

**BỘ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP.HỒ CHÍ MINH**

**BÁO CÁO TỔNG KẾT
KHOA HỌC VÀ KỸ THUẬT ĐỀ TÀI
NGHIÊN CỨU CẤP NHÀ NƯỚC**

TÊN ĐỀ TÀI
**NGHIÊN CỨU NÂNG CAO
CHẤT LƯỢNG MỘT SỐ CHẾ PHẨM
THUỐC SẢN XUẤT TRONG NƯỚC**

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI: PGSTS. LÊ QUAN NGHIỆM

CƠ QUAN CHỦ TRÌ: ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP.HỒ CHÍ MINH

THỜI GIAN THỰC HIỆN: 2001 - 2004

TP. HỒ CHÍ MINH – 9/ 2004

*Tài liệu này được chuẩn bị trên cơ sở kết quả thực hiện
đề tài độc lập cấp nhà nước giai đoạn 2001 - 2005*

2005-64-257/kq

5335

19/5/2005

DANH SÁCH CÁC ĐỀ TÀI NHÁNH

STT ĐỀ TÀI	TÊN ĐỀ TÀI NHÁNH	CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI NHÁNH	ĐƠN VỊ
1	Nghiên cứu bào chế viên bao tan trong ruột serratio peptidase	PGS. TS. Lê Quan Nghiệm ThS. Lê Văn Lăng	Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
2	Nghiên cứu bào chế bột đông khô của vi khuẩn lactic làm men tiêu hoá	PGS.TS. Nguyễn Văn Thanh	Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
3	Nghiên cứu bào chế viên bao chứa amoxicilin và acid clavulanic	PGS. TS. Lê Quan Nghiệm ThS. Trịnh Thị Thu Loan	Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
4	Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật vi nang để bào chế thuốc viên vitamin có sinh khả dụng và độ ổn định cao	PGS.TS. Phạm Ngọc Bùng	Đại Học Dược Hà Nội
5	Nghiên cứu điều chế nguyên liệu dược dụng và viên nén Magaldrat	TS. Đỗ Minh Quang	Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
6	Nghiên cứu bào chế viên nang phóng thích kéo dài với hoạt chất diclofenac natri	PGS. TS. Lê Quan Nghiệm TS. Lê Hậu	Đại Học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

DANH SÁCH NHỮNG NGƯỜI THỰC HIỆN CHÍNH

STT	HỌ TÊN	NHIỆM VỤ	ĐƠN VỊ
1	PGS.TS. Lê Quan Nghiệm	CN đề tài nhánh	ĐHYDƯỢC TPHCM
2	THS. Lê văn Lăng	1,3,6	"
3	THS. Trần quốc Thanh	CN đề tài nhánh 1	"
4	DS Lê Thị Đỗ Quyên	Tham gia nhánh 1	"
5	DS Nguyễn Thị Hải Uyên	"	"
6	THS. Lê thị Minh Nguyệt	"	ĐẠI HỌC Y DƯỢC HUẾ
		"	
7	PGSTS.Nguyễn văn Thanh	CN đề tài nhánh 2	ĐH Y DƯỢC TPHCM
8	Ths. Huỳnh thị Ngọc Lan	Tham gia nhánh 2	"
9	Ths. Hồ thi Yến Linh	"	"
10	PGS.TS. Mai Phương Mai	"	"
11	ThS.Nguyễn Trọng Hiệp	"	"
12	TS. Trần Cát Đông	"	"
13	ThS Phạm thị Minh Tâm	"	PV Kiểm NghiệmTPHCM
14	ThS. Trịnh Thị Thu Loan	CN đề tài nhánh 3	ĐH Y DƯỢC TPHCM
15	PGS.TS. Đặng Văn Giáp	Tham gia nhánh 3	"
16	Nguyễn Vũ Quốc Trung	"	"
17	Nguyễn Thị Mộng Đào	"	"
18	Nguyễn Thị Minh Uyên	"	"
19	Nguyễn Thanh Sang	"	"
20	TS. Nguyễn Đức Tuấn	"	"
21	Lưu Huỳnh Ngọc Dũng	"	"
22	Nguyễn Thị Quế Phương	"	"
23	DS. Phạm Thanh Liễu	"	Công ty dược quận 4
24	DS. Trương Thị Thu Lan	"	PV Kiểm nghiệm TPHCM

STT	HỌ TÊN	NHIỆM VỤ	ĐƠN VỊ
25	PGSTS. Phạm Ngọc Bùng	CN đề tài nhánh 4	Đ H DƯỢC Hà Nội
26	TS. Nguyễn thị Song Hà	Tham gia nhánh 4	“
27	Ths. Vũ thị Thu Giang	“	“
28	Ths. Đỗ thị Hoà	“	“
29	Ths. Nguyễn Trung Hiếu	“	“
30	DS. Hoàng văn Đức	“	“
31	PGSTS. Thái Phan Quỳnh Như	“	Viện Kiểm Nghiệm
32	TS. Nguyễn Kim Thanh	“	Viện Dinh Dưỡng
33	DSCK. II Trần Bình Duyên	“	Công Ty Dược Liệu TWI
34	DS. Đoàn văn Đồi	“	Công Ty Dược Nam Hà
35	TS. Đỗ Minh Quang	CN đề tài nhánh 5	ĐH Y DƯỢC TPHCM
36	PGS. Mai Long	tham gia nhánh 5	“
37	Ts. Phạm văn Nguyễn	tham gia nhánh 4,5	“
38	DS. Trần Phi Hoàng Yến	tham gia nhánh 5	“
39	Ths. Lê Minh Uyên	“	“
40	DS. Trần Lê Tuyết Châu	“	“
41	TS. Lê Hậu	CN đề tài nhánh 6	ĐHY DƯỢC TPHCM
42	DS. Lê Văn Điển	Tham gia nhánh 6	“
43	DS. Nguyễn Trung Lương	“	“
44	PGS.TS. Nguyễn Minh Đức	Thư ký khoa học	ĐHY DƯỢC TPHCM

BẢNG CHÚ GIẢI CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Aug	Augmentin
ASAT	Aspartat amino transferase
ALAT	Alanin amino transferase
B ₁ .NO ₃	Vitamin B1 dạng muối nitrat
B ₁ .HCl	Vitamin B1 dạng muối chlorhydrat
CT	Công thức
CV	Hệ số phân tán
HL	Hàm lượng
HPLC, SKLHNC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HPMC	Hydroxy propyl methyl cellulose
KL	Khối lượng
MIC	Nồng độ ức chế tối thiểu
NC	Nghiên cứu
NTN	Người tình nguyện
PEG	Polyethylenglycol
RSD	Độ lệch chuẩn tương đối
TB	Trung bình
SD	Độ lệch chuẩn
TĐSH	Tương đương sinh học
SER	Serratiopeptidase hay Serrapeptase
CAP	Cellulose aceto phtalat
Dd	Dung dịch
KNTHA	Khả năng trung hoà acid
DEP	Diethyl phtalat
DFN	Diclofenac natri
FDA	Cơ quan quản lý Thực phẩm và Dược Phẩm Hoa Kỳ (United States Food and Drug Administration)
SKD	Sinh khả dụng
STT	Số thứ tự
TDKD	Tác dụng kéo dài
PTKD	Phóng thích kéo dài
USP	Dược điển Hoa Kỳ (United States Pharmacopoeia)
ĐĐVN	Dược điển Việt Nam
BP	Dược điển Anh

BÀI TÓM TẮT

Với mục tiêu áp dụng các kỹ thuật, công nghệ để bào chế các dược phẩm thông dụng nhưng kém ổn định, các dạng thuốc mới chưa được nghiên cứu sản xuất ở Việt Nam có chất lượng ổn định, tuổi thọ hợp lý, tương đương sinh học với các dược phẩm cùng loại có uy tín trên thị trường, đề tài gồm 6 đề tài nhánh kết quả nghiên cứu được tóm tắt như sau.

1. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ VIÊN BAO TAN TRONG RUỘT SERRATIOPEPTIDASE

1.1. Khảo sát phương pháp định lượng serratiopeptidase (SER)

- Nguyên tắc chung của phương pháp định lượng SER là xác định hoạt lực phân giải casein của SER trên cơ sở định lượng tyrosin được tạo thành bằng phản ứng màu với thuốc thử folin rồi đo độ hấp thụ ở bước sóng 660 nm.
- Sự khảo sát cho thấy các qui trình thực hiện khác nhau cho kết quả khác nhau.
- Qui trình B được lựa chọn do tiến hành mẫu thử và mẫu chuẩn trong điều kiện hoàn toàn giống nhau nên loại bỏ được sự khác biệt giữa hai môi trường và các yếu tố khác

1.2. Thẩm định qui trình định lượng SER về độ tuyến tính, độ chính xác, độ đúng. Kết quả thẩm định cho thấy qui trình đáp ứng yêu cầu một qui trình phân tích

1.3. Khảo sát hàm lượng một số chế phẩm viên bao SER

Đã lấy mẫu và định lượng 17 chế phẩm trên thị trường

- Kết quả cho thấy viên bao chứa SER trên thị trường không đạt tiêu chuẩn về hàm lượng khá cao (11/17 chiếm tỉ lệ 64,71%).

1.4. Xây dựng phương pháp thử nghiệm độ hoà tan

Sau khi khảo sát các thông số của thử nghiệm độ hoà tan và tiến hành khảo sát trên một số chế phẩm, chúng tôi đề nghị qui trình thử nghiệm độ hoà tan của viên bao tan trong ruột chứa SER như sau:

• Môi trường acid hydrochloric 0,1N

- Thể tích: 1000ml
- Nhiệt độ: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Thiết bị: kiểu giỏ quay (thiết bị loại I)
- Tốc độ quay: 120 vòng/phút
- Thời gian: 120 phút

Sau 120 phút ở môi trường acid viên không rã, lập tức chuyển sang môi trường đệm phosphat pH $6,8 \pm 0,05$ tiếp tục với những viên trên

• Môi trường đệm phosphat pH $6,8 \pm 0,05$

- Thể tích: 1000ml
- Nhiệt độ: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Thiết bị: kiểu giỏ quay (thiết bị loại I)
- Tốc độ quay: 120 vòng/phút
- Thời gian: 60 phút

Độ hoà tan qui định:Theo Dược điển Việt Nam III: sau 60 phút lượng hoạt chất giải phóng ở mỗi viên không nhỏ hơn 70%.

1.5.Khảo sát độ hoà tan một số chế phẩm viên bao SER

Bảng tóm tắt độ hoà tan của các chế phẩm

	B	C	F	N	S
45 phút	97,04	41,01	86,15	75,10	83,60
60 phút	98,22	46,23	89,78	78,32	86,83

Độ hoà tan của các chế phẩm ở 60 phút là hoàn toàn khác nhau với

$F = 11,8013 > F_{0,05} = 3,4781$, trong đó 20% không đạt tiêu chuẩn đề nghị

1.6.Khảo sát chất lượng nguyên liệu SER

Kết quả phân tích 1 số chỉ tiêu cơ bản của nguyên liệu SER về hàm lượng và hạn sử dụng, về hình thức, độ ẩm, một số lon có thể ảnh hưởng tới hoạt độ SER cho thấy nguồn nguyên liệu có thành phần, chất lượng không đồng nhất, dễ hư hỏng cần quan tâm lựa chọn và kiểm tra trong sản xuất.

1.7. Xây dựng mô hình đánh giá độ ổn định của SER

Đã nghiên cứu đề xuất 4 thử nghiệm để nghiên cứu độ ổn định của nguyên liệu, bán thành phẩm và thuốc thành phẩm chứa serratiopeptidase

-Thử nghiệm đánh giá nhanh hoạt chất và bán thành phẩm

Nhiệt độ 50°C và môi trường khan thích hợp để khảo sát độ ổn định của SER dưới dạng nguyên liệu hay bán thành phẩm như cốm,viên chưa bao..

-Thử nghiệm đánh giá nhanh chất lượng thành phẩm

Nhiệt độ 50°C, độ ẩm $60 \pm 50\%$ và thời gian 10 – 30 ngày, định lượng so sánh với mẫu chuẩn.

-Thử nghiệm đánh giá khả năng chống chống ẩm của lớp bao: viên bao không đóng gói kín, đặt trong điều kiện nóng ẩm $T = 30 - 35^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 70 - 75%, theo dõi khối lượng viên trong 10 – 30 ngày. Yêu cầu viên không tăng khối lượng quá 1%.

-Thử nghiệm xác định độ ổn định của thuốc thành phẩm:

-Thử nghiệm xác định hạn sử dụng thuốc ở 2 điều kiện: Điều kiện khống chế: $T = 25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ độ ẩm $60 \pm 5\%$ và điều kiện nóng ẩm $T = 30 - 35^{\circ}\text{C}$, độ ẩm 70 -75 %. Định kỳ 6 tháng 1 lần lấy mẫu kiểm nghiệm,xác định hạn sử dụng thuốc.

1.8.Nghiên cứu bào chế viên bao SER 5 mg

Viên được thử nghiệm theo 2 bước: thăm dò và thực nghiệm tối ưu hoá công thức và thử nghiệm pilot

1.8.1. Nghiên cứu thành phần công thức và qui trình bào chế viên nhân-

Công thức viên nhân: cho 10.000 viên

Thành phần	Cho 1 viên	Cho 1 mẻ =10.000 viên
Serrapeptase*	5,935 mg	59,35 g (3,70 %)
PVP	7,4 mg	74,00 g (4,62 %)
Lactose	117,5 mg	1175 ,00 g (73,43 %)
Tinh bột	19,5 mg	195 ,00 g (12,18 %)
Magnesi stearat	4,0 mg	40,00 g (2,50 %)
Chất phụ	6,6 mg	56,65 g (3,54 %)
Dập viên 160 mg $\pm$ 7,5 %	148 – 172 mg	148 – 172 mg

Quy trình bào chế: Xát hạt từng phần → cốm trơ đến độ ẩm $\leq 0,5\%$. Trộn hoạt chất, chất phụ trong máy trộn kiểu hành tinh, thời gian trộn 7 – 8 phút. Lấy mẫu để định lượng hoạt chất, xác nhận sự đồng đều của cốm. Dập viên với chày khum 7 mm, khối lượng viên 160 mg.

1.8.2. Nghiên cứu hỗn hợp bao và quy trình bao viên

- **Dịch bao phim:** cho 1 mẻ 10.000 viên

Thành phần	Khối lượng	Tỷ lệ
1-Eudragit L100	290,28 g	8,8 5 %
2-CAP	47,888 g	1,46%
3-Chất làm trơn PEG 4000 & 6000	vd	
4-Màu Sunset yellow, chất phụ	vd..... 11,36 %.	
5-Dung môi: Aceton, Isopropanol ,Ethanol	3280 ml	100% (KL/TT)

-**Qui trình bao viên:** Viên nhân loại sạch bụi, cho vào nồi bao. Tốc độ quay 20 – 25 vòng phút sao cho viên chuyển động đều trong nồi. Phun dịch bao qua đầu phun, áp suất 2 kg/cm² luôn khuấy đều dịch bao. Thổi gió ở nhiệt độ thường hoặc mát, khô. Bao liên tục khi lớp bao đạt độ dày tương đương với khối lượng viên 176 – 182 mg, tăng 10,47 – 11,52 %. Thời gian bao khoảng 150 phút. Kết thúc bao viên, chọn bỏ viên không đạt yêu cầu.

Viên thành phẩm được đóng vỉ 10 viên hoặc trong chai nút kín, chống ẩm.

1.9. Khảo sát độ ổn định và tuổi thọ của thành phẩm

Thử nghiệm khả năng chống ẩm của lớp bao: Lớp bao của 3 mẫu thuốc mới có khả năng chống ẩm cao, trong môi trường ẩm khối lượng viên tăng trung bình 0,79% trong 30 ngày, đạt mức <1 % như thử nghiệm với mẫu thuốc ngoại.

Thử nghiệm xác định độ ổn định của thuốc thành phẩm: Điều kiện khống chế: nhiệt độ ở 25 $\pm$ 2°C, độ ẩm = 60 $\pm$ 5%. Mẫu thử nghiệm: 3 mẫu thuốc mới, đóng 50

viên/chai nắp xi kín và vial 10 viên

Nhận xét:

Khả năng chống ẩm: đạt mức gần với khả năng chống ẩm của mẫu thuốc ngoại A1, A4 và A9 được nghiên cứu.

Độ ổn định của thuốc:

- Trong thử nghiệm khống nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm = $60 \pm 5\%$, tốc độ giảm hàm lượng hoạt chất trung bình 1,208 % / tháng.
- Trong điều kiện bao bì chống ẩm gần tuyệt đối, thuốc đóng trong vial hoặc chai có độ ổn định như nhau.

Hạn sử dụng của thuốc: Với kết quả này suy đoán hạn dùng của mẫu thuốc mới khoảng ≥ 26 tháng trong điều kiện bình thường.

Bảo quản: bảo quản nơi mát $20 - 25^{\circ}\text{C}$, tránh ẩm, tránh ánh sáng. Vì chỉ riêng điều kiện bảo quản khống chế nhiệt, ẩm cũng có thể kéo dài thời hạn sử dụng thuốc trên 13 % thời gian.

1.10. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng và kiểm nghiệm viên bao SER 5mg

Tiêu chuẩn cơ sở được xây dựng theo yêu cầu của Dược điển Việt Nam, kết quả kiểm nghiệm các mẫu viên bao SER 5mg đạt tiêu chuẩn.

1.11. Xác định tương đương sinh học *in vitro* bằng thử nghiệm độ hoà tan: đạt yêu cầu độ hoà tan tương đương các thuốc đối chiếu

Kết luận

- Công thức và qui trình bào chế viên bao tan trong ruột SER 5 mg ổn định, có tính lặp lại, cho được phẩm ổn định đạt tiêu chuẩn chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở, có tuổi thọ 24 tháng, tương đương với thuốc đối chiếu theo thử nghiệm độ hoà tan.
- Các nội dung và hồ sơ nghiên cứu đáp ứng yêu cầu để đăng ký lưu hành thuốc loại generic
- Qua thực nghiệm đề nghị áp dụng qui trình B định lượng SER và qui trình thử nghiệm độ hoà tan đối với viên bao SER

2. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ BỘT ĐÔNG KHÔ CỦA VI KHUẨN LACTIC LÀM MEN TIÊU HOÁ

2.1. Nghiên cứu qui trình và môi trường nuôi cấy 2 loài vi khuẩn lactic

-Qui trình nuôi cấy *Bifidobacterium bifidum*

-Xác định được môi trường tối vi khuẩn, tăng trưởng tốt nhất ở pH 6,5- 7, nhiệt độ 37°C , cần có hệ thống ủ kỵ khí, thêm yếu tố tăng trưởng vào môi trường nuôi cấy hàm lượng đường glucose là 20g/l, nồng độ pepton là 30g/l

- Đường cong tăng trưởng của *B. bifidum*: Giai đoạn *logarit* của *B. bifidum* là 24 giờ. Thời gian cho sinh khối tối đa là 24 giờ, thời gian suy tàn sau 48 giờ

Qui trình và môi trường nuôi cấy *Lactobacillus acidophilus*

- Qui trình nuôi cấy *L. acidophilus*
- Xác định được môi trường tốt nhất cho sự tăng trưởng, pH thích hợp nhất là pH 6, môi trường pepton từ sữa, chất tăng trưởng rất cần thiết cho sự phát triển, nồng độ đường thích hợp là 2% glucose.
- Đường cong tăng trưởng của *L. acidophilus*: Sau 24 giờ vi khuẩn *L. acidophilus* cho lượng sinh khối lớn nhất. Vi khuẩn suy tàn sau 36 giờ.

2.2. Khảo sát các yếu tố ổn định và qui trình đông khô *B. bifidum* và *L. acidophilus*

2.2.1. Xác định thời gian nuôi cấy tối ưu: sau 26h nuôi cấy thu được lượng sinh khối lớn nhất, sau khi đông khô thì thời gian 24h cho hiệu suất đông khô cao nhất.

2.2.2. Xác định môi trường đông khô tối ưu

- **Ảnh hưởng của Yeast Extract tới hiệu suất đông khô:** khi thêm Yeast Extract thì hiệu suất đông khô không tốt hơn bao nhiêu
- **Ảnh hưởng của nồng độ đường có trong môi trường đông khô:** với nồng độ 25% đường lactose thì cho hiệu suất đông khô là cao nhất.
- **Ảnh hưởng của nồng độ sữa trong môi trường đông khô:** Môi trường đông khô thích hợp nhất là môi trường có chứa 50 % sữa
- **Ảnh hưởng của tỉ lệ vi khuẩn và môi trường đông khô tới sự sống sót của vi khuẩn sau khi ổn định bằng phương pháp đông khô:** với tỷ lệ 35 g cấy vi khuẩn trộn với 100 ml môi trường đông khô thì sẽ có hiệu suất cao nhất. Khi đó số vi khuẩn trong 1 g bột đông khô là 6×10^{10} vi khuẩn
- **Điều kiện bảo quản:** tốt nhất là ở 4°C
- **Thiết lập thành công qui trình đông khô vi khuẩn.**

2.3. Xây dựng tiêu chuẩn và qui trình kiểm định vi khuẩn

2.3.1. Định danh vi khuẩn *Bifidobacterium bifidum*

Phân lập *B. bifidum* theo qui trình.

Định danh ở mức độ chi (genus) dựa vào các đặc điểm sau: hình dạng kích thước khóm vi khuẩn, khả năng chịu đựng acid, khả năng đông tụ sữa, kết quả các phản ứng sinh hoá

Kết luận: Dựa vào các kết quả về hình thái, đặc điểm sinh lý và phản ứng sinh hoá, kết luận là *B. bifidum*.

2.3.2. Định danh vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*

- Phân lập theo qui trình.
 - Định danh vi khuẩn: khảo sát hình dạng vi khuẩn, khả năng sản xuất acid lactic, khả năng chịu đựng môi trường acid, khả năng ngưng kết sữa
 - Nhận định loài: xác định kiểu lên men lactic, định lượng acid tổng cộng, xác định thuận nhiệt, khảo sát phản ứng sinh hoá
- Kết luận: Từ các kết quả thu được về đặc điểm sinh lý của vi khuẩn và phản ứng sinh hoá, có thể kết luận đúng là *L. acidophilus*.

2.3.3. Định lượng số vi khuẩn

Thẩm định qui trình

- Phương pháp trộn trong môi trường rắn khảo sát độ chính xác, độ đúng
- Phương pháp trộn trong môi trường bán lỏng khảo sát độ chính xác, độ đúng

So sánh phương pháp môi trường rắn và môi trường bán lỏng

$t=1,50 < t_{\alpha}=2,57 \Rightarrow$ Hai phương pháp không khác nhau.

So sánh môi trường thạch MRS và môi trường thạch Tomato

$t=0,61 < t_{\alpha}=2,23 \Rightarrow$ Hai môi trường không khác nhau.

- Khả năng chịu pH acid dạ dày và dịch mật: pH thay đổi từ 1– 4, nồng độ acid mật là 2,0%. Tất cả các mẫu còn sống qua 2 giai đoạn.

2.3.4. Xác định độ nhiễm khuẩn và nấm mốc.

Tìm *E.coli* và *Staphylococcus aureus*: tất cả mẫu thử nghiệm đều không có nhiễm *E.coli* và *S. aureus*

Xác định độ nhiễm nấm mốc nấm men: Sau một thời gian bảo quản đạt giới hạn được diễn cho phép là <100 khóm/1g)

2.3.5. Xác định độ ẩm của bột đông khô bằng phương pháp sấy: trung bình 8- 9%

2.4. Khả năng đề kháng kháng sinh

- MIC của chủng *Bifidobacterium bifidum* và *Lactobacillus acidophilus* Dựa vào biện giải chuẩn đối với vi khuẩn kỵ khí của NCCLS (phụ lục) để biện giải sự nhạy cảm hay đề kháng của *B. bifidum* với các kháng sinh, kết quả như sau:

- *B. bifidum* đề kháng với Imidazol, Cefamandol, Cefotaxim, Cefoperazon, Cefalexin, Erythromycin, Rifampicin; nhạy cảm với Amoxicilin, Amoxicilin + acid clavulanic, Ampicillin + sulbactam, Chloramphenicol, Clindamycin, Metronidazol, Vancomycin, Tetracyclin; nhạy cảm trung gian với Ciprofloxacin
- *L. acidophilus* nhạy cảm với Amoxicilin, Amoxicilin + acid clavulanic, Ampicillin + sulbactam, Tetracyclin, Erythromycin, Rifampicin, Chloramphenicol; đề kháng với

Imidazol, Cefamandol, Ceftriaxon, Cefoperazon, Cefalexin, Clindamycin, Metronidazol, Vancomycin; nhạy cảm trung gian với Cefotaxim.

2.5.Xác định có mặt plasmid và khả năng chuyển plasmid

2.5.1.Xác định có mặt plasmid

Kết quả: *B. bifidum*, *L. acidophilus*, có plasmid. Vạch plasmid của *B. bifidum* khoảng 17kb, *L. acidophilus* khoảng 15kb.

2.5.2 Kết quả tiếp hợp với *S. faecalis* và *E. coli* K12F⁻

Không xảy ra sự tiếp hợp giữa *B. bifidum*, *L. acidophilus*, với *S. faecalis* cũng như *E. coli* K12F⁻.

Đối chứng dương của mô hình tiếp hợp với *E. coli* K12F⁻ là chủng *Shigella* đa đề kháng do bệnh viện Nhi Đồng 1 cung cấp cho kết quả tiếp hợp dương tính

2.6. Khảo sát độc tính cấp và bán cấp

Khảo sát độc tính cấp và bán cấp: Chế phẩm không gây độc tính cấp và bán cấp: các chỉ số sinh hoá huyết học không khác biệt giữa nhóm thử và nhóm chứng

2.7. Kết quả thử nghiệm *in vivo* khả năng điều trị loạn khuẩn của *B.bifidum* và *L. acidophilus*

-**Xây dựng mô hình loạn khuẩn** ở ruột liều kháng sinh là: 20mg Streptomycin + 30mg Lincomycin / 10 g chuột để gây tiêu chảy cho chuột , từ đó thử tác dụng trị loạn khuẩn của các vi khuẩn nuôi cấy được.

-**Xác định liều vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* và *Bifidobacterium bifidum* có tác dụng trị tiêu chảy do loạn khuẩn:** liều 10⁴ vi khuẩn / 10g chuột

-**Việc sử dụng riêng rẽ từng vi khuẩn** để trị loạn khuẩn cho thấy vi khuẩn thử nghiệm có tác dụng trị loạn khuẩn. Tuy nhiên nếu phối hợp 2 loại vi khuẩn sẽ cho kết quả tốt hơn việc sử dụng riêng rẽ ,biểu hiện ở khả năng làm bệnh mau hết hơn

-**Thử tác dụng trị loạn khuẩn của *B.bifidum* và *L.acidophilus*:**

Chuột được điều trị phối hợp 2 vi khuẩn thử nghiệm cho kết quả tốt nhất: số chuột hết tiêu chảy cao nhất, thời gian phục hồi nhanh nhất.

-**Giá trị sụt cân trung bình ở các lô chuột điều trị**

Chuột được điều trị bằng vi khuẩn thử nghiệm có mức độ sụt cân nhỏ nhất, cho thấy rõ ràng hiệu quả của việc điều trị so với lô chứng và hiệu quả không kém biệt được ngoại nhập cùng loại (Lactomed).

2.8. Tiêu chuẩn cơ sở chế phẩm Bifilac

- Là một loại chế phẩm sinh học đông khô, dạng bột ,
- Định danh: chứa vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* và *Bifidobacterium bifidum*

- Định lượng: bằng phương pháp đếm sống có tối thiểu 10^9 vi khuẩn sống mỗi loại / 1g sản phẩm.
- Chế phẩm không được chứa vi khuẩn lạ, kiểm nghiệm theo DĐVN
- Độ ẩm không quá 9%, kiểm nghiệm theo DĐVN

2.9. Kết quả nghiên cứu độ ổn định và tuổi thọ của chế phẩm: bột đông khô vi khuẩn vẫn đạt tiêu chuẩn chất lượng khi theo dõi đến tháng thứ 12

Kết Luận

Đã xác định môi trường, điều kiện, qui trình nuôi cấy 2 loại vi khuẩn lactic có hiệu quả kinh tế, bào chế thành công chế phẩm bột vi khuẩn đông khô ổn định có hiệu quả và an toàn trong điều trị tiêu chảy do loạn khuẩn, sẵn sàng để triển khai sản xuất thay thế được phẩm ngoại nhập.

3. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ VIÊN BAO HAI THÀNH PHẦN AMOXICILIN VÀ POTASSIUM CLAVULANATE.

3.1. Nghiên cứu công thức và quy trình bào chế viên bao amoxicillin và acid clavulanic

Qua quá trình thăm dò, thiết lập qui hoạch thực nghiệm, bào chế thực nghiệm, xử lý bằng phần mềm Inform tìm công thức và qui trình tối ưu

- Công thức 1viên nhân được xác định gồm:

Amoxicillin trihydrat (*)	500 mg	Clavulanat kali (**)	125 mg
Tá dược A (tá dược rã)	44 mg	Tá dược B (tá dược rã)	7,7 mg
Tá dược C (tá dược trơn)	11 mg	Tá dược D (tá dược độn)	137,8 mg

(*) Tính theo amoxicilin khan.

(**) Tính theo acid clavulanic.

- Qui trình bào chế theo phương pháp xát hạt khô.
- Thành phần dịch bao và các thông số của qui trình bao viên

Công thức cho 10 kg hỗn dịch bao:

HPMC	0,66 kg	PEG	0,20 kg
Talc	0,20 kg	Titandioxyd	0,44 kg
Ethanol	6,00 kg	Nước cất	2,50 kg

- Thông số của quy trình bao

Cho viên vào nồi bao, thổi sạch bụi trên bề mặt viên và làm nóng viên trong 10 phút.

Điều chỉnh các thông số của qui trình bao:

Vận tốc nồi bao	1-2 vòng/ phút.	Áp suất khí phun	2 kg/ cm ² .
Tốc độ phun	25-35 g/ phút	Nhiệt độ khí vào	50 °C.
Nhiệt độ khí ra	40 °C.	Sấy khô sau khi bao	50 °C/ 10 phút.

- Công thức và qui trình bào chế ổn định, có tính lặp lại, thích hợp cho viên chứa 2

thành phần amoxicilin và acid clavulanic. Lớp bao có khả năng bảo vệ tốt, kéo dài tuổi thọ của thuốc.

3.2. Về tiêu chuẩn chất lượng viên bao

Viên bao đạt tiêu chuẩn chất lượng theo USP 24.

3.3. Về độ ổn định và tuổi thọ của viên bao

- Độ ổn định của thuốc được khảo sát ở 2 điều kiện 25 °C/ 60% RH và 30 °C/ 65% RH. Cảm quan bên ngoài của viên không thay đổi theo thời gian bảo quản. Tuy nhiên, bột viên bên trong thay đổi màu theo thời gian từ trắng ngà đến vàng chanh, vàng nhạt, vàng sậm, đến vàng nâu. Hàm lượng và độ hòa tan giảm theo thời gian bảo quản, tốc độ giảm càng nhanh khi nhiệt độ và độ ẩm càng cao.
- Tuổi thọ được tính ở điều kiện bảo quản 25 °C/ 60% RH là 27 tháng, do đó, tuổi thọ của sản phẩm được đề nghị là 24 tháng (2 năm) với điều kiện bảo quản ở 25 °C và độ ẩm tương đối là 60%.

3.4. Về tương đương sinh học

- Kết quả thử độ hòa tan: thuốc nghiên cứu tương đương sinh học *in vitro* với thuốc đối chiếu là Augmentin.
- Các thông số dược động học C_{max}, AUC₀₋₅ và T_{max} từ 12 người Việt Nam tình nguyện sau khi uống viên nghiên cứu và viên đối chiếu (Augmentin) được dùng để đánh giá tương đương sinh học *in vivo* của thuốc. Các phương pháp phân tích phương sai và khoảng tin cậy 90% được sử dụng để phân tích thống kê: thuốc nghiên cứu tương đương sinh học *in vivo* với thuốc đối chiếu Augmentin.

3.5. Kết luận

- Công thức và qui trình bào chế viên bao chứa amoxicilin và acid clavulanic 625 mg ổn định, có tính lặp lại, cho được phẩm đạt tiêu chuẩn chất lượng theo USP 24, có tuổi thọ 24 tháng, tương đương sinh học với Augmentin.
- Dược phẩm sẵn sàng triển khai sản xuất tại xí nghiệp dược phẩm TW 25

4. NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT VI NANG ĐỂ BÀO CHẾ THUỐC VIÊN VITAMIN CÓ SINH KHẢ DỤNG VÀ ĐỘ ỔN ĐỊNH CAO

4.1. Xây dựng phương pháp định lượng các vitamin trong viên 3B

Vitamin B₁, B₆ được định lượng theo phương pháp của Dược điển Anh 1998. Vitamin B₁₂ được định lượng theo phương pháp của Dược điển Mỹ 23 bằng HPLC, khảo sát khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ tin cậy của phương pháp định lượng trong điều kiện thực nghiệm của nghiên cứu cho thấy đạt yêu cầu qui trình định lượng.

4.2. Kết quả định lượng vitamin trong một số mẫu viên 3B đang lưu hành

Lấy ngẫu nhiên 5 mẫu viên 3B đang lưu hành của 5 cơ sở sản xuất khác nhau để kiểm tra hàm lượng dược chất.

Kết quả: Hàm lượng vitamin B₁ và B₆ trong tất cả các mẫu viên nghiên cứu đều đạt yêu cầu so với qui định (>90%). Trong 5 mẫu nghiên cứu, có 2 mẫu không đạt chỉ tiêu hàm lượng vitamin B₁₂ (<90%) mặc dù thời hạn sử dụng còn rất dài.

4.3. Nghiên cứu lựa chọn thành phần viên Vitamin B₁, B₆, B₁₂

4.3.1. Nghiên cứu sự tương tác giữa các dược chất

a) Sự tương tác giữa các dược chất trong điều kiện bao gói chống ẩm

- Cả hai dạng muối nitrat và hydroclorid, hàm lượng còn lại của vitamin B₁ khác nhau không có nghĩa thống kê, hàm lượng vitamin B₁ còn lại trong các mẫu đơn chất và mẫu hỗn hợp là như nhau. Hàm lượng vitamin B₁ không bị giảm khi có mặt vitamin B₆ và B₁₂ trong hỗn hợp.

-So với mẫu đơn chất, hàm lượng vitamin B₆ cũng không bị giảm khi có vitamin B₁ và vitamin B₁₂ trong hỗn hợp.

-So với các mẫu đơn chất, tất cả các mẫu B₁₂ trong hỗn hợp với B₁ hoặc B₆ đều bị giảm hàm lượng. Đặc biệt trong các mẫu hỗn hợp có cả 3 loại vitamin, hàm lượng vitamin B₁₂ bị giảm một cách đáng kể.

b) Sự tương tác giữa các dược chất trong điều kiện có tác động của không khí ẩm.

- ở mẫu đơn chất, hàm lượng B₁.NO₃ giảm ít hơn hàm lượng B₁HCl. Ngược lại, ở mẫu hỗn hợp, đặc biệt là ở hỗn hợp có cả 3 loại vitamin, hàm lượng B₁.NO₃ lại giảm nhiều hơn.

- hàm lượng vitamin B₆ trong các mẫu hỗn hợp bị giảm nhiều hơn so với các mẫu đơn chất, trong các mẫu có cả 3 loại vitamin, hàm lượng vitamin B₆ cũng bị giảm đáng kể.

- độ ẩm cao không những làm giảm hàm lượng của các dược chất mà còn làm tăng sự tương tác giữa chúng.

4.3.2. Nghiên cứu sự tương tác giữa các dược chất với một số tá dược.

Chọn 10 loại tá dược để nghiên cứu. Kết quả cho thấy: trong các mẫu có các tá dược lactose, tinh bột, dextrin, Lycatab, Avicel và Castor wax A, hàm lượng các vitamin đều thay đổi rất ít. Với tá dược trơn magnesi stearat hàm lượng của cả 3 loại vitamin đều giảm một cách đáng kể. Như vậy, trừ magnesi stearat, các tá dược đã chọn đều có thể sử dụng để bào chế viên 3B.

4.4. Nghiên cứu chế tạo vi nang vitamin B₁₂ bằng phương pháp tách pha đông tụ để bào chế viên 3B

a - Xác định hiệu suất vitamin B₁₂ được vi nang hoá:

Hiệu suất vitamin B₁₂ được vi nang hoá tăng khi lượng vỏ nang tăng.

- Mẫu A₁ với tỷ lệ nhân/vỏ là 1/1 có hiệu suất thấp nhất.

- Các mẫu A₂ (1/1,5); A₃ (1/2) ; A₄ (1/2,5); A₅ (1/3) đều cho hiệu suất trên 75%.

b -Xác định kích thước vi nang Vitamin B12

Các tiểu phân Vitamin B₁₂ có kích thước từ 7,5 đến 30µm.

Kích thước các vi nang nằm trong khoảng từ 14 đến 60µm.

Lượng vỏ trong công thức bào chế tăng lên thì kích thước vi nang cũng tăng.

Nhìn chung kích thước các vi nang rất nhỏ. Khi phối hợp với cốm Vitamin B₁ và B₆ các vi nang B₁₂ phân tán đều trên bề mặt các hạt cốm, không gây ra hiện tượng phân lớp khi dập viên, đảm bảo độ đồng đều được chất trong viên.

c - Xác định khả năng hoà tan của vitamin B12 từ các mẫu vi nang

Khi lượng vỏ nang tăng thì khả năng hoà tan được chất giảm. Nhìn chung, độ hoà tan của vitamin B₁₂ từ 5 mẫu vi nang đều có xu hướng kéo dài, vì vậy cần nghiên cứu biện pháp làm tăng độ hoà tan của vitamin B₁₂.

- Bào chế 3 mẫu bột vi nang A'₂, A'₃, A'₄ tương ứng với 3 mẫu vi nang A₂, A₃, A₄. Tween 80 làm tăng tính thấm nước vào lớp vỏ, nhờ đó mà mức độ và tốc độ hoà tan của Vitamin B₁₂ tăng một cách đáng kể.

Sau 45 phút, độ hoà tan của Vitamin B₁₂ trong cả 3 mẫu đều đạt trên 75%.

d) Qui hoạch thực nghiệm theo mô hình toán bậc 1 dạng $N = 2^k$ để lựa chọn công thức tối ưu bào chế vi nang Vitamin B₁₂.

Bước 1: Lựa chọn yếu tố ảnh hưởng và xác định khoảng biến đổi của các yếu tố đó.

Độ giảm hàm lượng Vitamin B₁₂ sau thời gian lão hoá (y) được chọn làm thông số tối ưu hoá. Giá trị ở mức tâm và khoảng biến đổi của 4 yếu tố định lượng được lựa chọn theo các thí nghiệm sơ bộ.

Giá trị khoảng biến đổi của các yếu tố định lượng (Giá trị tính cho 1 viên)

Các yếu tố	Ký hiệu	Mức tâm	Khoảng biến đổi
Castor wax A (mg)	X ₁	1	0,25
isopropanol (%)	X ₂	5	3
Tween 80 (mg)	X ₃	0,025	0,005
Tốc độ khuấy (vòng/phút)	X ₄	600	200

Bước 2: Bố trí ma trận thí nghiệm: Các thí nghiệm được bố trí theo mô hình bậc 1 đầy đủ, dạng $N = 2^k$. Số thí nghiệm phải làm là $N = 2^4 = 16$.

Bước 3: Làm các thí nghiệm theo ma trận thực nghiệm: Bào chế 16 mẫu bột vi nang với các thông số như ma trận thí nghiệm

Bước 4: Đánh giá sự lặp lại của các thí nghiệm.

Bước 5: Tính các hệ số bj của phương trình hồi qui.

Bước 6: Đánh giá tính có ý nghĩa của các hệ số hồi qui

Bước 7: Đánh giá tính phù hợp của phương trình hồi qui

Kết quả: Castor wax và isopropanol (X_1 ; X_2) có ảnh hưởng tích cực đến thông số tối ưu hoá; tức là làm tăng tính ổn định của Vitamin B₁₂ trong vi nang. Mức độ ảnh hưởng theo thứ tự: Castor wax > isopropanol.

Tween 80 và tốc độ khuấy (X_3 ; X_4) làm giảm tính ổn định của Vitamin B₁₂ trong vi nang. Mức độ ảnh hưởng theo thứ tự: Tốc độ khuấy > Tween 80.

Bước 8: Tìm điều kiện tối ưu (y' min) bằng phương pháp Gradient.

Quy hoạch thực nghiệm để tìm điều kiện tối ưu

Các yếu tố	X'_1 (mg) castor wax	X'_2 (%) Isopropanol	X'_3 (mg) Tween 80	X'_4 (vòng /phút) Tốc độ khuấy
Mức tâm	1	5	0,025	600
Khoảng biến đổi λ_i	0,25	3	0,005	200
Hệ số b_i	- 0,48	- 0,13	+ 0,09	+ 0,24
$\lambda_i \times b_i$	- 0,12	- 0,39	+ 0,00045	+ 48
Bước tiến	+ 0,12	+ 0,4	- 0,0005	- 50
Các thí nghiệm				
17	1,12	5,4	0,0245	550
18	1,24	5,8	0,0240	500
19	1,36	6,2	0,0235	450
20	1,48	6,6	0,0230	400
21	1,60	7,0	0,0225	350
22	1,72	7,4	0,0220	300

Độ hoà tan Vitamin B12 từ các mẫu viên sau 45 phút

Mẫu	Độ hoà tan (%)
17	83,76 ± 0,59
18	80,10 ± 0,37
19	76,63 ± 0,54
20	75,96 ± 0,59
21	73,96 ± 0,76
22	71,77 ± 0,47

Độ giảm HL Vitamin B12 sau thời gian lão hoá

Mẫu	y' (%)
17	3,45
18	2,81
19	2,23
20	1,82
21	2,34
22	3,56

Kết luận: công thức 20 là công thức tối ưu.

e) Nghiên cứu nâng qui mô thí nghiệm bào chế vi nang Vitamin B₁₂

Khi nâng qui mô bào chế vi nang cho 1 nghìn viên (dùng máy khuấy từ) lên qui mô cho 6 nghìn viên và 10 nghìn viên (dùng máy cánh khuấy), hiệu suất tạo vi nang hầu như không thay đổi.

Khi giảm lượng dung môi và khi sử dụng lại dung môi (lần 2), hiệu suất tạo vi nang giảm đáng kể.

Nhìn chung trong tất cả các mẫu, kích thước của các vi nang tạo thành không khác nhau nhiều.

f. Nghiên cứu độ ổn định của vitamin B₁₂ trong viên 3B bào chế từ vi nang

Các mẫu viên 3B tương ứng với các mẫu vi nang được bào chế ở qui mô nâng cao lần lượt được kí hiệu là M'_1 , M'_2 , M'_3 , N'_1 , N'_2 , N'_3 . Độ giảm hàm lượng của vitamin B_{12} trong các mẫu viên sau khi lão hoá như sau:

Mẫu	M'_{20}	M'_1	M'_2	M'_3	N'_1	N'_2	N'_3
Độ giảm HL (%)	1,82	1,88	1,83	2,03	1,80	1,94	1,85

So với mẫu M'_{20} , độ giảm hàm lượng vitamin B_{12} trong các mẫu bào chế ở qui mô nâng cao không thay đổi nhiều. Điều đó cho thấy, có thể bào chế vi nang vitamin B_{12} ở qui mô nâng cao.

4.5. Nghiên cứu chế tạo vi nang vitamin B_{12} bằng phương pháp phun đông tụ

- Các thông số kĩ thuật được lựa chọn như sau:

- Nhiệt độ đầu phun và ống dẫn khí nén $85 - 88^{\circ}\text{C}$ được bảo ôn bằng cách bọc tấm điện trở đốt nóng đảm bảo không bị tắc đầu phun (có lỗ phun đường kính 3mm).

- Nhiệt độ hỗn hợp phun tạo vi nang $90^{\circ}\text{C} \pm 2$ được bảo ôn bằng hệ cách thuỷ có bọc tấm điện trở đốt nóng, đảm bảo hỗn hợp phun nóng chảy hoàn toàn.

- Nhiệt độ hệ bình đông tụ $25^{\circ} \pm 2$ được đặt trong phòng điều hoà có luồng thổi không khí qua hệ bình, quá trình phun không liên tục để đảm bảo cân bằng nhiệt độ.

- Tốc độ phun 3-5 g/phút với áp lực phun 4kg/cm^2 .

- Về kích thước vi nang:

- Vi nang có kích thước chủ yếu 15 - 60mcm, chiếm khoảng 66-70%

- Khi tá dược có Tween 80 tỉ lệ vi nang <15mcm tăng lên

- Khi tá dược có tỉ lệ Castor wax tăng, tỉ lệ vi nang có kích thước lớn hơn 60mcm tăng lên.

- Khi có tinh bột trong thành phần tỷ lệ vi nang <15mcm giảm đi, tỷ lệ vi nang > 60mcm tăng lên.

-Kích thước tiểu phân và độ hoà tan vitamin B₁₂ của các mẫu vi nang có thành phần tá dược khác nhau

Mẫu vi nang	Tỉ lệ thành phần				% phân đoạn tiểu phân			Độ hoà tan %
	vitamin B12	Tinh bột	Castor wax	Tween 80	< 15 mcm	15 -60 mcm	> 60 mcm	
I ₁	1		3		18,4	67,6	14,3	85,4
I ₂	1		4		16,8	68,4	14,8	65,2
I ₃	1		5		13,2	69,5	17,3	56,8
I ₄	1		10		5,5	67,3	27,2	45,8
I ₅	1		3	0,1	25,5	70,3	4,2	<u>112,4</u>
I ₆	1		4	0,1	23,7	69,6	6,7	<u>99,9</u>
I ₇	1		5	0,1	22,0	69,5	8,5	<u>90,1</u>
I ₈	1		6	0,1	21	68,0	10,5	<u>91,2</u>
I ₉	1		8	0,1	20,3	65,2	14,5	<u>65,2</u>
I ₁₀	1		10	0,1	13,5	66,3	20,2	<u>63,9</u>
I ₁₁	1	1	4	0,1	23,2	70,1	6,7	<u>115,7</u>
I ₁₂	1	1	6	0,1	20,7	68,8	10,5	<u>111,2</u>
I ₁₃	1	1	8	0,1	15,5	68,3	16,2	<u>89,9</u>
I ₁₄	1	1	10	0,1	4,3	73,7	22,0	<u>64,1</u>

-Tốc độ hoà tan vitamin B₁₂ từ các mẫu vi nang phun đồng tụ

Mẫu vi nang	% vitamin B ₁₂ hoà tan ở các thời điểm (phút)							
	2	4	6	8	10	15	20	30
I ₁	9,1	21,3	27,0	42,2	51,1	65,4	73,4	85,4
I ₂	6,4	19,3	25,0	37,0	48,0	59,5	60,9	65,2
I ₃	6,5	16,5	21,0	34,5	41,9	54,7	55,1	56,8
I ₄	5,0	9,9	16,0	25,9	32,1	43,3	44,1	45,8
I ₅	15,4	35,6	53,1	76,5	93,1	101,4	101,3	112,4
I ₆	12,6	35,0	45,0	70,1	85,4	95,4	97,4	<u>99,9</u>
I ₇	11,2	30,3	47,3	62,9	74,5	86,5	91,0	96,1
I ₈	11,3	30,0	44,6	61,3	72,0	82,1	89,2	<u>91,2</u>
I ₉	8,2	20,0	31,2	41,9	47,3	54,5	62,6	<u>65,2</u>
I ₁₀	8,1	19,8	31,0	42,0	45,8	51,1	62,3	<u>63,9</u>
I ₁₁	12,9	62,0	90,1	<u>103,1</u>	107,1	112,5	113,4	115,7
I ₁₂	10,5	52,2	88,3	98,7	<u>108,6</u>	108,9	110,7	111,2
I ₁₃	9,4	33,0	74,1	86,7	87,6	88,5	88,7	<u>88,9</u>
I ₁₄	14,1	45,9	56,3	61,0	61,0	63,0	63,7	<u>64,1</u>

Nhận xét:

- Khi sử dụng tinh bột để phân tán, hấp thụ vitamin B₁₂ tham gia vào thành phần hỗn hợp phun đồng tụ, độ hoà tan của vi nang tăng lên đáng kể so với mẫu vi nang chỉ dùng Tween 80 làm chất tăng độ tan. Điều này được biểu thị rõ trên đồ thị so sánh mẫu I₆, I₁₁ có cùng tỉ lệ dược chất - Castor wax 1:4 và mẫu I₈, I₁₂ có cùng tỉ lệ dược chất - Castor wax 1:8.

- Nếu tỉ lệ Wax gấp trên 8 lần dược chất, vi nang có độ hoà tan sau 30 phút nhỏ hơn

90% và nhỏ hơn 70% khi tỉ lệ này gấp 10 lần tuy có thêm các chất làm tăng độ tan.

4.6. Đánh giá độ ổn định của các mẫu vi nang vitamin B₁₂ và viên 3 B bào chế từ vi nang vitamin B₁₂.

4.6.1 Đánh giá độ ổn định của các mẫu vi nang vitamin B₁₂

Các mẫu vi nang được đánh giá độ ổn định theo phương pháp thử nghiệm cấp tốc ở 45°C ± 2; 75% ± 5% RH:

- Mẫu A - vi nang Vitamin B₁₂ chế tạo bằng phương pháp tách pha đồng tụ, có thành phần B₁₂ - Castor wax tinh bột -Tween 80: 1-2-9-0,05.

- Mẫu I₅, I₁₃ - Vi nang Vitamin B₁₂ chế tạo bằng phương pháp phun đồng tụ. Mẫu I₁₃ có thành phần B₁₂-tinh bột-Castor wax-Tween 80: 1- 1 - 8- 0,1.

-Sau thử nghiệm lão hoá cấp tốc các mẫu vi nang không có thay đổi về hình thức cảm quan như màu sắc, mức độ khô toi (độ ẩm thay đổi không đáng kể 2,0% - 2,5%).

-Độ suy giảm hàm lượng và độ hoà tan của các mẫu vi nang Vitamin B₁₂ sau 3 tháng bảo quản ở 45°C ± 2°C, 75% ± 5% RH

Mẫu vi nang	Hàm lượng (%)		Độ giảm hàm lượng (%)	Độ hoà tan (%)	
	Ban đầu	Sau 3 tháng		Ban đầu	Sau 3 tháng
A					
Mẻ 1	101,63	98,49	3,14	79,5	78,6
Mẻ 2	99,06	95,52	3,85	80,7	81,2
Mẻ 3	100,24	96,58	3,66	81,5	79,8
			Trung bình 3,51		
I ₅					
Mẻ 1	101,18	97,70	3,48	99,4	100,0
Mẻ 2	98,91	95,64	3,27	98,8	97,9
Mẻ 3	99,17	96,24	2,93	100,1	98,5
			Trung bình 3,23		
I ₁₃					
Mẻ 1	101,52	120,26	0,26	87,5	86,3
Mẻ 2	100,31	100,10	0,21	89,1	88,5
Mẻ 3	99,25	99,02	0,23	86,8	85,6
			Trung bình 0,23		

4.6.2. Đánh giá độ ổn định của các mẫu viên 3B điều chế thuốc từ vi nang vitamin B12

Các mẫu viên nén 3B điều chế từ vi nang vitamin B12 được đánh giá độ ổn định theo phương pháp thử nghiệm cấp tốc ở $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \pm 5\%$ RH.

Nhận xét:

- Về độ ổn định vitamin B12: Mẫu viên 3B bào chế từ vi nang vitamin B12 thu được từ phương pháp phun đông tụ với tỉ lệ Castor wax. - dược chất 8: 1 có độ ổn định cao nhất. Với tỉ lệ Castor wax - dược chất thấp hơn (4: 1) mẫu viên 3B bào chế từ vi nang phun đông tụ có độ ổn định vitamin B12 tương đương mẫu viên 3B bào chế từ vi nang thu được bằng phương pháp tách pha đông tụ (sự sai khác giữa 2 mẫu này về độ suy giảm hàm lượng không có ý nghĩa thống kê).

- Về độ hoà tan vitamin B12: Thay đổi không đáng kể đối với các mẫu sau 3 tháng thử nghiệm lão hoá cấp tốc.

Các mẫu vi nang vitamin B12, viên nén 3B mẫu VA được bảo quản ở điều kiện thường dài hạn theo sự biến đổi khí hậu nhiệt độ từ 15°C - 30°C , độ ẩm tương đối của không khí 65% - 90% sau 12 tháng vẫn đảm bảo chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở đề ra .

4.6.3. Thử nghiệm cấp tốc độ ổn định dự tính tuổi thọ của viên 3B

Viên 3B bào chế từ vi nang vitamin B12 bằng phương pháp tách pha đông tụ, được thử nghiệm lão hoá cấp tốc ở 3 nhiệt độ $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $45^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ($75\% \pm 5\%$ RH) để dự tính tuổi thọ theo phương trình Arrhenius.

-Mẫu viên 3B bào chế đôi hàm lượng vitamin B12 là 111,95% dự tính tuổi thọ trên 4 năm (59 tháng) với điều kiện bảo quản $\leq 25^{\circ}\text{C}$ 75% RH.

-Nếu hàm lượng 105% tuổi thọ dự tính sẽ trên 3 năm (40 tháng) với tiêu chuẩn viên có không ít hơn 90% vitamin B12.

-Nếu tiêu chuẩn viên 3B yêu cầu không ít hơn 95% vitamin B12 mẫu viên bào chế đôi hàm lượng vitamin B12 là 105% sẽ có tuổi thọ dự tính trên 2 năm (30 tháng).

5. NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ NGUYÊN LIỆU DƯỢC DỤNG VÀ VIÊN NÉN

MAGALDRAT

5.1. Qui trình tổng hợp magaldrat được dụng

-Thiết lập quy trình điều chế Magaldrat.

-Tối ưu hoá quy trình điều chế Magaldrat: Các thông số thích hợp cho quy trình điều chế Magaldrat đã được chọn:

-Tỷ lệ mol NaOH: Al = 4,5: 1

-Tỷ lệ mol Mg: Al = 2,5: 1

-Nhiệt độ phản ứng 28 -32°C

- Nhiệt độ sấy tủa 100°C.

-Nồng độ dd MgSO_4 20% và dd NaAlO_2 12%

5.2. Xác định thành phần công thức của phức hợp Magaldrat

Định tính: Các ion Al^{3+} , Mg^{2+} , OH^- và SO_4^{2-} của Magaldrat đúng theo USP 24.

Thành phần công thức của Magaldrat

Định lượng các thành phần Al, Mg, SO_4^{2-} , OH^- trong Magaldrat.

Độ ẩm của nguyên liệu Magaldrat là 16,52%.

Công thức phân tử gần đúng của Magaldrat là: $\text{Al}_5\text{Mg}_{10}(\text{OH})_{31}(\text{SO}_4)_2$.

Kết quả phân tích cho thấy công thức của Magaldrat điều chế có thành phần tương tự như Magaldrat trong tài liệu của USP 24.

5.3. Đặc điểm cấu trúc và phổ nhiễu xạ tia X của Magaldrat.

Phổ nhiễu xạ tia X của Magaldrat có hằng số mạng $d < 2,57$ angstrom, là dạng phổ của chất phức hợp đại phân tử, có trật tự liên kết xa và không có đỉnh nhiễu xạ đặc trưng như của $\text{Al}(\text{OH})_3$ và $\text{Mg}(\text{OH})_2$. Magaldrat là một phức hợp mới, khác biệt với sự pha trộn đơn thuần của $\text{Al}(\text{OH})_3$ và $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

5.4. Tiêu chuẩn chất lượng nguyên liệu Magaldrat

Mẫu thử Magaldrat đạt yêu cầu chất lượng theo USP 24

5.5. Độ an toàn của Magaldrat.

Thử độc tính cấp trên chuột nhắt trắng. Kết quả cho thấy nguyên liệu Magaldrat không gây độc tính cấp trên chuột với liều 5 g/kg/24 giờ (Liều này cao gấp 73 lần liều bình thường).

5.6. Thiết kế công thức và bào chế viên nén Malumix 540mg, 480mg, 400mg

Viên Malumix 540 mg, 480mg, 400mg đạt chất lượng tiêu chuẩn USP 24 và TC cơ sở tương ứng.

5.8. Kết quả nghiên cứu tác dụng sinh học và tương đương sinh học của malumix so với dược phẩm cùng nhóm

•Khả năng trung hoà acid của Malumix

Các chế phẩm chứa Magaldrat là loại antacid có khả năng trung hoà acid khá cao, tương tự với các chế phẩm ngoại nhập cùng loại.

•Khả năng ức chế hoạt độ pepsin của Malumix

Với cùng một lượng thuốc khảo sát, Malumix có khả năng ức chế pepsin tương đương với các kháng acid hiện hành như: Maalox, Mylanta II.

•Tác động bảo vệ niêm mạc dạ dày và chống loét của Malumix

Chỉ số loét U.I của Malumix (0,04) < Maalox (0,136) < 1 nên hai thuốc đều có khả năng bảo vệ tế bào niêm mạc dạ dày.

5.9. Kết quả độ an toàn của malumix

5.9.1. Độc tính cấp của Malumix

Mẫu thuốc Malumix không gây độc tính cấp trên chuột nhắt trắng.

5.9.2. Độc tính bán cấp của chế phẩm Malumix

Theo dõi các chỉ số huyết học, chỉ số sinh hoá (men), tình trạng thể trọng, các tổ chức như gan, thận: không có khác biệt so với nhóm chứng

5.10. Kết quả độ ổn định của magaldrat và malumix

5.10.1. Độ ổn định của nguyên liệu Magaldrat

Bảo quản nguyên liệu Magaldrat ở điều kiện tự nhiên (30°C).

Nguyên liệu Magaldrat sau khi bảo quản 48 tháng, ở điều kiện bình thường, sự thay đổi về chất lượng không có ý nghĩa thống kê (vẫn đạt tiêu chuẩn USP 24). Để nghị tuổi thọ 48 tháng

5.10.2. Độ ổn định của viên Malumix

- **Khảo sát viên bằng phương pháp phân tích nhiệt vi sai**

Giản đồ DTG cho thấy khi tăng nhiệt từ 29,8 – 138,6°C chỉ có sự mất nước, khối lượng nước mất 6,67%, ít có biến đổi hoá học xảy ra trong hỗn hợp bột Malumix khi $t^{\circ} < 60^{\circ}\text{C}$. Tiếp tục tăng nhiệt đến 198,9°C, lượng nước mất thêm 4,67%. KNTHA của Malumix trước và sau khi gia nhiệt thay đổi không có ý nghĩa thống kê.

- **Khảo sát viên Malumix ở điều kiện tự nhiên (30°C).**

Bảo quản viên Malumix trong vỉ ép ở 28-32°C, độ ẩm tương đối 72-85%, khảo sát các đặc tính kỹ thuật của viên Malumix.

Viên Malumix sau khi bảo quản 30 tháng, ở điều kiện bình thường chất lượng viên thay đổi vẫn trong giới hạn cho phép. Để nghị tuổi thọ 36 tháng

Kết luận: Đã điều chế thành công nguyên liệu được dụng magaldrat, viên nén magaldrat, có tuổi thọ cao, tác dụng điều trị ổn định, tương đương và có ưu điểm hơn so với các thuốc cùng nhóm, đạt tiêu chuẩn USP 24 (USP 26). Quy trình ổn định có tính lặp lại. Chế phẩm sẵn sàng được triển khai sản xuất tại công ty Domesco.

6. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ VIÊN NANG PHÓNG THÍCH KÉO DÀI (PTKD) VỚI HOẠT CHẤT DICLOFENAC NATRI

6.1. Nghiên cứu điều chế vi hạt và viên nang diclofenac PTKD

-Vi hạt được điều chế bằng phương pháp tạo hạt trực tiếp trên máy tạo hạt tầng sôi có đĩa quay. Công thức điều chế cho 1 lô vi hạt như sau:

Diclofenac natri	300 g
Avicel	600 g
Nước cất	1140 g

-Quy trình gồm 3 giai đoạn: tạo hạt ướt, làm tròn hạt và sấy vi hạt.

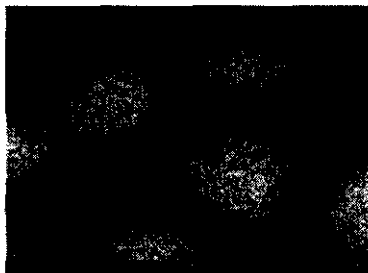
Các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng và hiệu suất điều chế vi hạt được khảo sát trong nghiên cứu gồm: tỉ lệ tá dược làm tròn hạt so với dược chất (Avicel: DFN), tỉ lệ và tốc độ phun nước.

6.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của lượng Avicel đến cấu trúc bề mặt của vi hạt

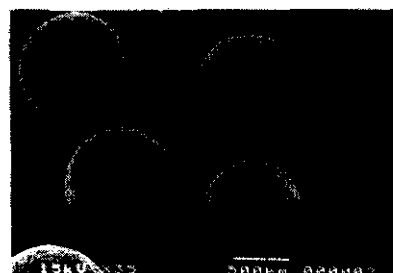
Hỗn hợp Avicel:DFN với tỉ lệ 2:1 (hình 6.3) tạo thành vi hạt có bề mặt rất nhẵn, thích hợp cho giai đoạn bao nên được chọn để nghiên cứu tiếp tục.



Hình 6.1. Vi hạt điều chế với hỗn hợp Avicel:DFN (1:1) (35X)



Hình 6.2. Vi hạt được điều chế từ hỗn hợp Avicel:DFN(1,5:1) (45X)



Hình 6.3. Vi hạt được điều chế từ hỗn hợp Avicel:DFN (2:1) (35X)

6.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ nước đến hiệu suất điều chế vi hạt

Hiệu suất đạt cao nhất khi tỉ lệ Avicel: DFN: Nước là 2: 1: 3,8.

6.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ phun nước đến hiệu suất tạo hạt

Năm công thức với tỉ lệ các thành phần giống nhau (Avicel 600 g; DFN 300 g; nước 1140 g) được khảo sát bằng cách thay đổi tốc độ phun nước, mỗi công thức được điều chế 6 lần (tổng cộng 30 lô thực nghiệm). Hiệu suất của qui trình điều chế được đánh giá bằng tỉ lệ phần trăm vi hạt trong khoảng 16-20 mesh. Kết quả tốc độ phun cho hiệu suất cao nhất là 30 g/phút.

Tóm tắt các thông số của qui trình điều chế vi hạt bằng máy tạo hạt tầng sôi

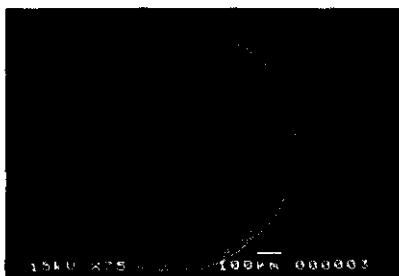
Thông số kỹ thuật	Giá trị điều chỉnh
Vận tốc đĩa quay trong giai đoạn tạo hạt	600 vòng/phút
Lưu lượng khí tạo tầng sôi	100-120 m ³ /giờ
Nhiệt độ khí vào	24-25°C
Nhiệt độ khí ra	20-24°C
Nhiệt độ trong buồng chứa hạt	17-20°C
Tốc độ phun nước	30 g/phút
Thời gian tạo hạt trung bình	40 phút
Vận tốc đĩa quay trong giai đoạn sấy sơ bộ	300 vòng/phút
Thời gian sấy sơ bộ	20 phút

6.1.4 Khảo sát các tính chất của vi hạt chưa bao

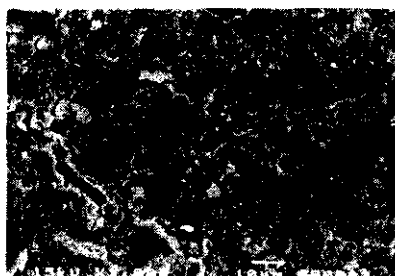
- **Hàm ẩm:** trung bình của vi hạt chưa bao là 0,97% (n = 6).
- **Độ mài mòn:** vi hạt có độ bền khá cao, độ mài mòn là 0,15%.
- **Phân bố kích thước vi hạt:** Có khoảng 85% hạt nằm trong khoảng 14-20 mesh và tỉ lệ vi hạt cao nhất nằm trong khoảng 16-20 mesh (trung bình 71,17%)
- **Xác định hàm lượng hoạt chất:** Sự khác biệt về hàm lượng giữa các lô rất nhỏ. Hàm lượng cao nhất là 100,11 mg và thấp nhất là 98,38 mg (trung bình $99,40 \pm 0,63$ mg; n = 6).

• Khảo sát hình thể và cấu trúc vi hạt

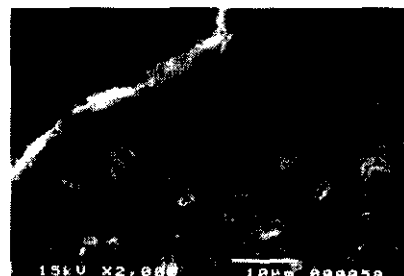
Ảnh chụp bề mặt và mặt cắt cho thấy các tiểu phân DFN và Avicel liên kết với nhau khá chặt chẽ, có những lỗ xấp nhỏ với kích thước khoảng 2-3 μm .



Hình 6.4. Vi hạt DFN chưa bao (75X)



Hình 6.5. Bề mặt vi hạt DFN chưa bao (1000X)



Hình 6.6. Mặt cắt của vi hạt DFN chưa bao (2000X)

• Khảo sát tốc độ phóng thích dược chất của vi hạt chưa bao

- Lượng DFN phóng thích trong 2 giờ đầu trong môi trường acid hầu như không đáng kể (khoảng 1%). Trong môi trường đệm pH 6,8, DFN được phóng thích khoảng 40% sau 1 giờ, và sau 6 giờ, lượng dược chất đã phóng thích được khoảng 70%; sau 12 giờ dược chất trong vi hạt đã phóng thích hơn 90%.
- Sau khi thử độ phóng thích dược chất, vi hạt vẫn còn nguyên dạng hình cầu, ảnh dưới kính hiển vi điện tử cắt lớp cho thấy có nhiều kênh khuếch tán xuất hiện trên bề mặt hạt, chứng tỏ vi hạt có cấu trúc khung matrix.



Hình 6.7. Vi hạt trước khi thử độ phóng thích hoạt chất (80X)



Hình 6.8. Vi hạt sau khi thử độ phóng thích hoạt chất (80X)

6.1.2. Bao vi hạt

6.1.2.1. Bao lót: Công thức dịch bao

HPMC	5%	PEG 6000	1,5%
Talc	5%	Titan dioxit	3,4%
Nhũ tương phá bột	0,2%	Nước cất vừa đủ	100%

6.1.2.2. Bao phóng thích được chất kéo dài

Nghiên cứu loại và tỉ lệ chất bao

Các vi hạt được bao với các Eudragit RS, Eudragit RL dùng riêng rẽ hoặc phối hợp với nhau. Công thức dịch bao phóng thích kéo dài.

Eudragit	50 gam	PEG 6000	5 gam
Nước cất	10 gam	Aceton: isopropanol (35:52,2) vđ	1000 gam

-Các lô vi hạt được khảo sát với 3 tỉ lệ chất bao khác nhau là 1%, 3% và 5% (tính theo khối lượng chất rắn).

-Các thông số kỹ thuật của qui trình bao vi hạt bằng các Eudragit

Thông số	Giá trị điều chỉnh
Lượng hạt cho mỗi lần bao	950 gam
Nhiệt độ phòng	24-26°C
Độ ẩm tương đối	65 ± 5%
Nhiệt độ khí vào	50°C
Nhiệt độ buồng chứa sản phẩm	30-32°C
Nhiệt độ khí thoát	30°C
Áp suất buồng bao	1,5 bar
Lưu lượng dịch bao	13-15 g/phút
Thời gian bao	Khoảng 40 phút

6.1.2.3. Bao bảo vệ

Các vi hạt sau khi được bao PTKD được bao bảo vệ với công thức tương tự công thức dịch bao lót, tỉ lệ lớp bao là 1% tính theo khối lượng vi hạt.

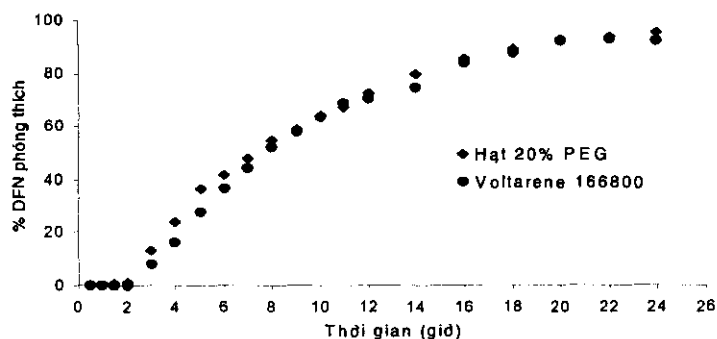
Nghiên cứu lựa chọn loại Eudragit và tỉ lệ Eudragit

. Các chất bao được khảo sát là Eudragit RS, Eudragit RL hoặc hỗn hợp Eudragit RS: Eudragit RL với các tỉ lệ khác nhau là 75:25, 50:50, 25:75 (KL/KL). Tỉ lệ lớp bao (tính trên khối lượng chất rắn) được lựa chọn là 1%, 3% và 5% so với khối lượng vi hạt.

Các hạt được bao với dịch bao chứa Eudragit RL tỉ lệ 1% có thể phóng thích được 87,62% sau 24 giờ. Tốc độ phóng thích được chất của mẫu này gần giống viên Voltaren® 100 mg nên được dùng để nghiên cứu tiếp tục.

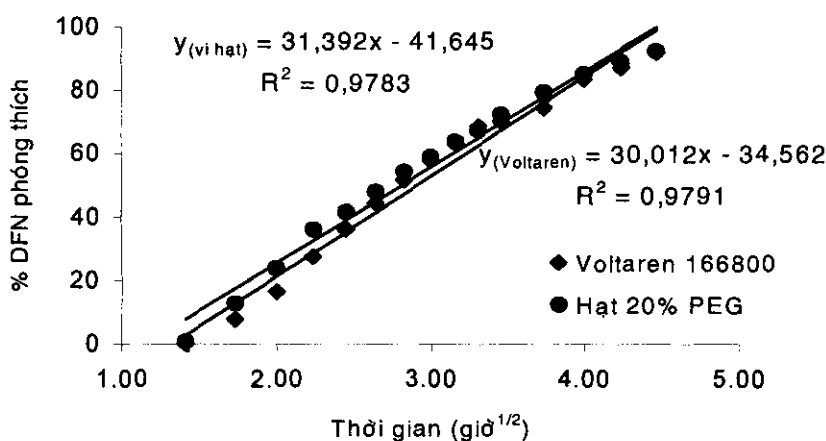
Nghiên cứu tỉ lệ PEG 6000

Công thức màng bao với 20% PEG được lựa chọn để điều chế vi hạt. Khi so sánh với viên Voltaren® 100 mg, tốc độ phóng thích dược chất của vi hạt tương đương với viên Voltaren® 100 mg.



Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm ĐFN phóng thích từ vi hạt có lớp màng bao chứa 20% PEG 6000 so với Voltaren® 100 mg (lô số 166800)

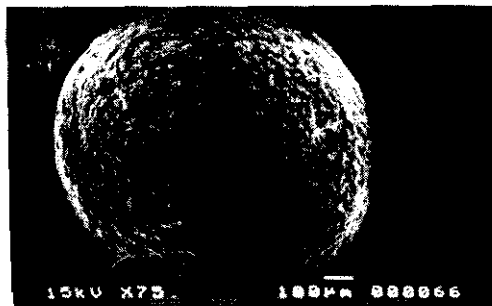
- Tương tự viên Voltaren® 100 mg, động học phóng thích dược chất của vi hạt cũng tuân theo mô hình Higuchi. Tỉ lệ phần trăm dược chất phóng thích tại mỗi thời điểm có thể dự đoán được theo phương trình $Q = 31,392\sqrt{t} - 41,65$, đặc trưng cho sự phóng thích dược chất do khuếch tán qua màng hoặc qua khung.



Phần trăm ĐFN phóng thích theo mô hình Higuchi từ vi hạt có lớp màng bao chứa 20% PEG 6000 so với Voltaren® 100 mg

Hình chụp dưới kính hiển vi điện tử cắt lớp cho thấy lớp bao phân bố khá đồng đều trên bề mặt hạt, bề dày lớp bao khoảng 6-8 μm , cấu trúc đậm đặc, không chứa các lỗ xốp (hình 6.10). Sau khi thử tốc độ phóng thích dược chất trong môi trường HCl 0,1 N, màng bao bắt đầu trương nở (hình 6.11) nhưng lượng dược chất phóng thích chỉ đạt tối đa khoảng 1%. Sau khi thử trong môi trường đệm phosphate pH 6,8 vi hạt biến

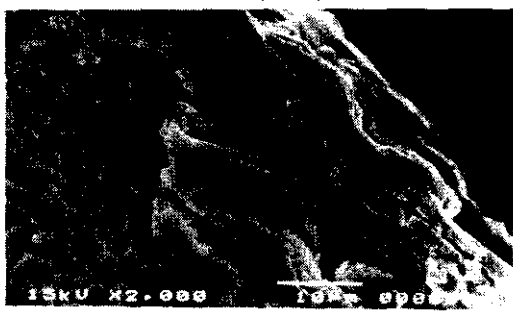
dạng do lớp bao trương nở nhiều, ảnh chụp mặt cắt lớp bao cho thấy có nhiều kênh khuếch tán có kích thước khá đồng nhất, đường kính trung bình khoảng 10 μm (hình 6.12).



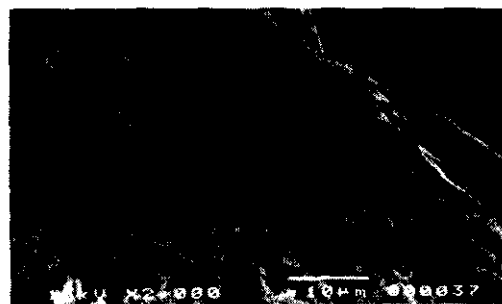
Hình 6.9. Vi hạt được bao bằng Eudragit RL (75X)



Hình 6.10. Màng bao trước khi thử độ phóng thích hoạt chất (2000X)



Hình 6.11. Màng bao sau khi thử độ phóng thích trong môi trường acid (2000X)



Hình 6.12. Màng bao sau khi thử trong môi trường đệm phosphat pH 6,8; các kênh khuếch tán hình thành rất rõ trên lớp bao (2000X)

6.1.2.4. Khảo sát độ ổn định của qui trình bao vi hạt

Sáu lô vi hạt (cỡ lô 3500 viên) đã được bao trong cùng điều kiện giống nhau như đã xác định. Hàm lượng và tốc độ phóng thích DFN của các lô đều tương đương nhau, cho thấy qui trình điều chế có tính ổn định cao.

6.1.3. Điều chế viên nang DFN 100 mg phóng thích kéo dài

Các vi hạt được bao với EudragitRL, tỉ lệ chất bao 1% được chọn để đóng vào nang số 1, hàm lượng trung bình của DFN trong mỗi nang là 100 mg.

6.2. Thử nghiệm độc tính cấp

Với $LD_{50} = 186,2 \text{ mg/kg}$, có thể kết luận các tá dược dùng trong công thức điều chế vi hạt không làm tăng độc tính của DFN.

6.3. Nghiên cứu tương đương sinh học so với thuốc đối chiếu Voltaren

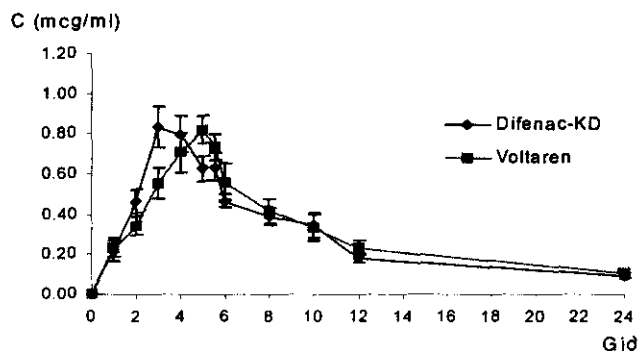
-Người tình nguyện: 14

-Thuốc thử nghiệm: Viên Difenac-KD, lô số 02, sản xuất ngày 15/01/2001.

-Thuốc đối chiếu: Voltaren® 100mg (lô số 166800, Novartis).

-Tốc độ phóng thích dược chất của 2 thuốc đã được khảo sát và xác định là tương đương nhau. Hàm lượng trung bình của viên Voltaren® 100 mg là 101,3 mg/viên và của viên Difenac-KD là 100,9 mg/viên.

Đường biểu diễn nồng độ Diclofenac trung bình trong huyết thu được ở 14 NTN sau khi uống viên Voltaren® 100 mg và viên Difenac-KD.

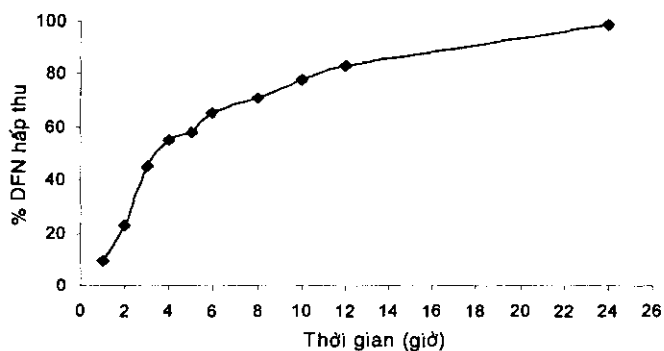


-Phân tích thống kê: Các số liệu được phân tích bằng phương pháp thống kê ANOVA. Tương đương sinh học được xác định bằng khoảng tin cậy 90% của các số liệu trung bình $AUC_{0-\infty}$, C_{max} và T_{max} .

Kết luận: viên Difenac-KD 100 mg tương đương sinh học với viên Voltaren® 100 mg.

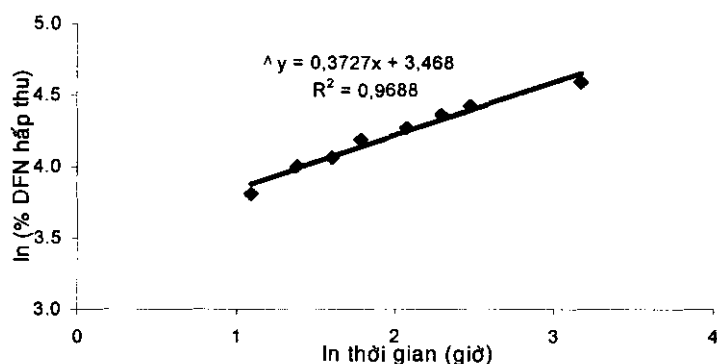
6.4. Khảo sát tốc độ hấp thu dược chất từ viên nang Difenac-KD.

Tốc độ hấp thu dược chất từ viên Difenac-KD nhanh ở 12 giờ đầu, lượng dược chất được hấp thu đạt đến 83,38% tại giờ thứ 12; sau giờ thứ 12 tốc độ hấp thu chậm dần và đến 24 giờ có 98,52% dược chất được hấp thu.



Đồ thị biểu diễn tốc độ hấp thu DFN từ viên Difenac-KD

Đường biểu diễn tốc độ hấp thu dược chất theo thời gian không thể hiện một sự tương quan tuyến tính, có thể kết luận sự hấp thu không tuân theo động học bậc 0. Khi biểu diễn đồ thị trên hệ trục tọa độ logarit tự nhiên toàn phần, sự hấp thu dược chất từ viên Difenac-KD thể hiện sự tuyến tính rõ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9688$.



Đồ thị biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN hấp thu *in vivo* trên hệ trục tọa độ logarit

Phương trình tốc độ hấp thu dược chất có thể viết lại như sau:

$\ln A = 0,3727 \ln t + 3,468$ (A: % dược chất được hấp thu tại thời điểm t)

Vì $\ln 32,072 = 3,468$; nên tỉ lệ phần trăm tại thời điểm t cho bởi:

$$\ln A = \ln t^{0,3727} + \ln 32,072 = \ln (t^{0,3727} \times 32,072)$$

Do đó, tỉ lệ phần trăm dược chất được hấp thu có thể được tính theo công thức đơn giản:

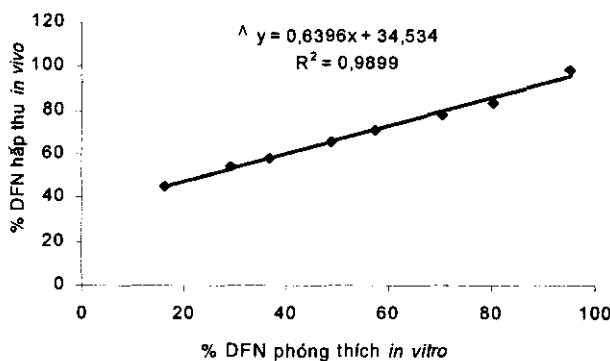
$$A = 32,072 t^{0,3727}$$

A: Tỉ lệ phần trăm dược chất được hấp thu; t: thời gian (giờ).

6.5. Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn viên PTKD

6.5.1. Khảo sát tương quan giữa tốc độ phóng thích dược chất *in vitro* với tốc độ hấp thu dược chất *in vivo*

Phân tích hồi qui tuyến tính giữa tốc độ phóng thích dược chất *in vitro* và tốc độ hấp thu dược chất *in vivo* cho thấy 2 thông số này có sự tương quan tuyến tính rõ và được biểu diễn bởi phương trình: $A = 0,6396D + 34,534$ (A: phần trăm dược chất hấp thu tại thời điểm t. D: phần trăm dược chất phóng thích tại thời điểm t tương ứng), với hệ số tương quan $R^2 = 0,9899$.



Đường biểu diễn tương quan giữa tốc độ phóng thích dược chất *in vitro* và tốc độ hấp thu *in vivo* của viên Difenac-KD

Đánh giá sai số dự đoán phần trăm của tương quan mức độ A

Kết quả tính toán sai số dự đoán phần trăm cho thấy sai số dự đoán tại mỗi thời điểm đều nhỏ hơn 10%, do đó, tương quan đã được thiết lập có khả năng dự đoán cao. Phương pháp thử độ phóng thích được chọn có thể được dùng để đánh giá chất lượng thuốc bằng các số liệu phóng thích *in vitro*.

6.5.2. Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn

Dự thảo tiêu chuẩn chất lượng viên Difenac-KD 100 mg theo yêu cầu của USP 23

6.6. Nghiên cứu độ ổn định và tuổi thọ của chế phẩm

6.6.1. Nghiên cứu độ ổn định bằng phương pháp lão hoá cấp tốc

-Điều kiện: $40 \pm 2^\circ\text{C}$ / độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$ và $30 \pm 2^\circ\text{C}$ / độ ẩm tương đối $60 \pm 5\%$. Các mẫu được kiểm tra cách mỗi 30 ngày trong thời gian bảo quản 6 tháng. Chỉ tiêu khảo sát: cảm quan, hàm lượng, tốc độ phóng thích dược chất. Kết quả: các tiêu chuẩn đều đạt

6.6.2. Dự báo tuổi thọ của thuốc

Dự báo tuổi thọ trung bình của chế phẩm trong điều kiện lão hoá cấp tốc: 1654 ngày, tương ứng với 55 tháng 23 ngày # 4 năm 07 tháng.

6.6.2. Nghiên cứu độ ổn định và tuổi thọ ở điều kiện bình thường

Sau 24 và 36 tháng bảo quản ở nhiệt độ và độ ẩm bình thường, hình dạng cảm quan, tỉ lệ phóng thích dược chất, hàm lượng DFN của Difenac-KD vẫn đạt tiêu chuẩn chất lượng. Tuổi thọ đề nghị 36 tháng

6.7. Kết luận

Đã điều chế thành công dạng viên nang chứa vi hạt PTKD bằng thiết bị tăng sôi. Quy trình ổn định, có tính lặp lại, viên nang Difenac – KD 100mg PTKD có tuổi thọ 3 năm, đạt tiêu chuẩn cơ sở, tương đương sinh học với thuốc đối chiếu Voltaren 100mg PTKD, sẵn sàng triển khai sản xuất tại công ty Domesco.

7. Các kết quả khác

7.1. Về đào tạo và công bố kết quả:

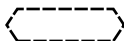
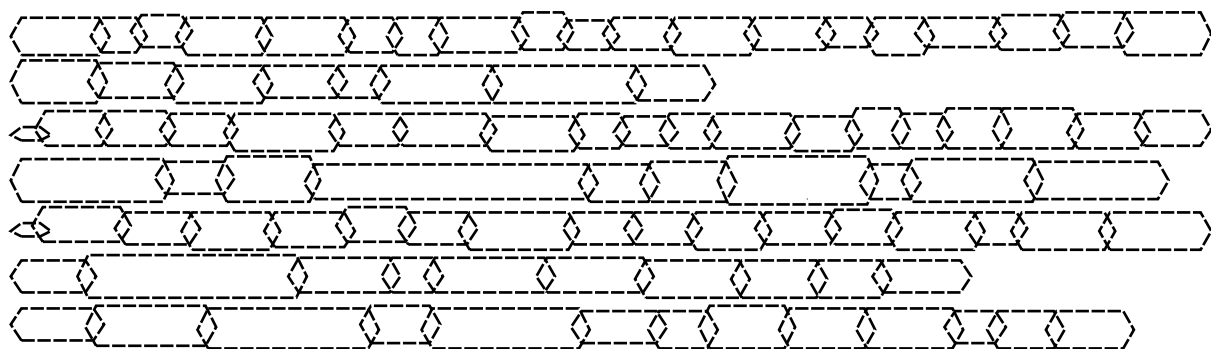
-Đề tài đã góp phần đào tạo 02 Tiến sĩ dược học, 04 Thạc sĩ dược học và một số Dược sĩ đại học.

-Kết quả liên quan đến đề tài đã được công bố với 12 bài báo trên tạp chí dược học

7.2. Về phương pháp luận nghiên cứu

- Đề tài đã ứng dụng các kỹ thuật hiện đại trong thực tiễn nghiên cứu bào chế thuốc: kỹ thuật đông khô để bảo quản vi khuẩn, kỹ thuật tạo hạt bằng máy tăng sôi điều chế vi hạt phóng thích kéo dài, kỹ thuật vi nang hóa với 2 phương pháp tách pha

<đồng tự và phur đồng tự, kỹ thuật tối ưu hoá công thức và qu trình bào chế bằng
<phần mềm thông minh và phương pháp toán học.>
<=> Lần đầu tiên nghiên cứu thành công, đủ cơ sở khoa học để có thể triển khai sản
<xuất dạng chế phẩm PTKD tại Việt Nam, góp phần phát triển hệ thống tri liệu mới.>
<=> Triển khai trong thực tiễn các nghiên cứu xác định sinh khả dụng và tương đương
<sinh học của thuốc, là vấn đề mới mẻ đối với ngành dược Việt Nam.>
<- Các kết quả nghiên cứu đều được xử lý đánh giá bằng phép thống kê phù hợp.>



MỤC LỤC

Trang

Danh sách những người thực hiện và danh sách các đề tài nhánh

Bảng chú giải các chữ viết tắt

Bài tóm tắt

Mục lục

Danh mục các bảng và hình

Lời mở đầu

1

1. Trích lược những điểm chính của thuyết minh đề tài

1

2. Mục tiêu của đề tài

4

3. Nội dung nghiên cứu

5

Nội dung chính

6

Chương 1: Tổng quan về các giải pháp kỹ thuật đã ứng dụng

6

1.1. Phương pháp đông khô ứng dụng làm khô và bảo quản vi khuẩn

6

1.2. Kỹ thuật vi nang hoá ứng dụng trong bào chế vi nang

8

1.3. Bào chế vi hạt bằng thiết bị tầng sôi

11

1.4. Thiết kế & tối ưu hóa công thức và qui trình bào chế bằng phần mềm

14

Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

22

2.1. Nguyên, vật liệu, thiết bị

22

2.1.1. Nghiên cứu bào chế viên bao tan trong ruột serratio peptidase

22

2.1.2. Nghiên cứu bào chế bột đông khô của vi khuẩn lactic làm men tiêu hoá

22

2.1.3. Nghiên cứu bào chế viên bao chứa amoxicilin và acid clavulanic

22

2.1.4. Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật vi nang để bào chế thuốc viên vitamin có sinh khả dụng và độ ổn định cao

23

2.1.5. Nghiên cứu điều chế nguyên liệu dược dụng và viên nén magaldrat

23

2.1.6. Nghiên cứu bào chế viên nang PTKD với hoạt chất diclofenac natri

23

2.2. Phương pháp nghiên cứu

23

Chương 3: Nội dung nghiên cứu, kết quả và bàn luận.

25

3.1. Nghiên cứu bào chế viên bao tan trong ruột serratio peptidase

25

3.1.1. Kết quả khảo sát phương pháp định lượng SER

25

3.1.2. Khảo sát hàm lượng các chế phẩm SER trên thị trường

37

3.1.3. Kết quả khảo sát điều kiện thử nghiệm độ hoà tan của viên SER

39

3.1.4. Khảo sát độ hoà tan của một số chế phẩm SER 10mg

43

3.1.5. Khảo sát sự ổn định của nguyên liệu và chế phẩm SER	49
3.1.6. Nghiên cứu bào chế viên bao phim SER tan trong ruột	58
3.1.7. Xác định tương đương sinh học <i>in vitro</i> bằng thử nghiệm độ hoà tan	67
3.1.8. Khảo sát độ ổn định và tuổi thọ của thành phẩm	68
3.1.9. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng viên bao SER 5mg	73
3.1.10. Nghiên cứu mở rộng cho viên SER 10 mg	74
3.2. Nghiên cứu bào chế bột đông khô của vi khuẩn lactic làm men tiêu hoá	75
3.2.1. Nghiên cứu môi trường, qui trình và điều kiện nuôi cấy vi khuẩn	75
3.2.2. Khảo sát các yếu tố ổn định và qui trình đông khô vi khuẩn	83
3.2.3. Xây dựng tiêu chuẩn và qui trình kiểm định vi khuẩn	87
3.2.4. Khảo sát khả năng đề kháng kháng sinh	108
3.2.5. Xác định có mặt plasmid và khả năng chuyển plasmid	112
3.2.6. Khảo sát độc tính cấp và bán cấp	113
3.2.7. Kết quả thử tác dụng trị tiêu chảy do loạn khuẩn và so sánh với thuốc cùng nhóm	118
3.2.8. Tiêu chuẩn cơ sở chế phẩm Bifilac	122
3.3. Nghiên cứu bào chế viên bao chứa amoxicilin và acid clavulanic	123
3.3.1. Kết quả thẩm định phương pháp HPLC định lượng amoxicilin & acid clavulanic	123
3.3.2. Kết quả thẩm định phương pháp quang phổ tử ngoại định lượng amoxicilin và acid clavulanic.	127
3.3.3. Kết quả nghiên cứu bào chế viên nhân, viên bao	129
3.3.4. Tóm tắt kết quả đánh giá tiêu chuẩn 3 lô viên bao theo USP XXIV	137
3.3.5. Khảo sát độ ổn định và xác định tuổi thọ của chế phẩm	140
3.3.6. Kết quả nghiên cứu tương đương sinh học	145
3.4. Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật vi nang để bào chế thuốc viên vitamin có sinh khả dụng và độ ổn định cao	157
3.4.1. Xây dựng phương pháp định lượng các vitamin trong viên 3B	157
3.4.2. Kết quả định lượng vitamin trong một số mẫu viên 3B đang lưu hành	160
3.4.3. Nghiên cứu lựa chọn thành phần viên Vitamin B1, B6, B12	161
3.4.4. Nghiên cứu chế tạo vi nang vitamin B ₁₂ bằng phương pháp tách pha đồng tụ để bào chế viên 3B	167
3.4.5. Nghiên cứu chế tạo vi nang vitamin B ₁₂ bằng phương pháp phun đông tụ	175
3.4.6. Đánh giá độ ổn định của các mẫu vi nang vitamin B ₁₂ và viên 3 B bào chế từ vi nang vitamin B12.	181

3.5.Nghiên cứu điều chế nguyên liệu dược dụng và viên nén magaldrat	187
3.5.1.Qui trình điều chế magaldrat dược dụng	187
3.5.2. Xác định thành phần công thức của phức hợp Magaldrat	189
3.5.3. Đặc điểm cấu trúc và phổ nhiễu xạ tia X của Magaldrat.	190
3.5.4. Chất lượng của nguyên liệu Magaldrat	191
3.5.5. Độ an toàn của Magaldrat.	192
3.5.6.Thiết kế công thức và bào chế viên nén Malumix	192
3.5.7.Kiểm nghiệm viên nén Malumix 400 mg, 480 mg và 540 mg	198
3.5.8. Kết quả nghiên cứu tác dụng sinh học và tương đương sinh học của malumix và các dược phẩm cùng nhóm.	200
3.5.9. Kết quả thử nghiệm độ an toàn của Malumix	202
3.5.10. Kết quả xác định độ ổn định của Magaldrat và Malumix	204
3.6.Nghiên cứu bào chế viên nang PTKD với hoạt chất diclofenac natri	205
3.6. 1. Điều chế và khảo sát đặc tính của vi hạt	205
3.6.2. Bao vi hạt	212
3.6.3. Điều chế viên nang Diclofenac natri 100 mg phóng thích kéo dài	219
3.6.4. Thử nghiệm độc tính cấp	221
3.6.5. Nghiên cứu tương đương sinh học	222
3.6.6. Khảo sát tốc độ hấp thu	228
3.6.7. Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn	230
3.6.8. Nghiên cứu độ ổn định và tuổi thọ của chế phẩm	234
Kết luận	243
Đề nghị	254
Tài liệu tham khảo	
Phụ lục	

- Các phiếu kiểm nghiệm

DANH MỤC BẢNG, HÌNH VÀ BIỂU ĐỒ

	Trang
Chương 1: Tổng quan về một số kỹ thuật mới đã ứng dụng	
Hình 1.1. Máy đông khô vi khuẩn Snijder	8
Hình 1.2.1. Sơ đồ thiết bị chế tạo vi nang ở qui mô bình đông tụ 10 lít	10
Hình 1.2.2. Sơ đồ thiết bị phun đông tụ điều chế vi nang	10
Hình 1.3.1. Quá trình hình thành vi hạt theo phương pháp tạo hạt trực tiếp	11
Hình 1.3.2. Buồng tạo hạt của máy tạo hạt tầng sôi có đĩa quay.	11
Hình 1.3.3. Máy tạo hạt tầng sôi có đĩa quay (Rotary fluidized bed granulator; Glatt Model GPCG-1, Glatt GmbH Technology, Đức)	11
Hình 1.3.4. Mặt cắt vi hạt được điều chế bằng phương pháp bồi được chất lên nhân trơ với thiết bị tầng sôi	12
Hình 1.3.5. Máy tạo hạt tầng sôi có đĩa quay được gắn thêm hệ thống cung cấp bột dùng cho phương pháp phun dịch – bồi bột luân phiên.	12
Hình 1.3.6. Nguyên lý hoạt động của máy bao tầng sôi kiểu phun từ trên xuống.	13
Hình 1.3.7. Máy bao tầng sôi kiểu phun từ trên xuống.	13
Hình 1.3.8. Nguyên lý hoạt động của máy bao tầng sôi kiểu phun tiếp tuyến.	13
Hình 1.3.9. Buồng bao của máy bao tầng sôi kiểu phun tiếp tuyến.	13
Hình 1.3.10. Nguyên lý hoạt động của máy bao tầng sôi kiểu phun từ dưới lên	14
Hình 1.3.11. Buồng bao của hệ thống bao tầng sôi kiểu phun từ dưới lên	14
Hình 1.4.1. Minh họa các mô hình công thức đặc biệt	15
Hình 1.4.2. Minh họa các mô hình quy trình đặc biệt	16
Hình 1.4.3. Sự kết hợp mạng thần kinh với logic mờ và thuật toán di truyền	16
Hình 1.4.4. Minh họa đơn vị thần kinh: sinh học (a) và nhân tạo (b)	18
Hình 1.4.5. Cấu trúc mạng thần kinh với một lớp ẩn: $I(i)-H(j)-o(k)$	18
Hình 1.4.6. Hàm truyền: sigmoid (a) và tanh (hyperbolic tangent) (b)	19
Hình 1.4.7. Minh họa logic cổ điển (a) và logic mờ (b)	19

3.1.Nghiên cứu bào chế viên bao tan trong ruột serratiopeptidase	
Bảng 3.1.1. Độ hấp thu của dung dịch Tyrosin	26
Bảng 3.1.2. Kết quả định lượng nguyên liệu SER	27
Bảng 3.1.3. Kết quả định lượng chế phẩm N₁(Số lô . 010103- HD . 01/05)	27
Bảng 3.1.4.Kết quả định lượng chế phẩm B₁(Số lô.1300603 - HD . 06/05)	27
Bảng 3.1.5. Kết quả định lượng của chế phẩm sản xuất theo công thức 1	28
Bảng 3.1.6. Kết quả định lượng của chế phẩm sản xuất theo công thức 2	29
Bảng 3.1.7. Kết quả định lượng của chế phẩm sản xuất theo công thức 3	29
Bảng 3.1.8. Kết quả định lượng với nguyên liệu (Lô 2022)	30
Bảng 3.1.9. Kết quả định lượng với chế phẩm N₁ (Lô 010103 - HD.01.05)	30
Bảng 3.1.10. Kết quả định lượng với chế phẩm B₁ (Lô 1300603 -HD.06.05)	30
Bảng 3.1.11. Kết quả định lượng với nguyên liệu (Lô 2022)	31
Bảng 3.1.12.Kết quả định lượng với chế phẩm N₁ (Lô 010103 - HD.01.05)	31
Bảng 3.1.13.Kết quả định lượng với chế phẩm B₁ (Lô 1300603-HD.06.05)	32
Bảng 3.1.14. Kết quả định lượng với nguyên liệu (Lô 2022)	32
Bảng 3.1.15. Kết quả định lượng với chế phẩm N₁ (Lô 010103-HD. 01.05)	33
Bảng 3.1.16. Kết quả định lượng với chế phẩm B₁(Lô 300603-HD.06.05)	33
Bảng 3.1.17. Độ hấp thu của giai mẫu tyrosin RS tương ứng với nồng độ	34
Bảng 3.1.18. Độ hấp thu của giai mẫu SER tương ứng với nồng độ	34
Bảng 3.1.19. Kết quả định lượng của nguyên liệu (Lô 2022)	35
Bảng 3.1.20. Kết quả định lượng của chế phẩm N₁(Lô 010103 -HD.01.05)	35
Bảng 3.1.21. Kết quả định lượng của chế phẩm B₁ (Lô 1300603 -HD.06.05)	36
Bảng 3.1.22. Độ đúng của qui trình	36
Bảng 3.1.23. Một số chế phẩm SER được lấy mẫu định lượng	37
Bảng 3.1.24. Kết quả định lượng chế phẩm SER đã mã hoá	38
Bảng 3.1.25. Kết quả định lượng một số lô của các chế phẩm đã chọn	39
Bảng 3.1.26. Kết quả định lượng nguyên liệu SER (Lô 2022)	40
Bảng 3.1.27. Kết quả định lượng chế phẩm N₁ (Lô 010103 -HD.01.05)	40
Bảng 3.1.28. Kết quả định lượng chế phẩm F₂ (Lô 305004 -HD. 05.06)	40
Bảng 3.1.29. Kết quả định lượng nguyên liệu (Lô 2022)	41
Bảng 3.1.30. Kết quả định lượng chế phẩm N₁ (Lô 010103, HD . 01.05)	41
Bảng 3.1.31. Kết quả định lượng chế phẩm F₂ (Lô 305004, HD . 05.06)	41
Bảng 3.1.32. Hàm lượng (%) hoạt chất giải phóng của chế phẩm F	42
Bảng 3.1.33. Hàm lượng (%) hoạt chất giải phóng của chế phẩm F	42
Bảng 3.1.34. Hàm lượng (%) hoạt chất giải phóng của chế phẩm B	42
Bảng 3.1.35. Hàm lượng hoạt chất giải phóng của chế phẩm C	44
Bảng 3.1.36. Hàm lượng (%) hoạt chất giải phóng của chế phẩm F	44
Bảng 3.1.37. Hàm lượng (%) hoạt chất giải phóng của chế phẩm N	44
Bảng 3.1.38. Hàm lượng(%) hoạt chất giải phóng chế phẩm S	46
Bảng 3.1.39. Tóm tắt độ hoà tan của các chế phẩm	47
Bảng 3.1.40. Tỷ lệ hoạt chất giải phóng so với hàm lượng	48
Bảng 3.1.41. Thay đổi hàm lượng SER dưới tác động của nhiệt độ cao 50→ 90°C, ở môi trường khan	52

Bảng 3.1.42. Sự thay đổi hàm lượng SER theo thời gian ở nhiệt độ 50°C, môi trường khan	52
Bảng 3.1.43. Thay đổi hàm lượng viên SER dưới tác động ở 50°C, độ ẩm 75%.	53
Bảng 3.1.44. Thay đổi hàm lượng SER trong điều kiện khống chế 25 ± 2°C độ ẩm 60 ± 5 % (thí nghiệm 3A)	55
Bảng 3.1.45. Thay đổi hàm lượng SER trong điều kiện khống chế 30 ± 35°C độ ẩm 70-75 % (thí nghiệm 3B)	56
Bảng 3.1.46. Dự đoán thời gian ổn định hay hạn sử dụng	56
Bảng 3.1.47. Tỷ lệ tăng khối lượng (bóc bỏ vi , cho tiếp xúc ẩm, nhiệt)	57
Bảng 3.1.48. Thông số cơ bản của các viên nhân.	60
Bảng 3.1.49. Biến đổi hoạt chất Ser. theo từng giai đoạn của quy trình	64
Bảng 3.1.50. Công thức viên nhân SER cho bào chế pilot	65
Bảng 3.1.51. Công thức dịch bao phim cho mẻ pilot	65
Bảng 3.1.52. Độ ẩm % của cối	66
Bảng 3.1.53. Một số kết quả kiểm nghiệm các mẫu viên Ser.	66
Bảng 3.1.54. Độ hoà tan một số chế phẩm nghiên cứu viên bao SER 5 mg	68
Bảng 3.1.55. Khả năng chống ẩm của các mẫu nghiên cứu	69
Bảng 3.1.56. Hàm lượng thuốc viên M2, M3, M4 ở 50°C, độ ẩm 60 ± 5%	69
Bảng 3.1.57. Khối lượng viên sau 23 tháng thử nghiệm	70
Bảng 3.1.58. Thay đổi hàm lượng Ser. của các mẫu nghiên cứu bảo quản trong điều kiện nóng ẩm. T ~ 30 - 35°C, độ ẩm ~ 70 - 75 %.	71
Bảng 3.1.59. Thay đổi hàm lượng Ser. của các mẫu nghiên cứu bảo quản trong điều kiện khống chế . nhiệt độ 25 ± 2°C, độ ẩm 60 ± 5 %.	72
Bảng 3.1.60. Tiêu chuẩn viên bao Serrapeptase 5 mg	73
Bảng 3.1.61. Công thức viên nhân Ser. 10 mg	74
HÌNH VÀ BIỂU ĐỒ	
Biểu đồ 3.1.1. Hàm lượng của một số chế phẩm chứa SER	39
Biểu đồ 3.1.2. Độ hoà tan của các chế phẩm ở 45 phút	47
Biểu đồ 3.1.3. Độ hoà tan của các chế phẩm ở 60 phút	47
Biểu đồ 3.1.4. Tỷ lệ % hoạt chất giải phóng so với hàm lượng của các chế phẩm ở 45 phút	48
Biểu đồ 3.1.5. Tỷ lệ % hoạt chất giải phóng so với hàm lượng của các chế phẩm ở 60 phút	48
Biểu đồ 3.1.6. Biểu đồ thay đổi hàm lượng SER dưới tác động của nhiệt độ cao 50 → 90°C, môi trường khan theo số liệu bảng 3.1.41	52
Hình 3.1.7. Biểu đồ sự thay đổi hàm lượng SER theo giờ dưới tác động của nhiệt độ 50°C, môi trường khan	53
Hình 3.1.8. Tỷ lệ nước (hàm ẩm) do các mẫu cối hấp thu .	60
Hình 3.1.9. Biến đổi hàm lượng hoạt chất của cối F2- F5 .	61
Hình 3.1.10. Mẫu viên nghiên cứu Serrapeptase 5 mg	67
3.2. Nghiên cứu bào chế bột đông khô vi khuẩn lactic làm men tiêu hoá	
BẢNG	
Bảng 3.2.1 . Kết quả xác định pH tối ưu cho sự tăng trưởng của <i>B.bifidum</i>	75

Bảng 3.2.2 . Số vi khuẩn sống/ml môi trường nuôi cấy ở các t° khác nhau	76
Bảng 3.2.3 . Tác động của oxy trên quá trình tăng trưởng của <i>B.bifidum</i>	76
Bảng 3.2.4. Số vi khuẩn/ml môi trường nuôi cấy có và không có chất tăng trưởng	77
Bảng 3.2.5. Ảnh hưởng của đường glucose trên sự tăng trưởng của <i>B.bifidum</i>	77
Bảng 3.2.6 . Số vi khuẩn /ml môi trường với các nguồn pepton khác nhau	78
Bảng 3.2.7 . Ảnh hưởng của hàm lượng pepton trên sự tăng trưởng của <i>B.bifidum</i>	78
Bảng 3.2.8. Ảnh hưởng của một số chất trên sự tăng trưởng của vi khuẩn <i>B.bifidum</i>	78
Bảng 3.2.9 . Thời gian tăng trưởng của <i>B.bifidum</i>	79
Bảng 3.2.10. Khoảng pH tăng trưởng của <i>L. acidophilus</i> quan sát bằng so độ đục	80
Bảng 3.2.11. Khoảng pH tăng trưởng của <i>L. acidophilus</i> quan sát bằng so độ đục	80
Bảng 3.2.12 . Sự tăng trưởng của <i>L. acidophilus</i> với các nguồn pepton khác nhau	81
Bảng 3.2.13 . Số vi khuẩn / 1ml dịch cấy môi trường có và không có yếu tố tăng trưởng	82
Bảng 3.2.14 . Số vi khuẩn /ml dịch nuôi cấy ở các nồng độ đường khác nhau sau 24 giờ	82
Bảng 3.2.15 . Thời gian tăng trưởng của <i>L.acidophilus</i>	82
Bảng 3.2.16. Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy vi khuẩn đến sự sống sót của vi khuẩn sau các khoảng thời gian khác nhau sau khi ổn định bằng phương pháp đông khô.	85
Bảng 3.2.17. Ảnh hưởng của nồng độ Yeast Extract tới sự sống sót của vi khuẩn sau khi ổn định bằng phương pháp đông khô.	85
Bảng 3.2.18. Ảnh hưởng của nồng độ Yeast extract tới sự sống sót của vi khuẩn sau khi ổn định bằng phương pháp đông khô.	86
Bảng 3.2.19. Ảnh hưởng của nồng độ Sữa tới sự sống sót của vi khuẩn sau khi ổn định bằng phương pháp đông khô.	86
Bảng 3.2.20. Ảnh hưởng của tỉ lệ vi khuẩn và môi trường đông khô tới sự sống sót của vi khuẩn sau khi ổn định bằng phương pháp đông khô.	89
Bảng 3.2.21. Khả năng chịu đựng pH acid của <i>B.bifidum</i>	90
Bảng 3.2.22. Kết quả phản ứng sinh hóa của <i>B. bifidum</i>	92
Bảng 3.2.23 . Khả năng chịu đựng acid của vi khuẩn nhận định	92
Bảng 3.2.24. kết quả định lượng acid tổng cộng	93
Bảng 3.2.25. So sánh lượng acid lactic và acid tổng cộng	94
Bảng 3.2.26. Sự tăng trưởng của vi khuẩn ở các nhiệt độ khác nhau	94
Bảng 3.2.27. Phản ứng sinh hóa của <i>L. acidophilus</i>	95
Bảng 3.2.28. Kết quả định danh ở mức độ chi	96
Bảng 3.2.29. Kết quả định danh bằng kit API 20A	96
Bảng 3.2.30. Kết quả định danh bằng kit API 50 CHL	97
Bảng 3.2.31. Kết quả khảo sát độ chính xác	99
Bảng 3.2.32. Kết quả khảo sát độ đúng	99
Bảng 3.2.33. Kết quả khảo sát độ chính xác	100
Bảng 3.2.34. Kết quả khảo sát độ đúng	101
Bảng 3.2.35 . Kết quả so sánh môi trường rắn và môi trường bán lỏng	102

Bảng 3.2.36. Kết quả so sánh môi trường thạch MRS và thạch Tomato	103
Bảng 3.2.37 . Khả năng chịu pH acid dạ dày	103
Bảng 3.2.38. Khả năng chịu dịch mật	104
Bảng 3.2.39 . Khả năng chịu acid và dịch mật 0,5%	104
Bảng 3.2.40 . Khả năng chịu acid và muối mật 1,0%	104
Bảng 3.2.41 . Khả năng chịu acid và dịch mật 1,5%	104
Bảng 3.2.42. Khả năng chịu acid và dịch mật 2,0%	105
Bảng 3.2.43 . Kết quả khảo sát độ nhiễm khuẩn	105
Bảng 3.2.44. Ảnh hưởng của mẫu lên khả năng phát hiện	106
Bảng 3.2.45. Kết quả kiểm tra nhiễm vi khuẩn <i>E.coli</i> và <i>Staphylococcus aureus</i> sau quá trình đông khô.	106
Bảng 3.2.46 . Kết quả kiểm nghiệm nấm mốc nấm men của bột sau khi đông khô	107
Bảng 3.2.47 . Độ ẩm bột đông khô	108
Bảng 3.2.48 . Kết quả MIC của <i>B. bifidum</i>	108
Bảng 3.2.49. Kết quả nhạy cảm với các kháng sinh của <i>B. bifidum</i>	109
Bảng 3.2.50. Kết quả MIC của <i>L. acidophilus</i>	109
Bảng 3.2.51. Kết quả nhạy cảm với các kháng sinh của <i>L. acidophilus</i>	110
Bảng 3.2.52. Kết quả xác khảo sát sự đề kháng kháng sinh bằng phương pháp tìm MIC trên các mẫu lưu hành trên thị trường	111
Bảng 3.2.53. Kết quả khảo sát sự đề kháng kháng sinh bằng phương pháp đặt đĩa giấy	112
Bảng 3.2.54. Số lượng bạch cầu, hồng cầu, tiểu cầu sau 21 và 45 ngày	115
Bảng 3.2.55. Các trị số SGOT, SPGT, BILIRUBIN sau 21 và 45 ngày	116
Bảng 3.2.56. Nồng độ BUN, creatinin huyết thể hiện chức năng thận sau 21 ngày và 45 ngày thử nghiệm	116
Bảng 3.2.57. Thể trọng chuột trung bình của hai lô thử và chứng (gram) lúc bắt đầu và lúc kết thúc đợt thử nghiệm	116
Bảng 3.2.58 . Tỷ lệ chuột chết, tỉ lệ chuột sưng viêm, tỉ lệ chuột tiêu chảy.	116
Bảng 3.2.59 . Khảo sát tình trạng của gan	117
Bảng 3.2.60 . Bảng tổng kết chung các kết quả	118
Bảng 3.2.61 . Tỷ lệ chuột tiêu chảy khi uống các liều kháng sinh	119
Bảng 3.2.62 . Tỷ lệ chuột hết tiêu chảy khi điều trị với các liều vi khuẩn thử nghiệm khác nhau	121
Bảng 3.2.63. Kết quả trị tiêu chảy của vi khuẩn <i>B.bifidum</i> và <i>L.acidophilus</i> dùng riêng rẽ và phối hợp	121
Bảng 3.2.64 . So sánh kết quả trị tiêu chảy của vi khuẩn <i>B.bifidum</i> và <i>L.acidophilus</i> với các biệt dược	122
Bảng 3.2.65 . Giá trị sput cân trung bình ở các lô (gam) chuột điều trị	122
SƠ ĐỒ, BIỂU ĐỒ VÀ HÌNH	
Sơ đồ 3.2.1. Qui trình nuôi cấy <i>B. bifidum</i>	75
Sơ đồ 3.2.2. Qui trình nuôi cấy <i>L. acidophilus</i>	84
Sơ đồ 3.2.3. Sơ đồ định danh vi khuẩn <i>B. bifidum</i>	89
Biểu đồ 3.2.1 . Đường cong tăng trưởng của <i>B. bifidum</i>	79

Biểu đồ 3.2.2 . Đường cong tăng trưởng của <i>L. Acidophilus</i>	
Hình 3.2.1 . Khuẩn lạc <i>B.bifidum</i> trên môi trường số 2	88
Hình 3.2.2. <i>B.bifidum</i> qua kính hiển vi x1000	89
Hình 3.2.3 . Các phản ứng sinh hóa của <i>B.bifidum</i> qua bộ kit API20A	90
Hình 3.2.4 . <i>L.acidophilus</i> qua kính hiển vi x1000	91
Hình 3.2.5. Khuẩn lạc <i>L.acidophilus</i>	92
Hình 3.2.6 . Các phản ứng sinh hóa của <i>L.acidophilus</i> qua bộ kit API20A	95
Hình 3.2.7 . Một số hình ảnh về <i>L. acidophilus</i> 1 từ mẫu 001.	97
Hình 3.2.8 . Một số hình ảnh về <i>L. acidophilus</i> 1 từ mẫu 006.	98
Hình 3.2.9 . Một số hình ảnh về <i>L. acidophilus</i> 3 từ mẫu 007	98
Hình 3.2.10. Hình ảnh MIC của <i>B. bifidum</i> với kháng sinh Cefalexin và Cefoperazon	110
Hình 3.2.11. Kết quả chạy điện di trên gel agarose	113
Hình 3.2.12. Cho chuột uống vật liệu thử nghiệm	120
Hình 3.2.13. Chuột bị tiêu chảy sau khi uống kháng sinh	120
3.3.Nghiên cứu bào chế viên bao phim chứa amoxicilin và acid clavulanic	
BẢNG	
Bảng 3.3.1. Kết quả các thông số sắc ký ứng với đỉnh của amoxicilin	123
Bảng 3.3.2. Kết quả các thông số sắc ký ứng với đỉnh của acid clavulanic	123
Bảng 3.3.3. Độ đúng của phương pháp HPLC định lượng amoxicilin	124
Bảng 3.3.4. Độ đúng của phương pháp HPLC định lượng acid clavulanic	124
Bảng 3.3.5. Kết quả độ lặp lại của phương pháp HPLC	125
Bảng 3.3.6. Kết quả độ chính xác trung gian của acid clavulanic và amoxicilin	125
Bảng 3.3.7. Kết quả tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh acid clavulanic và amoxicilin	126
Bảng 3.3.8. Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng clavulanic và amoxicilin	127
Bảng 3.3.9. Kết quả xác định khoảng tuyến tính của phương pháp quang phổ	127
Bảng 3.3.10. Kết quả xác định độ chính xác của phương pháp quang phổ	128
Bảng 3.3.11. Kết quả xác định độ đúng của phương pháp quang phổ	129
Bảng 3.3.12. Kết quả bề dày, độ cứng và độ mài mòn của 12 công thức viên nhân	129
Bảng 3.3.13. Kết quả đồng đều khối lượng, độ rã và độ ẩm của 12 công thức viên nhân	130
Bảng 3.3.14. Kết quả hàm lượng và độ hòa tan của 12 công thức viên nhân	130
Bảng 3.3.15. Tóm tắt kết quả giá trị các biến độc lập và biến phụ thuộc của 12 công thức viên nhân	130
Bảng 3.3.16. Kết quả tối ưu hóa	131
Bảng 3.3.17. Kết quả độ ẩm, tỷ trọng biểu kiến và góc chảy của 3 lô hạt theo công thức tối ưu trước khi dập viên	131
Bảng 3.3.18. Kết quả phân bố kích thước hạt của 3 lô hạt theo công thức tối ưu trước khi dập viên	131
Bảng 3.3.19. Kết quả độ cứng; độ rã của viên nhân và viên bao của 3 lô công thức tối ưu	133
Bảng 3.3.20. Kết quả bề dày của viên nhân, viên bao và của lớp bao của 3 lô	133

công thức tối ưu	
Bảng 3.3.21. Kết quả hàm lượng của 3 lô công thức tối ưu	133
Bảng 3.3.22. Kết quả độ hòa tan của 3 lô công thức tối ưu	133
Bảng 3.3.23. Kết quả độ đồng đều khối lượng và tỷ lệ tăng khối lượng của viên nhân và viên bao của 3 lô công thức tối ưu	134
Bảng 3.3.24. Kết quả độ đồng đều hàm lượng acid clavulanic của 3 lô công thức tối ưu	135
Bảng 3.3.25. Kết quả độ ẩm, độ mài mòn của 3 lô công thức tối ưu	135
Bảng 3.3.26. So sánh các giá trị thực nghiệm với giá trị dự đoán từ phần mềm INForm	136
Bảng 3.3.27. Kết quả khảo sát khả năng bảo vệ của lớp bao vể cảm quan và sự giảm hàm lượng acid clavulanic ở điều kiện $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $80 \pm 5\%$ RH	136
Bảng 3.3.28. Hàm lượng nước và hàm lượng hoạt chất của chế phẩm viên bao	138
Bảng 3.3.29. Độ hòa tan của chế phẩm viên bao	138
Bảng 3.3.30. Biến thiên khối lượng đối với amoxicilin	139
Bảng 3.3.31. Đồng đều hàm lượng acid clavulanic	139
Bảng 3.3.32. Khảo sát hàm lượng hoạt chất theo điều kiện lão hóa cấp tốc	140
Bảng 3.3.33. Khảo sát hàm lượng nước của các mẫu được bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$	141
Bảng 3.3.34. Kết quả khảo sát độ hòa tan amoxicilin của các mẫu được bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$	141
Bảng 3.3.35. Kết quả khảo sát độ hòa tan acid clavulanic của các mẫu được bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$	141
Bảng 3.3.36. Kết quả khảo sát hàm lượng amoxicilin trong 12 tháng bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$	142
Bảng 3.3.37. Kết quả khảo sát hàm lượng acid clavulanic trong 12 tháng bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$	142
Bảng 3.3.38. Hàm lượng nước các mẫu được bảo quản ở điều kiện $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{ RH} \pm 5\%$	144
Bảng 3.3.39. Kết quả khảo sát độ hòa tan của acid clavulanic sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$	144
Bảng 3.3.40. Kết quả khảo sát hàm lượng acid clavulanic ở điều kiện $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$	145
Bảng 3.3.41. Kết quả sự thay đổi hàm lượng acid clavulanic ở $25^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RH} \pm 5\%$ trong thời gian bảo quản	145
Bảng 3.3.42. Kết quả phân tích thống kê sự tương quan giữa hàm lượng acid clavulanic và thời gian bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RH} \pm 5\%$ và tuổi thọ ước tính tại thời điểm 12 tháng	145
Bảng 3.3.43. Kết quả tương đương sinh học <i>in vitro</i>	146
Bảng 3.3.44. Kết quả các thông số sắc ký ứng với đỉnh của hoạt chất trong huyết thanh	147
Bảng 3.3.45. Kết quả xác định khoảng tuyến tính của phương pháp HPLC	148
Bảng 3.3.46. Kết quả xác định độ chính xác trong ngày của phương pháp định lượng amoxicilin trong huyết thanh	149

Bảng 3.3.47. Kết quả xác định độ chính xác giữa các ngày của phương pháp định lượng amoxicilin trong huyết thanh	149
Bảng 3.3.48. Kết quả xác định độ chính xác trong ngày của phương pháp định lượng acid clavulanic trong huyết thanh	149
Bảng 3.3.49. Kết quả xác định độ chính xác giữa các ngày của phương pháp định lượng acid clavulanic trong huyết thanh	150
Bảng 3.3.50. Kết quả xác định độ đúng trong ngày của phương pháp định lượng amoxicilin trong huyết thanh	150
Bảng 3.3.51. Kết quả xác định độ đúng giữa các ngày của phương pháp định lượng amoxicilin trong huyết thanh	150
Bảng 3.3.52. Kết quả xác định độ đúng trong ngày của phương pháp định lượng acid clavulanic trong huyết thanh	151
Bảng 3.3.53. Kết quả xác định độ đúng giữa các ngày của phương pháp định lượng acid clavulanic trong huyết thanh	152
Bảng 3.3.54. Kết quả xác định tỷ lệ phục hồi đối với amoxicilin trong huyết thanh	152
Bảng 3.3.55. Kết quả xác định tỷ lệ phục hồi đối với clavulanic trong huyết thanh	153
Bảng 3.3.56. Kết quả phân tích nồng độ amoxicilin và acid clavulanic trong huyết thanh 12 người tình nguyện sau khi uống viên Augmentin và viên nghiên cứu	153
Bảng 3.3.57. Các thông số dược động của amoxicilin từ 12 người tình nguyện sau khi uống viên Augmentin (Aug.) và viên nghiên cứu (NC)	155
Bảng 3.3.58. Các thông số dược động của acid clavulanic từ 12 người tình nguyện sau khi uống viên Augmentin (Aug.) và viên nghiên cứu (NC)	155
Bảng 3.3.59. Kết quả so sánh tương đương theo khoảng tin cậy 90% đối với amoxicilin từ chế phẩm đối chiếu (Aug.) và chế phẩm nghiên cứu (NC)	156
Bảng 3.3.60. Kết quả so sánh tương đương theo khoảng tin cậy 90% đối với acid clavulanic từ chế phẩm đối chiếu (Aug.) và chế phẩm nghiên cứu (NC)	157
SƠ ĐỒ BIỂU ĐỒ VÀ HÌNH	
Hình 3.3.1. Đồ thị tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh của acid clavulanic	126
Hình 3.3.2. Đồ thị tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh của amoxicilin	126
Hình 3.3.3. Sơ đồ điều chế hỗn hợp bao và quy trình bao viên	132
Hình 3.3.4. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn (a), Sắc ký đồ dung dịch thử (b).	138
Hình 3.3.5. Đồ thị biểu diễn sự giảm hàm lượng của acid clavulanic và amoxicilin.	140
Hình 3.3.6. Biểu đồ độ hòa tan acid clavulanic của mẫu theo thời gian	142
Hình 3.3.7. Biểu đồ biểu diễn sự giảm hàm lượng acid clavulanic	143
Hình 3.3.8. Biểu đồ biểu diễn sự giảm hàm lượng amoxicilin	147
Hình 3.3.9. Sắc ký đồ huyết thanh trắng (a), sắc ký đồ huyết thanh người tình nguyện ở thời điểm 60 phút (b) và 240 phút (c).	147
Hình 3.3.10. Đồ thị nồng độ máu trung bình của amoxicilin từ 12 NTN	154
Hình 3.3.11. Đồ thị nồng độ máu trung bình của acid clavulanic từ 12 NTN	154
3.4. Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật vi nang để bào chế thuốc viên vitamin có sinh khả dụng và độ ổn định cao	
Bảng 3.4.1. Diện tích các pic thu được khi ủ nhũ lỏng các mẫu thử của vitamin B1	158
Bảng 3.4.2 Diện tích các pic thu được khi ĐL các mẫu thử của vitamin B6	158
Bảng 3.4.3. Diện tích các pic thu được khi ĐL các mẫu thử của vitamin B12	158

Bảng 3.4.4. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp ĐL vitamin B1, bằng HPLC	158
Bảng 3.4.5. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp ĐL vitamin B6, bằng HPLC	159
Bảng 3.4.6. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp ĐL vitamin B12, bằng HPLC	159
Bảng 3.4.7. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp ĐL vitamin B1, bằng HPLC	159
Bảng 3.4.8. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp định lượng vitamin B ₆ , bằng HPLC	159
Bảng 3.4.9. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp định lượng vitamin B12 bằng HPLC	160
Bảng 3.4.10. Hàm lượng vitamin trong các mẫu viên	160
Bảng 3.4.11. Hàm lượng vitamin trong các mẫu viên	161
Bảng 3.4.12. Hàm lượng còn lại của vitamin B6 trong điều kiện bao gói chống ẩm	162
Bảng 3.4.13. Hàm lượng còn lại của vitamin B12 trong điều kiện bao gói chống ẩm	162
Bảng 3.4.14. So sánh hàm lượng vitamin B12 khi có vitamin B1.HCl và vitamin B1.NO ₃ trong hỗn hợp	163
Bảng 3.4.15. Hàm lượng còn lại của Vitamin B1 trong điều kiện có tác động của độ ẩm	163
Bảng 3.4.16 . So sánh HL vitamin B1 trong các mẫu hỗn hợp với mẫu đơn chất	164
Bảng 3.4.17. Hàm lượng còn lại của vitamin B6 trong điều kiện có tác động của ẩm	165
Bảng 3.4.18 . So sánh hàm lượng vitamin B6 khi có vitamin B1.HCl và vitamin B1.NO ₃ trong hỗn hợp	165
Bảng 3.4.19. Hàm lượng còn lại của các dược chất khi có mặt tá dược	166
Bảng 3.4.20. Hiệu suất vitamin B12 được vi nang hoá	167
Bảng 3.4.21. Thành phần phân đoạn kích thước của các tiểu phân Vitamin B12	168
Bảng 3.4.22. Thành phần phân đoạn kích thước của vi nang Vitamin B12	168
Bảng 3.4.23. Độ hoà tan vitamin B12 từ các mẫu vi nang theo thời gian	169
Bảng 3.4.24. Độ hoà tan Vitamin B12 từ các mẫu bột vi nang.	170
Bảng 3.4.25 Giá trị khoảng biến đổi của các yếu tố định lượng (Giá trị tính cho 1 viên)	191
Bảng 3.4.26. Một số chỉ tiêu của 16 mẫu viên nén (không bao)	172
Bảng 3.4.27. Độ hoà tan của Vitamin B12 từ các mẫu viên sau 45 phút	173
Bảng 3.4.28. Độ giảm hàm lượng Vitamin B12 sau thời gian lão hoá	173
Bảng 3.4.29. Các hệ số bị của phương trình hồi qui	174
Bảng 3.4.30 Quy hoạch thực nghiệm để tìm điều kiện tối ưu	175
Bảng 3.4.31. Độ hoà tan Vitamin B12 từ các mẫu viên sau 45 phút	175
Bảng 3.4.32. Độ giảm HL Vitamin B12 sau thời gian lão hóa	175
Bảng 3.4.33. Thành phần phân đoạn theo kích thước và hiệu suất tạo vi nang Vitamin B12	176
Bảng 3.4.34. Kích thước tiểu phân và độ hoà tan vitamin B ₁₂ của các mẫu vi nang có thành phần tá dược khác nhau	179
Bảng 3.4.35. Tốc độ hoà tan vitamin B ₁₂ từ các mẫu vi nang phun đông tụ	179
Bảng 3.4.36 Độ suy giảm hàm lượng và độ hoà tan của các mẫu vi nang Vitamin B ₁₂ sau 3 tháng bảo quản ở 45°C ± 2°C, 75% ± 5% RH	182
Bảng 3.4.37 Độ suy giảm hàm lượng và độ hoà tan vitamin B ₁₂ của các mẫu viên nén sau 3 tháng bảo quản ở 45°C ± 2°C, 75% ± 5% RH.	183
Bảng 3.4.38 . Sự thay đổi hàm lượng của vitamin B ₁₂ trong viên 3B ở các điều kiện lão hoá cấp tốc theo thời gian	184
Bảng 3.4.39. Các số liệu phân tích tương quan và phương trình hồi qui ở các điều kiện lão hoá cấp tốc	185
HÌNH	
Hình 3.4.1. Đồ thị tốc độ hoà tan của Vitamin B12 khi có và không có Tween 80.	170
Hình 3.4.2. Đồ thị tốc độ hoà tan vitamin B ₁₂ từ các mẫu vi nang I ₆ , I ₈ , I ₁₁ , I ₁₂	180
Hình 3.4.3. Đồ thị tốc độ hoà tan vitamin B ₁₂ từ các mẫu vi nang I ₉ , I ₁₀ , I ₁₃ , I ₁₄	180

3.5.Nghiên cứu điều chế nguyên liệu dược dụng và viên nén magaldrat	
BẢNG	
Bảng 3.5.1. Ảnh hưởng của nồng độ dd NaAlO_2 và MgSO_4 lên khối lượng Magaldrat	188
Bảng 3.5.2 . Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khối lượng Magaldrat	188
Bảng 3.5.3. Kết quả phân tích thành phần công thức của phức hợp Magaldrat	189
Bảng 3.5.4 . Kết quả kiểm nghiệm nguyên liệu Magaldrat	191
Bảng 3.5.5. Kết quả kiểm tra 5 mẫu nguyên liệu Magaldrat.	192
Bảng 3.5.6. Tỷ trọng thô của nguyên liệu Magaldrat (sấy phun sương)	193
Bảng 3.5.7. Tỷ trọng do gỗ của nguyên liệu Magaldrat (sấy phun sương)	193
Bảng 3.5.8. Độ giảm khối lượng do sấy khô của Magaldrat	193
Bảng 3.5.9. Khả năng trung hoà acid của Magaldrat (KNTHA)	194
Bảng 3.5.10. Tỷ trọng thô của nguyên liệu Magaldrat (sấy tủ sấy)	194
Bảng 3.5.11. Tỷ trọng biểu kiến của nguyên liệu Magaldrat (sấy tủ sấy)	194
Bảng 3.5.12. Độ giảm khối lượng do sấy khô của Magaldrat	195
Bảng 3.5.13. Khả năng trung hoà acid của Magaldrat (KNTHA)	195
Bảng 3.5.14. Thành phần hoạt chất và tá dược của 6 công thức thực nghiệm	196
Bảng 3.5.15. Đặc tính kỹ thuật của viên Malumix 400 mg	196
Bảng 3.5.16. Kết quả kiểm tra thông số cốm dập viên	197
Bảng 3.5.17. Kết quả chỉ tiêu kỹ thuật các công thức viên nén Magaldrat 480mg	197
Bảng 3.5.18. Kết quả kiểm tra thông số cốm dập viên	198
Bảng 3.5.19. Kết quả đặc tính kỹ thuật các công thức viên nén Magaldrat 540 mg	198
Bảng 3.5.20. Khả năng trung hoà acid của một số chế phẩm kháng acid	201
Bảng 3.5.21. Khả năng ức chế pepsin của Malumix và thuốc đối chiếu ($p < 0,05$)	201
Bảng 3.5.22. Kết quả chỉ số loét của Malumix và thuốc đối chiếu	202
Bảng 3.5.23. Chỉ số huyết học của chuột sau 45 ngày uống Malumix	203
Bảng 3.5.24. Chỉ số ASAT, ALAT của chuột sau 45 ngày uống Malumix	203
Bảng 3.5.25. Chất lượng của Magaldrat bảo quản ở 30°C sau 48 tháng	204
SƠ ĐỒ VÀ HÌNH	
Sơ đồ 3.5.1. Điều chế nguyên liệu Magaldrat	187
Hình 3.5.1. Phổ nhiễu xạ tia X của Magaldrat điều chế $\text{Al}_5\text{Mg}_{10}(\text{OH})_{31}(\text{SO}_4)_2$	190
Hình 3.5.2. Phổ nhiễu xạ tia X của hỗn hợp $\text{Al}(\text{OH})_3$ và $\text{Mg}(\text{OH})_2$	190
Hình 3.5.3. Niêm mạc dạ dày chuột bị loét do	202
Hình 3.5.4. Malumix bảo vệ niêm mạc dạ dày	202
Hình 3.5.5 . Viên nén Malumix	205
3.6.Nghiên cứu bào chế viên nang PTKD với hoạt chất diclofenac natri	
BẢNG	
Bảng 3.6.1. Các công thức dùng khảo sát ảnh hưởng của lượng Avicel đến cấu trúc bề mặt vi hạt	206
Bảng 3.6.2. Các công thức dùng khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ nước đến hiệu suất điều chế vi hạt	207
Bảng 3.6.3. Tỉ lệ (%) vi hạt 16-20 mesh từ các công thức có tỉ lệ nước khác nhau	207

Bảng 3.6.4. Tỷ lệ (%) vi hạt 16-20 mesh từ một công thức khi thay đổi tốc độ phun nước	208
Bảng 3.6.5. Các thông số của qui trình điều chế vi hạt bằng máy tăng sôi	209
Bảng 3.6.6. Phân bố kích thước vi hạt	212
Bảng 3.6.7. Các thông số kỹ thuật của qui trình bao vi hạt bằng HPMC	213
Bảng 3.6.8. Các thông số kỹ thuật của qui trình bao vi hạt bằng các Eudragit	213
Bảng 3.6.9. Khối lượng trung bình và hàm lượng của các lô viên nang	220
Bảng 3.6.10. Cỡ liều và tỷ lệ phần trăm chuột chết trong thử nghiệm độc tính cấp	221
Bảng 3.6.11. Phân suất tử vong trong thử nghiệm độc tính cấp	221
Bảng 3.6.12. Số liệu chi tiết dùng tính toán LD ₅₀	221
Bảng 3.6.13. Các thông số dược động học của DFN sau khi uống viên Difenac-KD và Voltaren® 100 mg	226
Bảng 3.6.14. Các thông số dùng phân tích khoảng tin cậy 90% các số liệu trung bình AUC _{0-∞} , C _{max} và T _{max} của DFN giữa viên nang Difenac-KD và Voltaren®	227
Bảng 3.6.15. Kết quả chi tiết để tính toán tỷ lệ phần trăm dược chất hấp thu <i>in vivo</i>	228
Bảng 3.6.16. Tương quan giữa tỷ lệ phần trăm DFN phóng thích <i>in vitro</i> và phần trăm DFN hấp thu <i>in vivo</i> trên NTN (n=14) uống viên nang Difenac- KD	230
Bảng 3.6.17. Sai số dự đoán của tương quan mức độ A của viên nang TDKD	231
Bảng 3.6.18. Giới hạn độ phóng thích dược chất của viên nang Difenac-KD	232
Bảng 3.6.19. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 02 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 30°C/độ ẩm tương đối 60%	235
Bảng 3.6.20. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 03 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 30°C/độ ẩm tương đối 60%	236
Bảng 3.6.21. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 06 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 30°C/độ ẩm tương đối 60%	236
Bảng 3.6.22. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 02 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 40°C/độ ẩm tương đối 75%	238
Bảng 3.6.23. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 03 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 40°C/ độ ẩm tương đối 75%	237
Bảng 3.6.24. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 06 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 40°C/ độ ẩm tương đối 75%	237
Bảng 3.6.25. Sự giảm hàm lượng của mẫu bảo quản ở 30°C/độ ẩm tương đối 60%	238
Bảng 3.6.26. Kết quả phân tích tương quan giữa hàm lượng phần trăm và thời gian bảo quản ở điều kiện thực nghiệm 30°C/độ ẩm tương đối 60%	238
Bảng 3.6.27. Sự giảm hàm lượng của mẫu bảo quản ở 40°C/độ ẩm tương đối 75%	238
Bảng 3.6.28. Kết quả phân tích tương quan giữa hàm lượng phần trăm và thời gian bảo quản ở điều kiện thực nghiệm 40°C/độ ẩm tương đối 75%	238
Bảng 3.6.29. Tuổi thọ dự kiến của các lô thuốc thử nghiệm	240
Bảng 3.6.30. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 02, bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường	241
Bảng 3.6.31. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 03, bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường	241
Bảng 3.6.32. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 06, bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường	242

Bảng 3.6.33. Sự giảm hàm lượng của mẫu khảo sát bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường	242
HÌNH VÀ BIỂU ĐỒ	
Hình 3.6.1. Vi hạt điều chế với hỗn hợp Avicel.DFN (1.1) (35X)	206
Hình 3.6.2. Vi hạt được điều chế từ hỗn hợp Avicel. DFN (1,5.1) (45X)	206
Hình 3.6.3. Vi hạt được điều chế từ hỗn hợp Avicel.DFN (2.1) (35X)	206
Hình 3.6.4. Vi hạt diclofenac natri chưa bao (75X)	211
Hình 3.6.5. Bề mặt vi hạt diclofenac natri chưa bao (1000X)	211
Hình 3.6.6. Mặt cắt của vi hạt diclofenac natri chưa bao (2000X)	211
Hình 3.6.7. Vi hạt trước khi thử độ phóng thích hoạt chất (80X)	212
Hình 3.6.8. Vi hạt sau khi thử độ phóng thích hoạt chất (80X)	212
Hình 3.6.9. Vi hạt được bao bằng Eudragit RL (75X)	217
Hình 3.6.10. Màng bao trước khi thử độ phóng thích hoạt chất (2000X)	217
Hình 3.6.11. Màng bao sau khi thử độ phóng thích trong môi trường acid (2000X)	218
Hình 3.6.12. Màng bao sau khi thử trong môi trường đệm phosphat pH 6,8; các kênh khuếch tán hình thành rất rõ trên lớp bao (2000X)	218
Hình 3.6.13. Vi hạt sau khi thử độ phóng thích dược chất trong HCl 0,1 N (75X)	218
Hình 3.6.14. Vi hạt đã bao Eudragit RL với 10% PEG sau khi thử trong môi trường đệm phosphat pH 6,8 (75X)	218
Hình 3.6.15. Vi hạt đã bao Eudragit RL với 20% PEG sau khi thử trong môi trường đệm phosphat pH 6,8 (75X)	219
Hình 3.6.16. Bề mặt vi hạt đã bao sau khi phóng thích dược chất (1000X)	219
Hình 3.6.17. Viên nang Diclofenac 100 mg tác dụng kéo dài (viên DIFENAC – KD)	220
Hình 3.6.18. Sắc ký đồ DFN trong huyết tương	224
Hình 3.6.19. Sắc ký đồ định tính DFN (1. dung dịch DFN chuẩn; 2. hỗn hợp dung dịch thử và dung dịch chuẩn; 3. dung dịch thử)	224
Biểu đồ 3.6.1. Phân bố kích thước hạt (tính theo tỉ lệ phần trăm)	210
Biểu đồ 3.6.2. Đường biểu diễn độ phóng thích của vi hạt chưa bao	211
Biểu đồ 3.6.3. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao bằng Eudragit RS 100 với các tỉ lệ lớp bao 1%, 3% và 5%	214
Biểu đồ 3.6.4. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao bằng hỗn hợp Eudragit RS.RL (75.25) với các tỉ lệ lớp bao 1%, 3% và 5%	214
Biểu đồ 3.6.5. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao bằng hỗn hợp Eudragit RS.RL (50.50) với các tỉ lệ lớp bao 1%, 3% và 5%	215
Biểu đồ 3.6.6. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao bằng hỗn hợp Eudragit RS.RL (25.75) với các tỉ lệ lớp bao 1%, 3% và 5%	215
Biểu đồ 3.6.7. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao bằng Eudragit RL với các tỉ lệ lớp bao 1%, 3% và 5%	216
Biểu đồ 3.6.8. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao với Eudragit RL có 20% chất hoá dẻo so với 10% chất hoá dẻo	216
Biểu đồ 3.6.9. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt có lớp màng bao chứa 20% PEG 6000 so với Voltaren® 100 mg (lô số 166800)	216
Biểu đồ 3.6.10. Phần trăm DFN phóng thích theo mô hình Higuchi từ vi hạt có	217

lớp màng bao chứa 20% PEG 6000 so với Voltaren® 100 mg	
Biểu đồ 3.6.11. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ 6 lô vi hạt	219
Biểu đồ 3.6.12. Đường biểu diễn phần trăm DFN phóng thích từ viên Difenac-KD	220
Biểu đồ 3.6.13. Đường biểu diễn nồng độ DFN (TB ± SEM) trong huyết tương 14 NTN sau khi uống Voltaren® 100 mg và Difenac-KD	225
Biểu đồ 3.6.14. Đồ thị biểu diễn độ hấp thu DFN từ viên Difenac-KD	229
Biểu đồ 3.6.15 . Đồ thị biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN hấp thu <i>in vivo</i> trên hệ trục tọa độ logarit	229
Biểu đồ 3.6.16. Đường biểu diễn tương quan giữa độ phóng thích dược chất <i>in vitro</i> và độ hấp thu <i>in vivo</i> của viên Difenac-KD	231
Biểu đồ 3.6.17. Sự giảm hàm lượng của lô 02 khi bảo quản ở 30 ± 2°C/ độ ẩm tương đối 60 ± 5% và 40 ± 2°C/độ ẩm tương đối 75 ± 5%	239
Biểu đồ 3.6.18. Sự giảm hàm lượng của lô 03 khi bảo quản ở 30 ± 2°C/ độ ẩm tương đối 60 ± 5% và 40 ± 2°C/độ ẩm tương đối 75 ± 5%	239
Biểu đồ 3.6.19 . Sự giảm hàm lượng của lô 06 khi bảo quản ở 30 ± 2°C/ độ ẩm tương đối 60 ± 5% và 40 ± 2°C/độ ẩm tương đối 75 ± 5%	239

LỜI MỞ ĐẦU

1. Trích lược những điểm chính của thuyết minh đề tài

Các nguyên nhân làm thuốc kém chất lượng hoặc không đảm bảo hiệu lực có thể do:

- Bản chất kém ổn định của dược chất làm thuốc dễ bị hư, đặc biệt trong điều kiện phối hợp với tá dược, chịu sự tác động của các yếu tố trong sản xuất, do bao bì và điều kiện bảo quản không phù hợp...
- Kỹ thuật bào chế, bảo quản không thích hợp chẳng những không duy trì được sự ổn định của dược chất trong thời gian lưu hành mà còn có thể làm giảm hiệu lực, giảm sinh khả dụng, không tương đương sinh học với các chế phẩm khác.
- Ngoài ra, các tiêu chí được qui định trong tiêu chuẩn chất lượng quá thấp hoặc không đầy đủ làm cho chất lượng thuốc chỉ ở mức thấp hoặc không đủ để phản ánh được chất lượng thật sự.

