu chéo đôi, ngẫu nhiên, 2 giai đoạn, ở trạng thái đói với thời gian nghỉ giữa 2 giai đoạn là 7 ngày. Mẫu máu được lấy tại các thời điểm trước và sau khi uống thuốc với 12 điểm lấy mẫu(0; 1; 2; 3; 4; 5; 6; 8; 10; 12; 24 và 36 giờ). NIF được chiết tách từ huyết tương bằng phương pháp chiết lỏng – lỏng với ether và định lượng bằng phương pháp ESI-LC-MS, với IS là diazepam.Đường chuẩn tuyến tính trong khoảng nồng độ NIF 1 – 200 µg/L (R2> 0,99). Tính toán các thông số DĐH và đánh giá SKD tương đối và TĐSH của 2 loại viên nén GPKD. Các thông số DĐH thu được chứng minh rằng: 2 công thức thuốc là TĐSH và các viên nén GPKD có các đặc tính kéo dài sự giải phóng thuốc.

Liu X. và CS[[89](#_ENREF_89)]đã tiến hành nghiên cứu đánh giá *in vivo*hệ MOTS phân phối NIF. DĐH và SKD tương đối trên người của viên nén MOTS chứa NIF được so sánh với viên nén bơm thẩm thấu Adalat trên thị trường chứa 1 liều tương đương của NIF bằng cách cho mỗi người trong 11 người tình nguyện uống 1 liều đơn là 30mg theo 1 nghiên cứu mở, chéo đôi, ngẫu nhiên, hai giai đoạn với thời gian nghỉ giữa hai giai đoạn là 2 tuần. Mẫu máu được lấy tại các thời điểm trước và sau khi uống thuốc với 10 điểm lấy mẫu(0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 16; 20 và 24 giờ). NIF được chiết tách từ huyết tương bằng phương pháp chiết lỏng – lỏng với hỗn hợp hexan – dichloromethan (7:4, v/v) và định lượng bằng phương pháp HPLC, với IS là diazepam.Đường chuẩn tuyến tính trong khoảng nồng độ NIF 20 – 400 ng/mL. Kết quả nghiên cứu cho thấy: không có sự khác nhau đáng kể và có ý nghĩa thống kê nào về các thông số DĐH giữa 2 dạng thuốc. Hai chế phẩm MOTS và Adalat là TĐSH với nhau ở mức liều 30mg.

Phạm Thị Minh Huệ[[15](#_ENREF_15)]đã đánh giá TĐSH của viên nén NIF dạng cốt GPKD và so sánh với viên đối chiếu Adalat retard. Nghiên cứu được tiến hành trên 12 người tình nguyện khỏe mạnh được uống 1 liều đơn 20mg thuốc thử và thuốc đối chiếu lúc 8 giờ sáng trong 1 thiết kế nghiên cứu chéo đôi, ngẫu nhiên, hai giai đoạn, ở trạng thái đói với thời gian nghỉ giữa hai giai đoạn là 1 tuần. Mẫu máu được lấy tại các thời điểm trước và sau khi uống thuốc với 11 điểm lấy mẫu(0; 0,5; 1; 2; 3; 4; 6; 8; 10; 24 và 32 giờ). NIF trong mẫu huyết tương được chiết tách bằng phương pháp chiết lỏng-lỏng với hỗn hợp dung môi dicloromethan/pentan (30/70) và định lượng bằng phương pháp HPLC. Đường chuẩn tuyến tính trong khoảng nồng độ NIF 2 – 200 ng/mL (R2> 0,99).Tính toán các thông số DĐH, đánh giá SKD và TĐSH của 2 chế phẩm. Các thông số DĐH thu được cho thấy 2 chế phẩm là TĐSH.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu, hóa chất

- Các nguyên liệu, hoá chất chính được sử dụng trong nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.1.

Bảng 2.1. Các nguyên liệu và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Nguyên liệu** | **Nguồn gốc** | **Tiêu chuẩn** |
| 1 | Nifedipin  (Hàm lượng: 99,7 %) | Trung Quốc | USP 38  (Hạn dùng: 19.09.2020) |
| 2 | Nifedipin chuẩn SKS: WS.0216200.02  (Hàm lượng: 99,82%) | Viện KN thuốc TW | Chuẩn DĐVN |
| 3 | Glibenclamid chuẩn  SKS: 0103129  (Hàm lượng: 99,7 %) |
| 4 | Nifedipin Impurity A CRS  Code: N07 50010 | Châu Âu | PhEur |
| 5 | Nifedipin Impurity B CRS  Code: N07 50015 |
| 6 | PEO N10, PEO N80, PEO N750, PEO 301, PEO 303, PEO Coagualant, | Colorcon (Mỹ) | NSX |
| 7 | Lactose monohydrat, PVP K30, PEG 400, PEG 4000, PEG 6000, Magnesi stearat, | Trung Quốc | USP 38 |
| 8 | Celulose acetat, oxyd sắt đỏ, natri lauryl sulfat | Hàn Quốc | BP 2009 |
| 9 | Natri clorid | Việt Nam | DĐVN V |
| 10 | Kali clorid, acid hydrocloric, kali dihydrophosphat, natri dihydrophosphat, natri hydroxyd, natri acetat trihydrat | Trung Quốc | TKHH |
| 11 | Ethanol, nước cất | Việt Nam | DĐVN V |
| 12 | Aceton | Trung Quốc | DĐVN V |
| 13 | Methanol, acetonitril, cloroform, Acid formic | Merck-Đức | Loại dùng cho HPLC |

2.1.2. Thiết bị và dụng cụ nghiên cứu

***2.1.2.1. Thiết bị bào chế và sản xuất***

Bảng 2.2. Các thiết bị bào chế và sản xuất

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Thiết bị** | **Hãng – Model** | **Xuất xứ** |
| 1 | Máy dập viên tâm sai 1 chày | Korsch | Đức |
| 2 | Máy khoan laser | Epilog Laser mini/8000 | Mỹ |
| 3 | Nồi bao truyền thống | COATING PAN – CPS | Ấn Độ |
| 4 | Máy khuấy từ | IKA RH Basic | Đức |
| 5 | Máy dập viên 2 lớp quay tròn (9 chày) | SHAKTI/LP.DL | Ấn Độ |
| 6 | Máy bao viên | VANGUAR/VGB – 1E  Công suất: 0,5 – 1kg/mẻ | Trung Quốc |
| 7 | Máy trộn chữ Z | ERWEKA/AR – 400  Công suất: 0,5 – 2kg/mẻ | Đức |
| 8 | Máy xát hạt | ERWEKA |
| 9 | Đầu máy KALWEKA | Rimec/HD - 410 AC | Ấn Độ |
| 10 | Máy trộn lập phương | ERWEKA  Công suất: 0,5 – 2kg/mẻ | Đức |
| 11 | Súng phun | W-71 | Trung Quốc |
| 12 | Bơm nhu động  Đầu bơm YZ1515x  Dây Silicon Ø 25 | Longer pump / BT100 |

***2.1.2.2. Thiết bị và dụng cụ đánh giá***

Bảng 2.3. Các thiết bị và dụng cụ đánh giá

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Thiết bị** | **Hãng – Model** | **Xuất xứ** |
| 1 | Cân phân tích điện tử có độ chính xác 0,01mg | Mettler Toledo / MS205DU | Thụy Sĩ |
| 2 | Cân phân tích điện tử có độ chính xác 0,1mg | Mettler Toledo |
| 3 | Máyphân tích độ ẩm | AND MF – 50 | Nhật Bản |
| 4 | Máy đo pH | Mettler Toledo | Thụy Sĩ |
| 5 | Bộ rây kích thước 0,075-1mm |  | Trung Quốc |
| 6 | Máy đo quang phổ hồng ngoại Fourier | Cary 630 FTIR /Agilent | Mỹ |
| 7 | Máy phân tích nhiệt vi sai | PT 1000/ Linseis | Đức |
| 8 | Máy đo quang phổ UV – VIS 2 chùm tia | UVD 2960/LABOMED, INC. | Mỹ |
| 9 | Máy đo quang phổ UV – VIS 2 chùm tia | EMC-61 PC-UV Spectrophotometer/Emclab | Đức |
| 10 | Thước kẹp điện tử có nút định vị | Miyutoyo | Nhật |
| 11 | Máy thử độ cứng | PHAMATEST PTB 511E | Đức |
| 12 | Máy thử độ mài mòn | PHARMATEST PTFE |
| 13 | Máy đo khối lượng riêng biểu kiến | ERWEKA SVM |
| 14 | Máy xác định độ chảy | ERWEKA GLT |
| 15 | Máy thử độ hòa tan | COPLEY – DIS 8000 | Anh |
| 16 | Máy lắc siêu âm | Elmasonic S100H/ Elma | Đức |
| 17 | Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao | Alliance Waters 2695D | Mỹ |
| 18 | Tủ vi khí hậu | CLI – 305D / Boxun | Trung Quốc |
| 19 | Tủ vi khí hậu | Binder | Đức |
| 20 | Tủ sấy | Memmert /UN110 |
| 21 | Tủ lạnh sâu (-60oC) | Panasonic / MDF-U5312 PB | Nhật |
| 22 | Máy lắc xoáy | IKA / Vortex genius 3 | Đức |
| 23 | Máy sắc ký lỏng khối phổ UPLC-MS/MS | Water | Mỹ |
| 24 | Máy ly tâm | Universal 320/Hettich | Đức |
| 25 | Máy lắc ngang | IKA / HS 260 basic |
| 26 | Thiết bị bốc hơi dung môi có thổi khí | Organomation / 8125 | Mỹ |
| 27 | Tủ lạnh âm sâu (-30oC) | Panasonic / MDF-U5312 | Nhật |
| 28 | Cân kỹ thuật điện tử | Sartorius TE 3102S | Thụy Sĩ |
| 29 | Kính hiển vi | KRUSS | Đức |

2.1.3. Thuốc đối chiếu và thuốc thử

- Thuốc đối chiếu: Viên nén Adalat LA hàm lượng 30mg của hãng Bayer Pharma AG – Đức, số lô BXHAL06, sản xuất ngày 02/03/2016, hạn sử dụng 02/03/2020. Viên có chứa các thành phần là: NIF, hypromellose, PEO, magnesi stearat, natri clorid, oxid sắt đỏ, CA, PEG.

- Thuốc thử: Viên nén NIF 30mg GPKD theo cơ chế bơm thẩm thấu bào chế được.

2.1.4. Động vật thí nghiệm

Chó đực trưởng thành, khoẻ mạnh, cân nặng 12±2 kg, đạt tiêu chuẩn thí nghiệm, được nuôi dưỡng trong điều kiện thí nghiệm 7 ngày trước khi tiến hành thử thuốc tại khoa Dược lý – Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y.

2.1.5. Địa điểm nghiên cứu và thời gian thực hiện

***2.1.5.1. Địa điểm nghiên cứu***

- Viện Đào tạo Dược, Học viện Quân y.

- Viện nghiên cứu Y - Dược học Quân sự, Học viện Quân y.

- Bộ môn Bào chế, Trường đại học Dược Hà Nội.

- Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc Gia.

- Đại học Y Dược, Đại học Quốc Gia Hà Nội.

***2.1.5.2. Thời gian thực hiện:*** 2015 – 2020.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp nghiên cứu xây dựng công thức bào chế

***2.2.1.1. Đánh giá tương tác dược chất – tá dược***

*a. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng nifedipin trong mẫu đánh giá tương tác dược chất - tá dược bằng phương pháp HPLC*

### \*Xây dựng phương pháp

### - Pha các dung dịch chuẩn:

Dung dịch chuẩn gốc: cân chính xác khoảng 50,0mg NIF chuẩn cho vào bình định mức 100 mL.Thêm khoảng 70 mL pha động MeOH/nước (65/35), lắc siêu âm cho tan hoàn toàn trong 30 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng, sau đó thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều đều thu được dung dịch chuẩn gốc 500 µg/mL.

Dung dịch chuẩn: Lấy chính xác 3 mL dung dịch chuẩn gốc 500 µg/mLcho vào bình định mức 10 mL, thêm pha động vừa đủđến vạch, lắc đều để được dung dịch chuẩn có nồng độ NIF khoảng 150 µg/mL. Lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiêm mẫu vào hệ thống sắc ký.

### -Pha mẫu thử:

Cân chính xác một lượng hỗn hợp bột của NIF và các TD (theo tỷ lệ 1/1) tương đương với khoảng 50,0mg NIF cho vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 70 mL pha động MeOH/nước (65/35), lắc siêu âmtrong 30 phút, để nguội ở nhiệt độ phòng, sau đó thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lấy một thể tích khoảng 10mL dung dịch trong bình định mức, đem ly tâm 4000 vòng/phút trong 20 phút. Lấy chính xác 3 mL dung dịch đã được ly tâm, cho vào bình định mức 10 mL và thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiêm mẫuvào hệ thống sắc ký.

### - Điều kiện sắc ký:

Sử dụng dung dịch chuẩn NIF nồng độ 150 µg/mL để khảo sát. Quét phổ hấp thụ của dung dịch trên trong khoảng 200 - 500 nm để tìm bước sóng hấp thụ cực đại. Khảo sát các điều kiện sắc ký khác nhau như: pha tĩnh: cột silica gel pha đảo C18 Phenomenex LUNA, Xbridge; pha động: hỗn hợp các dung môi MeOH, ACN, H2O với các tỷ lệ khác nhau. Duy trì tốc độ dòng 1 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 20µL. Xác định điều kiện sắc ký cho pic đạt độ đối xứng tốt, tỷ lệ diện tích pic trên nồng độ và chiều cao pic trên nồng độ lớn nhất.

### \* Thẩm định phương pháp

Theo hướng dẫn của ICH và thông tư 32/2018 của Bộ Y tế, dựa trên việc khảo sát các chỉ tiêu sau: tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác trung gian, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ) của phương pháp.

*b. Đánh giá tương tác dược chất – tá dược*

### \* Chuẩn bị mẫu

Tiến hành rây nguyên liệu NIF qua rây 0,18mm; lactose monohydrat, natri clorid, PVP K30, PEO N10, PEO N80, PEO N750, PEO 301, PEO 303, PEO Coagulant qua rây 0,5mm và magnesi stearat, oxyd sắt đỏ cho qua rây 0,125mm. Trộn đều NIF với từng TD dự kiến sử dụng theo tỷ lệ 1:1 về khối lượng. Cho hỗn hợp bột vào lọ thủy tinh (10mL), nút kín, cho vào trong bao bì thứ cấp (túi nhôm), hàn kín, bảo quản mẫu sau khi trộn ở điều kiện 40oC và 40oC/độ ẩm 75 ± 5% trong 1 tháng. Quá trình chuẩn bị mẫu nguyên liệu và TD được thực hiện ở điều kiện 25 ± 2oC/55 ± 5%.

### \*Theo dõi sự biến đổi màu sắc của dược chất

Áp dụng đánh giá tương tác của từng TD với NIF. Đánh giá bằng cách quan sát sự biến đổi màu sắc hỗn hợp bột, so sánh với mẫu DC trong cùng điều kiện.

**\*** Phân tích nhiệt vi sai

Áp dụng đánh giá tương tác của từng TD với NIF. Phân tích nhiệt vi sai các mẫu trước và sau 1 tháng bảo quản trên máy DSC PT 1000, Linseis (Đức). Điều kiện: khối lượng mẫu 12 – 15 mg, gia nhiệt trong khoảng từ nhiệt độ 30oC đến 300oC, tốc độ gia nhiệt 10oC/phút, chén nhôm dung tích 30 μL. Trong quá trình thử, thổi khí nitrogen với tốc độ 20 mL/phút. Tiêu chí đánh giá là nhiệt độ chuyển pha và enthalpy.

**\*** Đo phổ hồng ngoại

Áp dụng đánh giá tương tác của từng TD với NIF. Đo phổ FT – IR các mẫu trước và sau 1 tháng bảo quản trên máy Cary 630 FTIR, Agilent (Mỹ) với các điều kiện như sau: khối lượng mẫu 2 – 5mg, chế độ đo truyền qua, quét phổ trong khoảng số sóng từ 650 –4000cm-1 (độ phân giải 8 cm-1). Tiêu chí đánh giá là bước sóng hấp thụ cực đại.

**\*** Xác định sự suy giảm hàm lượng dược chất

Áp dụng trên tất cả các mẫu đã được theo dõi sự thay đổi màu sắc của DC và sử dụng phương pháp đo phổ IR. Định lượngDC ở thời điểm t = 0 và sau 1 tháng bảo quản ở điều kiện 40oC và 40oC/độ ẩm 75 ± 5% bằng phương pháp HPLC. Đánh giá sự suy giảm hàm lượng DC.

***2.2.1.2. Đánh giá độ ổn định với ánh sáng của nifedipin trong các môi trường.***

Pha một dung dịch chuẩn có nồng độ xác định, đặt dưới 2 nguồn sáng là ánh sáng đèn natri và ánh sáng đèn neon phòng thí nghiệm, đo độ hấp thụ của mẫu sau các khoảng thời gian nhất định, đánh giá dựa trên sự giảm nồng độ dung dịch.Tiến hành trong 2 môi trường pH 1,2 chứa 0,5% SLS và môi trường đệm phosphat pH 7,5.

*Tiến hành:*

Pha chuẩn gốc Co: cân chính xác khoảng 50mg NIF chuẩn vào bình định mức nâu 100mL, thêm khoảng 70mL MeOH, lắc siêu âm 5 phút, thêm vừa đủ bằng MeOH được dung dịch chuẩn gốc nồng độ 500µg/mL.

Hút 1mL chuẩn gốc Co vào bình định mức nâu 100mL, thêm vừa đủ đến vạch bằng môi trường đệm tương ứng.Làm 2 mẫu, một mẫu để dưới ánh sáng đèn natri, một mẫu để dưới đèn neon phòng thí nghiệm.Đo mật độ quang tại bước sóng 237nm ở các thời điểm: 0 giờ; 0,25 giờ; 0,5 giờ; 1 giờ; 2 giờ; 4 giờ; 8 giờ, 16 giờ; 24 giờ.Đánh giá sự phân hủy của NIF trong 2 môi trường: đệm phosphat pH 7,5 và pH 1,2 chứa 0,5% SLS dưới 2 nguồn sáng.

2.2.2. Phương pháp bào chế

### *2.2.2.1.Phương pháp bào chế viên nén nifedipin giải phóng kéo dài ở quy mô phòng thí nghiệm*(100 viên/mỗi mẻ)

*a.Bào chế viên nhân hai lớp*

Bào chế viên nhân hai lớp chứa NIF bằng phương pháp tạo hạt ướt: rây NIF qua rây 0,18mmvà các PEO (PEO N10, PEO 303...), lactose monohydrat, natri cloridđược nghiền, rây qua rây 0,5 mm. Sau đó, trộn bột kép riêng hỗn hợp của lớp chứa DC và lớp đẩy, tạo hạt cốm lớp DC và lớp đẩy với dung dịch PVP K30 5% trong ethanol tuyệt đối. Trộn TD trơn, cân khối lượng từng lớp. Cho lớp DCvào cối, nén nhẹ, cho tiếp lớp đẩy vào dập từng viên một bằng máy dập viên tâm sai Korsch với chày đường kính 9,0mm. Độ cứng viên 10 – 12kp. Quy mô mỗi mẻ 100 viên.

Công thức viên nhân như sau:

* *Lớp dược chất:*

Nifedipin 30 mg

TD trương nở Thay đổi (mg)

(PEO N-10, PEO N-80, PEO N-750)

Natri clorid Thay đổi (mg)

Lactose monohydrat 15%

Magnesi stearat 1%

* *Lớp đẩy:*

TD trương nở Thay đổi (mg)

(PEO 301, PEO Coagulant, PEO 303)

Natri clorid Thay đổi (mg)

Magnesi stearat 1%

Oxyd sắt đỏ 0,5%

Khối lượng trung bình lớp dược chất: 190 mg, khối lượng trung bình lớp đẩy: 110 mg, khối lượng trung bình viên nhân: 300mg. Viên nhân 2 lớp, 2 mặt lồi, chày lõm.

*b. Bao màng bán thấm*

Sử dụng phương pháp bao phim bằng nồi bao truyền thốngcải tiến (Coating pan -CPS) để bao màng bán thấm cho viên nhân với quy mô 100 g viên/mẻ (330 viên/mẻ) với thành phần dịch bao như sau:

Cellulose acetat 10,8 g

PEG 4000 thay đổi(g)

Aceton 300 mL

Nước tinh khiết 10 mL

Quy trình bào chế lớp màng bao bán thấm gồm các bước:

*Chuẩn bị dịch bao phim*: phân tán và hòa tan bằng cách rắc từ từ lần lượt các thành phần PEG 4000, CA vào dung môi aceton và nước. Khuấy trộn liên tục bằng máy khuấy từ ít nhất 2 giờ đến khi polymer tan hết (dịch bao trong suốt) và duy trì khuấy trộn trong quá trình bao.

*Tiến hành bao phim:*cân viên nhân và cho vào nồi bao, sấy viên nhân ở nhiệt độ 400C trong 15 phút. Tiến hành bao viên sử dụng nồi bao truyền thống với các thông số thích hợp: góc nghiêng nồi bao 30o; tốc độ quay của nồi bao25 vòng/phút; tốc độ phun dịch 3,2 mL/phút; nhiệt độ không khí trong nồi bao 40 ± 2oC; áp lực vòi phun 1,5 bar; đường kính vòi phun 1,5mm.Quá trình bao viên được tiến hành đến khi viên bao đạt KLMB theo yêu cầu. Viên thu được đem sấy ở nhiệt độ 40 ± 5oC trong 24 giờ. Sau đó, để ổn định trong 48 giờ ở điều kiện phòng trước khi khoan laser. Kiểm soát tốc độ chiếu tia và năng lượng chùm tia.

*c. Khoan miệng giải phóng*

Miệng giải phóng được khoan ở chính giữa bề mặt lớp DC bằng kỹ thuật khoan laser:

- Thiết bị: sử dụng máy khoan laser phi kim, đầu phát tia laser CO2.

- Tiến hành:

+ Sử dụng khuôn định vị viên bằng mica, có độ dày xấp xỉ độ dày của viên, được máy cắt tạo các ô định vị có đường kính 9,1 mm; khoảng cách giữa các ô là 5 mm.

+ Xếp viên vào khuôn định vị sao cho mặt chứa DC hướng lên trên, đặt khuôn chứa viên vào ngăn định vị vật cần khoan của máy.

+ Trên máy tính đã cài đặt phần mềm điều khiển máy khoan, cài đặt thông số đường kính lỗ khoan mong muốn, lựa chọn mức năng lượng chùm tia thích hợp, điều chỉnh tiêu cự thấu kính hội tụ bằng thước của máy để chùm tia tác động tại màng bao.

+ Khoan chính giữa các ô định vị.

+ Sau khi khoan xong, lấy viên ra khỏi máy và chuẩn bị khoan mẻ tiếp theo.

### *2.2.2.2.Phương pháp bào chế viên nén nifedipin giải phóng kéo dài ở quy mô 2000 viên/mẻ*

Quá trình dập viên ở quy mô 2000 viên/mẻ được tiến hành trên máy dập viên 2 lớp quay tròn SHAKTI (9 chày). Quy trình bào chế viên nén NIF 30 mg GPKD theo cơ chế bơm thẩm thấu kéo - đẩy ở quy mô 2000 viên/mẻ được thể hiện ở hình 2.1.

dd PVP K30

5%/ ethanol

Magnesi stearat

NIF, PEO N10, NaCl, Lactose monohydrate

PEO 303, NaCl, Oxyd sắt đỏ

dd PVP K30

5%/ ethanol

Magnesi stearat

Lớp DC (Nifedipin và các TD)

Lớp đẩy (các TD)

- Trộn trong cối

- Trộn lập phương

- Thiết bị trộn chữ Z với đầu

máy KALWEKA

-Thiết bị trộn chữ Z với đầu máy

KALWEKA

- Máy xát hạt ERWEKA với

đầu máy KALWEKA

Rây 800μm

- Tủ sấy tĩnh Memmert

Nhiệt độ: 50 ± 50C

Độ ẩm: 2-3%

- Rây: 180μm (NIF), 500μm (TD

- Rây 800μm

- Máy dập viên 2 lớp quay tròn SHAKTI

Độ cứng: 10 – 12kp

Bao màng bán thấm

Khoan laser

Dập viên 2 lớp

Nghiền, rây, Cân

Trộn bột kép

Nhào ẩm

Xát hạt

Sấy hạt

Trộn cốm

Sửa hạt

Nghiền, rây, Cân

Trộn bột kép

Nhào ẩm

Xát hạt

Sấy hạt

Trộn cốm

Sửa hạt

**Hình 2.1**.Sơ đồ quy trình bào chế viên nifedipin

giải phóng kéo dài

Quy trình bào chế gồm các giai đoạn chính sau:

*Giai đoạn chuẩn bị nguyên liệu*: nguyên liệu NIF được nghiền trong cối, rây qua rây có kích thước lỗ rây 250μm, 180μm và 75μm. Đánh giá phân bố KTTP bột.

*Giai đoạn trộn bột kép*: thực hiện bằng cách trộn trong cối theo nguyên tắc đồng lượng. Sau đó, trộn bằng máy trộn lập phương với đầu máy KALWEKA. Cuối cùng, trộn bằng máy trộn chữ Z với đầu máy KALWEKA. Khảo sát quá trình trộn bột kép lớp DC và lớp đẩy lần lượt sau 10 và 5 phút, 15 và 10 phút, 20 và 15 phút, 25 và 20 phút.

*Giai đoạn nhào ẩm*: sử dụng máy trộn chữ Z ERWEKA với đầu máy KALWEKA. Khối bột ẩm được lấy ra và tiến hành xát hạt.

*Giai đoạn xát hạt*: tiến hành xát hạt trên máy xát hạt ERWEKA theo nguyên tắc xát hạt đung đưa qua rây 800μm và sử dụng đầu máy KALWEKA.

*Giai đoạn sấy và sửa hạt*: sử dụng hệ thống sấy tĩnh Memmert để tiến hành khảo sát quá trình sấy khô hạt ở nhiệt độ 50 ± 5oC trong 30 phút, 45 phút và 60 phút. Kiểm tra hàm ẩm của hạt tới khi đạt hàm ẩm2-3% và đem sửa hạt qua rây 800μm.

*Giai đoạn trộn hoàn tất*: trộn cốm khô với TD trơn bằng thiết bị trộn lập phương trên đầu máy KALWEKA. Khảo sát quá trình trộn TD trơn sau 10 phút, 15 phút, 20 phút và 25 phút.

*Giai đoạn dập viên*: tiến hành dập viên trên máy dập viên 2 lớp quay tròn SHAKTI (9 chày)với bộ chày cối kích thước 9mm. Theo dõi quá trình dập viên và đánh giá độ cứng của viên, độ mài mòn, độ đồng đều khối lượng tại 3 điểm khác nhau: đầu, giữa, cuối của quá trình dập viên.

Tiến hành khảo sát trên mẻ 1. Ở mẻ 2 và 3, tiến hành bào chế theo các thông số lựa chọn từ mẻ 1.

*Giai đoạn bao màng bán thấm*: tiến hành trên máy bao phim tự động VANGUAR – VGB - 1E với các thông số thích hợp: tốc độ quay của nồi bao 6 vòng/phút; tốc độ phun dịch: khảo sát các tốc độ 2,4 mL/phút, 3,2 mL/phút, 4 mL/phút; nhiệt độ khí vào: khảo sát các nhiệt độ khí vào 45ºC, 50ºC, 55ºC; áp suất khí nén 1,5 bar; thể tích khí vào 12m3/h; thể tích khí ra 15m3/h.Sau khi bao đạt độ dày yêu cầu, viên thu được đem sấy ở nhiệt độ 40 ± 5oC trong 24 giờ. Sau đó, để ổn định trong 48 giờ ở điều kiện phòng trước khi khoan laser.

*Giai đoạn khoan miệng giải phóng:* miệng giải phóng được khoan ở lớp DC bằng máy khoan laser Epilog Laser mini/8000với đường kính khay 9,1 mm. Kiểm soát tốc độ chiếu tiavà năng lượng chùm tia.

2.2.3. Thẩm định quy trình bào chế viên nén nifedipin 30 mg dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy ở quy mô 2000 viên/mẻ

***2.2.3.1. Đánh giá nguy cơ gây mất ổn định trong quy trình bào chế***

Xem xét từng giai đoạn của quy trình bào chế để đánh giá các yếu tố nguy cơ ảnh hưởng và có thể làm cho quy trình bào chế không ổn định. Từ đó, đề xuất các biện pháp xử lý để hạn chế các nguy cơ này. Các yếu tố nguy cơ ảnh hưởng đến độ ổn định của quy trình bào chế được trình bày ở phần phụ lục 4.

***2.2.3.2. Lựa chọn các thông số thẩm định***

Qua đánh giá nguy cơ ở trên, tiến hành thẩm định trên 3 mẻ nghiên cứu với các thông số cần thẩm định như trình bày ở phần phụ lục 5.

2.2.4. Phương pháp đánh giá tiêu chuẩn chất lượng

### *2.2.4.1. Đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng của hạt, bột trước khi dập viên*

*\* Đánh giá bột kép:* đánh giá độ đồng đều hàm lượng NIF trong bột kép dựa vào việc định lượng NIF theo phương pháp HPLC. Khối bột được coi là đồng đều hàm lượng khi RSD ≤ 3%.

*\* Đánh giá phân bố KTTP*(bột nguyên liệu, hạt): bằng phương pháp rây: cân 100 g bột (hạt) rây qua các rây có kích thước khác nhau. Tiến hành rung lắc để bột (hạt) qua các lớp rây. Sau đó, cân khối lượng bột qua từng rây để đánh giá phân bố KTTP.

#### \* Xác định khối lượng riêng biểu kiến:bằng phương pháp gõ đến thể tích không đổi. Cân m (g) bột (hạt) cho vào ống đong đặt lên máy đo khối lượng riêng biểu kiến (KLRBK) ERWEKA SVM. Gõ với tần số 100 lần/phút, gõ trong 5 phút. Đọc thể tích của khối bột sau khi gõ (Vbk). KLRBK được tính theo công thức: dbk=m/Vbk

Trong đó: dbk: khối lượng riêng biểu kiến (g/mL); m: khối lượng hạt (g).

Vbk: thể tích biểu kiến của hạt (mL)

#### \* Xác định độ trơn chảy: được thực hiện trên máy đo tốc độ chảy ERWEKA GWF với đường kính lỗ phễu 10 mm. Tốc độ trơn chảy được tính theo công thức: v = m/t

Trong đó: v: tốc độ chảy (g/giây); m: khối lượng bột (hạt) cho vào (g); t: thời gian chảy của khối bột (hạt) (giây).

#### \* Xác định mất khối lượng do làm khô:được xác định trên máy xác định độ ẩm nhanh AND MF – 50 theo phương pháp quy định tại phụ lục 9.6, DĐVN V [[9](#_ENREF_9)].

### *2.2.4.2. Đánh giá viên thẩm thấu*

*\* Đường kính miệng giải phóng:* kiểm tra đường kính miệng giải phóng bằng kính hiển vi quang học với nguồn sáng chiếu từ trên xuống, đo ở vật kính 4x. Đo kích thước miệng giải phóng của 10 viên, tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn tương đối.

*\* Độ dày màng bao:* độ dày màng bao được tính căn cứ vào khối lượng viên tăng lên sau khi bao. Phần trăm khối lượng viên tăng lên sau khi bao được tính theo công thức: F



### Trong đó: m1, m2là khối lượng trung bình viên trước và sau khi bao.

### *2.2.4.3. Đánh giá một số chỉ tiêu chất lượng của viên nén*

#### \* Hình thức:đánh giá bằng cảm quan.

#### \* Xác định lực gây vỡ viên

- Thiết bị: máy đo độ cứng PHARMATEST PTB.

- Tiến hành: đặt từng viên dọc theo đường kính viên, máy sẽ tác động 1 lực qua đường kính viên đến khi vỡ viên. Ghi lại lực gây vỡ viên.

#### \* Xác định độ mài mòn(áp dụng cho viên chưa bao)

Được xác định bằng máy thử độ mài mòn PHARMATEST PTF E theo phương pháp trống quay với tốc độ khoảng 100 vòng / 5 phút.Tính độ mài mòn X(%) theo công thức:



#### \* Định tính

Tiến hành theo phương pháp trong DĐVN V[[9](#_ENREF_9)].

#### \* Xác định độ đồng đều khối lượng, độ đồng đều hàm lượng

Theo quy định tại phụ lục 11.2 và 11.3 của DĐVN V [[9](#_ENREF_9)].

#### \* Đánh giá độ hòa tan

Tiến hành thử độ hòa tan theo Test 3 của chuyên luận thử độ hòa tan viên nén NIF GPKD của USP 38[[14](#_ENREF_14)] với các thông số kỹ thuật sau:

- Pha 1:

+ Môi trường: 900 mL dung dịch đệm phosphat 0,05M có pH 7,5.

+ Dung dịch thử: lọc qua màng lọc thích hợp.

+ Dung dịch chuẩn làm việc: nồng độ 20μg/mL của NIF chuẩn trong môi trường từ dung dịch chuẩn gốc 500μg/mL trong MeOH.

+ Detector UV.

+ Bước sóng phân tích: 237 nm.

+ Thiết bị: máy cánh khuấy 6 cốc

+ Tốc độ quay: 100 vòng/phút

+ Thời điểm lấy mẫu: 1 giờ.

+ Nhiệt độ: 37 ±0,5oC

+ Định lượng: lấy viên nén ra khỏi cốc chứa môi trường pha 1 và đưa viên nén đã được gắn với bộ phận giữ viên vào trong cốc hòa tan chứa môi trường của pha 2. Xác định hàm lượng NIF được giải phóng trong pha 1, dùng dung dịch thử đã được lọc qua màng lọc, thêm chuẩn dung dịch chuẩn làm việc, sử dụng môi trường là mẫu trắng.

- Pha 2:

+ Môi trường: 900 mL dung dịch pH 1,2 chứa 0,5% SLS.

+ Dung dịch thử: lọc qua màng lọc thích hợp.

+ Detector UV.

+ Bước sóng phân tích: 237nm.

+ Thiết bị: máy cánh khuấy 6 cốc

+ Tốc độ quay: 100 vòng/phút

+ Thời điểm lấy mẫu: 1, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 20, 24 giờ.

+ Nhiệt độ: 37,0±0,5oC

+ Định lượng: xác định hàm lượng NIF được giải phóng trong pha 2, dùng dung dịch thử đã được lọc qua màng lọc và đường chuẩn NIF trong môi trường hòa tan, sử dụng môi trường là mẫu trắng. Với mỗi viên thử độ hòa tan, lượng NIF hòa tan tại mỗi thời điểm của pha 2 được cộng thêm lượng NIF đã hòa tan trong đệm phosphat pH 7,5 ở pha 1.

Trường hợp định lượng NIF trong dịch thử hòa tan bằng phương pháp đo quang phổ UV - VIS (Áp dụng cho các mẫu viên xây dựng công thức): Sau mỗi khoảng thời gian nhất định, mẫu trắng, mẫu chuẩn và các mẫu thử được tiến hành đo ở bước sóng 237 nm và tính kết quả bằng cách sử dụng phương pháp thêm chuẩn và đường chuẩn của NIF trong môi trường hòa tan.

#### \* Định lượng nifedipin trong viên nén nifedipin 30mg giải phóng kéo dài:

Định lượng bằng phương pháp HPLC (Áp dụng trong nghiên cứu độ ổn định và xây dựng TCCS của viên):

- Dung dịch chuẩn: cân chính xác một lượng khoảng 0,050g NIF chuẩn cho vào bình định mức 100 mL. Thêm khoảng 70 mL pha động MeOH / nước (65/35), lắc siêu âm cho tan hoàn toàn (30 phút), sau đó để nguội ở nhiệt độ phòng rồi thêm pha động vừa đủ, lắc đều. Lấy chính xác 3 mL dung dịch thu được cho vào bình định mức 10 mL và thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều để được dung dịch có nồng độ NIF khoảng 150μg/mL. Sau đó, lọc qua màng lọc 0,45μm trước khi tiêm mẫu.

- Dung dịch thử: Lấy 20 viên, loại bỏ lớp bao phim (nếu cần), cân và tính KLTB, nghiền thành bột mịn. Cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với 0,050g NIF cho vào bình định mức 100 mL. Thêm khoảng 70 mL pha động MeOH / nước (65/35), lắc siêu âm cho tan hoàn toàn (30 phút), sau đó để nguội ở nhiệt độ phòng rồi thêm pha động vừa đủ, lắc đều. Lấy 1 thể tích khoảng 10 mL từ bình định mức đem ly tâm 4000 vòng/phút trong 20 phút. Lấy chính xác 3 mLdung dịch đã được ly tâm cho vào bình định mức 10 mL và thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua giấy lọc Whatman, bỏ 1-2 mL dịch lọc đầu. Sau đó, lọc qua màng lọc 0,45μm trước khi tiêm mẫu (Tiến hành thí nghiệm ngay sau khi pha dung dịch chuẩn và dung dịch thử).

Tiến hành sắc ký dung dịch thử và dung dịch chuẩn. Ghi diện tích pic.

Qua tham khảo tài liệu [[14](#_ENREF_14)], [[20](#_ENREF_20)] và kết quả khảo sát sơ bộ, lựa chọn các điều kiện sắc ký như sau: cột sắc ký phenomenex LUNA RP C18 (250mm x 4,6mm), đường kính hạt 5μm; pha động MeOH / nước (65/35); tốc độ dòng 1,0 mL/phút; thể tích tiêm: 20μl; detector quang phổ tử ngoại đặt tại bước sóng 237nm; nhiệt độ lò cột 25oC.

- Tính toán kết quả: hàm lượng NIF trong mẫu thử được tính bằng cách so sánh diện tích pic với mẫu chuẩn có nồng độ đã biết. Hàm lượng % nifedipin so với nhãn:

Trong đó:

St,Sc : lần lượt là diện tích pic của mẫu thử và mẫu chuẩn.

mt, mc : lần lượt là khối lượng cân của bột viên và mẫu chuẩn.

P : là hàm lượng của chất chuẩn NIF (Viện KNTW).

mnhãn : là lượng NIF có trong viên theo lý thuyết (mnhãn =0,03g).

mtbv : là khối lượng trung bình của viên.

- Yêu cầu: theo quy định trong DĐVN V, hàm lượng NIF trong viên phải nằm trong khoảng từ 95,0% đến 105,0% so với lượng theo lý thuyết.