Do đó, để đảm bảo và nâng cao chất lượng dược phẩm sản xuất trong nước cần thực hiện chiến lược hợp lý trong nghiên cứu phát triển sản phẩm, ứng dụng các giải pháp kỹ thuật hiện đại và các tiêu chí đánh giá phù hợp. Hiện nay, các giải pháp kỹ thuật và nội dung cần thiết và có thể thực hiện như:

- Nghiên cứu tối ưu hoá trong thiết kế công thức và qui trình sản xuất.
- Nghiên cứu sự ổn định của dược phẩm đảm bảo duy trì chất lượng trong suốt hạn dùng và xác định tuổi thọ của thuốc.
- Xác định sinh khả dụng và/ hoặc tương đương sinh học của dược phẩm, đặc biệt trong trường hợp sản xuất thuốc generic.
- Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng tối thiểu theo qui định của dược điển quốc gia và phấn đấu tương đương với các dược phẩm có giá trị trên thế giới.
- Thêm vào đó, cần sử dụng các giải pháp kỹ thuật phù hợp, các qui trình công nghệ và trang thiết bị hiện đại để đảm bảo sự ổn định trong sản xuất, giảm thiểu các yếu tố bất lợi có tác động xấu đến chất lượng sản phẩm.

Các giải pháp này đặc biệt quan trọng trong bào chế các dược phẩm dễ hư hỏng như các dược chất có nguồn gốc sinh học, các kháng sinh, các loại vitamin...

Thực tế đã cho thấy tồn tại một số vấn đề về chất lượng đối với các dược phẩm sản xuất trong nước liên quan đến các khía cạnh này:

• **Chế phẩm kháng viêm có nguồn gốc sinh học: serratio peptidase**

Trong nước đã sản xuất một số chế phẩm dạng viên bao với hoạt chất kháng viêm có nguồn gốc sinh học như alphachymotrypsin, serratio peptidase... ; tuy nhiên, chất lượng thuốc không ổn định. Kết quả kiểm tra viên alphachymotrypsin năm 2000 cho thấy đa số các mẫu không ổn định, hàm lượng chỉ đạt 42-63%; tình huống tương tự cũng xảy ra với viên bao serratio peptidase, do bản chất protein – enzyme, nên hoạt chất này rất dễ bị hư hỏng bởi nhiệt độ cao, độ ẩm, tác nhân acid hoặc kiềm mạnh, vi sinh vật phân huỷ,... Theo công bố của cơ quan quản lý dược Việt nam, tới 65 % chế phẩm loại này lưu thông trên thị trường có dấu hiệu kém chất lượng do giảm hàm lượng trong bảo quản, nhiều mẫu chỉ còn lại từ 20 đến dưới 90% hàm lượng theo quy định. Do đó trong 3 năm 2001 - 2003 đã có 17 biệt dược chứa enzyme này bị rút sổ đăng ký lưu hành tại Việt nam, Bộ Y tế có lúc đã khuyến nghị tạm dừng sản xuất các chế phẩm này, đây là một điển hình về dược chất dễ bị hư hỏng trên thị trường dược phẩm nước ta .

Nếu không nghiên cứu tìm công thức và qui trình bào chế phù hợp, đảm bảo ổn định hoạt chất, không thể sản xuất và lưu hành dược phẩm này trong điều kiện khí hậu Việt Nam.

• **Các chế phẩm probiotic chứa hỗn hợp vi khuẩn lactic trị tiêu chảy do loạn khuẩn đường ruột**

Mặc dù có nhu cầu trong điều trị, các biệt dược probiotic chứa vi khuẩn lactic hiện nay chưa sản xuất được trong nước ngoại trừ sản phẩm nhượng quyền Biolactyl và L-Bio được thực hiện ở công đoạn đóng gói. Như vậy, các chế phẩm trị loạn khuẩn đường ruột chủ yếu là biệt dược ngoại nhập. Từ năm 1999, Đại học Y Dược TPHCM đã bắt đầu nghiên cứu chủng *Bifidobacterium bifidum* và *Lactobacillus acidophilus* để dùng làm chế phẩm trị loạn khuẩn ở ruột. Bước đầu đã tìm môi trường nuôi cấy có ý nghĩa kinh tế ở qui mô phòng thí nghiệm, đã nghiên cứu đông khô sinh khối dưới dạng bột đảm bảo tỷ lệ vi khuẩn sống . Kết quả này cho thấy triển vọng ứng dụng công nghệ đông khô để phát triển sản phẩm thương mại chứa hỗn hợp vi khuẩn nói trên từ khâu chế tạo nguyên liệu đến thành phẩm trong điều kiện của Việt Nam.

• **Dạng thuốc có hai thành phần amoxicilin và acid clavulanic**

Dạng thuốc phối hợp giữa amoxicilin - một kháng sinh nhóm β -lactam và acid clavulanic - một chất ức chế men β -lactamase có hệ quả làm tăng hiệu lực của amoxicilin và mở rộng phổ kháng khuẩn của dược phẩm này đối với các chủng vi khuẩn đề kháng do tiết men β -lactamase đã được sản xuất từ lâu trên thế giới và vẫn

duy trì được ưu điểm này đến ngày nay. Tuy nhiên, đặc tính dễ hư hỏng của acid clavulanic làm chế phẩm không ổn định, khó đảm bảo chất lượng.

Mặc dù từ lâu đã nhận thức được giá trị kinh tế cao và hiệu quả điều trị tốt của chế phẩm phối hợp này nhưng các xí nghiệp dược phẩm trong nước vẫn chưa có giải pháp kỹ thuật phù hợp để đảm bảo sự bền vững, ổn định của chế phẩm, các dược phẩm lưu hành đều là thuốc ngoại nhập; hơn nữa trước tình hình đề kháng kháng sinh ngày càng tăng, nhu cầu nghiên cứu phát triển dược phẩm với hỗn hợp amoxicilin đã bán tổng hợp được trong nước với acid clavulanic để thay thế thuốc ngoại nhập ngày càng bức thiết.

• **Dạng thuốc chứa vitamin hoặc hỗn hợp các vitamin**

Vitamin là dược phẩm được sử dụng phổ biến trong điều trị và phòng bệnh, chiếm tỉ lệ và doanh số sản xuất khá cao. Tuy nhiên các tương kỵ lý hóa và bản chất kém bền của các vitamin làm thuốc dễ hư hỏng, giảm hàm lượng, tuổi thọ ngắn, đặc biệt với vitamin B₁₂, B₉, B₆, B₁, C...

Các xí nghiệp dược phẩm nước ngoài thường dùng kỹ thuật đông khô, kỹ thuật vi nang hoá và các kỹ thuật bào chế hiện đại khác để đảm bảo sự ổn định của chế phẩm.

Các dược phẩm chứa hỗn hợp B₁, B₆, B₁₂ được sản xuất khá nhiều bởi các xí nghiệp dược phẩm trong nước. Kết quả theo dõi hàm lượng B₁₂ trong các sản phẩm cho thấy hàm lượng B₁₂ đa số chỉ còn trong khoảng 41-87%, nhiều chế phẩm đã liên tục bị đình chỉ lưu hành; do đó, nhu cầu nghiên cứu chế phẩm ổn định để đảm bảo chất lượng thuốc là vấn đề cấp bách trong bối cảnh nhu cầu sử dụng các dược phẩm chứa vitamin rất cao. Hơn nữa, nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật đông khô, vi nang hoá trong sản xuất thuốc còn khá mới mẻ với công nghiệp dược Việt Nam.

• **Hoạt chất và chế phẩm Magaldrat trị viêm loét dạ dày tá tràng (DDTT)**

Magaldrat là dạng phức có thành phần và công thức là $Al_5Mg_{10}(OH)_{31}(SO_4)_2$. Dạng phức này khắc phục được nhược điểm của các chế phẩm antacid sử dụng hỗn hợp $Al(OH)_3$ và $Mg(OH)_2$, vì sự biến đổi không thuận nghịch của hệ keo làm giảm hiệu lực điều trị trong quá trình sản xuất bảo quản các dược chất này.

Magaldrat hiện nay đã được công nhận và đưa vào được điển một số nước như Mỹ, Ấn Độ, Thái Lan...

Nhu cầu dùng thuốc điều trị viêm loét DDTT trong nước khá cao, việc tổng hợp phức Magaldrat chưa được nghiên cứu thực hiện. Trước đây, có một số cơ sở sản xuất nhôm hydroxyd, nguyên liệu chỉ có hoạt tính dưới dạng gel. Khi sấy khô bị vón thành khối rắn, không tác dụng với HCl nên giảm khả năng trung hòa acid. Hàng năm, các

xí nghiệp phải nhập nhiều thành phẩm chứa Magaldrat làm thuốc trị viêm loét DDTT. Các nghiên cứu sơ bộ cho thấy có thể điều chế nguyên liệu Magaldrat được dụng và thành phẩm từ magaldrat tương ứng đạt tiêu chuẩn USP 24, có hiệu quả kinh tế và chất lượng tương đương thuốc ngoại nhập.

• **Chế phẩm phóng thích kéo dài chứa diclofenac natri**

Dạng thuốc phóng thích kéo dài có nhiều ưu điểm như:

- giảm số lần dùng thuốc tạo thuận lợi cho bệnh nhân, làm giảm nguy cơ thất bại trong trị liệu;
- tăng hiệu quả trị liệu, giảm hiệu ứng phụ và độc tính do duy trì nồng độ thuốc trong máu hằng định...
- rất thuận lợi trong điều trị các bệnh mạn tính

Dạng thuốc phóng thích kéo dài được xem như hệ thống trị liệu mới, là thành tựu nổi bật trong bào chế của thập niên qua, mặc dù không còn mới mẽ đối với công nghiệp dược của các nước tiên tiến nhưng ở nước ta chưa được nghiên cứu phát triển. Kết quả nghiên cứu phát triển dạng phóng thích kéo dài là đóng góp có ý nghĩa cả về lý luận lẫn thực tiễn cho khoa học và công nghệ dược ở nước ta.

2. Mục tiêu của đề tài

2.1. Mục tiêu chung

1. Giải quyết được vấn đề kỹ thuật, công nghệ để ổn định, nâng cao chất lượng và tuổi thọ một số thuốc sản xuất trong nước để có hiệu quả trị liệu tương đương các dược phẩm cùng loại có uy tín trên thị trường thế giới.
2. Bước đầu ứng dụng được phương pháp tối ưu hóa vào thiết kế công thức các dạng thuốc và qui trình sản xuất. Đánh giá tương đương sinh học một số chế phẩm nghiên cứu.

2.2. Mục tiêu cụ thể

2.2.1. Xây dựng được qui trình sản xuất nguyên liệu Magaldrat đạt tiêu chuẩn được dụng theo USP 24.

2.2.2. Thiết lập được công thức tối ưu, qui trình bào chế 6 dạng thuốc.

- Viên bao tan trong ruột Serratiopeptidase 5mg
- Thuốc uống dạng bột đông khô chứa hỗn hợp vi khuẩn lactic
Bifidobacterium bifidum và *Lactobacillus acidophylus*
- Viên bao phim chứa Amoxicilin và potassium clavulanat
- Viên nén chứa hỗn hợp vitamin B (B₁, B₆, B₁₂)
- Viên nén từ nguyên liệu Magaldrat được dụng
- Viên nang phóng thích kéo dài với Diclofenac natri

2.2.3. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng của dược phẩm tương đương với các chế phẩm cùng loại có uy tín trên thị trường.

2.2.4. Xác định độ ổn định và tuổi thọ của chế phẩm .

2.2.5. Xây dựng được phương pháp và xác định tương đương sinh học của chế phẩm nghiên cứu với chế phẩm nước ngoài cùng loại (sinh khả dụng *in vitro* và *in vivo*)

3. Nội dung nghiên cứu

3.1. Nghiên cứu tạo nguyên liệu, bán thành phẩm

3.1.1. Nghiên cứu xây dựng qui trình tổng hợp Magaldrat qui mô 5 kg/mẻ, xác định các thông số tối ưu của qui trình.

3.1.2. Xác định cấu trúc, tính chất hóa lý, thành phần nguyên tố, độ tinh khiết của magaldrat.

3.1.3. Kiểm định Magaldrat theo tiêu chuẩn USP 24. Thiết lập tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu.

3.1.3. Nghiên cứu môi trường, các điều kiện nuôi cấy, qui trình nuôi cấy vi khuẩn và phương pháp đông khô sản phẩm thu được ở qui mô 2-5 lít.

3.1.4. Kiểm định định danh, định lượng số vi khuẩn, tỷ lệ vi khuẩn sống sau phục hồi.

3.1.5. Xây dựng tiêu chuẩn kỹ thuật cho bán thành phẩm sinh khối đông khô.

3.1.5. Nghiên cứu vi nang hoá vitamin B₁₂ xác định các thông số kỹ thuật của vi nang

3.2. Nghiên cứu bào chế dược phẩm

1. Nghiên cứu thăm dò các giải pháp ổn định và xây dựng công thức cho chế phẩm.

2. Thiết lập qui trình sản xuất, sơ bộ xác định các thông số của qui trình.

3. Nghiên cứu tối ưu hóa các thành phần trong công thức và các thông số của qui trình sản xuất với sự hỗ trợ của phần mềm trí tuệ nhân tạo (CAD/CHEM và Inform) và các phương pháp khác.

4. Nghiên cứu độ ổn định và xác định tuổi thọ của sản phẩm bằng phương pháp già hóa cấp tốc và theo dõi tự nhiên.

5. Nghiên cứu tiêu chuẩn hóa. Thiết lập tiêu chuẩn chất lượng của sản phẩm so với các tài liệu và dược phẩm đối chiếu.

6. Xác định tương đương sinh học của các chế phẩm so với dược phẩm đối chiếu. Thử tác dụng dược lý đối với các chế phẩm: hỗn hợp vi khuẩn, Magaldrat.

NỘI DUNG CHÍNH

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN VỀ MỘT SỐ KỸ THUẬT MỚI ĐÃ ỨNG DỤNG

Trong nghiên cứu, đã sử dụng một số kỹ thuật mới trong bào chế để nâng cao chất lượng, độ ổn định, sinh khả dụng và tương đương sinh học của dược phẩm

1.1. Phương pháp bảo quản vi khuẩn bằng kỹ thuật đông khô.

1.1.1. Nguyên tắc và các yếu tố ảnh hưởng

- Quá trình đông khô vi khuẩn xảy ra qua hai giai đoạn : làm đông đặc môi trường đông khô và làm khô nước môi trường

- Quá trình làm đông đặc môi trường đông khô bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như : ảnh hưởng của nhiệt độ thấp, ảnh hưởng trực tiếp của sự đông đặc, ảnh hưởng không trực tiếp của sự đông đặc

Một số loài có thể sống được ở nhiệt độ đông lạnh, đa số loài khác không thể tồn tại được ở nhiệt độ rất thấp (gần nhiệt độ của nitơ lỏng), hầu như tất cả các quá trình sinh lý sinh hoá đều chậm lại và không xảy ra bất cứ sự phá huỷ nào. Tuy nhiên việc làm đông đặc thường gây chết tế bào. Trên một cơ quan, những tinh thể nước đá sẽ gây ra sự phá huỷ cơ học do sự giãn nở, hay sự cắt đứt khi những mũi nhọn của các tinh thể nước đá hình thành xuyên qua thành tế bào, hơn nữa nếu tình trạng đóng băng xảy ra trong tế bào thì hầu như các tế bào đều chết.

Trong tất cả các trường hợp ,sự nguyên vẹn của màng tế bào là yếu tố quan trọng .Một màng tế bào nguyên vẹn thì cần thiết để ngăn việc tạo tinh thể nước đá trong tế bào hay từ ngoài tế bào và sự bảo tồn dung dịch trong và ngoài tế bào .Và việc phá huỷ màng tế bào đồng nghĩa với việc tế bào sẽ chết. Để hạn chế sự đông đặc xảy ra trong tế bào có 4 cách :

- **Làm siêu lạnh (supercooling):** Là một phương pháp làm cho một dung dịch có điểm đông đặc cao hơn mức bình thường của nó mà không gây ra đông đặc cho những dịch sinh học. Phương pháp này có thuận lợi là dung dịch vẫn là dạng dung dịch và cho phép sự trao đổi chất diễn ra tương đối bình thường mặc dù xảy ra chậm hơn ,nhưng có bất lợi là dung dịch siêu lạnh thì thường không bền, nếu một tinh thể xuất hiện thì lập tức nó sẽ bị đông đặc và thành dạng nước đá .Điểm quan trọng của phương pháp này là nó cho phép tạo nên sự thuỷ tinh hoá mà ta xét sau.

- **Tạo điểm đông đặc bắt buộc:** Nhiều động vật và thực vật tìm thấy ở môi trường lạnh có các phân tử có thể hoà tan trong và ngoài màng tế bào của chúng. Những dung dịch này có điểm đông đặc thấp hơn thông thường dẫn đến kết quả là chịu đựng được sự mất nước tốt hơn ở điểm đông đặc bắt buộc cao hơn một vài độ C .Sự gia tăng lớn hơn đối với dung dịch muối.

● **Sự làm khan nước:** Nồng độ cao của một số phân tử gia tăng độ nhớt và giảm độ khuếch tán của dung dịch. Cơ chế làm chậm này lại làm thuận lợi cho sự khan nước và thủy tinh hoá. Sự đông đặc xảy ra ở ngoài tế bào trước tiên bởi vì ở đó có nhiều các mầm tinh thể và bởi vì dung dịch bên ngoài tế bào có thể tích nhiều hơn trong tế bào. Khi điều này xảy ra, dung dịch ngoài tế bào được tích tụ một lượng nhỏ nước chưa đông đặc mà có nồng độ thẩm thấu cao. Điều này làm nước thoát khỏi tế bào. Thời gian để nước thoát khỏi tế bào dưới điều kiện này khoảng 10 giây nên ta cần xét làm lạnh chậm hay nhanh phụ thuộc vào nhiệt độ thay đổi.

● **Sự thủy tinh hoá tế bào (Intracellular vitification):** Trong sự làm lạnh môi trường đông đặc, mục tiêu cần đạt là sự thủy tinh hoá tế bào nhưng phải tránh sự đóng băng trong tế bào và sự phá huỷ màng tế bào. Một yếu tố quyết định là mức độ làm lạnh. Khi làm lạnh sẽ tạo ra những mầm tinh thể có dạng như một tinh thể nước đá, nếu kích thước gia tăng vượt qua mức giới hạn thì mầm tinh thể này sẽ lớn lên rất nhanh, quá trình này gọi là tạo hạt nhân và phát triển tinh thể. Mầm tinh thể có thể là đồng nhất hay hỗn tạp

● Sự phá huỷ tế bào xảy ra suốt quá trình đông đặc: cơ chế đơn giản là sự giãn nở của tế bào, sự phát triển của tinh thể nước đá, hay có một nguyên nhân nữa là dòng điện: Môi trường điện từ lớn thoáng qua do sự phát triển của các tinh thể nước đá trong một dung dịch điện giải yếu gây ra sự khác biệt điện thế ngang qua màng tế bào mà độ lớn đủ để phá huỷ màng tế bào. Tế bào cũng bị hư hại khi sự mất nước xảy quá nhanh: nguyên nhân là do tế bào mất đi màng bán thấm và nó không kịp thích nghi khi sự mất nước quá mãnh liệt.

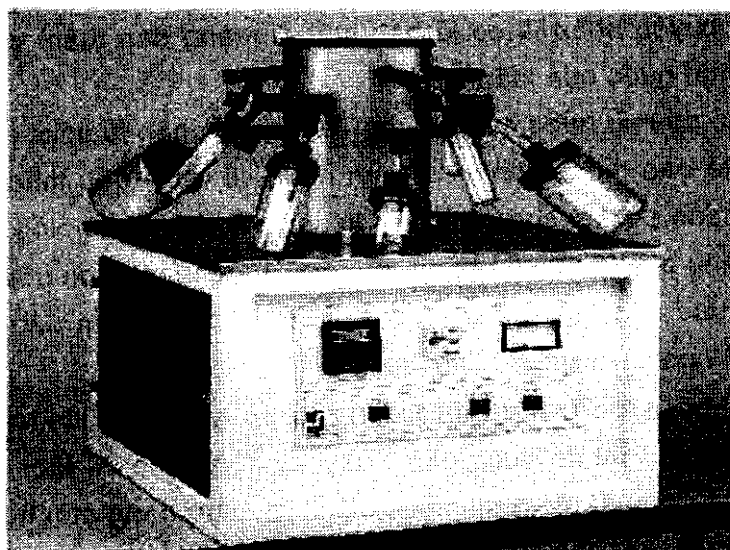
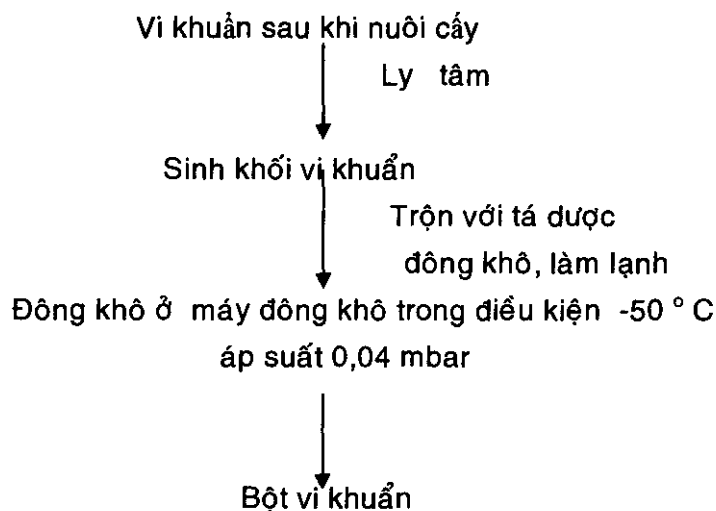
Sự phá huỷ tế bào do mất nước quá nhanh: Trong các phân tử lipid, một thành phần chính của màng tế bào thì các phân tử thân nước sẽ quay đầu thân nước ra ngoài. Nếu mất nước nhanh sẽ làm cho các phân tử lipid sẽ không còn xếp quay đuôi chặt vào nhau nữa, màng bị phá huỷ dễ dàng. Khi mất nước mạnh hơn nữa có thể xảy ra tình trạng đảo ngược các phân tử lipid, sáu phân tử lipid chụm đầu vào nhau đưa phần thân nước ra ngoài (hexagonal phases)

● **Quá trình làm khô nước trong môi trường đông khô:** Sau khi môi trường đông khô được làm đông đặc thì nó được gắn vào máy đông khô để làm đông khô dưới nhiệt độ -50°C và áp suất giảm 0,04mBar, khi đó nước trong môi trường đông khô đang ở trạng thái nước kết tinh, dưới áp suất giảm sẽ chuyển ngay sang dạng hơi mà không qua trạng thái lỏng. (Trạng thái thăng hoa hơi nước dưới áp suất giảm). Quá trình này cũng có nhiều yếu tố ảnh hưởng: Áp suất chân không của máy đông khô tạo ra trong bình đông khô là yếu tố quan trọng nhất quyết định tới thời gian đông khô, hiệu suất đông khô và cả chất lượng bột đông khô.

Nhiệt độ âm do máy chân không tạo ra cũng quan trọng vì nó sẽ giữ nhiệt độ cho môi trường đông đặc không bị chảy lỏng và nước sẽ thăng hoa tới khô, ngoài ra nhiệt độ này còn có vai trò giảm thiểu số lượng vi khuẩn chết trong suốt quá trình đông khô. Thông thường các máy đông khô có nhiệt độ âm từ -40°C đến -50°C

● **Thời gian đông khô:** Phụ thuộc vào áp suất chân không, thông thường với vi khuẩn đông khô 40-45 giờ. Ngoài ra còn phụ thuộc vào trạng thái kết tinh của môi trường khi thực hiện đông đặc ở bước 1

1.1.2. Sơ đồ qui trình và thiết bị đông khô vi khuẩn



Hình 1.1. Máy đông khô vi khuẩn Sniijder

1.2. Kỹ thuật vi nang hoá ứng dụng trong bào chế vi nang

1.2.1. Khai niệm và cấu trúc

Vi nang là các tiểu phân nhỏ kích thước từ một đến hàng trăm micromet, có cấu trúc bên trong là nhân được chất rắn hoặc lỏng, bên ngoài là vỏ hoặc các vật liệu bao.

1.2.2.Các phương pháp chế tạo vi nang

Một số phương pháp thường được ứng dụng như:

•Phương pháp tách pha đông tụ

Là quá trình chuyển pha từ lỏng sang rắn, làm ngưng tụ vật liệu bao trên bề mặt tiểu phân được chất hình thành lớp bao. Các tác nhân lý hoá gây tách pha đông tụ như thay đổi nhiệt độ, thay đổi dung môi, thêm chất điện ly, thay đổi pH...

Các giai đoạn chính trong tách pha đông tụ:

- Giai đoạn 1: tạo môi trường phân tán lỏng chứa các pha không hỗn hoà trong đó có pha được chất tạo nhân, pha vật liệu tạo vỏ hoà tan trong dung môi của môi trường phân tán.
- Giai đoạn 2: dùng tác nhân gây đông tụ lớp vỏ bao quanh nhân
- Giai đoạn 3: lặn rắn vỏ vi nang, lọc lấy vi nang, rửa, làm khô vi nang

•Phương pháp phun đông tụ

Áp dụng trong trường hợp nhân là các tiểu phân được chất rắn không tan trong vỏ bao là sáp hay chất béo.

Các bước tạo vi nang: đun chảy sáp hay chất béo. Phân tán được chất vào hỗn hợp chảy lỏng. Phun hỗn hợp vào buồng khí lạnh.

Nguyên liệu dùng làm vỏ vi nang khi gặp lạnh sẽ đông rắn bao lấy tiểu phân được chất.

Vi nang điều chế theo phương pháp này tỉ lệ được chất không cao, khi bảo quản gặp nhiệt độ cao có thể bị chảy dính.

•Phương pháp phun sấy

Áp dụng với được chất không tan trong dung dịch vỏ bao. Các giai đoạn tiến hành:

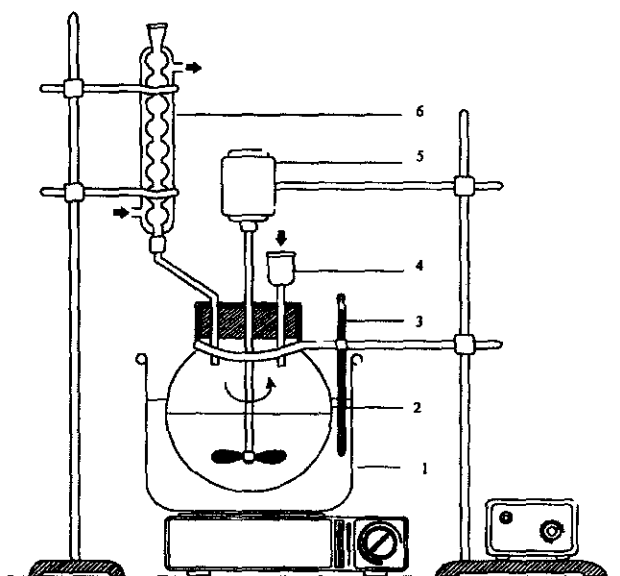
- Phân tán tiểu phân được chất vào dung dịch vỏ bao
- Phun hỗn dịch trong thiết bị phun sấy
- Khi dung môi bay hơi chất bao tạo vỏ trên bề mặt tiểu phân được chất

Với các được chất tan trong dầu có thể hoà tan trong dung môi dầu và nhũ tương hoá trong dung dịch chất bao trước khi phun sấy.

Phương pháp phun sấy thường tạo lớp vỏ bao không hoàn thiện, kém ổn định trong quá trình bảo quản.

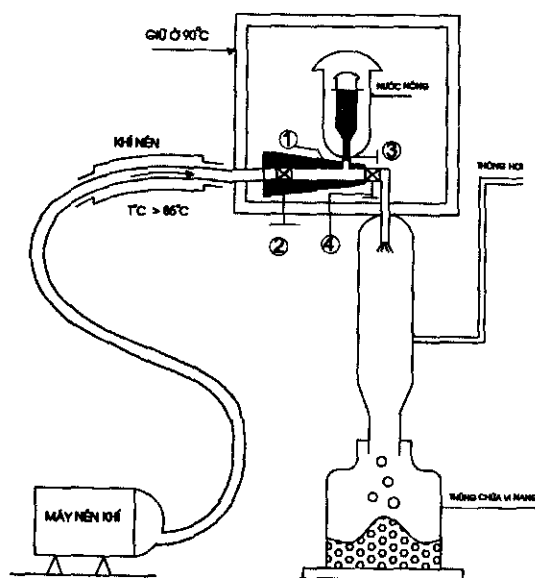
•Phương pháp bao

Áp dụng với được chất rắn, các tiểu phân được bao với kỹ thuật bao màng mỏng trong nồi bao hoặc trong thiết bị tăng sôi. Vỏ bao được bao lặp lại nhiều lần nên khá hoàn thiện.



Hình 1.2.1: Sơ đồ thiết bị chế tạo vi nang ở quy mô bình đồng tụ 10 lít

- | | |
|--------------------------------------|----------------------|
| 1 - Nồi cách thuỷ | 4 - Nơi xử lý mẫu |
| 2 - Bình chứa môi trường tạo vi nang | 5 - Mô tơ cánh khuấy |
| 3 - Nhiệt kế | 6 - Ống sinh hàn |



Hình 1.2.2: Sơ đồ thiết bị phun đồng tụ điều chế vi nang

Ghi chú :

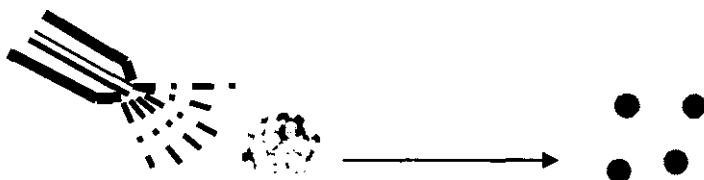
1. Súng phun
2. Van áp lực
3. Van định dạng tia chất lỏng
4. Van điều chỉnh tốc độ phun

1.3. Bào chế vi hạt bằng thiết bị tầng sôi

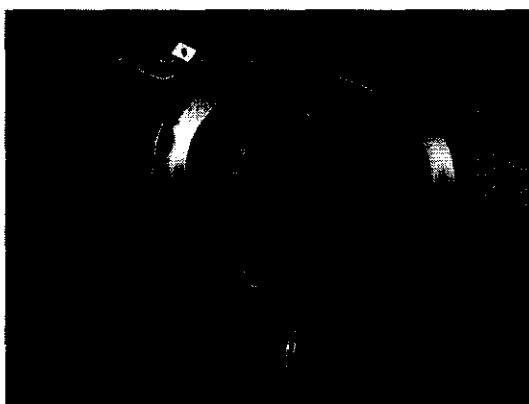
1.3.1. Tạo vi hạt bằng thiết bị tầng sôi

• Phương pháp tạo hạt trực tiếp.

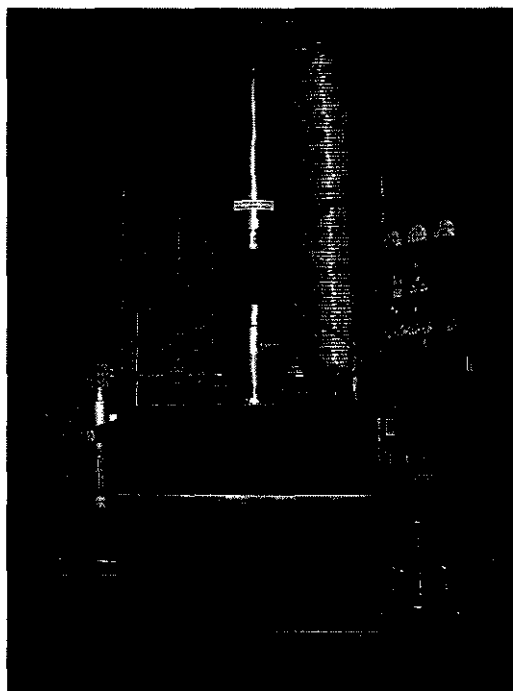
Nguyên tắc: hỗn hợp dược chất và tá dược được cho vào buồng tạo hạt của máy tạo hạt tầng sôi, tá dược dính được phun vào để làm ẩm khối bột, các tiểu phần dược chất và tá dược độn sẽ kết dính vào nhau thành những khối kết tụ vô định hình. Quá trình tạo khối kết tụ là một quá trình động trong đó các khối kết tụ lớn liên tục được phá vỡ và các tiểu phần nhỏ liên kết lại với nhau để thành hạt, quá trình làm tròn hạt xảy ra khi các khối kết tụ di chuyển theo chuyển động xoắn thường trong hệ thống dưới tác động của 3 lực: lực ly tâm của đĩa quay, lực đẩy lên của luồng khí nén và trọng lực. Chuyển động xoắn thường làm cho các tiểu phần dược chất và tá dược liên kết chặt chẽ với nhau để tạo vi hạt có cấu trúc rắn chắc và bề mặt nhẵn.



Hình 1.3.1. Quá trình hình thành vi hạt theo phương pháp tạo hạt trực tiếp



Hình 1.3.2. Buồng tạo hạt của máy tạo hạt tầng sôi có đĩa quay.



Hình 1.3.3. Máy tạo hạt tầng sôi có đĩa quay (Rotary fluidized bed granulator; Glatt Model GPCG-1, Glatt GmbH Technology, Đức)

Phương pháp tạo hạt trực tiếp cho phép sản xuất vi hạt có tỉ trọng cao, bề mặt rắn chắc và không phải dùng nguyên liệu ban đầu là hạt trơ.

Giới hạn: Phân bố kích thước hạt thường rộng nên khó áp dụng để điều chế các vi hạt kích thước lớn; thường phải dùng nhiều tá dược độn và tá dược làm tròn hạt nên không thích hợp với chế phẩm có hàm lượng cao.

• Phương pháp bồi.

Để điều chế vi hạt theo phương pháp bồi cần có một nhân trợ, nguyên tắc thực hiện tương tự như các phương pháp bao thông thường, dược chất được hoà tan (bồi bằng dung dịch thuốc) hoặc phân tán trong dịch bao (bồi bằng hỗn dịch thuốc) hoặc bằng cách phun tá dược dính và bồi bột luân phiên.

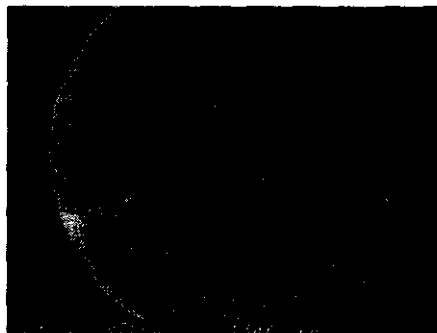
Thiết bị dùng trong phương pháp bồi có thể là nồi bao đường kính điển hoặc các hệ thống bao tầng sôi. Các thiết bị tạo hạt tầng sôi hiện nay được thiết kế với nhiều chức năng: trộn sơ bộ, tạo hạt ướt làm tròn hạt, sấy vi hạt và bao vi hạt cho phép thực hiện nhiều công đoạn khép kín để điều chế vi hạt với một máy duy nhất.

Phương pháp điều chế vi hạt bằng máy tạo hạt tầng sôi có các ưu điểm:

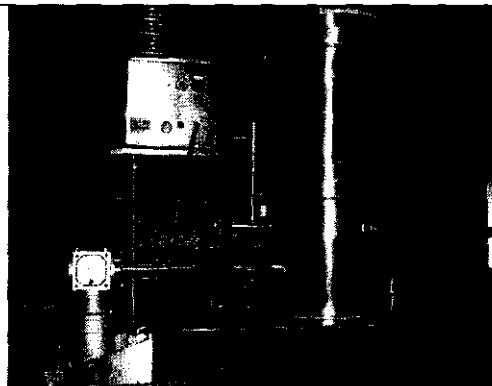
Vi hạt có tỉ trọng cao, cấu trúc rắn chắc thích hợp để điều chế dạng vi hạt phóng thích kéo dài với cấu trúc khung matrix.

Chất lượng của vi hạt được điều chế bằng phương pháp tạo hạt tầng sôi phụ thuộc chủ yếu vào tỉ lệ tá dược độn, tỉ lệ tá dược dính (liên quan đến lượng chất lỏng ở gian đoạn tạo khối ẩm) tốc độ phun tá dược dính. Ở giai đoạn làm tròn hạt, tốc độ đĩa quay phải được điều chỉnh sao cho các khối hạt phải có dạng hình cầu trước khi bị khô nhưng không được quay quá nhanh sẽ làm cho các hạt bị mài mòn và vỡ.

Các hệ thống bao tầng sôi rất hiệu quả trong để điều chế vi hạt bằng phương pháp bồi. Cả 3 kiểu bao phun từ trên xuống, phun từ dưới lên hoặc phun tiếp tuyến đều có thể điều chế được vi hạt có chất lượng cao. Hệ thống tầng sôi còn trang bị thêm hệ thống tiếp bột để dùng trong phương pháp phun dịch-bồi bột luân phiên.



Hình 1.3.4. Mặt cắt vi hạt được điều chế bằng phương pháp bồi được chất lên nhân trợ với thiết bị tầng sôi

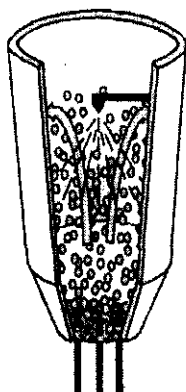


Hình 1.3.5. Máy tạo hạt tầng sôi có đĩa quay được gắn thêm hệ thống cung cấp bột dùng cho phương pháp phun dịch – bồi bột luân phiên.

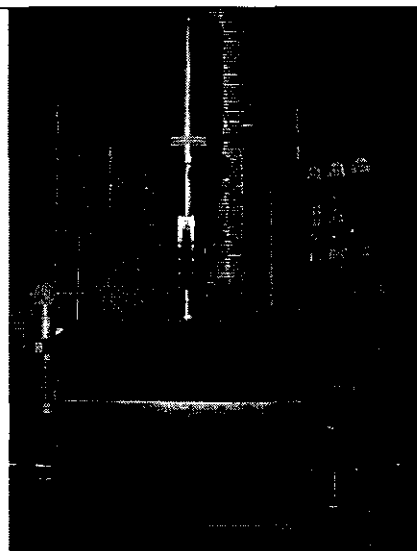
1.3.2. Bao vi hạt bằng thiết bị tầng sôi

Hệ thống tầng sôi đã được sử dụng để sấy và tạo hạt trong công nghiệp dược phẩm, sau này được cải tiến thành hệ thống bao bằng cách thiết kế thêm đầu phun dịch bao. Tùy theo vị trí đầu phun dịch bao, các hệ thống tầng sôi gồm 3 loại: kiểu phun từ trên xuống, kiểu phun từ dưới lên và kiểu phun tiếp tuyến.

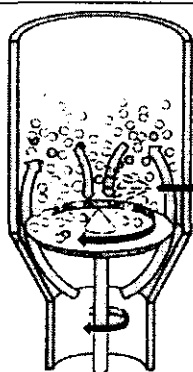
- Kiểu phun từ trên xuống: thiết kế căn bản của hệ thống này tương tự như máy tạo hạt tầng sôi nên hệ thống có thể được dùng với 2 chức năng điều chế vi hạt và bao viên nén hoặc vi hạt.



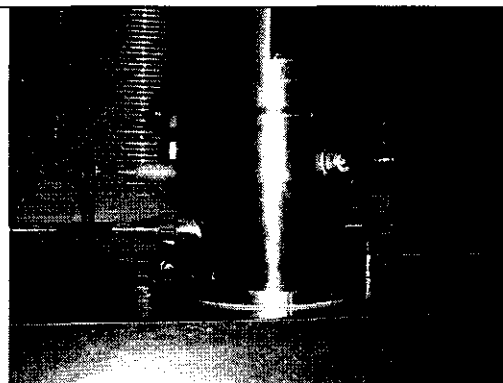
Hình 1.3.6. Nguyên lý hoạt động của máy bao tầng sôi kiểu phun từ trên xuống.



Hình 1.3.7. Máy bao tầng sôi kiểu phun từ trên xuống.



Hình 1.3.8. Nguyên lý hoạt động của máy bao tầng sôi kiểu phun tiếp tuyến.

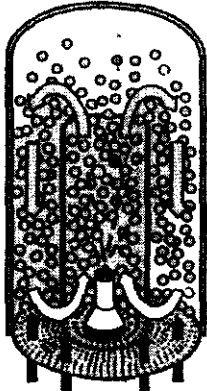
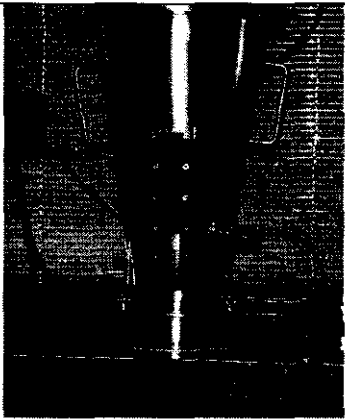


Hình 1.3.9.. Buồng bao của máy bao tầng sôi kiểu phun tiếp tuyến.

- Kiểu phun tiếp tuyến: Thiết kế đặc biệt của hệ thống này là không có đĩa phân phối khí, thay vào đó là một đĩa quay tròn, khí nén được cung cấp cho buồng bao qua một khe hẹp giữa đĩa quay và thành thiết bị. Các viên sẽ chuyển động trong buồng bao theo kiểu xoắn thừng, do sự chuyển động rất nhanh này, nên các viên

cần có độ bền cơ học tốt để chịu đựng sự va chạm mạnh giữa các viên.

• Kiểu phun từ dưới lên: còn được gọi là hệ thống bao Wurster. Trong hệ thống này, các lỗ trên đĩa phân phối khí có 2 kích thước khác nhau: đường kính lớn ở trung tâm và đường kính nhỏ hơn ở vùng ngoài. Luồng khí nén ở vùng trung tâm rất mạnh đẩy viên lên cao và luồng khí nén yếu bên ngoài giúp sấy viên trong chu trình bao. Bên trong buồng bao được thiết kế một cột nhỏ (được gọi là buồng trong), kích thước tương ứng với vùng có lỗ phân phối khí lớn. Các viên sẽ đi lên trong lòng cột, ngang qua vùng phun dịch và rơi xuống ở vùng ngoài cột. Đầu phun dịch bao được thiết kế ở giữa đĩa phân phối khí và phun từ dưới lên. Thiết kế này bảo đảm cho tất cả các viên đều đi qua vùng phun dịch.

	
Hình 1.3.10. Nguyên lý hoạt động của máy bao tầng sôi kiểu phun từ dưới lên	Hình 1.3.11. Buồng bao của hệ thống bao tầng sôi kiểu phun từ dưới lên

Các hệ thống tầng sôi có ưu điểm là khả năng sấy rất cao, rất thích hợp cho mọi loại dung môi khác nhau. Các hệ thống tầng sôi có thể được dùng để điều chế vi hạt bằng phương pháp tạo hạt trực tiếp, phương pháp bao bồi lên nhân trơ và dùng để bao vi hạt. Hiệu suất bao rất cao, nếu điều chỉnh các thông số tốt, hầu như không xảy ra tình trạng hao hụt chất bao.

1.4. Thiết kế & tối ưu hóa công thức và qui trình bào chế bằng phần mềm thông minh

1.4.1. Ý nghĩa tối ưu hóa

Tối ưu hóa một công thức là sự xác định giá trị tối ưu của nồng độ của các nguyên liệu trong công thức cũng như điều kiện pha chế đối với công thức ấy sao cho sản phẩm có thể:

- Hoàn thiện hơn về tiêu chuẩn chất lượng.
- Hiệu quả hơn về tính sinh khả dụng, tương đương sinh học.
- Đạt yêu cầu về giá thành.

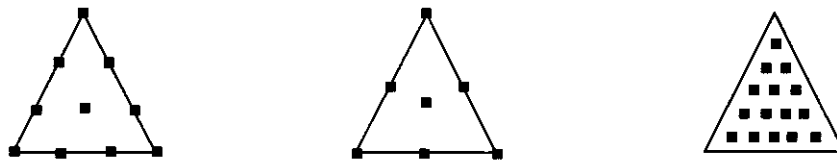
1.4.2. Mô hình thực nghiệm

Thiết kế công thức trong bào chế thường áp dụng 2 loại mô hình:

- Mô hình hỗn hợp (mixture design) hay mô hình công thức (formulation design): thiết kế thành phần của các nguyên liệu. Đây là loại mô hình có tính ràng buộc.
- Mô hình yếu tố (factorial design) hay mô hình quy trình (process design): thiết kế các phương pháp và điều kiện tiến hành. Đây là loại mô hình không có tính ràng buộc.

1.4.2.1. Mô hình công thức

Công thức bào chế có thể được xem như một “hỗn hợp” có n thành phần với tỷ lệ $x_1, x_2, \dots$ và x_n ; với $x_1 + x_2 + \dots + x_n = 1$ (hay 100%) và $0 \leq x_i \leq 1$. Không gian yếu tố (factor space) được thiết kế như khoảng không gian bên trong của một hình có n đỉnh và $(n-1)$ chiều để biểu thị mọi khả năng phối hợp; thí dụ hỗn hợp 2 thành phần là đường thẳng, hỗn hợp 3 thành phần là hình tam giác, hỗn hợp 4 thành phần là tứ diện... Việc thiết kế vì tính có nhiều ưu điểm là tiện lợi, nhanh chóng và cho các điểm dữ liệu phân bố đều khắp trong không gian yếu tố.



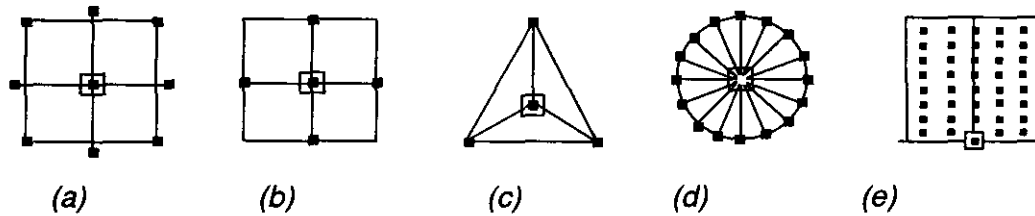
Hình 1.4.1. Minh họa các mô hình công thức đặc biệt

1.4.2.2. Mô hình quy trình

Một mô hình với f yếu tố được khảo sát, mỗi yếu tố có l mức, đòi hỏi số thí nghiệm là l^f . Thí dụ: mô hình 2 yếu tố 2 mức: $n = 2^2 = 4$; mô hình 3 yếu tố 2 mức: $n = 2^3 = 8$, mô hình 4 yếu tố 2 mức: $n = 2^4 = 16, \dots$ Mô hình yếu tố đầy đủ có ưu điểm là cho phép người nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố cũng như tương tác của chúng. Tuy nhiên mô hình yếu tố đầy đủ cần có số thí nghiệm rất lớn khi số yếu tố tăng lên. Mô hình phân đoạn cho phép giảm bớt rất nhiều số thí nghiệm mà vẫn khảo sát được một số sự ảnh hưởng của các yếu tố. Mô hình yếu tố phân đoạn được phân biệt bởi cách giải (resolution (Res)):

- Res 3: khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố có tính đến những tương tác 2 yếu tố
- Res 4: khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố có tính đến những tương tác 3 yếu tố và những tương tác 2 yếu tố.
- Res 5: khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố có tính đến những tương tác 4 yếu tố, những tương tác 3 yếu tố và những tương tác 2 yếu tố.

Phần mềm DOE có thể thiết kế các mô hình quy trình a). mô hình hợp tâm (central composite design), b). mô hình Box-Behnken (Box-Behnken design), c). mô hình đơn hình (simplex design), d). mô hình đồng căn (equiradial design) và e). mô hình ngẫu nhiên (random design).

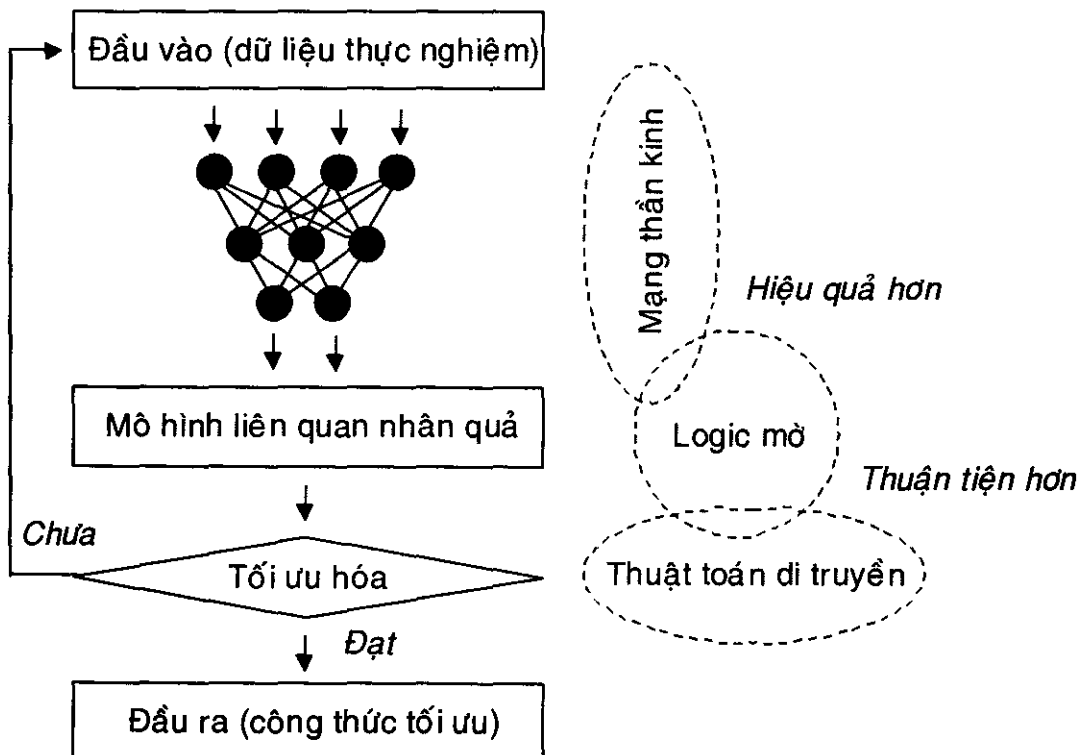


Hình 1.4.2. Minh họa các mô hình quy trình đặc biệt

1.4.3. Phần mềm thông minh (INForm)

Là phần mềm thông minh có sự kết hợp ba công cụ gồm: mạng thần kinh, logic mờ và thuật toán di truyền để thiết lập mô hình nhân quả và tối ưu hoá.

- Mạng thần kinh: thiết lập mô hình nhân quả và dự đoán.
- Thuật toán di truyền: tối ưu hoá dựa trên mô hình nhân quả đã được thiết lập bởi mạng thần kinh.
- Logic mờ: tăng hiệu quả của mạng thần kinh và tạo hàm mục tiêu thuận tiện cho việc tối ưu hoá.

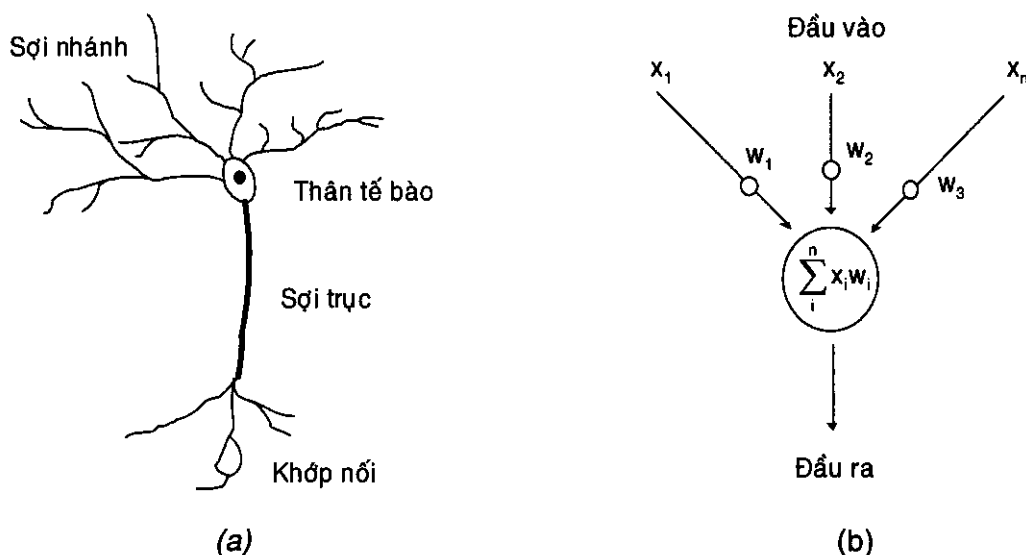


Hình 1.4.3. Sự kết hợp mạng thần kinh với logic mờ và thuật toán di truyền

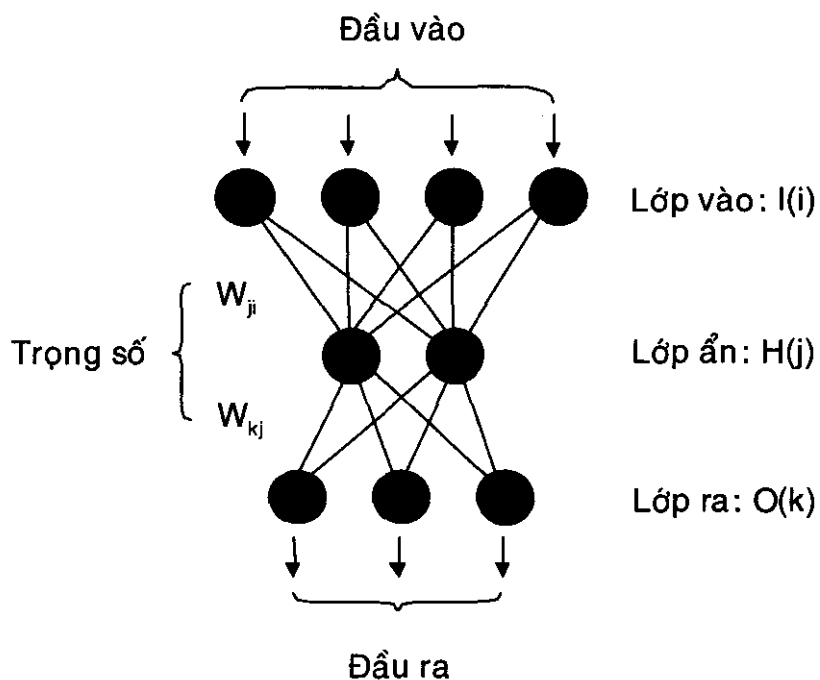
1.4.3.1. Mạng thần kinh

Mạng thần kinh nhân tạo là sự mô phỏng cấu trúc của mạng thần kinh sinh học, được tạo thành bởi sự liên kết giữa rất nhiều đơn vị thần kinh (perceptron). Những đơn vị thần kinh có nhiệm vụ thu thập các tín hiệu, xác định trọng số, tổng cộng và chuyển các tín hiệu sang đơn vị thần kinh khác. Không giống như mạng thần kinh sinh học, ở đây các tín hiệu thuộc dạng vector và ma trận đại số.

Mỗi mạng thần kinh nhân tạo được cấu tạo bởi hàng trăm ngàn đơn vị được liên kết và sắp xếp thành nhiều lớp. Có nhiều cấu trúc mạng thần kinh đã được đề nghị, trong đó cấu trúc mạng thần kinh nhiều lớp (multilayer perceptron networks) là thông dụng nhất. Cấu trúc mạng thần kinh nhiều lớp có một lớp vào, một hay nhiều lớp ẩn và một lớp ra. Thông thường, cấu trúc mạng với một lớp ẩn được dùng trong việc thiết lập mô hình và tối ưu hóa công thức. Cấu trúc mạng nhiều lớp ẩn cũng được dùng cho mô hình phi tuyến song nó đòi hỏi nhiều thời gian cho máy tính xử lý.



Hình 1.4.4. minh họa đơn vị thần kinh: sinh học (a) và nhân tạo (b)



Hình 1.4.5. Cấu trúc mạng thần kinh với một lớp ẩn: I(i)-H(j)-O(k)

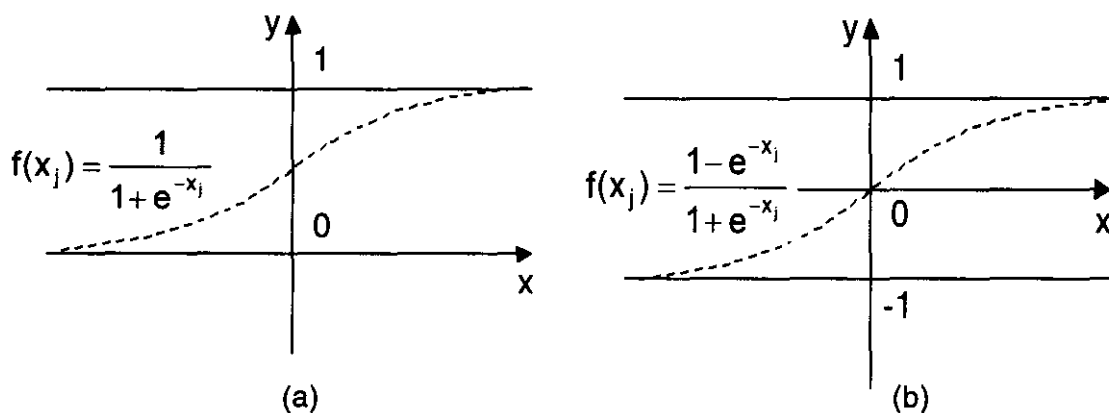
Đầu vào và đầu ra của một đơn vị thần kinh trong một lớp, thí dụ lớp J, được trình bày lần lượt như sau:

$$x_j = \sum_i w_{ji} o_i \quad o_j = f(x_j)$$

w_{ji} : trọng số của đơn vị j đối với đơn vị i

$o_j = f(x_j)$: hàm truyền

Hàm truyền phi tuyến có hai dạng: sigmoid (thường gặp) và tanh (hyperbolic tangent):



Hình 1.4.6. Hàm truyền: sigmoid (a) và tanh (hyperbolic tangent) (b)

1.4.3.2. Thuật toán di truyền

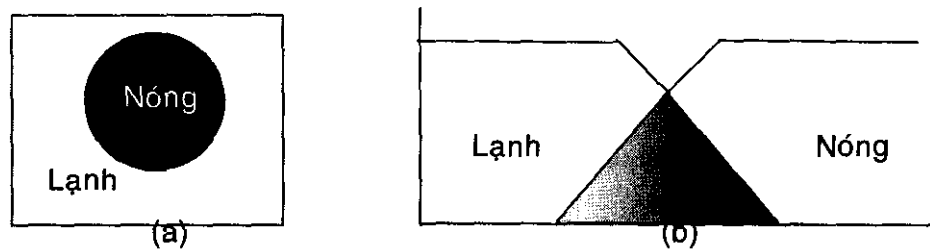
Là ý tưởng áp dụng các nguyên tắc của sự tiến hoá trong tự nhiên vào hệ thống trí tuệ nhân tạo. Sự tiến hoá là một quá trình không được điều khiển, các sinh vật tốt hơn sẽ thích nghi nhiều hơn với môi trường, sinh vật sống sót sẽ sinh sản,...Đó là quá trình chọn lọc và tiến hoá tự nhiên.

Thuật toán di truyền cần được kết hợp với mạng thần kinh vì nó đòi hỏi sự phản hồi các giá trị thích hợp một cách nhanh chóng.

1.4.3.3. Logic mờ

Trong logic cổ điển (crisp logic), hàm thành viên chỉ có một trong hai giá trị là 1 hay 0: thí dụ : cao/ thấp, đúng/ sai, nóng/ lạnh,... Điều này không phản ánh đầy đủ thế giới khách quan, vì giữa cao và thấp còn có vừa, vì giữa đúng và sai còn có gần đúng, vì giữa nóng và lạnh còn có ấm....

Trong logic mờ (fuzzy logic), hàm thành viên có thể cho các giá trị ở giữa 0 và 1. Do đó, logic mờ có tính hiện thực hơn logic cổ điển. Thí dụ: với logic cổ điển, nhiệt độ thoải mái là 20 °C; trong thực tế, nhiệt độ 19 °C hay 21 °C chưa chắc là không thoải mái.



Hình 1.4.7. Minh họa logic cổ điển (a) và logic mờ (b)

1.4.4. Luyện mạng thần kinh

Quá trình luyện mạng (học) được lặp lại theo vòng lặp hay chu kỳ (iteration cycle/ epoch) cho đến khi nào số lần lặp lại đạt đến số vòng lặp tối đa đã được ấn định hay là tổng sai số nhỏ hơn một giới hạn chấp nhận được:

Giá trị cập nhật của trọng số w_{ji} tại lần luyện thứ n có thể cho bởi biểu thức:

$$E = \frac{1}{2} \sum_p \sum_k (y_k - \hat{y}_k)^2$$
$$\Delta w_{ji}(n) = \varepsilon \frac{\partial E}{\partial w_{ji}} + \alpha \Delta w_{ji}(n-1)$$

ε : tốc độ luyện

α : momentum

Trên đây là biểu thức tổng quát về thuật toán lan truyền ngược (backpropagation algorithm) của các sai số. Nó có ý nghĩa quan trọng trong việc luyện có quan sát đối với mạng thần kinh nhiều lớp.

1.4.5. Tối ưu hóa thông minh

Con người tích lũy kinh nghiệm hay kiến thức trong cuộc sống hằng ngày của họ bằng cách thực hiện nhiều hoạt động như nhận dạng, nhận thức, giải quyết và học tập từ môi trường xung quanh. Khi gặp các tình huống mới, con người có khả năng đáp ứng nhờ vào kinh nghiệm hay kiến thức đã thu thập và tích lũy được từ các dữ liệu hay thông tin. Kiến thức được xem như hình thức thông tin kết hợp với sự giải quyết vấn đề qua rút kinh nghiệm (heuristics) và quy luật.

Thông qua máy tính, con người có thể bắt chước các hoạt động, khả năng thông minh của bộ não, đó là trí tuệ nhân tạo (artificial intelligence).

Trí tuệ nhân tạo dựa trên nhiều ngành khoa học (ngôn ngữ học, tâm lý học, kỹ thuật học, triết học, sinh học, tin học,...) và được áp dụng rộng rãi trong nhiều lãnh vực (máy học, tự động hoá, thiết lập mô hình và tối ưu hoá, xử lý ảnh và nhận dạng,...).

Trong lãnh vực tối ưu hoá công thức, trí tuệ nhân tạo ngày càng áp dụng rộng vì tốc độ xử lý của máy tính luôn tăng lên và chi phí luôn giảm xuống.

Một số công cụ trí tuệ nhân tạo thường được dùng trong lãnh vực tối ưu hoá công thức gồm có: mạng thần kinh (neural networks): thiết lập mô hình và dự đoán; logic mờ (fuzzy logic): kết hợp với mạng thần kinh (neuro-fuzzy technique); thuật toán di truyền (genetic algorithms): tối ưu hoá.

Phần mềm thông minh (intelligent software) là hệ thống kết hợp ba công cụ của trí tuệ nhân tạo: mạng thần kinh, logic mờ và thuật toán di truyền. CAD/ Chem và INForm là hai phần mềm thông minh nổi tiếng trong lãnh vực tối ưu hoá công thức.

Phần mềm thông minh có nhiều lợi điểm sau:

- Không giới hạn về số biến $x_1, x_2, \dots, x_k$: đáp ứng yêu cầu thiết kế với nhiều biến về công thức và điều kiện pha chế.
- Có thể tối ưu hoá đồng thời nhiều biến $y_1, y_2, \dots, y_k$: phù hợp với thực tế mỗi sản phẩm thường có rất nhiều tính chất.
- Không phụ thuộc mô hình toán học mà dựa vào khả năng luyện mạng với sự lựa chọn nhiều thông số phù hợp.
- Dự đoán chính xác quả (Y) từ nhân (X) biết trước dựa trên mô hình nhân quả đã được thiết lập.
- Phù hợp nhiều loại dữ kiện phức tạp, phi tuyến, định tính hay thiếu trị số.
- Áp dụng dễ dàng nhờ các hàm tối ưu trực quan: Tent, Up, Down, Flat-Tent

CHƯƠNG 2: NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Các nguyên, vật liệu, thiết bị

2.1.1. Nghiên cứu bào chế viên bao tan trong ruột serratiopeptidase

Casein	Merck (Đức)	Thuốc thử Folin	Merck (Đức)
Tyrosin chuẩn	Phân viện kiểm nghiệm	Eudragit L100	Tiêu chuẩn USP 24
Avicel	Tiêu chuẩn USP	PVP-K30	Tiêu chuẩn USP 24
Serratiopeptidase	Yuhan chemical IND.CO.Ltd Korea		

2.1.2. Nghiên cứu bào chế bột đông khô của vi khuẩn lactic làm men tiêu hoá

Chủng vi khuẩn sử dụng tạo chế phẩm probiotic

Chủng vi khuẩn *B. bifidum* và *L. acidophilus* được phân lập từ hỗn hợp các vi khuẩn trong dược phẩm, được tinh khiết hóa và định danh trước khi thử nghiệm.

Chủng vi khuẩn sử dụng trong nghiên cứu di chuyển gen : *Lactobacillus plantarum* CCUG 9289, *Staphylococcus aureus* ATCC6538P, *E. Coli*, *Salmonella paratyphi*, *E. coli* K12F⁻, *Candida albicans* ATCC2091, *Pseudomonas aeruginosa*

Chủng vi khuẩn thử nghiệm kháng sinh đồ : chủng *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus lactis* thuần khiết và *Escherichia coli* ATCC 25922 chuẩn được dùng để làm đối chứng.

Các loại môi trường sử dụng: môi trường phân lập, nuôi cấy; môi trường đông khô vi khuẩn; môi trường để kiểm nghiệm bột đông khô; môi trường thử nghiệm kháng sinh đồ; môi trường trong thử nghiệm tiếp hợp; môi trường và hoá chất sử dụng trong định danh vi khuẩn

Các loại đĩa kháng sinh

Mẫu sử dụng kiểm nghiệm đối chứng

- Nguyên liệu *Lactobacillus acidophilus* - lô: 307107 - Hàn Quốc.
- Nguyên liệu *Lactobacillus acidophilus* - lô: 310503- Khoa Dược.
- Thành phẩm Abio - lô: 2704001 - Deahan New pharm - Hàn quốc.
- Thành phẩm Antibio-lô: M002, Hanwha pharma - Hàn quốc.
- Thành phẩm Biolactyl - lô: 010103/1 - Imexpharm.

Thiết bị đặc biệt: Máy đông khô vi khuẩn hiệu Snjder

2.1.3. Nghiên cứu bào chế viên bao chứa amoxicilin và acid clavulanic

Chất chuẩn, nguyên liệu

Amoxicilin trihydrat chuẩn	Slovenia, Lot No: X01524909C
Lithilium clavulanate chuẩn đối chiếu	Slovenia, Lot No: Lek-61/01
Thuốc đối chiếu: Viên Augmentin 625 mg	GlaxoSmithkline
Amoxicilin trihydrate	Tây Ban Nha
Kali clavulanate: avicel (1:1)	Slovenia

2.1.4. Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật vi nang để bào chế thuốc viên vitamin có sinh khả dụng và độ ổn định cao

Nguyên liệu

Cyanocobalamin	Pháp, BP 98	Thyamin hydroclori	Nhật, USP 23
Thyamin mononitrat	Nhật, USP 23	Pyridoxin hydroclorid	Nhật, USP 23
Acid folic	Thụy Sĩ, USP 23	Sắt (II) sulfat	Đức, USP 23
Castor Wax	Ấn Độ, USP 23		

Thiết bị chuyên dùng

- Thiết bị chế tạo vi nang theo phương pháp tách pha đồng tụ
- Hệ thống phun đồng tụ

2.1.5. Nghiên cứu điều chế nguyên liệu dược dụng và viên nén magaldrat

Hoá chất, tá dược: muối nhôm, muối magnesi, nhôm kim loại. Acid hydrocloric (HCl), Acid citric. Natri hydroxyd (NaOH), dung dịch NH_4OH . Ethanol tuyệt đối. Các hoá chất trên đều thuộc loại tinh khiết.

Magaldrat: tổng hợp (đạt tiêu chuẩn USP 24), Avicel 101 (tiêu chuẩn BP 98), Era-Gel, Era-Tab (tiêu chuẩn BP 98), Talc, Magnesi stearat: (tiêu chuẩn DĐTQ 97)

Các thành phẩm được dùng làm thuốc đối chiếu

Maalox plus (Mỹ, Lot No 01346); Maalox (Pháp, Lot No 010498); Maloxal 2 (Việt Nam, Lô số 050299); Stomafar (Pharmedic); Alumina II (Nadyphar, Lot 120301); Mylanta II (Úc, Lot No 6631); Kremil-S (Philippines, Lot 8804991), Marax (Đức)

2.1.6. Nghiên cứu bào chế viên nang PTKD với hoạt chất diclofenac natri

- | | | | |
|-------------------|----------------|---------------------------------|----------------|
| -Diclofenac natri | Tiêu chuẩn USP | -Avicel | Tiêu chuẩn USP |
| -Eudragit® RS 100 | Tiêu chuẩn USP | -Eudragit® RL 100 | Tiêu chuẩn USP |
| -PEG 6000 | Thụy Sĩ | -Hydroxypropyl methyl cellulose | Tiêu chuẩn USP |
- Chất đối chiếu: Diclofenac natri Viện Kiểm Nghiệm
 - Thuốc đối chiếu: Viên nén Voltaren® SR 100 mg Novartis

Thiết bị đặc biệt

- Máy tạo hạt tăng sôi có đĩa quay Glatt Model GPCG-1, Đức
- Máy bao tăng sôi kiểu Würster Glatt Model GPCG-1, Đức
- Kính hiển vi điện tử cắt lớp JEO® Model JSM-5410 LV Scanning microscope, Nhật

2.2. Phương pháp nghiên cứu (chi tiết ở phần báo cáo của từng đề tài nhánh)

Chúng tôi đã thực hiện các phương pháp nghiên cứu chung như sau:

Nghiên cứu nguyên liệu, bán thành phẩm

- *Tổng hợp nguyên liệu Magaldrat*: trước hết chúng tôi dựa vào các phản ứng thủy phân, trao đổi để tổng hợp nguyên liệu, song song khảo sát các yếu tố ảnh hưởng và xây dựng quy trình điều chế nguyên liệu đạt tiêu chuẩn dược dụng.