#### \* Đánh giá tương đương hòa tan in vitro:phép thử độ hòa tan được tiến hành trong ba môi trường (môi trường pH 1,2; pH 4,5 và pH 6,8). Thực hiện trên máy thử hòa tan COPLEY – DIS 8000 với các thông số:

- Thiết bị cánh khuấy

- Nhiệt độ môi trường: 37 ± 0,5oC

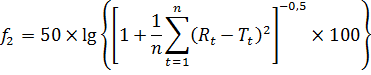
- Tốc độ khuấy: 100 vòng/phút

- Môi trường: 900 mL dung dịch HCl 0,1N pH 1,2 (hoặc dung dịch đệm pH 4,5 hay dung dịch đệm phosphat pH 6,8) chứa 1 % SLS.

- Thời gian thử: 24 giờ.

- Số lượng viên thử: 12 viên

Trường hợp định lượng NIF trong dịch thử hòa tan bằng phương pháp HPLC (Áp dụng cho viên đối chiếu, viên bao công thức cuối cùng): thử độ hòa tan của viên nén NIF 30mg GPKD và viên đối chiếu Adalat LA trong 3 môi trường khác nhau: dung dịch HCl 0,1N pH 1,2; dung dịch đệm pH 4,5; dung dịch đệm pH 6,8. So sánh biểu đồ hòa tan của thuốc thử và thuốc đối chiếu dựa vào hệ số tương đồng f2.



Trong đó:

n: số thời điểm lấy mẫu

Rt : % NIF giải phóng trung bình từ thuốc đối chiếu tại thời điểm t

Tt : % NIF giải phóng trung bình từ thuốc thử tại thời điểm t

2.2.5. Phương pháp đánh giá độ ổn định

Nghiên cứu độ ổn định được thực hiện theo quy định của WHO [[119](#_ENREF_119)], FDA [[120](#_ENREF_120)], ICH[[121](#_ENREF_121)] và Asean [[122](#_ENREF_122)].

### *2.2.5.1. Đối tượng thử*

Các mẫu viên nén NIF 30 mg GPKD của 3 mẻ khác nhau (mỗi mẻ khoảng 2000 viên) được đóng lọ thủy tinh màu nâu 60 viên, nắp kín, đóng trong hộp bìa carton.

### *2.2.5.2. Điều kiện, thời gian bảo quản và lấy mẫu kiểm tra*

- Nghiên cứu dài hạn: Điều kiện thực tại phòng thí nghiệm (nhiệt độ 25-35oC, độ ẩm 65-85%). Thời gian bảo quản 12 tháng.

- Điều kiện lão hóa cấp tốc: Nhiệt độ 40 ± 2°C, độ ẩm 75 ± 5%. Thời gian bảo quản 6 tháng.

- Thời gian lấy mẫu:

+ Nghiên cứu dài hạn: Sau khi bảo quản 3, 6, 9 và 12 tháng.

+ Điều kiện lão hóa cấp tốc: 3, 6 tháng.

### *2.2.5.3. Các tiêu chuẩn khảo sát*

Đánh giá về: hình thức, độ hoà tan, hàm lượng NIF và tạp chất liên quan.

### *2.2.5.4. Tính toán và dự đoán tuổi thọ của thuốc*

Sử dụng phần mềm Minitab 19. Các tiêu chuẩn khác theo quy định của WHO.

2.2.6. Phương pháp đánh giá sinh khả dụng viên nén nifedipin 30 mg giải phóng kéo dài trên chó thực nghiệm

### *2.2.6.1. Xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép nối khối phổ 2 lần để định lượng nifedipin trong huyết tương chó*

#### Xây dựng phương pháp

-*Xử lý mẫu:* bằng phương pháp chiết lỏng – lỏng. Tham khảo các tài liệu [[105](#_ENREF_105)], [[92](#_ENREF_92)], [[101](#_ENREF_101)], tiến hành khảo sát để lựa chọn dung môi và điều kiện chiết tách NIF từ huyết tương chó: Để huyết tương rã đông ở nhiệt độ phòng. Lấy 0,5 mL huyết tương (mẫu trắng hoặc mẫu chuẩn hoặc mẫu thử) cho vào lọ chiết. Thêm 50 µL dung dịch IS (dung dịch glibenclamid (GLI) 0,4 µg/mL). Lắc xoáy 5 giây. Thêm 4 mL cloroform. Lắc ngang cơ học 300 lần/phút trong 5 phút. Ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút. Hút 2 mL lớp dịch trong phía dưới, bốc hơi (không nhiệt) dưới dòng khí nitơ. Hòa tan cắn thu được trong 0,5 mL pha động. Tiêm sắc ký 5 µL.

*- Điều kiện sắc ký:* Thiết bị phân tíchUPLC MS/MS Water; detector Xevo TQD; cột sắc ký Hypersil Gold C18 (50 x 2,1 mm; 1,9 µm); nhiệt độ cột 400C; pha động ACN / dung dịch acid formic 0,1% = 90/10; tốc độ dòng 0,2 mL/phút; thể tích tiêm 5 µL; nhiệt độ buồng tiêm 20oC.

*- Điều kiện khối phổ*: kiểu khối phổ MS/MS, nguồn ion hóa ESI (+). Các thông số của thiết bị khối phổ để phát hiện NIF và GLI được trình bày ở bảng 2.4.

Bảng 2.4. Các thông số của detector khối phổ để định tính, định lượng

nifedipin và chuẩn nội glibenclamid

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***Chất phân tích***  ***Thông số*** | **Nifedipin** | **IS (Glibenclamid)** |
| Chế độ ion hoá | ESI (+) | ESI (+) |
| Thế nguồn (kV) | 4 | 4 |
| Thế hội tụ (V) | 24 | 34 |
| Nhiệt độ hóa hơi (oC) | 350 | 350 |
| Lưu lượng khí mang (L/H) | 850 | 850 |
| Lưu lượng khí bổ trợ (L/H) | 20 | 20 |
| Năng lượng bắn phá (V) | 8 | 14 |
| m/z ion mẹ | 347,07 | 494,20 |
| m/z ion con | 315,02 | 369,12 |

*- Mẫu huyết tương trắng*(do Ban cung cấp động vật thí nghiệm, Học viện Quân y cung cấp): lấy máu từ tĩnh mạch cổ của chó, chống đông bằng EDTA. Ly tâm 5000 vòng/phút trong 10 phút, tách lấy huyết tương. Bảo quản trong tủ lạnh âm sâu - 60oC.

#### Thẩm định phương pháp định lượng nifedipin trong huyết tương

Tiến hành thẩm định phương pháp định lượng NIF trong huyết tương chó bằng kỹ thuật UPLC-MS/MS theo các hướng dẫn về thẩm định phương pháp phân tích trong dịch sinh học[[123](#_ENREF_123)], [[124](#_ENREF_124)],[[125](#_ENREF_125)].Tiến hành thẩm định trên các mẫu huyết tương trắng và các mẫu huyết tương tự tạo chứa chuẩn NIF có nồng độ phù hợp.Các chỉ tiêu cần thẩm định gồm:

* *Tính phù hợp của hệ thống sắc ký*

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần cùng một dung dịch có chứa NIFvà IS trong huyết tương ở mức nồng độ mẫu kiểm tra nồng độ trung bình (MQC) vào hệ thống sắc ký theo chương trình đã chọn. Độ phù hợp của hệ thống được biểu thị qua hệ số biến thiên (CV%) của thời gian lưu tR, diện tích pic, tỷ lệ đáp ứng giữa pic NIF và pic IS.

* *Tính chọn lọc – đặc hiệu*

So sánh sắc ký đồ của ít nhất 06 mẫu huyết tương trắng có nguồn gốc khác nhau và 06 mẫu tự tạo có chứa IS và NIF ở nồng độ thấp nhất của đường chuẩn (0,5 ng/mL) trong từng nền huyết tương trắng tương ứng. Yêu cầu: các pic của NIF và IS phải được nhận diện rõ ràng và không bị ảnh hưởng bởi các pic khác. Đáp ứng của mẫu chuẩn phải gấp ít nhất 5 lần đáp ứng của mẫu trắng tương ứng tại thời điểm trùng với thời gian lưu của NIF. Tại thời điểm trùng với thời gian lưu của IS, đáp ứng của IS phải gấp ít nhất 20 lần đáp ứng của mẫu trắng tương ứng.

* *Đường chuẩn và khoảng tuyến tính*

Phân tích mẫu chuẩn NIF trong huyết tương có nồng độ tương ứng 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 40; 80 và 100 ng/mL theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ NIF trong huyết tương với tỷ lệ đáp ứng pic NIF/IS. Yêu cầu: đường chuẩn phải đáp ứng các điều kiện sau: phải có tối thiểu 6 giá trị nồng độ, có hệ số tương quan > 0,98 và ít nhất 75% số điểm của đường chuẩn, bao gồm tất cả các mẫu phải có độ đúng nằm trong khoảng từ 85% đến 115%, riêng mẫu có nồng độ thấp nhất của đường chuẩn cho phép độ đúng nằm trong khoảng từ 80% đến 120%.

* *Giới hạn định lượng dưới*

Tiến hành sắc ký trên 6 mẫu huyết tương trắng và 6 mẫu tự tạo chứa IS và NIF ở nồng độ LLOQ (0,5 ng/mL). Ghi lại sắc đồ và so sánh tỷ lệ đáp ứng pic của mẫu trắng và mẫu chuẩn.Yêu cầu: nồng độ được coi là LLOQcủa phương pháp khi trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn có nồng độ đó cho pic của NIF được nhận diện rõ ràng và tách riêng với các pic tạp, có độ đúng nằm trong khoảng từ 80% đến 120%, độ chính xác với giá trị CV ≤ 20% và tại thời điểm trùng với thời gian lưu của NIF, đáp ứng của zero ≤20% đáp ứng của pic NIF.

* *Độ đúng – độ chính xác trong ngày và khác ngày*

Chuẩn bị các lô mẫu LLOQ, mẫu kiểm tra nồng độ thấp (LQC), MQC và mẫu kiểm tra nồng độ cao (HQC), mỗi lô gồm 5 mẫu độc lập chứa NIF ở các mức nồng độ lần lượt là 0,5 ng/mL; 1,5 ng/mL; 50 ng/mL và 75 ng/mL.Xác định độ đúng của phương pháp bằng cách so sánh giá trị nồng độ trung bình của các lần định lượng của mỗi nồng độ với giá trị nồng độ lý thuyết. Xác định độ chính xác trong ngày và khác ngày bằng cách tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD) giữa các giá trị phân tích được của mỗi nồng độ được phân tích trong cùng 1 ngày và trong 3 ngày khác nhau. Yêu cầu: độ đúng của phương pháp tại mỗi nồng độ phải nằm trong khoảng 85 – 115%. Độ chính xác trong ngày và khác ngày tại các nồng độ có giá trị RSD ≤ 15%. Riêng nồng độ LLOQ cho phép độ đúng nằm trong khoảng 80 – 120% và giá trị CV ≤ 20%.

* *Tỷ lệ thu hồi*

Xác định tỷ lệ thu hồi của chất chuẩn và IS bằng cách so sánh đáp ứng pic của NIF và IS có trong mẫu huyết tương được chiết tách theo quy trình đã lựa chọn với đáp ứng pic của các mẫu chuẩn không được xử lý qua chiết tách(pha trong nền mẫu huyết tương đã xử lý) có chứa cùng nồng độ NIF chuẩn và IS. Tiến hành xử lý và sắc ký các mẫu NIF có nồng độ LQC; MQC; HQC và mẫu chuẩn có nồng độ tương ứng là: 1,5 ng/mL; 50 ng/mL và 75 ng/mL có chứa IS pha trên nền mẫu huyết tương đã xử lý (mẫu spike).Yêu cầu: phương pháp chiết tách, xử lý mẫu là thích hợp khi độ tìm lại của NIF không nhỏ hơn 30% và không lớn hơn 110%. Hiệu suất chiết trung bình tại các nồng độ có RSD khác nhau không quá ± 15%.

* *Ảnh hưởng của nền mẫu*

Tiến hành xử lý mẫu theo phương pháp đã xây dựng trên 6 mẫu huyết tương trắng có nguồn gốc khác nhau thu được dung dịch nền mẫu. Chuẩn bị các mẫu LQC và HQC trong các dung dịch nền mẫu tương ứng. Song song chuẩn bị các mẫu chuẩn LQC và HQC trong pha động. Phân tích sắc ký các mẫu trên. Xác định giá trị MFNIF, MFIS của NIF và IS bằng cách so sánh diện tích pic NIF và IS giữa các mẫu pha trong nền mẫu với các mẫu pha trong pha động. Yêu cầu: phương pháp UPLC-MS/MS không bị ảnh hưởng bởi nền mẫu khi giá trị RSD của tỷ số MFNIF/MFIS trên ít nhất 6 nền mẫu trắng có nguồn gốc khác nhau phải ≤ 15%. Giá trị MFNIF, MFIS phải nằm trong khoảng giá trị 0,85 – 1,15.

* *Độ nhiễm chéo*

Tiến hành xử lý mẫu theo phương pháp đã xây dựng trên 6 mẫu huyết tương trắng, 6 mẫu chuẩn pha trong huyết tương ở nồng độ LLOQ và 6 mẫu chuẩn pha trong huyết tương ở nồng độ cao nhất của đường chuẩn.Yêu cầu: mẫu được coi là không bị nhiễm chéo trong quá trình tiêm mẫu khi tiêm mẫu trắng ngay sau mẫu có nồng độ cao nhất của đường chuẩn nếu tại thời điểm trùng với thời gian lưu của NIF, đáp ứng pic trung bình của mẫu LLOQ phải gấp ít nhất 5 lần đáp ứng pic của từng mẫu trắng, tại thời gian lưu của chuẩn nội phải gấp ít nhất 20 lần.

* *Độ ổn định của dung dịch nội chuẩn làm việc thời gian ngắn ở nhiệt độ phòng*: so sánh đáp ứng píc của dung dịch IS làm việc sau khi bảo quản ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ với đáp ứng píc của dung dịch mới pha.Yêu cầu: đáp ứng píc của dung dịch sau bảo quản phải sai khác với đáp ứng píc của dung dịch mới pha không quá 5%.
* *Độ ổn định của mẫu phân tích trong huyết tương*: xác định độ ổn định của NIF trong huyết tương sau ba chu kỳ đông – rã đông; trong quá trình xử lý mẫu và trong quá trình bảo quản dài ngày và sau xử lý mẫu trên các mẫu LQC và HQC. Ở mỗi nồng độ, tiến hành xử lý 3 mẫu. Tính nồng độ của các mẫu dựa vào đường chuẩn.

*+ Độ ổn định sau 3 chu kỳ đông – rã đông:* thực hiện trên 2 nồng độ LQC và HQC. Bảo quản mẫu ở nhiệt độ -60oC và để rã đông ở nhiệt độ phòng. Sau 3 chu kỳ đông – rã, tiến hành phân tích xác định nồng độ NIF có trong mẫu. So sánh với nồng độ lý thuyết. LượngNIF có trong mẫu sau 3 chu kỳ đông – rã đông phải tương đương với lượng NIF lý thuyết.

*+ Độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu:* so sánh lượng NIFlý thuyết có trong các mẫu LQC và HQC và lượng NIF trong mẫu có nồng độ tương ứng chỉ được chiết tách sau khi đã rã đông và để ở nhiệt độ phòng 5 giờ. Kết quả phải sai khác so với nồng độ lý thuyết không quá 15% và giá trị RSD giữa các kết quả định lượng ở mỗi nồng độ phải không quá 15%.

*+ Độ ổn định dài ngày:* bảo quản mẫu trong điều kiện -60oC ± 50C trong 45 ngày. So sánh nồng độ NIF trong các mẫu tại từng thời điểm trong quá trình theo dõi với nồng độ NIF lý thuyết. Yêu cầu: nồng độ NIF phải sai khác với nồng độ lý thuyết không quá 15% và giá trị RSD giữa các kết quả định lượng ở mỗi nồng độ phải không quá 15%. Mẫu phải ổn định tại điều kiện bảo quản trong khoảng thời gian tối thiếu đủ để tiến hành lấy mẫu máu và phân tích hết số mẫu huyết tương sẽ lấy (khoảng 45 ngày).

*+ Độ ổn định của mẫu sau xử lý:* so sánh nồng độ NIFcó trong mẫu LQC và HQC được bảo quản trong auto - sampler 24 giờ sau xử lý và nồng độ lý thuyết. Yêu cầu: nồng độ mẫu sau bảo quản trong auto – sampler phải sai khác với nồng độ lý thuyết không quá 15%. Giá trị RSD giữa các kết quả định lượng ở mỗi nồng độ phải ≤ 15%.

### *2.2.6.2. Đánh giá sinh khả dụng viên nén nifedipin 30mg thẩm thấu kéo – đẩy trên chó thực nghiệm*

#### Thiết kế nghiên cứu, bố trí thí nghiệm

Tiến hành thử nghiệm trên chó theo phương pháp chéo đôi, ngẫu nhiên, đơn liều, hai thuốc, hai giai đoạn, ở trạng thái đói.Trong quá trình thử nghiệm, đặc biệt là các bước xử lý mẫu huyết tương cần được tiến hành trong điều kiện tránh ánh sáng hoặc dưới ánh sáng đèn natri.Chó được theo dõi trước khi tiến hành thí nghiệm 1 tuần.Nhịn đói 12 giờ trước khi thí nghiệm, cho uống nước tự do.Chia ngẫu nhiên 6 chó thí nghiệm thành 2 nhóm cho 2 giai đoạn thử, được thể hiện ở bảng 2.5.

Bảng 2.5. Mô hình thử thuốc trên chó thí nghiệm

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Giai đoạn**  **Nhóm** | **I** | **II** |
| Nhóm 1 | R  (Adalat LA) | T  (NIF GPKD) |
| Nhóm 2 | T  (NIF GPKD) | R  (Adalat LA) |

- Giai đoạn I:

+ Nhóm 1 (n = 3): uống thuốc đối chiếu (Adalat LA). Mỗi chó trong nhóm uống 1 viên nén Adalat LA 30 mg.

+ Nhóm 2 (n = 3): uống thuốc thử (NIF GPKD). Mỗi chó trong nhóm này uống 1 viên nén NIF 30 mg GPKD bào chế được.

- Giai đoạn II: Đổi ngược lại giai đoạn I.

- Thời gian nghỉ giữa 2 giai đoạn là 7 ngày. Chó được nuôi dưỡng bình thường theo tiêu chuẩn thí nghiệm.

- Cách cho chó uống thuốc: cố định chó lên bàn, dùng thanh gỗ cứng hoặc kim loại đặt ngang miệng chó, cho viên thuốc vào sâu trong cổ họng, cho chó uống 50mL nước để chó nuốt viên thuốc.

#### Lấy máu và bảo quản mẫu huyết tương

- *Lấy mẫu máu*: cho chó uống thuốc với 50 mL nước trong tình trạng không gây mê. Dùng kim vô khuẩn lấy máu tại các thời điểm 0 giờ (trước khi cho uống thuốc), 2; 4; 6; 8; 9; 10; 12; 14; 16; 24; 36; 48; 60; 72; 84; 96 giờ sau khi uống thuốc. Mỗi lần lấy khoảng 3,5 mL máu từ tĩnh mạch đùi chó và cho ngay vào ống nghiệm có tráng chất chống đông là EDTA, lắc nhẹ, ly tâm 3000 vòng/phút trong 10 phút ở nhiệt độ phòng.

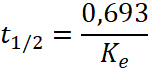
-*Bảo quản mẫu huyết tương*: sau khi ly tâm mẫu máu, tách lấy phần huyết tương, bọc huyết tương bằng giấy nhôm tránh ánh sáng và có thể đem định lượng ngay hoặc có thể được bảo quản trong tủ lạnh âm sâu ở nhiệt độ -60 ± 5oC cho đến khi tiến hành phân tích. Thời gian bảo quản không quá 45 ngày. Trong quá trình thí nghiệm, chó được bổ sung dung dịch Glucose20% bằng đường uống.

#### Xác định các thông số dược động học

- Cmax và Tmax: xác định trực tiếp từ các số liệu thực nghiệm.

- Ke: biểu thị tốc độ thải trừ thuốc ra khỏi huyết tương xác định từ độ dốc (giá trị tgα) của đoạn tuyến tính trên đường biểu diễn giá trị nồng độ thuốc trong pha thải trừ (số liệu đã chuyển logarit) theo thời gian, lấy tối thiểu 3 điểm trong pha thải trừ.

- t1/2 : là thời gian cần thiết để 1 nửa (nồng độ) DC đào thải khỏi cơ thể, tính theo mô hình DĐH tuyến tính, không ngăn theo công thức sau:



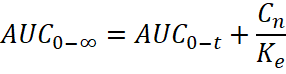
- Diện tích dưới đường cong:

+ AUC0 – t: xác định bằng phương pháp hình thang, tính từ thời điểm 0 đến thời điểm t (t là thời điểm lấy mẫu cuối cùng có thể xác định được bằng nồng độ thuốc trong huyết tương của từng cá thể) theo công thức:



Trong đó Ci: là nồng độ NIF trong huyết tương tại thời điểm lấy mẫu thứ i.

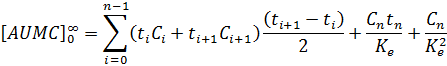
+AUCo - ∞: ngoại suy từ giá trị AUC0 – t, ước tính đến vô cùng theo mô hình DĐH tuyến tính, không ngăn theo công thức :



Trong đó:

Cn: nồng độ NIF tại thời điểm lấy mẫu cuối cùngcó thể định lượng được.

- AUMC: diện tích dưới đường cong x thời gian - thời gian



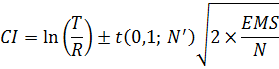
- MRT: thời gian lưu trú trung bình của phân tử thuốc



#### Phương pháp so sánh sinh khả dụng in vivo

Đánh giá sự giống nhau về SKD giữa viên nén NIF 30mg GPKD bào chế được với viên đối chiếu Adalat LA 30 mg bằng cách so sánh các thông số: [AUC]0∞ , Cmax, MRT, Tmax theo quy định của DĐVN V[[9](#_ENREF_9)] và FDA [[126](#_ENREF_126)]:

- So sánh [AUC]0∞, Cmax, MRT: phân tích ANOVA và xác định khoảng tin cậy 90% cho tỷ lệ thuốc thử so với thuốc đối chiếu. Các thông số cần so sánh ([AUC]0∞, Cmax, MRT) của thuốc thử và thuốc đối chiếu thu được từ thiết kế chéo đôi, đơn liều chuyển qua dạng logarit tự nhiên và đưa vào phân tích ANOVA. Khoảng tin cậy 90% (CI) được tính theo công thức:



Với :

• T: giá trị Cmax hoặc [AUC]0∞của thuốc thử chuyển sang logarit.

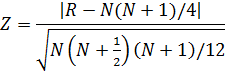
• R: giá trị Cmax hoặc [AUC]0∞của thuốc đối chiếu chuyển sang logarit.

• N’: bậc tự do của sai số xác định bằng ANOVA (N’=N-2).

• EMS : trung bình bình phương của sai số xác định bằng phân tích ANOVA.

• N : tổng số động vật thí nghiệm.

-So sánh Tmax: so sánh dựa trên phương pháp thống kê phi tham số (Wilcoxon signed rank test)[[127](#_ENREF_127)], dựa trên việc xác định tổng giá trị xếp hạng dương và âm hoặc xác định mức ý nghĩa p của phương pháp theo giá trị Z như sau:



Trong đó:

R: tổng xếp hạng (dương hoặc âm).

N: số cặp giá trị Tmax của thuốc thử và thuốc đối chiếu có sai khác.

Từ giá trị Z, tra bảng: phân phối lũy tíchđể xác định giá trị *Area* và giá trị p = 1 – *Area*.

- Tiêu chuẩn chấp nhận: hai chế phẩm được coi là TĐSH nếu:

+ Khoảng tin cậy 90% của thuốc thử so với thuốc đối chiếu nằm trong giới hạn 70 - 143% đối với giá trị Cmax trung bình và nằm trong giới hạn 80 - 125% đối với giá trị AUC trung bình.

+ Giá trị Tmax của thuốc thử và thuốc đối chiếu khác nhau không có ý nghĩa thống kê (Giá trị tổng xếp hạng dương và giá trị tổng xếp hạng âm đều lớn hơn giá trị tra bảng theo số N (N là số lượng cặp giá trị Tmax của thuốc thử và thuốc đối chiếu có sai khác) hoặc giá trị p > 0,05).

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

*- Xử lý các số liệu thống kê và tính toán các thông số DĐH:* bằng phần mềm Microsoft Excel.

*- Dự đoán sự biến thiên hàm lượng thuốc trong quá trình bảo quản và dự đoán tuổi thọ* : bằng phần mềm minitab 19.

Các kết quả được xử lý và biểu thị trong luận án dưới dạng: giá trị trung bình

( X ), độ lệch chuẩn (SD) và độ lệch chuẩn tương đối (RSD %).

CHƯƠNG 3

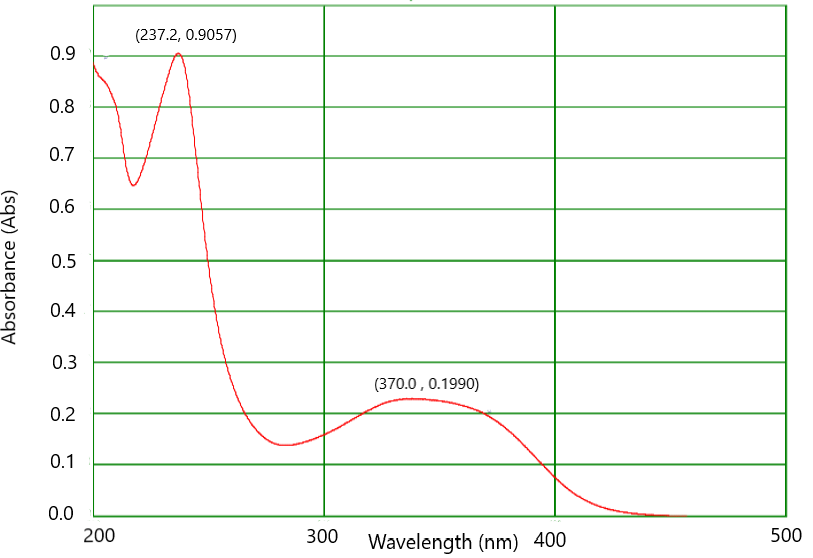
KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1.KẾT QUẢ XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG NIFEDIPIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

3.1.1. Xây dựng phương pháp định lượng nifedipin bằng phương pháp HPLC

***3.1.1.1. Bước sóng phân tích***

Kết quả xác định bước sóng thích hợp phân tích NIF được thể hiện ở hình 3.1.



**Hình 3.1.** Phổ hấp thụ tử ngoại của dung dịch NIF chuẩn 150 µg/mL

Phổ hấp thụ UV-VIS cho thấy các cực đại hấp thụ của NIF là 237,2 nm và 370 nm. Từ đó, chọn bước sóng 237 nm là bước sóng để khảo sát phương pháp định lượng NIF bằng HPLC.

***3.1.1.2. Kháo sát hiệu lực cột phân tích***

Kết quả khảo sát hiệu lực cột được thể hiện ở bảng 3.1 và hình PL 1.1, hình PL 1.2.

Bảng 3.1. Kết quả khảo sát hiệu lực cột

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Tên cột** | **Kết quả** | | |
| Hệ số bất đối xứng (AF) | Số đĩa lý thuyết (N) | Thời gian lưu (phút) |
| 1 | Phenomenex LUNA | 1,120 | 10600 | 8,965 |
| 2 | Xbridge | 1,049 | 19385 | 13,108 |

Dựa vào kết quả về hệ số bất đối xứng, số đĩa lý thuyết, thời gian lưu và sắc ký đồ, nhận thấy cả 2 cột đều cho píc không bị kéo đuôi, AF nằm trong giới hạn cho phép (0,8 ≤ AF ≤ 1,5), tuy nhiên cột PhenomenexLUNA cho số đĩa lý thuyết nhỏ hơn nhưng lại cho thời gian lưu ngắn hơn nhiều so với cột Xbridge (13,108 phút) nên lựa chọn cột PhenomenexLUNA cho phân tích định lượng NIF.

***3.1.1.3. Khảo sát thành phần pha động***

Kết quả khảo sát thành phần pha động được thể hiện ở bảng 3.2 và hình PL 1.3, hình PL 1.4, hình PL 1.5.

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát thành phần pha động

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Hệ pha động** | **Thời gian lưu**  (phút) | **Hệ số bất đối xứng** (AF) |
| MeOH: nước (65/35, v/v) | 8,965 | 1,120 |
| ACN : nước (65/35, v/v) | 5,187 | 1,261 |
| ACN: MeOH: nước (25/25/50, v/v) | 1,050 | 1,040 |

Kết quả thu được cho thấy: hệ dung môi ACN: nước (65/35, v/v) cho píc không cân đối bằng 2 hệ dung môi còn lại với AF =1,261, đường nền không ổn định bằng hệ MeOH: nước (65/35, v/v). Hệ dung môi ACN: MeOH: nước (25/25/50, v/v) cho píc gọn, nhưng thời gian lưu quá ngắn (1,050 phút), không đảm bảo cho quá trình tách. Trong khi đó, hệ dung môi MeOH: nước (65/35, v/v) cho đường nền ổn định, píc cân xứng, sắc nét với AF=1,126, khả năng tách tốt.

***3.1.1.4. Khảo sát tỷ lệ pha động***

Kết quả khảo sát tỷ lệ pha động được thể hiện ở bảng 3.3 và hình PL 1.6, hình PL 1.7, hình PL 1.8, hình PL 1.9, hình PL 1.10.

Bảng 3.3. Kết quả khảo sát tỷ lệ thành phần pha động MeOH:nước

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **MeOH: nước (v/v)** | **Thời gian lưu** (phút) | **Diện tích píc** (µV.s) | **Hệ số bất đối xứng** (AF) |
| 50/50 | 16,328 | 2500234 | 1,059 |
| 60/40 | 13,315 | 12833722 | 1,091 |
| 65/35 | 8,981 | 12823315 | 1,127 |
| 70/30 | 6,601 | 12894973 | 1,169 |
| 80/20 | 4,261 | 12810176 | 1,258 |

Từ kết quả khảo sát nhận thấy tỷ lệ dung môi MeOH:nước (v/v) là 65:35 cho thời gian lưu phù hợp, píc gọn, cân đối. Do đó, lựa chọn hệ dung môi MeOH:nước với tỷ lệ là 65:35 (v/v) để phân tích định lượng NIF.

3.1.2.Thẩm định phương pháp định lượng nifedipin bằng phương pháp HPLC

***3.1.2.1. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống***

Kết quả khảo sát tính tương thích của hệ thống sắc ký được trình bày ở bảng 3.4.

Bảng 3.4. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Mẫu** | **Thời gian lưu** (phút) | **Diện tích píc** (µV.s) | **Hệ số bất đối xứng** (AF) | **Số đĩa lý thuyết** (N) |
| 1 | 8,661 | 12287964 | 1,138 | 10873 |
| 2 | 8,718 | 12303091 | 1,137 | 10833 |
| 3 | 8,768 | 12318713 | 1,136 | 10814 |
| 4 | 8,794 | 12270688 | 1,136 | 10809 |
| 5 | 8,803 | 12260808 | 1,135 | 10795 |
| 6 | 8,795 | 12271121 | 1,136 | 10789 |
| TB | 8,757 | 12285398 | 1,136 | 10819 |
| RSD (%) | 0,6 | 0,2 | 0,1 | 0,3 |

Kết quả thu được ở bảng 3.4cho thấy: hệ thống HPLC hoạt động ổn định, có độ lặp lại tốt. Giá trị RSD (%) của thời gian lưu, diện tích píc, hệ số bất đối xứng píc và số đĩa lý thuyết của NIF đều < 2,0%. Do đó, hệ thống có tính tương thích tốt bảo đảm cho việc định tính và định lượng NIF trong hỗn hợp nguyên liệu và chế phẩm.

***3.1.2.2. Kết quả khảo sát tính đặc hiệu***

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của phương pháp được trình bày ởhình PL 1.11, hình PL 1.12, hình PL 1.13.

Kết quả ở hình PL 1.11, hình PL 1.12, hình PL 1.13 cho thấy: pic mẫu chuẩn cân đối, sắc nét, có thời gian lưu 8,874 phút. Trên sắc ký đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic trong khoảng thời gian 8-10 phút. Sắc ký đồ mẫu thử và chuẩn đều có 1 píc có thời gian lưu xấp xỉ 8,8 phút. Do đó, có thể đưa ra kết luận rằng phương pháp có tính đặc hiệu cao.

***3.1.2.3. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính***

Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính được trình bày ở hình 3.2.

**Hình 3.2.**Đường chuẩn của nifedipin trong pha động MeOH:nước (65/35)

Kết quả khảo sát ở hình trên cho thấy, trong khoảng nồng độ đã khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ NIF và diện tích píc thu được với phương trình hồi quy tuyến tính y = 83930x – 284700 và giá trị r ≈ 1. Khoảng tuyến tính này là phù hợp để định lượng NIF trong mẫu chứa NIF.

***3.1.2.4. Kết quả khảo sát độ chính xác***

*\* Độ lặp lại*

Kết quả khảo sát độ lặp lại được trình bày ởbảng 3.5.

Bảng 3.5. Kết quả khảo sát độ lặp lại của phương pháp

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Khối lượng cân** (g) | **Diện tích píc**(µV.s) | **Hàm lượng**(%) |
| 1 | 0,6450 | 13239283 | 100,43 |
| 2 | 0,6560 | 13373746 | 99,75 |
| 3 | 0,6540 | 13291701 | 99,44 |
| 4 | 0,6528 | 13280630 | 99,54 |
| 5 | 0,6545 | 13349152 | 99,79 |
| 6 | 0,6520 | 13277960 | 99,64 |
| TB |  |  | 99,77 |
| RSD (%) |  |  | 0,53 |

Kết quả ở bảng trên cho thấy: độ lặp lại kết quả phân tích định lượng trong ngày cho RSD đạt 0,53% nhỏ hơn 2%. Như vậy, phương pháp đã chọn đảm bảo độ chính xác.

*\* Độ chính xác trung gian*

Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian được trình bày ởbảng 3.6.

Bảng 3.6. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Khối lượng cân** (g) | **Diện tích píc**(µV.s) | **Hàm lượng**(%) |
| 1 | 0,6547 | 13366813 | 99,77 |
| 2 | 0,6565 | 13424439 | 99,92 |
| 3 | 0,6555 | 13451567 | 100,28 |
| 4 | 0,6534 | 13354395 | 99,87 |
| 5 | 0,6550 | 13420425 | 100,12 |
| 6 | 0,6538 | 13330146 | 99,63 |
| TB |  |  | 99,93 |
| RSD (%) |  |  | 0,24% |

Bảng trên cho thấy: độ lặp lại kết quả định lượng do từng kiểm nghiệm viên phân tích cho RSD đạt 0,24% và 0,53% nhỏ hơn 2% và do cả hai kiểm nghiệm viên phân tích là 0,3% nhỏ hơn 3%. Do đó, phương pháp đảm bảo độ chính xác.

***3.1.2.5. Kết quả khảo sát độ đúng***

Kết quả khảo sát độ đúng được trình bày ởbảng 3.7.

Bảng 3.7. Kết quả khảo sát độ đúng

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Mức**  **nồng độ** | **Lượng chuẩn thêm vào** (mg) | **Spícthêm chuẩn** (µV.s) | **Lượng tìm lại được** (mg) | **Tỷ lệthu hồi** | |
| **Phần trăm** (%) | **Kết quả** |
| 80% | 41,8 | 10211936 | 41,5 | 99,28 | TB=99,2  RSD(%) =0,36% |
| 41,4 | 10140050 | 41,2 | 99,52 |
| 42,0 | 10212840 | 41,5 | 98,81 |
| 100% | 51,9 | 12564631 | 51,1 | 98,46 | TB=98,84  RSD(%) =0,38% |
| 51,3 | 12521695 | 50,9 | 99,22 |
| 51,7 | 12558812 | 51,1 | 98,84 |
| 120% | 60,5 | 14916732 | 60,7 | 100,33 | TB=99,68  RSD(%) =0,59% |
| 61,2 | 14985984 | 60,9 | 99,51 |
| 61,8 | 15066105 | 61,3 | 99,19 |

Lượng chất chuẩn thu hồi ở mỗi mức nồng độ khác nhau đều nằm trong khoảng 98-102% so với lượng chất chuẩn thêm vào, với RSD của tỷ lệ thu hồi ở mỗi mức nồng độ < 2%, chứng tỏ phương pháp sử dụng có độ đúng cao.

***3.1.2.6. Khoảng xác định***

Kết quả độ đúng cho thấy tại nồng độ NIF bằng 80% đến 120% so với nồng độ định lượng có độ đúng và độ lặp lại tốt. Như vậy, khoảng xác định của phương pháp là trong giới hạn 120μg/mL– 180μg/mL.

***3.1.2.7. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng***

Bằng phương pháp dựa vào tỷ số giữa tín hiệu (S) và nhiễu (N) đã xác định được LOD của phương pháp là 0,0375µg/mL và LOQ của phương pháp là 0,105 µg/mL.

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG CÔNG THỨC BÀO CHẾ

3.2.1. Kết quả đánh giá tương tác dược chất – tá dược

***3.2.1.1. Kết quả đánh giá thay đổi hình thức và sự suy giảm hàm lượng dược chất***

Đánh giá tương tác của NIF với từng TD bằng phương pháp theo dõi sự biến đổi màu sắc và xác định sự suy giảm hàm lượng DC. Kết quả được trình bày ở bảng PL 2.1.

Kết quả cho thấy, đối với các mẫu chứa NIFở điều kiện 40oC và 40oC/ độ ẩm 75%, tất cả các mẫu hầu như không có sự thay đổi màu sắc. Mẫu N11, N12 dù màu sắc không thay đổi nhưng do màu của oxid sắt đỏ đã che phủ màu của NIF, do đó cần phải xác định hàm lượng NIF trong mẫu. Phân tích mẫu bằng phương pháp HPLC cho thấy: tất cả các mẫu đều không có sự thay đổi về hàm lượng. Với kết quả này có thể kết luận sơ bộ NIF ổn định về hàm lượng với các TD dự kiến sử dụng ở các điều kiện 40oC và 40oC/độ ẩm 75 ± 5%.

***3.2.1.2. Kết quả đánh giá bằng phương pháp phân tích nhiệt vi sai***

Kết quả khảo sát bằng quan sát hình thức và định lượng cho thấy NIF ổn định về mặt hàm lượng khi trộn với các TD lactose monohydrat, natri clorid, PVP K30, PEO N10, PEO N80, PEO N750, PEO 301, PEO 303, PEO Coagulant, magnesi stearat, oxyd sắt đỏ. Tuy nhiên, vẫn có thể xảy ra tương tác giữa DC và TD. Điều này có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của DC trong quá trình bảo quản. Để đánh giá tương tác DC – TD, phương pháp phân tích nhiệt vi sai tiếp tục được sử dụng.

Tiến hành phân tích nhiệt vi sai mẫu DC, cáchỗn hợp của DC với cácTD theo phương pháp trong mục 2.2.1. Kết quả phân tích nhiệt vi sai được trình bày trong phần phụ lục 12. Kết quả cho thấy trên biểu đồ phân tích nhiệt vi sai,NIF có đỉnh thu nhiệt ở gần 200oC (194,5oC)gần với đỉnh thu nhiệt của các hỗn hợp với NIF. Kết quả này cho thấy không xảy ra tương tác giữa NIF và các TD dự kiến sử dụng trong quá trình bào chế.

***3.2.1.3. Kết quả đánh giá bằng phương pháp đo phổ hồng ngoại***

Tiến hành đo phổ hồng ngoại của mẫu DC và các hỗn hợp của DC với các TD. Kết quả cho thấy NIF nguyên liệu có đỉnh hấp thụ tại bước sóng 3324 cm-1(là của nhóm N-H kéo dài) và cũng xuất hiện trong hỗn hợp NIF với các TD. Không xảy ra tương tác giữa NIF và các TD sử dụng trong nghiên cứu.

3.2.2. Kết quả đánh giá độ ổn định với ánh sáng của nifedipin trong các môi trường

*a. Trong môi trường đệm phosphat pH 7,5*

Đánh giá sự phân hủy của NIF trong môi trường đệm phosphat pH 7,5 dưới 2 nguồn sáng. Kết quả được thể hiện trong bảng 3.8 và hình 3.3. Kết quả cho thấy NIF bị phân hủy mạnh dưới ánh sáng đèn neon phòng thí nghiệm, sau 24 giờ chỉ còn lại 61,29 %. Tuy nhiên, khi đặt mẫu trong điều kiện ánh sáng đèn natri, bước sóng khoảng 589 nm thì NIF rất ổn định, hầu như bị phân hủy không đáng kể.

Bảng 3.8.Sự phân hủy của nifedipin trong dung dịch đệm pH 7,5 (n=1)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Thời gian**(giờ) | **Dưới đèn neon** | | **Dưới đèn natri** | |
| **Mật độ quang** | **Phần trăm so với ban đầu** (%) | **Mật độ quang** | **Phần trăm so với ban đầu(%)** |
| 0 | 0,279 | 100 | 0,276 | 100 |
| 0,25 | 0,274 | 98,21 | 0,275 | 99,64 |
| 0,5 | 0,27 | 96,77 | 0,275 | 99,64 |
| 1 | 0,263 | 94,27 | 0,274 | 99,28 |
| 2 | 0,257 | 92,11 | 0,273 | 98,91 |
| 4 | 0,247 | 88,53 | 0,272 | 98,55 |
| 8 | 0,23 | 82,44 | 0,269 | 97,46 |
| 16 | 0,206 | 73,84 | 0,266 | 96,38 |
| 24 | 0,171 | 61,29 | 0,263 | 95,29 |

**Hình 3.3**.Đồ thị biểu diễn sự phân hủy của nifedipin

trong môi trường pH 7,5

*b. Trong môi trường pH 1,2 chứa 0,5% natri laurylsulfat*

Sự phân hủy của NIF trong môi trường pH 1,2 chứa 0,5% SLS dưới 2 nguồn sáng được thể hiện trong bảng 3.9 và hình 3.4.

Bảng 3.9. Sự phân hủy của nifedipin trong môi trường pH 1,2 chứa 0,5% SLS (n=1)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Thời gian**(giờ) | **Dưới đèn neon** | | **Dưới đèn natri** | |
| **Mật độ quang** | **Phần trăm so với ban đầu** (%) | **Mật độ quang** | **Phần trăm so với ban đầu**(%) |
| 0 | 0,369 | 100 | 0,365 | 100 |
| 0,25 | 0,359 | 97,29 | 0,362 | 99,18 |
| 0,5 | 0,348 | 94,31 | 0,36 | 98,63 |
| 1 | 0,327 | 88,62 | 0,358 | 98,08 |
| 2 | 0,302 | 81,84 | 0,356 | 97,53 |
| 4 | 0,272 | 73,71 | 0,354 | 96,99 |
| 8 | 0,235 | 63,69 | 0,351 | 96,16 |
| 16 | 0,189 | 51,22 | 0,349 | 95,62 |
| 24 | 0,136 | 36,86 | 0,348 | 95,34 |

**Hình 3.4.**Đồ thị biểu diễn sự phân hủy của nifedipin trong môi trường

pH 1,2 chứa 0,5% SLS

Số liệu ở bảng 3.9 và hình 3.4 cho thấy NIF bị phân hủy mạnh dưới ánh sáng đèn neon trong phòng thí nghiệm và còn bị phân hủy mạnh hơn ở môi trường pH 1,2 chứa 0,5% SLS, sau 24 giờ chỉ còn lại 36,86 %. Trong khi đó, dưới ánh sáng đèn natri thì dung dịch NIF rất ổn định, hầu như bị phân hủy không đáng kể.

Từ kết quả thực nghiệm trên có thể kết luận: trong mọi quá trình nghiên cứuvới dung dịch NIF, bao gồm quá trình định lượng, xây dựng đường chuẩn, thử độ hòa tan, kể cả quá trình xát hạt, dập viên… cần phải được thực hiện dưới ánh sáng đèn natri, tránh ánh sáng mặt trời cũng như ánh sáng đèn neon phòng thí nghiệm. Điều này cũng được đề xuất cho quá trình sản xuất và kiểm nghiệm các chế phẩm chứa NIF. Việc định lượng NIF trong nghiên cứu độ ổn định với ánh sáng của NIF có thể sử dụng phương pháp UV - VIS thay vì phương pháp HPLC do phương pháp này đơn giản, dễ thực hiện, cho kết quả nhanh và đáp ứng được yêu cầu phân tích mà không cần thiết phải sử dụng phương pháp HPLC.

3.2.3. Kết quả thử độ hòa tan của viên đối chiếu

Viên Adalat LA 30 mg được sử dụng làmthuốc đối chiếu trong nghiên cứu xây dựng công thức viên. Thử hòa tan theo phương pháp ghi ở mục 2.2.4.3.Kết quả được trình bày ở bảng 3.10 và hình 3.5.

Bảng 3.10. Tỷ lệ (%) nifedipin giải phóng từ viên đối chiếu (n=6, TB ±SD)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Thời gian**(giờ) | **Tỷ lệ giải phóng** (%) | **Thời gian**(giờ) | **Tỷ lệ giải phóng**(%) |
| 1 | 7,85 ± 3,02 | 13 | 65,16 ± 5,08 |
| 2 | 8,16 ± 4,50 | 14 | 70,60 ± 5,16 |
| 3 | 15,24 ± 3,88 | 15 | 71,34 ± 5,32 |
| 4 | 19,86 ± 3,94 | 16 | 73,51 ± 5,46 |
| 5 | 24,04 ± 4,73 | 17 | 78,05 ± 5,59 |
| 6 | 29,12 ± 4,94 | 18 | 83,03 ± 5,76 |
| 7 | 34,32 ± 4,99 | 19 | 81,32 ± 5,02 |
| 8 | 39,72 ± 5,35 | 20 | 88,77 ± 4,79 |
| 9 | 45,11 ± 5,42 | 21 | 85,69 ± 4,79 |
| 10 | 50,59 ± 5,81 | 22 | 87,44 ± 4,47 |
| 11 | 55,78 ± 5,39 | 23 | 88,02 ± 4,37 |
| 12 | 61,50 ± 5,38 | 24 | 89,06 ± 5,40 |

**Hình 3.5.** Đồ thị giải phóng của viên đối chiếu Adalat LA.

Kết quả cho thấy, hàm lượng NIF giải phóng từ viên Adalat LA30 mg thấp khoảng 8,16 % trong 2 giờ đầu, sau đó giải phóng DC theo động học bậc 0 từ 2 – 20 giờ. Do viên Adalat LA có cấu tạo viên nén dạng bơm thẩm thấu gồm viên nhân 2 lớp kéo – đẩy và màng CA có khoan miệng giải phóng. Do đó, trong các nghiên cứu bào chế, viên sẽ được thử hòa tan trong 24 giờ.

3.3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG CÔNG THỨC VIÊN NIFEDIPIN GIẢI PHÓNG KÉO DÀI THEO CƠ CHẾ BƠM THẨM THẤU KÉO – ĐẨY

Để lựa chọn TD cho công thức viên NIF GPKD theo cơ chế bơm thẩm thấu kéo đẩy, đề tài luận án đã tiến hành khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố khác nhau thuộc về công thức viên đến sự giải phóng thuốc*in vitro* của viên thẩm thấu. Các đặc tính vật lý của viên 2 lớp cũng được đánh giá. Ban đầu, dựa trên tài liệu tham khảo, các kết quả khảo sát sơ bộ và đặc tính ít tan, sơ nước của NIF đưa ra công thức viên để tiến hành nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *- Lớp DC (công thức 1 viên)* | |  |
|  | Nifedipin | 30mg |
| Tá dược trương nở  (PEO N10, PEO N80, PEO N750) | Thay đổi (mg) |
| Lactose monohydrat | 15% |
| Natri clorid | Thay đổi (mg) |
| Magnesi stearat | 1% |
| PVP K30 | Thay đổi (mg) |
| *- Lớp đẩy (công thức 1 viên)* | |  |
|  | Tá dược trương nở  (PEO 301, PEO Coagulant, PEO 303) | Thay đổi (mg) |
| Natri clorid | Thay đổi (mg) |
| Magnesi stearat | 1% |
| Oxid sắt đỏ | 0,5% |
| PVP K30 | Thay đổi (mg) |
| *- Công thức dịch bao (công thức cho 330 viên):* | | |
|  | Celulose acetat | 10,8g |
| PEG 4000 | Thay đổi (g) |
| Aceton | 300 mL |
| Nước tinh khiết | 10 mL |

3.3.1. Nghiên cứu xây dựng công thức viên nhân

***3.3.1.1. Lựa chọn loại polymer trương nởtrong lớp dược chất và lớp đẩy***

Để lựa chọn loại polymer trương nở (PEO), tiến hành khảo sát các công thức với tỷ lệ các thành phần cố định như sau: hàm lượng natri clorid lớp đẩy và lớp DC là 20%, hàm lượng lactose trong lớp DC là 15%, hàm lượng magnesi stearat trong lớp DC và lớp đẩy cùng là 1%, hàm lượng oxid sắt đỏ trong lớp đẩy là 0,5%; thay đổiloại PEO khác nhau trong lớp DC và lớp đẩy như bảng 3.11. Màng bao cố định với tỷ lệ 12% (KL/KL) so với viên nhân. Đường kính miệng GP là 0,8 mm. Viên được thử hòa tantheo phương pháp ghi ở mục 2.2.4.3.Kết quả được trình bày ở hình 3.6.

Bảng 3.11.Các mẫu viên nifedipin với các loại polymer khác nhau

trong lớp dược chất và lớp đẩy

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Mẫu viên**  **PEO** | **CT01** | **CT02** | **CT03** | **CT04** | **CT05** | **CT06** | **CT07** | **CT08** | **CT09** |
| **Loại PEO lớp dược chất** | N10 | N10 | N10 | - | - | - | - | - | - |
| - | - | - | N80 | N80 | N80 | - | - | - |
| - | - | - | - | - | - | N750 | N750 | N750 |
| **Loại PEO lớp đẩy** | - | 301 | - | 301 | - | - | 301 | - | - |
| - | - | Coagulant | - | Coagulant | - | - | Coagulant | - |
| 303 | - | - | - | - | 303 | - | - | 303 |

**Hình 3.6**. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các mẫu viên có các loại polymer khác nhau trong lớp dược chất và lớp đẩy viên bào chế và viên đối chiếu(n=6)

Kết quả ở hình 3.6 cho thấy: các mẫu viên CT07, CT08, CT09 có tốc độ giải phóng khá thấp, phần trăm giải phóng ở 24 giờ cũng không cao (lần lượt là 78,70; 67,05 và 78,51). Các mẫu viên còn lại có tỷ lệ % NIF giải phóng tại 24 giờ không chênh lệch nhau nhiều, đều giải phóng được khoảng 88 - 91%, tốc độ giải phóng tương tự nhau, với hệ số f2 so với viên đối chiếu Adalat LA trong khoảng 40-49 (Phụ lục 3), nhỏ hơn so với giá trị f2 của mẫu viên CT01. Dựa vào khả năng giải phóng gần với động học bậc không, nhận thấy mẫu viên CT01 có khoảng giải phóng theo động học bậc không khá dài,hơn nữa giá trị f2 đạt được là cao nhất: 51,17 (Phụ lục 3). Qua đó lựa chọn PEO N10 cho lớp DC và PEO 303 cho lớp đẩy tương ứng vớimẫu viên CT01 cho các nghiên cứu tiếp theo.

***3.3.1.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ tá dược thẩm thấu trong lớp dược chất đến giải phóng thuốc***

Việc sử dụng lượng TD thẩm thấu (natri clorid) khác nhau trong lớp DC ảnh hưởng đến khả năng thấm hút nước vào trong viên và khả năng hòa tan NIF. Hàm lượng natri clorid được khảo sát với tỷ lệ thay đổi trong khoảng 0 - 40% (KL/KL) trong công thức lớp DC. Lớp đẩy được giữ cố định với các thành phần: PEO 303 82,85 mg, natri clorid 22 mg, magnesi stearat 1,1 mg, oxid sắt đỏ 0,55 mg, PVP K30 3,5 mg. Màng bao cố định với tỷ lệ 12% (KL/KL) so với viên nhân. Đường kính miệng giải phóng là 0,8 mm. Các thành phần lớp DC được trình bày trong bảng 3.12. Viên được thử hòa tan theo phương pháp ghi trong mục 2.2.4.3. Kết quả được trình bày ở hình 3.7.

Bảng 3.12.Công thức lớp dược chất củaviên nifedipin thẩm thấu với tỷ lệ natri cloridkhác nhau

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Thành phần (mg)** | **CT10** | **CT11** | **CT12** | **CT13** | **CT14** |
| Nifedipin | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 |
| PEO N10 | 125,1 | 106,1 | 87,1 | 68,1 | 49,1 |
| Lactose | 28,5 | 28,5 | 28,5 | 28,5 | 28,5 |
| **Natri clorid** | 0 | 19 | **38** | **57** | **76** |
| Magnesi stearat | 1,9 | 1,9 | 1,9 | 1,9 | 1,9 |
| PVP K30 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 | 4,5 |

**Hình 3.7**. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các mẫu viên có tỷ lệ natri clorid khác nhautrong lớp dược chất viên bào chế và viên đối chiếu (n=6)

Kết quả ở hình 3.7 cho thấy: các mẫu viên CT10, CT13, CT14 có tốc độ giải phóng cũng như phần trăm giải phóng ở thời điểm 24 giờ rất thấp (CT10: 69,72%; CT13: 61,00%; CT14: 12,14 %) so với viên đối chiếu. Mẫu viên CT12 cho tốc độ giải phóng cao hơn, phần trăm giải phóng ở 24 giờ là 86,29%, tuy nhiên Tlag khá cao (7,5 giờ). Trong khi đó, mẫu viên CT11 có tốc độ giải phóng cao, phần trăm giải phóng tại thời điểm 24giờ là 80,09 % và khoảng giải phóng theo động học bậc không khá dài, hơn nữa còn có hệ số f2 so với viên Adalat LA là cao nhất (f2=52)(*Phụ lục 3*). Qua đó lựa chọn hàm lượng natri clorid cho lớp DC là 10% tương ứng với mẫu viên CT11 cho các nghiên cứu tiếp theo.

***3.3.1.3. Ảnh hưởng của tỷ lệ tá dược thẩm thấu trong lớp đẩy đến giải phóng thuốc***

Việc sử dụng lượng TD thẩm thấu (natri clorid) khác nhau trong lớp đẩy ảnh hưởng đến khả năng thấm hút nước vào trong viên, khả năng trương nở của polymer và khả năng tạo áp lực đẩy NIF qua lỗ giải phóng ra khỏi viên.Hàm lượng natri clorid trong lớp đẩy được khảo sát với tỷ lệ thay đổi trong khoảng 10 - 60% (KL/KL). Lớp DC được giữ cố định với các thành phần: NIF 30 mg, PEO N10 106,1 mg, lactose 28,5 mg, natri clorid 19 mg, magnesi stearat 1,9 mg, PVP K30 4,5 mg. Màng bao cố định với tỷ lệ 12% (KL/KL) so với viên nhân. Đường kính miệng giải phóng là 0,8mm. Các thành phần lớp đẩy như trong bảng 3.13. Viên được thử hòa tan theo phương pháp ghi trong mục 2.2.4.3. Kết quả được trình bày ở hình 3.8.

Bảng 3.13.Công thức lớp đẩy của viên nifedipinthẩm thấu với tỷ lệ natri clorid khác nhau

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Thành phần (mg)** | **CT15** | **CT16** | **CT17** | **CT18** | **CT19** | **CT20** |
| PEO 303 | 93,85 | 82,85 | 71,85 | 60,85 | 49,85 | 38,85 |
| **Natri clorid** | **11** | **22** | **33** | **44** | **55** | **66** |
| Magnesi stearat | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 | 1,1 |
| Oxid sắt đỏ | 0,55 | 0,55 | 0,55 | 0,55 | 0,55 | 0,55 |
| PVP K30 | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 | 3,5 |

**Hình 3.8**. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các mẫu viên có tỷ lệ natri clorid khác nhautrong lớp đẩy viên bào chế và viên đối chiếu (n=6)

Kết quả ở hình 3.8 cho thấy: mẫu viên CT18 vàCT19, CT20 giải phóng theo động học bậc 0 lần lượt từ 6 giờ và 8 giờ đến tận 24 giờ, nhưng tốc độ giải phóng và phần trăm giải phóng quá thấp ( 72,35; 70,09; 51,09% tại 24h). Trong khi đó, mẫu viên CT17 có tốc độ giải phóng cao nhất, duy trì được tốc độ giải phóng hằng định đến tận 24 giờ, có giá trị f2(*Phụ lục 3*) so với viên đối chiếu Adalat LA lớn hơn các mẫu viên còn lại nên được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3.2. Nghiên cứu xây dựng công thức màng bao thẩm thấu

***3.3.2.1. Ảnh hưởng của tỷ lệ chất hóa dẻo đến tốc độ giải phóng thuốc***

Tiến hành cố định tỷ lệ màng bao là 12% (KL/KL) so với viên nhân. Thay đổi tỷ lệ chất hóa dẻo PEG 4000 so với khối lượng CA là 5% (CT17), 10% (CT21), 20% (CT22) và 30% (CT23) (Bảng 3.14). Tỷ lệ khối lượng và các thành phần viên nhân như CT17. Đường kính miệng giải phóng là 0,8 mm. Viên được thử hòa tan theo phương pháp ghi ở mục 2.2.4.3. Kết quả được trình bày ở hình 3.9.

Bảng 3.14.Công thức màng bao viên với các tỷ lệchất hóa dẻo so với khối lượng celulose acetat khác nhau (n=6)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Công thức màng bao** | **CT17** | **CT21** | **CT22** | **CT23** |
| Cellulose acetat (g) | 10,80 | 10,80 | 10,80 | 10,80 |
| PEG 4000 (g) | 0,54 | 1,08 | 2,16 | 3,24 |
| Aceton (mL) | 300 | 300 | 300 | 300 |
| Nước tinh khiết (mL) | 10 | 10 | 20 | 30 |

**Hình 3.9**. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các viên bao có các tỷ lệ chất hóa dẻo PEG 4000 khác nhau (n=6)

Kết quả ở hình 3.9 cho thấy:mẫu viên CT17 với tỷ lệ PEG/CA là 5% có Tlag là 4 giờ, hệ sốf2là 54,30 so với viên đối chiếu. Mẫu viên CT21 có tỷ lệ PEG/CA là 10% có Tlaggiảm đi đáng kể - Tlag là 3 giờ, đồ thị gần trùng khớp với viên đối chiếu, hệ số f2 lên tới 69,91(*Phụ lục 3*). Mẫu viên CT22, CT23 với tỷ lệ PEG/CA lần lượt là 20% và 30%, giải phóng với tốc độ quá nhanh, Tlag dưới 1 giờ, đến 4 giờ và 8 giờ quá trình giải phóng đã gần như xảy ra hoàn toàn, với hệ số f2lần lượt chỉ đạt 21,25 và 15,91(*Phụ lục 3*).Kết quả chứng minh: tỷ lệ PEG trong công thức màng bao ảnh hưởng lớn đến quá trình giải phóng DC từ viên NIF thẩm thấu. Tốc độ giải phóng tỷ lệ thuận với tỷ lệ PEG. Tỷ lệ PEG càng cao thì thời gian tiềm tàng Tlag càng ngắn.Từ những kết quả nghiên cứu trên, lựa chọn tỷ lệ chất hóa dẻo PEG so với khối lượng CA là 10% tương ứng vớimẫu viên CT21 cho các nghiên cứu tiếp theo.

***3.3.2.2. Ảnh hưởng của độ dày màng bao bán thấm đến tốc độ giải phóng thuốc***

Để đánh giá ảnh hưởng của độ dày màng bao bán thấm đến tốc độ giải phóng NIF, tiến hành khảo sát độ dày màng bán thấm với KLMB so với viên nhân là 6%, 8%, 10%, 12%, tương ứng với các mẫu viên CT24, CT25, CT26, CT21. Công thức màng bao như ở bảng 3.15. Đường kính miệng giải phóng là 0,8 mm.Viên được thử hòa tan theo phương pháp ghi ở mục 2.2.4.3. Kết quả được trình bày ở hình 3.10.

Bảng 3.15.Công thức màng bao viên với tỷ lệ chất hóa dẻo so với khối lượng celulose acetatlà 10%

|  |  |
| --- | --- |
| **Công thức màng bao** | |
| Cellulose acetat (g) | 10,80 |
| PEG 4000 (g) | 1,08 |
| Aceton (mL) | 300 |
| Nước tinh khiết (mL) | 10 |

**Hình 3.10**. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các mẫu viên có độ dày màng bao

khác nhau (n=6)

Kết quả ở hình 3.10 cho thấy: độ dày màng bao có ảnh hưởng lớn đến quá trình giải phóng DC từ viên NIF GPKD theo cơ bơm thẩm thấu kéo – đẩy. Khi tăng KLMB từ 6 – 10%, tương ứng với các mẫu viên CT24, CT25, CT26 thì tốc độ giải phóng NIF từ các mẫu viên giảm dần, Tlagrất thấp khoảng 1 giờ, thời gian đạt điểm bão hòa nồng độ là khoảng 12 – 14 giờ đối với cả 3 mẫu viên. Khi tăng KLMBlên 12%, tương ứng với mẫu viên CT21 cho thấy tốc độ giải phóng NIF giảm xuống một chút so với các mẫu viên CT24, CT25, CT26nhưng thời gian đạt điểm bão hòa kéo dài hơn (khoảng 20 giờ) 3 công thức trên. Tlagcủa mẫu viên CT21cũng được kéo dài lên khoảng 2 – 3 giờ. Tốc độ giải phóng này là khá phù hợp với viên đối chiếu với giá trị f2 = 69,91(*Phụ lục 3*). Trong khi giá trị f2 của 3 mẫu viênCT24, CT25, CT26chỉ đạt được khoảng 20 – 31(*Phụ lục 3*). Như vậy, tốc độ giải phóng NIF từ viên GPKD cơ chế bơm thẩm thấu kéo-đẩy tỷ lệ nghịch với KLMB và khi KLMB tăng thì Tlag càng kéo dài, làm chậm tốc độ giải phóng thuốc. Do đó, lựa chọn KLMB12% so với viên nhân cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của đường kính miệng giải phóng đến tốc độ giải phóng thuốc

Để đánh giá ảnh hưởng của kích thước miệng giải phóng đến khả năng giải phóng DC từ viên thẩm thấu, tiến hành bào chế các mẫu viên CT27, CT28, CT29 có cùng độ dày màng bao là 10% và CT30, CT21, CT31 có độ dày màng bao là 12%. Các mẫu viên này có đường kính miệng giải phóng thay đổi trên mỗi loại màng bao lần lượt là 0,6 mm, 0,8 mm, 1 mm; có thành phần viên nhân và thành phần màng bao như mẫu viên CT21. Viên được thử hòa tan theo phương pháp ghi ở mục 2.2.4.3.Kết quả được trình bày ở hình 3.11

**Hình 3.11**. Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ các mẫu viên có độ dày màng bao 10%, 12% và có đường kính miệng giải phóng khác nhau (n=6)

Kết quả ở hình 3.11cho thấy: đối với các mẫu viên CT27, CT28, CT29 có cùng độ dày màng bao là 10%, cho tốc độ giải phóng và phần trăm giải phóng ở 24 giờ khá cao. Tốc độ giải phóng có xu thế tăng dần theo thứ tự CT27 > CT28 > CT29, tỷ lệ thuận với sự tăng lên của kích thước lỗ giải phóng. Xét về Tlag, thì cả 3 mẫu viên có Tlagít thay đổi và khá ngắn (khoảng 1,5 – 2 giờ). Điều này là phù hợp do thời gian thấm nước chủ yếu phụ thuộc vào bề dày và thành phần màng bao.Ngược lại, đối với các mẫu viên có cùng độ dày màng bao 12% (CT30, CT21, CT31), tốc độ giải phóng là thấp hơn các mẫu viên có độ dày màng bao 10% khi so sánh trên cùng kích thước lỗ giải phóng. Tuy nhiên, với cùng độ dày màng bao là 12% thì tốc độ giải phóng của các mẫu viên vẫn có xu hướng tăng dần theo sự tăng lên của kích thước lỗ giải phóng và Tlag của các mẫu viên này cũng ít có sự thay đổi và có xu thế dài hơn một chút so với các mẫu viên có độ dày màng bao 10%. Trong các mẫu viên thì mẫu viên CT21 với độ dày màng bao 12% và kích thước lỗ giải phóng 0,8 mm chokhoảng giải phóng theo động học bậc 0 dài (20 giờ) và có tốc độ, tỷ lệ % NIF giải phóng tại 24 giờ là khá tương đồng với viên đối chiếu, với hệ số f2 là 69,91(Phụ lục 3), lớn hơn so với các mẫu viên còn lại. Do đó, nhận thấy mẫu viên CT21 với kích thước lỗ giải phóng 0,8 mm là phù hợp nhất và được lựa chọn.

Từ kết quả nghiên cứu và đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố khác nhau thuộc về công thức viên đến sự giải phóng thuốc *in vitro* của viên thẩm thấu, công thức viên NIF 2 lớp GPKD dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy được lựa chọn như sau:

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| *-Lớp DC (công thức 1 viên):* | |  |
|  | Nifedipin | 30mg |
| PEO N10 | 106,10 mg |
| Lactose | 28,50 mg |
| Natri clorid | 19mg |
| Magnesi stearat | 1,90 mg |
| PVP K30 | 4,50 mg |
| *- Lớp đẩy (công thức 1 viên):* | |  |
|  | PEO 303 | 71,85mg |
| Natri clorid | 33mg |
| Magnesi stearat | 1,10 mg |
| Oxid sắt đỏ | 0,55mg |
| PVP K30 | 3,50 mg |
| *-Công thức dịch bao (công thức cho 330 viên):* | | |
|  | Celulose acetat | 10,80 g |
| PEG 4000 | 1,08g |
| Aceton | 300 mL |
| Nước tinh khiết | 10 mL |
| - *KLMB so với viên nhân*: 12% | | |
| - *Kích thước miệng giải phóng DC*: 0,80 mm | | |

3.4. KẾT QUẢ XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH BÀO CHẾ VIÊN NÉN NIFEDIPINDẠNG BƠM THẨM THẤU KÉO – ĐẨY QUY MÔ 2000 VIÊN/MẺ

3.4.1. Mô tả quy trình bào chế viên nén nifedipin 30mg dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy ở quy mô 2000 viên/mẻ

***3.4.1.1. Công thức***

Công thức bào chế viên NIF 30mg dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy cho một mẻ 2000 viên có thành phần như sau:

Bảng 3.16. Công thức cho mẻ 2000 viên

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Tên các đơn vị**  **của viên** | | **Thành phần**  **(đơn vị)** | **Số lượng** |
| **Viên nhân** | **Lớp**  **dược chất** | Nifedipin (g) | 60 |
| PEO N10 (g) | 212,20 |
| Lactose (g) | 57 |
| Natri clorid (g) | 38 |
| Magnesi stearat (g) | 3,80 |
| PVP K30 (g) | 9 |
| **Lớp đẩy** | PEO 303 (g) | 143,70 |
| Natri clorid (g) | 66 |
| Magnesi stearat (g) | 2,20 |
| Oxid sắt đỏ (g) | 1,10 |
| PVP K30 (g) | 7 |
| **Bao màng bán thấm** | | Celulose (g) | 68,57 |
| PEG 4000 (g) | 3,43 |
| Aceton (mL) | 1905 |
| Nước tinh khiết (mL) | 63 |
| KLMB tăng lên so với viên nhân: 12% | |
| Kích thước miệng giải phóng: 0,80 mm | | | |

***3.4.1.2. Tóm tắt quy trình bào chế***

Quy trình bào chế gồm các giai đoạn chính:

*Giai đoạn chuẩn bị nguyên liệu*: NIF được nghiền trong cối, rây qua rây có kích thước lỗ rây 180 μm. Các tá dược khác cho qua rây 500 μm (Xay nghiền nếu cần).

*Giai đoạn trộn bột kép*:

- Lớp dược chất: cân các nguyên liệu NIF, PEO N10, lactose, natri clorid, tiến hành trộn trong cối theo nguyên tắc đồng lượng trong 30 phút. Trộn lactose với natri clorid; trộn hỗn hợp lactose và natri clorid với NIF; cuối cùng trộn hỗn hợp lactose, natri clorid, NIF với PEO N10. Sau đó, trộn bằng máy trộn lập phương với đầu máy KALWEKA, tốc độ hộp trộn 82 vòng/phút trong 15 phút. Cuối cùng, trộn bằng máy trộn chữ Z với đầu máy KALWEKA, tốc độ cánh trộn 134 vòng/phút trong 20 phút.

- Lớp đẩy: cân các nguyên liệu PEO 303, natri clorid, oxid sắt đỏ, tiến hành trộn trong cối theo nguyên tắc đồng lượng trong 30 phút. Trộn oxid sắt đỏ với 1 phần natri clorid; trộn hỗn hợp oxid sắt đỏ và 1 phần natri clorid với lượng natri clorid còn lại; trộn hỗn hợp oxid sắt đỏ và natri clorid với ½ lượng PEO 303; cuối cùng trộn với lượng PEO 303 còn lại. Sau đó, trộn bằng máy trộn lập phương với đầu máy KALWEKA, tốc độ hộp trộn 82 vòng/phút trong 15 phút. Cuối cùng, trộn bằng máy trộn chữ Z với đầu máy KALWEKA, tốc độ cánh trộn 134 vòng/phút trong 10 phút.

*Giai đoạn nhào ẩm*: nhào ẩm với dung dịch PVP K30 5% trong ethanol. Thực hiện trên máy trộn chữ Z ERWEKA với đầu máy KALWEKA, tốc độ cánh trộn là 124 vòng/phút trong thời gian 10 phút.

*Giai đoạn xát hạt*: tiến hành xát hạt qua rây 800μm. Thiết bị xát hạt ERWEKA đầu máy KALWEKA với tốc độ 105 vòng/phút.

*Giai đoạn sấy và sửa hạt*: sấy khô cốm ở nhiệt độ 50 ± 50C trong 30 phút đến độ ẩm 2 - 3%. Thực hiện trên thiết bị sấy tĩnh Memmert của Đức. Sửa hạt qua rây có kích thước mắt rây 800μm.

*Giai đoạn trộn hoàn tất*: trộn cốm khô với TD trơn magnesi stearat. Thực hiện trên thiết bị trộn lập phương với đầu máy KALWEKA cố định tốc độ hộp trộn 82 vòng/phút.

*Giai đoạn dập viên*: tiến hành dập viên có khối lượng 300 mg với độ cứng 10 – 12 kP. Thực hiện trên thiết bị dập viên 2 lớp quay tròn SHAKTI (9 chày) với bộ chày cối kích thước 9mm.

*Giai đoạn bao màng bán thấm*: bao màng bán thấm tới KLMB 12%. Thực hiện trên thiết bị bao phim tự động VANGUAR – VGB - 1E.

*Giai đoạn khoan miệng giải phóng:* khoan miệng giải phóng với kích thước lỗ 0,8 mm. Thực hiện trên thiết bị khoan laser Epilog Laser mini/8000với đường kính khay 9,1 mm. Kiểm soát tốc độ chiếu tia là 30 và năng lượng chùm tia là 35.

3.4.2. Thẩm định quy trình bào chế viên nén nifedipin 30mg dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy ở quy mô 2000 viên/mẻ

***3.4.2.1. Khảo sát các thông số của quá trình bào chế viên nhân ở quy mô 2000 viên***

*a, Quá trình tạo hạt*

\* *Nghiền, rây:*

Nguyên liệu NIF được nghiền trong cối. Tiến hành đánh giá phân bố KTTP NIF sau khi nghiền, kết quả được trình bày ở bảng 3.17.

Bảng 3.17. Phân bố kích thước tiểu phân nguyên liệu nifedipin

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **KTTP** (μm) | **Trên 250** | **250 - 180** | **180 – 75** | **Dưới 75** |
| **Tỷ lệ** (%) | 0 | 0,32 | 10,03 | 89,65 |

Kết quả ở bảng 3.17 cho thấy: KTTPcủa NIF chủ yếu vào khoảng dưới 75 μm (chiếm 89,65%). Tuy nhiên, vẫn còn 0,32 % bột có KTTP từ 250 – 180μm. Như vậy, sau khi nghiền, NIF phải được rây qua rây có kích thước 180μm.

\**Quá trình trộn bột kép*

Thực hiện bằng cách trộn trong cối theo nguyên tắc đồng lượng trong 30 phút. Sau đó, trộn bằng máy trộn lập phương với đầu máy KALWEKA, tốc độ 82 vòng/phút trong 15 phút. Cuối cùng, trộn bằng máy trộn chữ Z với đầu máy KALWEKA, tốc độ 134 vòng/phút được giữ cố định. Khảo sát thời gian trộn bột kép của lớp DC và lớp đẩy. Kết quả đánh giá bột về độ đồng đều hàm lượngvà tỷ trọng tại các thời điểm trộn được trình bày ở bảng 3.18, 3.19.

Bảng 3.18. Độ đồng đều hàm lượng nifedipin khi trộn bột kép lớp dược chất ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Thời gian trộn (phút)** | **Hàm lượng NIF (% ± SD, n=5)** | **RSD (%)** |
| 10 | 15,16 **±**0,52 | 3,44 |
| 15 | 15,28**±**0,50 | 3,24 |
| 20 | 15,06**±**0,18 | 1,21 |
| 25 | 14,96**±**0,62 | 4,16 |

Bảng 3.19. Tỷ trọng bột lớp đẩy sau khi trộn bột kép ở quy mô 2000 viên/mẻ (n = 3)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Thời gian**  **Tỷtrọng** (g/mL) | 5 phút | | 10 phút | | 15 phút | | 20 phút | |
| d thô | d biểu kiến | d thô | d biểu kiến | d thô | d biểu kiến | d thô | d biểu kiến |
| **TB** | 0,51 | 0,61 | 0,52 | 0,62 | 0,52 | 0,61 | 0,53 | 0,62 |
| **SD** | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,01 | 0,01 |
| **RSD%** | 2,98 | 2,49 | 1,12 | 1,61 | 3,33 | 2,84 | 1,89 | 1,85 |

Kết quả ở bảng 3.18 và bảng 3.19 cho thấy: khi thời gian trộn lớp DC là 20 phút, giá trị RSD < 3%. Điều đó chứng tỏ khối bột đồng đều về hàm lượng.Khi tăng thời gian trộn lên 25 phút, khối bột có xu hướng phân tán lại làm giảm giảm độ đồng nhất. Vì vậy, chọn thời gian trộn lớp DC là 20 phút. Đối với lớp đẩy, khi thời gian trộn là 10 phút, giá trị RSD của d thô và d biểu kiến đều < 2%, khi tăng thời gian trộn lên 15 phút, giá trị RSD của d thô> 2%, giá trị RSD của d biểu kiến là 2,84 % > 2%. Khi tăng thời gian trộn lên 20 phút, giá trị RSD của cả d thô và d biểu kiến đều nhỏ hơn 2%. Tuy nhiên, để tiết kiệm thời gian trộn lựa chọn thời gian trộn cho lớp đẩy là 10 phút.

*\* Quá trình nhào ẩm*

Giai đoạn nhào ẩm được thực hiện trên máy trộn chữ Z ERWEKA với đầu máy KALWEKA. Dựa vào cảm quan, đặc tính của khối ẩm và sự thuận tiện khi thao tác để lựa chọn thông số máy. Quá trình lựa chọn dung môi pha TDdính, ban đầu sử dụng ethanol tuyệt đối làm TD dính. Tuy nhiên, khi sử dụng vì là cồn cao độ nên bay hơi quá nhanh làm cho khối bột không đủ ẩm, quá trình xát hạt hạt không có được sự kết dính cần thiết, hạt bị vỡ vụn. Hơn nữa, sử dụng ethanol tuyệt đối đơn độc tiềm ẩn nguy cơ cháy nổ cao cùng với đó là giá thành đắt. Do đó, lựa chọn ethanol phối hợp với PVP K30 làm TD dính với lượng dùng là 5%, vừa đảm bảo khả năng kết dính tốt, vừa hạn chế sự trương nở, vón cục của PEO trong quá trình nhào ẩm.

Từ kết quả khảo sát sơ bộ đã lựa chọn quá trình nhào ẩm với dung dịch PVP K30 5% trong ethanol. Thực hiện trên máy trộn chữ Z ERWEKA với đầu máy KALWEKA, tốc độ trộn là 124 vòng/phút trong thời gian 10 phút.

\* *Giai đoạn xát hạt*: tiến hành xát hạt qua rây 800μm. Thiết bị xát hạt ERWEKA đầu máy KALWEKA với tốc độ 105 vòng/phút.

\* *Giai đoạn sấy và sửa hạt*: khối hạt ẩm sau khi tạo hạt được chuyển sang các khay inox, sấy khô cốm ở nhiệt độ 50 ± 5oC đến độ ẩm 2 - 3%. Thực hiện trên thiết bị sấy tĩnh Memmert của Đức. Sửa hạt qua rây có kích thước mắt rây 800μm. Kết quả xác định hàm ẩm được trình bày ở bảng 3.20 và bảng 3.21.