- *Xác định cấu trúc và chất lượng của nguyên liệu Magaldrat*: các phương pháp phân tích hoá lý như: Phổ nhiễu xạ tia X, phân tích nhiệt vi sai (DTG), định phân thể tích, sắc ký trao đổi ion, phổ hấp thụ nguyên tố đã được vận dụng. Các kết quả của chất khảo sát được so sánh với chất đối chiếu tương đương. Để đánh giá chất lượng của Magaldrat, các tiêu chuẩn kiểm nghiệm được sử dụng và xây dựng dựa theo các Dược điển hiện hành.

- *Nuôi cấy và thu sinh khối vi khuẩn*: thăm dò tìm môi trường, xác định các yếu tố tác động thuận lợi cho sự sinh trưởng, thực hiện kỹ thuật đông khô, xác định các điều kiện đông khô tối ưu để bảo quản vi khuẩn

Nghiên cứu bào chế thành phẩm

- *Bào chế viên nén, viên bao, viên nang*: Thực hiện thăm dò công thức và qui trình, áp dụng phương pháp thiết kế và tối ưu hoá phù hợp, xác định các tính chất kỹ thuật của bán thành phẩm, chọn công thức và qui trình tối ưu, thực nghiệm bào chế để xác định sự ổn định của qui trình, kiểm nghiệm chất lượng của chế phẩm theo tiêu chuẩn của dược điển hoặc tiêu chuẩn xây dựng.

- *Các phương pháp phân tích, kiểm nghiệm*: dùng các phương pháp và thiết bị hiện đại như HPLC, quang phổ... được qui định trong dược điển và các tài liệu chuyên môn hiện tại. Các phương pháp được thẩm định theo qui định chung.

- *Thử tác dụng dược lý của chế phẩm*: Các phương pháp xác định độc tính cấp và bán cấp, phương pháp xác định khả năng trung hoà acid, khả năng ức chế hoạt độ pepsin và khả năng bảo vệ vết loét trên chuột. Tất cả các thử nghiệm trên đều được thử với thuốc nghiên cứu và so sánh với thuốc đối chiếu.

- *Xác định tương đương sinh học*: so sánh tương đương *invitro* bằng thử nghiệm độ hoà tan và tương đương sinh học *invivo* bằng so sánh sinh khả dụng của thuốc nghiên cứu với thuốc đối chiếu theo hướng dẫn chung của FDA Mỹ

- *Xác định độ ổn định và tuổi thọ của nguyên liệu và chế phẩm:* bằng phương pháp lão hoá cấp tốc và theo dõi ở điều kiện bình thường theo qui định hiện hành.

Xử lý số liệu

Các số liệu là giá trị trung bình của các mẫu, các số liệu được xử lý và đánh giá bằng phương pháp xử lý thống kê thích hợp như ANOVA, Two one-sided t test....

CHƯƠNG 3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU, KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Nghiên cứu bào chế viên bao tan trong ruột serratiopeptidase 5mg

3.1.1. Kết quả khảo sát phương pháp định lượng SER

Nguyên tắc chung của phương pháp định lượng SER là xác định hoạt độ phân giải casein của SER trên cơ sở định lượng tyrosin được tạo thành bằng phản ứng màu với thuốc thử Folin đo ở bước sóng 660nm.

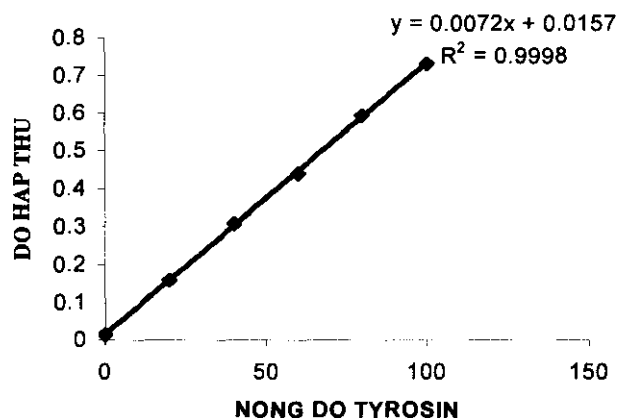
Một đơn vị SER được định nghĩa là lượng SER tương ứng có khả năng giải phóng được 1 μ g tyrosin trong một phút từ 5ml dung dịch casein.

• Xây dựng đường cong chuẩn độ tyrosin

Thiết lập đường biểu diễn sự liên quan giữa độ hấp thu và nồng độ tyrosin của dung dịch sau khi tạo màu với thuốc thử Folin ở bước sóng 660nm (Tyrosin RS của Phân viện kiểm nghiệm)

Độ hấp thu của giai mẫu tyrosin RS tương ứng với nồng độ

	S ₁	S ₂	S ₃	S ₄	S ₅	S ₆
C (μ g)	0	20,0251	40,0501	60,0752	80,1003	100,1253
A	0,0146	0,1588	0,3070	0,4388	0,5923	0,7305



Phương trình hồi quy có dạng $\hat{Y} = 0,0072X + 0,0157$ (1)
 $R^2 = 0,9998$

Nhận xét:

-Phương trình (1) có tính tương thích vì $F = 17219,85 > F_{0,05} = 7,7087$ và các hệ số $b_0 = 0,0157$ và $b = 0,0072$ có ý nghĩa vì $t_0 = 4,7463$ và $t = 131,2244$ đều lớn hơn $t_{0,05} = 2,7765$

-Với $R^2 = 0,9998$ cho thấy độ hấp thu tuyến tính tốt với nồng độ tyrosin.

• **Khảo sát ảnh hưởng của casein lên độ hấp thu của dung dịch tyrosin.**

Đo độ hấp thu của 2 dung dịch tyrosin RS có cùng nồng độ là 19,9755 µg/1ml trong 2 trường hợp có casein và không có casein

Qui ước: Độ hấp thu của dung dịch có casein là A_1

Độ hấp thu của dung dịch không có casein A_2

Bảng 3.1.1. Độ hấp thu của dung dịch Tyrosin

	1	2	3	4	5	TB
A_1	0,3005	0,2978	0,2938	0,2961	0,3013	0,2979
A_2	0,2868	0,2894	0,2855	0,2912	0,2912	0,2888

Xử lý các kết quả bằng trắc nghiệm so sánh hai phương sai và so sánh hai giá trị trung bình.

Nhận xét:

- Phương sai trong hai trường hợp trên là khác nhau không có ý nghĩa vì $F = 1,4338 < F_{0,05} = 6,3882$. Điều đó chứng tỏ độ phân tán của chuỗi dữ liệu được quan sát trong cả hai trường hợp là như nhau hay nói cách khác là cả hai trường hợp đều cho độ chính xác như nhau.

- Tuy nhiên với $t = 5,0309 > t_{0,05} = 2,3060$ trong trắc nghiệm t phương sai bằng nhau cho thấy giá trị độ hấp thu trung bình của hai dung dịch A_1 và A_2 có cùng nồng độ tyrosin RS là khác nhau có ý nghĩa.

- Với qui trình định lượng này, từ độ hấp thu đo được A_T của dung dịch tyrosin thử do SER phân giải casein; dựa vào đường biểu diễn mối liên hệ giữa độ hấp thu của dung dịch và nồng độ tyrosin ta sẽ xác định được lượng tyrosin sinh ra là C_T và xác định được số đơn vị hoạt độ của chế phẩm theo công thức:

$$X(UI) = C_t \times \frac{11}{2} \times \frac{1}{20} \times \text{độ pha loãng} \times \frac{\bar{M}}{m}$$

$\bar{M}$: khối lượng trung bình viên

m: khối lượng bột viên cân định lượng

Kết quả thực nghiệm trên cho thấy, giá trị A_T thu được là cao hơn so với độ hấp thu của dung dịch tyrosin chuẩn có cùng nồng độ có nghĩa là giá trị C_T suy ra từ đường chuẩn sẽ cao hơn lượng tyrosin thực được tạo thành do SER phân giải casein. Như vậy kết quả định lượng sẽ cao hơn kết quả thực có.

• **So sánh mẫu thử và mẫu chuẩn**

• So sánh kết quả định lượng SER theo qui trình A và B

Bảng 3.1.2. Kết quả định lượng nguyên liệu SER (Số lô 2022- NSX: 12/03/02 - Nơi sản xuất: Korea)

	Qui trình A	Qui trình B
1.	1833,15	1973,12
2.	1870,35	2013,16
3.	1814,39	1952,93
4.	1776,19	1911,81
5.	1798,68	1936,02
6.	1818,87	1957,75
GTTB	1818,60	1957,47
S^2	1620,61	1182,41
RSD(%)	1,76	1,76

Bảng 3.1.3. Kết quả định lượng chế phẩm N₁(Số lô: 010103- HD: 01/05)

	Qui trình A	Qui trình B
1.	102,61	110,41
2.	103,66	111,54
3.	104,70	112,67
4.	102,91	110,74
5.	102,06	109,83
6.	104,98	112,97
GTTB	103,48	111,36
S^2	1,3805	1,5987
RSD(%)	1,14	1,14

Bảng 3.1.4. Kết quả định lượng chế phẩm B₁(Số lô:1300603 - HD: 06/05)

	Qui trình A	Qui trình B
1.	89,54	96,26
2.	88,46	95,11
3.	88,43	95,08
4.	89,67	96,41
5.	87,99	94,59
6.	88,93	95,61
GTTB	88,84	95,51
S^2	0,4444	0,5137
RSD(%)	0,75	0,75

So sánh các phương sai, so sánh các giá trị trung bình.

Nhận xét

- Trên cùng một mẫu thử, dù là chế phẩm hay nguyên liệu nếu tiến hành định lượng theo hai qui trình khác nhau A, B thì cho hai kết quả hoàn toàn khác nhau ($t > t_{0,05}$).

Phương sai của hai qui trình là khác nhau không có ý nghĩa ($F < F_{0,05}$) hay nói cách khác độ chính xác của hai qui trình là như nhau.

Do đó chúng ta cần phải xem xét lại trong hai qui trình trên, qui trình nào là tối ưu hơn?

• **Xây dựng mẫu giả định có hàm lượng SER biết trước**

Công thức 1: Serratiapeptidase	22.000 UI
Tá dược vđ	1 viên
Công thức 2: Serratiapeptidase	24.000 UI
Tá dược vđ	1 viên
Công thức 3: Serratiapeptidase	26.000 UI
Tá dược vđ	1 viên

Ở đây, mẫu từ nguyên liệu do công ty Biotech - Div - Paracifac – Korea sản xuất, việc định lượng chúng tôi chỉ tiến hành trên viên nhân không bao để loại bỏ các yếu tố trong quá trình bao ảnh hưởng đến hàm lượng vì SER là enzym rất dễ bị hỏng bởi các yếu tố đó .

Bảng 3.1.5. Kết quả định lượng của chế phẩm sản xuất theo công thức 1

	Qui trình A	Qui trình B
1.	20.554,70	21.909,72
2.	20.89,46	21.946,78
3.	20.617,34	21.976,50
4.	20.469,02	21.818,40
5.	20.170,42	21.500,10
6.	20.557,98	21.913,22
GTTB	20.493,16	21.844,12
S ²	0,6872	0,7808
% so với LT	93,15%	99,29%

Bảng 3.1.6. Kết quả định lượng của chế phẩm sản xuất theo công thức 2

	Qui trình A	Qui trình B
1.	22.170,92	23.610,16
2.	22.112,20	23.550,84
3.	22.209,44	23.722,46
4.	22.276,38	23.651,18
5.	22.461,56	23.919,66
6.	22.104,46	23.539,38
GTTB	22.223,00	23.665,62
S ²	0,4416	0,5008
% so với LT	92,60%	98,61%

Bảng 3.1.7. Kết quả định lượng của chế phẩm sản xuất theo công thức 3

	Qui trình A	Qui trình B
1.	24.636,06	25.732,72
2.	14.844,50	25.950,44
3.	24.694,00	25.793,24
4.	24.947,82	26.058,36
5.	24.792,92	25.896,56
6.	24.618,40	25.714,28
GTTB	24.755,62	25.857,60
S ²	0,4158	0,4538
% so với LT	95,21%	99,45%

Nhận xét

- Kết quả định lượng theo qui trình B cho kết quả cao hơn khi định lượng theo qui trình A và kết quả này gần sát với giá trị lý thuyết hơn.
- Sự chênh lệch kết quả định lượng giữa hai qui trình từ 5% - 7%, thật sự cũng không phải là quá lớn đối với SER là chế phẩm enzym sinh học, tuy nhiên chúng tôi cho rằng việc tiến hành mẫu thử và mẫu chuẩn trong điều kiện hoàn toàn giống nhau như qui trình B là hợp lý hơn bởi vì loại bỏ được sự khác biệt về môi trường giữa mẫu thử và mẫu chuẩn.
- Chúng tôi chọn qui trình B làm qui trình chuẩn để khảo sát hàm lượng các chế phẩm SER hiện đang lưu hành trên thị trường .

Khảo sát các yếu tố khác ảnh hưởng trong định lượng

- Hai khối lượng bột thuốc khác nhau
- Lượng bột thuốc tương đương với 50mg SER ký hiệu là M₅₀

- Lượng bột thuốc tương đương với 10 mg SER ký hiệu là M_{10}

Bảng 3.1.8. Kết quả định lượng với nguyên liệu (Lô 2022)

	M_{50}	M_{10}
1	1972,44	1965,50
2	2001,15	1896,00
3	1963,14	1823,07
4	1928,35	1936,14
5	1938,90	2002,80
6	1953,95	1885,52
TB	1959,66	1918,17
S^2	668,2343	4065,33
RSD (%)	1,32	3,32

Bảng 3.1.9. Kết quả định lượng với chế phẩm N_1 (Lô 010103 - HD:01.05)

	M_{50}	M_{10}
1	111,49	113,23
2	111,49	112,45
3	110,60	110,83
4	111,97	108,86
5	110,01	108,97
6	111,80	112,91
TB	111,27	111,21
S^2	0,5817	3,8458
RSD (%)	0,68	1,76

Bảng 3.1.10. Kết quả định lượng với chế phẩm B_1 (Lô 1300603 -HD:06.05)

	M_{50}	M_{10}
1	95,20	98,12
2	95,13	93,93
3	95,18	94,40
4	97,28	94,28
5	96,06	93,83
6	95,08	97,94
TB	95,66	95,42
S^2	0,7651	4,1422
RSD (%)	0,91	2,13

So sánh phương sai, so sánh các giá trị trung bình

Nhận xét

- Giá trị trung bình của nguyên liệu hay mẫu thử trong cả hai trường hợp tiến hành với khối lượng bột thuốc tương đương 50 mg và 10 mg khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($t < t_{0,05}$).

- Phương sai trong cả ba trường hợp mẫu thử khi tiến hành định lượng với lượng bột thuốc tương đương 10 mg SER (1 viên) đều lớn hơn phương sai khi tiến hành với lượng bột thuốc tương đương 50 mg SER nên có thể nói là kết quả định lượng khi tiến hành với lượng bột thuốc tương đương 10 mg kém chính xác hơn là tiến hành với khối lượng bột thuốc tương đương là 50 mg rồi pha loãng đi 5 lần.

- Vậy ta nên chọn khối lượng bột thuốc tương đương 50 mg SER để có độ chính xác cao hơn vì thông thường khi tiến hành định lượng ta chỉ tiến hành 1 - 2 lần.

• Dung dịch Na_2CO_3 6% và 10%

Bảng 3.1.11. Kết quả định lượng với nguyên liệu (Lô 2022)

	Na_2CO_3 10%	Na_2CO_3 6%
1	1985,79	1992,59
2	1975,74	1884,91
3	1956,17	1932,55
4	1932,14	1907,43
5	1975,21	2001,44
6	2000,75	1905,79
TB	1970,97	1920,79
S^2	574,8028	4227,3230
RSD (%)	1,21	3,38

Bảng 3.1.12. Kết quả định lượng với chế phẩm N_1 (Lô 010103 - HD:01.05)

	Na_2CO_3 10%	Na_2CO_3 6%
1	110,00	110,87
2	111,70	112,69
3	111,56	108,66
4	112,12	109,40
5	110,28	113,86
6	111,08	111,46
TB	111,13	111,46
S^2	0,7002	3,8292
RSD (%)	0,75	1,76

Bảng 3.1.13. Kết quả định lượng với chế phẩm B₁ (Lô 1300603-HD:06.05)

	Na ₂ CO ₃ 10%	Na ₂ CO ₃ 6%
1	95,55	97,58
2	95,00	94,17
3	95,04	94,66
4	95,71	94,41
5	96,03	95,14
6	95,91	97,45
TB	95,54	95,97
S ²	0,1903	2,3803
RSD (%)	0,45	1,61

So sánh phương sai, so sánh giá trị trung bình

Nhận xét

- Giá trị trung bình trong hai trường hợp dùng Na₂CO₃ 6% và Na₂CO₃ 10% khác nhau không có ý nghĩa ($t < t_{0,05}$)

- Phương sai trong hai trường hợp lại khác nhau có ý nghĩa ($F > F_{0,05}$)

Do đó chúng tôi dùng dung dịch Na₂CO₃ 10% trong giai đoạn tạo màu với thuốc thử Folin.

• **Thuốc thử Folin với độ pha loãng 1/2 và 1/3**

Bảng 3.1.14. Kết quả định lượng với nguyên liệu (Lô 2022)

	Folin 1/2	Folin 1/3
1	1968,55	1904,75
2	1989,22	1980,56
3	1946,28	1942,08
4	1965,32	1861,79
5	1973,09	2003,52
6	1981,39	1910,14
TB	1970,64	1933,81
S ²	218,6090	2741,2120
RSD (%)	0,75	2,71

Bảng 3.1.15. Kết quả định lượng với chế phẩm N₁ (Lô 010103-HD: 01.05)

	Folin 1/2	Folin 1/3
1	110,20	110,33
2	110,45	113,28
3	112,93	108,44
4	111,01	108,56
5	110,43	111,33
6	111,22	113,17
TB	111,21	110,85
S ²	0,8324	4,5617
RSD (%)	0,82	1,93

Bảng 3.1.16. Kết quả định lượng với chế phẩm B₁ (Lô 300603-HD:06.05)

	Folin 1/2	Folin 1/3
1	94,38	93,47
2	96,33	94,56
3	95,27	97,78
4	94,53	96,40
5	95,39	96,76
6	95,87	96,68
TB	95,29	96,26
S ²	0,5682	3,8998
RSD (%)	0,79	2,05

So sánh phương sai, so sánh các giá trị trung bình

Nhận xét

Giá trị hàm lượng trung bình của chế phẩm và nguyên liệu SER khi định lượng với thuốc thử Folin 1/2 và Folin 1/3 là khác nhau không có ý nghĩa ($t < t_{0,05}$) nhưng phương sai trong trường hợp dùng thuốc thử Folin 1/2 nhỏ hơn, do đó ta vẫn chọn thuốc thử Folin 1/2 như qui trình B.

Tóm lại: Qui trình B là qui trình có nhiều ưu điểm hơn so với những qui trình khác. Tiến hành mẫu thử và mẫu chuẩn trong điều kiện hoàn toàn giống nhau nên loại bỏ được sự khác biệt giữa hai môi trường và các yếu tố khác.

Thẩm định qui trình B định lượng SER

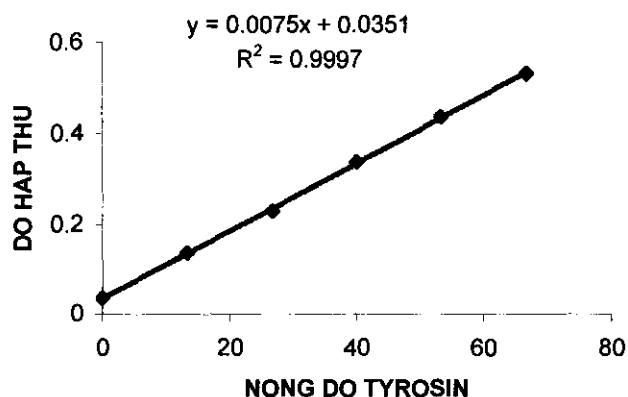
• Tính tuyến tính

Tiến hành trên tyrosin RS của Phân Viện Kiểm Nghiệm

Số lô: QT 088010902 có hàm lượng 99,134%, H₂O = 0,055%

Bảng 3.1.17. Độ hấp thu của giai mẫu tyrosin RS tương ứng với nồng độ

	1	2	3	4	5	6
C (µg)	0	13,3500	26,7001	40,0501	53,4002	66,7502
A	0,0353	0,1352	0,2298	0,3375	0,4358	0,5302



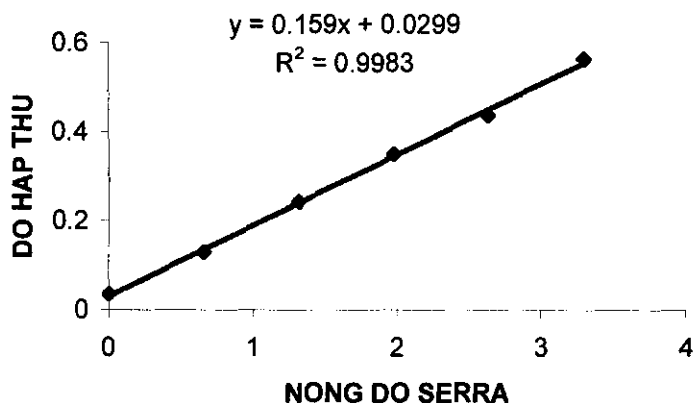
Phương trình hồi quy có dạng $\hat{Y} = 0,0075X + 0,0351$ (2)
 $R^2 = 0,9997$

- Phương trình (2) có tính tương thích vì $F = 14,7443 > F_{0,05} = 7,7087$ và có hệ số $b_0 = 0,0351$ và $b = 0,0075$ có ý nghĩa vì $t_0 = 14,1456$ và $t = 121,4261$ đều lớn hơn $t_{0,05} = 2,7765$.

•Tiến hành với nguyên liệu SER

Bảng 3.1.18. Độ hấp thu của giai mẫu SER tương ứng với nồng độ

	1	2	3	4	5	6
C (UI)	0	0,6603	1,3207	1,9810	2,6414	3,3017
A	0,0343	0,1286	0,2425	0,3492	0,4365	0,5634



- Phương trình hồi quy có dạng $\hat{Y} = 0,519X + 0,0299$ (3)
 $R^2 = 0,9983$

- Phương trình (3) có tính tương thích vì $F = 2297,34 > F_{0,05} = 7,7087$ và các hệ số $b_0=0,0299$ và $b= 0,159$ có ý nghĩa vì $t_0 = 4,50$ và $t = 47,93$ đều lớn hơn $t_{0,05} = 2,7785$.

- Với $R^2 = 0,9983$ cho thấy sự liên quan giữa hoạt lực của SER thông qua độ hấp thu của tyrosin tạo thành là tuyến tính mặc dù $R^2 = 0,9983$ cho độ tin cậy chưa cao. SER là chế phẩm enzym nên R^2 này vẫn chấp nhận được.

- **Độ chính xác:** Ở đây chúng tôi xét độ chính xác trung gian

Bảng 3.1.19. Kết quả định lượng của nguyên liệu (Lô 2022)

	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
1	1982,70	1936,58	1970,32
2	1988,21	1951,35	1976,19
3	1972,60	1969,72	1947,75
4	1970,82	1965,14	2003,14
5	1958,47	1997,67	1935,70
6	2006,52	1912,64	1925,57
GTTB	1979,89	1955,52	1963,11
S^2	276,1049	857,1459	705,0238

Bảng 3.1.20. Kết quả định lượng của chế phẩm N_1 (Lô 010103 -HD:01.05)

	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
1	111,95	109,57	111,42
2	112,19	114,56	112,04
3	110,63	112,34	111,64
4	110,27	110,04	109,79
5	109,96	112,90	111,21
6	112,40	110,30	110,58
GTTB	111,23	111,62	111,11
S^2	1,1416	3,8564	0,6589

Bảng 3.1.21. Kết quả định lượng của chế phẩm B₁ (Lô 1300603 -HD:06.05)

	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
1	96,35	96,44	95,53
2	96,26	95,51	96,24
3	93,86	97,23	95,69
4	94,72	93,74	95,32
5	95,27	95,90	96,51
6	95,61	95,91	94,58
GTTB	95,35	95,79	95,84
S ²	0,9043	1,3594	0,4702

Tóm tắt kết quả thống kê

Mẫu	Nguyên liệu	Chế phẩm N ₁	Chế phẩm B ₁
$\bar{X}$	1966,172	111,32	95,59
Sr	24,7540	1,3732	0,9546
RSD (%)	1,26	1,23	1,00

Nhận xét: Hệ số phân tán trong cả ba mẫu đều có giá trị < 2% chứng tỏ phương pháp có độ chính xác cao.

• **Độ đúng**

Tiến hành trên chế phẩm N₁ và sử dụng nguyên liệu được sản xuất bởi công ty Biotech -Div paracific - Korea đã được Phân viện kiểm nghiệm Tp.Hồ Chí Minh kiểm định như chất chuẩn thêm vào.

- Số đơn vị hoạt độ của chế phẩm N₁: 22.278,50 UI/10mg (1 viên)

- Số đơn vị hoạt độ của nguyên liệu: 1965,30 UI/1mg (kết quả kiểm nghiệm của phân viện Kiểm Nghiệm TP.HCM)

Bảng 3.1.22. Độ đúng của qui trình

N	Tỉ lệ % so với lý thuyết	Giá trị lý thuyết(UI)	Giá trị quan sát(UI)
1	80%	78,6120	80,0591
2		78,7692	78,9818
3		78,4548	78,2719
4	100%	98,650	99,8477
5		98,4615	100,7798
6		98,0685	97,8758
7	120%	117,9180	117,3829
8		118,1538	120,4196
9		117,6822	119,3154

Độ lệch thực nghiệm B = 1,14%, Tỷ lệ phục hồi F = 100,94%

Hệ số tương quan R = 99,80%

Nhận xét: Độ đúng của qui trình được phản ánh qua độ lệch thực nghiệm B, tỷ lệ phục hồi F và hệ số tương quan R. Các giá trị B và F trên là chấp nhận được đối với một qui trình định lượng, còn R thông thường phải > 99,90%. Tuy nhiên đây là qui trình định lượng đối với một chế phẩm sinh học nên chúng tôi nghĩ rằng giá trị hệ số tương quan R = 99,80% vẫn chấp nhận được.

3.1.2. Khảo sát hàm lượng các chế phẩm SER trên thị trường

Bảng 3.1.23. Một số chế phẩm SER được lấy mẫu định lượng

TT	Tên chế phẩm	Số đăng ký	Số lô	Hạn dùng	NSX
1	Danizane	VNA-4468-01	00203	04.05	VN
2	Doren	VNA-4589-01	1300603	06.05	VN
3	Garzen	VN-3366-02	204	21.08.05	Korea
4	Nuse	VN-4574-00	0301	03.06	Korea
5	Pamatase	VN-4446-00	L 2004	05.05	Korea
6	Petizen	VN-5107-01	305004	05.06	Korea
7	Popzen	VN-5618-01	06	02.05	Korea
8	Sarariben F	VN-5614-01	2001	14.11.05	Korea
9	S - dase	VN-4449-00	30527	28.04.06	Korea
10	Selthion	VN-3025-98	E 168201	03.04.05	Korea
11	Septirose	VN-4596-00	216901	10.05	Korea
12	Serazen	VNB-1183-02	202	20.06.05	Korea
13	Serratiopeptidase	VN-3697-99	010103	01.05	VN
14	Serratiopeptidase	VN-6405-02	11005	10.03	Korea
15	Serrazyme	VN-5860-01	2011	06.05	Korea
16	Silinazen	VN-5635-01	133033	05.01.06	Korea
17	Unitase		4902	09.06.05	Korea

- Các chế phẩm trên đều được bào chế dưới dạng viên bao tan ở ruột và có hàm lượng 10mg tương đương với 20000 UI.

- Các chế phẩm trên sẽ được mã hoá và định lượng

Bảng 3.1.24. Kết quả định lượng chế phẩm SER đã mã hoá

STT	Số mã hoá	Hàm lượng	Kết luận
1	A	90,20%	Đạt
2	B	95,69%	Đạt
3	C	101,19%	Đạt
4	D	75,25%	Không đạt
5	E	34,43%	Không đạt
6	F	107,56%	Đạt
7	G	15,60%	Không đạt
8	H	92,84%	Đạt
9	I	60,31%	Không đạt
10	K	45,43%	Không đạt
11	L	18,80%	Không đạt
12	M	80,78%	Không đạt
13	N	111,82%	Đạt
14	O	55,96%	Không đạt
15	P	52,23%	Không đạt
16	Q	82,04%	Không đạt
17	R	54,93%	Không đạt

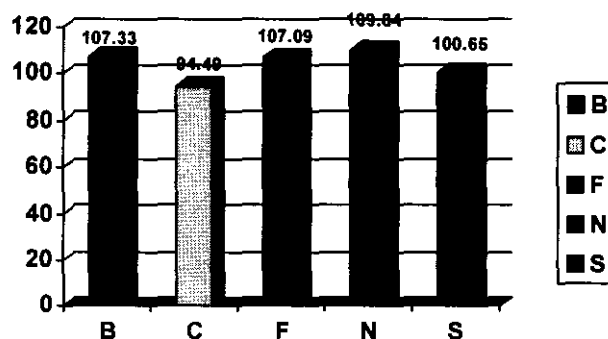
Nhận xét

- Kết quả cho thấy số chế phẩm chứa SER trên thị trường không đạt tiêu chuẩn về hàm lượng khá cao (11/17 chế phẩm chiếm 64,71%).
- Với những chế phẩm đạt chỉ tiêu hàm lượng ở trên, chúng tôi chọn ra một số chế phẩm tiến hành định lượng một số lô và chọn 3 lô đạt tiêu chuẩn hàm lượng rồi mới đánh giá độ hoà tan.

Bảng 3.1.25. Kết quả định lượng một số lô của các chế phẩm đã chọn

	Số lô	Hạn dùng	Hàm lượng	Hàm lượng TB
B	1300603	06/05	95,69	107,33
	4370803	08/05	109,49	
	4410803	08/05	116,80	
C	201	03/05	90,80	94,49
	204	06/05	91,49	
	206	10/05	101,19	
F	303002	04/03/06	98,26	107,09
	305004	01/05/06	107,56	
	307007	24/07/06	115,45	
N	010103	01/05	111,82	109,84
	010803	08/05	92,23	
	011003	10/05	125,46	
S	S ₅		93,46	100,65
	S ₈		90,42	
	S ₉		118,08	

Nhận xét: Trên cùng một chế phẩm của cùng một nhà sản xuất, hàm lượng hoạt chất giữa các lô là khác nhau chứng tỏ độ đồng đều hàm lượng của chế phẩm SER là chỉ tiêu cần quan tâm

**Biểu đồ 3.1.1.** Hàm lượng của một số chế phẩm chứa SER

3.1.3. Kết quả khảo sát điều kiện thử nghiệm độ hoà tan của viên SER

• Điều kiện để định lượng SER ở môi trường pH 6,8

Qui ước: Môi trường đệm borat 9,0 là môi trường 1

Môi trường đệm pH 9,0 do sự chuyển từ môi trường đệm pH 6,8 và borat pH 10,10 là môi trường 2.

Bảng 3.1.26. Kết quả định lượng nguyên liệu SER (Lô 2022)

	Môi trường 1(UI)	Môi trường 2(UI)
1	1991,48	1984,00
2	1953,07	1985,15
3	1948,06	1966,89
4	1937,7	2009,71
5	1904,20	1953,77
6	1964,14	1945,50
TB	1949,63	1974,13
S²	833,6525	557,1477
RSD (%)	1,48	1,20

Bảng 3.1.27. Kết quả định lượng chế phẩm N₁ (Lô 010103 -HD:01.05)

	Môi trường 1(%)	Môi trường 2(%)
1	111,63	110,34
2	112,10	110,25
3	111,12	111,41
4	110,43	111,37
5	110,53	111,43
6	110,49	111,83
TB	111,05	111,10
S²	0,4839	0,4218
RSD (%)	0,62	0,58

Bảng 3.1.28. Kết quả định lượng chế phẩm F₂ (Lô 305004 -HD: 05.06)

	Môi trường 1	Môi trường 2
1	107,10	107,69
2	105,96	106,87
3	107,67	106,85
4	107,49	107,15
5	106,00	108,77
6	108,41	107,85
TB	107,10	107,53
S²	0,9396	0,5415
RSD (%)	0,90	0,68

Nhận xét: Kết quả thực nghiệm cho thấy phương sai và giá trị trung bình của nguyên liệu SER và chế phẩm SER khi định lượng trong hai môi trường 1 và môi trường 2 khác nhau không có ý nghĩa. Điều đó có nghĩa là khi hoạt chất SER được giải phóng

từ chế phẩm ra môi trường hoà tan (môi trường đệm phosphat 6,8) thì ta có thể định lượng được hoạt lực của chế phẩm.

• **Độ bền vững của SER trong môi trường phosphat 6,8**

Bảng 3.1.29. Kết quả định lượng nguyên liệu (Lô 2022)

	15 phút	30 phút	45 phút	60 phút	75 phút
1	1977,42	1956,28	1953,37	1967,22	1960,65
2	1975,96	1953,37	1962,84	1958,47	1954,83
3	1960,66	1967,95	1971,59	1950,45	1982,52
4	1965,03	1965,03	1948,99	1960,66	1961,39
5	1953,37	1945,35	1965,03	1965,03	1964,30
6	1962,84	1944,62	1947,54	1954,83	1959,93
TB	1965,88	1955,44	1958,23	1959,44	1963,94
S²	85,7259	94,4384	93,8540	39,2416	92,3842

Bảng 3.1.30. Kết quả định lượng chế phẩm N₁ (Lô 010103, HD: 01.05)

	15 phút	30 phút	45 phút	60 phút	90 phút
1	110,61	110,21	110,98	111,27	110,58
2	110,29	110,83	110,47	110,14	111,63
3	111,52	111,67	112,83	110,87	109,78
4	110,90	110,94	111,65	111,15	111,12
5	111,67	112,06	112,32	111,26	111,41
6	111,16	110,36	110,72	112,47	111,01
TB	111,02	111,01	111,50	111,19	110,92
S²	0,2341	0,280	0,7348	0,5686	0,3696

Bảng 3.1.31. Kết quả định lượng chế phẩm F₂ (Lô 305004, HD: 05.06)

	15 phút	30 phút	45 phút	60 phút	90 phút
1	107,92	107,22	106,19	108,03	106,71
2	106,67	107,52	108,18	107,15	107,74
3	107,59	107,74	106,34	106,41	107,00
4	108,55	107,81	107,63	107,04	106,23
5	108,36	108,69	107,33	107,07	108,25
6	107,99	106,69	107,52	107,74	106,19
TB	107,85	107,64	107,20	107,24	107,02
S²	0,4459	0,3793	0,6019	0,3263	0,6873

Phân tích phương sai

Nhận xét: Kết quả định lượng SER tại các thời điểm khác nhau 15 phút, 30 phút, 45

phút, 60 phút và 75 phút trong môi trường đệm phosphat 6,8 là khác nhau không có ý nghĩa ($F < F_{\alpha = 0,05}$). Như vậy SER bền trong môi trường đệm phosphat 6,8 ở $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, cũng có nghĩa là SER sau khi giải phóng từ viên ra môi trường hoà tan chưa bị phân hủy do đó kết quả định lượng SER sau 45 phút hay 60 phút là phản ánh đúng độ giải phóng hoạt chất của chế phẩm.

• Khảo sát tốc độ quay của thiết bị

Tốc độ quay 50 vòng/phút

Bảng 3.1.32. Hàm lượng (%) hoạt chất giải phóng của chế phẩm F (Lô 305004, HD: 05.06)

	Mẫu	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	S ²	RSD(%)
45 phút	F ₁	78,51	76,59	76,46	77,19	1,3176	1,49
	F ₂	79,45	78,24	77,76	78,49	0,7584	1,11
	F ₃	77,88	78,09	78,93	78,63	0,3087	0,71
	TB	77,99				0,4920	0,90
60 phút	F ₁	79,40	79,41	78,77	79,19	3,1344	0,46
	F ₂	80,67	80,55	79,56	80,26	0,3711	0,76
	F ₃	80,03	81,22	81,08	80,78	0,4230	0,81
	TB	80,08				0,3095	0,69

Tốc độ quay 120 vòng/phút

Bảng 3.1.33. Hàm lượng (%) hoạt chất giải phóng của chế phẩm F (Lô 305004, HD: 05.06)

	Mẫu	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	S ²	RSD(%)
45 phút	F ₁	87,19	86,77	85,08	86,35	0,1274	1,29
	F ₂	87,61	86,15	86,33	86,70	0,6337	0,92
	F ₃	84,35	85,00	86,84	85,40	1,6680	1,51
	TB	86,26				1,1831	1,26
60 phút	F ₁	90,19	90,20	90,45	90,28	0,0217	0,16
	F ₂	89,44	90,07	88,76	89,42	0,4292	0,73
	F ₃	90,27	89,13	89,54	89,65	0,3334	0,64
	TB	89,78				0,2615	0,57

Nhận xét

- Ở các điều kiện khảo sát, ở hai tốc độ khác nhau, lượng hoạt chất giải phóng ra môi trường hoà tan sau 60 phút đều trên 70% hàm lượng ghi trên nhãn, đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam III.

- Ở tốc độ 50 vòng/phút, sau 45 phút ở các giỏ quay của thiết bị còn dính một ít bột thuốc và nếu đánh giá theo USP thì lượng hoạt chất giải phóng ra môi trường hoà tan < 80%. Ở tốc độ 120 vòng/phút, các viên đều tan hết.

- Qua tham khảo các tài liệu đánh giá độ hoà tan của chế phẩm viên bao tan ở ruột, chúng tôi chọn tốc độ 120 vòng/phút và xét ở hai thời điểm 45 phút và 60 phút

3.1.4. Khảo sát độ hoà tan của một số chế phẩm SER 10mg

Bảng 3.1.34. Hàm lượng (%) hoạt chất giải phóng của chế phẩm B

	Mẫu	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	S ²	RSD(%)
45 phút	B ₁	87,19	88,93	87,54	87,89	0,8470	1,05
	B ₂	97,15	96,86	98,01	97,34	0,3577	0,61
	B ₃	105,85	106,45	105,39	105,90	0,2825	0,50
	TB	97,04				0,4957	0,83
60 phút	B ₁	87,77	90,27	88,32	88,79	1,7258	1,48
	B ₂	98,03	98,49	99,57	98,70	0,6249	0,80
	B ₃	106,20	107,99	107,35	107,18	0,8227	0,85
	TB	98,22				1,0578	1,05

Nhận xét

- Tất cả các viên còn nguyên hình dạng trong suốt hai giờ ở môi trường acid và tan nhanh khi chuyển sang môi trường đệm phosphat.

- Hàm lượng hoạt chất giải phóng của các viên đều đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam III và USP XXIII

- Độ lệch chuẩn tương đối đều < 2%.

-So sánh phương sai giữa các lô của chế phẩm B ở 45 phút,so sánh giá trị trung bình giữa các lô của chế phẩm B ở 45 phút

Nhận xét: Sau 45 phút hàm lượng hoạt chất giải phóng từ các lô khác nhau của chế phẩm B là khác nhau có ý nghĩa ($t > t_{0,05}$) trong khi đó các phương sai lại khác nhau không có ý nghĩa ($F < F_{0,05}$).

-So sánh phương sai giữa các lô của chế phẩm B ở 60 phút,so sánh các giá trị trung bình giữa các lô của chế phẩm B ở 60 phút

Nhận xét

- Sau 60 phút, khả năng giải phóng hoạt chất từ chế phẩm giữa các lô là khác nhau có ý nghĩa thống kê ($t > t_{0,05}$). Điều này có thể do sự thay đổi hàm lượng giữa các lô chế phẩm khác nhau nhưng cũng có thể do thay đổi thành phần tá dược, tỉ lệ tá dược hay kỹ thuật bào chế.

Bảng 3.1.35. Hàm lượng hoạt chất giải phóng của chế phẩm C

	Mẫu	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	S ²	RSD(%)
45 phút	C ₁	33,77	31,40	19,66	31,61	4,2561	6,53
	C ₂	45,14	43,87	44,46	44,49	0,4039	1,43
	C ₃	56,27	55,79	51,71	55,92	0,0917	0,54
	TB	44,01				1,5839	2,86
60 phút	C ₁	34,09	31,43	29,44	31,66	5,4430	7,37
	C ₂	46,78	44,46	46,64	45,96	1,6924	2,83
	C ₃	61,90	61,21	60,14	61,08	0,7864	1,45
	TB	46,23				2,6406	3,52

Nhận xét

- Các viên nguyên vẹn trong môi trường acid nhưng chưa tan hết trong môi trường đệm 6,8.

- Hoạt chất giải phóng từ các viên đều không đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt nam III và USPXXIII.

- Độ lệch chuẩn tương đối của chuỗi kết quả khá cao > 2%

So sánh phương sai giữa các lô của chế phẩm C ở 45 phút, so sánh giá trị trung bình giữa các lô của chế phẩm C ở 45 phút

Nhận xét: Sau 45 phút hàm lượng hoạt chất giải phóng từ các lô của chế phẩm C là khác nhau có ý nghĩa ($t > t_{0,05}$). Tuy nhiên phương sai của lô C₁ và C₂ cũng như C₂ và C₃ khác nhau không có ý nghĩa ($F < F_{0,05}$), còn phương sai của C₁ và C₃ khác nhau có ý nghĩa ($F > F_{0,05}$).

So sánh phương sai giữa các lô của chế phẩm C ở 60 phút, so sánh giá trị trung bình của các lô của chế phẩm C ở 60 phút

Nhận xét: Sau 60 phút, độ giải phóng hoạt chất của chế phẩm khác nhau có ý nghĩa thống kê giữa các lô ($t > t_{0,05}$) nhưng phương sai của các lô khác nhau không có ý nghĩa ($F < F_{0,05}$).

Bảng 3.1.36. Hàm lượng (%) hoạt chất giải phóng của chế phẩm F

	Mẫu	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	S ²	RSD(%)
45 phút	F ₁	87,19	86,77	85,08	86,35	0,1274	1,29
	F ₂	87,61	86,15	86,33	86,70	0,6337	0,92
	F ₃	84,35	85,00	86,84	85,40	1,6680	1,51
	TB	86,26				1,1831	1,26
60 phút	F ₁	90,19	90,20	90,45	90,28	0,0217	0,16
	F ₂	89,44	90,07	88,76	89,42	0,4292	0,73
	F ₃	90,27	89,13	89,54	89,65	0,3334	0,64
	TB	89,78				0,2615	0,57

Nhận xét: Các viên nguyên vẹn trong môi trường acid và tan nhanh trong môi trường đệm phosphat.

- Tất cả các viên đều đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam III và USP XXIII

- Độ lệch chuẩn tương đối < 2%.

So sánh phương sai giữa các lô của chế phẩm F ở 45 phút, so sánh giá trị trung bình giữa các lô của chế phẩm F ở 45 phút.

Nhận xét: hàm lượng hoạt chất giải phóng giữa các lô của chế phẩm F sau 45 phút là khác nhau không có ý nghĩa ($t < t_{0,05}$).

So sánh phương sai giữa các lô của chế phẩm F ở 60 phút, so sánh giá trị trung bình giữa các lô của chế phẩm F ở 60 phút.

Nhận xét: Độ giải phóng hoạt chất của chế phẩm F giữa các lô là khác nhau không có ý nghĩa sau 60 phút ($t < t_{0,05}$).

Bảng 3.1.37. Hàm lượng (%) hoạt chất giải phóng của chế phẩm N

	Mẫu	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	S ²	RSD(%)
45 phút	N ₁	77,01	77,27	74,96	76,41	1,6010	1,66
	N ₂	74,61	73,91	76,28	74,93	1,4826	1,62
	N ₃	74,41	74,81	72,64	73,95	1,3336	1,56
	TB	75,10				1,4724	1,61
60 phút	N ₁	82,42	80,81	80,10	81,11	1,4131	1,47
	N ₂	79,05	77,31	79,96	78,77	1,8130	1,71
	N ₃	75,57	76,08	73,57	75,07	1,7600	1,77
	TB	78,32				1,6620	1,65

Nhận xét

- Mặc dù các viên có hình dạng nguyên vẹn sau hai giờ trong môi trường acid nhưng

lớp bao màu tan rất nhanh trong môi trường này, khi chuyển sang môi trường đệm phosphat, các viên tan rất nhanh nhưng nếu đánh giá theo USP 23 thì lượng hoạt chất giải phóng không đạt tiêu chuẩn.

- Nếu đánh giá theo tiêu chuẩn của Dược điển Việt Nam III thì cả ba lô đều đạt tiêu chuẩn.

- Có lẽ do acid thấm vào lớp bảo vệ của viên nên một phần hoạt chất đã bị phân hủy.

So sánh phương sai giữa các lô của chế phẩm N ở 45 phút, so sánh giá trị trung bình giữa các lô của chế phẩm N ở 45 phút.

Nhận xét: Sau 45 phút hàm lượng hoạt chất giải phóng từ các lô của chế phẩm N là khác nhau không có ý nghĩa ($t < t_{0,05}$) đạt tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam III nhưng không đạt tiêu chuẩn USP XXIII

So sánh phương sai giữa các lô của chế phẩm N ở 60 phút, so sánh giá trị trung bình giữa các lô của chế phẩm N ở 60 phút

Nhận xét: Sau 60 phút thì độ giải phóng hoạt chất các lô khác nhau, lô 1 và 2 khác nhau không có ý nghĩa ($t < t_{\alpha}$) nhưng lô 3 khác với lô 2 và lô 1. Như vậy, giữa các lô chưa có sự đồng đều.

Bảng 3.1.38. Hàm lượng (%) hoạt chất giải phóng chế phẩm S

	Mẫu	Lần 1	Lần 2	Lần 3	TB	S^2	RSD(%)
45 phút	S ₅	80,11	80,56	80,15	80,27	0,0620	0,31
	S ₈	70,44	70,03	70,44	70,30	0,0560	0,34
	S ₉	101,01	99,93	99,72	100,22	0,4791	0,69
	TB	83,60				0,1991	0,53
60 phút	S ₅	84,02	83,70	83,87	83,86	0,0256	0,19
	S ₈	75,85	73,45	73,57	74,29	1,8288	1,82
	S ₉	102,68	101,75	102,58	102,34	0,2606	0,50
	TB	86,83				0,7050	0,97

Nhận xét

- Trong môi trường acid, tất cả các viên đều nguyên vẹn trong suốt hai giờ, khi chuyển sang môi trường đệm phosphat thì các lô S₅, S₈ có một số viên chưa tan hết còn một ít bột thuốc trong giỏ, riêng S₉ tan hết.

-Các lô đạt tiêu chuẩn Dược điển III, nhưng S₅ không đạt tiêu chuẩn USP23

So sánh phương sai giữa các lô của chế phẩm S ở 45 phút, so sánh giá trị trung bình giữa các lô của chế phẩm S ở 45 phút

Nhận xét: Sau 45 phút hàm lượng hoạt chất giải phóng từ các lô của chế phẩm F là khác nhau có ý nghĩa ($t > t_{0,05}$).

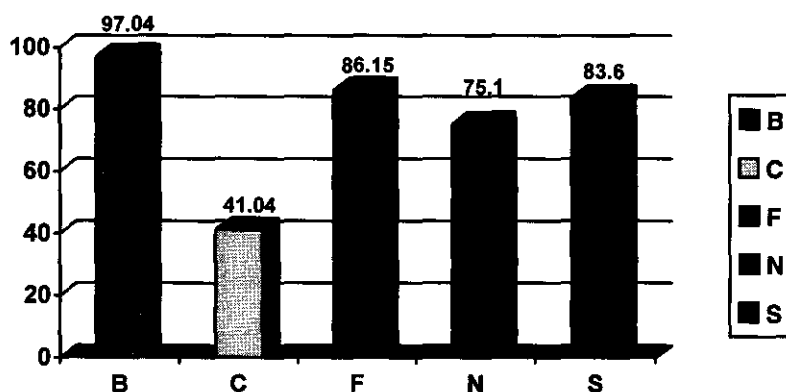
So sánh phương sai giữa các lô của chế phẩm S ở 60 phút, so sánh giá trị trung bình giữa các lô của chế phẩm S ở 60 phút.

Nhận xét: Khả năng giải phóng hoạt chất của chế phẩm nghiên cứu là khác nhau có ý nghĩa giữa các lô sản xuất. Vì đây là mẫu nghiên cứu, trong quá trình thay đổi các yếu tố để có độ giải phóng hoạt chất tốt hơn nhằm nâng cao chất lượng chế phẩm.

So sánh độ hoà tan giữa các chế phẩm

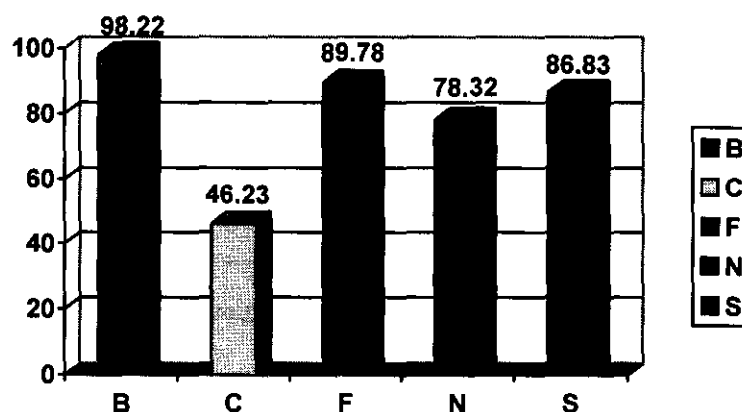
Bảng 3.1.39. Tóm tắt độ hoà tan của các chế phẩm

	B	C	F	N	S
45 phút	97,04	41,01	86,15	75,10	83,60
60 phút	98,22	46,23	89,78	78,32	86,83



Biểu đồ 3.1.2. Độ hoà tan của các chế phẩm ở 45 phút

Nhận xét: Độ hoà tan của các chế phẩm ở 45 phút là hoàn toàn khác nhau với $F = 13,1244 > F_{0,05} = 3,4781$



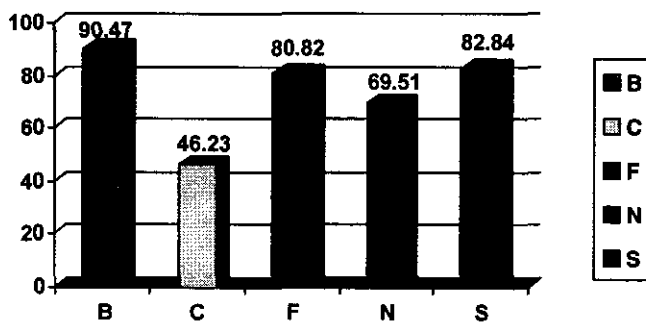
Biểu đồ 3.1.3. Độ hoà tan của các chế phẩm ở 60 phút

Nhận xét: Độ hoà tan của các chế phẩm ở 60 phút là hoàn toàn khác nhau với $F = 11,8013 > F_{0,05} = 3,478$

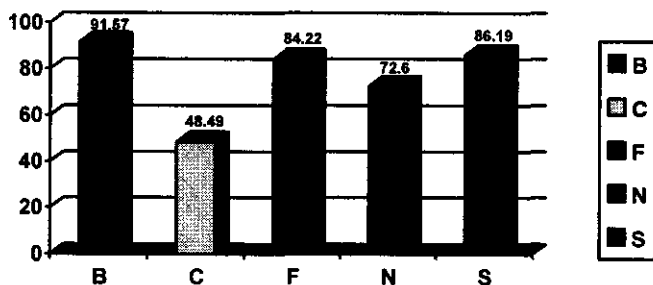
So sánh tỉ lệ hoạt chất giải phóng với hàm lượng của chế phẩm

Bảng 3.1.40. Tỉ lệ hoạt chất giải phóng so với hàm lượng

Mẫu		Lô 1	Lô 2	Lô 3	TB
B	45'	91,85	88,90	90,67	90,47
(%)	60'	92,79	90,15	91,76	91,57
C	45'	34,81	48,63	55,26	46,23
(%)	60'	34,87	50,23	60,36	48,49
F	45'	87,88	80,61	73,97	80,82
(%)	60'	91,88	83,13	77,65	84,22
N	45'	68,33	81,24	58,94	69,51
(%)	60'	72,54	85,41	59,84	72,60
S	45'	85,89	77,75	84,87	82,84
(%)	60'	89,73	82,16	86,67	86,19



Biểu đồ 3.1.4. Tỉ lệ % hoạt chất giải phóng so với hàm lượng của các chế phẩm ở 45 phút



Biểu đồ 3.1.5. Tỉ lệ % hoạt chất giải phóng so với hàm lượng của các chế phẩm ở 60 phút

Nhận xét .

- Tỷ lệ % hoạt chất giải phóng từ chế phẩm so với % định lượng là rất khác nhau giữa các lô trong cùng một nhà sản xuất. Có những chế phẩm chỉ giải phóng gần 50% lượng hoạt chất, cao nhất là 90%. Điều này phản ánh kỹ thuật bào chế cũng như thành phần và tỷ lệ tá dược giữa các nhà sản xuất lựa chọn là rất khác nhau. Mặt khác, tá dược bao và kỹ thuật bao cũng ảnh hưởng lớn đến khả năng giải phóng hoạt chất của chế phẩm. Đối với chế phẩm SER thì lớp bao có tác dụng bảo vệ, nhưng lớp bao càng dày thì hoạt chất càng khó giải phóng. Đây là một vấn đề cần quan tâm và nghiên cứu cải tiến để có một sản phẩm có chất lượng tốt.

Như vậy, sau khi khảo sát các thông số của thử nghiệm độ hoà tan và tiến hành khảo sát trên một số chế phẩm, chúng tôi đề nghị qui trình thử nghiệm độ hoà tan của chế phẩm chứa SER như sau:

• Môi trường acid hydrochloric 0,1N

- Thể tích: 1000ml
- Nhiệt độ: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Thiết bị: kiểu giỏ quay (loại I)
- Tốc độ quay: 120 vòng/phút
- Thời gian: 120 phút

Sau 120 phút ở môi trường acid, lập tức chuyển sang môi trường đệm phosphat pH $6,8 \pm 0,05$ tiếp tục với những viên trên

• Môi trường đệm phosphat pH $6,8 \pm 0,05$

- Thể tích: 1000ml
- Nhiệt độ: $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$
- Thiết bị: kiểu giỏ quay (loại I)
- Tốc độ quay: 120 vòng/phút
- Thời gian: 60 phút

Xử lý mẫu: Ở thời điểm lấy mẫu, lấy chính xác 20ml môi trường hoà tan. Lọc qua giấy lọc để được dịch lọc trong. Lấy chính xác 10ml dịch lọc pha loãng thành 20ml bằng dung dịch đệm borat pH $10,1 \pm 0,05$. Dung dịch sau khi pha loãng là dung dịch thử. Các bước tiếp tiến hành như phần định lượng

Đánh giá kết quả: Theo Dược điển Việt Nam III: sau 60 phút lượng hoạt chất giải phóng ở mỗi viên không nhỏ hơn 70%.

3.1.5. Khảo sát sự ổn định của nguyên liệu và chế phẩm SER

3.1.5.1. Kết quả khảo sát chất lượng nguyên liệu SER

Đã nghiên cứu một số chỉ tiêu cơ bản phục vụ công tác nghiên cứu với 4 mẫu nguyên liệu có xuất xứ rõ ràng, mã hoá ngẫu nhiên S1, S 2, S3A và S4.

Kết quả phân tích 1 số chỉ tiêu cơ bản của nguyên liệu SER

Chỉ tiêu phân tích	Mẫu S1	Mẫu S2	Mẫu S3A	Mẫu S4
Ngày sx:	20. 12. 01	10. 2001	6. 2001	29. 11. 03
Hạn dùng:	19. 12. 03	10. 2004	6. 2003	28.11.06
Hình thức	Bột trắng nhạt, mịn, mùi đặc biệt	Bột trắng hơi nâu, mịn, mùi đặc biệt	Bột kết tinh trắng, mịn, mùi đặc biệt	Bột trắng hơi nâu, mịn, mùi đặc biệt
Độ ẩm $\leq 7\%$	1,9	1,5	4,6	1,8
Hàm lượng (UI/ mg = %)	2650 ~132,50	2566 ~131,30	2642~132,10	2283,6~114,18
Ngày định lượng	23- 29 / 5 / 02	23- 29 / 5 / 02	23- 29/ 5/ 02	09/ 02/ 2004
Arsenic ≤ 5 ppm	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
Kim loại nặng ≤ 50 ppm	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
* Nhôm Al %	0,01	0,01	0,03	0,005
* Sắt Fe%	0,001	0,003	0,002	0,002
*Mangan Mn%	-	-	-	0,005
* Coban Co%	-	-	-	-
* Đồng Cu%	0,001	0,003	0,001	0,003
* Chì Pb	-	-	0,0005	-
* Kẽm Zn	0,003	0,003	0,002	0,003
Tổng (* lon có thể ảnh hưởng tới hoạt độ Ser %)	0,015	0,019	0,0355	0,018

Nhận xét

Về hàm lượng và hạn sử dụng: Tất cả các mẫu nguyên liệu đều đạt hàm lượng, với 2 mẫu đăng ký hạn dùng 2 năm S1, S3A, 2 mẫu đăng ký 3 năm S2,S4.

Về hình thức: 3/4 mẫu (S1, S2, S4) dạng bột mịn, màu trắng hơi ngả nâu, dễ bay bụi; 1 mẫu (S3A) bột kết tinh, màu trắng, cỡ hạt khoảng $\leq 0,125$ mm, dễ trơn chảy hơn 3 mẫu khác. Mùi vị đặc trưng.

Độ ẩm: Luôn đạt trạng thái bột khô, 3/4 hàm ẩm < 2%, 1 mẫu < 5%. Các mẫu đều rất háo ẩm, dễ hấp thu hơi nước, dính khối.

Một số ion có thể ảnh hưởng tới hoạt độ SER:

Ion kẽm Zn^{2+} gắn với phần hữu cơ trong enzym kiểu metalloprotease theo tỷ lệ lý thuyết 1 – 60.000 (0,00167 %). Ngoài ion kẽm, SER. còn được kích hoạt bởi các ion: Coban Co^{2+} và Mangan Mn^{2+} . Các ion kim loại đa hoá trị nhôm, sắt, mangan, đồng ...hiện diện trong các mẫu với nồng độ không giống nhau. Trong đó:

-Ion kẽm Zn^{2+} , giống nhau ở ¾ mẫu = 0,003%; mẫu S3A = 0,02 %,cao hơn gần 7 lần .

- Tổng hàm lượng 7 ion trong 3 mẫu S1,S 2 và S4 tương đối giống nhau (0,015 – 0,019 %), mẫu S3A cao hơn (0,0355 ppm) và hàm lượng nhôm Al cao hơn hẳn so với 3 mẫu còn lại (0,03 so với 0,005–0,001ppm).

3.1.5.2. Kết quả xây dựng mô hình đánh giá độ ổn định của SER

•Xây dựng mô hình đánh giá độ ổn định cấp tốc

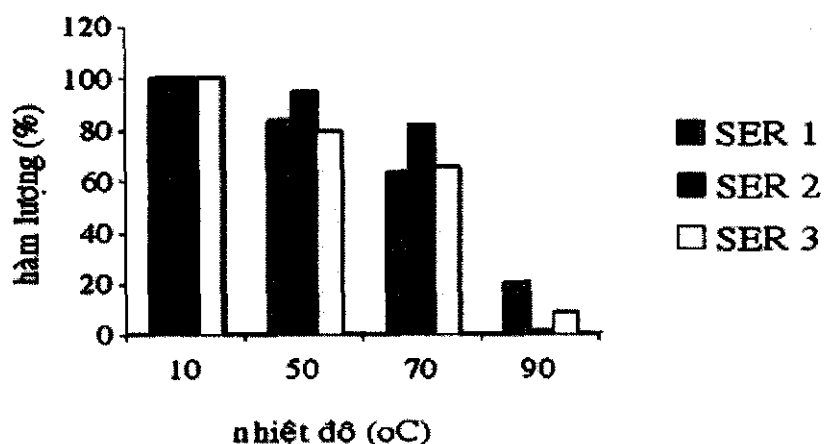
Sau nhiều nghiên cứu thăm dò,cho thấy độ ẩm làm hư hỏng hoạt chất nhanh nếu kết hợp với nhiệt độ cao trên 40°C, song khó xác lập được quy luật về ảnh hưởng phối hợp này. Do vậy nhiệt độ được sử dụng như là yếu tố trực tiếp, còn độ ẩm chỉ là yếu tố gián tiếp. Các thí nghiệm sau được tiến hành có kết quả:

Thí nghiệm 1 - Thử nghiệm với nguyên liệu:

-Điều kiện: Tác động ở nhiệt độ cao khác nhau: 50°C, 70°C, 90°C, trong thời gian: 4 giờ, độ ẩm = 0%(khan).Định lượng hoạt chất còn lại sau 1 giờ đến 4 giờ .

- Mẫu thí nghiệm:Cân chính xác khoảng 150 mg mỗi hoạt chất SER1, SER2 và SER3.Cho vào riêng vào từng lọ khô,sạch, không đóng nắp. Làm 3 mẫu như vậy cho mỗi hoạt chất. Để các chai mẫu vào bình khử ẩm chứa lượng đủ Silicagel đã được làm khan, đậy nắp bình thật kín. Đặt bình trong tủ điều nhiệt. Lấy mẫu định lượng sau thời gian quy định.

*Kết quả:xem bảng 3.1.41, bảng 3.1.42 và đồ thị biểu diễn .



Biểu đồ 3.1.6. Biểu đồ thay đổi hàm lượng SER dưới tác động của nhiệt độ cao 50→90°C, môi trường khan theo số liệu bảng 3.1.41

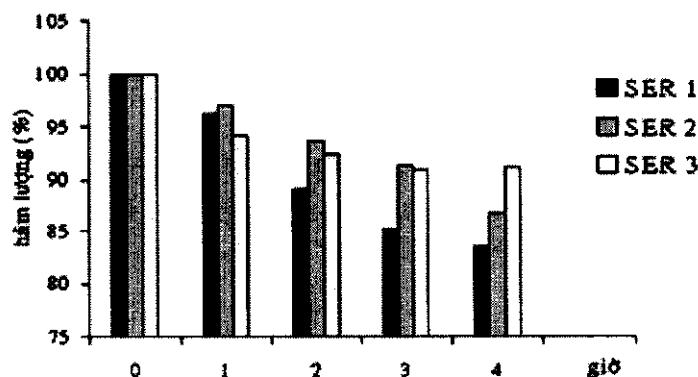
Bảng 3.1.41: Thay đổi hàm lượng SER dưới tác động của nhiệt độ cao 50→90°C, ở môi trường khan

Tỷ lệ % hoạt chất còn lại sau 4 giờ	Nhiệt độ		
	50°C	70°C	90°C
SER1	83,52	63,43	20,17
SER2	94,92	81,75	1,37
SER3	79,36	65,48	8,57

Nhận xét: Trong điều kiện gần như không có tác động của độ ẩm, thì nhiệt độ cao có tác động trực tiếp, làm giảm rõ rệt hàm lượng hoạt chất. Ở 50°C hoạt chất giảm trung bình 13,24 %, nếu tăng lên 90°C hoạt chất giảm tới 89,96 % trong 4 giờ.

Bảng 3.1.42. Sự thay đổi hàm lượng SER theo thời gian ở nhiệt độ 50°C, môi trường khan

Mẫu	SER 1	SER 2	SER 3	Tỷ lệ giảm %
1 giờ	96,23 (3,77)	97,03 (2,97)	94,19 (5,81)	4,18
2 giờ	89,05 (10,95)	93,65 (6,35)	92,30(7,7)	8,33
3 giờ	85,23 (14,77)	91,26 (8,74)	90,92 (9,02)	10,84
4 giờ	83,52(16,48)	86,69(13,31)	90,08(9,92)	13,24



Hình 3.1.7. Biểu đồ sự thay đổi hàm lượng SER theo giờ dưới tác động của nhiệt độ 50°C, môi trường khan

- Ở 50°C, hoạt chất giảm trung bình 4,18% sau giờ đầu tiên, đến 13,24 % sau 4 giờ. Nhiệt độ 50°C được chọn đánh giá nhanh chất lượng nguyên liệu và thành phẩm chứa ser. Vì ở nhiệt độ này tốc độ phân huỷ đủ để so sánh và kết quả định lượng đủ độ tin cậy. Ở nhiệt độ cao 70 – 90°C sản phẩm phân huỷ phức tạp hơn, gây khó khăn cho phản ứng với thuốc thử và đo quang phổ UV- VIS trong định lượng.

Thí nghiệm 2: Thử nghiệm với chế phẩm

*Điều kiện: Tác động ở 50°C, độ ẩm $60 \pm 5\%$, thời gian theo dõi kéo dài, kết thúc thí nghiệm khi hoạt chất giảm khoảng 90 % .

*Mẫu thí nghiệm: Viên bao A1, A4 và A9. Các vỉ thuốc nguyên vẹn được đặt trong tủ vi khí hậu có nhiệt độ, độ ẩm quy định. Mẫu được chọn do có sự tương đồng về 1 số yếu tố tại thời điểm lấy mẫu: hàm lượng hoạt chất đạt quy định, lớp bao, bao bì, vỉ

nhôm chống ẩm, thời hạn sử dụng, Định lượng hoạt chất sau 10, 20, 30, ngày.

*Kết quả: Các kết quả định lượng cho thấy hoạt chất giảm trên 40% trong vòng 10 ngày đến trên 80% ở thời điểm khoảng 30 – 40 ngày .

Bảng 3.1.43. Thay đổi hàm lượng viên SER dưới tác động ở 50°C, độ ẩm 75%.

Mẫu	A1	A4	A9
Tỷ lệ %hoạt chất còn lại sau 10 ngày → giảm trung bình <u>43,73%</u>	55,07	52,80	60,93
Tỷ lệ %hoạt chất còn lại sau 20 ngày → giảm trung bình <u>61,93 %</u>	32,41	41,91	39,87
Tỷ lệ %hoạt chất còn lại sau 30 ngày. → giảm trung bình <u>86,35 %</u>	13,66	12,26	15,03

Nhận xét:

-Độ ẩm cao 60-70% ít tác động trực tiếp trong trường hợp thuốc được bao chống ẩm và đóng trong bao bì kín như vỉ nhôm hoặc chai.

Do bao bì có khả năng bảo vệ nên sự giảm hàm lượng hoạt chất chủ yếu tác động bởi nhiệt độ cao, nhưng giảm chậm hơn nhiều so với trực tiếp trên nguyên liệu như ở thí nghiệm 1-

Vậy có 2 cách để đánh giá cấp tốc độ ổn định của SER:

- Với nguyên liệu hoặc bán thành (cốm, viên nén chưa bao): Đặt trong môi trường khan, nhiệt độ cao 50°C kéo dài ít nhất 4 giờ, định lượng xác định sự giảm hoạt chất theo từng giờ .

- Với thành phẩm (viên bao, hạt bao, đóng gói trong bao bì hoàn chỉnh): Đặt trong môi trường độ ẩm = $60 \pm 5\%$, nhiệt độ cao 50°C kéo dài từ 10 ngày đến 30 ngày, định lượng xác định sự giảm hoạt chất từng 10 ngày .

•Đánh giá ở điều kiện thường

Thử nghiệm này nhằm xác định tuổi thọ của nguyên liệu hoặc thành phẩm trong điều kiện tương tự điều kiện tự nhiên có lựa chọn mà quy định hiện hành cho phép so sánh với thử nghiệm cấp tốc.

Ở Tp Hồ Chí Minh và Việt nam nói chung thuộc khu vực nóng ẩm: nhiệt độ = $30 - 35^{\circ}\text{C}$, độ ẩm = 70-75 % thuốc dễ bị hư hỏng, nhất là hoạt chất nhạy cảm với nhiệt như nguyên liệu đang nghiên cứu. Nên chọn 2 điều kiện: có khống chế nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm = $60 \pm 5\%$ và nóng ẩm để theo dõi, so sánh.

Thí nghiệm 3 - Thử nghiệm với nguyên liệu:

Thí nghiệm 3A:

-Điều kiện: môi trường khống chế nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm = $60 \pm 5\%$. Định kỳ 6 tháng 1 lần lấy mẫu kiểm nghiệm.

Mẫu thí nghiệm 3B: Thiết lập các mẫu thí nghiệm SER1, SER2, SER3 như cách làm ở thí nghiệm 1, nhưng các chai đựng nguyên liệu thử nghiệm phải đậy nắp kín, chống ẩm. Lấy mẫu định lượng sau thời gian quy định.

Thí nghiệm 3B: Điều kiện nóng ẩm tương tự vùng nhiệt đới: nhiệt độ ~ $30 - 35^{\circ}\text{C}$, độ ẩm ~ 70 -75 %. Lấy mẫu định lượng sau thời gian quy định.

Mẫu thí nghiệm 3 B: Làm giống Mẫu thí nghiệm 3A. Kết quả

Bảng 3.1.44. Thay đổi hàm lượng SER trong điều kiện khống chế $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ độ ẩm $60 \pm 5\%$ Thí nghiệm 3A

Hàm lượng	<u>SER1</u>	<u>SER2</u>	<u>SER3</u>	Tỷ lệ giảm trung bình
Ngày sx:	12. 2001	10. 2001	6. 2001	
Hạn dùng:	12. 2003	10. 2004	6. 2003	
Ban đầu	2650 UI/ mg	2566 IU / mg	2642 IU / mg	
Định lượng lần 1	137,50%	131,30%	132,10%	0
Ngày tháng năm	25.01.2002	25.01.2002	25.01.2002	
Định lượng lần 2	129,45%	128,07 %	129,86%	X
Ngày tháng năm	23- 29/5/ 02	23- 29 / 5 / 02	23- 29/ 5/ 02	
Định lượng lần 3	101,42%	122,16 %	125,31	x
Ngày định lượng	20.3.2003	10.9.2002	10.9.2002	
Định lượng lần 4	85,82 %	~101,74%	96,16%	x
Ngày định lượng:	20.7.2003	20.7.2003	13.8.2003	
Thời gian bảo quản	~ 19 tháng	~ 21 tháng	~ 26 tháng	
Tỷ lệ giảm % / tháng	2,72	1,41	1,38	1,84

***Nhận xét:**

-Trong thử nghiệm 3A điều kiện khống chế nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm = $60 \pm 5\%$, tốc độ giảm hàm lượng hoạt chất trung bình 1,8% / tháng, so với 2,17 % trong thử nghiệm 3B (nóng ẩm, nhiệt độ ~ $30 - 35^{\circ}\text{C}$ độ ẩm ~ 70 -75 %).

Bảng 3.1.45. Thay đổi hàm lượng SER trong điều kiện *thường* 30-35 °C độ ẩm 70-75 %.Thí nghiệm 3B

Hàm lượng	SER1	SER2	SER3	Giảm trung bình
Ngày sx:	12. 2001	10. 2001	6. 2001	
Hạn dùng:	12. 2003	10. 2004	6. 2003	
Ban đầu	2650 UI/ mg	2566 IU / mg	2642 IU / mg	
Định lượng lần 1	137,50%	131,30%	132,10%	0
Ngày tháng năm	25.01.2002	25.01.2002	25.01.2002	
Định lượng lần 2	127,11%	126,47 %	126,78 %	x
Ngày tháng năm	23- 29 / 5 / 02	23- 29 / 5 / 02	23- 29/ 5/ 02	
Định lượng lần 3	85,32%	119,21 %	123,50 %	x
Ngày định lượng	20.3.2003	10.9.2002	10.9.2002	
Định lượng lần 4	77,83 %	96,23%	92,02%	x
Ngày định lượng:	20.7.2003	20.7.2003	13.8.2003	
Thời gian bảo quản	19 tháng	~ 21 tháng	~ 26 tháng	
Tỷ lệ giảm % / tháng	3,14	1,67	1,54	2.17

Số liệu ở 2 thí nghiệm 3A và 3B có thể dự đoán thời gian ổn định hay thời hạn sử dụng (Hsd) của các mẫu nguyên liệu như sau:

Bảng 3.1.46. Dự đoán thời gian ổn định hay hạn sử dụng (Hsd):

Tên mẫu	Hsd đăng ký (tháng)	Hsd theo thử nghiệm T=25 ± 2°C, H= 60±5 %	Hsd theo thử nghiệm T= 30-35°C, H~ 70 -75 %.
S1	24	15-16	13,5
S2	36	~ 31	24,7
S3	24	~ 31	27,3

-Trong cả 3 thí nghiệm cho thấy mẫu S3 bền vững hơn cả xét về cả số liệu nghiên cứu và việc nhà sản xuất đăng ký hạn dùng là 24 tháng là hợp lý, còn S3 đạt 24-31 tháng, nhưng chưa đạt 36 tháng như đăng ký, mẫu S1 không đạt 24 tháng .

-Như vậy chất lượng nguyên liệu khác nhau khá rõ ràng và tốc độ giảm hàm lượng tự nhiên trong bảo quản là đặc tính cần chú ý trong chọn nguồn cung cấp và trong bào chế.

Thí nghiệm 4 - Thử chống ẩm của lớp bao

Điều kiện tương tự xử nóng ẩm: độ ẩm ~ $70 \pm 5\%$, nhiệt độ ~ $30 - 35^{\circ}\text{C}$. Lấy mẫu, cân xác định lượng ẩm viên đã hấp thu sau thời gian quy định.

Mẫu thí nghiệm: Các mẫu viên A1, A4, và A, bóc bỏ vỉ, chọn mỗi mẫu 20 viên. Đặt trong môi trường thử, theo dõi khả năng hút ẩm của viên trong 10 – 30 ngày .Kết quả

Bảng 3.1.47. Tỷ lệ tăng khối lượng (bóc bỏ vỉ, cho tiếp xúc ẩm, nhiệt)

Khối lượng viên – Thời gian	Viên A1	Viên A4	Viên A9	Tăng tb
K.lượng ban đầu 20 viên ($20 \times m_{\text{viên}}$)	3,158 ($m=0,1579$)	5,706 ($m=0,2853$)	2,256 ($m=0,1128$)	00
K. lượng sau 10 ngày (Tỷ lệ % tăng k.lượng)	3,160 (0,071%)	5,7085 (0,043%)	2.258 (0,069%)	0,061%
K.lượng sau 20 ngày (Tỷ lệ % tăng k.lượng / cộng dồn)	3,167 (0,294%)	5,7223 (0,287%)	2.263 (0,302%)	0,294%
K.lượng sau 30 ngày (Tỷ lệ % tăng k.lượng / cộng dồn)	3,184 (0,821%)	5,7397 (0,590%)	2.274 (0,790%)	0,734%

Nhận xét: Khả năng chống ẩm của các mẫu thể hiện qua lượng ẩm hấp thu < 1 %.Thí nghiệm này cho biết khả năng chống ẩm của 3 chế phẩm ngoại nhập đang lưu hành, được dùng để so sánh trong nghiên cứu mẫu thuốc mới.

Vậy để chống ẩm cho viên, giúp cho hoạt chất bền vững nhất là những chất nhạy cảm như enzyme SER thì phải cần phối hợp cả 3 điều kiện: lớp bao, bao bì và điều kiện bảo quản.

***NHẬN XÉT VÀ BÀN LUẬN:**

Có thể áp dụng 4 thử nghiệm để nghiên cứu độ ổn định của nguyên liệu bán thành phẩm và thuốc thành phẩm chứa SER:

•Thử nghiệm đánh giá nhanh hoạt chất và bán thành phẩm:

*Thử nghiệm có điều kiện: Nhiệt độ 50°C và môi trường khan thích hợp để khảo sát độ ổn định của SER.dưới dạng nguyên liệu hay bán thành phẩm: cốm,viên chưa bao.Nhiệt tác động trực tiếp làm tăng tốc độ phân hủy hoạt chất như mô hình đề nghị giúp theo dõi đánh giá nhanh công thức thuốc trong nghiên cứu bào chế thuốc mới.

• Thử nghiệm đánh giá nhanh chất lượng thành phẩm

Thử nghiệm có điều kiện: Nhiệt độ 50°C, độ ẩm 60 ± 50% và thời gian 10 – 30 ngày. Viên bao thành phẩm cần có khả năng chống ẩm và bao bì phải kín tuyệt đối giúp hoạt chất SER chống được tác động của độ ẩm, nhưng vẫn chịu tác động của nhiệt.

• Thử nghiệm xác định độ ổn định của thuốc thành phẩm theo 2 điều kiện:

-Thử nghiệm điều kiện khống chế: nhiệt độ ở 25 ± 2°C, độ ẩm = 60 ± 5 %, theo dõi hàm lượng hoạt chất, xác định hạn sử dụng thuốc .

-Thử nghiệm ở điều kiện nóng ẩm: Đặt mẫu trong độ ẩm ~ 70 -75%,nhiệt độ ~ 30 - 35°C, tương tự điều kiện nóng ẩm xứ nhiệt đới.

-Áp dụng đánh giá khả năng chống chống ẩm của lớp bao: viên bao không đóng gói kín, theo dõi khối lượng viên trong 10 – 30 ngày .Yêu cầu: mẫu không hấp thu hơi ẩm, làm tăng khối lượng viên > 1% .

-Áp dụng để theo dõi hàm lượng hoạt chất, xác định hạn sử dụng thuốc: thành phẩm trong bao bì kín,chống ẩm. Định kỳ 6 tháng 1 lần lấy mẫu kiểm nghiệm.

3.1.6. Nghiên cứu bào chế viên bao phim Ser tan trong ruột

3.1.6.1. Xây Dựng Công Thức Viên Nhân

Viên được thử nghiệm theo 2 bước: thăm dò công thức và thực nghiệm tối ưu hoá công thức.Hoạt chất:mẫu SER S2,hàm lượng 2447UI ~122,35%

• Bước 1: Các công thức thử nghiệm cơ bản

Công thức F1 (Công thức cho 2000 viên)		Công thức F2 (Công thức cho 2000 viên)	
1-Serrapepdase	10 g	1-Serrapepdase	10 g
2-Avicel PH 102	65 g	2-Avicel PH 102	65 g
3-Tinh bột	235 g	3-Lactose	47 g
4-Magie stearat	10 g	4-Tinh bột	188 g
*Quy trình: Kỹ thuật dập trực tiếp.		5-Magie stearat	10 g
*Tiến hành: Sấy tá dược ở 50°C.		6-Chất phụ 1vừa đủ	320 g
Trộn đồng lượng Ser. và Avicel trong phòng điều nhiệt 20–25°C,độ ẩm 50 ± 5%.Trộn Avicel còn lại với tinh bột. Phối hợp 2 bột kép và magie stearat.		*Quy trình: Kỹ thuật dập trực tiếp.	
		*Tiến hành: -Sấy tá dược ở 50°C.	
		-Trộn đồng lượng Ser. với chất phụ rồi với Avicel trong phòng điều nhiệt 20–25°C,độ ẩm 50 ± 5%.Trộn Avicel còn lại với tinh bột, lactose. Phối hợp 2 bột kép và magie stearat.	

Công thức F3 (Công thức cho 2000 viên)		Công thức F4 (Công thức cho 2000 viên)	
1-Serrapepdase	10 g	1-Serrapepdase	10 g
2-Povidone K 30	16 g	2-Avicel PH 102	65 g
3-Lactose	47 g	3-Lactose	47 g
4-Tinh bột	227 g	4-Tinh bột	188 g
5 Nước cất	vừa đủ	5- Hồ tinh bột 10% --- ----	vừa đủ
6-Magie stearat	10 g	6-Magie stearat	10 g
7-Chất phụ 2.....	vừa đủ 320 g	7-Chất phụ 3	vừa đủ 320 g
*Quy trình -Xát hạt từng phần:		* Quy trình -Xát hạt từng phần:	
*Tiến hành:		*Tiến hành:	
-Chuẩn bị hạt: Cân, trộn đều lactose, tinh bột, Povidone. Thêm nước vừa đủ ẩm. Xát hạt qua lưới 1 mm. Sấy khô cốm ở 50°C, tới độ ẩm < 0,5%.Sửa hạt qua rây 0,45 mm.		-Chuẩn bị hạt: Cân, trộn đều lactose, tinh bột. Thêm hồ tinh bột vừa đủ ẩm. Xát hạt qua lưới 1 mm. Sấy khô cốm ở 50°C, tới độ ẩm < 0,5%.Sửa hạt qua rây 0,45 mm.	
-Trộn bột kép: Cân,trộn đều Ser. và với chất phụ,trong phòng điều nhiệt 20–25°C,độ ẩm 50 ± 5%. Thời gian trộn 5 - 7 phút.		-Trộn bột kép: Cân,trộn đều Ser. và chất phụ rồi với Avicel trong phòng điều nhiệt 20–25°C,độ ẩm 50 ± 5%.	
-Phối hợp bột kép với cốm và magie stearat, trong 2 phút		-Phối hợp bột kép với cốm và magie stearat.	
.-Dập viên: Chày Φ = 7mm, xác định khối lượng viên,độ cứng,độ rã viên .		-Dập viên: Chày Φ = 7mm, xác định khối lượng viên,độ cứng,độ rã viên .	

Công thức F (Công thức cho 2000 viên)

1-Serrapepdase	10 g	2 - Povidone K 30	16 g
3 -Lactose	230 g	4 - Tinh bột	44 g
5 - Magie stearat	10 g	6 - Chất phụ 4	vừa đủ 320 g

*Quy trình -Xát hạt từng phần:

*Tiến hành: Chuẩn bị hạt: Cân, trộn đều lactose, tinh bột, povidone. Thêm nước vừa đủ ẩm. Xát hạt qua lưới 1 mm. Sấy khô cốm ở 50°C, tới độ ẩm ≤0,5%.Sửa hạt qua rây 0,45 mm.

-Trộn bột kép: Cân,trộn đều SER.với với chất phụ trong phòng điều nhiệt 20–25°C,độ ẩm 50 ± 5%.

-Phối hợp bột kép với cốm và magie stearat.

-Dập viên: Chày $\Phi = 7\text{mm}$, xác định khối lượng viên, độ cứng, độ rã viên.

Kết quả: Thông số cơ bản của viên nhân F1 – F5 xem bảng:

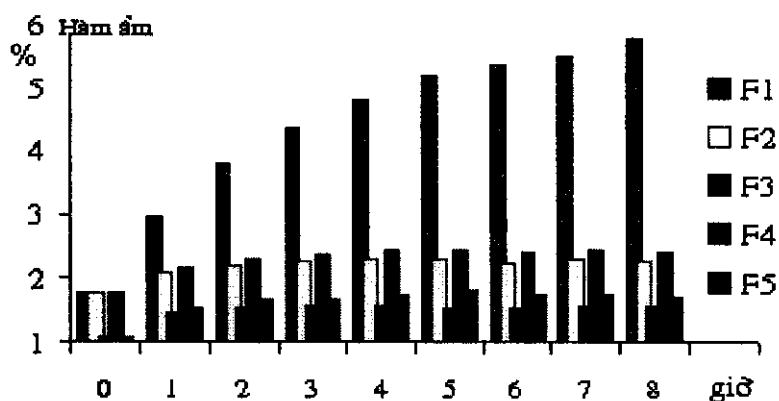
Bảng 3.1.48. Thông số cơ bản của các viên nhân.

STT	Yêu cầu	F1	F2	F3	F4	F5
1	Khối lượng viên $160\text{mg} \pm 7,5\%$ (148 – 172mg)	148 -160	157 - 165	165 -170	152 –171	164 –170
2	Hàm lượng ser. dự kiến %/ viên	117,76	123,11	128,08	123,88	127,70
3	Hàm lượng thực tế %/ viên	109,83	119,21	123,80	118,89	121,86
4	Mức giảm hàm lượng giai đoạn dập viên (%)	6,09	5,17	3,34	4,03	4,57
5	Độ cứng $\geq 5\text{kg/cm}^2$	2,5 - 3	3,5 - 4	3,5 -4	5 – 5,5	4,5 – 5
6	Độ rã < 5 phút	5 – 7	3 – 4	2 – 4	4 – 5	5 – 7
7	Độ mài mòn $\leq 0,5\%$	3,1 – 4,5	1,25 -1,5	1,1 –1,25	0,45-0,75	0,35-0,61

-Đánh giá độ ổn định hoạt chất

Áp dụng mô hình đánh giá nhanh khả năng bảo vệ hoạt chất qua 2 thông số chính: chống ẩm, kháng nhiệt - ổn định hoạt chất.

Khả năng chống ẩm của cốm: đặt cốm trong môi trường có độ ẩm $60 \pm 5\%$ trong 8 giờ. Định lượng hàm ẩm sau thực nghiệm. Cốm có thể hút 1,03- 5,45% nước – xem biểu đồ 3.1.8 .



Hình 3.1.8: Tỷ lệ nước (hàm ẩm) do các mẫu cốm hấp thu .

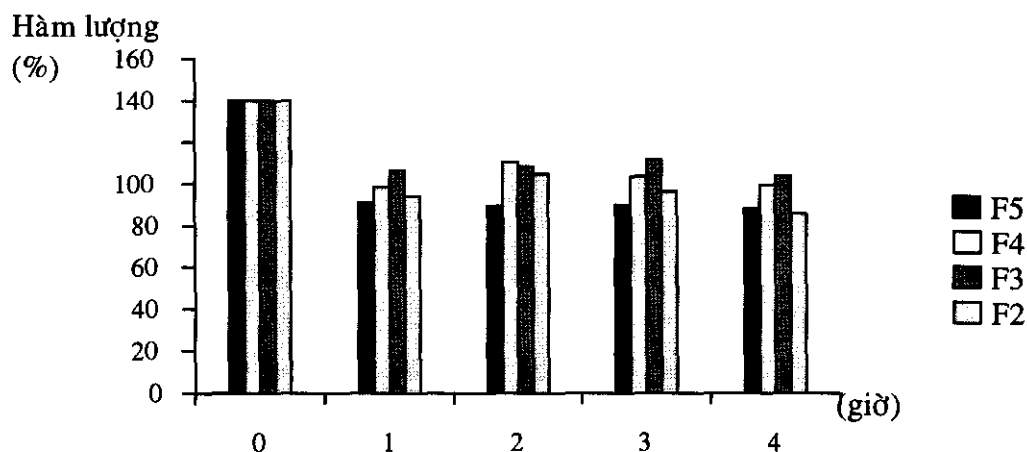
-Mẫu F1 có nhiều thông số không đạt, coi như bị loại, không tiếp tục sử dụng trong các đánh giá tiếp theo.

-Công thức F4 & F5 có các thông số cơ lý tốt hơn các mẫu khác,nhất là độ rã viên,chống ẩm..

-Từ nghiên cứu thăm dò cho thấy có thể sử dụng cặp tá dược độn lactose – tinh bột theo các tỷ lệ biến đổi khác nhau từ 1- 4 (F2) đến 5–1 (F5) để thiết kế công thức viên nhân SER .

* Độ bền của hoạt chất:

Định lượng hoạt chất trong viên nhân đặt ở 50°C,theo giờ, xem biểu đồ 3.1.9.



Hình 3.1.9: Biến đổi hàm lượng hoạt chất của cốm F2- F5 .

***Nhận xét:**

- Khả năng chống ẩm của cốm xếp theo thứ tự F3 > F5 > F2 > F4> F1 và kháng nhiệt bảo vệ hoạt chất tốt nhất với F3 > F4 . Đặc tính này tạo ra bởi các yếu tố cơ lý và chất phụ khác nhau trong mỗi công thức, trong đó chất phụ 3 bảo vệ hoạt chất tốt nhất.

- Tỷ lệ hoạt chất bị giảm trong khâu dập viên trung bình 4 % .

- Độ mài mòn chưa đạt yêu cầu cho viên nhân để bao < 0,5%,cần cải thiện bằng thực nghiệm tối ưu hóa công thức .

- Các thông số chủ yếu của công thức F3 F4, F5 được sử dụng để khảo sát tối ưu hoá viên nhân.

Bước 2: Nghiên cứu tối ưu hóa công thức viên nhân:

Áp dụng lý thuyết quy hoạch thực nghiệm ở các mức cơ bản của tá dược:

- Gọi Y là độ cứng của viên SER
- Gọi X1 là tỷ lệ tinh bột – lactose là yếu tố biến thiên 1: 4 → 5:1 .
- Gọi X2 là tỷ lệ tá dược dính trong công thức.
- Các yếu tố cố định: Lượng chất phụ, tá dược trơn magie stearat, Khối lượng cốm 320g / mẻ nghiên cứu 2000 viên, khối lượng viên 160 mg $\pm$ 7,5 %

Kết quả & Nhận xét:

- Yếu tố X1 ảnh hưởng đến độ cứng viên theo hướng tăng lượng lactose so với tinh bột trong hỗn hợp.
- Lượng povidone tăng có thể làm giảm độ cứng, thậm chí làm cốm dễ bị ẩm. Lượng Povidone 5% là lượng tối đa trong công thức.
- Các nghiên cứu hoàn thiện theo hướng tìm tỉ lệ tinh bột – lactose thích hợp và tìm vùng cực trị của hỗn hợp để tăng độ cứng, tăng khả năng rã, phóng thích hoạt chất được hoàn thiện với công thức viên nhân sau đây:

***Công thức viên nhân SER 5mg - cho 2000 viên:**Ký hiệu M1.

1-Serrapepdase	10 g	2 - Povidone K 30	14,8 g
3 -Lactose	235 g	4 - Tinh bột	39,0 g
5 - Magie stearat	8 g	6 - Chất phụ 3 vừa đủ	320,0 g (=13,2 g).

Quy trình -Xát hạt từng phần → cốm trở đến độ ẩm # 0,5%.Trộn hoạt chất,chất phụ trong máy trộn kiểu hành tinh,thời gian trộn 7 – 8 phút.Lấy mẫu để định lượng hoạt chất, xác nhận sự đồng đều của cốm.

-Dập viên: chày khum 7 mm, khối lượng viên 160 mg.

-Tiêu chuẩn cơ học: độ cứng ~6,5 Kf, độ rã viên < 5 phút,độ mài mòn # 0,5 %,độ ẩm 2 %.

-Hàm lượng hoạt chất = 12.125UI / viên ~121,25%.

-Viên nhân được bao thử nghiệm.

3.1.6.2.Bao Viên

Các thử nghiệm cơ bản: Đã sử dụng một số công thức bao viên tan trong ruột chứa Eudragit L100 và các tá dược hỗ trợ: CAP, Shellac,PEG 4000, PEG 6000,trong dung môi:ethanol, aceton, isopropanol,propylen glycol,...

Thực nghiệm ở các mức cơ bản của Eudragit L100 = 8,2 % và các chất phụ có nồng độ biến đổi. Một công thức với 3 yếu tố biến đổi DEP = x_1 ,CAP = x_2 và Shellac = x_3 cũng được khảo sát so sánh thông qua mô hình “D-Optimal” thiết kế bởi phần mềm Design-Expert 6.0 để tối ưu hoá công thức.

Các số liệu nghiên cứu được thu thập thống kê xử lý theo MS Excel .

***Kết quả:**

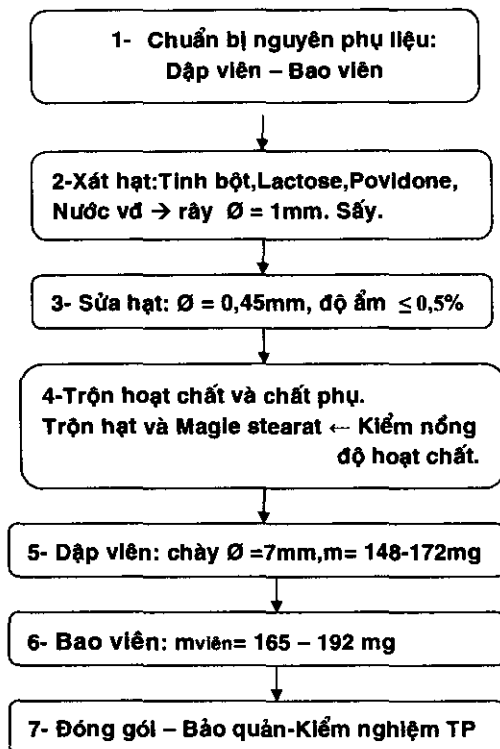
-Công thức bao phim:

- | | |
|---|---------------|
| 1-Eudragit L100 | 8,85% |
| 2-CAP | 1,46% |
| 3-Chất làm trơn PEG 4000 & 6000 ... | Vừa đủ . |
| 4-Màu Sunset yellow, chất phụ | Vừa đủ . |
| 5-Hỗn hợp dung môi: Aceton, Isopropanol, Ethanol | vừa đủ 100% . |

-Tiến hành:

- Pha dịch bao:Cân đong các tá dược,dung môi. Hoà tan CAP trong aceton. Ngâm Eudragit L100 trong cồn Isopropanol-ethanol cho trương nở, khuấy tan. Hoà tan PEG trong cồn ethanol trên cách thuỷ 70°C.Phối hợp các dịch và thêm phẩm màu,khuấy đều. Hàm lượng chất khô của dịch bao = 11,36 %.
- Bao viên: Viên nhân (2000 viên) loại sạch bụi,cho vào nồi bao.Tốc độ quay 20 – 25 vòng phút sao cho viên chuyển động đều trong nồi. Phun dịch bao qua đầu phun, áp suất 2 kg / cm² luôn khuấy đều dịch bao.Thổi gió ở nhiệt độ thường hoặc mát,khô. Bao liên tục khi lớp bao đạt độ dày tương đương với khối lượng viên 176 – 182 mg, tăng 10,47 – 11,52 %.Thời gian bao khoảng 150 phút. Kết thúc bao viên,chọn bỏ viên không đạt yêu cầu.
- Đóng chai nhãn 50 viên hoặc vỉ 10 viên,xem Tóm lược Quy Trình Bào Chế .
- **Kết quả:** Viên thành phẩm đạt tiêu chuẩn kỹ thuật sau:
 - Hình thức: Viên có màu vàng sáng đều, mặt viên tương đối nhẵn.
 - Độ cứng viên: 8 – 8,4 kf.
 - Đồng đều khối lượng viên: đạt 177mg ± 7,5 %.
 - Hàm lượng hoạt chất: 10.097,03 UI ~ 109,70 %.
 - Độ rã viên: không tan trong dịch pH =1 và tan trong dịch pH= 6,8: 25 phút.
 - Độ hoà tan: đạt 75,61% ở 45 phút và 81,30 % ở 45 phút .

Tóm Lược Quy Trình Bào Chế



Nhận xét:- Từ Quy trình,các thủ thuật, thông số quan trọng đã được thiết lập sơ bộ:

-Cổm trợ: Kích thước cổm 0,45 mm, độ ẩm 0,5%.

-Thời gian trộn bột kép = 7 phút: hoạt chất đạt độ đồng đều, cổm có độ trơn chảy tốt,phân liều đều.

-Biến đổi hàm lượng hoạt chất theo từng chặng của quy trình được ghi nhận qua kiểm nghiệm.

Theo mức giảm hàm lượng trong quá trình bào chế và mức giảm tự nhiên trong bảo quản của hoạt chất S2 (dự đoán) là 40% trong 24 tháng,nên khi sản xuất phải bù hàm lượng khoảng 55 % để đảm bảo hàm lượng 90 % trong thời hạn sử dụng.

Bảng 3.1.49. Biến đổi hoạt chất Ser. theo từng giai đoạn của quy trình

Stt	Giai đoạn	Nồng độ / Hàm lượng		Biến đổi % giảm
		Dự kiến	Thực tế	
1	Trộn bột kép, cổm	3,125% ~74,47 UI/ mg	~ 74,47	~ 00
2	Dập viên	12.278 IU/ viên	11.925 IU / viên	2,87
3	Bao viên	11.925 IU / viên	10.786 IU /viên	12,15
4	Tổng giảm hàm lượng.....			15,02%

*Tỷ lệ khối lượng viên nhân - dịch bao (W/V):1– 2,05 lần, hiệu suất bám dính tá dược bao viên đạt khoảng 97 %.

*Thành phẩm đạt các tiêu chuẩn cơ bản của Dược điển Việt nam.

*Các thông số cơ bản của quy trình là điều kiện để triển khai nghiên cứu pilot với khối lượng viên và số lô / mẻ nhiều hơn để khảo sát chính xác hơn các thông số đã thăm dò. Các thông số quan trọng cần tiếp tục khảo sát để điều chỉnh, ổn định quy trình:biến đổi hàm lượng hoạt chất trong quá trình bào chế,độ đồng đều hàm lượng,tính đồng đều giữa các lô bào chế,hiệu quả sử dụng tá dược bao viên,...

3.8.3 .Thử Nghiệm Pilot:

Thử nghiệm 3 mẫu thành phẩm, cỡ 10.000 viên /mẻ để đánh giá các thông số liên quan, hướng tới áp dụng vào thử nghiệm pilot công nghiệp.

***Công thức viên nhân:** cho 10.000 viên ~ 1600 g.

Bảng 3.1.50. Công thức viên nhân SER cho bào chế pilot

Thành phần	Cho 1 viên	Cho 1 mẻ =10.000 viên
Serrapeptase*	5,935 mg	59,35 g (3,70940 %)
PVP	7,4 mg	74,00 g (4,6250 %)
Lactose	117,5 mg	1175,00 g (73,4375 %)
Tinh bột	19,5 mg	195,00 g (12,1875 %)
Magnesi stearat	4,0 mg	40,00 g (2,5000 %)
Chất phụ	5,6 mg	56,65 g (3,5410 %)
Dập viên 160 mg ± 7,5 %	148 – 172 mg	148 – 172 mg

Ghi chú: Hoạt chất S2 sử dụng tại thời điểm tháng 9 năm 2002 có hàm lượng 122,157 %. Để bù hàm lượng theo dự đoán cần tăng 55% đơn vị hoạt lực so với hàm lượng tối thiểu giúp viên đạt hàm lượng 145 % =14.500 UI / viên trước khi dập viên.

Dịch bao phim: cho 1 mẻ 10.000 viên ~ 1,6 kg nhân

Bảng 3.1.51. Công thức dịch bao phim cho mẻ pilot

Thành phần	Khối lượng	Tỷ lệ
1- Eudragit L100	290,28 g	8,85 %
2- CAP	47,888 g	1,46%
3- Chất làm trơn PEG 4000 & 6000 ... V d		11,36 %.
4- Màu Sunset yellow, chất phụ Vd .		
5- Dung môi:Aceton, Isopropanol,Ethanol Vd.	3280 ml	100% (KL/TT)

-Tiến hành:

Đã thực hiện 3 mẻ nghiên cứu, ký hiệu: M2, M3 và M4 từ ngày 10/9/2002.

Tiến trình bào chế áp dụng như mô tả ở trên.

Viên thành phẩm được đóng vỉ 10 viên hoặc trong chai 50 viên nút kín, chống ẩm.

Các kết quả được ghi nhận.

- **Thông số của bán thành phẩm:** xem bảng 3.1.52.

Bảng 3.1.52. Phân bố cỡ hạt (mm) và tốc độ chảy Tđc (g / s) và độ ẩm % của cốm

Lô / mẻ	Cỡ hạt (mm)					Tđc	Độ ẩm
	≥ 0,125	≥ 0,180	≥ 0,355	≥ 0,710	>0,710	g/s	%
M2	9,86	25,83	55,19	9,12	0	12,80	1,57
M3	10,59	26,65	55,08	7,68	0	14,10	1,68
M4	10,27	25,37	54,94	9,42	0	13,70	1,53
T. bình	10,24	25,95	55,07	8,74	0	13,5	1,59

-**Chất lượng thành phẩm:**

Các mẫu được kiểm nghiệm để so sánh đánh giá tính ổn định của quy trình.

Bảng 3.1.53. Một số kết quả kiểm nghiệm các mẫu viên Ser.

Mẫu	M2	M3	M4
Hình thức: Viên trụ dẹt, viên nhẵn, đồng nhất, màu vàng cam nhạt.	Đạt	Đạt	Đạt
Khối lượng viên Mtb ± 7,5 % (mg)	169-178	165 – 174	171-185
Hàm lượng hoạt chất dự tính ban đầu % = trước khi dập viên	145	145	145
Hàm lượng hoạt chất thực tế %	126,52	127,23	125,91
Mức giảm %	12,75	12,25	13,16
Độ đồng đều hàm lượng	Đạt	Đạt	Đạt
Độ rã viên: thử với HCl 0,1 N trong 120 phút không có viên bị nứt, rã; tiếp trong đệm phosphat pH 6,8, viên rã ≤ 60 phút.	25	23	27
Độ hoà tan: ở pH 6,8. Hàm lượng hoạt chất phải hoà tan ≥ 70 %/ 60 phút	83,14	79,51	77,25

***Nhận xét:**

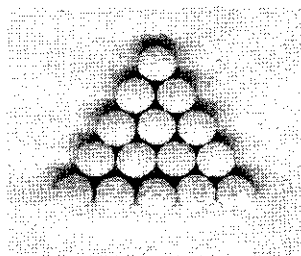
-Quy trình kỹ thuật có tính thực thi, chất lượng thành phẩm đạt các yêu cầu cơ bản của Dược điển. Hao hụt, giảm hàm lượng hoạt chất được kiểm soát ở mức = 12,72% so với dự đoán 15,02 % ở các thử nghiệm thăm dò.

- Hiệu suất thu thành phẩm chưa cao, do dịch bao có độ nhớt cao hơn dịch bao thường gặp, nên khó bao hơn, ảnh hưởng của thiết bị bao viên,...Một phần nhược điểm này có thể giải thích do ảnh hưởng của chất chống ẩm CAP, dung môi bay hơi

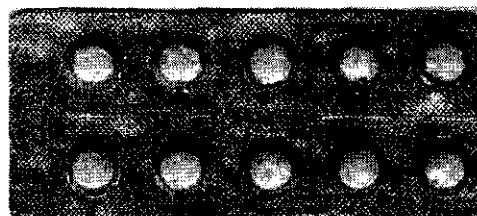
chậm vì phải bao ở nhiệt độ thấp,...

*Mẫu chế phẩm: xem Hình 3.1.10.

Chế phẩm được đóng trong vỉ ép nhôm nhựa 10 viên và chai 50 viên, có chất chống ẩm, nắp nút kín.



A



B

Hình 3.1.10. Mẫu viên nghiên cứu Serrapeptase 5 mg

A: Viên – B: Viên đóng trong vỉ nhôm.

Ngoài viên SER 5 mg, đã thử nghiệm viên SER 10 mg cho thấy công thức và quy trình có thể áp dụng cho viên có hàm lượng gấp đôi. Tuy nhiên độ cứng, độ mài mòn của viên giảm, do vậy khâu bao viên có khó hơn đôi chút. Có thể khắc phục bằng điều chỉnh một tỷ lệ vài chất phụ trong công thức như tăng tá dược dính PVP lên 4,75% so với 4,625% trong viên 5 mg.

Trên cơ sở các thông số của quy trình, các lô thử nghiệm số lượng 5 kg / mẻ cũng được tiến hành để hướng triển khai pilot công nghiệp.

Ngoài các thông số cơ lý và hoá sinh định lượng đã được trình bày, nghiên cứu còn chú ý tới vệ sinh công nghiệp để thuốc đạt tiêu chuẩn vi sinh vật như yêu cầu của Dược điển. Mẫu bào chế gần đây nhất (M5 – tháng 6 – 2004) đã được Viện Pasteur TP HCM kiểm nghiệm, cho thấy đạt tiêu chuẩn giới hạn vi sinh vật. Các mẫu thuốc mới đang theo dõi độ ổn định cũng đang được giữ kiểm nghiệm theo quy định. Các kết quả kiểm nghiệm sẽ được xử lý bổ sung để hoàn thiện quy trình kỹ thuật.

3.1.7. Xác định tương đương sinh học *in vitro* bằng thử nghiệm độ hoà tan

Chúng tôi đã khảo sát độ hoà tan của 3 mẫu viên bao tan trong ruột chứa SER 5mg. Các mẫu được định lượng trước khi tiến hành thử nghiệm. Biết hàm lượng mẫu M2= 126,52 %, M3= 127,23% và M4 =125,91% .

Tiến hành theo phương pháp đã đề nghị. Kết quả: xem bảng 3.1. 54 .

Bảng 3.1.54. Độ hoà tan một số chế phẩm nghiên cứu viên bao SER 5 mg

Hàm lượng hoạt chất phóng thích so với hàm lượng nguyên của chế phẩm%				Trung bình
Thời điểm	Mẫu M2	Mẫu M3	Mẫu M4	
45 phút	74,41	71,54	73,23	73,06
60 phút	83,14	79,51	77,25	79,97

Độ hoà tan hoạt chất của các chế phẩm ở 45 phút và ở 60 phút là tương đối đồng đều. Theo Dược điển Việt Nam III quy định: sau 60 phút lượng hoạt chất giải phóng ở mỗi viên không < 70%: đạt yêu cầu

Kết quả mẫu: độ hoà tan đạt 73,06% ở 45 phút và 79,97 % ở 60 phút, đạt yêu cầu của Dược điển Việt Nam III quy định.

So với kết quả khảo sát các mẫu thuốc chứa Ser. đang lưu hành B,C,F,N cho thấy mẫu thuốc nghiên cứu đạt khá tốt .

3.1.8. Khảo sát độ ổn định và tuổi thọ của thành phẩm

Các mô hình đã nghiên cứu đã đề xuất được áp dụng để đánh giá chất lượng và độ ổn định của các mẫu chế phẩm mới M2, M3, M4.

3.1.8.1.Thử nghiệm khả năng chống ẩm của viên

Điều kiện thử nghiệm: Đặt mẫu trong điều kiện tương tự môi trường khí hậu nóng ẩm: độ ẩm ~ 70 -75 % nhiệt độ ~ 30 - 35°C.

Mẫu thử nghiệm: Đặt viên bao trong chai, không đóng nắp, đặt trong môi trường thử, theo dõi khối lượng viên trong 10 – 30 ngày.

Kết quả: xem bảng 3.1.55.

Nhận xét:

Lớp bao của 3 mẫu thuốc mới có khả năng chống ẩm cao, trong môi trường ẩm khối lượng viên tăng trung bình 0,79% trong 30 ngày, đạt mức <1 % như thử nghiệm với mẫu thuốc ngoại và đề nghị.

Bảng 3.1.55. Khả năng chống ẩm của các mẫu nghiên cứu

Khối lượng viên – Thời gian	Mẫu M2	Mẫu M3	Mẫu M4	Trung bình %
K.lượng ban đầu 20 viên = (20 x m _{viên})	3,560 (mv=0,178)	3,480 (mv= 0,174)	3,620 (mv=0,181)	00
K. lượng sau 10 ngày (Tỷ lệ % tăng k.lượng)	3,5615 (0,042%)	3,4816 (0,048%)	3,6212 (0,033%)	0,041
K.lượng sau 20 ngày (Tỷ lệ % tăng k.lượng / cộng dồn)	3,5803 (0,571%)	3,4823 (0,67%)	3,6395 (0,54%)	0,5937
K.lượng sau 30 ngày (Tỷ lệ % tăng k.lượng / cộng dồn)	3,5876 (0,775%)	3,5130 (0,950%)	3,6441 (0,665%)	0,7967

3.1.8.2.Thử nghiệm đánh giá nhanh hàm lượng hoạt chất của thành phẩm

Mục đích:Thử nghiệm độ bền vững của hoạt chất SER trong viên thành phẩm, thể hiện khả năng chống nóng ẩm tạo bởi cấu trúc bền chắc của viên nén, của lớp bao phim và bao bì .

Điều kiện thử nghiệm: thuốc đặt trong môi trường nhiệt độ 50°C, độ ẩm 60 ± 5% và thời gian 10 – 30 ngày .

Mẫu thử nghiệm:3 mẫu thuốc mới,đóng 50 viên/chai nắp xi kín và vỉ 10 viên

Kết quả:xem bảng 3.1.56.

Nhận xét: Khả năng bảo vệ hoạt chất của các mẫu nghiên cứu chống nóng ẩm tương đối khả quan, tỷ lệ hoạt chất giảm 87,29 % so với 86,34 % tương đương các mẫu thuốc ngoại A1,A4,A9, trong thử nghiệm tương tự.

Bảng 3.1.56. Hàm lượng thuốc viên M2, M3, M4 ở 50°C, độ ẩm 60 ± 5%

Mẫu	M2	M3	M4
Hàm lượng ban đầu %	126,52	127,23	125,91
Tỷ lệ %hoạt chất còn lại sau 10 ngày → giảm trung bình <u>43,15 %</u>	57,55	59,01	54,00
Tỷ lệ %hoạt chất còn lại sau 20 ngày → giảm trung bình <u>72,263 %</u>	27,80	25,20	29,11
Tỷ lệ %hoạt chất còn lại sau 30 ngày. → giảm trung bình <u>87,29 %</u>	12,47	11,20	14,45

- Về bao bì:Trong điều kiện đóng gói kín, chống ẩm, khả năng bảo vệ hoạt chất của bao bì chai hay vỉ không khác nhau .

3.1.8.3.Thử nghiệm xác định độ ổn định của thuốc thành phẩm

Mục đích thử nghiệm: Xác định độ bền vững của hoạt chất,nhằm dự đoán hạn dùng hay tuổi thọ của thuốc mới trong điều kiện đánh giá dành riêng cho hoạt chất SER.

Điều kiện thử nghiệm - ở 2 điều kiện:

- Điều kiện khống chế: nhiệt độ ở $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm = $60 \pm 5\%$.
- Điều kiện nóng ẩm: Đặt mẫu trong điều kiện tương tự ở môi trường khí hậu nóng ẩm: độ ẩm tương đối ~ 70 -75 % nhiệt độ ~ $30 - 35^{\circ}\text{C}$.

Mẫu thử nghiệm: 3 mẫu thuốc mới,đóng 50 viên/chai nắp xi kín và vĩ 10 viên

Theo dõi hàm lượng hoạt chất: thành phẩm trong bao bì kín,chống ẩm. Định kỳ 6 tháng 1 lần lấy mẫu kiểm nghiệm. Song song kiểm tra khối lượng viên sau khi thử nghiệm kết thúc .Kết quả: xem bảng 3.1.57 ; 3.1.58 ;3.1.59.

Bảng 3.1.57. Khối lượng viên sau 23 tháng thử nghiệm

Khối lượng viên – Thời gian	Mẫu M2	Mẫu M3	Mẫu M4	Tăng %
K.lượng ban đầu 20 viên = (20 x m _{viên})	3,560 (mv=0,178)	3,480 (mv= 0,174)	3,620 (mv=0,181)	00
- K. lượng sau 23 tháng trong điều kiện khống chế: nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$,độ ẩm $60 \pm 5\%$. -Tỷ lệ tăng k.lượng %	3,5690 0,255	3,4902 0,295	3,6287 0,243	 0,26
-K.lượng sau 23 tháng trong điều kiện nóng ẩm: T ~ $30 - 35^{\circ}\text{C}$, độ ẩm ~ 70 -75 %. -Tỷ lệ tăng k.lượng %	3,5782 0,5100	3,5033 0,6701	3,6374 0,4820	 0,55

Bảng 3.1.58. Thay đổi hàm lượng Ser.của các mẫu nghiên cứu bảo quản trong điều kiện nóng ẩm: T ~ 30 - 35°C, độ ẩm ~ 70 -75 %.

Hàm lượng	Viên M2	Viên M3	Viên M4	Trung Bình
sau 12 tháng Ngày định lượng	99,91 20.8.2003	110,82% 20.8.2003	113,168% 20.8.2003	107,97
Sau 18 tháng Ngày định lượng:	97,34 % 09.02.2003	99,72 % 11.02.2003	103,34% 11.02.2003	100,13
Sau 23 tháng Ngày định lượng:	92,50 % 13.7.2004	94,17% 13.7.2004	96,03% 13.7.2004	94,23
Tỷ lệ giảm trung bình / tháng (%)	1,479	1,437	1,299	1,405
Hạn dùng dự đoán	25, 7 tháng	26,9 tháng	27,6 tháng	26,73

Nhận xét: Các mẫu thuốc mới qua 4 thử nghiệm cho thấy:

Khả năng chống ẩm:

-Trong môi trường ẩm khối lượng viên tăng ở mức =0,7967% trong 30 ngày.

-Trong bao bì kín, khối lượng viên tăng ở mức = 0,2643% trong môi trường mát, độ ẩm < 55% và = 0,5540% trong môi trường nóng ẩm.

Các kết quả này đạt mức tương đương với khả năng chống ẩm của mẫu thuốc ngoại A1,A4 và A9 được nghiên cứu, là những mẫu có chất lượng lớp bao tốt nhất qua khảo nghiệm .

Bảng 3.1.59. Thay đổi hàm lượng Ser.của các mẫu nghiên cứu bảo quản trong điều kiện khống chế: nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm $60 \pm 5 \%$.

H.lượng hoạt chất %	Viên M2 5 mg	Viên M3 5mg	Viên M4 5 mg	Trung bình
H.lượng ban đầu	= 12.652IU ~126,52%	= 12.723 IU ~127,23%	12.591 IU ~125,91%	126,55
Ngày bào chế	7- 9 - 2002	7- 9 - 2002	7- 9. 2002	
Ngày định lượng	11.9.02	11.9.02	11.9.02	
Sau 12 tháng.	111,630 %	111,230 %	113,81%	112,23
Ngày định lượng	20.8.2003	20.8.2003	20.8.2003	
Sau 18 tháng	101,72%	104,36%	104,37%	103,48
Ngày định lượng:	09.02.2003	11.02.2003	11.02.2003	
Sau 23 tháng	96,47%	99,61%	100,24%	98,77
Ngày định lượng:	13.7.2004	13.7.2004	13.7.2004	
Tỷ lệ giảm trung bình / tháng (%)	1,307	1,201	1,116	1,208
Hạn dùng dự đoán	27, 9 tháng	31 tháng	31,8 tháng	30,23

Độ ổn định của thuốc:

- Đánh giá nhanh ở 50°C , độ ẩm = $60 \pm 5 \%$, thuốc trong bao bì kín:khả năng bảo vệ hoạt chất của các mẫu nghiên cứu qua tỷ lệ hoạt chất giảm 87,29 % so với 86,34 % ngoại đối chứng.

-Trong thử nghiệm khống chế nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm = $60 \pm 5 \%$, tốc độ giảm hàm lượng hoạt chất trung bình 1,208 % / tháng và 1,405 % trong thử nghiệm với môi trường nóng ẩm,nhiệt độ $\sim 30 - 35^{\circ}\text{C}$,độ ẩm $\sim 70 - 75\%$.

-Trong điều kiện bao bì chống ẩm gần tuyệt đối, thuốc đóng trong vỉ hoặc chai có độ ổn định gần như nhau .

Kết luận

-Hạn sử dụng của thuốc mới: Với kết quả này suy đoán hạn dùng của mẫu thuốc mới khoảng 30 tháng nếu bảo quản khống chế nhiệt độ $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm = $60 \pm 5 \%$ hoặc 26 tháng trong điều kiện bình thường.

- Bảo quản: Nên bảo quản nơi mát $20 - 25^{\circ}\text{C}$,độ ẩm = $60 \pm 5 \%$, tránh ẩm, tránh ánh sáng để giúp thuốc ổn định hơn.Vì chỉ riêng điều kiện bảo quản khống chế nhiệt, ẩm cũng có thể kéo dài thời hạn sử dụng thuốc trên 13 % thời gian, chứng tỏ điều kiện kho tồn trữ thuốc rất quan trọng với những thuốc nhạy cảm với nhiệt ẩm .

- Vai trò của dạng bào chế: So sánh độ ổn định của hoạt chất S2 là nguyên liệu của nghiên cứu này cho thấy dạng bào chế có khả năng nâng cao độ ổn định của hoạt chất từ 14- 16 %.Tốc độ phân huỷ hoạt chất trong viên = 86 % nếu bảo quản không chế nhiệt ẩm và 84% trong điều kiện nóng ẩm so với nguyên liệu.Như vậy tác dụng bảo vệ hoạt chất của viên thành phẩm tốt hơn so với nguyên liệu trong điều kiện bất lợi nóng ẩm.

3.1.9. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng viên bao ser 5mg

Với các kết quả thu được từ các mẫu thuốc mới,tiêu chuẩn viên bao Serrapeptase 5mg được đề nghị.

Bảng 3.1.60. Tiêu chuẩn Viên bao Serrapeptase 5 mg

Stt	Tên chỉ tiêu	Nội dung	Phương pháp
1	Tinh chất	Viên bao có màu vàng chanh, đồng nhất. Bề mặt viên phải nhẵn bóng, không bám dính bụi. Bề viên phải thấy rõ lớp bao phim mỏng.	Dược điển VN tr.PL 19: quan sát bằng mắt thường hoặc thấu kính.
2	Độ đồng đều khối lượng	Các viên trong mẫu phải đạt giới hạn so với khối lượng trung bình: $M \pm 7,5\%$.	Dược điển VN: Phương pháp cân
3	Độ rã viên	Viên phải nguyên vẹn ở môi trường acid HCl 0,1 N trong 2 giờ. Tiếp thử với dung dịch đệm photphat pH 6,8, viên phải rã trong vòng 60 phút.	Dược điển VN tr.PL137: Thiết bị Erweka, thử trên 6 viên.
4	Định tính	Phải có phản ứng đặc trưng của enzym serrapeptase	Phổ UV-VIS ở bước sóng hấp thu cực đại 280-282 nm. Phản ứng màu với thuốc thử ninhydrin,...
5	Định lượng	Phải đạt 90 – 130% hàm lượng ghi trên nhãn: 5 mg= 10.000 IU.	Đo hoạt độ thuỷ phân casein theo mô tả.
6	Giới hạn vi sinh vật	Không chứa vi khuẩn độc:E. coli, Staph. aureus,..Đạt giới hạn vi khuẩn hiếu khí < 10^4 /gam, nấm mốc < 10^2 / gam .	Dược điển VN 3 - PL 182: Cấy mẫu trong điều kiện vô khuẩn, đếm số lượng vi sinh vật theo mô tả.
7	Độ hoà tan *	Phải hoà tan > 70 % hoạt chất trong vòng 60 phút với đệm photphat pH 6,8	Dược điển VN tr.PL133: Thiết bị giỏ quay

Nhận xét:

- Mẫu thuốc mới đều đáp ứng các tiêu chuẩn, đặc biệt về độ ổn định.
- Riêng tiêu chuẩn độ hoà tan hiện vẫn được coi như tiêu chuẩn khuyến khích áp dụng, nếu áp dụng tiêu chuẩn này thì không cần áp dụng tiêu chuẩn độ rã viên.
- Hạn dùng: thuốc dùng trong 24 tháng kể từ ngày sản xuất .

3.1.10. Nghiên cứu mở rộng cho viên SER 10 mg

Một số công thức nghiên cứu thăm dò để bào chế viên SER 10 mg cũng được tiến hành. Mẫu viên bao SER 10 mg đã được bào chế thử, xem bảng 3.1.61.

Bảng 3.1.61. Công thức viên nhân Ser. 10 mg, lô 10.000 viên

Thành phần	Cho 1 viên	Cho 1 mẻ =10.000 viên
Serrapeptase	11,87 mg	118,70 g (6,59%)
PVP	8,55 mg	85,50 g (4,75 %)
Lactose	121,72 mg	1217,20 g (67,63%)
Tinh bột	22,17 mg	221,70 g (12,32 %)
Magnesi stearat	4,5 mg	45,00 g (2,500 %)
Chất phụ	11,12 mg	111,20 g (6,18 %)
Dập viên 170 mg $\pm$ 7,5 %	167 – 180 mg	167 – 180 mg

Quy trình:

- Xát hạt từng phần $\rightarrow$ cối trơ đến độ ẩm 0,5%.Trộn hoạt chất,chất phụ trong máy trộn kiểu hành tinh,thời gian trộn 7 – 8 phút. Lấy mẫu để định lượng hoạt chất, xác nhận sự đồng đều của cối.
- Dập viên: chày khum 7 mm, khối lượng viên 167 – 180 mg.
- Quy trình bao viên: áp dụng quy trình bao viên như với viên 5 mg. Khối lượng viên đạt khoảng 185 – 187 mg.
- Viên thành phẩm được đóng vỉ 10 viên theo dõi hàm lượng hoạt chất.
- Tiêu chuẩn thành phẩm: Áp dụng nội dung tiêu chuẩn viên Ser 5mg nhưng với hàm lượng 10 mg/ viên.
- Độ ổn định: Mẫu theo dõi song với viên Ser.5mg cho thấy hàm lượng thuốc ổn định tốt.

Nhận xét:

Công thức này chủ yếu dựa trên thành phần công thức của viên 5mg., nhưng tỷ lệ tá dược dính PVP = 4,75 %, tăng khoảng 0,13 % so với viên 5mg và theo đó các tỷ lệ khác cũng có biến đổi phù hợp..

3.2. NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ BỘT ĐÔNG KHÔ VI KHUẨN LACTIC LÀM MEN TIÊU HOÁ

3.2.1. Nghiên cứu môi trường và qui trình nuôi cấy vi khuẩn

3.2.1.1. Nghiên cứu môi trường và qui trình nuôi cấy vi khuẩn *B. bifidum*

Qui trình nuôi cấy *B. bifidum* được thực hiện theo sơ đồ sau:



Sơ đồ 3.2.1. Qui trình nuôi cấy *B. bifidum*

*Xác định các yếu tố lý hóa thích hợp cho sự tăng trưởng

Xác định pH thích hợp

Dùng môi trường, điều chỉnh ở các pH 5, 5,5; 6 ; 6,5; 7 ; 7,5; 8 rồi cấy một lượng vi khuẩn *B.bifidum* giống nhau vào các môi trường đã điều chỉnh pH để có số vi khuẩn là 1×10^5 / ml môi trường. Ủ 37°C / 48h. Sau đó đếm số vi khuẩn sống có trong dịch nuôi cấy bằng phương pháp pha loãng trong môi trường bán lỏng. Thử nghiệm được thực hiện 3 lần và lấy số trung bình.

Bảng 3.2.1: Kết quả xác định pH tối ưu cho sự tăng trưởng của *B.bifidum*

PH môi trường	5	5,5	6	6,5	7	7,5	8
Số vi khuẩn/ml	3.10^5	$4,2.10^6$	$2,2.10^7$	$2,8.10^8$	3.10^8	$1,1.10^7$	$1,5.10^6$

Kết luận: *B.bifidum* tăng trưởng tốt nhất ở pH 6,5- 7. Số lượng vi khuẩn tăng được khoảng 3000 lần trong khi cũng với cùng loại môi trường nhưng ở pH acid và pH hơi kiềm chỉ tăng được khoảng 30 lần

Xác định nhiệt độ nuôi cấy tối ưu

Cấy 1 lượng vi khuẩn giống nhau để có số vi khuẩn ban đầu là 1×10^5 /ml môi trường vào 6 bình môi trường nuôi cấy có pH = 7, đem ủ ở các nhiệt độ 32°C, 37°C, 39°C, 42°C, 47°C, 50°C trong 48 giờ và đếm số vi khuẩn/ ml môi trường trong mỗi bình bằng phương pháp đếm sống(phương pháp pha loãng trong môi trường bán lỏng)

Kết quả:

Bảng 3.2.2: Số vi khuẩn sống/ml môi trường nuôi cấy ở các t° khác nhau

Nhiệt độ	32°C	37°C	39°C	42°	47°C	50°C
Số vi khuẩn / ml	1×10^7	2.8×10^8	1×10^8	1×10^5	0	0

Kết luận: Vi khuẩn tăng trưởng tốt nhất ở nhiệt độ 37°C số vi khuẩn tăng 3000 lần, ở các nhiệt độ trên 40°C vi khuẩn không tăng trưởng.

Xác định tác động của Oxy trên quá trình tăng trưởng

B.bifidum là vi khuẩn kỵ khí tuyệt đối. Sự có mặt của oxy sẽ ảnh hưởng bất lợi trên quá trình tăng trưởng. Chúng tôi sử dụng hệ thống nuôi cấy kỵ khí và vi hiếu khí Gaspak của hãng Bio Miereux để tạo môi trường kỵ khí tuyệt đối và môi trường vi hiếu khí. Cấy vi khuẩn vào môi trường số 1. Ủ 37°C/24h trong điều kiện kỵ khí ,vi hiếu khí và ở điều kiện bình thường (Không có hệ thống tạo môi trường kỵ khí).

Quan sát sự tăng trưởng của vi khuẩn.**Kết quả:**

Bảng 3.2.3: Tác động của oxy trên quá trình tăng trưởng của *B.bifidum*

Môi trường	MT số 1 Ủ kỵ khí tuyệt đối	MT số 1 Ủ vi hiếu khí + thioglycholat	MT số 1 Ủ bình thường
Sự tăng trưởng của vi khuẩn	+++	++	-

+++ : tăng trưởng mạnh ++ : tăng trưởng khá - : không tăng trưởng

Kết luận: Điều kiện tốt nhất để cấy *B.bifidum* là tránh tác động của oxy tuyệt đối , vì vậy cần có hệ thống ủ kỵ khí mới cho kết quả tốt nhất.

•Xác định môi trường tối ưu cho sự tăng trưởng của *B. bifidum*

Xác định vai trò của yếu tố tăng trưởng

Cấy một lượng vi khuẩn vào 2 bình chứa môi trường có bổ sung và không bổ sung chất tăng trưởng, số vi khuẩn ban đầu là 1×10^5 /ml môi trường, ủ 24 giờ và sau đó đếm số vi khuẩn sống bằng phương pháp pha loãng trong môi trường bán lỏng .**Kết quả:**

Bảng 3.2.4.Số vi khuẩn/ml môi trường nuôi cấy có và không có chất tăng trưởng

Môi trường không có chất tăng trưởng	Môi trường có chất tăng trưởng
$8,5 \times 10^6$	6×10^8

Kết luận: Vi khuẩn *B. bifidum* cần có yếu tố tăng trưởng mới phát triển được. Khi có yếu tố tăng trưởng số lượng vi khuẩn nuôi cấy tăng 1000 lần trong khi không có yếu tố tăng trưởng vi khuẩn gần như không tăng trưởng vì vậy cần phải thêm yếu tố tăng trưởng vào môi trường nuôi cấy.

Xác định hàm lượng đường thích hợp

Để xác định hàm lượng đường thích hợp sử dụng môi trường có các lượng đường khác nhau là 10g/l, 20g/l, 30g/l. Cấy cùng 1 lượng vi khuẩn vào các bình chứa môi trường trên để có số vi khuẩn là $2,2 \times 10^5$ /ml môi trường. Ủ $37^\circ\text{C}/48\text{h}$, đếm vi khuẩn sống/ml dịch nuôi cấy bằng phương pháp pha loãng trong môi trường bán lỏng. Kết quả:

Bảng 3.2.5: Ảnh hưởng của hàm lượng đường glucose trên sự tăng trưởng của *B.bifidum*

Hàm lượng đường	Số vi khuẩn ban đầu (Vi khuẩn / ml)	Số vi khuẩn sau 24 giờ (Vi khuẩn /ml)
10 g/ l	$2,2 \cdot 10^5$	$5,6 \cdot 10^7$
20g /l	$2,2 \cdot 10^5$	$4,2 \cdot 10^8$
30 g/l	$2,2 \cdot 10^5$	$6,6 \cdot 10^7$

Kết luận: . Hàm lượng đường cao sự tăng trưởng của vi khuẩn bị ức chế. Với hàm lượng đường glucose là 20g/l vi khuẩn *B.bifidum* tăng trưởng tốt nhất: số vi khuẩn tăng khoảng 2000 lần trong khi với nồng độ đường thấp hơn hoặc cao hơn đều cho hiệu quả kém hơn (chỉ tăng khoảng 300 lần)

Xác định nguồn pepton thích hợp

Thử nghiệm trên 3 nguồn pepton: pepton từ thịt, pepton từ sữa bột và pepton từ sữa đậu nành.

Thực hiện: Dùng môi trường chứa pepton từ các nguồn: sữa, thịt, đậu nành với cùng một hàm lượng, cấy vào các môi trường này cùng một lượng vi khuẩn thử nghiệm để có số vi khuẩn ban đầu là $3,5 \cdot 10^5$ /ml môi trường , ủ ở $37^\circ\text{C}/24$ giờ đếm số vi khuẩn trong 1ml môi trường bằng phương pháp đếm sống. Kết quả:

Bảng 3.2.6: Số vi khuẩn /ml môi trường với các nguồn pepton khác nhau

Môi trường	Số vi khuẩn ban đầu	Số vi khuẩn sau 24 giờ
Pepton từ sữa	$3,5.10^5$	$6,1.10^8$
Pepton từ thịt	$3,5.10^5$	$4,2.10^8$
Pepton từ sữa đậu nành	$3,5.10^5$	$5,2.10^8$

Kết luận: Nguồn pepton không ảnh hưởng nhiều đến sự tăng trưởng của *B.bifidum*
 Như vậy có thể sử dụng các nguồn pepton trên để nuôi cấy vi khuẩn

Xác định hàm lượng pepton thích hợp

.Dùng môi trường có hàm lượng pepton khác nhau là 10g/l, 20g/l, 30g/l. Kết quả

Bảng 3.2.7: Ảnh hưởng của hàm lượng pepton trên sự tăng trưởng của *B.bifidum*

Hàm lượng pepton (g/l)	Số lượng vi khuẩn ban đầu (vi khuẩn / ml)	Số lượng vi khuẩn sau 24 giờ (vi khuẩn / ml)
10	$2,2 . 10^5$	$0,5 . 10^8$
20	$2,2 . 10^5$	$2,5 . 10^8$
30	$2,2 . 10^5$	$5,2 . 10^8$

Kết luận: Hàm lượng pepton có ảnh hưởng nhiều đến sự tăng trưởng của vi khuẩn, để đạt hiệu suất cao cần dùng nồng độ pepton là 30g/l môi trường.

Xác định ảnh hưởng của một số chất khác trên sự tăng trưởng của *B.bifidum*

Một số chất như muối khoáng, L.Cystein có thể ảnh hưởng trên sự tăng trưởng này. Vì vậy để sự tăng trưởng đạt hiệu quả cao nhất cần thêm vào môi trường nuôi cấy các chất trên.

Thực hiện: Chúng tôi nuôi cấy cùng 1 lượng vi khuẩn vào các môi trường có thành phần khác nhau, số vi khuẩn ban đầu là 1×10^5 /ml môi trường. Các môi trường này có thành phần cơ bản là pepton, chất tăng trưởng và đường ở các nồng độ thích hợp như đã khảo sát ở trên (môi trường số 1), sau đó thêm vào các thành phần khác (môi trường số 2). Ủ $37^\circ\text{C}/48\text{h}$, đếm số vi khuẩn/ml dịch nuôi cấy bằng phương pháp đếm sống (phương pháp pha loãng trong môi trường bán lỏng). Kết quả:

Bảng 3.2.8: Ảnh hưởng của một số chất trên sự tăng trưởng của vi khuẩn *B.bifidum*

Môi trường	Số vi khuẩn ban đầu (vi khuẩn / ml)	Số lượng vi khuẩn sau 24 giờ (vi khuẩn / ml)
Môi trường số 1	$1,5 . 10^5$	$4,5 . 10^8$
Môi trường số 2	$1,5 . 10^5$	$8,6 . 10^8$

Kết luận: muối khoáng có ảnh hưởng trên quá trình tăng trưởng của vi khuẩn .

Với các khảo sát trên chúng tôi đã tìm được các điều kiện tốt nhất để nuôi cấy

B.bifidum: t° thuận nhiệt là 37°C, pH môi trường nuôi cấy tốt nhất là pH 7 và môi trường tối ưu là môi trường số 13

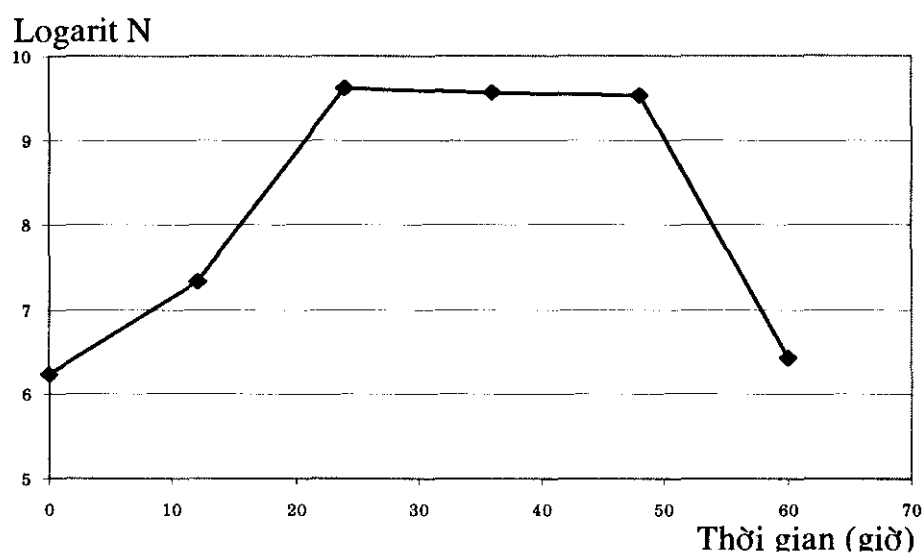
•Khảo sát đường cong tăng trưởng

Để thu được lượng sinh khối lớn nhất,khoảng thời gian logarit của vi khuẩn,thời gian vi khuẩn bắt đầu suy tàn cần kết thúc việc nuôi cấy , phải xác định đường cong tăng trưởng.

Thực hiện: Cấy lượng vi khuẩn ban đầu là $1,7 \times 10^6$ vi khuẩn /ml môi trường. Ủ kỵ khí tuyệt đối ở 37°C. Sau các khoảng thời gian đếm số vi khuẩn/ml dịch nuôi cấy bằng phương pháp đếm sống và lập đường biểu diễn số vi khuẩn/ml dịch nuôi cấy và thời gian.

Bảng 3.2.9: Thời gian tăng trưởng của *B.bifidum*

Thời gian	0 giờ	12 giờ	24 giờ	36 giờ	48 giờ	60 giờ
Số vi khuẩn /ml (N)	$1,7 \cdot 10^6$	$2,1 \cdot 10^7$	$4,2 \cdot 10^9$	$3,8 \cdot 10^9$	$3,5 \cdot 10^9$	$2,6 \cdot 10^6$
Log N		7,3	9,62	9,58	9,54	8,41



Biểu đồ 3.2.1: Đường cong tăng trưởng của *B. bifidum*

Kết luận: Giai đoạn *logarit* của *B.bifidum* là 24 giờ. Thời gian cho sinh khối tối đa là 24 giờ, thời gian suy tàn sau 48 giờ .

•Quy trình nuôi cấy *B.bifidum*

Từ các kết quả khảo sát trên chúng tôi thành lập quy trình nuôi cấy như sau:

Gốc vi khuẩn *B.bifidum* thuần chủng



Hoạt hoá



Cấy vào MT, ủ 37°C/18h
Ủ kỵ khí tuyệt đối.

Nhân giống cấp 1



Lấy 10ml dung dịch nuôi cấy đã được
hoạt hoá (1×10^8) vi khuẩn/ml cho vào
100ml MT nuôi cấy số 13 ủ 37 °C / kỵ
khí tuyệt đối trong 18h

Nhân giống cấp 2



Cho vào bình nuôi cấy chứa MT V=2 lít,
nhân giống cấp 2, ủ 37°C/24h/ kỵ khí
tuyệt đối.
Ly tâm ở tốc độ 5000 vòng /phút

Sinh khối *B.bifidum*

3.2.1.2. Nghiên cứu môi trường và quy trình nuôi cấy *L.acidophilus*

- Xác định các yếu tố lý hóa thích hợp cho sự tăng trưởng:

Xác định pH thích hợp

Cấy *L. acidophilus* vào môi trường đã điều chỉnh pH để tạo chuỗi pH từ 2 đến 10, ủ ở 37°C/24h. Quan sát sự tăng trưởng bằng cách so độ đục và đếm vi khuẩn bằng phương pháp đếm sống (phương pháp pha loãng và trải bản thạch). Kết quả:

Bảng 3.2.10: Khoảng pH tăng trưởng của *L. acidophilus* quan sát bằng so độ đục

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Mức độ tăng trưởng	-	+	+	+++	+++	+++	++	+	-

Ở pH 5,6,7 đếm vi khuẩn sống bằng phương pháp đếm sống

Bảng 3.2.11: Khoảng pH tăng trưởng của *L. acidophilus* quan sát bằng phương pháp đếm sống.

pH	5	6	7
Số vi khuẩn trong 1ml dịch cấy	$1,3 \cdot 10^8$	$5 \cdot 10^9$	$7 \cdot 10^8$

Kết luận: khoảng pH tăng trưởng của *L.acidophilus* là từ 3 – 9, pH thích hợp

nhất cho sự tăng trưởng là pH 6.

Xác định môi trường nuôi cấy tối ưu

Xác định nguồn pepton thích hợp:

Sử dụng một số nguồn pepton khác nhau như từ sữa, sữa đậu nành Cấy vi khuẩn vào các môi trường trên với số vi khuẩn ban đầu là $1,5 \cdot 10^5$ (môi trường số 18, 19, 20), ủ $37^\circ\text{C}/24\text{h}$. Đếm số vi khuẩn sống/ml dịch nuôi cấy bằng phương pháp đếm sống. Kết quả:

Bảng 3.2.12: Sự tăng trưởng của *L. acidophilus* với các nguồn pepton khác nhau

Môi trường	Số vi khuẩn ban đầu	Casein	Pepton từ sữa đậu nành	Pepton từ thịt
Số vi khuẩn/ ml dịch cấy	$5 \cdot 10^6$	$1,7 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^9$	$8 \cdot 10^7$

Kết luận: với các nguồn pepton trên vi khuẩn có thể tăng trưởng tốt trong môi trường pepton từ sữa, với nguồn pepton từ thịt cho hiệu suất kém hơn.

Xác định vai trò của yếu tố tăng trưởng

Để xác định vai trò của yếu tố tăng trưởng chúng tôi nuôi vi khuẩn trong 2 môi trường có và không có yếu tố tăng trưởng. Cấy một lượng vi khuẩn để có số lượng vi khuẩn ban đầu là $1,5 \cdot 10^5$ / ml môi trường, ủ $37^\circ\text{C}/24$ giờ, đếm số vi khuẩn trong 1ml bằng phương pháp đếm sống. Kết quả:

Bảng 3.2.13: Số vi khuẩn/1ml dịch cấy môi trường có và không có yếu tố tăng trưởng

Môi trường	Có chất tăng trưởng	Không có chất tăng trưởng
Số vi khuẩn / 1ml	$8 \cdot 10^8$	$3,7 \cdot 10^6$

Kết luận: Có sự chênh lệch rất lớn về số lượng vi khuẩn / ml dịch cấy ở 2 môi trường có và không có chất tăng trưởng. Như vậy chất tăng trưởng rất cần thiết cho sự phát triển của *L. acidophilus*

Xác định nguồn đường thích hợp

Thử nghiệm trên hai loại đường là glucose và saccharose. Dùng môi trường cơ bản thêm vào glucose và saccharose với các hàm lượng khác nhau (các thành phần còn lại giống nhau). Cấy lượng vi khuẩn để có số vi khuẩn ban đầu là $1,5 \cdot 10^5$ /ml môi trường, ủ $37^\circ\text{C}/24\text{h}$. Đếm số vi khuẩn sống/1ml dịch nuôi cấy. Kết quả

Bảng 3.2.14: Số vi khuẩn /ml dịch nuôi cấy ở các nồng độ đường khác nhau sau 24 giờ

Sacchrose			Glucose		
2%	4%	6%	2%	4%	6%
$8,5.10^8$	5.10^8	$1,6.10^8$	$1,2.10^9$	$6,4.10^8$	5.10^8

Kết luận: *L.acidophilus* có khả năng phát triển tốt trong môi trường chứa glucose hơn saccharose. Nồng độ đường thích hợp là 2% glucose

- Xác định đường cong tăng trưởng

Bảng 3.2.15: Thời gian tăng trưởng của *L.acidophilus*

Thời gian	0 giờ	12 giờ	24 giờ	36 giờ	48 giờ	60 giờ
Số vi khuẩn /ml (N)	$3,7 \cdot 10^5$	$2,1 \cdot 10^7$	$4,5 \cdot 10^9$	$3,5 \cdot 10^9$	$3,0 \cdot 10^8$	$2,6 \cdot 10^6$



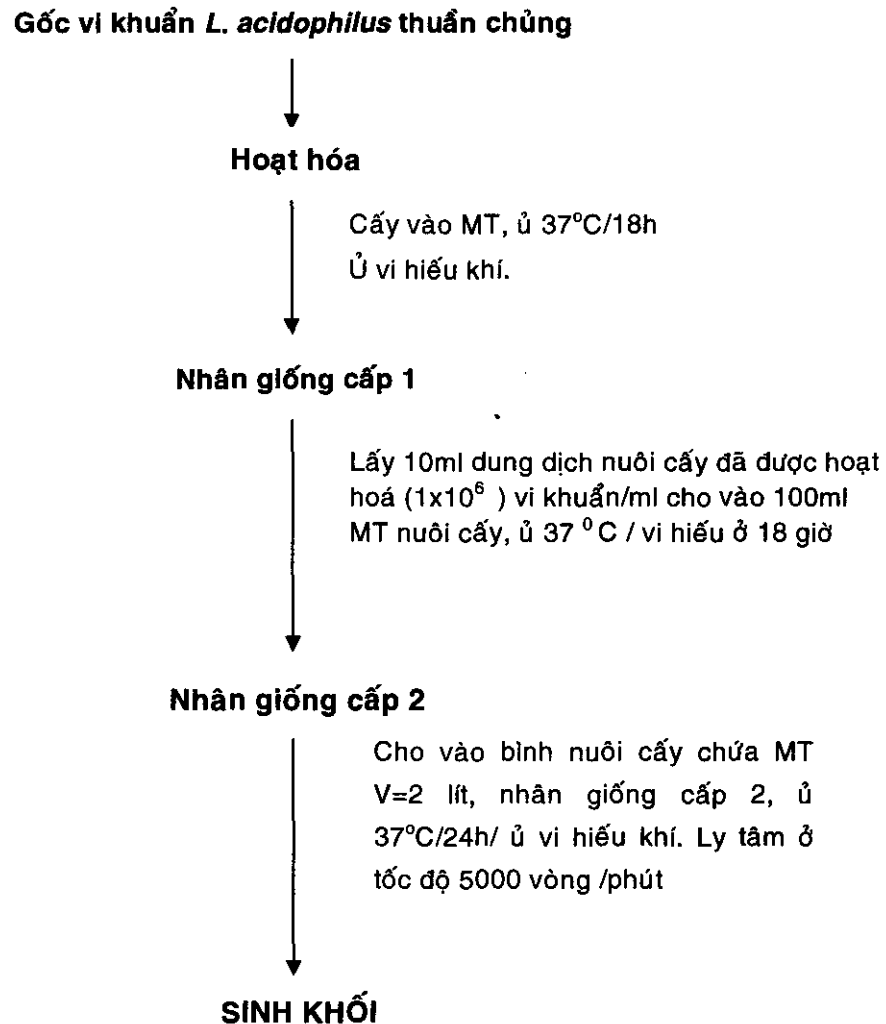
Biểu đồ 3.2.2: Đường cong tăng trưởng của *L. acidophilus*

Kết luận: Sau 24 giờ vi khuẩn *L. acidophilus* cho lượng sinh khối lớn nhất. Vi khuẩn suy tàn sau 36 giờ.