Bảng 3.20. Độ ẩm của hạt lớp dược chất với thời gian sấy khác nhau ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Thời gian** (phút) | 30 | 45 | 60 |
| **Độ ẩm trung bình** (%)  (TB±SD, n=3) | 2,14 ± 0,18 | 1,62 ± 0,06 | 0,79 ± 0,14 |

Bảng 3.21. Độ ẩm của hạt lớp đẩy với thời gian sấy khác nhau ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Thời gian** (phút) | 30 | 45 | 60 |
| **Độ ẩm trung bình** (%)  (TB±SD, n=3) | 2,61 ± 0,19 | 1,72 ± 0,09 | 0,84 ± 0,06 |

Kết quả ở bảng 3.20 và bảng 3.21 cho thấy ở thời điểm 30 phút, hạt đã được sấy đạt độ ẩm từ 2 – 3% theo yêu cầu. Như vậy, để tiết kiệm thời gian, lựa chọn thời gian sấy là 30 phút.

\* *Giai đoạn trộn hoàn tất*: trộn cốm khô với TD trơn magnesi stearat. Thực hiện trên thiết bị trộn lập phương với đầu máy KALWEKA cố định tốc độ 82 vòng/phút. Khảo sát thời gian trộn TD trơn của lớp DC và lớp đẩy. Kết quả đánh giá đặc tính hạt được trình bày ở bảng 3.22, bảng 3.23, bảng 3.24, bảng 3.25.

Bảng 3.22. Phân bố kích thước hạt lớp dược chất sau khi trộn hoàn tất ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **KTTP** (µm) | Nhỏ hơn 180 | 180 – 710 | Lớn hơn 710 |
| **Tỷ lệ** (%) | 11,34 | 84,42 | 4,24 |

Bảng 3.23. Một số đặc tính hạt lớp dược chất sau khi trộn hoàn tất ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Chỉ tiêu** | **10 phút** | **15 phút** | **20 phút** | **25 phút** |
| KLR (g/cm3)  (TB±SD, RSD, n=3) | 0,48± 0,02; 3,31 | 0,49± 0,01;  2,64 | 0,49± 0,01;  2,28 | 0,48± 0,01;  1,04 |
| KLRBK (g/cm3)  (TB±SD, RSD, n=3) | 0,54± 0,02;  3,07 | 0,53± 0,01;  0,63 | 0,56± 0,01;  2,26 | 0,55± 0,01;  1,06 |
| Chỉ số Carr  (TB±SD, n=3) | 10,07± 0,65 | 7,39± 2,02 | 11,67± 1,04 | 11,41± 0,69 |
| Tốc độ chảy (g/s)  (TB±SD, n=3) | 7,74± 0,21 | 7,80± 0,25 | 7,72± 0,33 | 7,96± 0,07 |
| Hàm lượng NIF (%)  (TB±SD, RSD, n=5) | 15,56±0,61,  3,91 | 15,03±0,48,  3,21 | 14,98±0,58,  3,90 | 14,58±0,33  2,23 |

Bảng 3.24. Phân bố kích thước hạt lớp đẩy sau khi trộn hoàn tất ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **KTTP** (µm) | Nhỏ hơn 180 | 180 – 710 | Lớn hơn 710 |
| **Tỷ lệ** (%) | 15,24 | 81,56 | 3,20 |

Bảng 3.25. Một số đặc tính hạt lớp đẩy sau khi trộn hoàn tất ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Chỉ tiêu** | **10 phút** | **15 phút** | **20 phút** | **25 phút** |
| KLR (g/cm3)  (TB±SD; RSD, n=3) | 0,51± 0,02;  4,38 | 0,52± 0,01;  1,97 | 0,52± 0,02;  4,00 | 0,52± 0,01;  2,32 |
| KLRBK (g/cm3)  (TB±SD; RSD, n=3) | 0,58± 0,02;  3,25 | 0,58± 0,01;  1,69 | 0,60± 0,03;  4,57 | 0,60± 0,02;  4,09 |
| Chỉ số Carr  (TB±SD, n=3) | 12,66± 1,02 | 11,26± 0,32 | 12,25± 0,87 | 12,86± 1,63 |
| Tốc độ chảy (g/s)  (TB±SD, n=3) | 7,32± 0,14 | 7,76± 0,10 | 7,84± 0,09 | 7,92± 0,07 |

Kết quả ở bảng 3.22, bảng 3.23, bảng 3.24, bảng 3.25 cho thấy: khi thời gian trộn lớp DC là 25 phút, giá trị RSD nhỏ nhất (2,23< 3%). Điều đó chứng tỏ cốm lớp DC đồng đều về hàm lượng. Hơn nữa, với thời gian trộn là 25 phút, giá trị RSD của d thô và d biểu kiến đều < 2% chứng tỏ cốm phân tán đều, chỉ số Carr là 11,41 < 15 chứng tỏ cốm có độ trơn chảy tốt. Vì vậy, chọn thời gian trộn hoàn tất lớp DC là 25 phút. Đối với lớp đẩy, khi thời gian trộn là 10 phút, giá trị RSD của d thô và d biểu kiến đều > 2%, khi tăng thời gian trộn lên 15 phút, giá trị RSD của d thô và d biểu kiếnđều <2%. Khi tăng thời gian trộn lên 20 phút, 25 phút, giá trị RSD của cả d thô và d biểu kiến đều tăng vượt 2%. Do vậy, chọn thời gian trộn hoàn tất lớp đẩy là 15 phút.

*b. Quá trình dập viên*: Tiến hành dập viên có khối lượng 300 mg với độ cứng 10 – 12 kP. Thực hiện trên thiết bị dập viên 2 lớp quay tròn SHAKTI (9 chày)với bộ chày cối kích thước 9mm, chày lõm. Khảo sát tốc độ dập viên 2,5 vòng/phút; 5 vòng/phút và 10 vòng/phút. Theo dõi quá trình dập viên và đánh giá độ cứng, độ đồng đều khối lượng của viên tại 3 thời điểm khác nhau. Kết quả được trình bày ở bảng 3.26, bảng 3.27, bảng 3.28.

Bảng 3.26. Đặc tính của viên tại các thời điểm với tốc độ dập 1(2,5vòng/phút) ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Thời điểm lấy mẫu** | **KLTB viên** (n=20) | | **Độ cứng** (n=20) | **Độ mài mòn** (n=10) |
| TB ± SD (mg) | RSD (%) | TB ± SD (kP) | TB ± SD (%) |
| Đầu | 296,0 ± 5,5 | 1,87 | 9,1 ± 0,34 | 0,07 ± 0,01 |
| Giữa | 301,1 ± 6,6 | 2,19 | 9,5 ± 0,22 | 0,07 ± 0,004 |
| Cuối | 300,3 ± 8,1 | 2,70 | 10,5 ± 0,23 | 0,07 ± 0,01 |

Bảng 3.27. Đặc tính của viên tại các thời điểm với tốc độ dập 2 (5 vòng/phút) ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Thời điểm lấy mẫu** | **KLTB viên** (n=20) | | **Độ cứng** (n=20) | **Độ mài mòn** (n=10) |
| TB ± SD (mg) | RSD (%) | TB ± SD (kP) | TB ± SD (%) |
| Đầu | 299,6 ± 5,0 | 1,67 | 10,5 ± 0,14 | 0,08 ± 0,01 |
| Giữa | 301,0 ± 5,0 | 1,62 | 10,9 ± 0,24 | 0,09 ± 0,01 |
| Cuối | 302,0 ± 5,0 | 1,66 | 11,1 ± 0,41 | 0,10 ± 0,01 |

Bảng 3.28.Đặc tính của viên tại các thời điểm với tốc độ dập 3 (10 vòng/phút) ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Thời điểm lấy mẫu** | **KLTB viên** (n=20) | | **Độ cứng** (n=20) | **Độ mài mòn** (n=10) |
| TB ± SD (mg) | RSD (%) | TB ± SD (kP) | TB ± SD (%) |
| Đầu | 300,4 ± 7,9 | 2,62 | 11,6 ± 0,43 | 0,10 ± 0,01 |
| Giữa | 308,2 ± 6,5 | 2,10 | 12,0 ± 0,53 | 0,07 ± 0,01 |
| Cuối | 305,6 ± 8,2 | 2,70 | 12,51 ± 0,60 | 0,08 ± 0,01 |

Kết quả ở bảng 3.26, 3.27, 3.28 cho thấy: với tốc độ dập 5 vòng/phút, viên có sự đồng đều về khối lượng ở cả 3 thời điểm lấy mẫu với RSD < 2%. Điều đó chứng tỏ hạt trơn chảy tốt trong suốt quá trình dập viên .Độ cứng của viên vào khoảng 10 – 12kp. Độ mài mòn < 1% (đạt yêu cầu DĐVN V). Tuy nhiên, ở tốc độ dập viên 2,5 vòng/phút và 10 vòng/phút có sự dao động của khối lượng viên, độ cứng và độ mài mòn. Lựa chọn tốc độ dập 5vòng/phút để đảm bảo viên có chất lượng đồng đều. Kết quả khảo sát là cơ sở khoa học để xây dựng quy trình bào chế ở quy mô 2000 viên/mẻ (Hình PL 10.1. Phần Phụ lục).

***3.4.2.2. Khảo sát các thông số của quá trình bao viên nhân ở quy mô 2000 viên/mẻ***

Viên được bao phim bằng nồi bao phim tự động Vanguard. Tổng lượng viên được duy trì trong tất cả các trường hợp bằng với công suất máy.

Quá trình bao màng bán thấm với TDCA, sử dụng dung môi chủ yếu là aceton, dễ bay hơi. Vì vậy, nhiệt độ trong buồng bao thiết lập thấp, chỉ từ 35 – 40oC. Trong quá trình bao, các thông số như: tốc độ phun dịch, nhiệt độ khí vào, tốc độ quay của nồi bao…đều ảnh hưởng đến độ đồng đều màng bao. Từ kết quả nghiên cứu sơ bộ, lựa chọn các thông số như sau:

- Tốc độ nồi bao: 6 vòng/phút

- Lưu lượng gió vào: 70% công suất máy

- Cửa gió ra: Đặt mức 100%

Thay đổi các thông số về nhiệt độ khí đầu vào và tốc độ cấp dịch, khảo sát sự ảnh hưởng đến độ đồng đều của KLMB. Kết quả được trình bày ở bảng 3.29.

Bảng 3.29. Ảnh hưởng của 1 số thống số của quy trình bao đến độ đồng đều khối lượng màng bao (% ±RSD, n=10)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Nhiệt độ khí vào (0C)** | **Tốc độ phun dịch (mL/kg viên/phút)** | | |
| 2,4 | 3,2 | 4,0 |
| 45 | 12,6 ± 6,52 | 12,7 ± 8,69 | 12,7 ± 7,05 |
| 50 | 13,2 ± 5,95 | 14,0 ± 6,45 | 13,07 ± 6,19 |
| 55 | 11,4 ± 4,77 | 11,73 ± 4,00 | 11,92 ± 4,85 |

Kết quả ở bảng 3.29 cho thấy: ở nhiệt độ của khí vào là 55oC thì độ đồng đều của KLMB ở mức cao (thể hiện ở giá trị RSD vào khoảng 4 – 5%), tuy nhiên KLMB lại thấp. Điều này có thể do viên khô nhanh, dẫn đến giảm các khả năng dính và làm viên đồng đều hơn. Tuy nhiên, do nhiệt độ khí làm khô cao do đó, làm tăng tỷ lệ hư hao dịch bao và làm cho KLMB thấp. Trong đó, các mẫu khảo sát với nhiệt độ khí vào 55ºC, tốc độ phun dịch 3,2 mL/phút thu được màng bao tốt, có độ đồng nhất cao (RSD khoảng 4%), tỷ lệ hư hao thấp.

***3.4.2.3. Khảo sát các thông số của quá trình khoan laser viên bao ở quy mô 2000 viên/mẻ***

Quá trình khoan laser yêu cầu phải lựa chọn các thông số để đạt độ đồng đều đường kính lỗ khoan. Các thông số cần kiểm soát là mức năng lượng chùm tia, thời gian tác động chùm tia và điều chỉnh tiêu cự thấu kính hội tụ để chùm tia tác động tại màng bao.Từ kết quả thực nghiệm sơ bộ, đặt các thông số cho máy khoan để tiến hành khảo sát quá trình khoan laser với tốc độ cố định là 30, năng lượng chùm tia được điều chỉnh ở các mức 15, 25 và 35%, tiêu cự được điều chỉnh bằng thước của máy, đường kính miệng giải phóng là 0,8mm. Lấy 10 viên ngẫu nhiên của mẻ khoan, đánh giá đường kính miệng giải phóng DC. Kết quả được trình bày ở bảng 3.30.

Bảng 3.30. Kết quả khảo sát thông số khoan miệng giải phóng dược chất

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Mức năng lượng (%)** | **Đường kính miệng giải phóng trung bình** (n=10) | |
| TB ± SD (g) | RSD (%) |
| 15 | 0,783 ± 0,031 | 3,90 |
| 25 | 0,789 ± 0,026 | 3,35 |
| 35 | 0,801 ± 0,012 | 1,49 |

Kết quả ở bảng 3.30 cho thấy, đặt mức năng lượng 35 % công suất máy cho kết quả phù hợp nhất. Đường kính lỗ khoan xấp xỉ thông số đặt trên máy với độ lệch chuẩn tương đối nhỏ (khoảng 1,49%). Thông số này được sử dụng để khoan miệng giải phóng DC cho viên.

***3.4.2.4. Đánh giá quy trình bào chế trên 3 mẻ ở quy mô 2000 viên***

Đánh giá các đặc tính của hạt hai lớp và viên trên 3 mẻ ở quy mô 2000 viên. Kết quả được trình bày ở bảng 3.31 và bảng 3.32.

Bảng 3.31. Một số đặc tính của hạt lớp dược chấtvà lớp đẩy ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Mẻ** | **Đặc tính cốm lớp dược chất** | | | | **Đặc tính cốm lớp đẩy** | | |
| KLRBK (g/cm3)  (TB±SD, RSD, n=3) | Tốc độ chảy (g/s)  (TB±SD, n=3) | Hàm ẩm (%) (TB±SD, n=3) | Hàm lượng (%)  (TB±SD, RSD, n=5) | KLRBK (g/cm3)  (TB±SD, RSD, n=3) | Tốc độ chảy (g/s)(TB±SD, n=3) | Hàm ẩm (%)(TB±SD, n=3) |
| Mẻ 1 | 0,55±0,01 | 7,96±0,07 | 2,14±0,18 | 14,58±0,33  2,23 | 0,58±0,01  1,69 | 7,76±0,10 | 2,61±0,19 |
| Mẻ 2 | 0,56±0,01  1,45 | 7,90±0,16 | 2,4±0,26 | 14,48  ±0,32  2,19 | 0,57  ±0,01  1,67 | 7,43±0,09 | 2,57±0,35 |
| Mẻ 3 | 0,58±0,01  1,75 | 7,98±0,10 | 2,57±0,32 | 14,43±0,26  1,82 | 0,56±0,01  1,36 | 7,47±0,05 | 2,60±0,20 |

Bảng 3.32. Một số đặc tính của viên nhân và viên thẩm thấu ở quy mô 2000 viên/mẻ

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Mẻ** | **Đặc tính viên nhân** | | | **Đặc tính viên thẩm thấu** | |
| **Độcứng** (kP) (TB±SD, n=20) | **Độ mài mòn** (%)(TB±SD, n=10) | **KLTB viên** (mg), (TB±SD, RSD, n=20) | Độ đồng đều KLMB (%)(TB±RSD, n=10) | Độ đồng đều đường kính miệng giải phóng (mm),(TB±SD, RSD, n=10) |
| Mẻ 1 | 10,9±0,24 | 0,09±0,01 | 301,0±5,0  1,62 | 11,73±4,00 | 0,801±0,012  1,49 |
| Mẻ 2 | 10,9±0,32 | 0,08±0,03 | 300,1±5,0  1,56 | 11,82±4,13 | 0,797±0,013  1,68 |
| Mẻ 3 | 11,0±0,31 | 0,09±0,02 | 300,9±5,0  1,67 | 11,85±4,04 | 0,802±0,015  1,84 |

Kết quả ở bảng 3.31 và bảng 3.32 cho thấy hạt có độ đồng đều hàm lượng cao và trơn chảy tốt. Viên nhân thu được ở cả 3 mẻ đều có độ cứng 10 - 12 kP, độ mài mòn < 1% và độ đồng đều khối lượng đạt tiêu chuẩn DĐVN V. Viên thẩm thấu có độ đồng đều màng bao ở mức cao và độ đồng đều về kích thước miệng giải phóng với giá trị RSD tương đối nhỏ. Giá trị SD thu được ở cả 3 mẻ nhỏ, cho thấy quy trình bào chế ổn định và có tính lặp lại tốt.

3.5. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CƠ SỞ VÀ ĐÁNH GIÁ ĐỘ ỔN ĐỊNH VIÊN NÉN NIFEDIPIN THẨM THẤU KÉO –ĐẨY

3.5.1. Kết quả nghiên cứu xây dựng một số chỉ tiêu chất lượng viên nifedipin dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy

Dựa vào kết quả kiểm nghiệm một số chỉ tiêu chất lượng của 3 mẻ nghiên cứu, mỗi mẻ tương ứng 2000 viên. Kết quả thu được như sau:

***3.5.1.1. Tính chất***

Viên bao, một mặt màu vàng, một mặt màu đỏ nâu. Viên bao nhẵn bóng, không bị bong mặt. Miệng giải phóng ở chính giữa bề mặt màu vàng của viên.

***3.5.1.2. Định tính***

Trên sắc ký đồ thu được trong phần định lượng, dung dịch thử phải cho 1 pic có cùng thời gian lưu với pic chính thu được từ sắc ký đồ của dung dịch chuẩn NIF. Kết quả sắc ký đồ trình bày ở phần phụ lục 13.

***3.5.1.3. Độ đồng đều khối lượng***

Tiến hành theo Dược điển Việt Nam V, phụ lục 11.3 (phương pháp 1). Kết quả dược trình bày ở bảng 3.33.

Bảng 3.33. Độ đồng đều khối lượng của 3 mẻ viên bao

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **KLTB viên** (g, n=20) | **Mẻ 1** | **Mẻ 2** | **Mẻ 3** |
| TB | 0,337 | 0,339 | 0,342 |
| SD | 0,005 | 0,003 | 0,002 |
| RSD% | 1,37 | 1,02 | 0,66 |

Kết quả ở bảng 3.33 cho thấy: khối lượng giữa các viên chênh lệch ít và chênh so với KLTB nhỏ hơn 5%.

***3.5.1.4. Độ hòa tan***

## Tiến hành theo phương pháp ghi ở mục 2.2.4. Kết quả được trình bày ở bảng 3.34.

Bảng 3.34. Kết quả độ hòa tan của 3 mẻ nghiên cứu (TB ± SD, n = 6)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Thời gian** (giờ) | **% NIF giải phóng** | | |
| **Mẻ 1** | **Mẻ 2** | **Mẻ 3** |
| 4 | 8,24 ± 0,39 | 9,00 ± 0,25 | 9,09 ± 0,42 |
| 12 | 52,17 ± 1,87 | 53,07 ± 1,05 | 52,33 ± 0,76 |
| 24 | 102,07 ± 2,86 | 98,96 ± 2,45 | 97,42 ± 1,90 |

***3.5.1.5. Định lượng***

## Tiến hành theo phương pháp ghi trong mục 2.2.4. Kết quả được trình bày ở bảng 3.35.

Bảng 3.35. Hàm lượng nifedipin (%) của 3 mẻ nghiên cứu (TB ± SD,n = 6)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Hàm lượng nifedipin (%) so với lượng ghi trên nhãn | | |
| Mẻ 1 | Mẻ 2 | Mẻ 3 |
| 100,39± 0,13 | 100,66± 0,20 | 101,42± 0,36 |

## Kết quả ở bảng 3.35 cho thấy: cả 3 mẻ đều đạt yêu cầu về hàm lượng DC nằm trong khoảng 90 – 110% so với hàm lượng ghi trên nhãn theo yêu cầu của USP 41.

Bảng3.36. Đề xuất một số tiêu chuẩn chất lượng cho viên nén

nifedipin 30 mg giải phóng kéo dài

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| STT | Chỉ tiêu chất lượng | Tiêu chuẩn đề xuất | Phương pháp thử |
| 1 | Hình thức | Viên bao, một mặt màu vàng, một mặt màu đỏ. Bề mặt nhẵn bóng, không bị bong mặt | Cảm quan |
| 2 | Đồng đều khối lượng | Khối lượng trung bình ± 5% | DĐVN V, phụ lục 11.3 |
| 3 | Định tính | Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic nifedipin thu được trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn | HPLC, DĐVN V |
| 4 | Định lượng | 90,0 – 110,0 % so với hàm lượng ghi trên nhãn | HPLC |
| 5 | Độ hòa tan | Tỷ lệ giải phóng hoạt chất như sau:  Sau 4 giờ: 5 – 17%  Sau 12 giờ: 43 – 80%  Sau 24 giờ: ≥ 85% | Theo mục 2.2.3 |
| 6 | Tạp chất liên quan | Tạp chất A ≤ 0,5%  Tạp chất B ≤ 0,5%  Tạp đơn khác ≤ 0,2%  Tổng tạp ≤ 1% | DĐVN V, HPLC |

3.5.2. Kết quả đánh giá độ ổn định

***3.5.2.1. Theo dõi hình thức***

Kết quả theo dõi hình thức cho thấy các mẫu viên mới bào chế, các viên bào chế được được bảo quản ở điều kiện thực trong 12 tháng và điều kiện lão hóa cấp tốc trong 6 tháng đều không có sự thay đổi về hình thức.

***3.5.2.2. Theo dõi độ hòa tan***

Kết quả thử hòa tan của 3 mẻ sau khi theo dõi ở điều kiện lão hóa cấp tốc và điều kiện thực được trình bày ở phần phụ lục 6.

Kết quả khảo sát độ hòa tan DC từ viên trong các điều kiện bảo quản với khoảng thời gian xác định cho thấy: sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc và 12 tháng bảo quản ở điều kiện thực, không nhận thấy sự thay đổi đáng kể về mức độ và tốc độ hòa tan DC ở các mẫu thử nghiệm.

***3.5.2.3. Theo dõi hàm lượng***

Sự thay đổi hàm lượng NIF trong viên nén NIF GPKD được theo dõi ở điều kiện lão hóa cấp tốc và điều kiện thực. Kết quả được trình bày ở bảng 3.37và bảng 3.38.

Bảng 3.37.Hàm lượng nifedipin (%) của 3 mẻ ở điều kiện lão hóa cấp tốc

(TB ± SD, n = 3)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Thời gian bảo quản** (tháng) | **Hàm lượng (%)** | | |
| **Mẻ 1** | **Mẻ 2** | **Mẻ 3** |
| **0** | 99,11 ± 0,50 | 99,61 ± 0,49 | 100,75 ± 1,07 |
| **3** | 97,90 ± 0,81 | 97,73 ± 0,62 | 97,26 ± 0,68 |
| **6** | 96,01 ± 0,49 | 96,20 ± 0,85 | 95,98 ± 0,76 |

Bảng 3.38.Hàm lượng nifedipin (%) của 3 mẻ ở điều kiện thực

(TB ± SD, n = 3)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Thời gian bảo quản** (tháng) | **Hàm lượng (%)** | | |
| **Mẻ 1** | **Mẻ 2** | **Mẻ 3** |
| **0** | 99,11 ± 0,50 | 99,61 ± 0,49 | 100,75 ± 1,07 |
| **3** | 99,37 ± 0,76 | 100,80 ± 0,84 | 99,39 ± 1,30 |
| **6** | 98,44 ± 1,27 | 98,34 ± 0,92 | 99,39 ± 1,30 |
| **9** | 98,53 ± 1,73 | 99,07 ± 0,81 | 98,58 ± 0,49 |
| **12** | 98,38 ± 1,09 | 98,47 ± 1,22 | 98,43 ± 0,75 |

Kết quả khảo sát hàm lượngNIF của viên trong các điều kiện bảo quản với khoảng thời gian xác định cho thấy: sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc và 12 tháng bảo quản ở điều kiện thực, sự thay đổi hàm lượng NIF ở các mẫu thử nghiệm là không đáng kể.

***3.5.2.4. Tạp chất liên quan***

Tiến hành thử tạp chất liên quan của 3 mẻ ở điều kiện lão hóa cấp tốc và điều kiện thực theo phương pháp trong DĐVN V. Định lượng tạp A và tạp B bằng phương pháp HPLC theo tiêu chuẩn cơ sở đã xây dựng. Kết quả được trình bày ở bảng 3.39, bảng 3.40, bảng 3.41.

Bảng 3.39. Hàm lượng tạp chất (%) của 3 mẻ sau 3 tháng ở điều kiện lão hóa cấp tốc (TB ± SD, n = 3)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Tạp chất**(%) | **Mẻ** | | |
| **Mẻ 1** | **Mẻ 2** | **Mẻ 3** |
| **Tạp chất A** | 0,14 ± 0,006 | 0,16 ± 0,010 | 0,15 ± 0,010 |
| **Tạp chất B** | 0,14 ± 0,021 | 0,13 ± 0,010 | 0,12 ± 0,010 |
| **Tạp chất khác** | 0 | 0 | 0 |

Bảng 3.40. Hàm lượng tạp chất (%) của 3 mẻ sau 6 tháng ở điều kiện lão hóa cấp tốc (TB ± SD, n = 3)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Tạp chất**(%) | **Mẻ** | | |
| **Mẻ 1** | **Mẻ 2** | **Mẻ 3** |
| **Tạp chất A** | 0,28 ± 0,020 | 0,33 ± 0,017 | 0,30 ± 0,010 |
| **Tạp chất B** | 0,25 ± 0,010 | 0,29 ± 0,015 | 0,27 ± 0,015 |
| **Tạp chất khác** | 0 | 0 | 0 |

Bảng 3.41. Hàm lượng tạp chất (%) của 3 mẻ sau 12 tháng ở điều kiện thực

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **Tạp**  **Thời gian** | Tạp A | Tạp B | Tạp khác |
| 0 tháng | Không xuất hiện pic tạp nào khi đánh giá các mẫu thử trên các mẻ phân tích | | |
| 3 tháng |
| 6 tháng |
| 9 tháng |
| 12 tháng |
| Kết luận | Đạt yêu cầu | | |

Kết quả ở bảng 3.39, bảng 3.40, bảng 3.41 cho thấy chế phẩm đạt yêu cầu phép thử tạp chất liên quan theo DĐVN V với hàm lượng tạp chất ở điều kiện lão hóa cấp tốc tương đối nhỏ, nằm trong giới hạn cho phép và không xuất hiện tạp trong các mẫu thử ở điều kiện thực.

Từ các kết quả theo dõi độ ổn định dài hạn, xác định tuổi thọ của thuốc bằng phép tính hồi quy ngoại suy theo hướng dẫn của FDA. Kết quả được trình bày ở các hình PL 9.1, hình PL 9.2.

Kết quả tính toán theo hướng dẫn của FDA cho thấy: nếu tính trên độ hòa tan sau 4 giờ, sau 12 giờ thì viên có tuổi thọ lần lượt là 59,9 tháng; 27,3 tháng. Riêng ở độ hòa tan sau 24 giờ, hệ số góc của đáp ứng trung bình của mẻ 1 và mẻ 2 không nhỏ hơn 0 một cách đáng kể nên không xác định được tuổi thọ; với mẻ 3, tuổi thọ dự đoán là 38,4 tháng.

Nếu dự đoán tuổi thọ dựa trên hàm lượng NIF trong viên còn lại so với hàm lượng NIF ban đầu của viên thì tuổi thọ của viên sẽ là 52,9 tháng. Như vậy, thuốc sẽ có tuổi thọ ước tính là 27 tháng.

3.6. KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG VIÊN NÉN NIFEDIPIN THẨM THẤU KÉO – ĐẨY

3.6.1. Kết quả đánh giá tương đương hòa tan *in vitro*

Tiến hành thử độ hòa tan viên nén NIF 2 lớp dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy trong 3 môi trường pH 1,2; pH 4,5 và pH 6,8 với các điều kiện thử được trình bày ở mục 2.2.4.3. và tính giá trị f2 so với viên đối chiếu Adalat LA 30mg. Kết quả được trình bày ở bảng 3.42.

Bảng 3.42.Tỷ lệ % nifedipin giải phóng từ viên thử và viên đối chiếu ở 3 môi trường hòa tan (TB ± SD, n = 12)

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Thời gian (giờ)** | **Tỷ lệ nifedipin hòa tan trung bình (%)** | | | | | |
| **Môi trường pH 1,2** | | **Môi trường pH 4,5** | | **Môi trường pH 6,8** | |
| Thử | Đối chiếu | Thử | Đối chiếu | Thử | Đối chiếu |
| **4** | 9,53  ± 0,20 | 8,34  ± 0,29 | 9,80  ± 0,29 | 8,89  ± 0,26 | 9,80  ± 0,34 | 8,52  ± 0,23 |
| **8** | 34,92  ± 0,99 | 30,88  ± 1,38 | 34,06  ± 0,85 | 30,85  ± 1,00 | 35,06  ± 1,19 | 31,44  ± 1,38 |
| **12** | 57,09  ± 2,11 | 51,10  ± 1,67 | 56,21  ± 1,85 | 50,18  ± 1,48 | 54,48  ± 1,21 | 49,73  ± 1,25 |
| **16** | 77,96  ± 1,58 | 71,37  ± 1,14 | 76,54  ± 1,73 | 70,48  ± 1,32 | 73,27  ± 1,20 | 66,74  ± 0,90 |
| **24** | 101,20  ± 2,07 | 100,72  ± 1,62 | 101,39  ± 1,13 | 100,49  ± 1,00 | 101,93  ± 1,05 | 100,94  ± 0,49 |
| f2 | 67,2 | | 68,6 | | 69,1 | |

Kết quả ở bảng 3.42 cho thấy: trong cả ba môi trường pH 1,2 , đệm pH 4,5 và đệm phosphat pH 6,8, độ hòa tan viên nén NIF 2 lớp dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy và viên đối chiếu Adalat LA 30mg là tương đương *in vitro* với hệ số f2> 50. Như vậy, viên nén NIF 2 lớp dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy được tiếp tục đánh giá SKD*in vivo* trên chó thực nghiệm.

3.6.2. Kết quả thẩm định phương pháp UPLC-MS/MS để định lượng nifedipin trong huyết tương chó

***3.6.2.1. Tính phù hợp của hệ thống sắc ký***

Tiến hành xử lý mẫu huyết tương chó chứa NIF chuẩn ở mức nồng độ 50 ng/mL. Tiêm lặp lại 6 lần vào hệ thống UPLC-MS/MS theo các điều kiện đã xây dựng. Kết quả đánh giá độ phù hợp của hệ thống được trình bày ở bảng 3.43.

Bảng 3.43.Kết quả kiểm tra sự phù hợp của hệ thống UPLC-MS/MS

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **NIF** | | **GLI** | | **Tỷ lệ NIF/GLI** |
| **Thời gian lưu** (phút) | **Diện tích pic** | **Thời gian lưu** (phút) | **Diện tích pic** |
| 1 | 0,75 | 121993 | 0,76 | 14544 | 8,388 |
| 2 | 0,75 | 121878 | 0,76 | 14674 | 8,306 |
| 3 | 0,75 | 122083 | 0,76 | 14569 | 8,380 |
| 4 | 0,75 | 123553 | 0,76 | 14480 | 8,533 |
| 5 | 0,75 | 124376 | 0,76 | 14122 | 8,807 |
| 6 | 0,75 | 123867 | 0,76 | 14523 | 8,529 |
| **TB** | **0,75** | **122958** | **0,76** | **14485** | **8,490** |
| **RSD(%)** | **0,0** | **0,9** | **0,0** | **1,3** | **2,1** |

Kết quả khảo sát cho thấy giá trị RSD (%) của thời gian lưu và diện tích pic đều nằm trong khoảng giới hạn cho phép (<5,0 %) theo tiêu chuẩn FDA. Điều này chứng tỏ hệ thống UPLC-MS/MSvới các điều kiện sắc ký đã chọn là phù hợp và đảm bảo tính ổn định cho phép phân tích định lượng các mẫu chứaNIF trong huyết tương chó.

***3.6.2.2.Tính chọn lọc – đặc hiệu của phương pháp***

Tiến hành phân tích 06 mẫu huyết tương trắng có nguồn gốc khác nhau, và 06 mẫu chuẩn trong các nguồn huyết tương trên có chứa NIF ở nồng độ 0,5 ng/mL. Kết quả được thể hiện ở hình 3.12, hình 3.13 và bảng 3.44.



**Hình 3.12**. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng



**Hình 3.13.** Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng có pha chuẩn nifedipin ở nồng độ LLOQ (0,5 ng/mL) và chuẩn nội glibenclamid (40 ng/mL)

Bảng 3.44. Ảnh hưởng của mẫu trắng tại thời gian lưu của nifedipin và

chuẩn nội glibenclamid

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Đáp ứng tại Rt của NIF** | | **Tỷ lệ đáp ứng**  **trắng/ LLOQ** | **Đáp ứng tại Rt của GLI** | | **Tỷ lệ đáp ứng**  **trắng/ GLI** |
| Mẫu trắng | LLOQ | Mẫu trắng | TB IS |
| 1 | 128 | 1824 | **0,0702** | 69 | 12685 | **0,00544** |
| 2 | 115 | 1860 | **0,0618** | 73 | 12685 | **0,00576** |
| 3 | 130 | 1757 | **0,0740** | 53 | 12685 | **0,00418** |
| 4 | 104 | 1717 | **0,0606** | 39 | 12685 | **0,00307** |
| 5 | 102 | 2166 | **0,0471** | 31 | 12685 | **0,00244** |
| 6 | 88 | 1648 | **0,0534** | 55 | 12685 | **0,00434** |
| **Kết luận** | | | Đạt (≤ 20%) |  |  | Đạt (≤ 5%) |

Kết quả thực nghiệm được trình bày ở các hình 3.12 và 3.13, bảng 3.44 cho thấy:

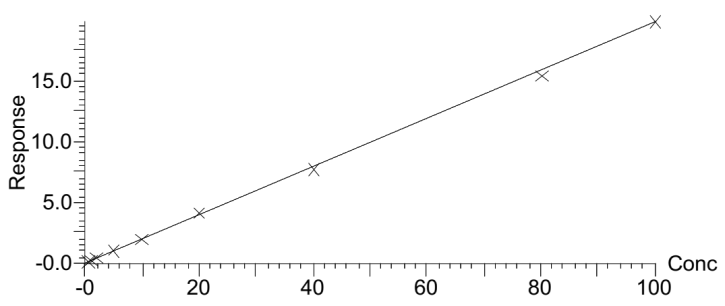
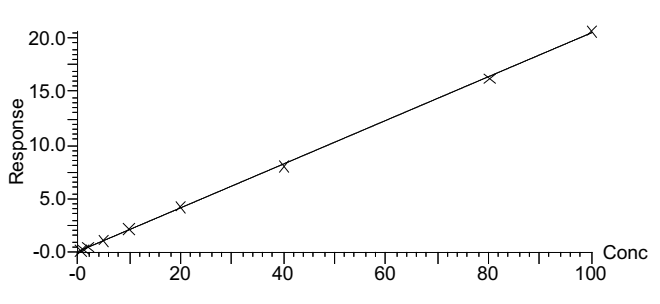
+ Tại thời điểm trùng với thời gian lưu của NIF, diện tích pic của từng mẫu trắng đều nhỏ hơn 7,40 % diện tích pic của mẫu LLOQ tương ứng (theo quy định không quá 20 %).

+ Tại thời điểm trùng với thời gian lưu của GLI, diện tích pic của từng mẫu trắng đều nhỏ hơn 0,576 % diện tích pic trung bình của mẫu LLOQ (theo quy định không quá 5 %).

Do đó, phương pháp phân tích NIF đã xây dựng đáp ứng được yêu cầu về độ đặc hiệu và chọn lọc của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của FDA – Mỹ và EMA.

***3.6.2.3. Xây dựng đường chuẩn và khoảng tuyến tính***

Tiến hành pha các mẫu chuẩn trong huyết tương có nồng độ NIFlần lượt là: 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 40; 80 và 100 ng/mL. Phân tích theo quy trình đã xây dựng*.* Xác định mối tương quan giữa nồng độ NIF trong huyết tương và tỷ lệ diện tích pic NIF/GLI bằng phương pháp hồi quy tuyến tính. Kết quả xác định mối tương quan tuyến tính và độ đúng của các mẫu chuẩn (tỷ lệ nồng độ NIF xác định từ đường chuẩn so với nồng độ NIF lý thuyết có trong mẫu chuẩn sau khi pha) được trình bày ở hình 3.14 và bảng 3.45.