Như vậy chúng tôi đã xác định được môi trường tốt nhất cho sự tăng trưởng điều kiện nuôi cấy là nhiệt độ 37°C , môi trường vi hiếu khí , thu sinh khối sau 24 giờ

• Qui trình nuôi cấy *L. acidophilus*

Từ các kết quả trên, chúng tôi thành lập qui trình nuôi cấy *L. acidophilus* theo sơ đồ sau:



Sơ đồ 3.2.2: Qui trình nuôi cấy *L. acidophilus*

3.2.2. Khảo sát các yếu tố ổn định và qui trình đông khô *B.bifidum* và *L. acidophilus*

3.2.2.1. Xác định thời gian nuôi cấy tối ưu

Mục đích: Xác định thời gian nuôi cấy tối ưu, sự ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy tới sự ổn định của vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* trong quá trình đông khô và bảo quản. Ở những khoảng thời gian khác nhau của pha tăng trưởng sẽ có sự bền vững

khác nhau sau quá trình đông khô.

Thực hiện: Nuôi cấy 5 mẫu T_{18} (18h nuôi cấy), T_{24} (24h nuôi cấy), T_{26} (26h nuôi cấy), T_{28} (28h nuôi cấy), T_{30} (30h nuôi cấy). Sau các khoảng thời gian tương ứng: 18h, 24h, 26h, 28h và 30h dùng phương pháp đếm sống trong môi trường bán lỏng đếm 1ml dung dịch nuôi cấy xác định thời gian nuôi cấy tối ưu, sau đó ly tâm lấy sinh khối, và đếm số lượng vi khuẩn sống sót và theo dõi số lượng vi khuẩn sống theo thời gian bảo quản. **Kết quả.**

Bảng 3.2.16: Ảnh hưởng của thời gian nuôi cấy vi khuẩn đến sự sống sót của vi khuẩn sau các khoảng thời gian khác nhau sau khi ổn định bằng phương pháp đông khô.

Thời gian nuôi cấy (giờ)	Tổng số vi khuẩn sống trước đông khô	Tổng vi khuẩn sống Sau khi đông khô	Hiệu suất (%)
18	$1,5 \cdot 10^{12}$	$4,095 \cdot 10^{11}$	23,4
24	$2,25 \cdot 10^{12}$	$6,2055 \cdot 10^{11}$	27,8
26	$3 \cdot 10^{12}$	$8,04 \cdot 10^{11}$	26,8
28	$2,5 \cdot 10^{12}$	$6,549 \cdot 10^{11}$	26,1
30	$2,75 \cdot 10^{12}$	$6,65 \cdot 10^{11}$	24,18

Kết luận: Vậy sau 26h nuôi cấy thu được lượng sinh khối lớn nhất, sau khi đông khô thì thời gian 24h cho hiệu suất đông khô cao nhất.

3.2.2.2. Xác định môi trường đông khô tối ưu

Ảnh hưởng của Yeast Extract tới hiệu suất đông khô.

Mục đích: Thêm vào một yếu tố tăng trưởng để xem ảnh hưởng của nó tới quá trình đông khô và bảo quản vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*.

Nguyên tắc: Yeast Extract là một yếu tố tăng trưởng có ảnh hưởng tới khả năng sống sót của vi khuẩn theo thời gian bảo quản. Thông thường Yeast Extract được pha với nồng độ là 0,5%. Khi thêm vào mẫu một lượng Yeast Extract và tiến hành đông khô song song với một mẫu không thêm Yeast Extract thì sẽ xác định được ảnh hưởng của nó.

Tiến hành: Nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* trong hai bình môi trường nuôi cấy (môi trường sữa), sau đó trộn vi khuẩn với môi trường có yeast extract (M_Y) và không có yeast extract (M_{BT}) số. Tiến hành đông khô và đếm lượng vi khuẩn sống để xác định hiệu suất đông khô. **Kết quả:**

Bảng 3.2.17: Ảnh hưởng của nồng độ Yeast Extract tới sự sống sót của vi khuẩn sau khi ổn định bằng phương pháp đông khô.

Mẫu	Vi khuẩn trong 250 ml	Kết quả (1ml)	Tổng vi khuẩn	Hiệu suất
M _Y	22,1	$5,3.10^{10}$	$1,171.10^{12}$	36
M _{BT}	23,1	$4,9.10^{10}$	$1,132.10^{12}$	34,8

Kết luận: Như vậy khi thêm Yeast Extract thì hiệu suất đông khô không tốt hơn bao nhiêu, đang theo dõi ổn định theo thời gian.

Ảnh hưởng của nồng độ đường có trong môi trường đông khô.

Mục đích: Khảo sát sự ảnh hưởng của đường lactose trong quá trình đông khô và xác định nồng độ đường tối ưu cho quá trình đông khô vi khuẩn.

Tiến hành: Thay đổi các nồng độ đường khác nhau trong khi cố định các yếu tố còn lại sẽ thấy được ảnh hưởng của đường tới quá trình đông khô. Nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* trong 5 bình môi trường nuôi cấy số 1 (môi trường sữa), ly tâm lấy cặn vi khuẩn, sau đó trộn vi khuẩn với môi trường có nồng độ đường khác nhau. Tiến hành đông khô và đếm lượng vi khuẩn sống để xác định hiệu suất đông khô. Kết quả.

Bảng 3.2.18: Ảnh hưởng của nồng độ đường tới sự sống sót của vi khuẩn sau khi ổn định bằng phương pháp đông khô.

Mẫu	Tổng số vi khuẩn ban đầu	Tổng số vi khuẩn sau khi đông khô	Hiệu suất (%)
L4%	$2,31.10^{12}$	$0,851.10^{12}$	36,8
L10%	$2,85.10^{12}$	$1,1374.10^{12}$	39,9
L15%	$3,25.10^{12}$	$1,67.10^{12}$	51
L20%	$5,25.10^{12}$	$3,31.10^{12}$	63
L25%	$5,5.10^{12}$	$3,82.10^{12}$	69,5
L30%	$4,25.10^{12}$	$3,126.10^{12}$	59,25

Nhận xét: Như vậy với nồng độ 25% đường lactose thì cho hiệu suất đông khô là cao nhất.

Ảnh hưởng của nồng độ sữa trong môi trường đông khô.

Mục đích: Xác định nồng độ tối ưu của sữa trong môi trường đông khô.

Tiến hành: Thay đổi các nồng độ khác nhau của sữa để xác định nồng độ tối ưu của sữa khi đông khô. Nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*, ly tâm lấy cặn vi khuẩn, sau đó trộn với môi trường có nồng độ sữa khác nhau. Tiến hành đông khô

và đếm lượng vi khuẩn sống để xác định hiệu suất đông khô. *Kết quả:*

Bảng 3.2.19: Ảnh hưởng của nồng độ Sữa tới sự sống sót của vi khuẩn sau khi ổn định bằng phương pháp đông khô.

Mẫu	Tổng vi khuẩn ban đầu	Tổng vi khuẩn sau đông khô	Hiệu suất (%)
S30%	5.10^{12}	$3,37.10^{12}$	67
S40%	$4,75.10^{12}$	$3,402.10^{12}$	71
S50%	$3,5.10^{12}$	$26,19.10^{12}$	74

Thay đổi tỉ lệ vi khuẩn và môi trường.

Mục đích: Xác định tỉ lệ vi khuẩn và môi trường đông khô tốt nhất cho quá trình đông khô vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*.

Tiến hành: Thay đổi tỉ lệ vi khuẩn so với môi trường đông khô để xác định tỉ lệ nào tốt nhất. Chúng tôi chọn các tỉ lệ sau: Cẩn ly tâm/môi trường là 35/15, 35/35, 35/100, 35/150, tương ứng với các mẫu M_{15} , M_{35} , M_{100} , M_{150} . Nuôi cấy vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*, ly tâm lấy cẩn vi khuẩn, sau đó trộn vi khuẩn với môi trường. Tiến hành đông khô và đếm lượng vi khuẩn sống để xác định hiệu suất đông khô.

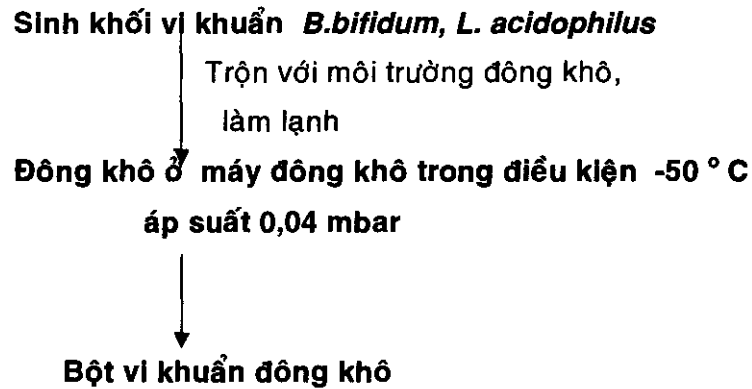
Kết quả:

Bảng 3.2.20: Ảnh hưởng của tỉ lệ vi khuẩn và môi trường đông khô tới sự sống sót của vi khuẩn sau khi ổn định bằng phương pháp đông khô.

Mẫu	Tổng số vi khuẩn trong 35g cẩn ly tâm	Tổng vi khuẩn	Hiệu suất
M_{15}	$5,74.10^{12}$	$1,34.10^{12}$	23,4
M_{35}	$5,74.10^{12}$	$3,951.10^{12}$	68,71
M_{100}	$5,74.10^{12}$	$4,59.10^{12}$	79,88
M_{150}	$5,74.10^{12}$	$4,38.10^{12}$	76,17

Kết luận: Như vậy với tỷ lệ 35 g cẩn vi khuẩn trộn với 100 ml môi trường đông khô thì sẽ có hiệu suất cao nhất. Khi đó số vi khuẩn trong 1 g bột đông khô là 6×10^{10} vi khuẩn

3.2.2.3. Quy trình đông khô vi khuẩn

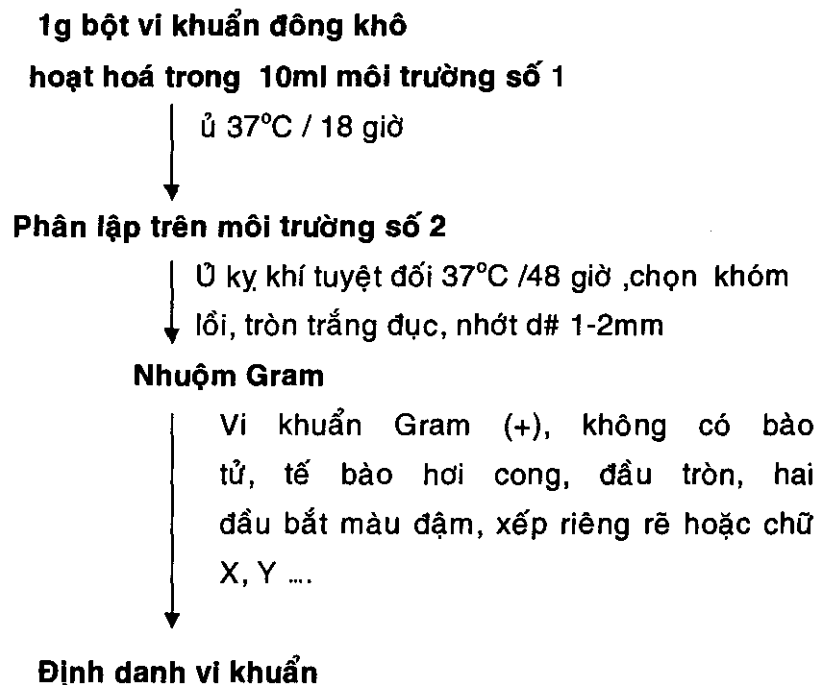


3.2.3. Xây dựng tiêu chuẩn và quy trình kiểm định vi khuẩn

3.2.3.1. Định danh vi khuẩn *Bifidobacterium bifidum*

- Trước khi định danh cần phân lập để có vi khuẩn tinh khiết cho các bước thử nghiệm sau

SƠ ĐỒ PHÂN LẬP *B. bifidum*

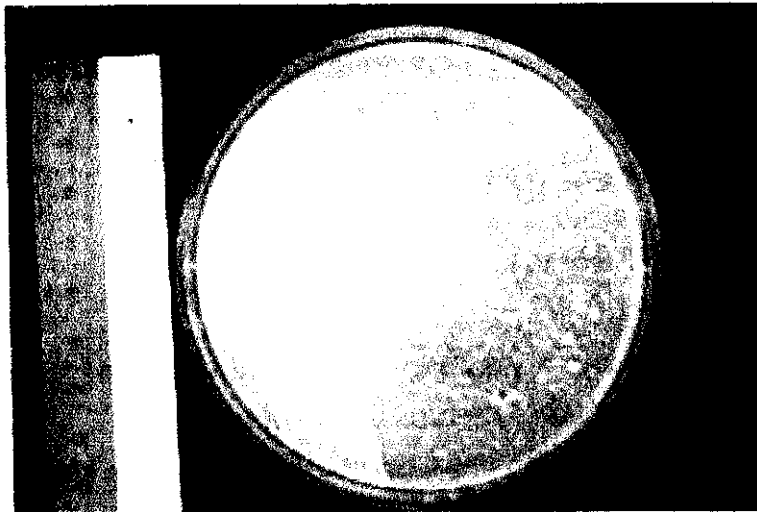


Sơ đồ 3.2.3. Sơ đồ định danh vi khuẩn *B. bifidum*

Định danh ở mức độ chi (genus): dựa vào các đặc điểm sau

- Hình dạng kích thước khóm vi khuẩn
- Phân lập vi khuẩn trên môi trường số 2: khóm vi khuẩn tinh khiết trên môi

trường số 2 có các đặc điểm: khóm lồi, tròn, trắng đục như sữa, hơi nhớt, d # 1-2mm



Hình 3.2.1: Khuẩn lạc *B.bifidum* trên môi trường số 2

○ Quan sát hình dạng, kích thước vi khuẩn

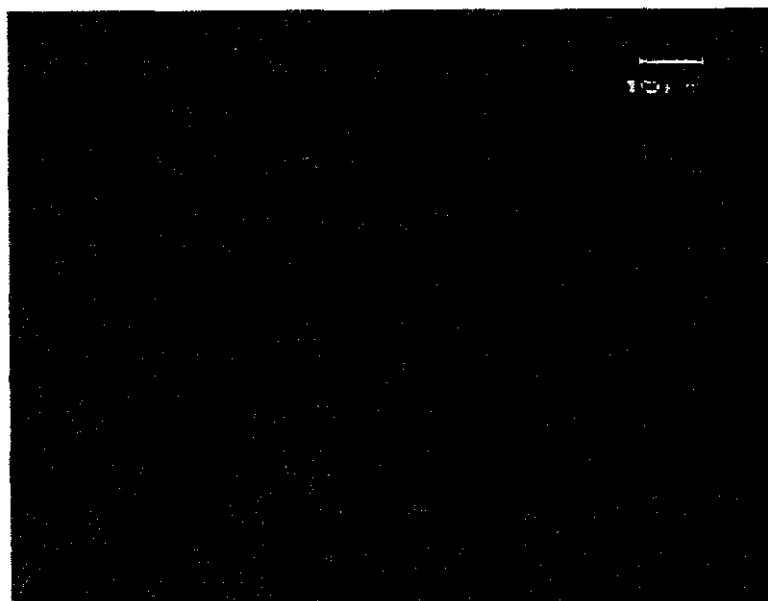
Nuôi vi khuẩn trên môi trường số 1, sau 24 giờ nhuộm Gram và quan sát dưới kính hiển vi X1000, nhận thấy:

- Vi khuẩn bắt màu Gram (+), không sinh bào tử
- Kích thước vi khuẩn: dài 3 – 3,5µm, rộng 0,3 - 0,4µm
- Hình dạng vi khuẩn:

- Sau 24-48 giờ: vi khuẩn dạng que hơi cong, hai đầu tròn phình ra hoặc đầu to đầu nhỏ, bắt màu đậm ở hai đầu, có thể xếp riêng rẽ hoặc hình chữ Y, V, Gram +, không sinh bào tử

- Sau 60 giờ: một số vi khuẩn chuyển sang dạng ngọn lửa đèn cây, hoặc hình gậy, hình khúc xương, hai đầu tròn và bắt màu đậm; có thể có dạng nảy chồi.

Tất cả các hình dạng đặc biệt này đúng như hình dạng của *B.bifidum* đã được mô tả trong từ điển phân loại của Bergey.



Hình 3.2.2: *B.bifidum* qua kính hiển vi x1000

- Khả năng chịu đựng acid

Cấy vi khuẩn vào môi trường đã được điều chỉnh ở các pH khác nhau: 1,2,3,4,5 ấp ở 37°C/24h, quan sát sự tăng trưởng của vi khuẩn bằng mắt thường: và nhuộm màu Gram huyền trục vi khuẩn ở ống có vi khuẩn mọc để xác định là vi khuẩn *B.bifidum*, cho kết quả:

Bảng 3.2.21: Khả năng chịu đựng pH acid của *B.bifidum*

pH môi trường	1	2	3	4	5
Vi khuẩn	-	-	-	+	+

+: có mọc

-: không mọc

Như vậy vi khuẩn có khả năng chịu được pH acid (pH 4) , đây là một đặc tính của vi khuẩn *B.bifidum*.

- Khả năng đông tụ sữa

Cấy vi khuẩn vào môi trường có bổ sung 2% sữa ủ 37°C/24h thấy sau 3 giờ có sự đông tụ sữa, 1 giờ tiếp theo môi trường trở nên xốp và lắng.

- Kết quả các phản ứng sinh hoá:

Vi khuẩn cần định danh có các đặc điểm về hình dạng, cách sắp xếp tế bào, hình dạng khóm và các đặc điểm sinh lý giống như tài liệu đã mô tả . Chúng tôi tiến hành bước cuối cùng là xác định các phản ứng sinh hoá .

Xác định các phản ứng sinh hoá .

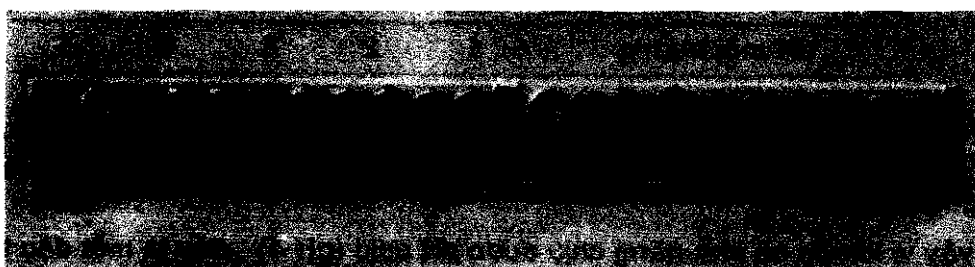
Nguyên tắc: Sử dụng bộ kit Api 20A có các phản ứng sinh hoá cần thiết để định

danh *B.bifidum*.

Bộ kit Api 20A của hãng Bio Miereux chứa các môi trường đường và môi trường cho một số phản ứng sinh hoá. Vi khuẩn tinh khiết được hoạt hoá trong môi trường ở 37°C/24h sau đó lấy vi khuẩn cho vào NaCl 0,9% vô trùng, dùng micropipet hút chính xác 50µl cho vào từng giếng trên bộ Api 20A. Ủ kỵ khí 48h và đọc kết quả.

Bảng 3.2.22: Kết quả phản ứng sinh hóa của *B. bifidum*

STT	Phản ứng	Kết quả
01	Arabinose (ARA)	-
02	Xylose (DXYL)	-
03	Ribose (RIB)	-
04	Gluconat (GNT)	-
05	Cellobiose (CEL)	+
06	Lastose (LAC)	+
07	Manitol (MAN)	-
08	Melezitose (MLZ)	-
09	Salicin (SAL)	-
10	Starch (AMD)	-
11	Trehalose (TRE)	-

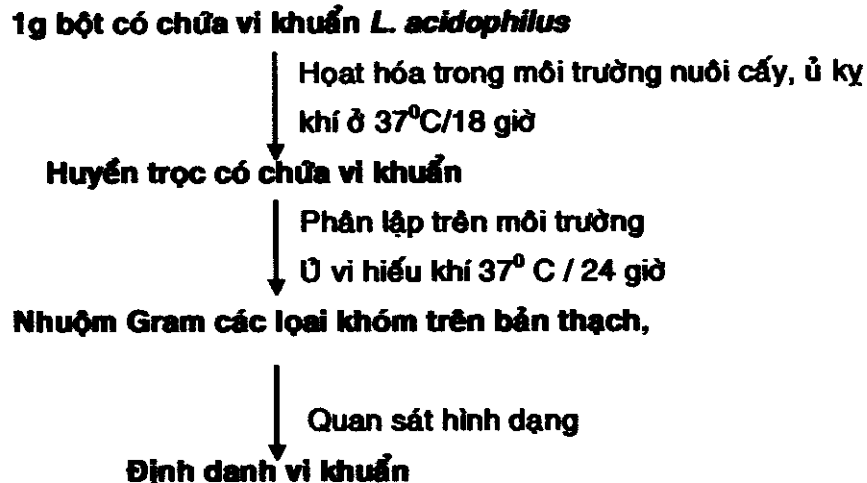


Hình 3.2.3: Các phản ứng sinh hóa của *B.bifidum* qua bộ kit API20A

Kết luận: Dựa vào các kết quả về hình thái, đặc điểm sinh lý và phản ứng sinh hoá , kết luận là *B.bifidum*.

3.2.3.2. Định danh vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus*

Sơ đồ phân lập:

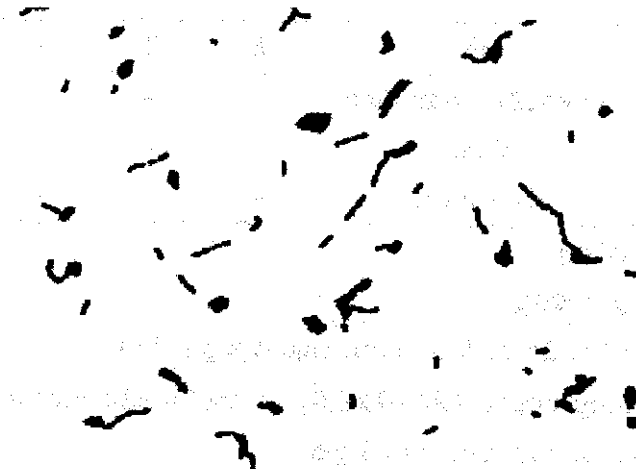


Định danh vi khuẩn

Nguyên tắc: Dựa vào các đặc điểm của giống *Lactobacillus* là 1 nhóm vi khuẩn hình que, Gram (+), không di động, không sinh bào tử, để lâu (72h) sẽ sinh dị dạng, vi khuẩn xếp thành chuỗi dài trong môi trường lỏng. Vi khuẩn có khả năng sinh trưởng ở môi trường acid, vi khuẩn sản xuất acid lactic và có khả năng làm ngưng tụ sữa. Chúng tôi dựa vào các đặc điểm này để nhận định giống.

Kết quả khảo sát hình dạng vi khuẩn:

- Nuôi vi khuẩn trong môi trường lỏng, ủ 37°C/24h. Quan sát dưới kính hiển vi X400 thấy vi khuẩn không di động. Nhuộm màu Gram và quan sát dưới kính hiển vi X1000, thấy vi khuẩn hình que, xếp thành chuỗi dài, bắt màu Gram (+), kích thước vi khuẩn: ngang 0,5µm, dài 2,5-3µm, không sinh bào tử. Tiếp tục ủ 37°C/24h: vi khuẩn có dạng rất dài (dị dạng).



Hình 3.2.4: *L. acidophilus* qua kính hiển vi x1000

• Hình thái khóm vi khuẩn trên môi trường đặc: Cho các khuẩn lạc tròn, lồi, màu trắng đục như sữa, đường kính 0,25-0,5mm. Từ 4-7 ngày khóm vi khuẩn có màu vàng nâu, đường kính 1-1,5mm.



Hình 3.2.5 : Khuẩn lạc *L.acidophilus*

Khảo sát khả năng chịu đựng môi trường acid

Môi trường lỏng được điều chỉnh pH bằng acid lactic tạo chuỗi pH 2, 3, 4, 5 cấy vi khuẩn cần nhận định, ủ 37°C/24h. quan sát sự phát triển của vi khuẩn dựa vào độ đục và nhuộm màu Gram. So sánh khả năng chịu được acid của vi khuẩn với khả năng chịu đựng acid của *E.coli* và *S. aureus*.

Kết quả:

Bảng 3.2.23: Khả năng chịu đựng acid của vi khuẩn nhận định

pH	2	3	4	5
Vi khuẩn nhận định	-	+	+	+
<i>E.coli</i>	-	-	-	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	+

+: có tăng trưởng

-: không tăng trưởng

Kết luận: vi khuẩn có khả năng chịu đựng pH=3

Khảo sát khả năng ngưng kết sữa Cấy vi khuẩn vào môi trường được bổ sung 2% sữa, ủ 37°C. Sữa bị ngưng tụ sau 3 giờ

Kết luận: vi khuẩn nhận định có đặc điểm về hình thái và sinh lý của giống

Lactobacillus

- o Nhận định loài:

Nguyên tắc: giống *Lactobacillus* được phân loại tổng quát như sau:

+ Nhóm đồng lactic: sản xuất acid lactic với lượng cao (trên 80% acid lactic so với acid tổng cộng), được chia làm 3 nhóm nhỏ:

Nhóm thuận nhiệt 37°C-45°C: gồm có *L.lactis*, *L. acidophilus*, *L.bifidus*, *L. helveticus*, ...

Nhóm thuận nhiệt 28°C-32°C: gồm có *L.casei*, *L. leichmannu*, *L. plantarum*.

Nhóm thuận nhiệt 45°C-62°C: gồm có *L.bulgaricus*, *L.thermophilus*, *L. delbruneckii*.

+ Nhóm dị lactic: sản xuất 50% acid lactic, 50% ethanol: *L.acidophilus* thuộc nhóm đồng lactic, thuận nhiệt 37°C-45°C, đây là những đặc điểm để nhận định loài.

Như vậy để nhận định loài cần xác định kiểu lên men lactic, thuận nhiệt và cuối cùng là phản ứng sinh hóa.

Xác định kiểu lên men lactic

Để xác định vi khuẩn lên men theo kiểu đồng lactic hay dị lactic cần định lượng acid tổng cộng và acid lactic tạo thành

- **Định lượng acid tổng cộng:**

Cấy vi khuẩn vào môi trường nuôi cấy, ấp 37°C/48h, lấy 10ml dịch cấy đun để loại CO₂, sau đó định lượng bằng NaOH 0,1N chỉ thị đỏ phenolphthalein. Làm song song với 1 mẫu trắng không cấy vi khuẩn. Thực hiện 3 lần và lấy kết quả trung bình.

Bảng 3.2.24: kết quả định lượng acid tổng cộng

Lần thử nghiệm	Số ml NaOH 0,1 N để trung hòa 10ml dịch cấy
Lần 1	10,8
Lần 2	10,6
Lần 3	10,7
Trung bình	10,7

- **Định lượng acid lactic**

Cấy vi khuẩn vào môi trường lỏng, ấp 37°C/48h, lấy 100ml dịch cấy, thêm vào Ca(OH)₂ đến pH=7. Đun nóng để tủa protein và loại CO₂, cô, bốc hơi để lấy calci lactat. Định lượng calci lactat theo được điển quốc tế

Kết quả: Lượng Calci lactat có trong 10ml dịch cấy là 0,905g tương ứng với 0,74g acid lactic. Để trung hoà 0,74g acid lactic này cần 7,75ml NaOH 0,1N

So sánh lượng acid lactic sản xuất với lượng acid tổng cộng thông qua số ml NaOH 0,1N dùng để trung hoà.

Bảng 3.2.25: So sánh lượng acid lactic và acid tổng cộng

Số ml NaOH Để trung hòa acid tổng cộng	Số ml NaOH để trung hòa acid lactic	% acid lactic so với acid tổng cộng
10,7	7,75	80%

Kết luận: vi khuẩn nhân dinh lên men đồng lactic

Xác định thuận nhiệt: Vi khuẩn có khả năng phát triển trong một khoảng nhiệt độ, nhưng thông thường sẽ có một nhiệt độ thích hợp nhất cho sự tăng trưởng gọi là thuận nhiệt.

Thực hiện: cấy vi khuẩn vào môi trường lỏng, ủ ở các nhiệt độ 32°C, 37°C, 45°C, 50°C, 55°C / 24h. Quan sát sự tăng trưởng của vi khuẩn bằng cách đo độ đục. **Kết quả:**

Bảng 3.2.26: Sự tăng trưởng của vi khuẩn ở các nhiệt độ khác nhau

Nhiệt độ	32°C	37°C	45°C	50°C	55°C
Tăng trưởng	±	++	+	-	-

+: tăng trưởng ít ++: tăng trưởng mạnh

±: tăng trưởng rất ít -: không tăng trưởng

Kết luận: vi khuẩn nhân định có thuận nhiệt là 37°C.

Khảo sát phản ứng sinh hoá:

Để nhận định một cách chắc chắn loài cần thực hiện các phản ứng sinh hoá để phân biệt loài *acidophilus* và các loài khác.

Sử dụng bộ kit API 20A để thực hiện các phản ứng sinh hoá

Thực hiện: cấy vi khuẩn trên môi trường đặc, ủ kỵ khí ở 37°C/24h, sau đó cấy và chuyển vi khuẩn vào môi trường lỏng số 18, ủ 37°C đến khi có được huyền濁 tương đương McFarland số 2. Dùng micropipette cho huyền濁 vi khuẩn vào các giếng của bộ Api 20A. Nhỏ parafin lỏng vào miệng giếng, ủ kỵ khí 24 – 48h. Sau đó đọc kết quả.

Bảng 3.2.27: Phản ứng sinh hóa của *L. acidophilus*

STT	Phản ứng	Kết quả
1	Indol (IND)	-
02	Urê (URE)	-
03	Glucose (GLU)	+
04	Manitol (MAN)	+
05	Lastose (LAC)	+
06	Saccharose (SAC)	+
07	Maltose (MAL)	+
08	Salicin	+
09	Xylose	-
10	Arabinose (ARA)	-
11	Gelatin (GEL)	-
12	Esculin (ESC)	+
13	Glycerol (GLY)	-
14	Cellobiose (CEL)	+
15	Mannose	+
16	Melezitose (MLZ)	-
17	Raffinose (RAF)	-
18	Sorbitol (SOR)	+
19	Rhamnose (RHA)	+
20	Trehalose (TRE)	+
21	Catalase	-

Kết luận: Từ các kết quả thu được về đặc điểm sinh lý của vi khuẩn và phản ứng sinh hoá, có thể kết luận là *L. acidophilus*.

**Hình 3.2.6: Các phản ứng sinh hóa của *L. acidophilus* qua bộ kit API20A**

Áp dụng trong định danh một số mẫu kiểm nghiệm

Chúng tôi áp dụng qui trình kiểm nghiệm để định danh lại một số chế phẩm hiện đang lưu hành trên thị trường. **Kết quả:**

Bảng 3.2.28: Kết quả định danh ở mức độ chi

TT	Đặc điểm	Mẫu							
		001	002	003	004	0061	0062	021	0071
1	MRS	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Hình dạng khóm	Lồi, tròn	Tròn, lồi cao	Tròn, lồi cao	Tròn, lồi cao	Tròn, lồi cao	Lồi, tròn	Lồi, tròn	Lồi, tròn
3	Kích thước	#1mm	#2mm	#2mm	#2mm	#1,5mm	#1mm	#2mm	#1mm
4	Màu sắc	Hơi đục	Hơi đục	Trắng kem	Trắng kem	Trắng kem	Hơi đục	Trắng kem	Hơi đục
6	Gram	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Trực khuẩn	+	+	+	+	+	+	+	+
8	Cách xếp	Cặp, chuỗi ngắn	Cặp, chuỗi ngắn	Cặp, chuỗi ngắn	Cặp, chuỗi ngắn	Cặp, chuỗi ngắn		Cặp, chuỗi ngắn	Cặp, chuỗi ngắn
9	Bào tử	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Di động	-	-	-	-	-	-	+	-
11	Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-
	Kết luận	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng

o Định danh ở mức độ loài

Bảng 3.2.29: Kết quả định danh bằng kit API 20A

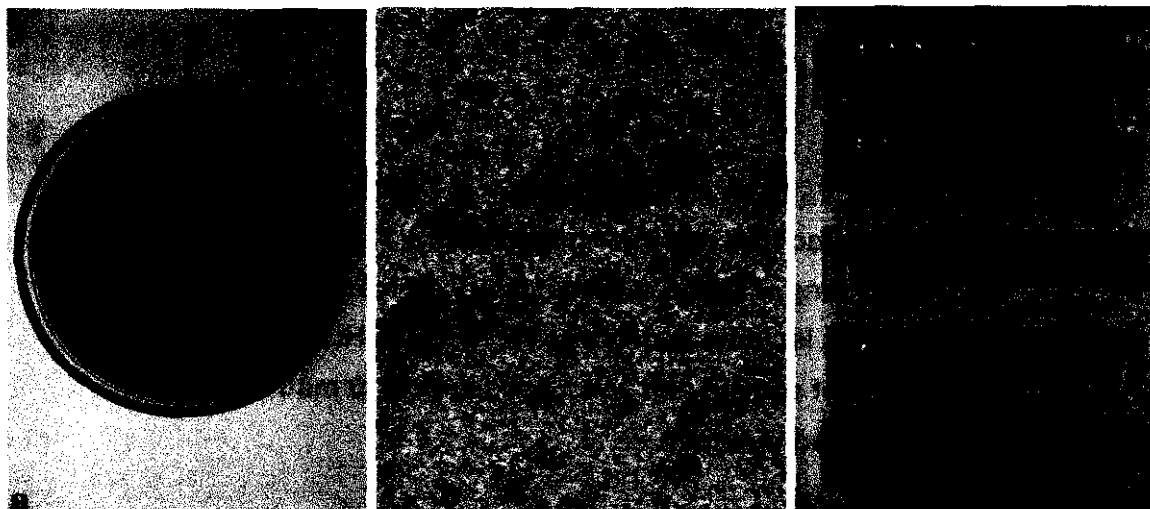
Mẫu	Vi khuẩn đề nghị	Id%	T	Thử lại
001	1. <i>L.acidophilus / jensenii</i>	70,1	1,00	0
	2. <i>Eubact. Aerofaciens</i>	27,8	0,97	0
002	1. <i>L.acidophilus / jensenii</i>	58,6	0,13	3
	2. <i>Bifidobacterium spp</i>	17,2	0,13	4
	3. <i>Clostridium ranorum</i>	14,8	0,11	2
	4. <i>Actino. Israelii</i>	7,9	0,11	3
003	1. <i>Bifidobacterium spp</i>	91,1	0,25	3
	2. <i>Actino. israelii</i>	4,8	0,07	3
	3. <i>L.acidophilus / jensenii</i>	3,1	0,00	4
004	Không phân biệt được			
0061	1. <i>Bifidobacterium spp</i>	91,9	0,42	3
	2. <i>Actino. israelii</i>	4,8	0,24	3
	3. <i>L.acidophilus / jensenii</i>	3,1	0,08	4
0062	1. <i>L.acidophilus / jensenii</i>	70,1	1	0
	2. <i>Eubact. aerofaciens</i>	27,8	0,97	0
0071	1. <i>L.acidophilus / jensenii</i>	68,1	0,83	0
	2. <i>Eubact. aerofaciens</i>	29,7	0,81	0
021	1. <i>Bifidobacterium spp</i>	65,8	0,51	2
	2. <i>Actino. israelii</i>	26,5	0,48	2
	3. <i>Bifidobacterium spp 1</i>	7,3	0,47	3

⇒ Kit Api 20 A chỉ có thể phân biệt được một vài loài trong chi *Lactobacillus*.

Bảng 3.2.30: Kết quả định danh bằng kit API 50 CHL

Mẫu	Vi khuẩn đề nghị	Id%	T	Thử lại	Test bổ sung	Kết luận
001	1. <i>L. acidophilus</i> 1	49,6	0,92	0	Không làm quay AS phân cực	<i>L. acidophilus</i>
	2. <i>L. delbrueckii</i> ssp <i>lactic</i>	43,1	0,84	1	Làm quay AS phân cực	
002	1. <i>L. rhamnosus</i>	91,5	0,54	2	Mọc được ở 45°C	<i>L. rhamnosus</i>
	2. <i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	8,2	0,05	2	Không mọc được ở 45°C	
003	1. <i>L. rhamnosus</i>	93,6	0,42	3		<i>L. rhamnosus</i>
004	1. <i>L. rhamnosus</i>	90,4	0,51	3	Mọc được ở 45°C	<i>L. rhamnosus</i>
	2. <i>L. paracasei</i> ssp <i>paracasei</i> 1	8,6	0,42	4	Không mọc được ở 45°C	
0061	1. <i>L. rhamnosus</i>	99,9	0,99	0		<i>L. rhamnosus</i>
0062	1. <i>L. acidophilus</i> 1	84,9	0,89	0		<i>L. acidophilus</i> 1
0071	1. <i>L. acidophilus</i> 3	47,9	0,49	0	Trục khuẩn	<i>L. acidophilus</i> 3
	2. <i>Lactococcus lactic</i>	33,9	0,41	1	Cầu khuẩn	
021	1. <i>L. plantarum</i>	99,9	0,82	0		<i>L. plantarum</i>

**L. rhamnosus* còn gọi là *L. casei* ssp *rhamnosus*.

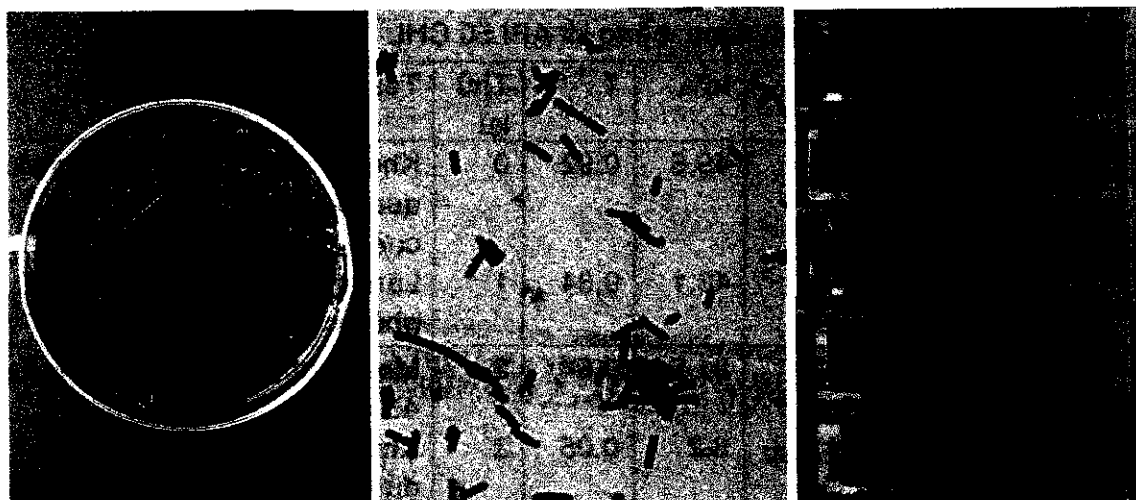


a – Khuẩn lạc trên môi trường thạch MRS.

b – Hình dạng vi khuẩn quan sát trên kính hiển vi (x320).

c – Kết quả lên men đường trên Kit API 50 CHL.

Hình 3.2.7: Một số hình ảnh về *L. acidophilus* 1 từ mẫu 001.

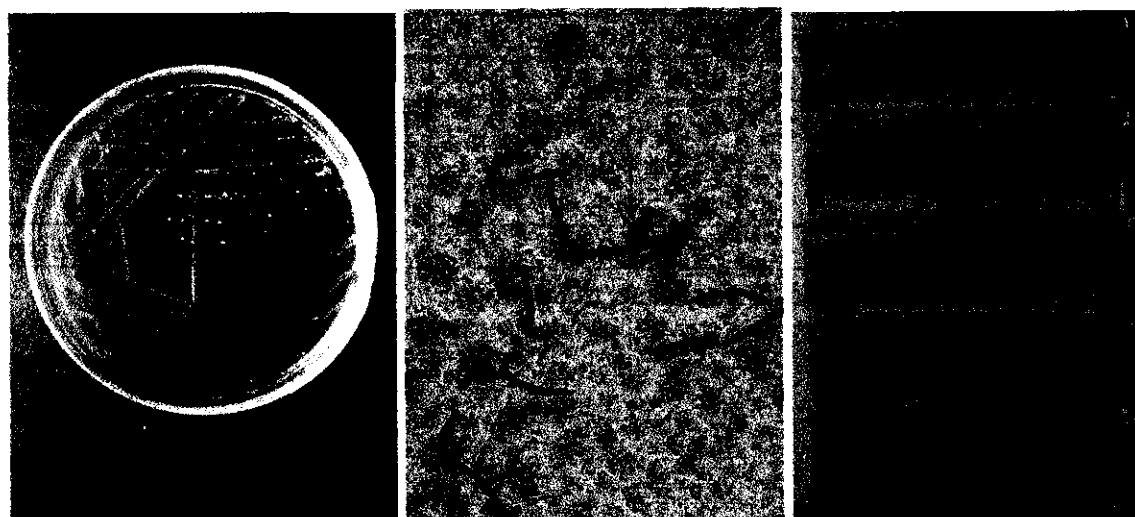


a – Khuẩn lạc trên môi trường thạch MRS.

b – Hình dạng vi khuẩn quan sát trên kính hiển vi (x250).

c – Kết quả lên men đường trên Kit API 50 CHL.

Hình 3.2.8: Một số hình ảnh về *L. acidophilus* 1 từ mẫu 006.



a – Khuẩn lạc trên môi trường thạch MRS.

b – Hình dạng vi khuẩn quan sát trên kính hiển vi (x250).

c – Kết quả lên men đường trên Kit API 50 CHL.

Hình 3.2.9: Một số hình ảnh về *L. acidophilus* 3 từ mẫu 007.

3.2.3.3. Định lượng số vi khuẩn

Thẩm định qui trình

- o Phương pháp trộn trong môi trường rắn

- Độ chính xác

Mẫu sử dụng: 004

Môi trường sử dụng: Môi trường MRS agar.

Nồng độ pha loãng: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} .

Loại giá trị bất thường bằng trắc nghiệm Dixon

$Q = 0,237 < Q_{\alpha} = 0,389$: Dãy không có giá trị bất thường.

Bảng 3.2.31: Kết quả khảo sát độ chính xác

	Nồng độ 10^{-9}				Kết quả		
	Đĩa 1	Đĩa 2	Đĩa 3	TB	N	Nmin	Nmax
Lần 1	45	36	42	41,00	$4,10 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^{10}$	$4,9 \times 10^{10}$
Lần 2	47	46	40	44,33	$4,43 \times 10^{10}$	$3,7 \times 10^{10}$	$5,3 \times 10^{10}$
Lần 3	45	46	40	43,67	$4,37 \times 10^{10}$	$3,7 \times 10^{10}$	$5,2 \times 10^{10}$
Lần 4	38	36	42	38,67	$3,87 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^{10}$	$4,6 \times 10^{10}$
Lần 5	42	48	46	45,33	$4,53 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{10}$	$4,5 \times 10^{10}$
Lần 6	43	42	39	41,33	$4,13 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^{10}$	$4,9 \times 10^{10}$
Số liệu thống kê	Trung bình				$4,24 \times 10^{10}$		
	S				$0,25 \times 10^{10}$		
	Hệ số phân tán CV%				5,87 < 15%		

- Độ đúng:

Mẫu sử dụng: Mẫu 004 được pha loãng 10 lần.

Môi trường sử dụng: MRS agar.

Loại giá trị bất thường bằng trắc nghiệm Dixon

- $Q_{50\%} = 0,636 < Q_{\alpha} = 0,667$: Dãy không có giá trị bất thường.
- $Q_{100\%} = 0,381 < Q_{\alpha} = 0,667$: Dãy không có giá trị bất thường.
- $Q_{150\%} = 0,364 < Q_{\alpha} = 0,667$: Dãy không có giá trị bất thường.

Bảng 3.2.32: Kết quả khảo sát độ đúng

N	Tỷ lệ thêm %	Giá trị lý thuyết	Nồng độ: 10^{-8}			Trung bình	Tổng đếm được	Thực tế thu hồi	Tỷ lệ phục hồi Pi (%)
			Đĩa 1	Đĩa 2	Đĩa 3				
1	50	$2 \times 9,64 \times 10^8$	65	62	63	63,33	$6,33 \times 10^9$	$2,09 \times 10^9$	108,58
2			58	65	62	61,67	$6,17 \times 10^9$	$1,93 \times 10^9$	99,93
3			60	61	60	60,33	$6,03 \times 10^9$	$1,80 \times 10^9$	93,01
4	100	$4 \times 9,64 \times 10^8$	82	80	76	79,33	$7,93 \times 10^9$	$3,70 \times 10^9$	95,78
5			80	88	85	84,33	$8,43 \times 10^9$	$4,20 \times 10^9$	108,75
6			74	81	75	76,67	$7,70 \times 10^9$	$3,43 \times 10^9$	88,87
7	150	$6 \times 9,64 \times 10^8$	98	90	98	95,33	$9,53 \times 10^9$	$5,30 \times 10^9$	91,52
8			96	99	91	95,33	$9,53 \times 10^9$	$5,30 \times 10^9$	91,52
9			95	98	92	95,00	$9,50 \times 10^9$	$5,26 \times 10^9$	90,94

Tỷ lệ phục hồi $F = \frac{\sum_{i=1}^N P_i}{N} = 96,54\% \Rightarrow$ Lệch 3,46 % so với giá trị lý thuyết.

(Độ lệch cho phép $\pm 15\%$).

- Phương pháp trộn trong môi trường bán lỏng

- Độ chính xác:

Mẫu sử dụng: 004

Môi trường sử dụng: Môi trường MRS broth + 2% agar.

Nồng độ pha loãng: 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} .

Loại giá trị bất thường bằng trắc nghiệm Dixon

$Q = 0,200 < Q_\alpha = 0,389$: Dãy không có giá trị bất thường.

Bảng 3.2.33: Kết quả khảo sát độ chính xác

	Nồng độ: 10^{-9}				Kết quả		
	Ống 1	Ống 2	Ống 3	Trung bình	N	Nmin	Nmax
Lần 1	35	40	42	39,00	$3,90 \times 10^{10}$	$3,2 \times 10^{10}$	$4,7 \times 10^{10}$
Lần 2	42	46	40	42,67	$4,27 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{10}$	$5,1 \times 10^{10}$
Lần 3	47	40	41	42,67	$4,27 \times 10^{10}$	$3,6 \times 10^{10}$	$4,3 \times 10^{10}$
Lần 4	42	49	44	45,00	$4,50 \times 10^{10}$	$3,8 \times 10^{10}$	$5,3 \times 10^{10}$
Lần 5	42	40	45	42,33	$4,23 \times 10^{10}$	$3,5 \times 10^{10}$	$5,0 \times 10^{10}$
Lần 6	43	40	40	41,00	$4,10 \times 10^{10}$	$3,4 \times 10^{10}$	$4,9 \times 10^{10}$
Số liệu thống kê			Trung bình		$4,21 \times 10^{10}$		
			S		$0,19 \times 10^{10}$		
			Hệ số phân tán CV%		4,74% <15%		

- Độ đúng

Mẫu sử dụng: 004

Môi trường sử dụng: Môi trường MRS broth + 2% agar

Loại giá trị bất thường bằng trắc nghiệm Dixon

- $Q_{50\%} = 0,500 < Q_\alpha = 0,667$: Dãy không có giá trị bất thường.
- $Q_{100\%} = 0,375 < Q_\alpha = 0,667$: Dãy không có giá trị bất thường.
- $Q_{150\%} = 0,455 < Q_\alpha = 0,667$: Dãy không có giá trị bất thường

Bảng 3.2.34: Kết quả khảo sát độ đúng

N	Tỷ lệ thêm vào	Giá trị lý thuyết	Nồng độ: $0,5 \times 10^{-8}$			Trung bình	Tổng đếm được	Thực tế thu hồi	Tỷ lệ phục hồi P_i (%)
			Ống 1	Ống 2	Ống 3				
1	50%	$2 \times 9,64 \times 10^8$	32	30	31	31,00	$6,20 \times 10^9$	$1,96 \times 10^9$	101,66
2			30	32	34	32,00	$6,40 \times 10^9$	$2,16 \times 10^9$	112,03
3			30	31	32	31,00	$6,20 \times 10^9$	$1,96 \times 10^9$	101,66
4	100%	$4 \times 9,64 \times 10^8$	41	41	36	39,33	$7,87 \times 10^9$	$3,63 \times 10^9$	94,05
5			40	37	43	40,00	$8,00 \times 10^9$	$3,76 \times 10^9$	97,51
6			42	37	40	39,67	$7,97 \times 10^9$	$3,69 \times 10^9$	95,78
7	150%	$6 \times 9,64 \times 10^8$	50	46	48	48,00	$9,60 \times 10^9$	$5,36 \times 10^9$	92,67
8			42	50	46	47,00	$9,40 \times 10^9$	$5,16 \times 10^9$	85,75
9			48	47	46	47,00	$9,40 \times 10^9$	$5,16 \times 10^9$	89,21

Tỷ lệ phục hồi $F = \frac{\sum_{i=1}^N P_i}{N} = 96,7\% \Rightarrow$ Lệch 3,3% so với giá trị lý thuyết.

(Độ lệch cho phép $\pm 15\%$).

So sánh phương pháp môi trường rắn và môi trường bán lỏng

Mẫu sử dụng: 002

Môi trường rắn: Môi trường MRS agar

Môi trường bán lỏng: Môi trường MRS broth + 0,2% agar.

Nồng độ pha loãng: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 2×10^{-8} , 10^{-9} .

Loại giá trị bất thường bằng trắc nghiệm Dixon

- $Q_{\text{Môi trường rắn}} = 0,261 < Q_{\alpha} = 0,389$: Dãy không có giá trị bất thường.
- $Q_{\text{Môi trường bán lỏng}} = 0,242 < Q_{\alpha} = 0,389$: Dãy không có giá trị bất thường.

Bảng 3.2.35: Kết quả so sánh môi trường rắn và môi trường bán lỏng

Phương pháp	Nồng độ		Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Lần 6
Môi trường rắn	10^{-7}	Đĩa 1	228	230	220	238	224	228
		Đĩa 2	236	232	226	230	234	230
		Đĩa 3	230	228	228	226	236	228
		TB	231,33	230,00	224,67	231,33	231,33	228,67
		Kết quả	$2,31 \times 10^9$	$2,30 \times 10^9$	$2,25 \times 10^9$	$2,31 \times 10^9$	$2,31 \times 10^9$	$2,29 \times 10^9$
Môi trường bán lỏng	$2 \cdot 10^{-8}$	Ống 1	55	40	49	49	47	45
		Ống 2	62	43	48	46	45	53
		Ống 3	54	42	52	48	52	51
		TB	57,00	41,67	49,67	47,67	48,00	49,67
		Kết quả	$2,85 \times 10^9$	$2,08 \times 10^9$	$2,48 \times 10^9$	$2,38 \times 10^9$	$2,40 \times 10^9$	$2,48 \times 10^9$

$t=1,50 < t_{\alpha}=2,57 \Rightarrow$ Hai phương pháp không khác nhau.

So sánh môi trường thạch MRS và môi trường thạch Tomato

Môi trường sử dụng: MRS agar và môi trường Tomato agar.

Mẫu sử dụng: 002

Loại giá trị bất thường bằng trắc nghiệm Dixon

- $Q_{\text{Môi trường MRS agar}} = 0,261 < Q_{\alpha} = 0,389$: Dãy không có giá trị bất thường.
- $Q_{\text{Môi trường Tomato agar}} = 0,333 < Q_{\alpha} = 0,389$ Dãy không có giá trị bất thường.

Bảng 3.2.36: Kết quả so sánh môi trường thạch MRS và thạch Tomato

Phương pháp	Nồng độ		Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lần 4	Lần 5	Lần 6
Môi trường MRS agar	10^{-7}	Đĩa 1	228	230	220	238	224	228
		Đĩa 2	236	232	226	230	234	230
		Đĩa 3	230	228	228	226	236	228
		Trung bình	231,33	230,00	224,67	231,33	231,33	228,67
		Kết quả	$2,31 \times 10^9$	$2,30 \times 10^9$	$2,24 \times 10^9$	$2,31 \times 10^9$	$2,31 \times 10^9$	$2,28 \times 10^9$
Môi trường Tomato agar	10^{-7}	Đĩa 1	229	231	228	236	224	230
		Đĩa 2	238	230	226	230	232	230
		Đĩa 3	236	228	229	228	238	225
		Trung bình	234,33	229,67	227,67	231,33	231,33	228,33
		Kết quả	$2,34 \times 10^9$	$2,30 \times 10^9$	$2,28 \times 10^9$	$2,31 \times 10^9$	$2,31 \times 10^9$	$2,28 \times 10^9$

$t = 0,61 < t_{\alpha} = 2,23 \Rightarrow$ Hai môi trường không khác nhau.

Khả năng chịu pH acid dạ dày và dịch mật

Khả năng chịu acid dạ dày

Mẫu được thử song song với:

- Chứng dương là *Bacillus subtilis*
- Chứng âm *Pseudomonas aeruginosa*

Mỗi thử nghiệm được lặp lại 3 lần.

Bảng 3.2.37: Khả năng chịu pH acid dạ dày

STT	PH	Mẫu					Nhận xét
		001	002	003	004	021	
1	1	+	+	+	+	+	Tất cả các mẫu đều có khả năng chịu pH acid từ 1-4 trong 3 h.
2	2	+	+	+	+	+	
3	3	+	+	+	+	+	
4	4	+	+	+	+	+	

Khả năng chịu dịch mật

Mẫu được thử song song với:

- Hai chứng dương là: *Streptococcus faecalis* và *E. coli*.

- Hai chủng âm là: *Staphylococcus aureus* và *Pseudomonas aeruginosa*.

Mỗi thử nghiệm được lặp lại 3 lần.

Bảng 3.2.38: Khả năng chịu dịch mật

STT	Nồng độ%	Mẫu					Nhận xét
		001	002	003	004	021	
1	2,0	+	+	+	+	+	Tất cả các mẫu đều chịu được 3h với nồng độ muối mật cao nhất là 2%.
2	1,5	+	+	+	+	+	
3	1,0	+	+	+	+	+	
4	0,5	+	+	+	+	+	

Khả năng chịu pH acid và dịch mật

- pH thay đổi từ 1–4, nồng độ acid mật là 0,5%.

Bảng 3.2.39: Khả năng chịu acid và dịch mật 0,5%

STT	pH	Mẫu					Nhận xét
		001	002	003	004	021	
1	1	+	+	+	+	+	Tất cả các mẫu còn sống qua 2 giai đoạn.
2	2	+	+	+	+	+	
3	3	+	+	+	+	+	
4	4	+	+	+	+	+	

- pH thay đổi từ 1–4, nồng độ acid mật là 1,0%.

Bảng 3.2.40: Khả năng chịu acid và muối mật 1,0%

STT	pH	Mẫu					Nhận xét
		001	002	003	004	021	
1	1	+	+	+	+	+	Tất cả các mẫu còn sống qua 2 giai đoạn.
2	2	+	+	+	+	+	
3	3	+	+	+	+	+	
4	4	+	+	+	+	+	

- pH thay đổi từ 1–4, nồng độ acid mật là 1,5.

Bảng 3.2 41: Khả năng chịu acid và dịch mật 1,5%

STT	pH	Mẫu					Nhận xét
		001	002	003	004	021	
1	1	+	+	+	+	+	Tất cả các mẫu còn sống qua 2 giai đoạn.
2	2	+	+	+	+	+	
3	3	+	+	+	+	+	
4	4	+	+	+	+	+	

pH thay đổi từ 1–4, nồng độ acid mật là 2,0%.

Bảng 3.2.42: Khả năng chịu acid và dịch mật 2,0%

STT	pH	Mẫu					Nhận xét
		001	002	003	004	021	
1.	1	+	+	+	+	+	Tất cả các mẫu còn sống qua 2 giai đoạn.
2.	2	+	+	+	+	+	
3.	3	+	+	+	+	+	
4.	4	+	+	+	+	+	

3.2.3.4. Xác định độ nhiễm khuẩn và nấm mốc.(ĐBVN III PL 10.7)

3.4.1. Tìm *E.coli* và *Staphylococcus aureus*

Nguyên tắc: Dùng môi trường chọn lọc cho *E.coli* và *Staphylococcus aureus* để cấy dịch (Pha từ chế phẩm bằng nước muối sinh lý), Quan sát sự mọc trên các môi trường để kết luận có nhiễm các vi khuẩn này không

Bảng 3.2.43: Kết quả khảo sát độ nhiễm khuẩn

Mẫu	Mức tiêu chuẩn	001	002	003	004	Kết luận
Tổng số nấm	< 100 CFU/g	0	0	16	4	Đạt
<i>Staphylococcus aureus</i>	Không được có/ 1g	–	–	–	–	Đạt
<i>Salmonella sp.</i>	Không được có/ 10g	–	–	–	–	Đạt
<i>E. coli</i>	Không được có/ 1g	–	–	–	–	Đạt
<i>Enterobacteria</i> & vi khuẩn Gram âm khác	< 100CFU/ 1g	<1	<1	<10	<1	Đạt
Kết luận		Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	

Ảnh hưởng của mẫu lên khả năng phát hiện

Vì các *Lactobacillus* được cho là có khả năng cạnh tranh với các vi khuẩn gây bệnh, chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng phát hiện lại các vi khuẩn này khi trộn trong mẫu *Lactobacillus*. Những vi khuẩn được chọn thêm vào mẫu là những vi khuẩn mà các Dược điển quy định không được phép có trong các chế phẩm dùng đường uống không thể tiệt trùng được.

Bảng 3.2.44: Ảnh hưởng của mẫu lên khả năng phát hiện

Nồng độ vi sinh vật thêm vào	100 tế bào/g		10 tế bào/g		1 tế bào/g	
	M ₁₀₀	C ₁₀₀	M ₁₀	C ₁₀	M ₁	C ₁
Vi sinh vật thêm vào	<i>Staphylococcus aureus</i>					
Số mẫu phát hiện	4/4	4/4	4/4	4/4	2/4	3/4
Vi sinh vật thêm vào	<i>E. coli</i>					
Số mẫu phát hiện	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	4/4
Vi sinh vật thêm vào	<i>Salmonella paratyphi</i>					
Số mẫu phát hiện	4/4	4/4	4/4	4/4	1/4	2/4
Vi sinh vật thêm vào	<i>Candida albicans</i>					
Số mẫu phát hiện	4/4	4/4	4/4	4/4	3/4	3/4

Bảng 3.2.45: Kết quả kiểm tra nhiễm vi khuẩn *E.coli* và *Staphylococcus aureus* sau quá trình đông khô.

Mẫu	Khóm trên môi trường MC	Khóm trên môi trường thạch muối Manitol	Kết luận
S30%	Khuẩn tròn màu trắng lục	Khuẩn lạc nhỏ không có ánh đen kim loại	Không nhiễm <i>E.coli</i> và <i>S. aureus</i>
S40%	Khuẩn tròn màu trắng lục	Khuẩn lạc nhỏ không có ánh đen kim loại	Không nhiễm <i>E.coli</i> và <i>S. aureus</i>
S50%	Khuẩn tròn màu trắng lục	Khuẩn lạc nhỏ không có ánh đen kim loại	Không nhiễm <i>E.coli</i> và <i>S. aureus</i>
L _{15%}	Khuẩn tròn màu trắng lục	Khuẩn lạc nhỏ không có ánh đen kim loại	Không nhiễm <i>E.coli</i> và <i>S. aureus</i>
L _{20%}	Khuẩn tròn màu trắng lục	Khuẩn lạc nhỏ không có ánh đen kim loại	Không nhiễm <i>E.coli</i> và <i>S. aureus</i>
L _{25%}	Khuẩn tròn màu trắng lục	Khuẩn lạc nhỏ không có ánh đen kim loại	Không nhiễm <i>E.coli</i> và <i>S. aureus</i>
L _{30%}	Khuẩn tròn màu trắng lục	Khuẩn lạc nhỏ không có ánh đen kim loại	Không nhiễm <i>E.coli</i> và <i>S. aureus</i>

Kết luận: Vậy tất cả mẫu thử nghiệm đều không có nhiễm *E.coli* và *S. aureus*

Xác định độ nhiễm nấm mốc nấm men

Nguyên tắc: Dùng môi trường chọn lọc cho nấm mốc và nấm men để cấy chế phẩm đông khô sau khi pha bằng nước muối sinh lý. Quan sát sự mọc để kết luận sự nhiễm

nấm mốc và nấm men.

Kết quả:

Bảng 3.2.46: Kết quả kiểm nghiệm nấm mốc nấm men của bột sau khi đông khô

Mẫu	Kết quả (1g)
S30%	2
S40%	8
S50%	17
L _{15%}	19
L _{20%}	5
L _{25%}	1
L _{30%}	20

Nhận xét: Sau một thời gian bảo quản thì hầu như tất cả các mẫu đều bị nhiễm nấm mốc, nhưng tỉ lệ thì chấp nhận được (Giới hạn trong được điển cho phép là <100 khóm/1g)

3.2.3.5. Xác định độ ẩm của bột đông khô bằng phương pháp sấy (D ĐVN III PL 5.16)

Nguyên tắc: Sấy khô một lượng chế phẩm nhất định ở 110 °C trong những điều kiện quy định dựa vào độ mất khối lượng tính ra được độ ẩm.

Tiến hành: Dùng 10 chén sứ đã được rửa sạch cho vào tủ sấy 110 °C trong vòng 30 phút, Lấy chén sứ ra bỏ vào tủ sấy cho nguội, sau đó cân bì, được khối lượng m₁. Tiếp tục bỏ chén sứ vào tủ sấy 30 phút lấy ra cân lần thứ hai, nếu hai lần cân không cách nhau 0,5 mg thì được khối lượng bì

Dùng cân phân tích chính xác (Bốn số lẻ) Cân 2 g bột chế phẩm (chênh lệch không lớn hơn 10% khoảng 0,2 g), được khối lượng m₂, cho vào chén sứ đã được cân bì, dàn mỏng chế phẩm khoảng 0,5 mm. Bỏ vào tủ sấy 105 °C (chênh lệch cho phép khoảng 2 °C) Sấy trong vòng 4 h, lấy ra bỏ vào bình hút ẩm cho nguội và cân, sau đó bỏ vào tủ sấy tiếp tục sấy trong vòng 30 phút, Lấy ra cân lần thứ hai. Tiếp làm cho tới khối lượng không đổi được khối lượng m₃. Khi đó sẽ tính được độ ẩm bằng công thức sau:

$$\text{Độ ẩm của chế phẩm} = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100\%$$

Kết quả:

Bảng 3.2.47: Độ ẩm bột đông khô

Mẫu	Bì(gam)	Bì+bột trước sấy (Gam)	Bì+bột sau sấy (Gam)	Độ ẩm %
Sữa 30%	47,6081	49,7148	49,506	9,91
Sữa 40%	49,2608	51,3183	51,037	13,67
Sữa 50%	44,2095	46,2707	46,0251	11,92

3.2.4. Khảo sát khả năng đề kháng kháng sinh**3.2.4.1. MIC của chủng *Bifidobacterium bifidum* và *Lactobacillus acidophilus***

B. bifidum và là những vi khuẩn kỵ khí và kỵ khí tùy ý, khó mọc, nên theo Tracy D. Wilking và Teresa Thiel, ngoài phương pháp xác định sự nhạy cảm với kháng sinh bằng phương pháp khuếch tán trên thạch còn nên xác định MIC bằng phương pháp pha loãng kháng sinh trong môi trường lỏng

Kết quả:

Bảng 3.2.48. Kết quả MIC của *B. bifidum*

Tên kháng sinh	MIC (µg/ml)
1. Amoxicillin	4
2. Amoxicillin + acid clavulanic	1
3. Ampicillin + sulbactam	4
4. Imipenem	> 32
5. Cefamandol	32
6. Cefotaxim	32
7. Ceftriaxon	32
8. Cefoperazon	32
9. Chloramphenicol	16
10. Cefalexin	32
11. Tetracyclin	8
12. Clindamycin	< 1
13. Metronidazol	32
14. Erythromycin	16
15. Rifampicin	64
16. Vancomycin	4
17. Ciprofloxacin	4

Dựa vào biện giải chuẩn đối với vi khuẩn kỵ khí của NCCLS (phụ lục) để biện giải sự nhạy cảm hay đề kháng của *B. bifidum* với các kháng sinh, kết quả như sau:

- *B.bifidum* đề kháng với Imidazol, Cefamandol, Cefotaxim, Cefoperazon, Cefalexin, Erythromycin, Rifampicin; nhạy cảm với Amoxycillin, Amoxicillin + acid clavulanic, Ampicillin + sulbactam, Chloramphenicol, Clindamycin, Metronidazol, Vancomycin, Tetracyclin. Nhạy cảm trung gian với Ciprofloxacin

Bảng 3.2.49: Kết quả nhạy cảm với các kháng sinh của *B. bifidum*

Đề kháng	Nhạy cảm trung gian	Nhạy cảm
Imidazol	Ciprofloxacin	Amoxicillin
Cefamandol		Amoxicillin + acid clavulanic
Cefotaxim		Ampicillin + sulbactam
Cefoperazon		Chloramphenicol
Cefalexin		Clindamycin
Erythromycin		Metronidazol
Rifampicin		Vancomycin
		Tetracyclin

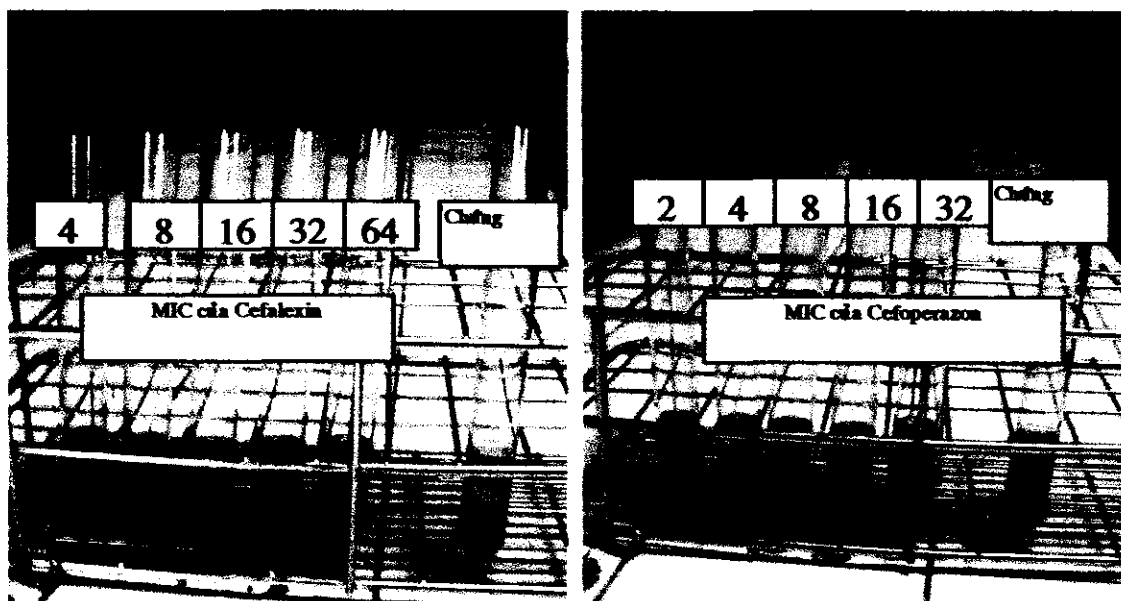
Bảng 3.2.50: Kết quả MIC của *L. acidophilus*

Tên kháng sinh	MIC (µg/ml)
1. Amoxicillin	< 1
2. Amoxicillin + acid clavulanic	< 2 + 1
3. Ampicillin + sulbactam	< 2 + 1
4. Imipenem	> 32
5. Cefamandol	> 32
6. Cefotaxim	16
7. Ceftriaxon	> 32
8. Cefoperazon	> 32
9. Chloramphenicol	16
10. Cefalexin	> 64
11. Tetracyclin	4
12. Clindamycin	> 16
13. Metronidazol	> 128
14. Erythromycin	4
15. Rifampicin	2
16. Vancomycin	> 32

- *L. acidophilus* nhạy cảm với Amoxicillin, Amoxicillin + acid clavulanic, Ampicillin + sulbactam, Tetracyclin, Erythromycin, Rifampicin, Chloramphenicol; đề kháng với Imidazol, Cefamandol, Ceftriaxon, Cefoperazon, Cefalexin, Clindamycin, Metronidazol, Vancomycin; nhạy cảm trung gian với Cefotaxim.