****

y = 0.204677x + 0.0286904

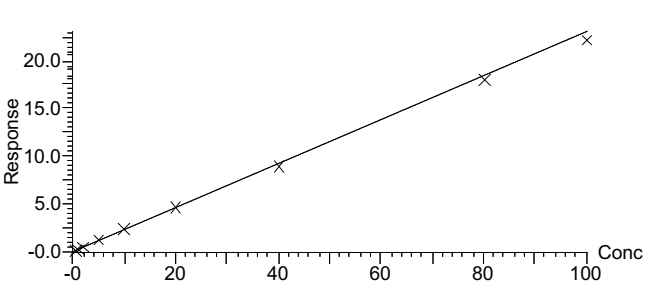
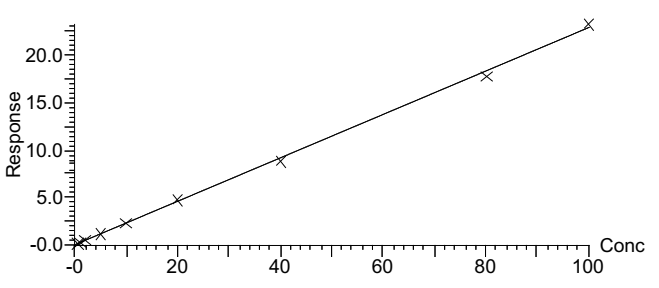
r2 = 0.999684

y = 0.19802x + 0.0198567

r2 = 0.998849

b

a



y = 0.229086x + 0.0192563

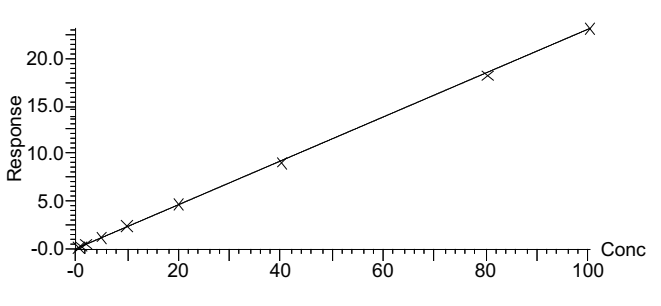
r2 = 0.998791

y = 0.22982x + 0.0299804

r2 = 0.998634

c

d



y = 0.230299x + 0.0222678

r2 = 0.999415

e

**Hình 3.14.** Đồ thị biểu diễn sự tương quan giữa nồng độ nifedipin và tỷ lệ diện tích pic NIF/GLI trong các ngày khác nhau (a \_ 1.12.2019, b \_2.12.2019, c \_ 3.12.2019, d \_ 4.12.2019, e \_ 7.12.2019)

Bảng 3.45. Độ đúng của các mẫu chuẩn

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **CC** | **Độ chính xác (% so với nồng độ lý thuyết)** | | | | |
| **CC1 (01.12.2019)** | **CC2 (02.12.2019)** | **CC3 (03.12.2019)** | **CC4 (04.12.2019)** | **CC5 (07.12.2019)** |
| **S1** | 97,1 | 99,8 | 97,0 | 98,4 | 98,1 |
| **S2** | 104,5 | 100,5 | 103,3 | 100,8 | 103,1 |
| **S3** | 102,5 | 99,2 | 103,7 | 105,2 | 100,9 |
| **S4** | 101,0 | 100,4 | 104,0 | 99,7 | 100,4 |
| **S5** | 99,0 | 102,1 | 101,3 | 98,9 | 102,6 |
| **S6** | 103,1 | 101,7 | 100,5 | 103,3 | 100,6 |
| **S7** | 96,5 | 96,9 | 96,6 | 95,6 | 96,8 |
| **S8** | 96,5 | 98,9 | 97,5 | 96,7 | 98,0 |
| **S9** | 99,9 | 100,6 | 96,1 | 101,4 | 99,6 |
| **Kết luận** | **Đạt** | **Đạt** | **Đạt** | **Đạt** | **Đạt** |

Kết quả thực nghiệm ở hình 3.14 và bảng 3.45 cho thấy, trong khoảng nồng độ từ 0,5 ng/mL đến 100 ng/mL có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ NIF và tỷ lệ diện tích pic NIF/GLI với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ NIF xác định được từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết đều đạt xấp xỉ 100% (từ 95,6 % đến 105,2 %) nằm trong giới hạn cho phép (từ 80 đến 120 % đối với nồng độ thấp nhất và từ 85 đến 115 % cho các nồng độ còn lại), do đó đáp ứng yêu cầu về đường chuẩn và khoảng tuyến tính của một phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của FDA – Mỹ và EMA.

***3.6.2.4. Xác định giới hạn định lượng dưới***

LLOQ được xác định ở nồng độ khoảng 0,5 ng/mL. Phân tích các mẫu chuẩn tự tạo ở nồng độ này, đánh giá tỷ lệ tín hiệu của chất phân tích ở nồng độ LLOQ so với tín hiệu của mẫu zero.

Bảng 3.46. Đáp ứng mẫu zero so với LLOQ

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Mẫu** | **Đáp ứng tại Rt của NIF**  **(01.12.2019)** | | **Zero/ LLOQ** | **Đáp ứng tại Rt của NIF**  **(02.12.2019)** | | **Zero/ LLOQ** | **Đáp ứng tại Rt của NIF**  **(03.12.2019)** | | **Zero/ LLOQ** |
| Zero | LLOQ | Zero | LLOQ | Zero | LLOQ |
| 1 | 306 | 1704 | 0,180 | 271 | 1709 | 0,159 | 253 | 1937 | 0,131 |
| 2 |  | 1562 | 0,196 |  | 1598 | 0,170 |  | 1974 | 0,128 |
| 3 |  | 1801 | 0,170 |  | 1829 | 0,148 |  | 1874 | 0,135 |
| 4 |  | 1843 | 0,166 |  | 1901 | 0,143 |  | 1558 | 0,162 |
| 5 |  | 1852 | 0,165 |  | 1887 | 0,144 |  | 1740 | 0,145 |
| **Kết luận** | | | **Đạt** |  | | **Đạt** |  | | **Đạt** |

Kết quả cho thấy tỷ lệ đáp ứng của mẫu zero tại thời gian lưu của chất phân tích < 20% so với mẫu LLOQ.

Ở nồng độ khoảng 0,5 ng/mL đạt yêu cầu về độ đúng (80% – 120% so với nồng độ lý thuyết) và độ chính xác khi tiến hành phân tích trên các mẫu LLOQ độc lập CV% ≤ 20%. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.47.

Bảng 3.47. Kết quả xác định giá trị LLOQ của phương pháp

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| STT | Nồng độ lý thuyết (ng/mL) | Nồng độ xác định từ đường chuẩn (ng/mL) | Độ đúng so với nồng độ lý thuyết (%) | Giá trị S/N của pic |
| 1 | 0,5 | 0,6 | 113,5 | >10 |
| 2 | 0,5 | 100,4 | >10 |
| 3 | 0,6 | 112,2 | >10 |
| 4 | 0,6 | 119,5 | >10 |
| 5 | 0,6 | 123,8 | >10 |
| TB (%) | | | 113,9 |  |
| CV (%) | | | 7,8 |  |

Kết quả cho thấy: nồng độ NIF khoảng 0,5 ng/mL đáp ứng các yêu cầu về LLOQ của một phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của FDA – Mỹ và EMA.

***3.6.2.5. Độ đúng – độ chính xác trong ngày và khác ngày***

Pha các lô mẫu LLOQ (0,5 ng/mL), LQC (1,5 ng/mL), MQC (50 ng/mL), HQC (75 ng/mL) như trong mục 2.2.6.1, mỗi loại mẫu QC gồm 05 mẫu độc lập có cùng nồng độ. Tiến hành xử lý và phân tích các lô mẫu theo phương pháp đã xây dựng. Xác định nồng NIF có trong các mẫu QC từ đường chuẩn tiến hành phân tích trong cùng điều kiện. Kết quả thẩm định độ đúng và độ chính xác trong ngày và khác ngày của phương pháp được trình bày ở các bảng 3.48 và 3.49.

Bảng 3.48. Kết quả khảo sát độ đúng, độ chính xác trong ngày

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT**  01.12.2019 | **LLOQ**  **(0,5 ng/mL)** | | **LQC**  **(1,5 ng/mL)** | | **MQC**  **( 50,2 ng/mL)** | | **HQC**  **(75,3ng/mL)** | |
| *Nồng độ (ng/mL) (a)* | *Độ đúng (%) (b)* | *Nồng độ (ng/mL) (a)* | *Độ đúng (%) (b)* | *Nồng độ (ng/mL) (a)* | *Độ đúng (%) (b)* | *Nồng độ (ng/mL) (a)* | *Độ đúng (%) (b)* |
| 1 | 0,6 | **113,6** | 1,6 | **105,7** | 43,1 | **85,8** | 71,9 | **95,5** |
| 2 | 0,5 | **100,3** | 1,6 | **109,4** | 49,6 | **98,9** | 70,9 | **94,2** |
| 3 | 0,6 | **112,2** | 1,7 | **116,2** | 51,1 | **101,8** | 67,7 | **89,9** |
| 4 | 0,6 | **119,5** | 1,6 | **108,5** | 50,0 | **99,5** | 70,9 | **94,2** |
| 5 | 0,6 | **123,9** | 1,6 | **106,6** | 48,4 | **96,5** | 71,2 | **94,6** |
| **TB** | **0,6** | **113,9** | **1,6** | **109,3** | **48,4** | **96,5** | **70,5** | **93,7** |
| **CV (%)** | **7,7** | **7,8** | **2,8** | **3,8** | **6,5** | **6,5** | **2,3** | **2,3** |

(a): Tính từ phương trình hồi qui (b): % so với nồng độ lý thuyết

Bảng 3.49.Kết quả khảo sát độ đúng, độ chính xác khác ngày

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **LLOQ(0,5 ng/mL)** | | **LQC(1,5 ng/mL)** | | **MQC(50,2 ng/mL)** | | **HQC(75,3ng/mL)** | |
| *Nồng độ (ng/mL) (a)* | *Độ đúng (%) (b)* | *Nồng độ (ng/mL) (a)* | *Độ đúng (%) (b)* | *Nồng độ (ng/mL) (a)* | *Độ đúng (%) (b)* | *Nồng độ (ng/mL) (a)* | *Độ đúng (%) (b)* |
| **Ngày I**  **01.12.2019** | 0,6 | 113,6 | 1,6 | 105,7 | 43,1 | 85,8 | 71,9 | 95,5 |
| 0,5 | 100,3 | 1,6 | 109,4 | 49,6 | 98,9 | 70,9 | 94,2 |
| 0,6 | 112,2 | 1,7 | 116,2 | 51,1 | 101,8 | 67,7 | 89,9 |
| 0,6 | 119,5 | 1,6 | 108,5 | 50,0 | 99,5 | 70,9 | 94,2 |
| 0,6 | 123,9 | 1,6 | 106,6 | 48,4 | 96,5 | 71,2 | 94,6 |
| **Ngày II**  **02.12.2019** | 0,5 | 97,7 | 1,6 | 106,6 | 46,9 | 93,4 | 74,8 | 99,3 |
| 0,5 | 100,2 | 1,5 | 100,2 | 48,1 | 95,8 | 70,7 | 93,9 |
| 0,5 | 107,7 | 1,6 | 107,8 | 49,7 | 98,9 | 68,2 | 90,6 |
| 0,5 | 107,6 | 1,7 | 110,1 | 49,5 | 98,5 | 70,5 | 93,6 |
| 0,6 | 119,0 | 1,5 | 102,4 | 48,0 | 95,6 | 70,3 | 93,4 |
| **Ngày III**  **03.12.2019** | 0,5 | 106,5 | 1,5 | 103,0 | 42,4 | 84,5 | 67,3 | 89,4 |
| 0,6 | 110,4 | 1,5 | 98,2 | 44,7 | 89,1 | 65,2 | 86,6 |
| 0,5 | 108,9 | 1,4 | 96,3 | 43,1 | 85,8 | 62,4 | 82,8 |
| 0,4 | 83,4 | 1,4 | 91,5 | 44,2 | 88,1 | 63,7 | 84,7 |
| 0,5 | 101,8 | 1,4 | 94,0 | 39,9 | 79,4 | 65,2 | 86,6 |
| **TB** | **0,5** | **107,5** | **1,5** | **103,8** | **46,6** | **92,8** | **68,7** | **91,3** |
| **CV (%)** | **11,6** | **9,4** | **6,4** | **6,5** | **7,3** | **7,3** | **5,0** | **5,0** |

Kết quả thẩm định được trình bày ở bảng 3.48 và 3.49 cho thấy ở các khoảng nồng độ thấp, trung bình và cao của khoảng tuyến tính, phương pháp đều cho độ đúng trung bình trong ngày và khác ngày nằm trong khoảng cho phép 85 - 115%, độ chính xác trong ngày và khác ngày có giá trị CV ≤ 15%; riêng mẫu LLOQ có độ đúng khoảng 107,5 % (đều nằm trong giới hạn cho phép 80 - 120%), độ chính xác trong ngày và khác ngày có giá trị CV ≤ 20%. Do đó, phương pháp có độ đúng-độ chính xác trong ngày và khác ngày đáp ứng được yêu cầu đối với phương pháp phân tích thuốc trong sinh học theo hướng dẫn của FDA – Mỹ và EMA.

***3.6.2.6. Xác định tỷ lệ thu hồi hoạt chất và chuẩn nội***

Các lô mẫu QC bao gồm LQC, MQC và HQC trong huyết tương được chiết tách theo qui trình xử lý mẫu đã xây dựng, mỗi lô mẫu gồm 5 mẫu độc lập. Song song tiến hành sắc ký các mẫu spike có nồng độ tương ứng (chứa chuẩn NIF và IS pha trong nền mẫu huyết tương đã được chiết tách). Kết quả xác định tỷ lệ thu hồi hoạt chất và IS được trình bày trong bảng 3.50.

Bảng 3.50. Kết quả khảo sát tỷ lệ thu hồi của NIF và chuẩn nội GLI

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT**  03.12.2019 | **LQC** | | **MQC** | | **HQC** | | **IS** | |
| Nền mẫu | Huyết tương | Nền mẫu | Huyết tương | Nền mẫu | Huyết tương | Nền mẫu | Huyết tương |
| 1 | 7859 | 4890 | 274210 | 127706 | 372617 | 200445 | 23180 | 13057 |
| 2 | 8707 | 5008 | 261705 | 144352 | 301436 | 194591 | 26889 | 13999 |
| 3 | 9770 | 4597 | 276276 | 129926 | 397990 | 208864 | 27317 | 13088 |
| 4 | 10042 | 4626 | 223312 | 133965 | 406915 | 195637 | 21079 | 13148 |
| 5 | 9412 | 4847 | 280293 | 115176 | 386937 | 195340 | 27717 | 12525 |
| **TB** | **9158** | **4794** | **263159** | **130225** | **373179** | **198975** | **25236** | **13163** |
| **CV (%)** | **9,6** | **3,7** | **8,9** | **8,1** | **11,3** | **3,0** | **11,7** | **4,0** |
| **Tỷ lệ thu hồi (%)** | **104,7** | | **99,0** | | **106,6** | | **104,3\*** | |
| **TB (%)** | **103,4** | | | | | |  | |

*\* Tính từ giá trị IS của mẫu MQC*

Kết quả phân tích cho thấy, phương pháp xử lý mẫu chiết NIF và GLI với dung môi cloroform cho tỷ lệ thu hồi hoạt chất và IS cao (xấp xỉ103 %), với độ lặp lại tốt (CV< 15 %). Do đó phương pháp xử lý mẫu đã được xây dựng là phù hợp để chiết tách NIF từ huyết tương chó.

***3.6.2.7. Ảnh hưởng của nền mẫu***

Chuẩn bị các mẫu LQC và HQC trong nền mẫu và trong pha động, xác định giá trị MF của NIF và IS, tỷ số MFNIF/MFISbằng cách so sánh diện tích pic NIF và IS giữa các mẫu pha trong nền mẫu với các mẫu pha trong pha động. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.51.

Bảng 3.51. Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **MFNIF** | | **MFGLI** | | **MFNIF/MFGLI** | |
| **LQC** | **HQC** | **LQC** | **HQC** | **LQC** | **HQC** |
| 1 | 0,513 | 0,536 | 0,659 | 0,594 | 0,779 | 0,903 |
| 2 | 0,564 | 0,395 | 0,658 | 0,463 | 0,858 | 0,853 |
| 3 | 0,543 | 0,490 | 0,610 | 0,576 | 0,891 | 0,851 |
| 4 | 0,497 | 0,440 | 0,554 | 0,530 | 0,897 | 0,831 |
| 5 | 0,454 | 0,507 | 0,577 | 0,499 | 0,787 | 1,015 |
| 6 | 0,805 | 0,555 | 0,726 | 0,605 | 1,109 | 0,917 |
| **TB** |  |  |  |  | **0,887** | **0,895** |
| **RSD (%)** |  |  |  |  | **13,5** | **7,5** |

Kết quả thực nghiệm ở bảng 3.51 cho thấy, tỷ số MFNIF/MFGLI ở cả hai mức nồng độ thấp và cao (LQC và HQC) có giá trị RSD lần lượt là 13,5 % và 7,5 % (≤ 15%), đáp ứng yêu cầu của một phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

***3.6.2.8. Độ nhiễm chéo***

Tiến hành xử lý mẫu theo phương pháp đã xây dựng trên 6 mẫu huyết tương trắng, 05 mẫu chuẩn pha trong huyết tương ở nồng độ LLOQ (0,5 ng/mL) và 06 mẫu chuẩn pha trong huyết tương ở nồng độ cao nhất của đường chuẩn (100ng/mL).Tiêm sắc ký các mẫu trắng sau mỗi mẫu ULOQ. Ghi sắc ký đồ và đáp ứng pic. Kết quả đánh giá độ nhiễm chéo được trình bày ở bảng 3.52.

Bảng 3.52. Kết quả đánh giá độ nhiễm chéo

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **STT** | **Mẫu trắng** | | **Mẫu LLOQ** | | **Mẫu trắng/**  **Trung bình LLOQ** | | **Kết luận** |
| **NIF** | **GLI** | **NIF** | **GLI** | **NIF** | **GLI** |
| 1 | 110 | 13 | 1374 | 10699 | 0,080 | 0,0012 | **Đạt** |
| 2 | 165 | 42 | 1374 | 10536 | 0,119 | 0,0040 | **Đạt** |
| 3 | 133 | 40 | 1377 | 10610 | 0,096 | 0,0038 | **Đạt** |
| 4 | 153 | 35 | 1319 | 10526 | 0,111 | 0,0033 | **Đạt** |
| 5 | 76 | 5 | 1461 | 10366 | 0,055 | 0,0005 | **Đạt** |
| 6 | 108 | 0 |  |  | 0,078 | 0,0000 | **Đạt** |
| **TB** |  |  | 1381 | 10547 |  |  |  |

Kết quả thực nghiệm ở bảng 3.52 cho thấy tại thời điểm trùng với thời gian lưu của NIFđáp ứng của các mẫu trắng đều nhỏ hơn 20 % đáp ứng của mẫu LLOQ và tại thời điểm trùng với thời gian lưu của IS đáp ứng của các mẫu trắng đều nhỏ hơn 5 % đáp ứng của mẫu LLOQ. Như vậy phương pháp phân tích đáp ứng yêu cầu về độ nhiễm chéo của một phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

***3.6.2.9.Độ ổn định***

*a.Độ ổn định của dung dịch chuẩn nội làm việc thời gian ngắn*

Độ ổn định của dung dịch IS làm việc trong thời gian ngắn ở nhiệt độ phòng được trình bày trong bảng 3.53.

Bảng 3.53. Độ ổn định dung dịch chuẩn nội làm việc

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **STT** | **Đáp ứng ban đầu** | **Đáp ứng sau 5 giờở nhiệt độ phòng** |
| **1** | 18916 | 18302 |
| **2** | 18388 | 18672 |
| **3** | 18412 | 18776 |
| **TB** | 18572 | 18583 |
| **CV (%)** | 1,6 | 1,3 |
| **Tỷ lệ (%) chênh lệch** | | **0,1** |

*b****.*** *Độ ổn định của mẫu phân tích trong huyết tương*

Để đảm bảo rằng kết quả phân tích sau thời gian bảo quản và giá trị lý thuyết là không có sự khác biệt, tiến hành nghiên cứu đánh giá độ ổn định theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.2.6.1*.*

*- Độ ổn định sau 3 chu kỳ đông – rã đông*

Tiến hành phân tích trên 03 mẫu ở mỗi mức nồng độ LQC và HQC theo phương pháp đã được xây dựng và thẩm định. Xác định nồng độ NIF có trong các mẫu bằng đường chuẩn tiến hành song song trong cùng điều kiện. So sánh nồng độ NIF có trong các mẫu QC bảo quản sau 3 chu kỳ đông - rã đông với nồng độ lý thuyết. Kết quả được trình bày ở bảng 3.54.

Bảng 3.54.Độ ổn định của mẫu huyết tương sau 3 chu kỳ đông – rã đông

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Phương trình hồi quy** | | | | | | **y = 0,2303 x + 0,0223 ; r = 0,9997** | | | | | |
| **Mẫu** | ***Nồng độ lý thuyết (ng/mL)*** | ***Đáp ứng NIF*** | ***Đáp ứng GLI*** | ***NIF/GLI*** | ***Nồng độ sau BQ (ng/mL)*** | ***TB nồng độ lý thuyết*** | ***TB nồng độ sau BQ*** | ***Tỷ lệ sai khác***  ***(%)*** | ***Độ đúng (%)*** | ***TB*** | **CV (%)** |
| **LQC-1** | 1,5 | 4847 | 11547 | 0,420 | 1,73 | 1,5 | 1,66 | 10,7 | 115,1 | 110,7 | 3,5 |
| **LQC-2** | 1,5 | 4441 | 11262 | 0,394 | 1,62 | 107,7 |
| **LQC-3** | 1,5 | 4287 | 10713 | 0,400 | 1,64 | 109,4 |
| **HQC-1** | 75,3 | 145195 | 10627 | 13,663 | 59,23 | 75,3 | 64,0 | -15,0 | 78,7 | 85,0 | 7,9 |
| **HQC-2** | 75,3 | 155049 | 10679 | 14,519 | 62,95 | 83,6 |
| **HQC-3** | 75,3 | 167796 | 10504 | 15,974 | 69,27 | 92,0 |

Kết quả ở bảng 3.54 cho thấy, nồng độ NIF ở cả 2 mẫu LQC và HQC bảo quản sau 3 chu kỳ đông – rã đông so với nồng độlý thuyếtkhác nhau không quá 15% và các giá trị RSD ≤ 15%. Như vậy, có thể kết luận NIF ổn định trong mẫu huyết tương khi được bảo quản sau 3 chu kỳ đông – rã đông.

*- Độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu* (độ ổn định trong thời gian ngắn)

Đánh giá độ ổn định của NIF trong mẫu huyết tương được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong vòng 5 giờ.Tiến hành phân tích trên 03 mẫu ở mỗi mức nồng độ LQC và HQC*.*Xác định nồng độ NIF có trong các mẫu bằng đường chuẩn tiến hành song song trong cùng điều kiện. So sánh nồng độ NIF trong các mẫu LQC, HQC khi để ở nhiệt độ phòng 5 giờ với nồng độ lý thuyết. Kết quảđược trình bày ở bảng 3.55.

Bảng 3.55. Độ ổn định của mẫu huyết tương ở nhiệt độ phòng trong 5 giờ

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Phương trình hồi quy** | | | | | | **y = 0,2291 x + 0,0193 ; r = 0,9994** | | | | | |
| **Mẫu** | ***Nồng độ lý thuyết (ng/mL)*** | ***Đáp ứng NIF*** | ***Đáp ứng GLI*** | ***NIF/***  ***GLI*** | ***Nồng độ sau BQ (ng/mL)*** | ***TB nồng độ lý thuyết*** | ***TB nồng độ sau BQ*** | ***Tỷ lệ sai khác***  ***(%)*** | ***Độ đúng (%)*** | ***TB*** | **CV (%)** |
| **LQC-1** | 1,5 | 3775 | 10357 | 0,364 | 1,51 | 1,5 | 1,54 | 2,6 | 100,5 | 102,6 | 5,3 |
| **LQC-2** | 1,5 | 3162 | 8048 | 0,393 | 1,63 | 108,7 |
| **LQC-3** | 1,5 | 3533 | 9866 | 0,358 | 1,48 | 98,6 |
| **HQC-1** | 75,3 | 165160 | 10953 | 15,079 | 65,74 | 75,3 | 64,0 | -15,0 | 87,3 | 85,0 | 2,7 |
| **HQC-2** | 75,3 | 165846 | 11313 | 14,659 | 63,91 | 84,9 |
| **HQC-3** | 75,3 | 152987 | 10707 | 14,289 | 62,29 | 82,7 |

Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.55 cho thấy, nồng độ NIF trong mẫu LQC và HQC sau 5 giờ bảo quản ở nhiệt độ phòng so với nồng độ lý thuyết khác không quá 15% và các giá trị RSD đều ≤ 15%. Như vậy, mẫu huyết tương ổn định ở nhiệt độ phòng trong thời gian ngắn (5 giờ).

*- Độ ổn định của mẫu sau xử lý*(độ ổn định trong autosampler)

Tiến hành phân tích trên 03 mẫu ở mỗi mức nồng độ LQC và HQC. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của mẫu sau xử lý trong auto-sampler được trình bày trong bảng 3.56.

Bảng 3.56. Độ ổn định của mẫu sau xử lý trong autosampler

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Phương trình hồi quy** | | | | | | **y = 0,2291 x + 0,0193 ; r = 0,9994** | | | | | |
| **Mẫu** | ***Nồng độ lý thuyết (ng/mL)*** | ***Đáp ứng NIF*** | ***Đáp ứng GLI*** | ***NIF/GLI*** | ***Nồng độ sau BQ (ng/mL)*** | ***TB nồng độ lý thuyết*** | ***TB nồng độ sau BQ*** | ***Tỷ lệ sai khác (%)*** | ***Độ đúng (%)*** | ***TB*** | **CV (%)** |
| **LQC-1** | 1,5 | 4639 | 11584 | 0,400 | 1,66 | 1,5 | 1,63 | 8,7 | 110,9 | 108,75 | 3,1 |
| **LQC-2** | 1,5 | 4312 | 10812 | 0,399 | 1,66 | 110,5 |
| **LQC-3** | 1,5 | 4490 | 11829 | 0,380 | 1,57 | 104,9 |
| **HQC-1** | 75,3 | 198925 | 12745 | 15,608 | 68,1 | 75,3 | 68,98 | -8,4 | 90,4 | 91,59 | 3,1 |
| **HQC-2** | 75,3 | 185505 | 11322 | 16,384 | 71,44 | 94,9 |
| **HQC-3** | 75,3 | 183759 | 11885 | 15,461 | 67,41 | 89,5 |

Kết quả ở bảng 3.56 cho thấy, nồng độ NIF trong mẫu LQC và HQC sau khi bảo quản 24 giờ trong autosampler so với nồng độ lý thuyết khác nhau không quá 15% và các giá trị RSD ≤ 15%. Do vậy, NIF ổn định trong mẫu huyết tương sau khi xử lý được bảo quản trong autosampler (ở nhiệt độ 20°C) trong vòng 24 giờ.

*- Độ ổn định dài ngày*

Nghiên cứu độ ổn định của NIF trong mẫu huyết tương được bảo quản ở nhiệt độ -60 ± 5°C sau 45 ngày. Đánh giá độ ổn định của NIF trong huyết tương trên các mẫu LQC và HQC. Xác định nồng độNIF có trong mẫu sau 45 ngày bảo quản ở nhiệt độ -60 ± 5°C theo phương pháp phân tích đã được xây dựng. Kết quả đánh giá được trình bày ở bảng 3.57.

Bảng 3.57. Độ ổn định dài ngày của mẫu huyết tương

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Phương trình hồi quy** | | | | | | **y = 0,2281 x + 0,0226 ; r = 0,9987** | | | | | |
| **Mẫu** | ***Nồng độ lý thuyết (ng/mL)*** | ***Đáp ứng NIF*** | ***Đáp ứng GLI*** | ***NIF/GLI*** | ***Nồng độ sau BQ(ng/mL)*** | ***TB nồng độ lý thuyết*** | ***TB nồng độ sau BQ*** | ***Tỷ lệ sai khác***  ***(%)*** | ***Độ đúng (%)*** | ***TB*** | **CV (%)** |
| **LQC-1** | 1,5 | 4140 | 10735 | 0,386 | 1,59 | 1,5 | 1,57 | 4,8 | 106,1 | 104,9 | 1,0 |
| **LQC-2** | 1,5 | 4395 | 11572 | 0,380 | 1,57 | 104,4 |
| **LQC-3** | 1,5 | 4345 | 11460 | 0,379 | 1,56 | 104,2 |
| **HQC-1** | 75,3 | 178366 | 11443 | 15,587 | 68,23 | 75,3 | 68,37 | -9,2 | 90,6 | 91,0 | 0,7 |
| **HQC-2** | 75,3 | 176264 | 11163 | 15,790 | 69,12 | 91,8 |
| **HQC-3** | 75,3 | 163379 | 10478 | 15,593 | 68,25 | 90,6 |

Kết quả đánh giá được trình bày ở bảng 3.57cho thấy, nồng độ NIF trong các mẫu bảo quản ở điều kiện -60 ± 5°C trong 45 ngày so với nồng độ lý thuyết khác nhau không quá 15%. Như vậy, NIF ổn định trong huyết tương khi bảo quản ở điều kiện -60 ± 5°C trong vòng 45 ngày.

Kết quả thẩm định độ tương thích hệ thống, độ đặc hiệu – chọn lọc, độ đúng, độ chính xác, đường chuẩn và khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, tỷ lệ thu hồi, ảnh hưởng của nền mẫu, độ nhiễm chéo và nghiên cứu độ ổn định cho thấy: phương pháp đã được xây dựng đáp ứng các yêu cầu của một phương pháp phân tích dược chất trong dịch sinh học theo hướng dẫn của FDA – Mỹ và EMA. Phương pháp có thể áp dụng để định lượng NIF trong huyết tương chó trong các nghiên cứu SKD các chế phẩm chứa NIF.

3.6.3. Kết quả đánh giá sinh khả dụng của viên nén nifedipin 30 mg thẩm thấu kéo – đẩy trên chó thực nghiệm

***3.6.3.1. Xác định nồng độ nifedipin trong huyết tương chó sau khi uống viên nén nifedipin 30 mg thẩm thấu kéo – đẩy và viên đối chiếu Adalat LA 30 mg.***

Tiến hành phân tích các mẫu huyết tương chó ở cả hai nhóm (uống thuốc thử và thuốc đối chiếu) theo phương pháp đã trình bày ở mục 2.2.6. Xác định nồng độ NIF có trong mẫu dựa vào đường chuẩn được tiến hành song song trong ngày. Từ kết quả xác định nồng độ, vẽ đường cong nồng độ (ng/mL) NIF trung bình trong huyết tương theo thời gian (giờ). Kết quả được trình bày ở bảng 3.58, 3.59 và hình 3.15.

Bảng 3.58. Nồng độ nifedipin trong huyết tương chó sau khi uống liều đơn thuốc thử (T) (n = 6)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Cá thể**  **Thời gian**(giờ) | **Nồng độ NIF trong huyết tương** (ng/mL) | | | | | | **TB** | **SD** |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 0 | 0,0 | 0,1 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | **0,2** | **0,4** |
| 2 | 0,0 | 3,5 | 0,8 | 1,7 | 1,7 | 0,2 | **1,3** | **1,3** |
| 4 | 15,5 | 24,1 | 1,8 | 11,2 | 13,8 | 3,4 | **11,6** | **8,2** |
| 6 | 22,2 | 32,5 | 7,1 | 16,2 | 17,1 | 7,8 | **17,2** | **9,5** |
| 8 | 15,8 | 34,2 | 10,3 | 20,7 | 16,2 | 15,8 | **18,8** | **8,2** |
| 9 | 23,4 | 31,0 | 11,8 | 21,5 | 20,5 | 11,6 | **20,0** | **7,4** |
| 10 | 22,3 | 25,9 | 16,2 | 22,6 | 22,6 | 15,5 | **20,9** | **4,1** |
| 12 | 24,7 | 30,1 | 17,8 | 19,5 | 20,5 | 13,0 | **20,9** | **5,9** |
| 14 | 25,3 | 31,5 | 17,2 | 18,1 | 18,1 | 33,5 | **24,0** | **7,3** |
| 16 | 21,8 | 25,1 | 18,3 | 20,4 | 20,4 | 38,7 | **24,1** | **7,5** |
| 24 | 22,7 | 13,1 | 8,5 | 19,3 | 15,2 | 36,3 | **19,2** | **9,7** |
| 36 | 7,0 | 0,6 | 3,2 | 11,3 | 5,7 | 26,7 | **9,1** | **9,4** |
| 48 | 2,2 | 0,2 | 0,2 | 5,6 | 0,2 | 13,1 | **3,6** | **5,1** |
| 60 | 1,0 | 0,1 | 0,2 | 2,5 | 0 | 6,5 | **1,7** | **2,5** |
| 72 | 1,2 | 0,2 | 0,2 | 1,3 | 0 | 3,2 | **1,0** | **1,2** |
| 84 | 0,3 | 0,3 | 0,1 | 0 | 0 | 1,6 | **0,4** | **0,6** |
| 96 | 0,2 | 0,2 | 0,2 | 0 | 0 | 0 | **0,1** | **0,1** |

Bảng 3.59. Nồng độ nifedipin trong huyết tương chó sau khi uống liều đơn thuốc đối chiếu (R) Adalat LA 30 mg (n = 6)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Cá thể**  **Thời gian** (giờ) | **Nồng độ NIF trong huyết tương (ng/mL)** | | | | | | **TB** | **SD** |
| 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| 0 | 0,0 | 0,2 | 0,1 | 0,0 | 0,6 | 0,0 | **0,2** | **0,2** |
| 2 | 0,0 | 0,3 | 0,3 | 0,0 | 0,1 | 1,6 | **0,4** | **0,6** |
| 4 | 1,3 | 5,0 | 5,5 | 0,0 | 10,7 | 8,3 | **5,1** | **4,1** |
| 6 | 7,3 | 30,5 | 12,7 | 0,8 | 11,2 | 15,9 | **13,1** | **10,0** |
| 8 | 21,4 | 20,8 | 13,6 | 2,8 | 12,9 | 24,9 | **16,1** | **8,0** |
| 9 | 25,1 | 23,1 | 15,0 | 4,7 | 12,9 | 30,9 | **18,6** | **9,5** |
| 10 | 24,0 | 25,7 | 19,1 | 8,0 | 13,7 | 37,2 | **21,3** | **10,2** |
| 12 | 24,9 | 26,2 | 21,2 | 20,2 | 13,4 | 39,1 | **24,2** | **8,6** |
| 14 | 22,1 | 29,5 | 18,3 | 25,2 | 21,5 | 39,7 | **26,1** | **7,7** |
| 16 | 21,3 | 30,2 | 15,7 | 22,6 | 21,5 | 37,6 | **24,8** | **7,8** |
| 24 | 22,6 | 19,5 | 6,2 | 22,6 | 14,2 | 36,7 | **20,3** | **10,2** |
| 36 | 5,0 | 2,7 | 2,0 | 9,4 | 1,7 | 22,4 | **7,2** | **8,0** |
| 48 | 0,5 | 0,9 | 0,4 | 5,3 | 0,1 | 12,5 | **3,3** | **4,9** |
| 60 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 2,4 | 0 | 7,3 | **1,7** | **2,9** |
| 72 | 0,0 | 0,2 | 0,1 | 0,7 | 0 | 5,2 | **1,0** | **2,1** |
| 84 | 0,0 | 0,1 | 0,1 | 0,0 | 0 | 2,1 | **0,4** | **0,8** |
| 96 | 0,0 | 0,2 | 0,7 | 0,0 | 0 | 0,8 | **0,3** | **0,4** |

**Hình 3.15.** Đường cong nồng độ thuốc trung bình theo thời gian của 6 cá thể chó sau khi uống liều đơn thuốc thử và thuốc đối chiếu

Kết quả ở bảng 3.58, 3.59 và hình 3.15 cho thấy: đường cong biểu diễn nồng độ thuốc – thời gian của thuốc thử và thuốc đối chiếu có các điểm lấy mẫu phân bố đều và phù hợp. Nồng độ NIF trong máu nhóm chó uống thuốc thử khá tương đồng so với chó uống thuốc đối chiếu.Tại thời điểm 4 giờ, nồng độ NIF đã định lượng được trong hầu hết các mẫu huyết tương. Từ thời điểm 4 giờ đến 16 giờ, nồng độ NIF trung bình trong huyết tương chó uống thuốc thử và thuốc chứng đều tăng dần, đạt đỉnh khoảng 14 giờ đối với thuốc đối chiếu và 16 giờ đối với thuốc thử. Từ thời điểm 16 đến 36 giờ, cả thuốc thử và thuốc đối chiếu đều thải trừ không quá nhanh, nồng độ NIF trong huyết tương chó định lượng được đều gần mức 10 ng/mL đối với cả hai thuốc. Từ thời điểm 48 giờ đến 96 giờ, nồng độ NIF trung bình trong huyết tương chó uống hai loại thuốc đối chiếu và thử gần như thải trừ hết, ngoại trừ chó 06 đến thời điểm lấy mẫu 84 giờ nồng độ NIF định lượng được trong huyết tương là 1,6 ng/mL đối với thuốc thử và 2,1 ng/mL đối với thuốc đối chiếu.

Tại mỗi thời điểm lấy mẫu, có sự dao động khá lớn giữa các cá thể cả khi uống chế phẩm thử cũng như chế phẩm đối chiếu.

Cmax nằm trong khoảng từ 18,3– 38,7 ng/mL với thuốc thử (T) và 21,2–39,7 ng/mL với thuốc chứng (R), đều nhỏ hơn nồng độ ULOQ (100 ng/mL) của đường chuẩn.

Hầu hết các mẫu huyết tương của chó uống thuốc đều có nồng độ NIFphân bố trong khoảng tuyến tính khảo sát. Như vậy, phương pháp đã xây dựng là phù hợp với thực tế trong thử nghiệm đánh giá SKD.

***3.6.3.2. Phân tích dược động học và so sánh sinh khả dụng của viên nén nifedipin 30 mg thẩm thấu kéo – đẩy với viên đối chiếu Adalat LA 30 mg.***

*a. Xác định các thông số dược động học*

Từ kết quả định lượng nồng độ NIF trong huyết tương chó (bảng 3.58, 3.59) và dựa vào phương pháp xác định các thông số DĐH đã ghi ở phần 2.2.6.2., xác định được một số thông số DĐH cơ bản của NIF. Kết quả được trình bày ở bảng 3.60 và bảng 3.61.

Bảng 3.60. Các thông sốdược động học của chế phẩm thử (n=6)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Chó** | **Ke** | **t1/2**  **(giờ)** | **MRT**  **(giờ)** | **Cmax (ng/mL)** | **Tmax (giờ)** | **AUC0-96**  **(giờ.ng/mL) (1)** | **AUC0-∞**  **(giờ.ng/mL) (2)** | **(1)/(2) %** |
| **1** | 0,062 | 11,26 | 22,24 | 25,30 | 14,0 | 733,55 | 736,80 | 99,56 |
| **2** | 0,072 | 9,65 | 15,17 | 34,20 | 8,0 | 639,15 | 641,94 | 99,57 |
| **3** | 0,063 | 11,02 | 19,90 | 18,30 | 16,0 | 366,45 | 369,63 | 99,14 |
| **4** | 0,045 | 15,44 | 24,92 | 22,60 | 10,0 | 755,45 | 784,42 | 96,31 |
| **5** | 0,110 | 6,30 | 18,48 | 22,60 | 10,0 | 544,70 | 546,52 | 99,67 |
| **6** | 0,049 | 14,09 | 30,12 | 38,70 | 16,0 | 1334,45 | 1366,98 | 97,62 |
| **TB** | 0,07 | 11,29 | 21,80 | 26,95 | 12,33 | 728,96 | 741,05 | 98,64 |
| **SD** | 0,02 | 3,25 | 5,25 | 7,82 | 3,44 | 328,87 | 340,39 | 1,38 |
| **RSD** | 35,02 | 28,77 | 24,07 | 29,03 | 27,93 | 45,11 | 45,93 | 1,40 |

Bảng 3.61. Các thông sốdược động học của chế phẩm đối chiếu (n=6)

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Chó** | **Ke** | **T1/2 (giờ)** | **MRT**  **(giờ)** | **Cmax (ng/mL)** | **Tmax**  **(giờ)** | **AUC0-96**  **(giờ.ng/mL) (1)** | **AUC0-∞**  **(giờ.ng/mL) (2)** | **(1)/(2) %** |
| **1** | 0,092 | 7,53 | 19,74 | 25,10 | 9,0 | 599,90 | 605,33 | 99,10 |
| **2** | 0,073 | 9,47 | 18,27 | 30,50 | 6,0 | 671,25 | 673,98 | 99,59 |
| **3** | 0,062 | 11,17 | 19,77 | 21,20 | 12,0 | 357.25 | 368,53 | 96,94 |
| **4** | 0,060 | 11,65 | 26,94 | 25,20 | 14,0 | 661,70 | 673,47 | 98,25 |
| **5** | 0,158 | 4,39 | 17,48 | 21,50 | 14,0 | 437,70 | 438,33 | 99,86 |
| **6** | 0,046 | 15,23 | 30,14 | 39,70 | 14,0 | 1487,05 | 1504,63 | 98,83 |
| **TB** | 0,08 | 9,91 | 22,06 | 27,20 | 11,50 | 702,48 | 710,71 | 98,76 |
| **SD** | 0,04 | 3,72 | 5,20 | 6,99 | 3,33 | 404,48 | 408.76 | 1,06 |
| **RSD** | 49,51 | 37,56 | 23,57 | 25,68 | 28,97 | 57,58 | 57,51 | 1,07 |

Kết quả ở bảng 3.60 và 3.61 cho thấy:

Giá trị Cmaxtrung bình trong huyết tương chó khi uống thuốc thử là 26,95 ± 7,82 (ng/mL) và thuốc đối chiếu là 27,2 ± 6,99 (ng/mL). Cmaxkhá dao động giữa nhóm chó uống thuốc thử (RSD = 29,0 %) và nhóm chó uống thuốc đối chiếu (RSD = 25,7 %).

Giá trị AUC0-96trung bình trong huyết tương chó khi uống thuốc thử là 729,0± 328,9 (ng.h/mL), khi uống thuốc đối chiếu là 702,5 ± 404,5 (ng.h/mL). Như vậy, giá trị AUC0-96có sự dao động. Giá trị RSD của AUC0-96 của nhóm uống thuốc thử và thuốc đối chiếu lần lượt là 45,1 % và 57,6 %. Tỷ lệ (%) giữa AUC0-96/ AUC0-∞ trung bình đạt trên 80%, cụ thể: khi uống thuốc thử và thuốc đối chiếu đều đạt 98,9 %. Như vậy, thời gian lấy mẫu cuối cùng (96 giờ) đã thoả mãn yêu cầu về đánh SKD theo quy định của FDA.

Thời gian trung bình để đạt nồng độ cực đại trong huyết tương chó Tmax trung bình khi uống thuốc thử và thuốc đối chiếu lần lượt là 12,3± 3,4giờ và 11,5± 3,3giờ. Tmax của thuốc thử và thuốc đối chiếu đều dao động lần lượt dao động từ 8 đến 16 giờ và từ 6 đến 14 giờ.

*b.Phân tích thống kê và so sánh sinh khả dụng của viên nén nifedipin 30 mg thẩm thấu kéo – đẩy với viên đối chiếu Adalat LA 30mg.*

Từ kết quả xác định các thông số DĐH của thuốc thử và thuốc đối chiếu ở bảng 3.60 và 3.61, đánh giá SKD viên nén GPKD chứa NIF theo qui định của FDA và DĐVN V. So sánh giá trị Cmax, AUC0-∞, MRT và xác định khoảng tin cậy 90 % (CI) của tỷ lệ thuốc thử so với thuốc đối chiếu, tính trên số liệu đã chuyển logarit; sử dụng phần mềm Microsoft Excel.

Kết quả phân tích phương sai và xác định khoảng tin cậy CI 90% của tỷ số Cmax, AUC0-∞, MRTđược trình bày ở bảng 3.62, 3.63 và 3.64.

-*Phân tích phương sai và xác định khoảng tin cậy 90% của tỷ số Cmax*

Bảng 3.62. Phân tích phương sai với biến phụ thuộc là ln[Cmax]

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nguồn biến thiên** | **Bậc tự do** | **Tổng bình phương** | **Trung bình bình phương** | **F** | **P** |
| Trình tự thử | 1 | 0,0061 | 0,0061 | 0,0377 | 0,8554 |
| Chó (cá thể) | 4 | 0,6485 | 0,1621 | 32,6699 | 0,0026 |
| Thuốc | 1 | 0,0010 | 0,0010 | 0,1995 | 0,6782 |
| Giai đoạn | 1 | 0,0040 | 0,0040 | 0,8054 | 0,4202 |
| Sai số | 4 | 0,0199 | 0,0050 |  |  |
| Tổng | 11 | 0,6795 |  |  |  |

Kết quả ở bảng 3.62 cho thấy, Ptrình tự thử, Pthuốc, Pgiai đoạn đều lớn hơn 0,05 chứng tỏ ảnh hưởng của sự khác nhau giữa trình tự thử, chế phẩm thử (mẫu thử và đối chiếu), giai đoạn thử đến Cmax không có ý nghĩa thống kê.

Từ kết quả xác định giá trị trung bình bình phương của sai số (0,0050) và bậc tự do của sai số (4), xác định được khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ Cmax giữa hai mẫu T và R:

Vậy giới hạn dưới của khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ giá trị Cmax giữa thuốc thử và thuốc đối chiếu là 0,9004 và giới hạn trên là 1,0709.Khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ Cmax là 90,04% -107,09% nằm trong giới hạn 80 – 125 %. Hai giá trị Cmaxcủa thuốc thử và thuốc đối chiếu tương đương nhau theo qui định của DĐVN V.

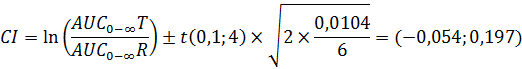
-*Phân tích phương sai và xác định khoảng tin cậy 90 % của tỷ số ln[AUC0-∞]*

Bảng 3.63. Phân tích phương sai với biến phụ thuộc là ln[AUC0-∞]

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nguồn biến thiên** | **Bậc tự do** | **Tổng bình phương** | **Trung bình bình phương** | **F** | **P** |
| Trình tự thử | 1 | 0,0569 | 0,0569 | 0,1127 | 0,7540 |
| Chó (cá thể) | 4 | 2,0186 | 0,5046 | 48,3222 | 0,0012 |
| Thuốc | 1 | 0,0153 | 0,0153 | 1,4617 | 0,2932 |
| Giai đoạn | 1 | 0,0041 | 0,0041 | 0,3933 | 0,5646 |
| Sai số | 4 | 0,0418 | 0,0104 |  |  |
| Tổng | 11 | 2,1366 |  |  |  |

Kết quả ở bảng 3.63 cho thấy, Ptrình tự thử, Pthuốc, Pgiai đoạn đều lớn hơn 0,05 chứng tỏ ảnh hưởng của sự khác nhau giữa trình tự thử, chế phẩm thử (mẫu thử và đối chiếu), giai đoạn thử đến AUC0-∞ không có ý nghĩa thống kê.

Từ kết quả xác định giá trị trung bình bình phương của sai số (0,0104) và bậc tự do của sai số (4), xác định được khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ AUC0-∞ giữa hai mẫu T và R:



Vậy giới hạn dưới của khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ giá trị AUC0-∞ giữa thuốc thử và thuốc đối chiếu là 0,9470 và giới hạn trên là 1,2179.Khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ AUC0-∞ là 94,70% - 121,79% nằm trong giới hạn 80 – 125 %. Hai giá trị AUC0-∞của thuốc thử và thuốc đối chiếu tương đương nhau theo qui định của DĐVN V.

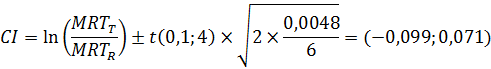
-*Phân tích phương sai và xác định khoảng tin cậy 90 % của tỷ số ln[MRT]*

Bảng 3.64. Phân tích phương sai với biến phụ thuộc là ln[MRT]

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Nguồn biến thiên** | **Bậc tự do** | **Tổng bình phương** | **Trung bình bình phương** | **F** | **P** |
| Trình tự thử | 1 | 0,0766 | 0,0766 | 0,7122 | 0,4462 |
| Chó (cá thể) | 4 | 0,4304 | 0,1076 | 22,4200 | 0,0053 |
| Thuốc | 1 | 0,0006 | 0,0006 | 0,1196 | 0,7469 |
| Giai đoạn | 1 | 0,0092 | 0,0092 | 1,9253 | 0,2376 |
| Sai số | 4 | 0,0192 | 0,0048 |  |  |
| Tổng | 11 | 0,5361 |  |  |  |

Kết quả ở bảng 3.64 cho thấy, Ptrình tự thử, Pthuốc, Pgiai đoạn đều lớn hơn 0,05 chứng tỏ ảnh hưởng của sự khác nhau giữa trình tự thử, chế phẩm thử (mẫu thử và đối chiếu), giai đoạn thử đến MRT không có ý nghĩa thống kê.

Từ kết quả xác định giá trị trung bình bình phương của sai số (0,0048) và bậc tự do của sai số (4), xác định được khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ MRT giữa hai mẫu T và R:



Vậy giới hạn dưới của khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ giá trị MRT giữa thuốc thử và thuốc đối chiếu là 0,9056 và giới hạn trên là 1,0741.Khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ MRT là 90,56% -107,41% nằm trong giới hạn 80 – 125 %. Hai giá trị MRT của thuốc thử và thuốc đối chiếu tương đương nhau theo qui định của DĐVN V.

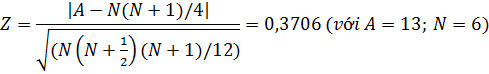
Kết quả ở bảng 3.62, bảng 3.63 và bảng 3.64 cho thấy khoảng tin cậy 90 % của thuốc thử so với thuốc đối chiếu nằm trong giới hạn 80,00 – 125 % đối với giá trị Cmax, AUC0-∞ và MRT trung bình. Do đó, các giá trị Cmax, AUC0-∞ và MRT của thuốc thử và thuốc đối chiếu là tương đương nhau hay nói cách khác là sự khác nhau của các giá trị trên giữa hai chế phẩm không có ý nghĩa thống kê với khoảng tin cậy 90%. Điều này có nghĩa là khi uống viên nifedipin 30 mg thẩm thấu kéo – đẩy và viên đối chiếu Adalat LA 30 mg ở điều kiện đói, đơn liều, nồng độ NIF cực đại trong máu, tốc độ và mức độ hấp thu NIF vào máu và thời gian lưu trú trung bình là tương đương nhau.

- *So sánh giá trị Tmax của thuốc thử và thuốc đối chiếu theo phương pháp thống kê phi tham số (Wilcoxon Signed Rank Test)*. Kết quả được trình bày ở bảng 3.65.

Bảng 3.65. So sánh giá trị Tmax theo phương pháp thống kê phi tham số

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **Chó** | **Tmax (giờ)** | | **Chênh lệch** | | **Thứ tự** | |
| Thuốc thử | Thuốc đối chiếu | (+) | (-) | (+) | (-) |
| 1 | 14,0 | 9,0 | 5,0 |  | 1,5 |  |
| 2 | 8,0 | 6,0 | 2,0 |  | 1,5 |  |
| 3 | 16,0 | 12,0 | 4,0 |  |  | 4 |
| 4 | 10,0 | 14,0 |  | 4,0 |  | 4 |
| 5 | 10,0 | 14,0 |  | 4,0 | 4 |  |
| 6 | 16,0 | 14,0 | 2,0 |  | 6 |  |
| TB | **12,3** | **11,5** |  | **Tổng** | **13** | **8** |
| SD | **3,4** | **3,3** |  |  |  |  |

Kết quả ở bảng 3.65 cho thấy: giá trị tra bảng (values leading to significance for the Wilcoxon Signed Rank Test) ứng với cặp sai khác là n = 6 là: 0 ở mức tin cậy 95%. Tổng thứ tự xếp hạng dương và âm đều lớn hơn giá trị tra bảng.



Area = 0,6554 (tra bảng: Cumulative Normal Distribution[[127](#_ENREF_127)])

P – area = 1 – 0,6554= 0,3446 lớn hơn 0,05

Như vậy, giá trị Tmax của thuốc thử và thuốc đối chiếu khác nhau không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05.

Kết quả phân tích phương sai và xác định khoảng tin cậy 90 % cho thấy giá trị Cmax, AUC0-∞ và MRT của thuốc thử và thuốc đối chiếu tương đương nhau, giá trị Tmax khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Như vậy, viên NIF 30 mg thẩm thấu kéo – đẩycó SKD tương đương với viên đối chiếu Adalat LA 30 mg trên chó thực nghiệm theo quy định của FDA – Mỹ và DĐVN V.

CHƯƠNG 4

BÀN LUẬN

4.1. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ

4.1.1. Lựa chọn dạng giải phóng kéo dài

NIF là thuốc điều trị tăng huyết áp thuộc nhóm 1,4-dihydropyridin, hiện nay đang được sử dụng rộng rãi. Tuy nhiên, NIF có độ tan trong nước kém (thuộc nhóm II trong hệ thống phân loại sinh dược học), nửa đời thải trừ ngắn khoảng 2 – 4 giờ, bị chuyển hóa qua gan lần đầu dẫn tới SKD không cao, số lần dùng thuốc trong 1 ngày lớn, gây bất tiện và giảm khả năng tuân thủ liều dùng của bệnh nhân, gây ảnh hưởng tới kết quả điều trị. Đòi hỏi cần phải thiết kế chế phẩm chứa NIF dưới dạng bào chế GPKD giúp làm giảm số lần dùng thuốc, duy trì nồng độ thuốc ổn định trong máu, tăng SKD…

Hiện nay, trên thế giới các chế phẩm chứa NIF dưới dạng bào chế GPKD có nhiều loại với các cơ chế khác nhau như: Adalat LA, Adalat retard, Avensa LA. Trong đó, viên dạng cốt GPKD chứa NIF có cấu trúc đơn giản, dễ triển khai trong sản xuất. Tuy nhiên, dạng này có nhiều TDKMM nên hiện nay ít được chỉ định trong điều trị. Trong khi đó, viên bơm thẩm thấu là dạng bào chế có nhiều ưu điểm vượt trội so với viên dạng cốt như: dễ đạt động học bậc 0, giải phóng DC không phụ thuộc vào pH, enzym, nhu động ruột....

Trên thế giới hiện nay đã và đang phát triển nhiều dạng bơm thẩm thấu khác nhau, trong đó nổi bật là hệ EOP và PPOP. Trong đó, EOP là một hệ đơn giản, có đặc điểm giải phóng chỉ thích hợp để phân phối các DCcó độ tan tương đối lớn[[52](#_ENREF_52)]. Trên thực tế, có rất nhiều các DC ít tan hoặc hầu như không tan trong nước. NIF là một DC không tan trong nước, vì vậy không thích hợp để bào chế dưới dạng EOP. Hạn chế này được khắc phục bằng cách phát triển hệ PPOP. PPOP là một dạng cải tiến của EOP, có thể phân phối cả DC dễ tan và ít tan trong nước với tốc độ hằng định. Ngược lại với thiết kế viên nhân một lớp trong hệ EOP, hệ PPOP gồm một viên nhân hai lớp có thành phần khác nhau: lớp chứa DC bao gồm DC, polymer phân tán DC, TD tạo ASTT và các TD khác; lớp đẩy gồm polymer trương nở, TD tạo ASTT, TD tạo màu để phân biệt hai mặt viên trong quá trình tạo miệng giải phóng DC và các TD viên thích hợp khác. Hai lớp này được liên kết với nhau nhờ lực nén để tạo thành một viên nhân hai lớp. Viên nhân sau đó được bao bằng màng bán thấm và tạo miệng giải phóng trên bề mặt lớp chứa DC. Thiết kế phức tạp này thường bị coi là một nhược điểm đối với sự phát triển và sản xuất hệ PPOP. Tuy vậy, với thiết kế đặc biệt này của PPOP có thể đảm bảo phân phối thuốc ổn định và linh hoạt, đặc biệt đối với DC liều thấp [[128](#_ENREF_128)]. Với đặc điểm giải phóng từ hệ PPOP cho phép DC được phân phối độc lập với các đặc tính của DC và điều kiện sinh lý bên ngoài. Do đó, hầu hết các DC cả dễ tan lẫn ít tan trong nước, đặc biệt là các DC ít tan đều thích hợp để phát triển dưới dạng bơm thẩm thấu loại này.

Hệ PPOP đã được phát triển thành công và đưa ra thị trường để kéo dài giải phóng các DC ít tan dùng trong các chỉ định khác nhau như tăng huyết áp, tiểu đường, hen suyễn. Trong điều trị các bệnh mạn tính, hệ PPOP đã được chứng minh là mô hình phân phối thuốc giảm được sự tương tác với thức ăn, cho phép dùng một lần mỗi ngày, giúp cải thiện khả năng dung nạp và sự tuân thủ điều trị của bệnh nhân.

Hệ PPOP được nghiên cứu và đưa ra thị trường thời kỳ đầu (năm 1982) thường chế tạo một vách ngăn động giữa hai lớp để tránh sự pha trộn giữa các thành phần của hai lớp trong quá trình hút nước và giải phóng DC. Ví dụ: biệt dược Adalat LA. Sau đó, do sự ra đời của các polymer thân nước với KLPT khác nhau, mức độ trương nở khác nhau nên có thể sử dụng thích hợp cho từng lớp, việc sử dụng vách ngăn không còn cần thiết nữa. Lớp chứa DC thường sử dụng PEO có KLPT thấp, quá trình thấm nước sẽ trộn với DC dưới dạng gel đặc. Lớp đẩy thường chứa PEO có KLPT lớn, trương nở dần và đẩy lớp DC ra môi trường dưới dạng hỗn dịch.

Một ưu điểm của hệ bơm thẩm thấu là DC được giải phóng theo động học bậc không. Đây là một đặc điểm rất khó đạt được với các dạng viên sử dụng nguyên lý kiểm soát giải phóng DC khác. Với hệ EOP, DC cũng giải phóng theo động học bậc không. Tuy nhiên, do trong quá trình giải phóng, lượng TD tạo ASTT sẽ giảm dần dẫn đến tốc độ giải phóng DC cũng giảm theo. Vì thế, với loại viên thẩm thấu này, tốc độ giải phóng DC sẽ giảm dần theo thời gian và DC không được giải phóng triệt để khỏi viên. Nhược điểm này đã được khắc phục ở viên PPOP. Trong quá trình giải phóng DC, ASTT cũng giảm dần, tuy nhiên TD trương nở trong lớp đẩy sẽ tăng thể tích, làm tăng ASTT trong viên, áp suất tăng đó bù vào sự giảm ASTT và duy trì áp suất trong viên không thay đổi, giúp duy trì tốc độ giải phóng DC trong viên hằng định đến khi giải phóng hết DC. Nhờ đặc điểm này nên viên PPOP kiểm soát giải phóng DC một cách chính xác hơn.

Động học bậc không của viên PPOP là ưu điểm lớn, tuy nhiên nó cũng có nhược điểm. Khác với động học giải phóng Higuchi có lượng DC giải phóng cao hơn ở thời điểm ban đầu và vì thế thuận lợi hơn để tăng nồng độ DC trong máu nhanh đạt nồng độ tối thiểu cho tác dụng,giải phóng thuốc từ viên PPOP được đặc trưng bởi pha tiềm tàng. Theo nghiên cứu của Malaterre V. và CS [[128](#_ENREF_128)], Tlag bị ảnh hưởng bởi diện tích bề mặt viên, tỷ lệ TD tạo ASTT và KLPT của polymer trong lớp DC. Do hàm lượng DC giải phóng thấp, đặc biệt trong những giờ giải phóng đầu tiên nên trong quá trình nghiên cứu bào chế, định lượng DC trong môi trường hòa tan bằng phương pháp đo quang gặp khó khăn.

Trong nghiên cứu này, đề tài luận án đã lựa chọn sử dụng Adalat LA làm viên đối chiếu. Dựa vào kết quả thử hòa tan viên đối chiếu cho thấy viên đối chiếu không dùng biện pháp đưa một phần DC ra lớp vỏ bao ngoài để tăng lượng DC giải phóng trong giờ đầu như một số chế phẩm hay áp dụng.

Với các đặc điểm được phân tích như trên, đề tài đã lựa chọn thiết kế viên NIF GPKD theo cơ chế bơm thẩm thấu kéo – đẩy phù hợp với khả năng và điều kiện của cơ sở nghiên cứu. Về thời gian kiểm soát giải phóng DC, đề tài lựa chọn thiết kế viên NIF GPKD 24 giờ.

4.1.2. Xây dựng công thức bào chế

***4.1.2.1. Lựa chọn thành phần công thức viên cơ bản***

Viên PPOP là một loại viên EOP cải tiến thường được thiết kế dưới dạng viên hai lớp, trong đó có 1 lớp đẩy và 1 lớp DC với các thành phần cơ bản như sau:

- Lớp DC: chứa DC, polymer phân tán DC, TD tạo ASTT và các TD khác (chiếm 60-80% trọng lượng viên).

- Lớp đẩy: gồm polymer trương nở, TD tạo ASTT, TD tạo màu và các TD khác (thường chiếm 20-40% trọng lượng viên).

Viên sau khi dập được bao màng bán thấm cấu tạo bởi polymer không tan trong nước, kết hợp với chất hóa dẻo để điều chỉnh tốc độ thấm nước và sau đó được khoan lỗ giải phóng DC ở bề mặt lớp DC.

*a. Tá dược tạo áp suất thẩm thấu*

Trong viên PPOP, các yếu tố thuộc về công thức viên nhân đóng vai trò quan trọng trong giải phóng DC, bao gồm: hàm lượng DC, vị trí và tỷ lệ TD thẩm thấu, loại và lượng của các polymer trương nở (PEO) trong cả hai lớp [[48](#_ENREF_48)], [[57](#_ENREF_57)], [[129](#_ENREF_129)]. Theo cơ chế giải phóng của viên PPOP, do chênh lệch ASTT giữa trong và ngoài màng bán thấm, nước được kéo vào trong viên. DC được phân tán trong dạng gel của polymer lớp DC và được đẩy ra ngoài khi polymer lớp đẩy trương nở tạo áp lực lên lớp DC. Do đó, thành phần không thể thiếu trong viên PPOP là TD tạo ASTT, TD phân tán và TD trương nở.TD tạo ASTT có thể là các muối tan trong nước của acid vô cơ, acid hữu cơ, carbohydrat, amino acid tan trong nước, tuy nhiên, TD tạo ASTT được sử dụng phổ biến nhất là natri clorid. Một số nghiên cứu cho thấy rằng, khi sử dụng glucose và lactose làm TD tạo ASTT, đặc tính giải phóng của viên PPOP không tuân theo động học bậc không, trong khi đó nếu sử dụng natri clorid thì đảm bảo giải phóng DC ổn định và kéo dài [[58](#_ENREF_58)], [[130](#_ENREF_130)].Hơn nữa, natri clorid là TD rẻ tiền, dễ kiếm do đó, đề tài luận án đã lựa chọn natri clorid làm TD tạo ASTT. Trong công thức còn phối hợp với lactose là TD độn được dùng khá phổ biến trong viên nén và cũng là một TD tạo ASTT, tạo được liên kết tốt, dễ tạo hạt, dễ sấy khô, dễ đảm bảo độ bền cơ học của viên[[131](#_ENREF_131)]. Sự kết hợp giữa natri clorid và lactose giúp tạo ASTT và trương nở dẫn đến chênh lệch áp suất trong và ngoài màng luôn hằng định. Vì vậy, khả năng giải phóng DC của các mẫu viên luôn hằng định và tuyến tính theo thời gian.

*b. Tá dược trương nở*

Đối với TD trương nở, một số nghiên cứu đã chỉ ra rằng việc sử dụng các TD có tính chất trương nở quá mạnh có thể dẫn đến hiện tượng nứt vỡ màng bao trong quá trình sử dụng. Trong nghiên cứu của tác giả Vũ Thị Thanh Huyền [[76](#_ENREF_76)] có tiến hành khảo sát sử dụng croscarmellose là một TD siêu rã có khả năng hút nước và trương nở mạnh. Kết quả cho thấy các viên thu được đều bị vỡ màng bao trong quá trình thử hòa tan (sau 3-4 giờ thử). TD trương nở sử dụng trong viên PPOP có thể là Carbopol, HPMC, NaCMC, PVP K30, PEO. Tuy nhiên, PEO thường được sử dụng nhất trong thiết kế viên PPOP do động học hydrat hóa đặc biệt, khả năng trương nở cao, đặc tính trơn chảy và chịu nén tốt của chúng [[132](#_ENREF_132)]. Hơn nữa, bản thân DC sử dụng trong đề tài luận án là NIF có độ tan kém, do đó, việc sử dụng PEO trong viên PPOP là một lựa chọn giá trị với 2 vai trò: thứ nhất là để điều chỉnh đặc tính hòa tan DC cũng như giúp phân tán lớp DC tốt hơn ngay cả khi hàm lượng DC cao mà không làm mất đi động học giải phóng bậc không lẫn sự phân phối độc lập với pH và điều kiện thủy động học [[57](#_ENREF_57)]. Thứ hai là trương nở tạo áp lực đẩy hỗn dịch keo DC thoát ra ngoài qua miệng giải phóng. Tỷ lệ PEO thích hợp sẽ giúp tăng tốc độ giải phóng và duy trì giải phóng DC theo động học bậc không [[48](#_ENREF_48)], [[53](#_ENREF_53)]. Ngoài ra, PEO có khả năng trơn chảy và chịu nén tốt nên rất thuận lợi cho quá trình trộn, tạo hạt và dập viên khi tiến hành bào chế. Hơn nữa, PEO dạng thương mại với nhiều loại KLPT tương ứng với khả năng trương nở khác nhau khá phong phú trên thị trường để dễ dàng lựa chọn.PEO sử dụng trong lớp DC với vai trò phân tán tạo hỗn dịch keo lớp DC, do vậy cần sử dụng loại PEO có độ nhớt thấp tới trung bình, đề tài luận án đã lựa chọn các loại PEO có KLPT từ 100,000 – 600,000 Dal (PEO N10, PEO N750, PEO N80) để tiến hành khảo sát. Bên cạnh đó, PEO trong lớp đẩy có vai trò trương nở tạo áp lực đẩy hỗn dịch keo lớp DC ra ngoài qua miệng GP, yêu cầu sử dụng PEO có khả năng trương nở mạnh, đề tài đã tiến hành khảo sát lựa chọncác loại PEO có KLPT lớn trong khoảng 3,000,000 – 8,000,000 Dal (PEO 301, PEO 303, PEO Coagulant).

*c. Tá dược tạo màu*

Việc sử dụng TD tạo màu trong viên PPOP nhằm mục đích phân biệt hai lớp trong viên nhân. Điều đó là cần thiết trong quá trình bào chế cũng như trong quá trình khoan miệng giải phóng DC. TD tạo màu phải đảm bảo không tan để không làm ảnh hưởng đến quá trình hòa tan và kết quả định lượng. Do đó, đề tài luận án đã lựa chọn TD tạo màu là oxid sắt đỏ.Đây là loại TD tạo màu được sử dụng rất phổ biến trong viên PPOP [[53](#_ENREF_53)], [[129](#_ENREF_129)].

*d. Phương pháp dập viên*

Viên thẩm thấu kéo – đẩy thông thường được thiết kế dưới dạng viên hai lớp, do đó cần phải sử dụng phương pháp dập viên hai lớp.Để bào chế viên nhân hai lớp cho viên PPOP có thể lựa chọn phương pháp dậpthẳng hoặc phương pháp tạo hạt ướt tùy thuộc vào mục tiêu giải phóng thuốc, điều kiện trang thiết bị và đặc tính lý hóa của DC và TD sử dụng. Với mục tiêu bào chế viên NIF GPKD 24 giờ, đề tài luận án đã lựa chọn phương pháp tạo hạt ướt để bào chế viên nhân 2 lớp. Phương pháp này cũng được sử dụng rất phổ biến để bào chế viên PPOP GPKD 24 giờ [[40](#_ENREF_40)], [[53](#_ENREF_53)], [[133](#_ENREF_133)]. Phương pháp này có ưu điểm là các đặc tính vật lý của hạt và viên tạo thành dễ đạt được theo yêu cầu giải phóng DC, viên tạo thành bóng, đẹp. Tuy nhiên, nhược điểm là công đoạn sản xuất phức tạp hơn phương pháp dập thẳng, trang thiết bị sử dụng lớn và nhiều khi triển khai ở quy mô lớn, thời gian sản xuất đòi hỏi nhiều hơn. DC sử dụng là NIF ít bị ảnh hưởng bởi ẩm, tuy nhiên các TD trong công thức là lactose và PEO lại bị ảnh hưởng bởi ẩm, dẫn đến ảnh hưởng đến lực nén của viên. Do đó, trong quá trình bào chế cần phải kiểm soát độ ẩm môi trường. PEO có khả năng trơn chảy và chịu nén tốt, dễ trộn nên thuận lợi cho quá trình tạo hạt. Tuy nhiên, PEO sử dụng trong lớp đẩy thường là loại có tính trương nở cao nên khi bào chế cần thao tác nhanh để đảm bảo quá trình nhào ẩm và xát hạt đảm bảo yêu cầu.

Quá trình khảo sát xây dựng công thức viên NIF GPKD, đề tài luận án lựa chọn sử dụng máy dập viên tâm sai nên quá trình dập viên hai lớp phải trải qua 2 bước: cho lớp DC vào cối trước, nén sơ bộ lớp DC, sau đó cho lớp đẩy vào cối và dập hoàn tất. Với thao tác dập như vậy sẽ mất nhiều thời gian hơn, tuy nhiên, sẽ tiết kiệm được lượng nguyên liệu, TD sử dụng khi số lượng công thức viên cần khảo sát nhiều và dễ dàng điều chỉnh lực nén phù hợp với từng công thức viên. Phương pháp dập viên này chỉ phù hợp khi áp dụng ở quy mô phòng thí nghiệm.Khi dập viên với số lượng viên nhiều ở quy mô pilot thì phải sử dụng máy dập viên hai lớp quay tròn.

*e. Màng bán thấm*

\* Lựa chọn polymer tạo màng: thành phần màng bao là thông số quan trọng để kiểm soát tốc độ giải phóng DC. CA là polymer được sử dụng rộng rãi để bao màng kiểm soát tốc độ cho hệ thẩm thấu. Màng CA không tan và có tính bán thấm nên trong thành phần dịch bao thường cho thêm chất hóa dẻo, chất chống dính. PEG là polymer tan trong nước, có thể được thêm vào dung dịch CA với hai chức năng vừa là chất hóa dẻo vừa là chất tạo lỗ [[129](#_ENREF_129)], [[130](#_ENREF_130)], [[128](#_ENREF_128)]. Tỷ lệ PEG trong lớp màng bao ảnh hưởng nhiều đến giải phóng thuốc trong khi đó, loại PEG không ảnh hưởng nhiều [[75](#_ENREF_75)].

Hiện nay, trên thị trường có sản phẩm với tên thương mại Opadry®cellulose acetat của hãng Colorcon là sự kết hợp giữa polymer CA và PEG 3350 được trộn sẵn theo tỷ lệ 9:1 với các ưu điểm: dễ hòa tan trong dung môi aceton, tiện dùng do không phải phối hợp thêm chất hóa dẻo và chất chống dính. Tuy nhiên, đề tài luận án lựa chọn sử dụng polymer CA kết hợp thêm vào chất hóa dẻo PEG 4000 trong thành phần dịch bao, tiến hành khảo sát theo các tỷ lệ 5%, 10%, 20%, 30% (KL/KL, so với CA). Việc lựa chọn này vừa đảm bảo tính kinh tế, vừa có thể lựa chọn tỷ lệ PEG và CA theo đúng yêu cầu giải phóng thuốc mong muốn.

\* Lựa chọn độ dày màng bao: trong viên PPOP, do chênh lệch ASTT được tạo ra giữa bên trong và bên ngoài viên nên nước từ môi trường bên ngoài xâm nhập vào bên trong viên qua màng bán thấm. Do đó, độ dày màng bao có ảnh hưởng đặc biệt quan trọng đến đặc tính giải phóng thuốc do ảnh hưởng đến tốc độ kéo nước từ môi trường vào viên nhân. Để đảm bảo cho màng bao có khả năng đề kháng lại áp suất bên trong viên, độ dày màng bao thường được duy trì trong khoảng 200 – 300 µm. Độ dày màng bao khó xác định, thường được thể hiện bằng sự tăng khối lượng viên sau khi bao [[55](#_ENREF_55)], [[58](#_ENREF_58)], [[130](#_ENREF_130)].

Do đó, để đạt được giải phóng DC mong muốn cần phải lựa chọn được sự tăng khối lượng màng bao thích hợp. Đề tài luận án đã lựa chọn khảo sát KLMB tăng lên khác nhau là 6%, 8%, 10%, 12% so với viên nhân.

*f. Miệng giải phóng*

\* Lựa chọn phương pháp tạo miệng giải phóng dược chất

Việc bào chế thuốc dưới dạng bơm thẩm thấu phức tạp hơn so với các dạng bào chế GPKS theo các cơ chế khác do phải tạo miệng giải phóng DC. Có nhiều kỹ thuật khác nhau để tạo miệng giải phóng DC, mỗi loại có những ưu nhược điểm khác nhau.

Một phương pháp đơn giản, ít tốn kém đó là thêm TD tạo lỗ vào thành phần màng bao [[41](#_ENREF_41)], [[42](#_ENREF_42)], thông thường được sử dụng trong hệ thẩm thấu chứa DC ít tan. TD tạo lỗ xốp có khả năng hòa tan hoặc ăn mòn trong quá trình hoạt động của hệ và để lại cấu trúc lỗ xốp trên màng. Màng vi xốp được tạo thành tại chỗ, vừa có khả năng thấm nước vừa có thể cho dịch hòa tan DC đi qua. TD tan trong nước có thể được sử dụng làm TD tạo lỗ như: muối kim loại kiềm và kiềm thổ (natri clorid, kali clorid, calci clorid...), carbohydrat (lactose, glucose, manitol...), diol và polyol, các polymer tan trong nước (PEG, PVP...). TD ăn mòn như poly(acid glycolic), poly(acid lactic) hoặc kết hợp cả hai loại cũng có thể được sử dụng làm TD tạo lỗ. Các lỗ cũng có thể hình thành trong màng trước khi hệ hoạt động bằng cách tạo khí hoặc làm bay hơi các thành phần trong dịch bao, hay bởi các phản ứng sinh khí trong dịch bao trước hoặc trong quá trình sử dụng[[55](#_ENREF_55)], [[60](#_ENREF_60)]. Phương pháp này mặc dù dễ áp dụng, nhưng lại có nhược điểm là cần thời gian để tạo các kênh nên Tlag thường dài, khó tạo ra được các kênh đồng nhất ở các viên khác nhau, do đó quá trình giải phóng DC thường chênh lệch khá cao. Do đó, mức độ ứng dụng của phương pháp này cũng còn hạn chế.

Một phương pháp khác đó là sử dụng kỹ thuật khoan cơ học, tạo miệng giải phóng DC bằng các đầu khoan cơ khí thích hợp. Kỹ thuật này cũng đơn giản, dễ áp dụng vì vậy thường phù hợp với quá trình nghiên cứu phát triển. Kỹ thuật này khó tạo ra được sự đồng đều và khó tự động hóa, do đó, khó áp dụng trong sản xuất lớn.

Khoan laser là một trong những phương pháp được sử dụng phổ biến nhất để tạo miệng giải phóng trong viên nén thẩm thấu. Đây là phương pháp đòi hỏi kỹ thuật cao, sử dụng thiết bị khoan tự động với nhiều ưu điểm, nổi bật nhất là có thể điều chỉnh đường kính miệng giải phóng dễ dàng và áp dụng được trong sản xuất quy mô công nghiệp. Kỹ thuật này cần các đầu phát tia laser công suất cao và có khả năng điều khiển chính xác. Các thông số cần điều chỉnh trong quá trình khoan là công suất phát tia và thời gian phát tia để thu được miệng giải phóng DC có kích thước và độ sâu phù hợp; ngoài ra, cần điều chỉnh tiêu cự của kính hội tụ sao cho điểm khoan chính xác trên bề mặt màng bao. Trên thực tế, các hãng thường sử dụng các đầu khoan laser phi kim, dùng đầu phát tia laser CO2. Do phần lớn các chất hữu cơ sử dụng bào chế các dạng bơm thẩm thấu thể hiện sự hấp thụ mạnh ở bước sóng hồng ngoại nên thường sử dụng các đầu phát laser có bước sóng khoảng 10,6 µm. Ngược lại, nhiều chất hữu cơ sử dụng làm thuốc lại trong suốt tại bước sóng hồng ngoại gần (1,06 µm), đây thường là dải sóng của các đầu phát laser công nghiệp theo các nguyên lý khác.

So với viên EOP, việc khoan tạo miệng giải phóng DCcủa viên PPOP trong phát triển sản xuất có phức tạp hơn.Ở viên EOP, do viên có cấu tạo đồng nhất nên miệng giải phóng DC có thể khoan tùy chọn trên một trong hai mặt viên hoặc cả hai mặt viên. Trong khi đó, do có hai mặt viên khác nhau nên viên PPOP cần được khoan miệng giải phóng DC trên mặt viên có chứa lớp DC. Do đó, quy trình bào chế gặp khó khăn hơn khi phân biệt hai mặt của viên. Hiện nay, để phân biệt hai mặt viên, thông thường trong lớp đẩy cần cho thêm các TD màu, đây là tín hiệu sử dụng để phân biệt trong quá trình khoan. Để nhận biết bề mặt viên, hiện nay cũng có thể sử dụng các đầu dò cảm ứng, tuy nhiên đây là một kỹ thuật rất khó, công nghệ cao. Có hai loại thiết bị khoan laser thường được phát triển và ứng dụng trong sản xuất viên thẩm thấu quy mô công nghiệp:

- Thiết bị khoan tĩnh: đầu phát tia laser được thiết kế cố định và viên cần khoan chuyển động qua vùng khoan, hoặc viên cố định và đầu khoan chuyển động tới từng vị trí cần khoan. Chọn mặt viên cần khoan và sắp xếp viên trong các khuôn cố định hoặc chuyển động ở tốc độ thấp. Thiết bị loại này thường có cấu tạo đơn giản và chi phí đầu tư thích hợp với các đơn vị sản xuất ở quy mô vừa.