Bảng 3.2.51: Kết quả nhạy cảm với các kháng sinh của *L. acidophilus*

Nhạy cảm	Nhạy cảm trung gian	Đề kháng
Amoxicillin	Cefotaxim	Imidazol
Amoxicillin + acid clavulanic		Cefamandol
Ampicillin + sulbactam		Ceftriaxon
Tetracyclin		Cefoperazon
Erythromycin		Cefalexin
Rifampicin		Clindamycin
Chloramphenicol		Metronidazol
		Vancomycin



Hình 3.2.10. Hình ảnh MIC của *B. bifidum* với kháng sinh Cefalexin và Cefoperazon

Bảng 3.2.52: Kết quả khảo sát sự đề kháng kháng sinh bằng phương pháp tìm MIC trên các mẫu lưu hành trên thị trường

STT	Kháng sinh	Ký hiệu	MIC (μg hoặc UI/ml) của các mẫu thử nghiệm					Kết quả
			001	002	003	004	021	
1	Penicillin	Pn	0,125	0,25	0,25	0,25	0,5	Cả 5 mẫu đều nhạy cảm
2	Ampicillin	Am	1,0	4,0	2,0	4	1,0	Cả 5 mẫu đều nhạy cảm
3	Streptomycin	Sm	128	512	512	512	512	Cả 5 mẫu đều đề kháng
4	Chloramphenicol	Cl	4	16	16	16	8	Mẫu 001 nhạy cảm
5	Tetracyclin	Te	4	4	2	2	64	Mẫu 021 đề kháng
6	Erythromycin	Er	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	< 0,5	Cả 5 mẫu đều nhạy cảm
7	Vancomycin	Va	> 512	> 512	> 512	> 512	> 512	Cả 5 mẫu đều nhạy cảm
8	Cephalexin	Cp	8	256	256	256	2	Mẫu 002, 003, 004 đề kháng
9	Ciprofloxacin	Ci	128	128	128	256	128	Cả 5 mẫu đều đề kháng

3.2.4.2. Phương pháp đặt đĩa giấy

Các đĩa giấy kháng sinh được sử dụng: Penicillin 10 UI, Ampicillin 10 μg , Cephalexin 30 μg , Tetracyclin 30 μg , Chloramphenicol 30 μg , Erythromycin 15 μg , Ciprofloxacin 5 μg , Streptomycin 10 UI, Bactrim 1,25/ 3,75 μg , Rifampicin 5 μg , Vancomycin 30 μg là đại diện cho các nhóm kháng sinh thông dụng hay được sử dụng hiện nay.

Bảng 3.2.53: Kết quả khảo sát sự đề kháng kháng sinh bằng phương pháp đặt đĩa giấy

S TT	Kháng sinh	Ký hiệu.	Đường kính vòng vô khuẩn (mm)					Kết quả
			001	002	003	004	021	
1	Penicillin	Pn	34,0	25,7	25,0	26,5	27,5	Cả 5 mẫu đều nhạy cảm
2	Ampicillin	Am	26,5	21,0	21,6	20,0	32,5	Cả 5 mẫu đều nhạy cảm
3	Cephalexin	Cp	22,4	–	–	–	31,0	Mẫu 002, 003, 004 đề kháng
4	Tetracyclin	Te	27,0	26,4	26,5	26,6	13,0	Mẫu 021 đề kháng
5	Chloramphenicol	Cl	27,4	17,6	16,6	16,0	22,0	
6	Erythromycin	Er	23,2	21,0	18,6	19,0	19,0	Cả 5 mẫu đều nhạy cảm
7	Ciprofloxacin	Ci	–	–	–	–	–	Cả 5 mẫu đều đề kháng
8	Streptomycin	Sm	–	–	–	–	–	Cả 5 mẫu đều đề kháng
9	Bactrim	Bt	14,0	–	–	–	12,0	Cả 5 mẫu đều đề kháng
10	Rifampicin	Rf	14,4	20,4	19,2	21,4	14,0	Mẫu 002, 003, 004 đề kháng
11	Vacomycin	Va	–	–	–	–	–	Cả 5 mẫu đều đề kháng

So sánh sự tương đương giữa 2 phương pháp

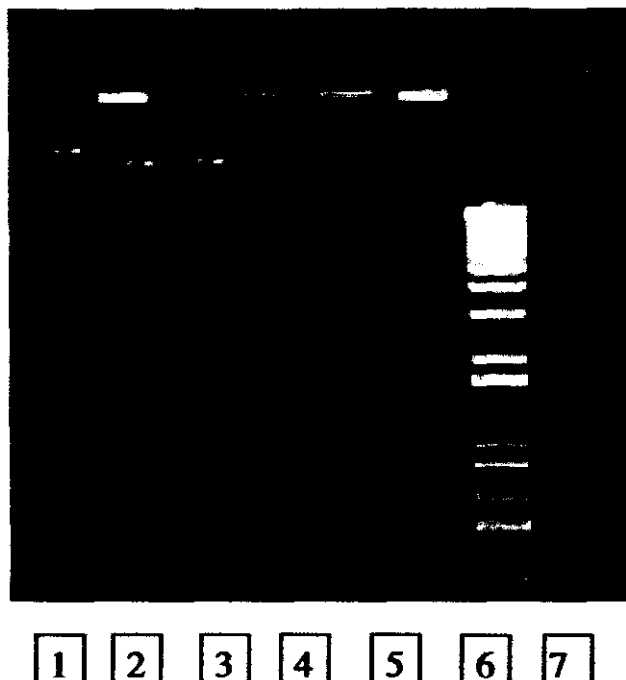
Hai phương pháp trên được coi là tương đương nhau. Tuy nhiên, như đã đề cập ở trên, *Lactobacillus* không phải là chủng gây bệnh nên cho đến thời điểm này, chưa có một nghiên cứu nào được công bố qui định về những điểm giới hạn (break-point) để xác định ở mức độ nào thì được coi là nhạy cảm hay đề kháng. Chúng tôi tạm tham khảo một số giới hạn qui định cho những vi khuẩn khác, do đó, chỉ dám đánh giá những kết quả nào chắc chắn là đề kháng hay nhạy cảm. Đối với những thông số nằm trong khoảng trung gian, chúng tôi tạm thời chưa đánh giá.

3.2.5.Xác định có mặt plasmid và khả năng chuyển plasmid

3.2.5.1 .Xác định có mặt plasmid

Thực hiện qui trình chiết plasmid DNA , lấy mẫu chạy điện di trên gel agarose 1% với điện thế cố định 100 volt, thời gian 90 phút. Phát hiện vết plasmid trên đèn UV, cho màu da cam.

Kết quả: *B. bifidum*, *L. acidophilus*, có plasmid. Vạch plasmid của *B. bifidum* khoảng 17kb, *L. acidophilus* khoảng 15kb.



Hình 3.2.11. Kết quả chạy điện di trên gel agarose

(1. *B. bifidum*; 2. *S. lactis*; 3. *L. acidophilus*; 4. *B. longum*; 5. *L. bulgaricus*; 6. *S. lactis*; 7. *Marker*)

3.2.5.2 Kết quả tiếp hợp với *S. faecalis* và *E. coli* K12F

Kết quả không xảy ra sự tiếp hợp giữa *B. bifidum*, *L. acidophilus*, với *S. faecalis* cũng như *E. coli* K12F. Sở dĩ chúng tôi chọn 2 vi khuẩn *S. faecalis* và *E. coli* K12F là vì các vi khuẩn lactic thử nghiệm thuộc hệ vi khuẩn đường ruột, khi sử dụng chúng làm probiotic, chúng có thể chuyển gen để kháng kháng sinh cho cả vi khuẩn gram dương cũng như là vi khuẩn gram âm ở ruột.

Đối chứng dương của mô hình tiếp hợp với *E. coli* K12F là chủng *Shigella* đa đề kháng do bệnh viện Nhi Đồng 1 cung cấp cho kết quả tiếp hợp dương tính.

3.2.6. Khảo sát độc tính cấp và bán cấp

3.2.6.1. Khảo sát độc tính cấp

Lactobacillus acidophilus và *Bifidobacterium bifidum* là hai vi khuẩn lactic được phân lập, định danh, khảo sát điều kiện nuôi cấy, cách đông khô và sử dụng điều trị tiêu

chảy có hiệu quả.

Để cho đề tài nghiên cứu chế phẩm này đủ cơ sở khoa học hầu đưa ra sản xuất, cần nghiên cứu tính an toàn của chế phẩm theo qui định của Bộ Y Tế . Chúng tôi tiến hành khảo sát độc tính cấp của chế phẩm đông khô chứa hai vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* và *Bifidobacterium bifidum*.

Nội dung nghiên cứu:

Thú vật: chuột lắt chủng Swiss.

Chế phẩm thử: bột đông khô vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* và *Bifidobacterium bifidum*.

* Thực hiện

Số chuột n = 30 con

Trọng lượng: 18 – 20 gam

Thời điểm dùng thuốc: lúc chuột đói 11 giờ trưa

Cho chuột uống 2.10^7 vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* + 2.10^7 vi khuẩn *Bifidobacterium bifidum* / 0,2ml / 10gam chuột.

(gấp 100 lần liều có tác dụng trị tiêu chảy.)

Thời gian theo dõi: 48 giờ sau khi dùng thuốc.

* Cách đánh giá kết quả:

Quan sát các biểu hiện của chuột sau khi dùng thuốc trong thời gian 48 giờ.

Mổ quan sát đại thể và vi thể một số phủ tạng sau khi kết thúc thử nghiệm.

Kết quả: Kết quả quan sát lô chuột thử nghiệm: sau 48 giờ uống thuốc, chuột vẫn linh hoạt, ăn uống bình thường, không có biểu hiện lạ, không có tử vong.

Quan sát đại thể nội tạng lô chuột sau 48 giờ dùng thuốc: *tím, gan, phổi, ruột bình thường.*

Kết quả xét nghiệm vi thể 5 chuột sau 48 giờ dùng thuốc: mẫu mô gan, mô thận có hình thái bình thường không có hiện tượng hủy hoại tế bào gan và thận.

Kết luận: Chế phẩm không gây độc tính cấp

3.2.6.2 Khảo sát độc tính bán cấp

Nội dung nghiên cứu:

- Lô thử: 80 con chuột nhắt chủng Swiss, uống chế phẩm 2.10^5 *Lactobacillus acidophilus* và 2.10^5 *Bifidobacterium bifidum* / 0,1ml / 10 gram chuột.
- Lô chứng: 80 con chuột nhắt chủng Swiss, uống nước cất 0,1ml / 10 gram chuột.

Cách đánh giá kết quả:

- Kết quả xét nghiệm huyết học ngày 21 và ngày 45.

- Kết quả xét nghiệm chức năng gan (ASAT, ALAT, BILIRUBIN trực tiếp, gián tiếp) và chức năng thận (BUN, creatinin huyết) vào ngày 21 và 45.
- Quan sát đại thể nội tạng và xét nghiệm vi thể sau khi kết thúc đợt thử nghiệm và khi chuột chết có nghi vấn trong quá trình thử nghiệm.

Kết quả:

Sự biến đổi các chỉ số huyết học:

Bảng 3.2.54: Số lượng bạch cầu, hồng cầu, tiểu cầu sau 21 và 45 ngày

Thời điểm nghiên cứu		Lô chứng	Lô thử	P
Ngày 21	N	6	6	>0,05
	SLBC	10,12±0,93	11,04±2,77	
	SLHC	8,63±0,32	7,96±0,2	
	SLTC	301,43±76,70	449,3±8,71	
Ngày 45	N	20	20	>0,05
	SLBC	7,05±0,54	8,80±0,96	
	SLHC	8,32±0,24	8,23±0,18	
	SLTC	651,90±38,04	651,90±55,80	

SLBC: số lượng bạch cầu; SLHC: số lượng hồng cầu; SLTC: số lượng tiểu cầu

N: cỡ mẫu

* SLBC, SLHC, SLTC giữa lô chứng và lô thử khác nhau không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95% ($P > 0,05$)

Sự biến đổi các chỉ số sinh hoá sau 21 và 45 ngày thử nghiệm:

- *Chức năng gan:*

Bảng 3.2.55: Các trị số SGOT, SPGT, BILIRUBIN sau 21 và 45 ngày

Thời điểm nghiên cứu		Lô chứng (a)	Lô thử (b)	P (a-b)
Ngày 21	N	13	13	>0,05
	SGOT	213,3±13,1	218,2±11,9	
	SGPT	93,5±15,1	77,2±6,4	
	Bilirubin tp	0,39±0,05	0,46±0,05	
Ngày 45	N	11	15	>0,05
	Bilirubin tp	0,56±0,06	0,57±0,04	
	Bilirubin gt	0,34±0,04	0,29±0,03	
	Bilirubin tt	0,22±0,03	0,27±0,03	

Nồng độ ASAT và ALAT, BILIRUBIN giữa lô chứng và lô thử thay đổi không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.

- Chức năng thận:

Bảng 3.2.56: Nồng độ BUN, creatinin huyết thể hiện chức năng thận sau 21 ngày và 45 ngày thử nghiệm

Thời gian thử nghiệm		Ngày 21	Ngày 45
Chứng	N	13	25
	BUN	22,9±1,18	21,5±1,3
Thử	BUN	21,2±1,15	29,03±1,41
Chứng	N	13	19
	Creatinin	0,58±0,03	0,56±0,05
Thử	N	13	16
	Creatinin	0,58±0,03	0,65±0,04

Nồng độ creatinin huyết giữa hai lô chứng và lô thử vào ngày thứ 21 và 45 của đợt thử nghiệm khác nhau không có ý nghĩa thống kê, với độ tin cậy 95%.

Nồng độ ure huyết vào ngày 21 khác nhau không có ý nghĩa nhưng vào ngày 45 ure huyết lô thử tăng so với lô chứng ($P < 0,01$).

Sự biến đổi về thể trọng:

Bảng 3.2.57: Thể trọng chuột trung bình của hai lô thử và chứng (gram) lúc bắt đầu và lúc kết thúc đợt thử nghiệm

Thời điểm nghiên cứu		Bắt đầu thử nghiệm	Kết thúc thử nghiệm
Lô chứng (a)	N	80	64
	Thể trọng (g)	20,07±0,13	27,23±0,31
Lô thử (b)	N	80	52
	Thể trọng (g)	20,23±0,13	26,42±0,39

Trọng lượng của các chuột lô thử và chứng ở lúc bắt đầu thử nghiệm và kết thúc thử nghiệm khác nhau không có ý nghĩa thống kê, với độ tin cậy 95% ($p > 0,05$).

Tỉ lệ chuột chết, tỉ lệ chuột sưng viêm, tỉ lệ chuột tiêu chảy:

Bảng 3.2.58: Tỉ lệ chuột chết, tỉ lệ chuột sưng viêm, tỉ lệ chuột tiêu chảy:

Chỉ số nghiên cứu		Tỉ lệ chuột chết	Tỉ lệ chuột sưng viêm	Tỉ lệ chuột tiêu chảy
Lô chứng	N	80	80	80
	f	6/80	1/80	2/80
Lô thử	N	80	80	80
	f	12/80	1/80	3/80
P (a-b)		>0,05	>0,05	>0,05

Qua 45 ngày thử nghiệm, tỉ lệ chuột chết, tỉ lệ chuột sưng viêm, tỉ lệ chuột tiêu chảy giữa hai lô chứng và thử khác nhau không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95%.

Về giải phẫu bệnh chức năng gan, thận:

Khảo sát vi thể tế bào gan, thận trên 8 lô chuột chứng và 8 lô chuột thử, kết quả thu được như sau:

- 8 chuột chứng và 7 chuột thử có mô gan, thận bình thường.

Mô gan, mô thận có hình thái bình thường không có hiện tượng hủy hoại tế bào gan, thận.

- 1 chuột thử bị viêm gan mạn tính.

B: Mẫu thử có viêm gan

B': Mẫu thử không viêm gan

T: Thử

C: Chứng

Bảng 3.2.59: Khảo sát tình trạng của gan

	B	B'	Tổng cộng
T	1	8	8
C	0	8	8
	1	15	16

Dùng Fisher Exact Test có kết quả như sau: $P > 0,5$.

Kết luận: Sự khác biệt giữa hai lô không có ý nghĩa thống kê.

Kết luận:

Bảng 3.2.60: Bảng tổng kết chung các kết quả

Chỉ tiêu	Thời điểm	Kết quả	P
Huyết học	Ngày 21	Số lượng hồng cầu không khác	>0,05
		Số lượng bạch cầu không khác	>0,05
		Số lượng tiểu cầu không khác	>0,05
	Ngày 45	Số lượng hồng cầu không khác	>0,05
		Số lượng bạch cầu không khác	>0,05
		Số lượng tiểu cầu không khác	>0,05
Chức năng gan	Ngày 21	Giá trị SGOT, SGPT không khác	
		Bilirubin (toàn phần, trực tiếp, gián tiếp) không khác	>0,05
	Ngày 45	Giá trị SGOT, SGPT không khác	
		Bilirubin (toàn phần, trực tiếp, gián tiếp) không khác	>0,05
Chức năng thận	Ngày 21	Urê huyết không khác	>0,05
		Creatinin không khác	>0,05
	Ngày 45	Urê lơ thử tăng	<0,05
		Creatinin không khác	>0,05
Thể trọng	Bắt đầu thử nghiệm	Thể trọng chuột không khác	>0,05
	Kết thúc thử nghiệm	Thể trọng chuột không khác	>0,05
Tỉ lệ chuột sưng viêm sau 45 ngày		Tỉ lệ chuột sưng viêm không khác	>0,05
Tỉ lệ chuột bị tiêu chảy sau 45 ngày		Tỉ lệ chuột bị tiêu chảy không khác	>0,05
Vi thể tế bào gan, thận sau 30 ngày		Lô thử và lô chứng khác nhau không có ý nghĩa thống kê	

3.2.7. Kết quả thử tác dụng trị tiêu chảy do loạn khuẩn và so sánh với thuốc cùng nhóm

3.2.7.1. Kết quả thử nghiệm *invivo* khả năng điều trị loạn khuẩn của *B.bifidum* và *L. acidophilus*

Xây dựng mô hình loạn khuẩn ở ruột

Nguyên tắc: gây loạn khuẩn ở ruột cho chuột bằng cách cho uống kháng sinh

liều cao. Kháng sinh sử dụng là kháng sinh có tác động mạnh trên *E.coli* (Streptomycin), phối hợp với một kháng sinh tác động trên vi khuẩn Gram (+), không tác động trên Proteus.

Chuột được dùng làm thú thử nghiệm, có trọng lượng từ 18 – 20g, khỏe mạnh, không phân biệt đực cái.

Tìm liều kháng sinh sử dụng thích hợp: liều kháng sinh sử dụng phải theo nguyên tắc: gây tiêu chảy 100% thú thử nghiệm, thú có thời gian tự phục hồi chậm và tỉ lệ thú chết thấp, các liều kháng sinh:

Liều 1 : 30mg Streptomycin + 40mg Lincomycin / 10 g chuột

Liều 2 : 20mg Streptomycin + 30mg Lincomycin / 10 g chuột

Liều 3 : 15mg Streptomycin + 20 mg Lincomycin / 10 g chuột

Chuột được chia làm 03 lô, mỗi lô 10 con và uống kháng sinh ngày 2 lần theo các liều sau: lô 1: uống liều 1; lô 2: uống liều 2; lô 3: uống liều 3

Sau khi chuột uống kháng sinh ở các liều trên bị tiêu chảy, chuyển qua dùng liều kháng sinh duy trì bằng 1/100 liều kháng sinh trên để hạn chế khả năng tự hồi phục.

Kết quả

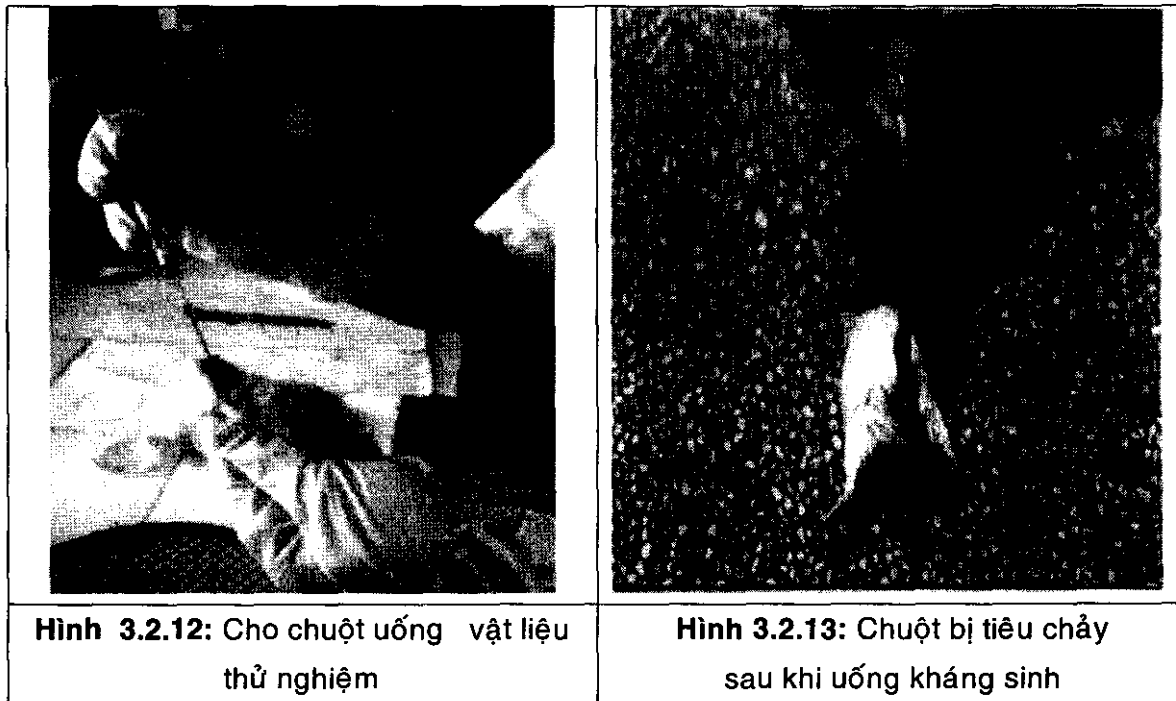
Bảng 3.2.61: Tỷ lệ chuột tiêu chảy khi uống các liều kháng sinh

Liều KS	Tình trạng chuột ngày 1		Tình trạng chuột ngày 2		Tình trạng chuột ngày 3		Tình trạng chuột ngày 4		Tình trạng chuột ngày 5		
	TC	Chết	TC	chết	TC	chết	TC	chết	TC	chết	Hồi phục
Liều 1	0%	0%	100%	0%	90%	10%	70%	30%	60%	40%	0%
Liều 2	0%	0%	100%	0%	100%	0%	90%	10%	80%	20%	0%
Liều 3	0%	0%	30%	0%	70%	0%	80%	0%	30%	10%	60%

Kết luận: Qua kết quả trên, chúng tôi nhận thấy:

- Liều 1: Chuột uống kháng sinh liều này tiêu chảy ngay 100 % ở ngày thứ 2, nhưng ở các ngày sau tỷ lệ chuột chết cao.
- Với liều 2 kết quả chuột tiêu chảy cao, lâu tự hồi phục , tỷ lệ chuột chết và không phục hồi cho đến ngày thứ 5.
- Liều 3: Chuột lâu tiêu chảy , kết quả tỷ lệ chuột tiêu chảy không đều, số chuột tự phục hồi cao.
- Vì vậy chúng tôi dùng liều kháng sinh 2 là: 20mg Streptomycin + 30mg

Lincomycin / 10 g chuột để gây tiêu chảy cho chuột , từ đó thử tác dụng trị loạn khuẩn của các vi khuẩn nuôi cấy được.



Thử tác dụng trị loạn khuẩn của *B.bifidum* và *L.acidophilus*:

Sau khi xác định được mô hình gây loạn khuẩn ở ruột trên chuột lắt trắng, chúng tôi gây tiêu chảy trên chuột để có tỉ lệ tiêu chảy 100%.

Chúng tôi tiến hành 3 thử nghiệm:

- **Thử nghiệm 1:** Xác định liều vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* và *Bifidobactrium bifidum* có tác dụng trị tiêu chảy do loạn khuẩn: Dùng 3 lô chuột đã tiêu chảy do loạn khuẩn, cho uống vi khuẩn ngày 2 lần như sau:

Lô 1: Cho uống vi khuẩn thử nghiệm liều 10^5 vi khuẩn /10g chuột

Lô 2: Cho uống vi khuẩn thử nghiệm liều 10^4 vi khuẩn / 10g chuột

Lô 3: Lô chứng , chuột không uống vi khuẩn thử nghiệm

Mỗi lô 15 chuột.

Kết quả:

Bảng 3.2.62: Tỷ lệ chuột hết tiêu chảy khi điều trị với các liều vi khuẩn thử nghiệm khác nhau

Lô	Tỷ lệ chuột hết tiêu chảy sau các khoảng thời gian					
	1 ngày	2 ngày	3 ngày	4 ngày	5 ngày	6 ngày
1	0%	0%	45%	70%	100%	100%
2	0%	0%	20%	40%	100%	100%
3	0%	0%	0%	20%	60%	80%

- **Thử nghiệm 2:** Hiệu quả của việc sử dụng phối hợp 2 vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* và *Bifidobacterium bifidum* trong điều trị tiêu chảy do loạn khuẩn

Dùng 04 lô chuột, mỗi lô 15 con đã tiêu chảy hoàn toàn và cho uống vi khuẩn ngày 2 lần như sau:

Lô 1: Cho chuột uống vi khuẩn *B.bifidum* 10^5 vi khuẩn/10 g chuột

Lô 2: Cho chuột uống vi khuẩn *L.acidophilus* 10^5 vi khuẩn/10 g chuột

Lô 3: cho chuột uống phối hợp hai vi khuẩn *B.bifidum* và *L.acidophilus*: mỗi loại $0,5 \cdot 10^5$ vi khuẩn/10 g chuột

Lô 4: Lô chứng, không uống vi khuẩn thử nghiệm

Sau đó mỗi ngày quan sát tiến trình lành tiêu chảy bằng cách quan sát phân chuột. Kết quả được trình bày trong bảng 3.2.63..

Bảng 3.2.63. Kết quả trị tiêu chảy của vi khuẩn *B.bifidum* và *L.acidophilus* dùng riêng rẽ và phối hợp

Lô chuột	% chuột hết tiêu chảy sau 2 ngày	% chuột hết tiêu chảy sau 3 ngày	% chuột hết tiêu chảy sau 4 ngày	% chuột hết tiêu chảy sau 5 ngày
Lô 1	0%	40%	60%	100%
Lô 2	0%	30%	70%	100%
Lô 3	0%	40%	100%	100%
Lô 4	0%	0%	25%	60%

Kết luận: Việc sử dụng riêng rẽ từng vi khuẩn để trị loạn khuẩn cho thấy vi khuẩn thử nghiệm có tác dụng trị loạn khuẩn. Tuy nhiên nếu phối hợp 2 loại vi khuẩn sẽ cho kết quả tốt hơn việc sử dụng riêng rẽ, biểu hiện ở khả năng làm bệnh mau hết hơn

- **Thử nghiệm 3:** so sánh tác dụng trị loạn khuẩn của *B.bifidum* và *L.acidophilus* nuôi cấy được với các biệt dược đang lưu hành trên thị trường. Các biệt dược được pha thành các huyền dịch có nồng độ 10^5 vi khuẩn/0,1ml. Cho chuột uống liều 10^5 vi khuẩn /10g chuột

Dùng 04 lô chuột, mỗi lô 15 con đã tiêu chảy hoàn toàn và cho uống thuốc ngày

2 lần như sau:

Lô 1: Uống biệt dược Biosubtil.(lô Biosubtyl)

Lô 2: Uống biệt dược Lactomed (lô Lactomed)

Lô 3: Uống *B.bifidum* và *L.acidophilus* thử nghiệm.(lô vi khuẩn thử)

Lô 4: Lô chứng không uống.

- **Kết quả:** Khảo sát kết quả dựa vào 2 yếu tố % số chuột khỏi tiêu chảy , mức độ sụt cân của chuột ở các lô thử nghiệm sau 5 ngày thử nghiệm

Bảng 3.2.64: So sánh kết quả trị tiêu chảy của vi khuẩn *B.bifidum* và *L.acidophilus* với các biệt dược

Lô chuột	% chuột hết tiêu chảy sau 2 ngày	% chuột hết tiêu chảy sau 3 ngày	% chuột hết tiêu chảy sau 4 ngày	% chuột hết tiêu chảy sau 5 ngày
Lô 1	0%	60%	70%	88%
Lô 2	0%	60%	80%	90%
Lô 3	0%	80%	100%	100%
Lô 4	0%	0%	20%	60%

Kết luận: Chuột được điều trị phối hợp 2 vi khuẩn thử nghiệm cho kết quả tốt nhất: số chuột hết tiêu chảy cao nhất, thời gian phục hồi nhanh nhất

Bảng 3.2.65: Giá trị sụt cân trung bình ở các lô (gam) chuột điều trị

Lô	Biosubtyl	Lactomed	Vi khuẩn thử	Chứng
Trọng lượng bị sụt	2,832713	2,747778	2,45125	3.365882

Kết luận: Chuột được điều trị bằng vi khuẩn thử nghiệm có mức độ sụt cân nhỏ nhất, cho thấy rõ ràng hiệu quả của việc điều trị so với lô chứng và hiệu quả không kém biệt dược ngoại nhập cùng loại (Lactomed) .

3.2.8. Tóm tắt tiêu chuẩn cơ sở chế phẩm Bifilac

Từ những kết quả nghiên cứu trên chúng tôi đề nghị tiêu chuẩn cơ sở của chế phẩm như sau:

- Là một loại chế phẩm sinh học đông khô, dạng bột ,
- Định danh: chứa vi khuẩn *Lactobacillus acidophilus* và *Bifidobacterium bifidum*
- Định lượng: bằng phương pháp đếm sống có tối thiểu 10^9 vi khuẩn sống mỗi loại / 1g sản phẩm.
- Chế phẩm không được chứa vi khuẩn lạ, kiểm nghiệm theo DĐVN
- Độ ẩm không quá 9%, kiểm nghiệm theo DĐVN

3.3.NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ VIÊN BAO PHIM CHỨA AMOXICILIN VÀ ACID CLAVULANIC

3.3.1. Kết quả thẩm định phương pháp HPLC định lượng amoxicillin & acid clavulanic

3.3.3.1 Khảo sát tính tương thích của hệ thống

Tính tương thích của hệ thống được khảo sát với các thông số về độ phân giải, hiệu lực cột, hệ số bất đối xứng, diện tích đỉnh, thời gian lưu.

Kết quả được trình bày trong bảng 3.3.1, bảng 3.3.2.

Bảng 3.3.1. Kết quả các thông số sắc ký ứng với đỉnh của amoxicillin

Amoxicillin					
TT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích đỉnh	Hệ số bất đối xứng	Số đĩa lý thuyết	Độ phân giải
1	5,98	3581504	1,03	809	9,0
2	5,99	3578012	1,06	806	8,9
3	6,01	3578809	1,06	809	8,9
4	5,95	3589993	1,07	809	8,9
5	5,98	3577337	1,03	806	8,8
6	5,99	3582134	1,07	806	9,0
TB	5,98	3581298	1,05	807,5	8,92
RSD (%)	0,33	0,13	1,77	0,20	0,84

Bảng 3.3.2: Kết quả các thông số sắc ký ứng với đỉnh của acid clavulanic

Acid clavulanic					
TT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích Đỉnh	Hệ số bất đối xứng	Số đĩa lý thuyết	Độ phân giải
1	3,45	1091535	1,14	630	9,0
2	3,45	1091586	1,14	635	8,9
3	3,43	1093634	1,14	635	8,9
4	3,47	1109131	1,14	630	8,9
5	3,45	1090517	1,14	630	8,8
6	3,44	1094216	1,10	630	9,0
TB	3,45	1095103	1,13	631,7	8,92
RSD (%)	0,39	0,64	1,44	0,41	0,84

Nhận xét: Tất cả các thông số sắc ký của cả 2 hoạt chất đều đạt yêu cầu. Vậy phương pháp phân tích đạt tính tương thích hệ thống.

3.3.1.2. Khảo sát độ đúng của phương pháp HPLC

Độ đúng được thực hiện theo phương pháp thêm chuẩn. Kết quả được trình bày ở bảng 3.3.3 và bảng 3.3.4.

Bảng 3.3.3: Độ đúng của phương pháp HPLC định lượng amoxicilin

N	Tỷ lệ %	Ei	Oi	IOi - Ei I	Di
1	80	80,83	79,71	1,120654	1,39
2		79,34	79,04	0,301514	0,38
3		80,76	79,07	1,686251	2,09
4	100	101,04	99,69	1,348938	1,34
5		99,18	101,14	1,960103	1,98
6		100,95	99,86	1,091292	1,08
7	120	121,25	120,97	0,281569	0,23
8		119,01	120,59	1,583764	1,33
9		121,14	120,59	0,552159	0,46
B					1,14

Độ lệch thực nghiệm $B = 1,14\% < 2\%$. Đạt.

Bảng 3.3.4: Độ đúng của phương pháp HPLC định lượng acid clavulanic

TT	Tỷ lệ %	Ei	Oi	IOi - Ei I	Di
1	80	19,87	19,51	0,3622	1,82
2		19,63	19,54	0,0903	0,46
3		19,92	19,48	0,4432	2,22
4	100	24,84	24,57	0,2732	1,10
5		24,43	24,52	0,0892	0,37
6		24,9	24,58	0,3199	1,28
7	120	29,81	29,71	0,0978	0,33
8		29,31	29,73	0,4192	1,43
9		29,88	29,68	0,1999	0,67
B					1,08

Độ lệch thực nghiệm $B = 1,08\% < 2\%$: Đạt.

Nhận xét: Phương pháp HPLC định lượng amoxicilin và acid clavulanic có độ lệch thực nghiệm lần lượt là 1,14% và 1,08% < 2%. Vậy phương pháp đạt yêu cầu độ đúng.

3.3.1.3. Khảo sát độ chính xác của phương pháp HPLC

Độ chính xác của phương pháp được xác định ở 2 mức: độ lặp lại và độ chính xác

trung gian. Kết quả được nêu ở bảng 3.3.5 và bảng 3.3.6.

Bảng 3.3.5: Kết quả độ lặp lại của phương pháp HPLC

TT	Hàm lượng (%)	
	Amoxicilin	Acid clavulanic
1	99,76	99,63
2	99,44	99,25
3	100,04	99,76
4	100,09	99,76
5	99,80	99,17
6	99,63	98,96
TB	99,79	99,42
CV (%)	0,22	0,31

Bảng 3.3.6: Kết quả độ chính xác trung gian của acid clavulanic và amoxicilin

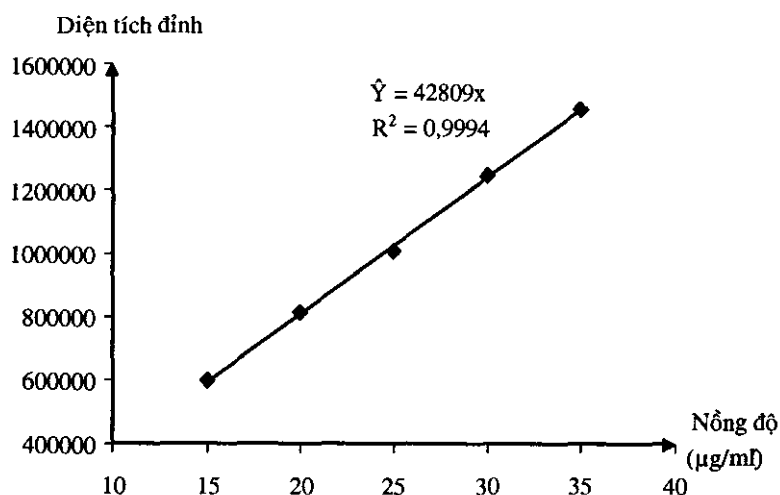
TT	Hàm lượng (%)					
	Acid clavulanic			Amoxicilin		
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
1	99,63	99,86	99,83	99,76	99,48	99,61
2	99,25	99,81	100,09	99,44	99,40	99,86
3	99,76	100,05	98,56	100,04	99,59	96,38
4	99,76	99,86	100,29	100,09	99,78	96,57
5	99,17	98,24	99,89	99,80	99,70	99,89
6	98,96	98,41	98,28	99,63	99,76	98,74
$\bar{X}$	99,42	99,37	99,49	99,79	99,62	98,51
S^2	0,116	0,666	0,719	0,060	0,024	2,666
Si			0,707			0,957
CV (%)			0,71			0,96

Nhận xét: phương pháp có độ lặp lại, độ chính xác trung gian tốt với hệ số phân tán lần lượt là 0,71 và 0,96 < 2%. Vậy đạt yêu cầu.

3.3.1.4. Khoảng tuyến tính

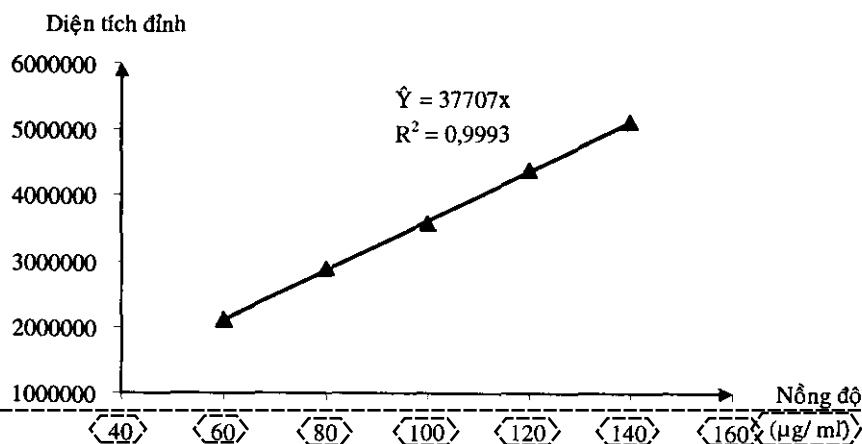
Bảng 3.3.7: Kết quả tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh acid clavulanic và amoxicillin

Acid clavulanic		Amoxicillin	
Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh
15	597679	60	2111085
20	814651	80	2878784
25	1009653	100	3559110
30	1244826	120	4390628
35	1452804	140	5125830



Hình 3.3.1: Đồ thị tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh của acid clavulanic

Phương trình hồi quy tuyến tính giữa nồng độ và diện tích đỉnh của acid clavulanic có dạng $\hat{y} = 42809x$ (hệ số $b_0 = -46290$ không có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$).



Hình 3.3.2: Đồ thị tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh của amoxicillin

Phương trình hồi quy tuyến tính giữa nồng độ và diện tích đỉnh của amoxicilin có dạng $\hat{y} = 37707x$ (hệ số $b_0 = -157580$ không có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$).

3.3.1.5. Giới hạn phát hiện

Bảng 3.3.8: Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng clavulanic và amoxicilin

	<i>Acid clavulanic</i>	<i>Amoxicilin</i>
Giới hạn phát hiện ($\mu\text{g/ml}$)	0,7	3,2
Giới hạn định lượng ($\mu\text{g/ml}$)	2,3	9,6

3.3.2. Kết quả thẩm định phương pháp quang phổ tử ngoại định lượng amoxicilin và acid clavulanic

Bảng 3.3.9: Kết quả xác định khoảng tuyến tính của phương pháp quang phổ

Phương pháp quang phổ			
Amoxicilin		Acid clavulanic	
Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Độ hấp thu	Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Độ hấp thu
16	0,328	10	0,307
20	0,413	14	0,434
24	0,493	18	0,568
28	0,579	22	0,698
32	0,657	26	0,825
$\hat{y} = 0,021x$ $R^2 = 0,9998$		$\hat{y} = 0,033x - 0,019$ $R^2 = 0,9999$	

Kết quả cho thấy trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và độ hấp thu.

Phương trình hồi quy tuyến tính của amoxicilin có dạng $\hat{y} = 0,021x$ (hệ số $b_0 = -0,0004$ không có ý nghĩa với $\alpha = 0,05$).

Phương trình hồi quy tuyến tính của clavulanic có dạng $\hat{y} = 0,033x - 0,019$.

Bảng 3.3.10: Kết quả xác định độ chính xác của phương pháp quang phổ

Số thí nghiệm	Phương pháp quang phổ		
	Lượng bột viên (g)	Hàm lượng (%)	
		Amoxicilin	Acid clavulanic
1	0,2383	98,76	98,65
2	0,2384	98,14	98,16
3	0,2380	98,60	98,51
4	0,2384	98,22	98,78
5	0,2380	98,42	98,47
6	0,2383	98,12	98,57
Trung bình		98,38	98,52
RSD (%)		0,27	0,21

Kết quả cho thấy phương pháp đạt độ chính xác.

Bảng 3.3.11: Kết quả xác định độ đúng của phương pháp quang phổ

Mức nồng độ (n = 3)	Phương pháp quang phổ	
	Amoxicilin	Acid clavulanic
	Tỷ lệ (%) so với giá trị lý thuyết	Tỷ lệ (%) so với giá trị lý thuyết
80%	99,42	102,0
100%	101,11	99,3
120%	99,61	100,0
Trung bình	100,05	100,43
Độ lệch thực nghiệm	0,05%	0,34%

Kết quả cho thấy phương pháp quang phổ đạt độ đúng theo yêu cầu kiểm nghiệm.

Nhận xét: Cả 2 phương pháp HPLC và quang phổ đều có thể được áp dụng để định lượng amoxicilin và acid clavulanic trong chế phẩm. Hai phương pháp này cũng có thể được áp dụng để định lượng amoxicilin và acid clavulac dạng nguyên liệu, đồng thời thích hợp để định lượng amoxicilin và acid clavulanic trong phép thử độ hòa tan.

3.3.3. Kết quả nghiên cứu bào chế viên nhân, viên bao

Bảng 3.3.12: Kết quả bề dày, độ cứng và độ mài mòn của 12 công thức viên nhân

Công thức	Bề dày viên (mm)	Độ cứng (N)	Độ mài mòn (%)
	(n = 20)	(n = 10)	(n = 20)
1	7,146 ± 0,112	137,9 ± 10,0	0,06
2	7,326 ± 0,245	138,7 ± 9,6	0,05
3	7,212 ± 0,225	140,2 ± 9,4	0,07
4	7,341 ± 0,301	139,6 ± 16,6	0,05
5	7,132 ± 0,064	137,8 ± 10,3	0,07
6	7,095 ± 0,032	141,0 ± 5,3	0,03
7	7,135 ± 0,123	140,8 ± 7,5	0,02
8	7,388 ± 0,098	139,6 ± 13,6	0,05
9	7,103 ± 0,039	140,9 ± 7,1	0,01
10	7,189 ± 0,042	141,1 ± 13,7	0,01
11	7,170 ± 0,063	136,5 ± 5,1	0,09
12	7,201 ± 0,142	135,9 ± 11,4	0,06

Bảng 3.3.13: Kết quả đồng đều khối lượng, độ rã và độ ẩm của 12 công thức viên nhân

CT	Đồng đều khối lượng (n = 20)		Độ rã (phút)	Độ ẩm (%)
	M (mg)	RSD (%)	(n = 6)	(n = 3)
1	1138,04	0,82	6,35	8,98
2	987,60	6,09	8,12	8,89
3	1122,57	1,06	9,56	8,67
4	1006,60	5,76	9,30	8,54
5	1000,40	4,41	8,75	8,41
6	1125,97	1,04	8,82	8,69
7	997,60	6,23	8,85	8,19
8	1137,54	1,19	9,36	8,71
9	1126,92	1,15	8,98	8,56
10	1000,60	5,62	8,61	8,65
11	1210,50	3,59	8,45	8,42
12	998,60	5,28	8,76	9,01

Bảng 3.3.14: Kết quả hàm lượng và độ hòa tan của 12 công thức viên nhân

CT	Hàm lượng (%) (n = 3)		Độ hòa tan (%) (n = 6)	
	Amoxicilin	Acid clavulanic	Amoxicilin	Acid clavulanic
1	102,24	104,23	100,64	103,32
2	103,28	102,43	96,94	102,12
3	101,29	100,56	99,97	101,82
4	100,78	102,06	97,95	102,03
5	100,24	103,82	98,71	102,31
6	100,13	103,32	99,86	104,58
7	102,74	99,69	98,91	103,06
8	103,67	101,90	98,73	102,05
9	99,86	102,56	100,12	101,80
10	100,38	103,78	98,12	101,04
11	103,47	102,45	104,36	104,47
12	101,43	101,98	98,82	101,55

Bảng 3.3.15: Tóm tắt kết quả giá trị các biến độc lập và biến phụ thuộc của 12 công thức viên nhân

CT	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Y ₄
1	29,7	6,6	9,2	155,0	0,82	137,9	0,06	9,35
2	32,5	11,2	11,7	145,1	6,09	138,7	0,05	8,12
3	35,5	6,9	7,3	150,8	1,06	140,2	0,07	9,56
4	57,3	12,1	15,7	115,4	5,76	139,6	0,05	9,30
5	38,7	12,1	15,7	134,0	4,41	137,8	0,07	8,75
6	32,7	9,3	15,0	143,5	1,04	141,0	0,03	9,82
7	32,9	11,0	10,7	145,9	6,23	140,8	0,02	8,85
8	50,0	9,8	11,7	129,0	1,19	139,6	0,05	9,36
9	49,7	7,7	9,4	133,7	1,15	140,9	0,01	8,98
10	45,1	10,9	12,4	132,1	5,62	141,1	0,01	8,61
11	53,6	6,6	14,1	126,2	3,59	136,5	0,09	8,45
12	34,3	11,9	8,7	145,6	5,28	135,9	0,06	8,76

X ₁	Tá dược A	Y ₁	Độ phân tán khối lượng (%)
----------------	-----------	----------------	----------------------------

X ₂	Tá dược B	Y ₂	Độ cứng (N)
----------------	-----------	----------------	-------------

X ₃	Tá dược C	Y ₃	Độ mài mòn (%)
----------------	-----------	----------------	----------------

X ₄	Tá dược D	Y ₄	Thời gian tan rã (phút)
----------------	-----------	----------------	-------------------------

Xử lý bằng phần mềm INForm, kết quả tối ưu hóa các thành phần công thức (bảng

3.3.16).

Bảng 3.3.16: Kết quả tối ưu hóa

Biến độc lập		Biến phụ thuộc	
Xi	Công thức tối ưu	Yi	Công thức tối ưu
X1	44	Y1	1,087
X2	7,7	Y2	137,67
X3	11	X3	0,07
X4	137,8	Y4	9,6

Bào chế viên nhân, viên bao theo công thức tối ưu đã chọn và khảo sát các tính chất khác của cốm, viên nhân và viên bao

Bảng 3.3.17: Kết quả độ ẩm, tỷ trọng biểu kiến và góc chảy của 3 lô hạt theo công thức tối ưu trước khi dập viên

Lô	Độ ẩm (%) (n = 3)	Tỷ trọng biểu kiến (g/cm ³) (n = 3)	Góc chảy (°) (n = 3)
1	9,09 ± 0,16	0,726 ± 0,006	27,39 ± 0,49
2	9,06 ± 0,05	0,726 ± 0,008	27,38 ± 0,99
3	9,07 ± 0,31	0,725 ± 0,009	27,10 ± 0,86

Bảng 3.3.18: Kết quả phân bố kích thước hạt của 3 lô hạt theo công thức tối ưu trước khi dập viên

Lô	% hạt còn trên rây (n = 3)			
	710µm	355µm	180µm	125µm
1	18,12 ± 0,45	28,62 ± 0,24	46,43 ± 0,15	5,96 ± 0,41
2	18,72 ± 0,31	27,97 ± 0,35	47,07 ± 0,13	5,79 ± 0,32
3	18,81 ± 0,32	27,85 ± 0,56	47,11 ± 0,70	5,55 ± 0,12

Kết quả cho thấy, hạt của cả 3 lô đáp ứng được yêu cầu dập viên.

Kết quả phân tích thống kê cho thấy, các tính chất của hạt giữa ba lô khác nhau không ý nghĩa ($F = 1,909 < F_{0,05} = 3,885$, $\alpha = 0,05$). Vậy quy trình xát hạt ổn định.

Công thức và quy trình bao viên

Hỗn hợp bao được chọn theo nguyên tắc lớp bao có khả năng bảo vệ viên nhân và tan trong dạ dày.

Công thức cho 10 kg hỗn dịch bao:

HPMC	0,66 kg	PEG	0,20 kg
Talc	0,20 kg	Titandioxyd	0,44 kg
Ethanol	6,00 kg	Nước cất	2,50 kg

Điều chế hỗn hợp bao

Hòa tan HPMC vào khoảng 1,5 lít nước.

Hòa tan riêng PEG vào khoảng 0,5 lít nước. Phân tán titandioxyd và talc vào cồn và lượng nước còn lại. Cho dung dịch PEG vào, vừa cho vừa khuấy đến khi hỗn dịch mịn, đồng nhất.

Phối hợp dung dịch HPMC vào hỗn dịch trên, khuấy thật đều. Hỗn hợp trên được khuấy liên tục trong suốt quá trình bao để tránh lắng đọng các thành phần không tan.

Quy trình bao

Ba lô của công thức tối ưu được lần lượt bao trên máy bao phim tự động FC10, đầu phun lwata LA70B.

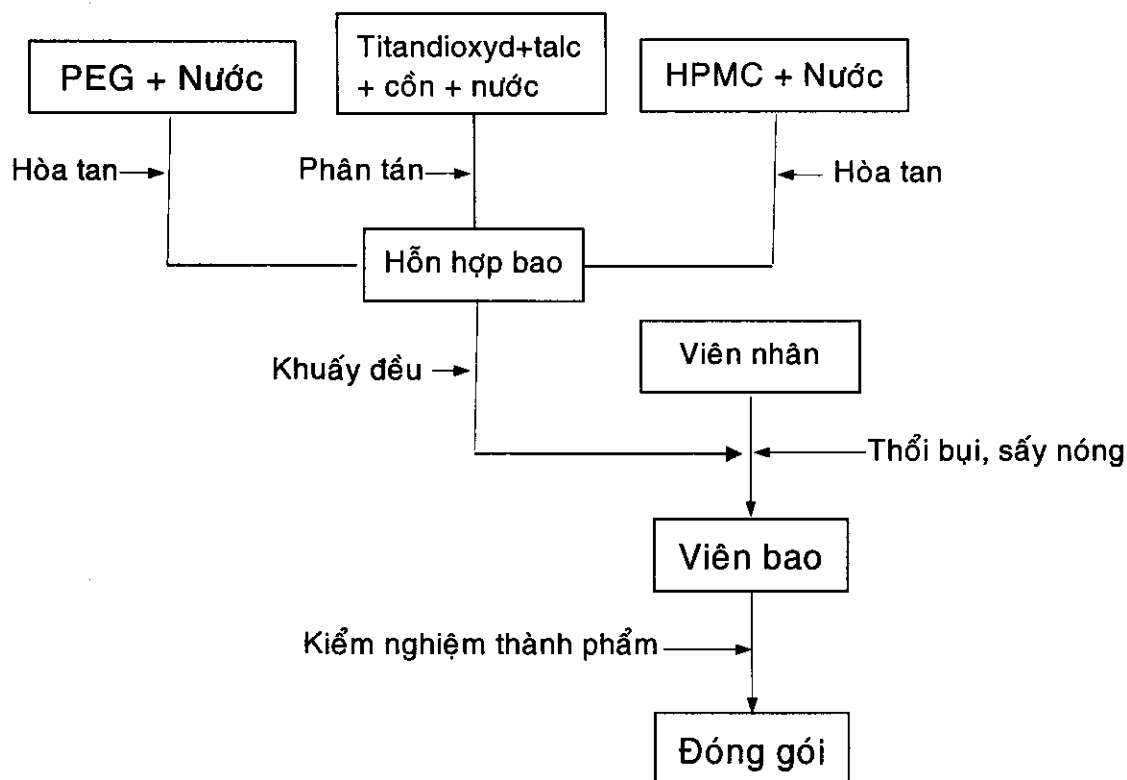
Cho viên vào nồi bao, thổi sạch bụi trên bề mặt viên và làm nóng viên trong khoảng 10 phút. Điều chỉnh các thông số trong quá trình bao:

Vận tốc nồi bao 1-2 vòng/ phút. Áp suất khí phun 2 kg/ cm².

Tốc độ phun 25-35 g/ phút . Nhiệt độ khí vào 50 °C.

Nhiệt độ khí ra 40 °C. Sấy khô sau khi bao 50 °C/ 10 phút.

Các giai đoạn điều chế hỗn hợp bao và quy trình bao viên được thực hiện theo sơ đồ 3.3.1.



Sơ đồ 3.3.1: Sơ đồ điều chế hỗn hợp bao và quy trình bao viên

Đánh giá các tính chất của viên nhân, viên bao và xác định các biến phụ thuộc Y_1, Y_2, Y_3, Y_4 và Y_5 .

Bảng 3.3.19: Kết quả bề dày của viên nhân, viên bao và của lớp bao của 3 lô công thức tối ưu

Bề dày (mm) (n = 20)		
Lô	Viên nhân	Viên bao
1	7,245 ± 0,38	7,346 ± 0,039
2	7,245 ± 0,032	7,344 ± 0,039
3	7,242 ± 0,036	7,360 ± 0,037

Bảng 3.3.20: Kết quả độ cứng; độ rã của viên nhân và viên bao của 3 lô công thức tối ưu

Độ cứng (N) (n =10)			Độ rã (phút) (n = 6)	
Lô	Viên nhân	Viên bao	Viên nhân	Viên bao
1	127,4 ± 2,4	128,4 ± 2,5	9,11 ± 0,35	12,12 ± 0,18
2	127,7 ± 2,4	128,8 ± 2,5	9,16 ± 0,29	11,91 ± 0,25
3	127,9 ± 2,3	129,2 ± 2,4	9,3 ± 0,43	12,10 ± 0,21

Kết luận

Đạt

Bảng 3.3.21: Kết quả hàm lượng của 3 lô công thức tối ưu

Hàm lượng (%) (n = 3)				
Lô	Viên nhân		Viên bao	
	Amoxicilin	Acid clavulanic	Amoxicilin	Acid clavulanic
1	100,35 ± 0,34	100,58 ± 1,06	100,48 ± 0,85	100,12 ± 0,19
2	101,22 ± 1,45	100,06 ± 0,92	100,15 ± 0,31	100,36 ± 0,48
3	100,13 ± 0,39	100,84 ± 0,98	100,15 ± 0,52	100,42 ± 0,40

Bảng 3.3.22: Kết quả độ hòa tan của 3 lô công thức tối ưu

Độ hòa tan (%) (n = 6)				
Lô	Viên nhân		Viên bao	
	Amoxicilin	Acid clavulanic	Amoxicilin	Acid clavulanic
1	100,34 ± 2,12	100,48 ± 1,46	99,92 ± 2,07	100,48 ± 0,95
2	99,76 ± 0,70	100,80 ± 0,99	99,49 ± 1,61	100,87 ± 1,46
3	100,40 ± 1,61	100,93 ± 1,80	99,37 ± 1,95	100,58 ± 1,36

Bảng 3.3.23: Kết quả độ đồng đều khối lượng và tỷ lệ tăng khối lượng của viên nhân và viên bao của 3 lô công thức tối ưu

	Khối lượng viên (g)					
	Viên nhân			Viên bao		
Lần thử	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 1	Lô 2	Lô 3
1	1,1358	1,1115	1,1550	1,1732	1,1638	1,1682
2	1,1174	1,1180	1,1291	1,1853	1,1634	1,1862
3	1,1371	1,1215	1,1422	1,1640	1,1754	1,1908
4	1,1411	1,1232	1,1333	1,1918	1,1758	1,1928
5	1,1214	1,1026	1,1492	1,1739	1,1736	1,1613
6	1,1179	1,1344	1,1215	1,1757	1,1558	1,1866
7	1,1374	1,1364	1,1547	1,1848	1,1807	1,1611
8	1,1407	1,1124	1,1232	1,1793	1,1850	1,1903
9	1,1364	1,1266	1,1461	1,1636	1,1627	1,1853
10	1,1352	1,1391	1,1211	1,1647	1,1509	1,1843
11	1,1336	1,1104	1,1138	1,1790	1,1731	1,1798
12	1,1173	1,1482	1,1230	1,1655	1,1740	1,1789
13	1,1353	1,1358	1,1393	1,1497	1,1802	1,1514
14	1,1311	1,1254	1,1133	1,1536	1,1582	1,1685
15	1,1047	1,1246	1,1344	1,1762	1,1740	1,1592
16	1,1445	1,1222	1,1349	1,1606	1,1650	1,1831
17	1,1265	1,1080	1,1334	1,1628	1,1580	1,1607
18	1,1179	1,1291	1,1278	1,1656	1,1533	1,1557
19	1,1430	1,1332	1,1116	1,1885	1,1570	1,1897
20	1,1153	1,1228	1,1499	1,1770	1,1744	1,1569
TB	1,1295	1,1243	1,1328	1,1717	1,1677	1,1745
Giới hạn KL	1,0730 - 1,1860	1,0681 - 1,1805	1,0762 - 1,1895	1,1132 - 1,2303	1,1093 - 1,2261	1,1158 - 1,2333
Kết luận	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
% KL tăng				3,74	3,64	3,68

Bảng 3.3.24: Kết quả độ đồng đều hàm lượng acid clavulanic của 3 lô công thức tối ưu

	Hàm lượng acid clavulanic (%)					
	Viên nhân			Viên bao		
Lần thử	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 1	Lô 2	Lô 3
1	100,58	100,68	100,22	99,51	101,90	102,02
2	101,87	102,30	100,58	98,79	99,59	101,98
3	103,84	104,39	100,30	100,41	101,62	98,54
4	98,68	100,71	99,81	100,52	99,81	99,46
5	102,74	102,38	101,66	100,35	100,79	102,30
6	102,46	105,28	105,37	99,10	100,74	98,62
7	100,70	100,46	100,34	99,44	98,47	101,20
8	102,80	101,94	103,50	100,61	100,29	99,51
9	101,27	102,02	100,05	99,38	100,59	100,58
10	101,58	104,30	100,29	99,82	102,70	100,08
TB	101,65	102,45	101,21	99,79	100,65	100,43
RSD (%)	1,43	1,65	1,80	0,65	1,21	1,40
Kết luận	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

Bảng 3.3.25: Kết quả độ ẩm, độ mài mòn của 3 lô công thức tối ưu

	Độ ẩm (%) (n = 3)		Độ mài mòn (%) (n = 10)
Lô	Viên nhân	Viên bao	Viên nhân
1	9,04 ± 0,16	9,10 ± 0,11	0,093 ± 0,006
2	8,76 ± 0,05	8,77 ± 0,21	0,093 ± 0,006
3	9,07 ± 0,31	8,65 ± 0,27	0,091 ± 0,007

Những kết quả trên cho thấy viên nhân và viên bao của cả 3 lô công thức tối ưu đều đạt tiêu chuẩn theo USP XXIV.

Kết quả phân tích thống kê cho thấy, các tính chất của viên nhân giữa 3 lô như bề dày, độ phân tán khối lượng, độ phân tán hàm lượng, độ cứng, độ rã, độ mài mòn, độ ẩm khác nhau không ý nghĩa ($F = 1,01 < 3,89$, $\alpha = 0,05$). Vậy tính chất của viên nhân giữa 3 lô có tính lặp lại.

Các tính chất của viên bao như bề dày viên, bề dày lớp bao, độ phân tán khối lượng, tỷ lệ tăng khối lượng, độ cứng, độ rã, độ ẩm khác nhau không ý nghĩa ($F = 1,22 < 3,89$, $\alpha = 0,05$). Vậy tính chất của viên bao giữa 3 lô khác nhau không ý nghĩa, hỗn

hợp bao và quy trình bao thích hợp cho viên nén chứa amoxicilin và acid clavulanic.

Bảng 3.3.26: So sánh các giá trị thực nghiệm với giá trị dự đoán từ phần mềm INForm

Biến số Y	Giá trị thực nghiệm (n=3)	Giá trị dự đoán
Y1	1,087	1,16
Y2	137,67	138,01
Y3	0,07	0,05
Y4	9,60	8,73

Kết quả phân tích thống kê cho thấy các giá trị thực nghiệm và giá trị dự đoán khác nhau không ý nghĩa ($F = 0,24 < 10,13$, $\alpha = 0,05$). Việc áp dụng phần mềm thông minh hoàn toàn khả thi và có kết quả tốt.

Bảng 3.3.27: Kết quả khảo sát khả năng bảo vệ của lớp bao về cảm quan và sự giảm hàm lượng acid clavulanic ở điều kiện $30 \pm 2^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\% \text{ RH}$

Thời điểm (giờ)	Cảm quan		Hàm lượng acid clavulanic (%)	
	Viên nhân	Viên bao	Viên nhân	Viên bao
0	Viên trắng ngà, cứng chắc. Bột thuốc trắng ngà	Lớp bao trắng đục. Viên cứng chắc. Bột thuốc trắng ngà	101,49	100,24
3	Viên vàng tươi, nứt, mềm. Bột thuốc vàng chanh đến vàng nâu	Lớp bao trắng đục. Viên cứng chắc. Bột thuốc trắng ngà	90,12	98,26
6	Viên vàng nâu, rất mềm. Bột thuốc vàng nâu sậm	Lớp bao trắng đục. Viên hơi mềm. Bột thuốc vàng nhạt	77,33	93,75
8		Lớp bao nứt. Viên mềm. Bột thuốc màu vàng hơi nâu	70,41	86,62

Kết quả khảo sát về mặt cảm quan và sự giảm hàm lượng acid clavulanic khi đặt thuốc ở điều kiện $30 \pm 2^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\% \text{ RH}$ cho thấy lớp bao có khả năng bảo vệ viên nhân.

3.3.4. Tóm tắt kết quả đánh giá tiêu chuẩn 3 lô viên bao theo USP XXIV

Những tiêu chuẩn quy định cho viên chứa amoxicilin và acid clavulanic được dùng cho người theo USP XXIV như sau:

Định tính: Thời gian lưu của những đỉnh chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải tương ứng với thời gian lưu của những đỉnh chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn đạt được từ phép định lượng.

Độ hòa tan: Môi trường: 900 ml nước cất. Dụng cụ số 2: 75 vòng/ phút. Thời gian: 30 phút. $Q \geq 85\%$ lượng ghi trên nhãn của $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ (amoxicilin) và $Q \geq 80\%$ lượng ghi trên nhãn của $C_8H_9NO_5$ (acid clavulanic), được hòa tan trong 30 phút.

Biến thiên khối lượng: Biến thiên khối lượng được xác định đối với amoxicilin. Cân chính xác 10 viên riêng lẻ. Từ kết quả định lượng tính hàm lượng amoxicilin trong từng viên.

Đồng đều hàm lượng acid clavulanic: Xác định hàm lượng acid clavulanic trong 10 viên riêng lẻ.

Biến thiên khối lượng và đồng đều hàm lượng được xem là đạt yêu cầu khi hàm lượng hoạt chất trong từng viên nằm trong khoảng 85-115% hàm lượng nhãn và RSD nhỏ hơn hoặc bằng 6%.

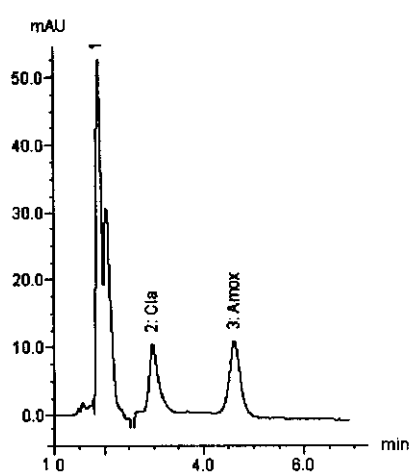
Nếu có 1 viên có hàm lượng hoạt chất nằm ngoài khoảng 85-115% và không có viên nào nằm ngoài khoảng 75-125% lượng ghi trên nhãn hoặc nếu $RSD > 6\%$ hoặc cả 2 điều kiện trên, phải thử tiếp với 20 viên. Không được có quá 1 viên trong 30 viên nằm ngoài khoảng 85-115% và không có viên nào nằm ngoài khoảng 75-125% lượng ghi trên nhãn và RSD không quá 7,8%.

Hàm lượng nước: không quá 10,5%.

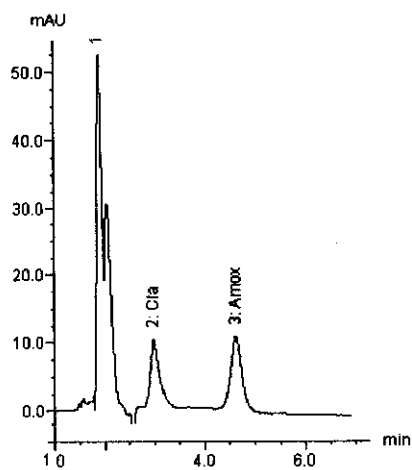
Định lượng: Định lượng amoxicilin và acid clavulanic bằng phương pháp HPLC. Viên chứa không nhỏ hơn 90% và không lớn hơn 120% lượng nhãn ghi cho $C_{16}H_{19}N_3O_5S$ (amoxicilin) và $C_8H_9NO_5$ (acid clavulanic).

KẾT QUẢ

Định tính: Đạt



(a)



(b)

Hình 3.3.4: Sắc ký đồ dung dịch chuẩn (a), Sắc ký đồ dung dịch thử (b).

Bảng 3.3.28: Hàm lượng nước và hàm lượng hoạt chất của chế phẩm viên bao

Lô	Hàm lượng nước	Hàm lượng (%)	
	(%)	Amoxicilin	Clavulanic
1	$9,10 \pm 0,11$	$100,48 \pm 0,85$	$100,12 \pm 0,19$
2	$8,77 \pm 0,21$	$100,15 \pm 0,31$	$100,36 \pm 0,48$
3	$9,07 \pm 0,27$	$100,15 \pm 0,52$	$100,42 \pm 0,40$
Kết luận	Đạt	Đạt	Đạt

Bảng 3.3.29: Độ hòa tan của chế phẩm viên bao

Độ hòa tan (%) (n = 6)		
Lô	Amoxicilin	Clavulanic
1	$99,92 \pm 2,07$	$100,48 \pm 0,95$
2	$99,49 \pm 1,91$	$100,87 \pm 1,46$
3	$99,37 \pm 1,95$	$100,58 \pm 1,36$
Kết luận	Đạt	Đạt

Bảng 3.3.30: Biến thiên khối lượng đối với amoxicilin

Lần thử	Hàm lượng amoxicilin (mg)					
	Lô 1		Lô 2		Lô 3	
	KL viên (g)	HL viên (mg)	KL viên (g)	HL viên (mg)	KL viên (g)	HL viên (mg)
1	1,1732	501,37	1,1638	498,65	1,1682	495,45
2	1,1853	506,55	1,1634	498,48	1,1862	503,08
3	1,1640	497,44	1,1754	503,62	1,1908	505,03
4	1,1918	509,32	1,1758	503,79	1,1928	505,88
5	1,1739	501,67	1,1736	502,85	1,1613	492,52
6	1,1757	502,44	1,1558	495,22	1,1866	503,25
7	1,1848	506,33	1,1807	505,89	1,1611	492,44
8	1,1793	503,98	1,1850	507,73	1,1903	504,82
9	1,1636	497,27	1,1627	498,18	1,1853	502,70
10	1,1647	497,74	1,1509	493,12	1,1843	502,28
TB	1,1756	502,41	1,1687	500,75	1,1807	500,75
RSD (%)		0,83		0,95		1,04
Giới hạn HL (mg)		425-575		425-575		425-575
Kết luận		Đạt		Đạt		Đạt

Bảng 3.3.31: Đồng đều hàm lượng acid clavulanic

Lần thử	Hàm lượng acid clavulanic (mg)		
	Lô 1	Lô 2	Lô 3
1	124,39	127,38	127,52
2	123,49	124,49	127,48
3	125,51	127,03	123,18
4	125,65	124,76	124,33
5	125,44	125,99	127,87
6	123,88	125,92	123,28
7	124,30	123,09	126,50
8	125,76	125,36	124,39
9	124,23	125,74	125,73
10	124,78	128,37	125,10
TB	124,74	125,81	125,54
RSD (%)	0,65	1,21	1,40
Giới hạn HL (mg)	106,25-143,75	106,25-143,75	106,25-143,75
Kết luận	Đạt	Đạt	Đạt

3.3.5. Khảo sát độ ổn định và xác định tuổi thọ của chế phẩm

3.3.5.1. Đánh giá mẫu thử theo USP XXIV (03 lô thử nghiệm)

Từ những kết quả trên cho thấy cả 3 lô đều đạt tiêu chuẩn USP XXIV, do đó có thể khảo sát độ ổn định của thuốc trên cả 3 lô này.

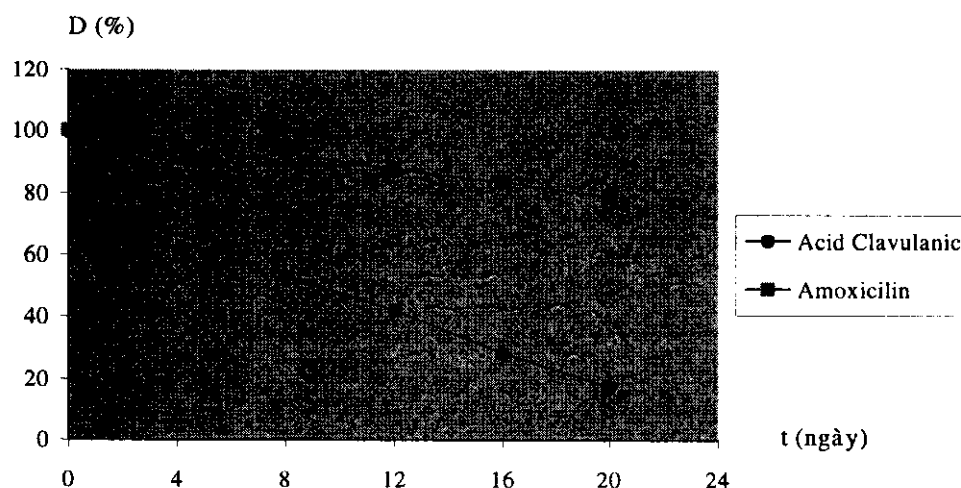
Kết quả ở bảng 3.3.32, bảng 3.3.33, bảng 3.3.34 và bảng 3.3.35.

3.3.5.2. So sánh tốc độ phân hủy của amoxicilin và acid clavulanic

Tiến hành định lượng mẫu của lô 3 được lão hóa cấp tốc ở nhiệt độ $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ / $80\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$, cho kết quả bảng 3.3.2.

Bảng 3.3.32: Khảo sát hàm lượng hoạt chất theo điều kiện lão hóa cấp tốc.

Hàm lượng (D %)		
t (ngày)	Acid clavulanic	Amoxicilin
0	99,68	99,92
4	85,99	97,2
8	53,2	92,81
12	42,28	87,21
16	28,31	83,39
20	17,58	78,52



Hình 3.3.5: Đồ thị biểu diễn sự giảm hàm lượng của acid clavulanic và amoxicilin.

Nhận xét: Tốc độ phân hủy của hoạt chất acid clavulanic nhanh hơn so với hoạt chất amoxicilin trong chế phẩm 2 thành phần này. Do đó tuổi thọ của thuốc được tính dựa trên sự giảm hàm lượng acid clavulanic.