- Thiết bị khoan động: đối với thiết bị loại này, viên sau khi được xác định mặt cần khoan sẽ chuyển động vào vùng khoan. Trong quá trình khoan, viên vẫn chuyển động liên tục, vì vậy, để quá trình khoan chính xác tại một điểm, tia laser cần chuyển động theo viên trong quá trình khoan. Chuyển động này được điều khiển bằng cách sử dụng hệ thống gương quay để phản xạ chùm tia laser. Thiết bị khoan này có tốc độ lớn, thiết bị phức tạp, giá thành cao, thích hợp cho các quy mô sản xuất lớn.

Đề tài luận án lựa chọn sử dụng máy khoan laser EPILOG Helix là thiết bị khoan tiên tiến, gọn nhẹ, dễ vận hành. Kỹ thuật khoan laser sử dụng trong nghiên cứu chủ yếu theo cơ chế tĩnh. Viên được sắp xếp vào khay đã được tạo khuôn trước có đường kính và bề dày vừa khít với viên cần khoan. Việc tạo khuôn mica cũng được thực hiện bằng máy khoan laser cùng loại với chế độ “cắt”. Để phân biệt mặt viên cần khoan, công thức bao bán thấm không được đưa thêm nhiều chất độn để có thể nhìn rõ màu của hai lớp. Với kích thước máy khoan EPILOG Helix, khuôn được sử dụng cho viên NIF thẩm thấu bào chế được có thể sắp xếp được một mẻ khoan tới trên 1000 viên một lượt. Sau khi thiết lập chương trình và thông số phù hợp, viên cần khoan sẽ di chuyển để khoan vào chính giữa bề mặt viên với tốc độ chuyển động 62,5 cm/giây. Các thông số của quá trình khoan miệng giải phóng cho viên NIF thẩm thấu được nghiên cứu thăm dò rất cẩn thận sao cho đạt được độ đồng đều về đường kính lỗ khoan, đồng thời phải có độ sâu vừa đủ để xuyên thủng qua bề dày lớp bao. Nếu khoan quá sâu, có thể xuyên tới lớp đẩy, dẫn tới polymer lớp đẩy trong quá trình trương nở có thể đùn lên làm bít miệng giải phóng DC. Nếu năng lượng chùm tia quá cao, có thể gây ảnh hưởng đến độ ổn định của phần DC tiếp xúc với tia laser. Đề tài luận án đã lựa chọn máy sử dụng nguồn laser CO2 và khảo sát các mức năng lượng 15%, 25%, 35% công suất máy.

Để xác định bề mặt viên cần khoan miệng giải phóng, oxyd sắt đỏ được đưa vào lớp đẩy để tạo màu phân biệt trong quá trình khoan laser. Do đó, lớp đẩy có màu đỏ thẫm, phân biệt rõ với lớp DC có màu vàng của viên nhân. Viên được xếp vào các ô định vị sao cho mặt chứa DC hướng lên trên. Tuy đây là công đoạn làm thủ công nhưng không mất nhiều thời gian nên không ảnh hưởng đến quy trình sản xuất ở quy mô lớn, trong điều kiện chưa có sẵn thiết bị xác định màu để nhận biết bề mặt lớp DC.

\* Lựa chọn kích thước miệng giải phóng

Do màng bao sử dụng trong viên PPOP được hình thành từ polymer CA có bản chất là màng bán thấm nên các phân tử DC không bị khuếch tán qua màng mà chỉ được giải phóng qua miệng giải phóng DC. Do đó, kích thước miệng giải phóng ảnh hưởng đến tốc độ giải phóng DC, Tlag và động học giải phóng của viên. Kích thước miệng giải phóng phải phù hợp, nghĩa là phải nhỏ hơn kích thước tối đa để giảm thiểu sự khuếch tán của thuốc và phải lớn hơn kích thước tối thiểu để giảm thiểu áp lực thủy tĩnh bên trong viên, yếu tố này sẽ ảnh hưởng đến tốc độ giải phóng theo động học bậc 0 của viên. Các nghiên cứu về hệ bơm thẩm thấu đều chỉ ra rằng: kích thước miệng giải phóng điển hình được sử dụng trong hệ dao động trong khoảng 0,6 – 1,0 mmvà trong khoảng này tốc độ giải phóng DC có thể tuân theo động học bậc 0. Do đó, đề tài luận án đã lựa chọn khảo sát ba kích thước miệng giải phóng là 0,6mm; 0,8mm và 1mm.

Từ những phân tích và bàn luận trên, đề tài luận án lựa chọn ra công thức cơ bản cho viên NIF GPKD để tiến hành nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng.

***4.1.2.2. Ảnh hưởng của các yếu tố đến tốc độ giải phóng nifedipin từ viên thẩm thấu.***

Quá trình giải phóng DC từ viên PPOP phụ thuộc vào nhiều yếu tố, tựu chung chủ yếu phụ thuộc vào 3 nhóm yếu tố: các yếu tố thuộc về công thức viên nhân, các yếu tố thuộc về công thức màng bao và kích thước miệng giải phóng.

1. *Các yếu tố thuộc về công thức viên nhân*

\* *Loại polymer trương nở trong lớp dược chất và lớp đẩy*

Việc lựa chọn loại polymer trương nở (PEO) sử dụng trong lớp DC và lớp đẩy đã được đề cập trong một số nghiên cứu. Đa số các nghiên cứu này đều thống nhất lựa chọn PEO có độ nhớt thấp tới trung bình cho lớp DC và PEO có độ nhớt cao sử dụng cho lớp đẩy. Đề tài luận án đã tiến hành khảo sát các loại PEO N10, PEO N750, PEO N80 tương ứng với KLPT từ 100.000 – 600.000 Dal cho lớp DC và PEO 301, PEO 303, PEO coagulant cho lớp đẩy. Kết quả là đề tài luận án đã lựa chọn được PEO N10(100.000 Da) trong lớp DC và PEO 303 (7000.000 Da) trong lớp đẩy. Kết quả này là tương tự với kết quả lựa chọn PEO trong hai lớp của Shah A. và CS [[53](#_ENREF_53)] khi nghiên cứu bào chế viên ropinirole GPKD theo cơ chế bơm thẩm thấu kéo – đẩy. Trong nghiên cứu này, tác giả đã lựa chọn PEO N80 (200.000 Da) cho lớp DC và PEO 303 (7000.000 Da) trong lớp đẩy, với sự ảnh hưởng đến giải phóng DC khi lựa chọn PEO N10(100.000 Da) hay PEO N80 (200.000 Da) trong lớp thuốc là không đáng kể [[75](#_ENREF_75)]. Kết quả này cũng khá tương đồng với nghiên cứu của các tác giả Missaghi S. và CS [[129](#_ENREF_129)], Wu C. và CS [[130](#_ENREF_130)], Patel V. và CS [[134](#_ENREF_134)]. Sự lựa chọn này cho thấy, công thức viên có khả năng kiểm soát tốc độ giải phóng DC tốt nhất so với các công thức có các loại PEO khác trong công thức, với khoảng giải phóng theo động học bậc không khá dài và giá trị f2 so với viên đối chiếu là 51,17.

\* *Tỷ lệ tá dược thẩm thấu trong lớp dược chất và lớp đẩy*

Tỷ lệ TD tạo áp suất thẩm thấu trong viên nhân có vai trò quan trọng trong việc tạo ra chênh lệch ASTT giữa trong và ngoài màng. Trong nghiên cứu này, đề tài đã lựa chọn sử dụng 10% TD tạo ASTT trong lớp DC và 30% trong lớp đẩy. Điều này là phù hợp nghiên cứu của Malaterre V và CS [[128](#_ENREF_128)]cho rằng để giải phóng DC theo động học bậc không thì cần tối thiểu 5% TD tạo ASTT trong lớp DC. Đối với hàm lượng TD tạo ASTT trong lớp đẩy, tỷ lệ 30% mà đề tài lựa chọn đã tạo ra tốc độ giải phóng NIF cao và mức độ tương đồng lớn so với viên đối chiếu (f2=54,30). Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của tác giả Missaghi S. và CS [[129](#_ENREF_129)] cho rằng với tỷ lệ TD thẩm thấu 0 – 35% trong lớp đẩy đảm bảo tạo ra được giải phóng hoàn toàn, ít thay đổi và có độ tuyến tính cần thiết. Hơn nữa, với việc lựa chọn tỷ lệ TD tạo ASTT trong lớp DC là 10% và trong lớp đẩy là 30% đã tạo ra được sự cân bằng độ nhớt và cân bằng hydrat hóa giữa 2 lớp theo Malaterre V. và CS [[135](#_ENREF_135)].

1. *Các yếu tố thuộc về công thức màng bao*

\* *Tỷ lệ chất hóa dẻo*

Thành phần màng bao, trong đó có tỷ lệ TD hóa dẻo là thông số quan trọng ảnh hưởng lớn đến tốc độ giải phóng thuốc. PEG trong công thức đóng vai trò làm chất hóa dẻo, tăng độ bền màng và còn đóng vai trò quan trọng trong quá trình giải phóng thuốc do có ảnh hưởng đến tính thấm của màng. PEG có bản chất là TD hóa dẻo thân nước, khi tiếp xúc với môi trường hòa tan, PEG dễ dàng bị hòa tan trong nước và để lại cấu trúc lỗ xốp, làm tăng độ xốp của màng bán thấm, do đó, tăng khả năng hút nước vào trong hệ[[40](#_ENREF_40)], [[84](#_ENREF_84)].Tỷ lệ PEG càng cao thì cấu trúc lỗ xốp này càng dày đặc, tốc độ thấm nước càng cao, tăng tốc độ giải phóng. Theo nghiên cứu của Malaterre V. và CS [[128](#_ENREF_128)] đã chỉ ra rằng sự phụ thuộc của tốc độ giải phóng thuốc vào tỷ lệ TD hóa dẻo trong màng là theo hàm số mũ, khi tăng tỷ lệ TD hóa dẻo dẫn đến tăng tốc độ giải phóng thuốc. Cũng theo Malaterre V. và CS tỷ lệ PEG chỉ có ý nghĩa kiểm soát tốc độ giải phóng thuốc khi ở mức tối đa là 20%. Trong nghiên cứu này, đã lựa chọn TD hóa dẻo là PEG 4000 với tỷ lệ PEG 4000 so với CA (KL/KL) là 10%. Với tỷ lệ này, viên có Tlag giảm đi đáng kể, đồ thị gần trùng khớp với viên đối chiếu với hệ số f2 lên tới 69,91.

\* *Độ dày màng bao bán thấm*

Độ dày màng bao cũng là 1 yếu tố quan trọng thuộc về thành phần màng bao để kiểm soát tốc độ thấm nước vào viên, qua đó ảnh hưởng đến giải phóng thuốc, tốc độ giải phóng thuốc tỷ lệ nghịch với độ dày màng, khi tăng độ dày màng bao dẫn đến làm chậm giải phóng thuốc. Độ dày màng bao khó xác định, tuy nhiên có thể được xác định bằng 2 cách, đó là xác định theo mặt cắt ngang của viên bằng cách sử dụng kính hiển vi quang học và xác định dựa vào việc sử dụng thông số tỷ lệ khối lượng màng bao/khối lượng trung bình viên trước khi bao. Luận án sử dụng cách tính dựa vào khối lượng viên tăng lên sau khi bao hay dựa vào thông số tỷ lệ khối lượng màng bao/khối lượng trung bình viên trước khi bao bởi vì đây là cách đã được đề cập và thực hiện trong nhiều nghiên cứu về bào chế. Hơn nữa, thực tế tiến hành nghiên cứu bào chế cho thấy đây là phương pháp rất phù hợp, dễ thực hiện trong nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của độ dày màng bao đến giải phóng thuốc và có thể áp dụng được trong các điều kiện cơ sở vật chất đơn giản nhất. Cách xác định độ dày màng bao dựa vào kính hiển vi quang học phù hợp với việc đánh giá sản phẩm cuối cùng hơn.

Do đó, để đạt được quá trình giải phóng DC mong muốn, cần phải lựa chọn được KLMB tăng lên thích hợp. Từ kết quả thực nghiệm so sánh khả năng giải phóng DC của các mẫu viên có KLMB tăng lên khác nhau 6%, 8%, 10% và 12% cho thấy: KLMBcàng tăng thì Tlag càng dài, tốc độ giải phóng DC càng chậm do tốc độ nước qua màng chậm hơn và ngược lại. Các mẫu viên có tốc độ giải phóng DC khác nhau, nhưng không có mẫu viên nào có hiện tượng nứt màng bao. Như vậy, sự kết hợp giữa polymer CA và PEG 4000 đã tạo ra màng bán thấm có cấu trúc dẻo dai và khả năng kiểm soát giải phóng tốt, tốc độ thấm nước qua màng ổn định bất kể với độ dày màng bao khác nhau. Trong phạm vi nghiên cứu này, đề tài luận án đã lựa chọn KLMB 12% so khối lượng viên nhân là phù hợp hơn cả. Với độ dày màng bao như vậy, công thức viên lựa chọn có tốc độ giải phóng khá phù hợp so với viên đối chiếu với giá trị f2 = 69,91.

1. *Kích thước miệng giải phóng*

Miệng giải phóng là một trong những thành phần quan trọng nhất trên màng bao có ảnh hưởng đến giải phóng thuốc. Kích thước miệng giải phóng cần phải được tối ưu hóa để kiểm soát giải phóng thuốc trong hệ thẩm thấu [[66](#_ENREF_66)]. So sánh kết quả nghiên cứu độ hòa tan của các mẫu viên có kích thước miệng giải phóng khác nhau 0,6 mm, 0,8 mm và 1 mmthu được từ những thực nghiệm khảo sát trong đề tài luận án cho thấy: kích thước miệng giải phóng ít ảnh hưởng đến Tlagnhưng có ảnh hưởng nhiều đến tốc độ giải phóng thuốc,kích thước miệng giải phóng càng lớn thì DC được giải phóng càng nhanh. Nghiên cứu đã lựa chọn được kích thước miệng giải phóng phù hợp nhất là 0,8 mm vì có khoảng tuyến tính dài và tốc độ, tỷ lệ % NIF giải phóng 24 giờ là khá tương đồng với viên đối chiếu, với hệ số f2 là 69,91.Điều này là phù hợp với kích thước miệng giải phóng điển hình của dạng bơm thẩm thấu theo Verma R.K. và CS[[55](#_ENREF_55)], Gupta S. và CS[[62](#_ENREF_62)], Patra C.N. và CS [[68](#_ENREF_68)].

4.1.3. Xây dựng quy trình bào chế viên nifedipin giải phóng kéo dài

Do đặc tính không bền với ánh sáng ban ngày và ánh sáng đèn neon phòng thí nghiệm của NIF và đặc tính hút ẩm của các TD sử dụng trong bào chế viên như PEO, lactose … nên việc bảo quản nguyên liệu tránh ẩm, tránh ánh sáng cần phải được chú ý. KTTP bột ảnh hưởng đến độ trơn chảy, tỷ trọng biểu kiến, độ đồng đều của khối bột và khả năng chịu nén. Do đó, trước khi tiến hành bào chế phải xay nghiền, rây nguyên liệu qua rây 180 µm và TD qua rây 500 µm để đảm bảo KTTP nguyên liệu và TD tương đối đồng đều. Quá trình này có ảnh hưởng lớn đến độ đồng đều hàm lượng DC trong quá trình trộn bột kép. Đồng thời trong quá trình bào chế nên được thực hiện trong phòng được chiếu sáng bằng đèn natri có bước sóng khoảng 589 nm để đảm bảo độ ổn định của NIF và kiểm soát được hàm ẩm để giảm khả năng hút ẩm của các TD như PEO, lactose..giúp tăng độ đồng đều trong quá trình trộn bột kép. Bên cạnh đó, thời gian trộn bột kép, nhất là đối với bột kép lớp DC có ảnh hưởng đến độ đồng đều hàm lượng NIF, vì vậy cần được khảo sát kỹ trong quá trình bào chế.

Phương pháp tạo hạt ướt được lựa chọn để bào chế viên NIF GPKD nhằm đảm bảo lực nén 10 – 12 kP và đảm bảo mục tiêu kéo dài giải phóng 24 giờ. Trong quá trình thực nghiệm sử dụng các cách thức tạo hạt khác nhau như ở quy mô phòng thí nghiệm: tạo hạt bằng tay (100 viên/mẻ) và ở quy mô lớn hơn: tạo hạt qua rây bằng máy (2000 viên/mẻ). Như vậy, thiết bị tạo hạt và thiết bị sấy ảnh hưởng lớn đến các đặc tính của hạt như phân bố KTTP, tỷ trọng hạt, độ trơn chảy và khả năng chịu nén của hạt.

Do trong công thức viên có sử dụng TD trương nở PEO nên cách cho TD dính có ảnh hưởng đến khả năng thấm đều TD dính vào khối bột. Đối với lớp DC, đặc biệt là lớp đẩy có chứa PEO có đặc tính trương nở mạnh thì thao tác nhào trộn cần được tiến hành nhanh. Để đảm bảo sự đồng đều của khối ẩm, trước khi nhào, TD dính cần được rải đều trên khối bột với một lượng nhất định. Trong quá trình nhào ẩm cần kiểm tra sơ bộ độ ẩm khối bột bằng tay, tránh cho TD dính nhanh quá sẽ dẫn đến dính bết, cũng cần tránh cho TD chậm quá dẫn đến dung môi pha TD dính bay hơi quá nhanh ảnh hưởng đến độ ẩm của khối bột. Bên cạnh đó, tốc độ trộn cũng cần được điều chỉnh tăng dần đến tốc độ mong muốn.

Độ ẩm của hạt ảnh hưởng đến độ trơn chảy và mức độ liên kết tiểu phân khi dập viên. Hạt được sấy đến độ ẩm 2 – 3 % cho thấy hạt trơn chảy tốt và viên đạt độ cứng theo yêu cầu. Việc xát hạt bằng máy xát hạt đung đưa qua rây 800 µm không được thực hiện quá chậm sẽ dẫn đến khối bột khô nhanh, làm cho hạt có độ xốp tăng, do đó sẽ ảnh hưởng đến độ trơn chảy của hạt và độ cứng khi dập viên.

Quá trình dập viên khi thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm được tiến hành trên máy dập viên tâm sai nên quá trình dập viên hai lớp phải trải qua 2 bước: cho lớp DC vào cối trước, nén sơ bộ lớp DC, sau đó cho lớp đẩy vào cối và dập hoàn tất. Với thao tác dập như vậy sẽ mất nhiều thời gian hơn.

Khi chuyển sang quy mô 2000 viên/mẻ, thao tác dập viên được thực hiện trên máy dập viên 2 lớp quay tròn SHARTI 9 chày tự động, thời gian dập viên nhanh hơn và cách thức dập viên khác so với quy mô phòng thí nghiệm. Máy dập viên hai lớp có hai phân phối để đong khối lượng của lớp DC và khối lượng của lớp đẩy. Tại phân phối của lớp DC có thiết kế cánh quay giúp quá trình đong khối lượng viên được đồng đều hơn. Tuy nhiên lại không thiết kế cho lớp đẩy. Do đó, việc đong khối lượng lớp đẩy kém chính xác hơn khối lượng lớp DC. Thực tế cho thấy có thể điều chỉnh tốc độ quay cánh khuấy của phân phối trên thích hợp để quá trình đong khối lượng đều, tránh hiện tượng bột xuống quá nhiều tràn ra mâm quay gây hiện tượng trộn lẫn vào lớp đẩy. Do tại phân phối của lớp đẩy không thiết kế cánh quay phân phối, do đó để điều chỉnh lượng bột lớp đẩy xuống vừa phải, tránh tràn ra mâm quay chỉ bằng cách điều chỉnh mức độ cao hay thấp của phễu cấp liệu. Bên cạnh đó, tốc độ dập viên là một yếu tố quan trọng quyết định đồng đều hàm lượng viên. Khi tăng tốc độ dập viên, do chuyển động của mâm quay quá nhanh, bột viên không kịp chảy vào cối gây ra hiện tượng khối lượng viên và độ cứng dao động khá lớn vượt quá giới hạn cho phép. Do đó, để đảm bảo các tiêu chuẩn kỹ thuật của viên nhân, đề tài luận án lựa chọn tốc độ dập viên tương đối chậm là 5 vòng/phút. Một hạn chế của máy dập viên 2 lớp là mâm quay nhỏ, phân phối chỉ thiết kế 3 khoang nên quá trình đong khối lượng viên với viên nén khối lượng lớn gặp nhiều khó khăn khi dập với tốc độ cao.

Quá trình bao phim: ở lô 1, số lượng viên là 2000 viên nên tổng khổi lượng cả lô khoảng 0,6 kg, trong khi công suất nồi bao phim tự động Vanguard là 0,5-1 kg viên/mẻ. Do đó, không cần phải sử dụng thêm viên trơ. Tiến hành bao phim màng bán thấm lô 1. Kết quả cho thấy, khi bao phim ở tốc độ 7-10 vòng/phút, viên có hiện tượng sứt cạnh, tiến hành giảm tốc độ nồi bao xuống 6 vòng/phút, hiện tượng sứt cạnh đã được khắc phục. Quá trình bao màng bán thấm với TDCA, sử dụng dung môi chủ yếu là aceton, dễ bay hơi. Vì vậy, nhiệt độ trong buồng bao thiết lập thấp, chỉ từ 35 - 400C. Đề tài luận án đã lựa chọn được các thông số thích hợp cho quá trình bao. Với các thông số này, thu được viên có màng bao tốt, hình thức bóng đẹp và có độ đồng nhất cao, tỷ lệ hư hao thấp. Tiếp tục bào chế lô 2, lô 3 trên cơ sở các thông số của lô 1.

Mặc dù khi chuyển từ quy mô phòng thí nghiệm sang quy mô lớn hơn là 2000 viên/mẻ, các trang thiết bị và quy trình có sự thay đổi, tuy nhiên đây vẫn là quy mô nhỏ. Do đó, các kết quả thu được là cơ sở tham khảo để nâng cấp quy mô pilot.

4.2. XÂY DỰNG TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG VÀ BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ ĐỘ ỔN ĐỊNH VIÊN NÉN NIFEDIPIN30MG GIẢI PHÓNG KÉO DÀI

4.2.1. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở

Tiêu chuẩn chất lượng viên được xây dựng phù hợp với DĐVN V, chuyên luận viên nén NIF GPKD trong USP 38 và quy định chung về viên GPKD.

Phương pháp HPLC được sử dụng để định lượng NIF trong viên thẩm thấu là phương pháp có độ chính xác cao. Kết quả thẩm định phương pháp HPLC để định lượng NIF trong viên GPKD đạt yêu cầu về tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, độ tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại, độ chính xác trung gian và khoảng xác định theo hướng dẫn của ICH và thông tư 32 của Bộ Y tế.

4.2.2. Đánh giá độ ổn định

Nghiên cứu độ ổn định viên nén NIF 30mg GPKD nhằm đánh giá mức độ thay đổi của các chỉ tiêu chất lượng viên dưới tác động của các yếu tố môi trường cũng như các yếu tố thuộc về chế phẩm thuốc, từ đó làm cơ sở để dự đoán tuổi thọ của thuốc. Các yếu tố thuộc về chế phẩm có thể ảnh hưởng đến độ ổn định của thuốc như: tính chất lý hóa của NIF và các TD, dạng bào chế, quá trình sản xuất, độ kín và bản chất của bao bì đóng gói trực tiếp.

Đề tài tiến hành nghiên cứu độ ổn định của viên NIF 30mg GPKD trên cơ sở tham khảo các quy định của WHO[[119](#_ENREF_119)], FDA [[120](#_ENREF_120)], ICH [[121](#_ENREF_121)]và hướng dẫn của ASEAN về nghiên cứu độ ổn định của thuốc [[122](#_ENREF_122)].

Độ ổn định của viên bào chế được theo dõi sau 12 tháng ở điều kiện thực và sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc. Sử dụng phần mềm Minitab 19để ngoại suy tuổi thọ của thuốc. Kết quả nghiên cứu cho thấy sau 12 tháng theo dõi dài hạn và 6 tháng ở điều kiện lão hóa cấp tốc, viên bào chế được vẫn đạt độ ổn định về hình thức, hàm lượng, độ hòa tan và đạt yêu cầu phép thử tạp chất liên quan, dự đoán được tuổi thọ của viên ước tính là 27 tháng.

Do hạn chế về trang thiết bị nghiên cứu do tủ vi khí hậu chỉ đặt được 1 điều kiện lão hóa cấp tốc, nên nghiên cứu độ ổn định dài hạn chưa đáp ứng chặt chẽ điều kiện nhiệt độ, độ ẩm quy định. Điều kiện lưu mẫu theo dõi độ ổn định thực là điều kiện phòng thí nghiệm với nhiệt độ và độ ẩm được kiểm soát bằng điều hòa nhiệt độ nên có mức độ dao động cao hơn so với để ở tủ vi khí hậu, điều kiện này sát với điều kiện thực tế sau này thuốc lưu hành trên thị trường nên kết quả nghiên cứu có ý nghĩa hơn. Khi tiếp tục triển khai ở quy mô lớn hơn để áp dụng vào sản xuất đề tài luận án sẽ tiếp tục nghiên cứu độ ổn định dài hạn theo đúng quy định hiện hành.

4.3. BƯỚC ĐẦU ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG

4.3.1. Kết quả xây dựng và thẩm định phương pháp sắc ký lỏng siêu hiệu năng ghép nối khối phổ 2 lần để định lượng nifedipin trong huyết tương chó

Theo hướng dẫn của FDA [[123](#_ENREF_123)] và EMA [[125](#_ENREF_125)]về thẩm định phương pháp định lượng DC trong dịch sinh học đã đưa ra các chỉ tiêu thẩm định gồm có: tính đặc hiệu, chọn lọc; đường chuẩn;giới hạn định lượng dưới; độ đúng; độ chính xác; tỷ lệ thu hồi hoạt chất, độ nhiễm chéo, ảnh hưởng của nền mẫu, độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương. Đây chính là cơ sở để xác định tính chính xác của phương pháp và khả năng áp dụng phương pháp trong xác định NIF trong dịch sinh học.

Quá trình chiết xuất DC trong dịch sinh học có thể được thực hiện bằng các phương pháp như chiết lỏng-lỏng, chiết pha rắn và tủa protein. Trong đó, phương pháp tủa protein sử dụng các tác nhân gây tủa là acid và dung môi hữu cơ để làm đông vón protein trong huyết tương. Phương pháp này đơn giản, không đòi hỏi trang thiết bị hiện đại, dễ tiến hành, thời gian chiết nhanh, chi phí thấp; tuy nhiên, hoạt chất chiết được có độ tinh khiết không cao, các thành phần tạp có trong nền mẫu, ngay cả protein vẫn còn tồn tại, gây cản trở quá trình định lượng. Phương pháp chiết pha rắn tuy cho dịch chiết có độ tinh khiết cao, tính chọn lọc tốt, có khả năng loại bỏ các thành phần tạp có trong nền mẫu và cho hiệu xuất chiết tương đối cao nhưng thực tế khả năng áp dụng phương pháp này còn hạn chế do rào cản về chi phí cao để trang bị cột chiết pha rắn và mức độ phức tạp khi áp dụng phương pháp. Đây là những khó khăn thực tế đã tồn tại trong việc sử dụng phương pháp này trong các nghiên cứu và trong các phòng thí nghiệm ở Việt Nam trong những năm trở lại đây. Phương pháp chiết lỏng-lỏng tuy phải dùng nhiều dung môi nhưng đơn giản, giá thành thấp, dịch chiết phù hợp với hệ thống sắc ký, có thể dễ dàng thay thế dung môi để có độ chọn lọc cao và có thể cô đặc mẫu để làm tăng nồng độ DC trong mẫu định lượng, do đó có thể phát hiện được DC ở nồng độ thấp.Trong số các nghiên cứu định lượng NIF trong dịch sinh học, có một số nghiên cứu sử dụng phương pháp tủa protein [[92](#_ENREF_92)], [[93](#_ENREF_93)], [[94](#_ENREF_94)]; một số sử dụng phương pháp chiết pha rắn [[95](#_ENREF_95)], [[96](#_ENREF_96)]; đa số các nghiên cứu sử dụng phương pháp chiết lỏng-lỏng [[105](#_ENREF_105)], [[99](#_ENREF_99)], [[21](#_ENREF_21)]…Hơn nữa, NIF là hoạt chất có pKa=5,33 và log P = 2,49 nên việc sử dụng phương pháp chiết NIF trong huyết tương bằng dung môi hữu cơ là hoàn toàn có cơ sở.Đề tài đã tiến hành khảo sát chiết lỏng – lỏng với các dung môi: cloroform, diethyl ether, diethylether/cloroform (8/2), terbutylmethyl ether và pha động ACN/dung dịch acid formic 0,1% (90/10), nhận thấy chiết bằng cloroform đơn giản, loại được tạp chất trong mẫu huyết tương, cho nền mẫu sạch, dễ bốc hơi dung môi và cho tỷ lệ thu hồi NIF và chuẩn nội GLI cao, do đó, lựa chọn cloroform để xử lý mẫu huyết tương trước khi định lượng.

NIF thuộc phân nhóm 2 trong hệ thống phân loại sinh dược học gồm những chất kém tan trong nước và tính thấm tốt.NIF là một chất không phân cực, được hấp thu hoàn toàn qua đường tiêu hóa nhưng lại có SKD rất thấp, chủ yếu là do chuyển hóa tiền hệ thống. NIF được sử dụng với liều đường uống là 20mg, 30mg cho SKD là 43% [[104](#_ENREF_104)], nồng độ NIF tối đa trong huyết tương trên người lần lượt là 64 ± 31ng/mL và 75 ± 30 ng/mL[[104](#_ENREF_104)]. Trên chó, sau khi uống 1 liều đơn viên nén NIF GPKS với hàm lượng 30mg, nồng độ NIF trong huyết tương có thể dưới 1ng/mL[[105](#_ENREF_105)]. Đó là một thách thức đối với các phương pháp phân tích hiện đại. Mặt khác, do tính chất của NIF ko bền trong điều kiện ánh sáng mặt trời và ánh sáng đèn neon trong phòng thí nghiệm, khi bị phân hủy tạo thành các dẫn xuất nitroso-pyridin và nitro-pyridin. Chính những đặc tính vật lý và DĐH bất lợi này gây ra khó khăn cho việc định lượng NIF trong huyết tương.

Hơn nữa, trong phân tích thuốc trong dịch sinh học, nền mẫu phức tạp, lượng mẫu thường ít nên việc tiến hành định lượng lặp lại nhiều lần là rất khó khăn. Do đó, để phân tích NIF trong dịch sinh học, thường chọn các phương pháp có độ nhạy, độ chọn lọc cao, LLOQ thấp, độ lặp lại tốt và thời gian phân tích một mẫu phải đủ ngắn. Hiện nay, đã có nhiều các kỹ thuật phân tích định lượng được sử dụng để định lượng NIF trong huyết tương như phương pháp sắc ký khí và phương pháp LC kết hợp với các loại detector khác nhau. Các tài liệu chủ yếu dựa vào phương pháp HPLC mà hiện nay được phát triển, tối ưu hóa lên thành phương pháp UPLC, trong đó kỹ thuật UPLC-MS/MS được ưu tiên sử dụng do có độ nhạy, độ đặc hiệu, độ chọn lọc cao, có LOQ thấp, có khả năng phân tích được số lượng mẫu lớn và đặc biệt thời gian phân tích trên 1 mẫu nhanh. Do đó, đề tài đã lựa chọn phương pháp UPLC-MS/MS để định lượng NIF trong huyết tương chó. Điều này là hoàn toàn phù hợp với điều kiện trang thiết bị của Viện nghiên cứu Y Dược học quân sự và yêu cầu có 1 phương pháp phân tích có độ nhạy cao, LOQ thấp, thời gian phân tích nhanh phù hợp với việc định lượng NIF trong huyết tương chó.

Việc lựa chọn IS về nguyên tắc cơ bản dựa vào sự tương đồng về cấu trúc, đặc tính lý hóa, KLPT và thời gian lưu của chất cần phân tích và IS. Tuy nhiên, cần dựa vào từng điều kiện thực nghiệm cụ thể để lựa chọn IS sao cho phù hợp. Trong nhiều trường hợp về mặt lý thuyết, IS dự kiến được sử dụng là rất tốt, như đối với NIF và các thuốc chống tăng huyết áp, việc sử dụng các đồng vị đánh dấu deuteri làm IS là rất tốt, tuy nhiên do không có sẵn và tốn kém nên nó khó được tiếp cận trong quá trình nghiên cứu. Do đó, trong trường hợp này nên lựa chọn những chất sẵn có, phù hợp với khả năng cho phép. Bên cạnh đó, thời gian phân tích của mẫu cũng cần phải được xem xét trong quá trình lựa chọn IS. Bởi vì thời gian lưu của chất phân tích và IS quá dài sẽ dẫn đến tốn dung môi hóa chất, mất thời gian chờ đợi, trong khi lượng mẫu cần phân tích trong đánh giá SKD thông thường là rất nhiều, do đó, cần lựa chọn IS có thời gian lưu phù hợp. Tuy nhiên, để làm được điều này còn phụ thuộc vào việc sẽ sử dụng pha động nào. Ngoài ra, việc lựa chọn IS cũng phụ thuộc rất nhiều vào việc sử dụng dung môi chiết là gì. Thông thường lựa chọn IS trong số các chất chiết được bằng dung môi đó và cho nền mẫu sạch.

Qua tham khảo các tài liệu nghiên cứu, nhận thấy các tác giả đã sử dụng một số chất IS trong định lượng NIF trong dịch sinh học như: NIF D6 [[92](#_ENREF_92)], nimodipin [[105](#_ENREF_105)], diazepam [[100](#_ENREF_100)], nitrendipin [[101](#_ENREF_101)]…Dựa trên kinh nghiệm, nhận thấy GLI là chất khá ổn định, có thời gian lưu ngắn (khoảng 0,76 phút), có thể được phân tích ở cả chế độ ion âm và ion dương, đặc biệt là có cùng chế độ ion hóa với NIF (chế độ ion dương), phù hợp về thời gian rửa giải và phù hợp với điều kiện chiết của NIF, thời gian phân tích mẫu chứa NIF và GLI chỉ cần khoảng 2 phút, do đó, GLI được lựa chọn làm IS trong nghiên cứu định lượng NIF trong huyết tương chó.

Nhiệt độ cột, tốc độ dòng lựa chọn lần lượt là 400C và 0,2 mL/phút tương tự như điều kiện sắc ký của một số nghiên cứu đã công bố [[98](#_ENREF_98)], [[113](#_ENREF_113)], [[114](#_ENREF_114)].

Pha động gồm hỗn hợp ACN với các dung môi khác nhau như acid formic, đệm phosphat, amoni acetat, acid acetic băng đã được ứng dụng trong nhiều nghiên cứu về định lượng NIF trong dịch sinh học [[97](#_ENREF_97)], [[98](#_ENREF_98)], [[105](#_ENREF_105)]. Đề tài đã lựa chọn pha động gồm: ACN/dung dịch acid formic 0,1% - 90/10 đảm bảo pic IS và NIF được tách tốt và có thời gian lưu hợp lý.

Điều kiện sắc ký và khối phổ đã lựa chọn cho thấy có thể tách NIF, IS ra khỏi tạp, cho thời gian rửa giải phù hợp đáp ứng yêu cầu của việc phân tích NIF trong huyết tương chó.

Thẩm định phương pháp định lượng NIF trong huyết tương chó theo các điều kiện sắc ký và điều kiện khối phổ đã lựa chọn cho thấy phương pháp phân tích đạt các yêu cầu về độ chọn lọc, đặc hiệu;đường chuẩn; giới hạn định lượng dưới; độ đúng; độ chính xác; tỷ lệ thu hồi hoạt chất, độ nhiễm chéo, ảnh hưởng của nền mẫu, độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương.

Nghiên cứu sự tương quan giữa nồng độ NIF (x) có trong mẫu và tỷ lệ đáp ứng pic NIF/IS (y) bằng phương pháp hồi quy tuyến tính, sử dụng các hệ số weighting 1/x2, 1, 1/x1/2, 1/x cho thấy: với hệ số weighting là 1/x2 cho tổng các sai số dư là nhỏ nhất, do đó chọn hệ số weighting là 1/x2. Thẩm định sự tương quan giữa nồng độ NIF và tỷ lệ đáp ứng pic NIF/IS sử dụng hệ số weighting là 1/x2 cho thấy: trong khoảng nồng độ từ 0,5ng/mL đến 100ng/mL có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ NIF và tỷ lệ đáp ứng pic NIF/IS với hệ số tương quan xấp xỉ bằng 1. Nồng độ NIF xác định từ đường chuẩn so với giá trị lý thuyết đều đạt xấp xỉ 100% và nằm trong giới hạn cho phép theo quy định của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

Kết quả xác định LLOQ cho thấy ở nồng độ 0,5ng/mL đáp ứng yêu cầu về độ đúng (80-120% so với nồng độ thực) và độ chính xác khi tiến hành phân tích trên các mẫu LLOQ độc lập được thể hiện bằng CV% ≤ 20%, giá trị S/N của pic NIF trong các mẫu LLOQ đều > 10, đáp ứng yêu cầu về LLOQ của phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

Đánh giá độ đúng và độ chính xác của phương pháp được thực hiện trên 4 lô mẫu LLOQ, LQC, MQC, HQC tương ứng với các nồng độ NIF là 0,5; 1,5; 50 và 75ng/mL. Xác định nồng độ NIF có trong các mẫu QC từ đường chuẩn tiến hành phân tích trong cùng điều kiện và tỷ lệ % giữa nồng độ xác định từ đường chuẩn so với nồng độ lý thuyết. Kết quả thẩm định cho thấy ở các nồng độ LQC, MQC và HQC, phương pháp có độ đúng trong ngày, khác ngày xấp xỉ 100%, độ chính xác trong ngày, khác ngày với giá trị RSD% < 15%, đáp ứng yêu cầu về độ đúng, độ chính xác đối với phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn của FDA và EMA.

Xác định tỷ lệ thu hồi của NIF và IS được thực hiện với 3 lô mẫu LQC, MQC và HQC bằng cách so sánh đáp ứng pic của NIF và chuẩn nội GLI trong các mẫu có qua chiết tách và không qua chiết tách. Kết quả xác định tỷ lệ thu hồi của NIF ở 3 khoảng nồng độ là từ 99 – 106,6%; tỷ lệ thu hồi chuẩn nội GLI là 104,3%.

Mẫu trong huyết tương ổn định trong quá trình xử lý mẫu (5 giờ ở nhiệt độ phòng), sau 3 chu kỳ đông-rã đông và khi bảo quản ở nhiệt độ -600C ± 50C trong vòng 45 ngày. Khoảng thời gian 45 ngày đủ để toàn bộ số mẫu huyết tương của 6 chó nghiên cứu được phân tích hết.

4.3.2. Sinh khả dụng viên nén nifedipin 30mg giải phóng kéo dài

Trước khi đánh giá SKD của viên NIF 30mg GPKD, đề tài đã tiến hành đánh giá tương đương hòa tan của chế phẩm thử với viên đối chiếu Adalat LA 30mg trên 3 môi trường hòa tan có pH 1,2; pH 4,5 và pH 6,8 với các điều kiện được lựa chọn cụ thể là: thiết bị II (cánh khuấy), tốc độ 100 vòng/phút, thể tích môi trường hòa tan 900mL ở nhiệt độ 37 ± 0,50C. Ở mỗi môi trường thử nghiệm thực hiện song song với 12 mẫu viên NIF 30mg GPKD và thuốc đối chiếu Adalat LA 30mg. Độ hòa tan của các chế phẩm được xác định tại 5 thời điểm là 4 giờ, 8 giờ, 12 giờ, 16 giờ và 24 giờ. Lượng NIF giải phóng tại các thời điểm được xác định bằng phương pháp HPLC.

Kết quả thử nghiệm hòa tan cho thấy, ở cả 3 môi trường pH khác nhau, cả 2 chế phẩm đều cho lượng DC giải phóng tại thời điểm 24 giờ trên 85%. Đồng thời hệ số tương đồng f2 của viên NIF 30mg GPKD ở cả ba môi trường đều lớn hơn 50, chứng tỏ viên NIF 30mg GPKD bào chế được tương đương *in vitro* với viên đối chiếu Adalat LA 30mg bằng phép thử độ hòa tan. Điều này có thể lý giải là do giải phóng của NIF từ hệ PPOP không chịu ảnh hưởng của độ pH của môi trường hòa tan, điều này cũng tương tự các kết quả đã được công bố trước đây.

Xác định SKD của 1 chế phẩm là rất quan trọng trong suốt vòng đời của các chế phẩm thuốc trong đánh giá tính an toàn và sự hiệu quả của 1 chế phẩm thuốc. Nghiên cứu SKD *in vivo* tốt nhất là đánh giá trên người tình nguyện khỏe mạnh. Với chế phẩm thuốc GPKD, việc đánh giá trên động vật thí nghiệm còn có ý nghĩa thăm dò về mức độ giải phóng DC, đề phòng thuốc giải phóng ồ ạt gây nguy cơ ngộ độc. Để đánh giá SKD của viên nghiên cứu NIF 30mg GPKD so với viên đối chiếu, đề tài đã lựa chọn đánh giá trên 6 chó thí nghiệm với thiết kế nghiên cứu chéo đôi, ngẫu nhiên, đơn liều, 2 thuốc, 2 giai đoạn nhằm hạn chế ảnh hưởng của sự biến thiên giữa các cá thể và giảm bớt số động vật thực nghiệm. Đây là phương pháp đã được đề cập và áp dụng trong nhiều nghiên cứu những năm trở lại đây. Với số lượng 6 chó thí nghiệm cho phép bước đầu đánh giá và có những kết luận sơ bộ về SKD của viên nghiên cứu so với viên đối chiếu.

Trong đánh giá SKD và TĐSH các thuốc generic, nếu thuốc phát minh không có sẵn trên thị trường tại thời điểm nghiên cứu, có thể sử dụng 1 thuốc tương đương đã được cấp phép thay thế. Với thuốc thử là chế phẩm GPKD hoặc GP biến đổi, thuốc đối chiếu có thể dùng 1 thuốc có chứa cùng DC ở dạng GPKD hoặc GP biến đổi bất kỳ đã được cấp phép hiện đang lưu hành và được thử theo mức liều của thuốc đối chiếu. Do đó, đề tài đã lựa chọn viên đối chiếu là viên Adalat LA 30mg có cùng cơ chế giải phóng bơm thẩm thấu kéo-đẩy được cấp phép lưu hành tại Việt Nam và được thử với cùng mức liều 30mg như viên nghiên cứu.

Chó được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm, mỗi giai đoạn từng nhóm được uống viên nghiên cứu NIF 30mg GPKD hoặc viên đối chiếu Adalat LA 30mg. Thời gian nghỉ giữa 2 giai đoạn được thiết kế là 1 tuần để đảm bảo thuốc sử dụng ở giai đoạn trước được thải trừ hết, do thời gian bán thải của NIF khoảng 2 – 4 giờ[[8](#_ENREF_8)].

Thời điểm và khoảng thời gian lấy mẫu nên thiết kế sao cho có thể ước lượng được Cmax và thu được đường cong nồng độ DC theo thời gian đủ để ước lượng chính xác mức độ hấp thu. Trong đó, với hầu hết các thuốc, số điểm lấy mẫu thường dao động từ 12 – 18, phải có 1 điểm trước khi uống thuốc (thời điểm 0 giờ), nên có ít nhất 3-4 điểm lấy mẫu trước khi đạt Cmax (pha hấp thu), khoảng 3 điểm lấy mẫu xung quanh Cmax và không ít hơn 4-6 điểm ở pha thải trừ[[9](#_ENREF_9)]. Khoảng thời gian lấy mẫu trong đề tài luận án là 96 giờ với 17 thời điểm lấy mẫu đã bao phủ được toàn bộ các quá trình hấp thu, phân bố, chuyển hóa và thải trừ của thuốc.

Tiến hành phân tích các mẫu huyết tương chó ngay sau khi kết thúc lấy mẫu giai đoạn 2 của nghiên cứu bằng phương pháp UPLC-MS/MS theo quy trình đã được xây dựng và thẩm định. Các mẫu huyết tương của mỗi chó phải được phân tích trong cùng điều kiện và cùng 1 ngày. Xác định nồng độ NIF có trong mẫu huyết tương chó dựa vào đường chuẩn được tiến hành song song trong ngày. Quá trình phân tích tuân thủ theo hướng dẫn phân tích mẫu trong dịch sinh học của FDA. Tổng số 204 mẫu của cả hai giai đoạn nghiên cứu trên 6 chó thí nghiệm được phân tích trong 4 ngày. Thời gian tính từ thời điểm lấy mẫu đầu tiên tới khi kết thúc phân tích là 28 ngày, đảm bảo tất cả các mẫu được phân tích trong khoảng thời gian ổn định của mẫu huyết tương đã được thẩm định (45 ngày).

Trên đồ thị nồng độ NIF theo thời gian ở cả hai chế phẩm thử và đối chiếu thể hiện quá trình DĐH đặc trưng của dạng thuốc GPKD. Bên cạnh đó, có sự khác nhau ở các thời điểm 4, 6, 10, 16 và 36 giờ có thể lý giải do dao động giữa các cá thể. Đây là đặc tính thường gặp khi đánh giá thuốc trên động vật thực nghiệm.

Kết quả đánh giá SKD của viên nghiên cứu trên chó thực nghiệm cho thấy có sự biến thiên các thông số DĐH, chứng tỏ có sự khác biệt về tốc độ và mức độ hấp thu NIF giữa các cá thể. Các viên thuốc sử dụng trong nghiên cứu đều duy trì được nồng độ NIF kéo dài trong máu với Tmax trung bình khi uống thuốc thử và thuốc đối chiếu lần lượt là 12,33 ± 3,44 giờ và 11,50 ± 3,33 giờ.Kết quả phân tích phương sai cho thấy ảnh hưởng của thuốc nghiên cứu, trình tự thử, giải đoạn thử đến các thông số DĐH Cmax, AUC0-∞, MRT không có ý nghĩa thống kê với p > 0,05. Tuy nhiên, sự khác nhau giữa các cá thể ảnh hưởng đến AUC0-96 giờ, AUC0-∞ có ý nghĩa thống kê với p< 0,05 cho thấy có sự khác biệt về mức độ hấp thu giữa các cá thể. Do đó, việc đánh giá SKD các chế phẩm NIF GPKD nên tăng cỡ mẫu để thu được kết quả khách quan, đảm bảo ý nghĩa thống kê của nghiên cứu.

Kết quả xác định khoảng tin cậy 90% của tỷ số Cmax, AUC0-∞, MRT giữa thuốc thử và thuốc đối chiếu tính trên số liệu đã chuyển logarit lần lượt là: 90,04% - 107,09%, 94,70% - 121,79%, 90,56% - 107,41%.Các giá trị này tương đương nhau theo hướng dẫn của DĐVN V. Giá trị Tmax của thuốc thử và thuốc đối chiếu khác nhau không có ý nghĩa thống kê với mức tin cậy trên 95%.

Do hạn chế về điều kiện kinh phí nên đề tài luận án chỉ mới dừng lại ở mô hình 6 chó thí nghiệm, số lượng chó mỗi giai đoạn chưa nhiều nên còn hạn chế về mức ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên, với các kết quả nghiên cứu thu được có thể kết luận sơ bộ viên NIF 30mg GPKD có SKD tương tự với viên Adalat LA 30mg ở trạng thái đói và kéo dài được thời gian tác dụng của thuốc trong 24 giờ.

KẾT LUẬN

Từ kết quả nghiên cứu của luận án, có thể rút ra một số kết luận sau:

**1.Đã xây dựng được công thức, quy trình bào chế viên nén nifedipin 30 mg GPKD 24 giờ ở quy mô 2000 viên/mẻ**

Viên NIF GPKD theo cơ chế bơm thẩm thấu kéo – đẩy được bào chế bằng cách dập viên hai lớp, bao màng bán thấm và khoan miệng giải phóng bằng tia laser.

- Đã xây dựng được công thức bào chế viên NIF 30 mg GPKD 24 giờ theo cơ chế bơm thẩm thấu kéo – đẩy. Nghiên cứu sử dụng PEO N10 có KLPT thấp (100.000 Da) làm TD phân tán trong lớp DC và PEO 303 có KLPT cao (7000.000 Da) làm polymer trương nở trong lớp đẩy, natri clorid đóng vai trò làm TD tạo ASTT có mặt ở cả 2 lớp. Công thức lựa chọn có lượng PEO N10, PEO 303 lần lượt trong lớp DC và lớp đẩy tương ứng là 106,1 mg và 71,85 mg; có KLMB tăng 12% so với viên nhân, kích thước miệng giải phóng là 0,8 mm. Kết quả nghiên cứu cho thấy viên bào chế có khả năng kiểm soát giải phóng DC theo động học bậc không đến 20 giờ.

- Đã xây dựng được quy trình bào chế viên NIF 30 mg GPKD ở quy mô 2000 viên/mẻ với các thông số phù hợp. Quy trình đã được thẩm định các thông số trọng yếu.

**2. Đã xây dựng được tiêu chuẩn chất lượng và bước đầu đánh giá độ ổn định của viên nén nifedipin 30 mg GPKD**

- Đã xây dựng được các tiêu chuẩn chất lượng về hình thức, định tính, định lượng, độ đồng đều khối lượng, độ hòa tan và tạp chất liên quan của viên nén NIF 30 mg GPKD.

- Chế phẩm được theo dõi độ ổn định với bốn chỉ tiêu về hình thức, hàm lượng, độ hòa tan và tạp chất liên quan ở điều kiện thực và lão hóa cấp tốc. Sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc và 12 tháng theo dõi ở điều kiện thực, chế phẩm của 3 mẻ bào chế ở quy mô 2000 viên/mẻ không thay đổi về hình thức, hàm lượng NIF trong viên vẫn đạt trên 95%, độ hòa tan có thay đổi nhưng không đáng kể so với thời điểm ban đầu và đạt yêu cầu về độ hòa tan theo tiêu chuẩn cơ sở đã xây dựng, hàm lượng tạp chất ở điều kiện lão hóa cấp tốc tương đối nhỏ, nằm trong giới hạn cho phép và không xuất hiện tạp ở điều kiện thực.

**3. Đã bước đầu đánh giá được sinh khả dụng của viên nén nifedipin 30 mg GPKD trên chó thực nghiệm**

- Đã xây dựng và thẩm định được phương pháp định lượng NIF trong huyết tương chó bằng phương pháp UPLC MS/MS. Phương pháp đạt các yêu cầu về phân tích hoạt chất trong dịch sinh học theo hướng dẫn của FDA, EMA và DĐVN V.

- Đã bước đầu đánh giá được SKD viên NIF 30 mg GPKD bào chế được trên chó thực nghiệm ở trạng thái đói. Bước đầu có thể kết luận viên NIF 30 mg GPKD bào chế được tương đương về SKD so với viên đối chiếu Adalat LA 30 mg đang lưu hành trên thị trường Việt Nam theo quy định của DĐVN V.

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nâng cấp quy mô bào chế 10.000 viên/lô trước khi triển khai và hoàn thiện quy trình sản xuất viên nén NIF 30 mg 2 lớp dạng bơm thẩm thấu kéo – đẩy vào thực tế sản xuất công nghiệp. Tiếp tục đánh giá độ ổn định và đánh giá SKD, TĐSH viên NIF GPKD.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Bộ môn bào chế - Trường đại học Dược Hà Nội (2005). *Một số chuyên đề về bào chế hiện đại*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội: 85-113, 132-157, 210-239.

2. Keraliya R.A., Patel C., Patel P., et al. (2012). Osmotic drug delivery system as a part of modified release dosage form. *ISRN pharmaceutics*,2012 1-9.

3. Zhang Z., Peng B., Yang X., et al. (2009). Design and Evaluation of a Novel Floating Osmotic Pump System. *J Pharm Pharmaceut Sci*,12 (1): 129 -137.

4. Phạm Tử Dương (2003). *Thuốc tim mạch*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội: 300-304.

5. Bộ Y tế (2018). *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội: 1056-1058.

6. O'Rourke R.A. (1985). Rationale for calcium entry-blocking drugs in systemic hypertension complicated by coronary artery disease. *The American Journal of Cardiology*,56 (16): 34H - 40H.

7. Sweetman S.C. (2014). *Martindale : The Complete Drug Reference, 38th edn*, Pharmaceutical Press, London, UK: 1447-1455.

8. Tolia P., Patel M., Bhagat H. (2014). Development and characterization of release profile of nifedipine as an effective controlled release system by using proportion of various amount of HPMC with different particle size of nifedipine with cost benefit point of view. *IJPRBS*,3 (2): 525-539.

9. Bộ Y tế (2017). *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội: 678, PL. 203, PL. 249.

10. Sigma supplier (1996). *Product Information*, Sigma, USA: No. N7634.

11. Florey K. (1989). *Analytical Proﬁles of Drug Substances*, Academic Press, InC, New York: 221-288.

12. British Pharmacopoeia Commission (2014). *British Pharmacopoeia* The Pharmaceutical Press, London, UK.

13. Naveed S., Qamar F., Zainab S., et al. (2015). Simple UV Spectrophotometric Assay of Nifedipine. *Journal of Biotechnology and Biosafety,* ,3 (3): 255-259.

14. The United States Pharmacopeial Convention InC. (2015). *The United States Pharmacopeia and National Formulary: USP 38 NF 33*, Rockville, 4555, 497.

15. Phạm Thị Minh Huệ (2003). *Nghiên cứu bào chế viên nén Nifedipin tác dụng kéo dài*, Luận án tiến sĩ dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội: 49 - 50.

16. Remunan C., Mrhar A., Primozis S., et al. (2008). Sustained release nifedipine formulations: Moment, Modelling and Simulation as pharmacokinetic analysis approach. *Drug Development and Industrial Pharmacy*,18 (2): 187-202.

17. Pillai G.K., Younis H.M., Sallam E., et al. (1998). Design of oral sustained-release nifedipine using semisolid matrix systems. *International Journal of Pharmaceutical Medicine*,12 (3): 155-158.

18. Aderibigbe S.A., Adegoke O.A., Idowu O.S. (2012). A new colorimetric method for the determination of nifedipine tablets by derivatization using 4-carboxyl-2,6-dinitrobenzene diazonium ion. *International Journal of Industrial Chemistry* 3(5): 1-8.

19. Veronico M., Ragno G., Vetuschi C. (2006). Simultaneous Assay of Atenolol and Nifedipine by UV Derivative Spectrophotometry and Gaschromatography. *Spectroscopy Letters*,28 (3): 407-415.

20. Uday Y.A., Patel S.K., Kumar D., et al. (2011). Estimation of nifedipine by reverse phase high performance liquid chromatography tablet dosage form. *Int. J. of Pharm. & Life Sci*,2 (3): 610-612.

21. Hamann S. R., McAllister R. G. (1983). Measurement of nifedipine in plasma by gas-liquid chromatography and electron-capture detection. *Clin Chem*,29 (1): 158-60.

22. Akira K., Baba S., Aoki S. (1988). Quantitative determination of nifedipine and its metabolite in hamster plasma by radio-gas chromatography. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*,36 (8): 3000-3007.

23. Jankowski A., Lamparczyk H. (1994). Evaluation of chromatographic methods for the determination of nifedipine in human serum. *Journal of Chromatography A*,668 (1994): 469-473.

24. Patrick K.S. (1989). Gas Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis Of Plasma Nifedipin. *Journal of Chromatography*,495 (1989): 123-130.

25. Cục quản lý dược Việt Nam (2020). *Đăng ký thuốc và nguyên liệu làm thuốc tại Việt Nam*, <http://dichvucong.dav.gov.vn/congbothuoc/index>, 12/12/2020.

26. Kanagale P., Patel V., Venkatesan N., et al. (2008). Pharmaceutical development of solid dispersion based osmotic drug delivery system for nifedipine. *Curr Drug Deliv*,5 (4): 306-311.

27. Misra M., Bagul N., Patel V., et al. (2012). Design and development of solid self emulsifying osmotic delivery system of nifedipine. *Archives of Pharmacy Practice*,3 (2): 128-135.

28. Nguyễn Ngọc Chiến, Trần Thị Vân Anh (2010). Nghiên cứu bào chế viên nén nifedipin giải phóng theo nhịp. *Tạp chí Dược học*,4 (408): 14-16.

29. Akhtar S., Chandrawanshi H., Patel M., et al. (2015). Formulation and optimization of sustained release matrix tablet of nifedipine using different grades of HPMC. *Panacea Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4(3): 617-653.

30. Barzegar J.M., Hanaee J., Omidi Y., et al. (2013). Formulation and Evaluation of Sustained Release Dosage Form of Nifedipine Hydrochloride Using Hydrophilic Polymers. *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*,2 (1): 32-37.

31. Thakare V.M., Tekade B.W., Patil A.M., et al. (2014 ). Design and Development of nifedipine bilayer tablet. *International Journal of Advanced Pharmaceutics*,4 (2): 108-119.

32. Vũ Thị Huỳnh Hân (2007). Kết quả nghiên cứu bào chế viên nén phóng thích kéo dài chứa nifedipin 20mg. *Tạp chí Y học Tp. HCM*,11 (4): 203-207.

33. Lâm Huệ Quân,Nguyễn Thiện Hải (2010). Nghiên cứu bào chế viên nén phóng thích kéo dài chứa nifedipin 30mg. *Tạp chí Y học Tp. HCM*,14 (S1): 41-46.

34. Akelesh T., Perla S.,Venkatnarayanan R. (2011). Formulation and Evaluation of Nifedipine Sustained Release Pellets. *International Research Journal of Pharmacy*,2 (8): 177-180.

35. Ige PP., Rajput P., Pardeshi C., et al. (2013). Development of pellets of nifedipine using HPMC K15 M and κ-carrageenan as mucoadhesive sustained delivery system and in vitro evaluation. *Iranian Polymer Journal*,22 (12): 911-921.

36. Zheng W., Wei Y., Ye Y., et al. (2013). Development and pharmacokinetic evaluation of once-daily sustained-released matrix capsules of nifedipine using solid dispersion technique. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*,7 (12): 658-665.

37. Zhao L., Wei Y.M., Yu Y., et al. (2010). Polymer blends used to prepare nifedipine loaded hollow microspheres for a floating-type oral drug delivery system: in vitro evaluation. *Arch Pharm Res*,33 (3): 443-450.

38. Bashir S., Asad M., Qamar S., et al. (2014). Development of Sustained-Release Microbeads of Nifedipine and In vitro Characterization. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*,13 (4): 505-510.

39. Nokhodchi A., Momin M.N., Shokri J., et al. (2008). Factors affecting the release of nifedipine from a swellable elementary osmotic pump. *Drug Deliv*,15 (1): 43-48.

40. Liu L.,Xu X. (2008). Preparation of bilayer-core osmotic pump tablet by coating the indented core tablet. *International Journal of Pharmaceutics*,352 (1-2): 225-230.

41. Kumaravelrajan R., Narayanan N.,Suba V. (2011). Development and evaluation of controlled porosity osmotic

pump for nifedipine and metoprolol combination. *Lipids Health Dis*,10 (1): 1-13.

42. Patel C.J. , Rajesh A. , Sangeeta A. , et al. (2012). Development and Evaluation of Self Pore Forming Osmotic Tablets of Nifedipine. *Research Journal of Pharmaceutical Dosage Forms and Technology*,4 (4): 207-210.

43. Kumaravelrajan R., Narayanan N., Suba V., et al. (2010). Simultaneous delivery of Nifedipine and Metoprolol tartarate using sandwiched osmotic pump tablet system. *International Journal of Pharmaceutics*,399 (1–2): 60-70.

44. Liu L., Ku J., Khang G., et al. (2000). Nifedipine controlled delivery by sandwiched osmotic tablet system. *J Control Release*,68 (2): 145-156.

45. Liu L., Khang G., Rhee J.M., et al. (2000). Monolithic osmotic tablet system for nifedipine delivery. *Journal of Controlled Release*,67 (2-3): 309-322.

46. Thakor R., Majmudar F., Patel J., et al. (2010). Formulation and Evaluation of Monolithic Osmotic Tablets For Controlled Delivery of Nifedipin. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*,1 (8): 59-66.

47. Garg V. (1988). *Formulation of an oral controlled release dosage form for nifedipin*, Master's Theses, University of Rhode Island United State of American: ii-iii.

48. Prasoon P., Devi D.R.,Hari B.N.V. (2014). Push-pull osmotic tablets - An overview with its commercial significance. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*,5 (3): 12 - 25.

49. Rathore G.S., Gupta R.N., Gupta R., et al. (2009). Osmotically controlled oral drug delivery systems: a review. *Int. J. Pharm. Sci*,1 (2): 75-269.

50. Zhang Z., Dong H., Peng B., et al. (2011). Design of an expert system for the development and formulation of push–pull osmotic pump tablets containing poorly water-soluble drugs. *International journal of pharmaceutics*,410 (1-2): 41-47.

51. Swanson D.R., Barclay B.L., Wong P.S.L., et al. (1987). Nifedipine gastrointestinal therapeutic system. *The American journal of medicine*,83 (6): 3-9.

52. Ketjinda W., Sinchaipanid N., Limsuwan P., et al. (2011). Development of Push–Pull Osmotic Tablets Using Chitosan–Poly (Acrylic Acid) Interpolymer Complex as an Osmopolymer. *Aaps Pharmscitech*,12 (1): 132-140.

53. Shah A., Shah V.,Upadhyay U.M. (2012). Development and evaluation of push-pull based osmotic delivery system for ropinirole. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*,3 (9): 3211-3218.

54. Li G., Wang Y., Chen H., et al. (2015). Can semipermeable membranes coating materials influence in vivo performance for paliperidone tri-layer ascending release osmotic pump tablet: In vitro evaluation and in vivo pharmacokinetics study. *asian journal of pharmaceutical sciences*,10 (2): 128-137.

55. Verma R.K., Krishna D.M.,Garg S. (2002). Formulation aspects in the development of osmotically controlled oral drug delivery systems. *Journal of controlled release*,79 (1-3): 7-27.

56. Shahithi C., Prathyusha A.,Rao V.U.M. (2015). A review on oral osmotically driven system. *Int Journal of innovative Pharm Sciences and Research*,3 (5): 423-439.

57. Malaterre V., Ogorka J., Loggia N., et al. (2009). Evaluation of the tablet core factors influencing the release kinetics and the loadability of push–pull osmotic systems. *Drug development and industrial pharmacy*,35 (4): 433-439.

58. Zhao Z., Wu C., Zhao Y., et al. (2015). Development of an oral push–pull osmotic pump of fenofibrate-loaded mesoporous silica nanoparticles. *International journal of nanomedicine*,10 1691–1701.

59. Sancheti V.N. (2014). *Design and development of osmotically controlled drug delivery system for antihypertensive drug*, Doctor of philosophy, KK College of Pharmacy,, Chennai, India: 5 - 6, 17-18, 22.

60. Babasaheb B., Sandip H.,Sachin D. (2014). Osmotic drug delivery system: An overview. *International Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Research*,2 (1): 29-44.

61. Garg S.,Kaushal A.M. (2003). An update on osmotic drug delivery patents. *Pharmaceutical technology*,27 (8): 38-44.

62. Gupta S., Singh R.P., Sharma R., et al. (2011). Osmotic pumps: A review. *International journal of comprehensive pharmacy*,6 (1): 1 - 8.

63. Maurya B., Parashar B., Yadav V., et al. (2012). A review on osmotically regulated devices. *The pharma innovation*,1 (4): 48-56.

64. Gupta B.P., Thakur N., Jain N.P., et al. (2010). Osmotically controlled drug delivery system with associated drugs. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*,13 (4): 571-588.

65. Rathee P., Ahuja N.,Kumar V. (2012). Osmotic-controlled release oral delivery system: an advanced oral delivery form. *The Pharma Innovation*,1 (7): 116-124.

66. Ghosh T.,Ghosh A. (2011). Drug delivery through osmotic systems—an overview. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*,2 (1): 38-49.

67. Patel H., Patel U., Kadikar H., et al. (2012). A Review on Osmotic Drug Delivery System. *International Research Journal of Pharmacy*,3 (4): 88-94.

68. Patra C.N., Swain S., Sruti J., et al. (2013). Osmotic drug delivery systems: Basics and design approaches. *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation* 7(2): 1 - 12.

69. Patel H,Parikh V.P. (2017). An overview of osmotic drug delivery system: an update review. *International Journal of Bioassays*,6 (7): 5426-5436.

70. Hao H., Jia Y., Zhang H., et al. (2015). Preparation of monolithic osmotic tablet of quercetin loaded by solid dispersion. *J. Chin. Pharm. Sci*,24 (6): 383–392.

71. Hong W.,Kinam P. (2010). *Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery Theory to Practice*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey: 138-139.

72. Li W., Du G., Yang X., et al. (2008). In vitro and in vivo evaluation of a novel push–pull osmotic pump with orifices on both side surfaces. *Drug development and industrial pharmacy*,34 (12): 1350-1355.

73. Lu E.X., Jiang Z.Q., Zhang Q.Z., et al. (2003). A water-insoluble drug monolithic osmotic tablet system utilizing gum arabic as an osmotic, suspending and expanding agent. *Journal of controlled release*,92 (3): 375-382.

74. Thombre A.G., Appel L.E., Chidlaw M.B., et al. (2004). Osmotic drug delivery using swellable-core technology. *Journal of Controlled Release*,94 (1): 75-89.

75. Zhang Z., Li W., Nie S., et al. (2009). Overcome side identification in PPOP by making orifices on both layers. *International journal of pharmaceutics*,371 (1-2): 1-7.

76. Vũ Thị Thanh Huyền (2020). *Nghiên cứu bào chế viên felodipin 5 mg giải phóng kéo dài theo cơ chế thẩm thấu*, Luận án Tiến sĩ dược học, Học viện Quân y, Hà Nội: 8-13.

77. Theeuwes F. (1975). Elementary osmotic pump. *Journal of pharmaceutical sciences*,64 (12): 1987-1991.

78. Farheen F.,Bharadwaj S. (2014). A review on osmotically regulated systems. *Pharmatutor Magazine*,2 (5): 51-64.

79. Nikam P.H., Kareparamban J.A., Jadhav A.P., et al. (2012). Osmotic pump: A reliable drug delivery system. *RJPBCS*,3 (3): 478-494.

80. Kumar D., Sharma A.,Painuly N. (2018). A Review on Osmostically Controlled Drug Delivery Systems. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*,6 (4): pp. 101-109.

81. Kannadasan M.,Rastogi H. (2016). A Complete Conclusion of Osmotic Drug Delivery System to Date. *Critical Review in Pharmaceutical Sciences*,5 (2): 23-48.

82. Pujara N.D., Thacker A.P., Dudhat K.R., et al. (2012). Osmotically Controlled Oral Drug Delivery Systems: A Novel Approach. *Inventi Rapid: NDDS*,2012 (4): 1-8.

83. Shaikh S.N., Khan G.J., Shaikh M.F., et al. (2016). Pulsincap Osmotically Driven Capsule Based On Push-Pull Technology: An Overview. *Int. J. Chem, Pharm, Sci.*,4 (1): 50-56.

84. Khatri P., Desai D., Shelke N., et al. (2018). Role of plasticizer in membrane coated extended release oral drug delivery system. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*,44 231-243.

85. Jadhav A., Gangode B., Chavan D., et al. (2016). A Review on Oral Osmotically Driven Systems. *Indian Journal of Drugs*,4 (4): 168-182.

86. Wu C., Zhao Z., Zhao Y., et al. (2014). Preparation of a push-pull osmotic pump of felodipine solubilized by mesoporous silica nanoparticles with a core-shell structure. *Int J Pharm*,475 (1-2): pp. 298-305.

87. Panda S.K.,Dinda S.C. (2014). Development and In-Vitro / In-Vivo Assessment of Extended Release Tablets of Nifedipine *American Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*,1 (2): 44-53

88. Chaudhary R.S., Gangwal S.S., Gupta V.K., et al. (1993). Dissolution system for Nifedipine Sustained Release Formulations. *Drug Development and Industrial Pharmacy*,19 (15): 1939-1946.

89. Liu X., Chen D.,Zhang R. (2003). Evaluation of monolithic osmotic tablet system for nifedipine delivery in vitro and in vivo. *Drug Dev Ind Pharm*,29 (7): 813-819.

90. Garbacz G., Golke B., Wedemeyer R.S., et al. (2009). Comparison of dissolution profiles obtained from nifedipine extended release once a day products using different dissolution test apparatuses. *Eur J Pharm Sci*,38 (2): 147-55.

91. Wonnemann M., Schug B., Anschutz M., et al. (2008). Comparison of two marketed nifedipine modified-release formulations: an exploratory clinical food interaction study. *Clin Ther*,30 (1): 48-58.

92. Mukhopadhyay A., Reddy S., Ahmad I., et al. (2013). Estimation of nifedipine in human plasma by LC MS/MS *Asian J Pharm Clin Res*,6 (1): 83 - 86.

93. Aryal B., Bajracharya S.R.,Neupane M.S. (2015). Development of Simple Analytical Method to Determine Nifedipine Rat Plasma. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archive*,5 (4): 89 - 94

94. Ezzeldin E., Abo-Talib N.F., Tammam M.H., et al. (2014). Development and validation of LC/MS/MS method for the simultaneous determination of montelukast, gliclazide, and nifedipine and its application to a pharmacokinetic study. *Chem Cent J*,8 (1): 17.

95. Baviskar D., Sharma S.,Jain D. (2009). Determination of Nifedipine in Human Plasma by Tandem Mass Spectrometry. *Asian Journal of Chemistry*,21 (9): 7309-7315.

96. Bach P.R. (1983). Determination of nifedipine in serum or plasma by reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem*,29 (7): 1344-1348.

97. Zendelovska D., Simeska S., Sibinovska O., et al. (2006). Development of an HPLC method for the determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction. *Journal of Chromatography B*,839 (1–2): 85-88.

98. Patel D.P., Sharma P., Sanyal M., et al. (2012). Highly sensitive and rapid ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of nifedipine in human plasma and its application to a bioequivalence study. *Biomed Chromatogr*,26 (12): 1509-18.

99. Mennickent S., Contreras J., Schulz B., et al. (2012). High performance thin layer chromatographic determination of nifedipine in human serum after liquid-liquid extraction. *Química Nova*,35 (2): 411-415.

100. Abou-Auda H. S., Najjar T. A., Al-Khamis K.I., et al. (2000). Liquid chromatographic assay of nifedipine in human plasma and its application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,22 (2): 241-249.

101. Filgueira G.C., Filgueira O.A., Carvalho D.M., et al. (2015). Analysis of nifedipine in human plasma and amniotic fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application to clinical pharmacokinetics in hypertensive pregnant women. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,993-994 (1): 20-25.

102. Abdollahi M., Pirali M., Karim M., et al. (1999). High performance liquid chromatography method for determination of Nifedipine in human plasma. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*,7 (4): 1-4.

103. Guo Y., Dai J., Qian G., et al. (2007). Determination of nifedipine in human plasma and its use in bioequivalence study. *International Journal of Pharmaceutics*,341 (1–2): 91-96.

104. Waller D.G., Renwich A.G., Gruchi B.S., et al. (1984). The first pass metabolism of nifedipine in man. *Br. J. clin. Pharmac.*,18 951-954.

105. Pan X., Zhou S., Fu Q., et al. (2014). Determination of nifedipine in dog plasma by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. *Biomed Chromatogr*,28 (7): 1036-40.

106. Niopas I.,Daftsios A.C. (2003). Determination of nifedipine in human plasma by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography: validation and application to pharmacokinetic studies. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*,32 (6): 1213-1218.

107. Vertzoni M.V., Reppas C.,Archontaki H.A. (2006). Sensitive and simple liquid chromatographic method with ultraviolet detection for the determination of nifedipine in canine plasma. *Anal Chim Acta*,573-574 298-304.

108. Gurley B.J., Buice R.G.,Sidhu P. (1985). Reversed-phase high performance liquid chromatographic determination of nifedipine in human plasma. *Ther Drug Monit*,7 (3): 321-3.

109. Horvai G., Hrabéczy-P A., Horváth V., et al. (1994). Determination of nifedipine in human plasma by high performance liquid chromatography using column-switching technique. *Microchimica acta*,113 (3-6): 171-178.

110. Horváth V., Hrabéczy-Páll A., Niegreisz Z., et al. (1996). Sensitive high-performance liquid chromatographic determination of nifedipine in dog plasma using an automated sample preparation system with laboratory robot. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*,686 (2): 211-219.

111. Streel B., Zimmer C., Sibenaler R., et al. (1998). Simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*,720 (1-2): 119-28.

112. Chen R., Huang J., Lv C., et al. (2013). A more rapid, sensitive, and specific HPLC-MS/MS method for nifedipine analysis in human plasma and application to a pharmacokinetic study. *Drug Res (Stuttg)*,63 (1): 38-45.

113. Wang X.D., Li J.L., Lu Y., et al. (2007). Rapid and simultaneous determination of nifedipine and dehydronifedipine in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Application to a clinical herb-drug interaction study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,852 (1-2): 534-44.

114. Wang D., Jiang K., Yang S., et al. (2011). Determination of nifedipine in human plasma by ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its application in a pharmacokinetic study. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*,879 (20): 1827-32.

115. Dankers J., Elshout J.V.D., Ahr G., et al. (1998). Determination of nifedipine in human plasma by flow-injection tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*,710 (1-2): 115–120.

116. Nidhi N.K., Neelam I., Ajitha A., et al. (2014). An Oveview on HPLC, UPLC and Its Troubleshooting. *International Journal of Pharmaceutical Research & Analysis*,4 (4): 265-273.

117. Sridhar S., Divya S., Madhuri R., et al. (2013). UPLC - A Dynamic and Expeditious Approach to Liquid Chromatography. *IJPCBS*,3 (4): 1139-1152.

118. Wei L.J., Wei L., Ailing M., et al. (2008). Bioequivalent study of nifedipine sustained-release tablets in healthy volunteers. *Chinese Journal of Clinical Pharmacy*,17 (4): 238-242.

119. WHO (2006). *Stability Testing of Active Substances and Pharmaceutical Products*, Department of Medicines Policy and Standards, Geneva, Switzerland.

120. Food and Drug Administration (2003). *Guidance for Industry Q1A(R2) Stability Testing of New Drug Substances and Products*, U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, USA.

121. The ICH (2003). *Harmonised Tripartite Guideline: Evaluation for stability data Q1E*, The ICH Steering Committee, Geneva, Switzerland.

122. ACCSQ/PPWG (2005). *Asean Guideline On Stability Study Of Drug Product*, Asean, Philippines.

123. Food and Drug Administration (2018). *Guidance for Industry : Bioanalytical Method Validation* U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, USA.

124. Thông tư 32/2018/TT-BYT (2018). *Quy định việc đăng ký lưu hành thuốc, nguyên liệu làm thuốc*, 1 - 51.

125. European Medicine Agency (2012). *Guideline bioanalytical method validation*, Committee for Medicinal Products for Human Use London, UK.

126. Food and Drug Administration (2019). *Guidance for Industry: Bioavailability Studies Submitted in NDAs or INDs — General Considerations* U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, USA.

127. Bolton S.,Charles B. (2010). *Drugs and the Pharmaceutical Sciences: Pharmaceutical Statistic - Practical Clinical Application*, Informa healthcare, New York: 163-164.

128. Malaterre V., Ogorka J., Loggia N., et al. (2009). Approach to design push–pull osmotic pumps. *International Journal of Pharmaceutics*,376 (1–2): 56-62.

129. Missaghi S., Patel P., Farrell T.P., et al. (2014). Investigation of critical core formulation and process parameters for osmotic pump oral drug delivery. *AAPS PharmSciTech*,15 (1): 149-160.

130. Wu C., Zhao Z., Zhao Y., et al. (2014). Preparation of a push–pull osmotic pump of felodipine solubilized by mesoporous silica nanoparticles with a core–shell structure. *International Journal of Pharmaceutics*,475 (1-2): 298 - 305.

131. Bộ Y tế (2014). *Kỹ thuật bào chế và sinh dược học các dạng thuốc*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội: 155.

132. Yang L., Venkatesh G.,Fassihi R. (1996). Characterization of compressibility and compactibility of poly(ethylene oxide) polymers for modified release application by compaction simulator. *J Pharm Sci*,85 (10): 1085-90.

133. Muthulingam C., Sona P.S., Shrivastava B., et al. (2013). Development and optimization of push pull osmotic tablets of lamotrigine using design of experiments. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*,22 (2): 96-102.

134. Patel V., Chudasama A., Nivsarkar M., et al. (2012). Push-pull osmotic pump for zero order delivery of lithium carbonate: Development and in vitro characterization. *Pharmaceutical development and technology*,17 (3): 375-382.

135. Malaterre V., Metz H., Ogorka J., et al. (2009). Benchtop-magnetic resonance imaging (BT-MRI) characterization of push-pull osmotic controlled release systems. *J Control Release*,133 (1): 31-36.