3.3.5.3. Theo dõi độ ổn định của thuốc ở điều kiện bình thường (dài hạn)

- Khảo sát trên 3 lô thành phẩm 1, 2, 3.

- Điều kiện bảo quản: ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$.
- Chu kỳ thử nghiệm: 0, 3, 6, 9 12, (18, 24, 24, 36) tháng.
- Chất lượng của mẫu được xác định dựa trên các chỉ tiêu: tính chất cảm quan, hàm lượng nước, độ hòa tan, hàm lượng acid clavulanic.

Tính chất

Sau từng khoảng thời gian theo dõi định kỳ, các mẫu không có sự thay đổi về cảm quan bên ngoài so với mẫu khảo sát ban đầu. Tuy nhiên bột thuốc bên trong chuyển dần từ trắng ngà đến vàng nhạt, có mùi nhẹ theo thời gian bảo quản.

Hàm lượng nước

Bảng 3.3.33: Khảo sát hàm lượng nước của các mẫu được bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$

Tháng	Hàm lượng nước (%)				
	0	3	6	9	12
Lô 1	9,10	9,22	9,18	9,14	9,26
Lô 2	8,70	8,56	8,99	8,62	8,60
Lô 3	9,19	9,29	9,36	9,49	9,56

Kết quả phân tích phương sai một yếu tố, khảo sát sự ảnh hưởng của yếu tố thời gian trong quá trình bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$ cho thấy thời gian bảo quản không ảnh hưởng đến hàm lượng nước của mẫu ($F = 0,124 < F_{0,05} = 3,478$).

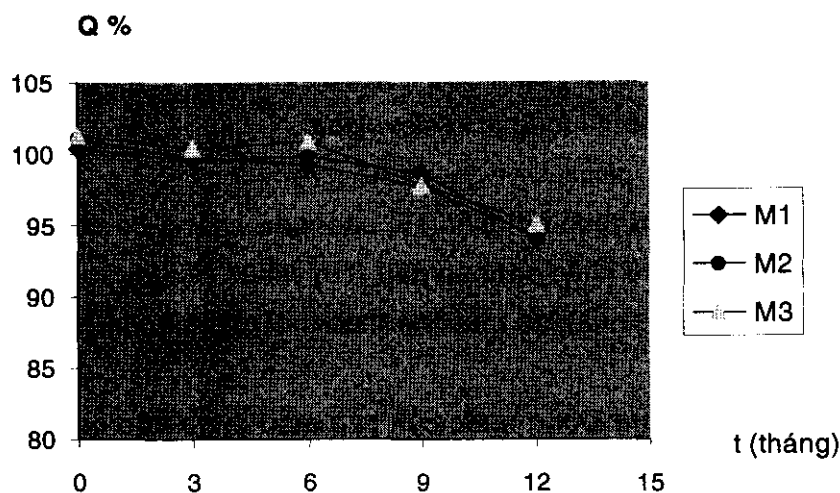
Độ hòa tan

Bảng 3.3.34: Kết quả khảo sát độ hòa tan amoxicilin của các mẫu được bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$

T (tháng)	Q% (Amoxicilin)				
	0	3	6	9	12
Lô 1	100,35	99,63	99,9	98,77	97,98
Lô 2	99,53	100,08	99,43	98,97	95,55
Lô 3	101,62	100,43	99,17	98,38	96,32

Bảng 3.3.35: Kết quả khảo sát độ hòa tan acid clavulanic của các mẫu được bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$

T (tháng)	Q% (Acid clavulanic)				
	0	3	6	9	12
Lô 1	100,38	99,56	99,72	98,66	93,94
Lô 2	101,08	99,7	99,18	97,7	94,13
Lô 3	101,27	100,37	100,78	97,82	94,97



Hình 3.3.6: Biểu đồ độ hòa tan acid clavulanic của mẫu theo thời gian

Phân tích phương sai một yếu tố, khảo sát sự ảnh hưởng của yếu tố thời gian trong quá trình bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$ cho thấy thời gian bảo quản có ảnh hưởng đến độ hòa tan của mẫu ($F = 61,644 > F_{0,05} = 3,478$).

Nhận xét: ở điều kiện bảo quản dài hạn, độ hòa tan của acid clavulanic của mẫu khảo sát giảm dần theo thời gian nhưng vẫn đạt yêu cầu quy định của chỉ tiêu này.

Hàm lượng hoạt chất

Bảng 3.3.36: Kết quả khảo sát hàm lượng amoxicilin trong 12 tháng bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$

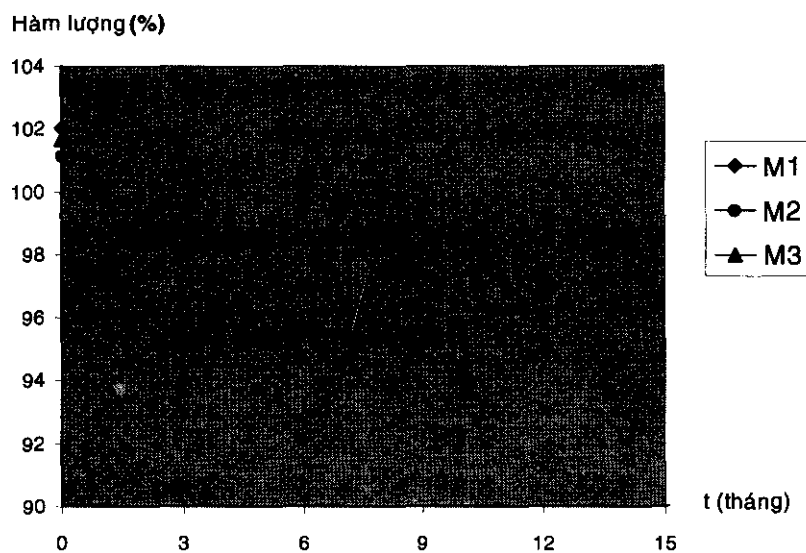
T (tháng)	Hàm lượng % của amoxicilin				
	0	3	6	9	12
Lô 1	101.58	101.26	100.17	99.74	98.22
Lô 2	100.49	100.17	100.19	99.51	97.97
Lô 3	101.1	100.89	100.34	99.94	98.8

Bảng 3.3.37: Kết quả khảo sát hàm lượng acid clavulanic trong 12 tháng bảo quản ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$

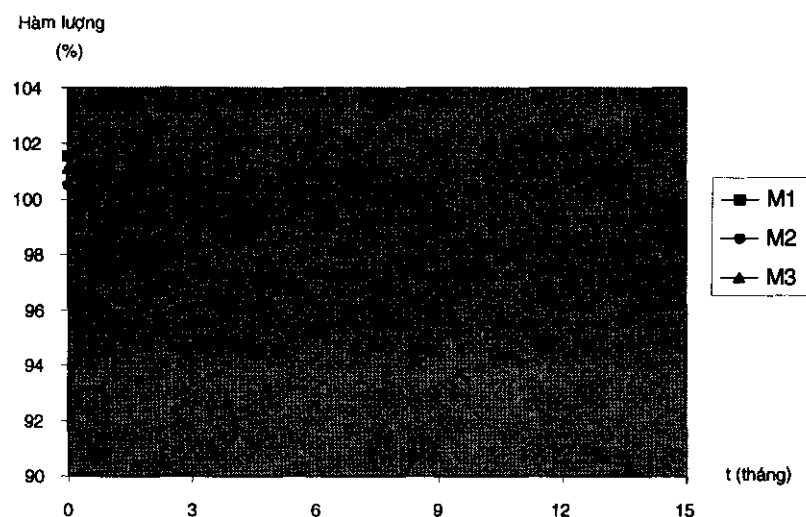
T (tháng)	Hàm lượng % của acid clavulanic				
	0	3	6	9	12
Lô 1	102,02	101,52	100,22	99,4	97,09
Lô 2	101,12	100,62	99,45	98,89	96,18
Lô 3	101,67	101,17	100,12	98,23	96,77

Nhận xét: Kết quả cho thấy trong quá trình bảo quản dài hạn, hàm lượng hoạt chất acid clavulanic và amoxicilin giảm theo thời gian. Mức độ giảm hàm lượng của acid

clavulanic cao hơn so với amoxicilin.



Hình 3.3.7: Biểu đồ biểu diễn sự giảm hàm lượng acid clavulanic



Hình 3.3.8: Biểu đồ biểu diễn sự giảm hàm lượng amoxicilin

3.3.5.4. Theo dõi độ ổn định của thuốc ở điều kiện $30 \pm 2^\circ\text{C} / 65\% \text{ RH} \pm 5\%$

Ở điều kiện lão hóa cấp tốc $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ với $75\% \text{ RH} \pm 5\%$, hàm lượng acid clavulanic giảm nhanh. Sau 4 tháng hàm lượng giảm còn 91-92%. Do đó độ ổn định của thuốc được khảo sát ở điều kiện $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C} / 65\% \text{ RH} \pm 5\%$.

- Khảo sát trên 3 lô thành phẩm 1, 2, 3.
- Điều kiện bảo quản: ở $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$.
- Chu kỳ thử nghiệm: 1, 2, 3, 4, 5, 6 tháng.
- Chất lượng của mẫu được xác định dựa trên các chỉ tiêu: tính chất cảm quan, hàm

lượng nước, độ hòa tan, hàm lượng hoạt chất.

Tính chất

Trong quá trình bảo quản, cảm quan bên ngoài của viên không thay đổi so với mẫu ban đầu. Tuy nhiên bột thuốc chuyển dần từ trắng ngà đến vàng nhạt rồi vàng nâu, có mùi từ nhẹ đến hăng nồng theo thời gian bảo quản.

Hàm lượng nước

Bảng 3.3.38: Hàm lượng nước các mẫu được bảo quản ở điều kiện $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/65\% \text{ RH} \pm 5\%$

t (tháng)	Hàm lượng nước (%)						
	0	1	2	3	4	5	6
Lô 1	9,14	9,25	8,69	9,04	8,15	8,63	8,84
Lô 2	8,62	8,94	8,69	8,12	7,94	8,16	8,12
Lô 3	9,49	9,16	9,35	8,86	8,69	8,43	8,18

Nhận xét: Ở điều kiện $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$, hàm lượng nước của các mẫu không thay đổi theo thời gian ($F=2,708 < F_{0,05} = 2,847$).

Độ hòa tan

Bảng 3.3.39: Kết quả khảo sát độ hòa tan của acid clavulanic sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$

Lần đo	Độ hòa tan Q(%)					
	Trước khi lão hóa			Sau khi lão hóa		
	Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 1	Lô 2	Lô 3
1	99,56	98,02	99,19	90,07	88,60	88,74
2	97,79	97,69	94,63	81,25	93,69	80,52
3	99,48	97,73	98,29	86,15	86,43	86,97
4	98,92	96,70	98,72	93,98	90,69	93,08
5	97,62	97,75	97,32	87,45	81,90	84,64
6	98,61	98,31	98,77	89,66	85,33	88,34
TB	98,66	97,70	97,82	88,09	87,77	87,05

Độ hòa tan của acid clavulanic ở cả 3 lô giảm sau khi lão hoá.

Hàm lượng

Bảng 3.3.40: Kết quả khảo sát hàm lượng acid clavulanic ở điều kiện $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$

t (tháng)	Hàm lượng (%)						
	0	1	2	3	4	5	6
Lô 1	99,40	98,59	97,96	97,04	95,20	93,76	92,26
Lô 2	98,89	97,45	96,27	96,63	94,17	93,88	92,13
Lô 3	99,02	98,61	97,76	96,48	94,46	93,49	91,54

Hàm lượng của acid clavulanic giảm theo thời gian bảo quản ở điều kiện $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $65\% \text{ RH} \pm 5\%$.

3.3.5.5. Xác định tuổi thọ

Tuổi thọ của thuốc được ước tính dựa vào sự giảm hàm lượng acid clavulanic sau 12 tháng được bảo quản ở điều kiện bình thường $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ với $60\% \text{ RH} \pm 5\%$.

Bảng 3.3.41: Kết quả sự thay đổi hàm lượng acid clavulanic ở $25\text{ }^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RH} \pm 5\%$ trong thời gian bảo quản

Lô	Phần trăm hàm lượng					
	0 tháng	3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	18 tháng
1	102,02	101,52	100,22	99,4	97,09	96,49
2	101,12	100,62	99,45	98,89	96,18	95,58
3	101,67	101,17	100,12	98,63	97,17	96,17

Bảng 3.3.42: Kết quả phân tích thống kê sự tương quan giữa hàm lượng acid clavulanic và thời gian bảo quản ở $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RH} \pm 5\%$ và tuổi thọ ước tính tại thời điểm 12 tháng

Thuốc thử nghiệm	Hệ số tương quan R	Hệ số B	Hệ số Bo	Tuổi thọ (T_{90}) (ngày)
Lô 1	0,970	-0,013	102,45	849
Lô 2	0,949	-0,013	101,57	869
Lô 3	0,984	-0,013	102,14	801

Tuổi thọ thực nghiệm của lô 2 lớn hơn 60 ngày (68 ngày) so với lô 3. Do đó tuổi thọ của lô 2 không được dùng để tính tuổi thọ của sản phẩm. Tuổi thọ của sản phẩm là $(849+801)/2 = 825$ ngày hay 27 tháng.

3.3.6. Kết quả nghiên cứu tương đương sinh học

Thuốc thử nghiệm và thuốc đối chiếu

Thuốc thử nghiệm: Viên nghiên cứu chứa 500 mg amoxicilin và 125 mg acid clavulanic, sản xuất ngày 22 tháng 02 năm 2003. Hàm lượng trung bình là 502,58

mg và 127,21 mg.

Thuốc đối chiếu: Viên Augmentin cùng hàm lượng, lô 75762A, hạn dùng 05/2005.

Hàm lượng trung bình là 500,14 mg và 123,82 mg.

Hàm lượng amoxicilin và acid clavulanic của viên nghiên cứu và viên đối chiếu khác nhau không quá 5%. Vậy 2 chế phẩm này đạt yêu cầu cho thử nghiệm tương đương sinh học.

Xác định tương đương sinh học *in vitro* qua thử nghiệm độ hoà tan

Bảng 3.3.43: Kết quả tương đương sinh học *in vitro*

Số viên thử	Tỷ lệ (%) amoxicilin hòa tan		Tỷ lệ (%) clavulanic hòa tan	
	Viên Aug.	Viên NC	Viên Aug.	Viên NC
1	101,24	100,42	100,32	101,02
2	99,94	100,21	101,12	101,8
3	99,97	101,12	99,82	100,8
4	99,95	100,02	100,75	100,11
5	101,27	100,05	100,31	100,88
6	99,86	99,93	100,58	101,18
7	100,19	99,89	100,16	100,56
8	100,32	101,24	100,05	101,54
9	99,82	99,77	101,8	100,45
10	99,12	99,78	101,04	100,89
11	100,36	100,68	101,12	101,26
12	100,19	100,28	100,64	100,95
TB	101,24	100,42	100,32	101,02
Giá trị	$F = 1,43 < F_{0,05} = 2,82$		$F = 1,46 < F_{0,05} = 2,82$	
thống kê	$t = 0,43 < t_{0,05} = 2,07$		$t = 1,48 < t_{0,05} = 2,07$	

Kết quả cho thấy thuốc nghiên cứu tương đương sinh học *in vitro* với thuốc đối chiếu trong thử nghiệm độ hòa tan.

Kết quả thẩm định phương pháp HPLC định lượng amoxicilin và acid clavulanic trong huyết thanh

Bảng 3.3.44: Kết quả các thông số sắc ký ứng với đỉnh của hoạt chất trong huyết thanh

TT		Amoxicilin			Acid clavulanic			
1	t _R	S	T	N	t _R	S	T	N
2	5,245	3,708	0,92	2629	3,085	0,779	0,990	1263
3	5,121	3,641	0,92	2887	3,010	0,713	0,94	1310
4	5,094	3,562	0,92	2513	2,99	0,811	0,96	1454
5	5,071	3,241	0,91	2922	3,00	0,744	0,95	1256
6	5,086	3,674	0,90	2562	3,07	0,717	0,94	1239
TB	5,123	3,560	0,914	2703	3,026	0,753	0,956	1304,4
SD	0,070	0,201	0,009	189,26	0,036	0,042	0,021	87,672
RSD	1,37%	5,64%	0,98%	7,00%	1,19%	5,56%	2,17%	6,72%

Các thông số kỹ thuật sắc ký của cả 2 hoạt chất đều có RSD < 15%. Vậy phương pháp đạt tính tương thích hệ thống.

Bảng 3.3.45: Kết quả xác định khoảng tuyến tính của phương pháp HPLC

Số TT	Amoxicilin		Acid clavulanic	
	Nồng độ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Diện tích đỉnh	Nồng độ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Diện tích đỉnh
1	0,625	0,451	0,3125	0,124
2	1,250	0,725	0,6250	0,213
3	2,500	1,163	1,2500	0,410
4	5,000	3,912	2,5000	0,741
5	10,000	7,126	5,000	1,745
6	20,000	14,424	10,000	3,682
Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 0,731x$ $R^2 = 0,9969$		$\hat{y} = 0,370x$ $R^2 = 0,9973$	

Kết quả cho thấy diện tích đỉnh có tương quan tuyến tính với khoảng nồng độ khảo sát cho cả 2 hoạt chất.

Bảng 3.3.46: Kết quả xác định độ chính xác trong ngày của phương pháp định lượng amoxicilin trong huyết thanh

TT	Nồng độ 0,625 $\mu\text{g}/\text{ml}$		Nồng độ 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$		Nồng độ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
	Diện tích đỉnh	Nồng độ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Diện tích đỉnh	Nồng độ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Diện tích đỉnh	Nồng độ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
	0,448	0,631	3,708	5,223	7,416	10,445
2	0,475	0,669	3,641	5,128	7,281	10,254
3	0,462	0,650	3,562	5,017	7,124	10,033
4	0,412	0,580	3,214	4,527	6,428	9,054
5	0,358	0,504	3,674	5,175	7,062	9,946
6	0,387	0,545	3,560	5,014	7,321	10,312
Trung bình		0,596		5,014		10,007
RSD (%)		10,83		5,04		5,01

Bảng 3.3.47: Kết quả xác định độ chính xác giữa các ngày của phương pháp định lượng amoxicilin trong huyết thanh

TT	Nồng độ 0,625 µg/ ml		Nồng độ 5 µg/ ml		Nồng độ 10 µg/ ml	
	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)
	0,360	0,560	3,090	4,807	7,069	10,999
2	0,345	0,537	2,850	4,434	6,578	10,236
3	0,400	0,623	2,970	4,620	6,482	10,081
4	0,399	0,621	3,120	4,854	6,330	9,848
5	0,377	0,586	3,290	5,118	6,250	9,723
6	0,407	0,633	2,990	4,625	6,531	10,159
Trung bình		0,593		4,743		10,174
RSD (%)		6,56		5,00		4,40

Bảng 3.3.48: Kết quả xác định độ chính xác trong ngày của phương pháp định lượng acid clavulanic trong huyết thanh

TT	Nồng độ 0,3125 µg/ ml		Nồng độ 2,5 µg/ ml		Nồng độ 5 µg/ ml	
	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)
	0,141	0,217	1,621	2,533	3,116	4,797
2	0,140	0,216	1,461	2,283	2,850	4,387
3	0,145	0,223	1,553	2,427	3,242	4,991
4	0,127	0,196	1,559	2,436	2,974	4,578
5	0,137	0,211	1,377	2,152	3,046	4,689
6	0,105	0,162	1,621	2,366	3,250	5,003
Trung bình		0,204		2,366		4,741
RSD (%)		11,10		6,31		5,07

Bảng 3.3.49: Kết quả xác định độ chính xác giữa các ngày của phương pháp định lượng acid clavulanic trong huyết thanh

TT	Nồng độ 0,3125 µg/ ml		Nồng độ 2,5 µg/ ml		Nồng độ 5 µg/ ml	
	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)
1	0,225	0,361	1,421	2,276	2,930	4,647
2	0,172	0,276	1,299	2,083	3,150	5,096
3	0,165	0,264	1,270	2,035	2,760	4,423
4	0,200	0,321	1,332	2,131	2,980	4,776
5	0,190	0,305	1,498	2,404	3,141	5,032
6	0,210	0,337	1,39	2,228	2,889	4,631
Trung bình		0,310		2,193		4,768
RSD (%)		11,76		6,24		5,39

Kết quả cho thấy phương pháp định lượng amoxicilin và acid clavulanic trong huyết thanh đạt độ chính xác trong ngày và giữa các ngày theo yêu cầu của phương pháp định lượng thuốc trong dịch sinh học.

Bảng 3.3.50: Kết quả xác định độ đúng trong ngày của phương pháp định lượng amoxicilin trong huyết thanh

TT	Nồng độ 0,625 µg/ ml		Nồng độ 5 µg/ ml		Nồng độ 10 µg/ ml	
	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)
1	0,486	0,579	4,145	4,913	8,230	9,756
2	0,542	0,646	4,062	4,815	7,980	9,459
3	0,520	0,619	4,280	5,073	8,450	10,017
4	0,529	0,630	4,437	5,260	8,117	9,622
5	0,487	0,580	4,098	4,858	8,556	10,142
6	0,499	0,594	4,223	5,006	8,011	9,496
Trung bình		0,608		4,988		9,749
Sai biệt nồng độ		0,017		0,012		0,251
Tỷ lệ (%) sai biệt		2,72		0,25		2,51

Bảng 3.3.51: Kết quả xác định độ đúng giữa các ngày của phương pháp định lượng amoxicilin trong huyết thanh

TT	Nồng độ 0,625 µg/ ml		Nồng độ 5 µg/ ml		Nồng độ 10 µg/ ml	
	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)
	0,543	0,643	4,338	5,142	7,96	9,171
2	0,520	0,616	4,280	5,073	8,87	10,219
3	0,395	0,468	2,970	3,521	9,05	10,426
4	0,495	0,587	4,301	5,098	8,23	9,482
5	0,535	0,634	4,112	4,874	7,98	9,194
6	0,555	0,658	3,455	4,096	8,23	9,482
TB		0,601		4,634		9,662
Sai biệt nồng độ		0,024		0,366		0,338
Tỷ lệ (%) sai biệt		3,84		7,32		3,38

Bảng 3.3.52: Kết quả xác định độ đúng trong ngày của phương pháp định lượng acid clavulanic trong huyết thanh

TT	Nồng độ 0,3125 µg/ml		Nồng độ 2,5 µg/ ml		Nồng độ 5 µg/ ml	
	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ ml)
	0,181	0,283	1,893	2,692	3,400	5,274
2	0,195	0,340	1,698	2,358	3,405	5,255
3	0,186	0,291	1,768	2,456	3,455	5,332
4	0,205	0,320	1,646	2,286	2,990	4,614
5	0,215	0,336	1,670	2,319	3,010	4,645
6	0,211	0,330	1,700	2,316	3,120	4,815
Trung bình		0,317		2,405		4,985
Sai biệt nồng độ		-0,005		0,095		0,015
Tỷ lệ (%) sai biệt		-0,60		3,80		0,31

Bảng 3.3.53: Kết quả xác định độ đúng giữa các ngày của phương pháp định lượng acid clavulanic trong huyết thanh

TT	Nồng độ 0,3125 µg/ml		Nồng độ 2,5 µg/ml		Nồng độ 5 µg/ml	
	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ml)	Diện tích đỉnh	Nồng độ (µg/ml)
	0,181	0,279	1,67	2,285	3,123	4,808
2	0,195	0,299	1,7	2,326	3,201	4,928
3	0,186	0,286	1,530	2,355	3,120	4,803
4	0,205	0,316	1,480	2,278	3,182	4,898
5	0,2105	0,324	1,83	2,254	3,195	4,918
6	0,193	0,297	1,92	2,365	3,168	4,877
Trung bình		0,300		2,311		4,872
Sai biệt nồng độ		0,0125		0,189		0,128
Tỷ lệ (%) sai biệt		4,000		7,56		2,561

Kết quả cho thấy phương pháp định lượng amoxicilin và acid clavulanic trong huyết thanh đạt độ đúng trong ngày và giữa các ngày theo yêu cầu của phép phân tích sinh học.

Bảng 3.3.54: Kết quả xác định tỷ lệ phục hồi đối với amoxicilin trong huyết thanh

TT	Nồng độ 1,25 µg/ml			Nồng độ 5 µg/ml			Nồng độ 10 µg/ml		
	S1	S2	%	S1	S2	%	S1	S2	%
1	1,024	0,956	93,36	3,934	3,708	94,26	7,816	7,102	90,86
2	0,910	0,802	88,13	3,641	3,463	95,11	8,107	7,686	94,81
3	0,978	0,952	97,34	3,91	3,562	91,10	7,786	7,718	99,13
4	0,996	0,962	96,59	3,267	3,214	98,38	8,211	7,982	97,21
5	0,918	0,834	90,85	3,674	3,527	96,00	7,825	7,326	93,62
Trung bình			93,25			94,97			95,13
SD			3,87			2,65			3,19
RSD (%)			4,15			2,79			3,36

S1: Diện tích đỉnh của hoạt chất trong mẫu không chiết hoạt chất (hoạt chất trong huyết thanh đã khử protein).

S2: Diện tích đỉnh của hoạt chất trong mẫu chiết hoạt chất (mẫu phải qua giai đoạn xử lý khử protein).

%; Tỷ lệ % phục hồi (hiệu suất chiết).

Bảng 3.3.55: Kết quả xác định tỷ lệ phục hồi đối với clavulanic trong huyết thanh

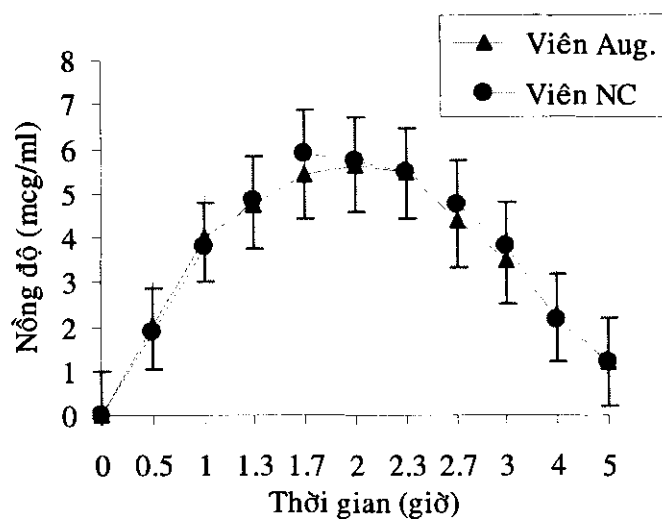
TT	Nồng độ 0,625 µg/ml			Nồng độ 2,5 µg/ ml			Nồng độ 5 µg/ ml		
	S1	S2	%	S1	S2	%	S1	S2	%
1	0,402	0,396	98,51	1,563	1,527	97,70	3,215	3,054	94,99
2	0,384	0,364	94,79	1,539	1,492	96,95	3,078	2,994	97,27
3	0,374	0,35	93,58	1,487	1,325	89,11	2,987	2,719	91,03
4	0,362	0,328	90,61	1,445	1,370	94,81	2,890	2,728	94,39
5	0,376	0,364	96,81	1,505	1,462	97,14	3,015	2,747	91,11
Trung bình			94,86			95,14			93,75
SD			3,03			3,55			2,68
RSD (%)			3,20			3,73			2,86

Kết quả cho thấy phương pháp đạt hiệu suất chiết (hiệu suất chiết > 90%) cho cả amoxicilin và acid clavulanic..

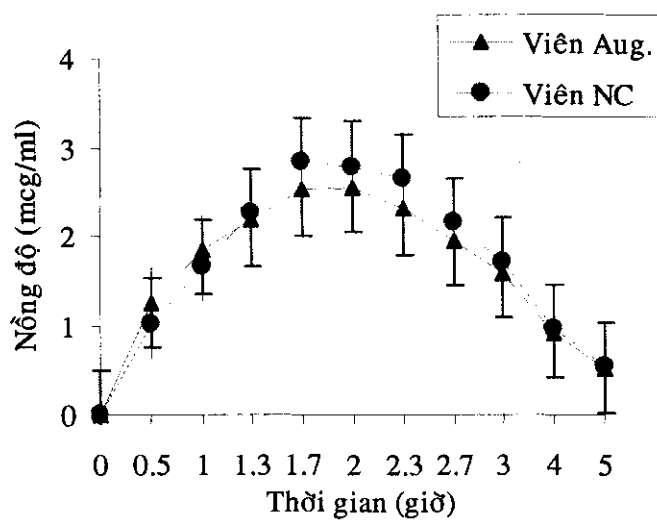
Kết quả xác định tương đương sinh học theo phương pháp định lượng thuốc trong huyết thanh

Bảng 3.3.56: Kết quả phân tích nồng độ amoxicilin và acid clavulanic trong huyết thanh 12 người tình nguyện sau khi uống viên Augmentin và viên nghiên cứu

Giờ	Viên Augmentin		Viên nghiên cứu	
	Amox. (µg/ ml) (n = 12)	Clav. (µg/ ml) (n = 12)	Amox. (µg/ ml) (n = 12)	Clav. (µg/ ml) (n = 12)
0,5	2,026 ± 1,459	1,249 ± 0,376	1,848 ± 1,175	1,023 ± 0,427
1,0	4,002 ± 1,624	1,844 ± 0,397	3,816 ± 2,098	1,654 ± 0,741
1,3	4,750 ± 1,468	2,174 ± 0,395	4,744 ± 1,966	2,265 ± 0,665
1,7	5,418 ± 1,429	2,508 ± 0,540	5,849 ± 1,807	2,835 ± 0,551
2,0	5,588 ± 1,461	2,550 ± 0,480	5,710 ± 1,199	2,792 ± 0,451
2,3	5,434 ± 1,462	2,307 ± 0,667	5,431 ± 0,869	2,607 ± 0,702
2,7	4,339 ± 1,274	1,952 ± 0,690	4,740 ± 1,232	2,154 ± 0,612
3,0	3,470 ± 1,186	1,590 ± 0,594	3,788 ± 1,255	1,710 ± 0,470
4,0	2,220 ± 0,755	0,912 ± 0,313	2,150 ± 0,744	0,965 ± 0,205
5,0	1,183 ± 0,347	0,523 ± 0,168	1,174 ± 0,410	0,548 ± 0,120



Hình 3.3.10: Đồ thị nồng độ máu trung bình của amoxicilin từ 12 NTN



Hình 3.3.11: Đồ thị nồng độ máu trung bình của acid clavulanic từ 12 NTN

Bảng 3.3.57: Các thông số dược động của amoxicilin từ 12 người tình nguyện sau khi uống viên Augmentin (Aug.) và viên nghiên cứu (NC)

NTN	Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		AUC ₀₋₅ ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{ml}$)		Tmax (giờ)	
	Viên Aug.	Viên NC	Viên Aug.	Viên NC	Viên Aug.	Viên NC
	6,038	5,455	16,592	14,117	2,0	2,0
2	4,418	5,329	12,044	13,623	1,3	1,7
3	6,909	7,397	15,118	19,182	2,3	2,7
4	5,939	5,902	12,957	14,350	1,7	1,7
5	7,059	7,243	21,260	18,683	2,3	2,0
6	7,102	7,344	17,814	15,969	1,7	2,0
7	8,419	7,564	19,779	18,711	2,0	1,7
8	7,544	7,226	16,827	18,382	1,0	1,7
9	6,972	6,834	20,948	19,309	2,3	2,3
10	5,236	5,232	12,817	11,717	2,3	2,33
11	6,063	6,214	14,944	15,943	1,7	1,7
12	6,021	8,788	14,686	19,517	1,3	1,0
TB	6,477	6,711	16,315	16,625	1,83	1,89
SD	1,075	1,089	3,137	2,684	0,46	0,43

Bảng 3.3.58: Các thông số dược động của acid clavulanic từ 12 người tình nguyện sau khi uống viên Augmentin (Aug.) và viên nghiên cứu (NC)

NTN	Cmax ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		AUC ₀₋₅ ($\mu\text{g}\cdot\text{giờ}/\text{ml}$)		Tmax (giờ)	
	Viên Aug.	Viên NC	Viên Aug.	Viên NC	Viên Aug.	Viên NC
1	2,902	2,887	5,738	7,292	1,7	1,7
2	2,108	2,596	5,363	6,698	1,3	1,7
3	2,500	3,027	5,902	7,262	2,0	2,3
4	3,234	3,253	8,569	8,843	1,7	1,7
5	3,340	3,580	8,625	9,143	2,3	2,3
6	2,871	3,287	6,916	8,265	1,3	1,7
7	3,191	3,418	9,535	8,550	2,3	2,0
8	3,342	3,290	7,805	7,109	1,7	1,7
9	2,885	3,531	9,323	9,218	2,7	2,3
10	2,117	3,397	6,645	7,516	2,0	2,0
11	2,724	2,833	7,193	6,257	1,7	2,0
12	3,085	3,583	7,232	7,416	2,0	1,3
TB	2,858	3,224	7,404	7,797	1,89	1,89
SD	0,411	0,320	1,392	0,978	0,41	0,33

Kết quả phân tích phương sai

Kết quả phân tích phương sai cho thấy trình tự thử, giai đoạn thử và chế phẩm thuốc thử nghiệm không ảnh hưởng đến kết quả nhưng đối tượng thử (người tình nguyện) ảnh hưởng rõ đến kết quả.

Xác định tương đương sinh học theo khoảng tin cậy 90%

Bảng 3.3.59: Kết quả so sánh tương đương theo khoảng tin cậy 90% đối với amoxicilin từ chế phẩm đối chiếu (Aug.) và chế phẩm nghiên cứu (NC)

Các giá trị so sánh	Cmax (µg/ ml)		AUC ₀₋₅ (µg.giờ/ ml)		Tmax (giờ)	
	Viên Aug.	Viên NC	Viên Aug.	Viên NC	Viên Aug.	Viên NC
	6,477	6,711	16,315	16,625	1,83	1,89
S (SD)	1,075	1,089	3,137	2,684	0,46	0,43
$t_{0.05} \times S / \sqrt{N}$		0,565		1,392		0,23
$\bar{X} - t_{0.05} \times S / \sqrt{N}$		6,146		15,234		1,66
$\bar{X} + t_{0.05} \times S / \sqrt{N}$		7,275		18,017		2,11

- **Đối với Cmax:** Ở mức tin cậy 90%, giá trị trung bình Cmax của amoxicilin từ thuốc nghiên cứu trong khoảng 6,148-7,275; giới hạn 80-120% của giá trị trung bình của Cmax từ thuốc đối chiếu là 5,181-7,772. Vậy giá trị Cmax của amoxicilin từ thuốc nghiên cứu tương đương với thuốc đối chiếu.
- **Đối với AUC₀₋₅:** Ở mức tin cậy 90%, giá trị trung bình AUC₀₋₅ của amoxicilin từ thuốc nghiên cứu trong khoảng 15,234-18,017; giới hạn 80-120% của giá trị trung bình của AUC₀₋₅ từ thuốc đối chiếu là 13,052-19,579. Vậy giá trị AUC₀₋₅ của amoxicilin từ thuốc nghiên cứu tương đương với thuốc đối chiếu.
- **Đối với Tmax:** Ở mức tin cậy 90%, giá trị trung bình Tmax của amoxicilin từ thuốc nghiên cứu trong khoảng 1,66-2,11; giới hạn 80-120% của giá trị trung bình của Tmax từ thuốc đối chiếu là 1,47-2,20. Vậy giá trị Tmax của amoxicilin từ thuốc nghiên cứu tương đương với thuốc đối chiếu.

Bảng 3.3.60: Kết quả so sánh tương đương theo khoảng tin cậy 90% đối với acid clavulanic từ chế phẩm đối chiếu (Aug.) và chế phẩm nghiên cứu (NC)

Các giá trị so sánh	Cmax (µg/ ml)		AUC ₀₋₅ (µg.giờ/ ml)		Tmax (giờ)	
	Viên Aug.	Viên NC	Viên Aug.	Viên NC	Viên Aug.	Viên NC
$\bar{X}$	2,858	3,224	7,404	7,797	1,89	1,89
S (SD)	0,411	0,320	1,392	0,978	0,41	0,33
$t_{0,05} \times S / \sqrt{N}$		0,166		0,507		0,170
$\bar{X} - t_{0,05} \times S / \sqrt{N}$		3,058		7,290		1,719
$\bar{X} + t_{0,05} \times S / \sqrt{N}$		3,389		8,305		2,059

- **Đối với Cmax:** Ở mức tin cậy 90%, giá trị trung bình Cmax của acid clavulanic từ thuốc nghiên cứu trong khoảng 3,058-3,389; giới hạn 80-120% giá trị trung bình Cmax của acid clavulanic từ thuốc đối chiếu là 2,287-3,430. Vậy giá trị Cmax của acid clavulanic từ thuốc nghiên cứu tương đương với thuốc đối chiếu.
- **Đối với AUC:** Ở mức tin cậy 90%, giá trị trung bình AUC₀₋₅ của acid clavulanic từ thuốc nghiên cứu trong khoảng 7,299-8,305; giới hạn 80-120% giá trị trung bình Cmax của acid clavulanic từ thuốc đối chiếu là 5,923-8,884. Vậy giá trị AUC₀₋₅ của acid clavulanic từ thuốc nghiên cứu tương đương với thuốc đối chiếu.
- **Đối với Tmax:** Ở mức tin cậy 90%, giá trị trung bình Tmax của acid clavulanic từ thuốc nghiên cứu trong khoảng 1,72-2,06; giới hạn 80-120% giá trị trung bình Cmax của acid clavulanic từ thuốc đối chiếu là 1,51-2,2. Vậy giá trị Tmax của acid clavulanic từ thuốc nghiên cứu tương đương với thuốc đối chiếu.

3.4. NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT VI NANG ĐỂ BẢO CHẾ THUỐC VIÊN VITAMIN CÓ SINH KHẢ DỤNG VÀ ĐỘ ỔN ĐỊNH CAO

3.4.1. Xây dựng phương pháp định lượng các vitamin trong viên 3B

Vitamin B₁, B₆ được định lượng theo phương pháp của Dược điển Anh 1998. Vitamin B₁₂ được định lượng theo phương pháp của Dược điển Mỹ 23. Vì vậy, chúng tôi chỉ khảo sát khoảng tuyến tính và nghiên cứu độ lặp lại, độ tin cậy của phương pháp định lượng trong điều kiện thực nghiệm của nghiên cứu này.

3.4.1.1. Khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng các vitamin B₁, B₆ và B₁₂ bằng HPLC.

Khi định lượng vitamin B₁, B₆ bằng HPLC, các Dược điển thường qui định nồng độ của hai loại vitamin này nằm trong khoảng từ 20 đến 100µg/ml. Định lượng vitamin

B₁₂, Dược điển Mỹ qui định nồng độ khoảng 1 µg/ml, chúng tôi pha các mẫu thử có nồng độ khác nhau trong các khoảng qui định trên, sau đó xác định diện tích các pic tương ứng. Kết quả được trình bày trong các bảng dưới đây:

Bảng 3.4.1. Diện tích các pic thu được khi định lượng các mẫu thử của vitamin B1

Nồng độ Vit.B ₁ : X(µg/ml)	19,9	30,1	45,0	67,1	100,6
Diện tích pic (Y)	300,88	456,79	681,26	1013,94	1524,19

Hệ số tương quan $r = 0,9999$;

Phương trình hồi qui: $Y = 15,14X - 0,05$

Bảng 3.4.2 Diện tích các pic thu được khi ĐL các mẫu thử của vitamin B6

Nồng độ Vit.B ₆ : X(µg/ml)	19,1	28,5	42,5	63,7	95,5
Diện tích pic (Y)	771,99	1153,51	1721,52	2582,55	3866,19

Hệ số tương quan $r = 0,9999$;

Phương trình hồi qui: $Y = 40,51X - 0,68$

Bảng 3.4.3. Diện tích các pic thu được khi ĐL các mẫu thử của vitamin B12

Nồng độ Vit.B ₁₂ : X(µg/ml)	0,7	0,9	1,2	1,5	1,8
Diện tích pic (Y)	156,14	201,12	267,82	335,15	403,54

Hệ số tương quan $r = 0,9999$

Phương trình hồi qui: $Y = 224,6X - 1,27$

Nhận xét: Trong khoảng nồng độ khảo sát đối với cả 3 loại vitamin B₁, B₆ và B₁₂, diện tích của các pic thu được có tương quan hồi qui tuyến tính với nồng độ của các mẫu thử.

3.4.1.2. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp định lượng

Sử dụng mẫu viên 3B đã bào chế, pha mẫu thử và định lượng theo phương pháp đã nêu, số phép đo là 5 lần. Kết quả được trình bày ở các bảng 3.4.4 ; 3.4.5 và 3.4.6.

Bảng 3.4.4. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp ĐL vitamin B1, bằng HPLC

Số lần TN	Diện tích của các pic	Hàm lượng (%)	Số liệu thống kê
1	718,30	104,02	$\bar{X} = 104,08$ $S^2 = 0,0393$ $SD = 0,20$ $RSD = 0,19\%$
2	720,72	104,37	
3	718,02	103,98	
4	719,13	104,16	
5	717,13	103,85	

Bảng 3.4.5. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp ĐL vitamin B₆, bằng HPLC

Số lần TN	Diện tích của các pic	Hàm lượng (%)	Số liệu thống kê
1	2047,45	102,89	$\bar{X} = 102,96$ $S^2 = 0,0254$ $SD = 0,16$ $RSD = 0,15\%$
2	2051,03	103,74	
3	2044,47	102,74	
4	2052,62	103,15	
5	2048,84	102,96	

Bảng 3.4.6. Khảo sát độ lặp lại của phương pháp ĐL vitamin B₁₂, bằng HPLC

Số lần TN	Diện tích của các pic	Hàm lượng (%)	Số liệu thống kê
1	232,39	110,20	$\bar{X} = 110,10$ $S^2 = 0,0310$ $SD = 0,18$ $RSD = 0,16\%$
2	232,62	110,31	
3	231,92	109,98	
4	232,28	110,15	
5	231,69	109,87	

Nhận xét: Phương pháp định lượng vitamin B₁, B₆ và B₁₂ đều có sai số tương đối rất nhỏ - tức là độ lặp lại cao.

3.4.1.3. Khảo sát độ tin cậy của phương pháp

Để khảo sát độ tin cậy của phương pháp, chúng tôi sử dụng phương pháp thêm: Dùng dung dịch thử đã xác định hàm lượng, thêm một lượng chất chuẩn sao cho nồng độ dung dịch sau khi thêm chất chuẩn vẫn nằm trong khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng. Sau đó tìm lại lượng chất đã thêm bằng HPLC. Kết quả được trình bày ở các bảng 3.4.7, 3.4.8 và 3.4.9.

Bảng 3.4.7: Khảo sát độ lặp lại của phương pháp ĐL vitamin B₁, bằng HPLC

Lượng thêm vào (µg)	Lượng tìm thấy (µg)	% tìm thấy	Số liệu thống kê
1000	990,1	99,01	$\bar{X} = 99,49$ $S^2 = 0,2200$ $SD = 0,47$ $RSD = 0,42\%$
1000	997,8	99,78	
1000	996,4	99,64	
1000	1000,2	100,02	
1000	989,8	98,98	

Bảng 3.4.8: Khảo sát độ lặp lại của phương pháp định lượng vitamin B₆, bằng HPLC

Lượng thêm vào (µg)	Lượng tìm thấy (µg)	% tìm thấy	Số liệu thống kê
1000	988,9	98,89	$\bar{X} = 99,56$ $S^2 = 0,2486$ $SD = 0,50$ $RSD = 0,50\%$
1000	991,9	99,19	
1000	997,8	99,78	
1000	1000,4	100,04	
1000	999,2	99,92	

Bảng 3.4.9: Khảo sát độ lặp lại của phương pháp định lượng vitamin B12 bằng HPLC

Lượng thêm vào (μg)	Lượng tìm thấy (μg)	% tìm thấy	Số liệu thống kê
20	19,864	99,32	$\bar{X} = 99,36$ $S^2 = 0,2307$ $SD = 0,48$ $RSD = 0,48\%$
20	19,750	98,75	
20	19,816	99,08	
20	19,990	99,95	
20	19,942	99,71	

Nhận xét: Các kết quả khảo sát độ tin cậy của phương pháp định lượng vitamin B₁, B₆ và B₁₂ cho thấy tỷ lệ % được chất tìm thấy cao (hầu hết là > 99%) và sai số tương đối rất nhỏ (<0,5%) chứng tỏ phương pháp định lượng có độ tin cậy cao.

3.4.2. Kết quả định lượng vitamin trong một số mẫu viên 3B đang lưu hành

Chúng tôi lấy ngẫu nhiên các mẫu viên 3B đang lưu hành của 5 cơ sở sản xuất khác nhau để kiểm tra hàm lượng dược chất: 01 mẫu nhập ngoại (ký hiệu là mẫu 1); 02 mẫu do các doanh nghiệp phía Bắc sản xuất (mẫu 2 và 3); 02 mẫu do các doanh nghiệp phía Nam sản xuất (mẫu 4 và 5)

Hàm lượng vitamin trong các mẫu nghiên cứu tại thời điểm kiểm tra được trình bày trong bảng 3.4.10.

Bảng 3.4.10. Hàm lượng vitamin trong các mẫu viên

Mẫu	X	Hàm lượng các vitamin (%)		
		Vitamin B ₁	Vitamin B ₆	Vitamin B ₁₂
1	0,62	98,35 $\pm$ 0,59	114,01 $\pm$ 0,89	75,14 $\pm$ 0,41
2	0,76	110,02 $\pm$ 0,74	103,15 $\pm$ 0,71	108,35 $\pm$ 0,38
3	0,71	97,15 $\pm$ 0,86	106,38 $\pm$ 0,88	46,59 $\pm$ 0,53
4	0,85	113,96 $\pm$ 0,89	98,97 $\pm$ 0,91	93,58 $\pm$ 0,84
5	0,81	102,14 $\pm$ 0,75	96,24 $\pm$ 0,72	95,15 $\pm$ 0,72

(X là tỷ lệ giữa thời gian sử dụng còn lại và tuổi thọ của các mẫu thuốc)

Kết quả cho thấy: Hàm lượng vitamin B₁ và B₆ trong tất cả các mẫu viên nghiên cứu đều đạt yêu cầu so với qui định (>90%). Trong 5 mẫu nghiên cứu, có tới 2 mẫu

không đạt chỉ tiêu hàm lượng vitamin B₁₂ (<90%) mặc dù thời hạn sử dụng còn rất dài.

3.4.3. Nghiên cứu lựa chọn thành phần viên Vitamin B₁, B₆, B₁₂

3.4.3.1. Nghiên cứu sự tương tác giữa các dược chất

a) Sự tương tác giữa các dược chất trong điều kiện bao gói chống ẩm

Hàm lượng các vitamin trong nguyên liệu ban đầu đưa vào nghiên cứu được quy về 100%. Sau thời gian lão hoá, hàm lượng các vitamin đều bị giảm.

- Với vitamin B₁, kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.4.11

Bảng 3.4.11: Hàm lượng vitamin trong các mẫu viên

TT	Các mẫu thí nghiệm	Hàm lượng vitamin B ₁ .NO ₃ (%)	Hàm lượng vitamin B ₁ .HCl (%)	So sánh hàm lượng B ₁ .NO ₃ và B ₁ .HCl
1	B ₁	98,02 ± 0,59	98,16 ± 0,47	$t_{\text{bảng}}(0,05;10)=2,23$ $t_{\text{tính}} = 0,49 < t_{\text{bảng}}$
2	B ₁ + B ₆	97,34 ± 0,73	97,58 ± 0,67	$t_{\text{tính}} = 0,62 < t_{\text{bảng}}$
3	B ₁ +B ₁₂	97,14 ± 0,69	97,03 ± 0,82	$t_{\text{tính}} = 2,14 < t_{\text{bảng}}$
4	B ₁ +B ₆ +B ₁₂	97,91 ± 0,82	97,46 ± 0,76	$t_{\text{tính}} = 0,97 < t_{\text{bảng}}$
So sánh HL Vit.B ₁ trong mỗi nhóm $F_{\text{bảng}}(0,05;3;20)=3,10$		$F_{\text{tính}} = \frac{1,1034}{0,4588} = 2,40$ $F_{\text{tính}} < F_{\text{bảng}}$	$F_{\text{tính}} = \frac{0,6926}{0,4247} = 1,63$ $F_{\text{tính}} < F_{\text{bảng}}$	

Kết quả ở bảng 3.4.11 cho thấy:

- ở mỗi dạng muối, hàm lượng còn lại của vitamin B₁, khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

- ở cả hai dạng muối nitrat và hydroclorid, hàm lượng còn lại của vitamin B₁ cũng khác nhau không có nghĩa thống kê.

Vì vậy, có thể kết luận: ở cả 2 dạng muối, hàm lượng vitamin B₁ còn lại trong các mẫu đơn chất và mẫu hỗn hợp là như nhau. Hàm lượng vitamin B₁ không bị giảm khi có mặt vitamin B₆ và B₁₂ trong hỗn hợp.

- Với vitamin B₆, kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.4.12.

Bảng 3.4.12: Hàm lượng còn lại của vitamin B6 trong điều kiện bao gói chống ẩm

TT	Các mẫu TN	Hàm lượng vitamin B ₆ (%)
1	B ₆	97,98 ± 0,47
2	B ₆ + B ₁ .HCl	97,51 ± 0,64
3	B ₆ + B ₁ .NO ₃	98,12 ± 0,69
4	B ₆ + B ₁₂	98,09 ± 0,82
5	B ₆ + B ₁₂ + B ₁ .HCl	97,44 ± 0,75
6	B ₆ + B ₁₂ + B ₁ .NO ₃	97,49 ± 0,77

So sánh HL của Vit.B₆ giữa các mẫu TN, ta có $F_{\text{tính}} = \frac{0,6287}{0,4644} = 1,35 < F_{\text{bảng}}$ $F_{\text{bảng}} (0,05 ; 5 ; 30) = 2,53$

Các kết quả ở bảng 3.4.12 cho thấy: So với mẫu đơn chất, hàm lượng vitamin B₆ cũng không bị giảm khi có vitamin B₁ và vitamin B₁₂ trong hỗn hợp.

- Với vitamin B₁₂, kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 3.4.13

Sau thời gian lão hoá, hàm lượng còn lại của vitamin B₁₂ trong các mẫu nghiên cứu đều khác nhau có ý nghĩa thống kê. So với các mẫu đơn chất, tất cả các mẫu B₁₂ trong hỗn hợp với B₁ hoặc B₆ đều bị giảm hàm lượng. Đặc biệt trong các mẫu hỗn hợp có cả 3 loại vitamin, hàm lượng vitamin B₁₂ bị giảm một cách đáng kể.

Bảng 3.4.13: Hàm lượng còn lại của vitamin B12 trong điều kiện bao gói chống ẩm

TT	Các mẫu TN	HL Vitamin B12	So sánh hàm lượng Vit B12 của các mẫu
1	B ₁₂	98,86 ± 0,83	T _{bảng} (0,05:10)=2,23; phương sai chung trong các nhóm S ₂ ² = 0,3793
2	B ₁₂ + B ₁ .HCl	86,15 ± 0,52	T _{tính} = 35,75 < t _{bảng}
3	B ₁₂ + B ₁ .NO ₃	83,29 ± 0,69	T _{tính} = 43,80 < t _{bảng}
4	B ₁₂ + B ₆ + B ₁ .HCl	80,09 ± 0,17	T _{tính} = 52,80 < t _{bảng}
5	B ₁₂ + B ₆ + B ₁ .NO ₃	78,17 ± 0,66	T _{tính} = 58,20 < t _{bảng}
6	B ₁₂ +B ₆	86,72 ± 0,79	T _{tính} = 34,15 < t _{bảng}

So sánh HL Vit.B₁₂ trong các mẫu TN $F_{\text{tính}} = \frac{321,9223}{0,3792} = 848,95$
 $F_{\text{bảng}} (0,05 ; 5 ; 30) = 2,53$

Để tìm hiểu cụ thể hơn về ảnh hưởng của B₁ ở các dạng muối khác nhau tới hàm lượng B₁₂ chúng tôi tiếp tục so sánh. Kết quả được trình bày ở bảng 3.4.14.

Bảng 3.4.14. So sánh hàm lượng vitamin B₁₂ khi có vitamin B₁.HCl và vitamin B₁.NO₃ trong hỗn hợp

TT	Các mẫu TN	HL Vit.B ₁₂ (%)		t _{bảng} (0,05 ; 10) = 2,23
		Hỗn hợp với B ₁ .HCl	Hỗn hợp với B ₁ .NO ₃	
1	B ₁₂ + B ₁	86,15 ± 0,52	83,29 ± 0,69	t _{tính} = 8,05 > t _{bảng}
2	B ₁₂ + B ₆ + B ₁	80,09 ± 0,17	78,17 ± 0,66	t _{tính} = 5,40 > t _{bảng}
t _{bảng} (0,05;10)=2,23		t _{tính} =17,05 t _{tính} > t _{bảng}	t _{tính} =14,40 t _{tính} > t _{bảng}	

Kết quả so sánh cho thấy, trong hỗn hợp có vitamin B₁ và B₆, hàm lượng vitamin B₁₂ bị giảm nhiều hơn. Trong hỗn hợp có vitamin B₁ dạng muối nitrat, hàm lượng vitamin B₁₂ cũng giảm nhiều hơn.

b) Sự tương tác giữa các dược chất trong điều kiện có tác động của không khí ẩm.

Trong phần này, chúng tôi chỉ nghiên cứu hàm lượng của Vitamin B₁ và Vitamin B₆ trong các hỗn hợp dược chất khi có tác động của cả nhiệt độ và độ ẩm không khí. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở các bảng 3.4.15; 3.4.16; 3.4.17 và 3.4.18.

Bảng 3.4.15: Hàm lượng còn lại của Vitamin B₁ trong điều kiện có tác động của độ ẩm

TT	Các mẫu thí nghiệm	Hàm lượng Vit. B ₁ . NO ₃ (%)	Hàm lượng Vit.B ₁ . HCL %	So sánh hàm lượng B ₁ . NO ₃ và B ₁ . HCL
1	B ₁	93,94 ± 0,84	91,58 ± 0,55	t _{bảng} (0,05; 10) = 2,23 t _{tính} = 6,03 > t _{bảng}
2	B ₁ + B ₆	87,25 ± 0,27	89,01 ± 0,60	t _{tính} = 6,85 > t _{bảng}
3	B ₁ + B ₁₂	88,39 ± 0,75	89,96 ± 0,67	t _{tính} = 4,02 > t _{bảng}
4	B ₁ + B ₆ + B ₁₂	86,54 ± 0,80	88,15 ± 0,88	t _{tính} = 3,47 > t _{bảng}
So sánh HL Vit.B ₁ trong mỗi nhóm, F _{bảng} (0,05;3;10)=3,1		F _{tính} = $\frac{67,7724}{0,4533} = 149,51$ F _{tính} > F _{bảng}		F _{tính} = $\frac{12,9562}{0,4269} = 30,35$ F _{tính} > F _{bảng}

Các kết quả ở bảng 3.4.15 cho thấy: Với mỗi loại muối, hàm lượng vitamin B₁ còn lại trong tất cả các mẫu nghiên cứu đều khác nhau có ý nghĩa thống kê. Trong từng mẫu nghiên cứu, hàm lượng vitamin B₁.NO₃ và hàm lượng vitamin B₁.HCl còn lại cũng khác nhau có ý nghĩa thống kê.

Vì vậy có thể kết luận rằng ở mẫu đơn chất, hàm lượng B₁.NO₃ giảm ít hơn hàm lượng B₁HCl. Ngược lại, ở mẫu hỗn hợp, đặc biệt là ở hỗn hợp có cả 3 loại vitamin, hàm lượng B₁.NO₃ lại giảm nhiều hơn.

Bảng 3.4.16: So sánh HL vitamin B1 trong các mẫu hỗn hợp với mẫu đơn chất

TT	Các mẫu TN	Hàm lượng vitamin B ₁ .NO ₃ (%)		Hàm lượng vitamin B ₁ .HCl (%)	
		Hàm lượng	So sánh	Hàm lượng	So sánh
1	B ₁	93,94 ± 0,84	t _{bảng} (0,05;10) = 2,23	91,58 ± 0,55	t _{bảng} (0,05;10) = 2,23
2	B ₁ + B ₆	87,25 ± 0,27	t _{tính} =17,21 > t _{bảng}	89,01 ± 0,60	t _{tính} =6,81 > t _{bảng}
3	B ₁ +B ₁₂	88,39 ± 0,75	t _{tính} =14,28 > t _{bảng}	89,96 ± 0,67	t _{tính} =4,29 > t _{bảng}
4	B ₁ +B ₆ +B ₁₂	86,54 ± 0,80	t _{tính} =19,04 > t _{bảng}	88,15 ± 0,88	t _{tính} =9,09 > t _{bảng}

Như vậy, hàm lượng vitamin B₁ trong các mẫu hỗn hợp giảm nhiều hơn so với mẫu đơn chất. Đặc biệt, độ ẩm cao làm cho hàm lượng vitamin B₁ trong các mẫu có cả 3 loại vitamin bị giảm đi một cách đáng kể.

Bảng 3.4.17: Hàm lượng còn lại của vitamin B₆ trong điều kiện có tác động của ẩm

TT	Các mẫu TN	Hàm lượng vitamin B ₆ (%)	So sánh Hàm lượng vitamin B ₆ của các mẫu hỗn hợp với mẫu đơn chất
1	B ₆	94,79 ± 0,62	t _{bảng} (0,05 ; 10) = 2,23
2	B ₆ + B ₁ .HCl	93,48 ± 0,52	t _{tính} = 3,70 > t _{bảng}
3	B ₆ + B ₁ .NO ₃	92,27 ± 0,42	t _{tính} = 7,13 > t _{bảng}
4	B ₆ + B ₁₂	93,01 ± 0,83	t _{tính} = 5,03 > t _{bảng}
5	B ₆ + B ₁₂ + B ₁ .HCl	91,59 ± 0,82	t _{tính} = 9,05 > t _{bảng}
6	B ₆ + B ₁₂ + B ₁ .NO ₃	90,11 ± 0,53	t _{tính} = 13,24 > t _{bảng}
So sánh HL Vit.B ₆ trong các mẫu thí nghiệm F _{bảng} (0,05 ; 5 ; 30) = 2,53		$F_{\text{tính}} = \frac{15,6568}{0,3752} = 41,73$ $F_{\text{tính}} > F_{\text{bảng}}$	

Kết quả ở bảng 3.4.17 cho thấy hàm lượng vitamin B₆ trong các mẫu hỗn hợp bị giảm nhiều hơn so với các mẫu đơn chất. Đặc biệt, trong các mẫu có cả 3 loại vitamin, hàm lượng vitamin B₆ cũng bị giảm đáng kể.

Như vậy có thể thấy rằng độ ẩm cao không những làm giảm hàm lượng của các dược chất mà còn làm tăng sự tương tác giữa chúng.

Bảng 3.4.18: So sánh hàm lượng vitamin B₆ khi có vitamin B₁.HCl và vitamin B₁.NO₃ trong hỗn hợp

TT	Các mẫu TN	Hàm lượng vitamin B ₆ (%)		t _{bảng} (0,05 ; 10) = 2,23
		Hỗn hợp với B ₁ .HCl	Hỗn hợp với B ₁ .NO ₃	
1	B ₆ + B ₁	93,48 ± 0,52	91,27 ± 0,42	t _{tính} = 3,42 > t _{bảng}
2	B ₆ + B ₁ + B ₁₂	91,59 ± 0,82	90,11 ± 0,53	t _{tính} = 4,19 > t _{bảng}
t _{bảng} (0,05 ; 10) = 2,23		t _{tính} = 5,35 > t _{bảng}	t _{tính} = 6,11 > t _{bảng}	

Kết quả cho thấy: Khi hỗn hợp có vitamin B₁ dạng muối nitrat, hàm lượng vitamin B₆ bị giảm nhiều hơn.

3.4.3.2. Nghiên cứu sự tương tác giữa các dược chất với một số tá dược.

Căn cứ vào tính chất của dược chất, tá dược, chúng tôi lựa chọn 10 loại tá dược để nghiên cứu. Kết quả được trình bày ở bảng 3.4.19.

Các số liệu trong bảng 3.4.19 cho thấy:

- Đối với mỗi loại vitamin trong các mẫu nghiên cứu, hàm lượng còn lại của chúng đều khác nhau có ý nghĩa thống kê.

- Tuy nhiên trong các mẫu có các tá dược lactose, tinh bột, dextrin, Lycatab, Avicel và Castor wax A, hàm lượng các vitamin đều thay đổi rất ít. Với tá dược tron magnesi stearat hàm lượng của cả 3 loại vitamin đều giảm một cách đáng kể.

Như vậy, trừ magnesi stearat, các tá dược đã lựa chọn trong bảng 3.4.19 đều có thể sử dụng để bào chế viên 3B.

Bảng 3.4.19: Hàm lượng còn lại của các dược chất khi có mặt tá dược

TT	Tá dược	Hàm lượng vitamin B ₁ .HCl (%)	Hàm lượng vitamin B ₆ (%)	Hàm lượng vitamin B ₁₂ (%)
1	Mẫu không có tá dược	98,86 ± 0,53	98,52 ± 0,68	99,01 ± 0,48
2	Lactose	97,73 ± 0,78	98,01 ± 0,69	98,17 ± 0,42
3	Tinh bột	97,54 ± 0,58	97,59 ± 0,59	98,95 ± 0,39
4	Dextrin	98,54 ± 0,42	98,14 ± 0,53	98,76 ± 0,65
5	Lycatab	98,15 ± 0,59	98,54 ± 0,55	98,56 ± 0,64
6	Avicel	98,54 ± 0,78	98,51 ± 0,44	99,28 ± 0,52
7	Castol wax A	98,36 ± 0,77	97,75 ± 0,69	98,24 ± 0,75
8	Mg. Stearat	92,17 ± 0,82	90,56 ± 0,68	95,15 ± 0,82
9	Talc	94,72 ± 0,83	95,71 ± 0,83	95,02 ± 0,81
10	Aerosil	95,17 ± 0,81	96,27 ± 0,82	96,81 ± 0,65
So sánh HL Vit. trong các nhóm F _{bảng} (0,05;9;50)=210		$F_{tính} = \frac{29,8011}{0,4504} = 66,17 > F_{bảng}$	$F_{tính} = \frac{35,8980}{0,3944} = 91,02 > F_{bảng}$	$F_{tính} = \frac{15,0250}{0,4457} = 33,71 > F_{bảng}$

3.4.4. Nghiên cứu chế tạo vi nang vitamin B₁₂ bằng phương pháp tách pha đông tụ để bào chế viên 3B

Dựa trên các thí nghiệm sơ bộ, chúng tôi đã bào chế 5 mẫu vi nang theo phương pháp tách pha đông tụ theo qui trình đã nêu với tỷ lệ vitamin B₁₂/Castor theo 5 mức. Thể tích hỗn hợp dung môi n-hexan và isopropanol là 0,25ml, trong đó isopropanol chiếm 5% (thể tích tính cho 1 viên 3B) ; tốc độ khuấy là 600vòng/phút.

a - Xác định hiệu suất vitamin B12 được vi nang hoá

Định lượng vitamin B₁₂ trong 5 mẫu vi nang được bào chế; xác định tỷ lệ % lượng vitamin B₁₂ trong các mẫu vi nang trên lượng vitamin B₁₂ ban đầu, đó chính là hiệu suất vitamin B₁₂ được vi nang hoá.

Bảng 3.4.20. Hiệu suất vitamin B12 được vi nang hoá

Số lần TN	Hiệu suất vi nang hoá (%) trong các mẫu TN				
	A ₁ (1/1)	A ₂ (1/1,5)	A ₃ (1/2)	A ₄ (1/2,5)	A ₅ (1/3)
1	52,42	78,62	80,41	83,40	86,96
2	53,61	79,46	82,63	84,81	85,12
3	51,26	79,82	82,16	85,16	84,41
Trung bình	52,43	79,30	81,73	84,46	86,41

Ghi chú: (A₁, A₂, A₃, A₄ và A₅ là ký hiệu các mẫu TN với các tỷ lệ vitamin B₁₂/Castor Wax khác nhau).

Kết quả cho thấy:

- Hiệu suất vitamin B₁₂ được vi nang hoá tăng khi lượng vỏ nang tăng.
- Mẫu A₁ với tỷ lệ nhân/vỏ là 1/1 có hiệu suất thấp nhất.
- Các mẫu A₂, A₃, A₄, A₅ đều cho hiệu suất trên 75%.

b -Xác định kích thước vi nang Vitamin B12

Kích thước của các tiểu phân Vitamin B₁₂ và của vi nang B₁₂ được trình bày trong bảng 3.4.21 và 3.4.22.

Bảng 3.4.21: Thành phần phân đoạn kích thước của các tiểu phân Vitamin B₁₂

Kích thước (μm)	Thành phần phân đoạn theo kích thước tiểu phân B ₁₂ (%)
≤ 7,5	10,8
7,5 ÷ 15	46,2
15 ÷ 30	33,4
> 30	9,6

Bảng 3.4.22: Thành phần phân đoạn kích thước của vi nang Vitamin B₁₂

Kích thước (μm)	Thành phần phân đoạn theo kích thước vi nang (%)		
	Mẫu A ₂	A ₃	A ₄
≤ 15	10,2	6,8	6,1
15 ÷ 30	36,8	32,4	21,4
30 ÷ 45	26,6	30,1	32,1
45 ÷ 60	18,3	20,5	26,8
> 60	8,1	10,2	13,6

- Phần lớn các tiểu phân Vitamin B₁₂ có kích thước từ 7,5 đến 30μm.
- Kích thước các vi nang B₁₂ nằm trong khoảng từ 14 đến 60μm.
- Kích thước lượng vỏ trong công thức bào chế tăng lên thì kích thước vi nang cũng tăng.
- Nhìn chung kích thước các vi nang rất nhỏ. Khi phối hợp với cốm Vitamin B₁ và B₆ các vi nang B₁₂ phân tán đều trên bề mặt các hạt cốm, không gây ra hiện tượng phân lớp khi dập viên, đảm bảo độ đồng đều dược chất trong viên.

c - Xác định khả năng hoà tan của vitamin B₁₂ từ các mẫu vi nang

Độ hoà tan vitamin B₁₂ từ các mẫu vi nang được trình bày trong bảng 3.4.23.

Bảng 3.4.23. Độ hoà tan vitamin B₁₂ từ các mẫu vi nang theo thời gian

Mẫu vi nang	Độ hoà tan (% theo HL) ở các thời điểm (phút)						
	5'	15'	30'	45'	60'	90'	120'
A ₁	50,12	59,01	63,06	65,72	68,21	70,56	71,64
A ₂	23,06	36,01	39,82	42,16	45,13	46,61	50,04
A ₃	21,12	31,11	36,82	40,06	41,24	45,16	48,84
A ₄	18,06	26,14	34,64	39,51	40,81	43,15	46,06
A ₅	17,19	26,08	28,17	31,92	34,08	36,24	38,16

Các kết quả cho thấy:

- Khi lượng vỏ nang tăng thì khả năng hoà tan dược chất giảm.
- Nhìn chung, độ hoà tan của vitamin B₁₂ từ 5 mẫu vi nang đều có xu hướng kéo dài, vì vậy cần nghiên cứu biện pháp làm tăng độ hoà tan của vitamin B₁₂.

Qua các nghiên cứu trên, 3 mẫu vi nang A₂, A₃ và A₄ được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo.

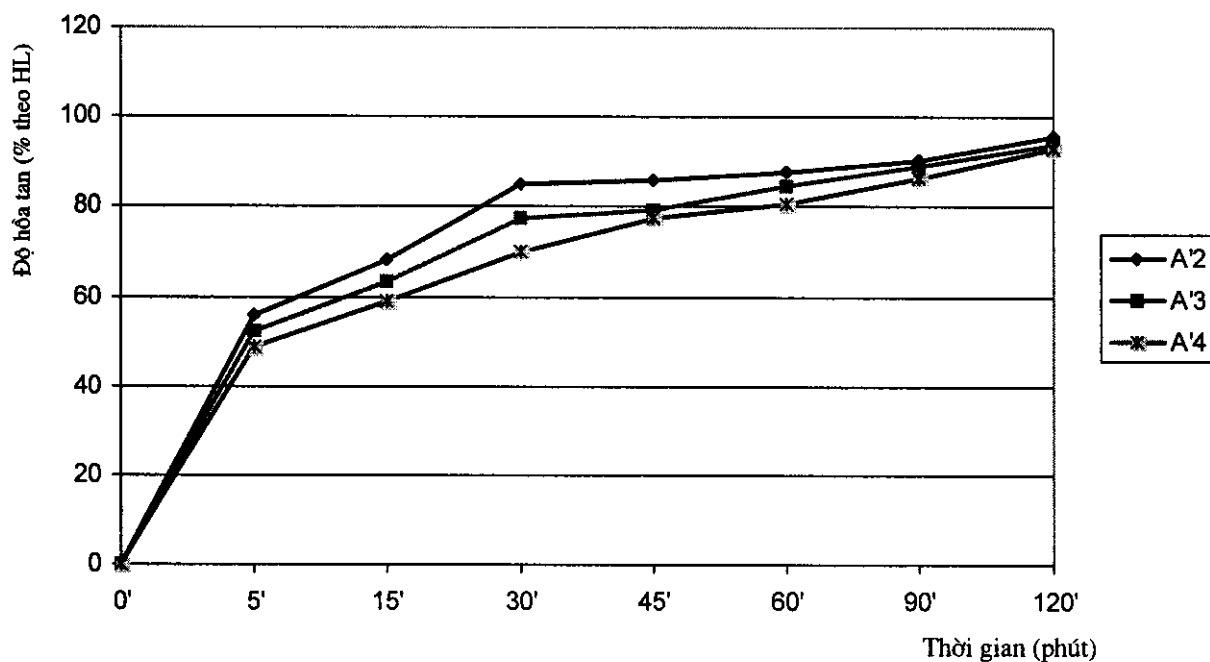
Để tăng khả năng hoà tan dược chất, chúng tôi đưa thêm Tween 80 vào công thức với hàm lượng 0,025mg/viên: Tween 80 được pha trong ethanol 90%, nồng độ 0,5% (Khối lượng/thể tích) sau đó phân tán vào Avicel và sấy khô. Phối hợp Avicel với vi nang tạo hỗn hợp đồng nhất được gọi là bột vi nang.

Bào chế 3 mẫu bột vi nang A'₂, A'₃, A'₄ tương ứng với 3 mẫu vi nang A₂, A₃, A₄. Tỷ lệ Vitamin B₁₂ giải phóng từ 3 mẫu bột vi nang được trình bày trong bảng 3.4.24 và đồ thị trên hình 3.4.1

Tween 80 làm tăng tính thấm nước vào lớp vỏ, nhờ đó mà mức độ và tốc độ hoà tan của Vitamin B₁₂ tăng một cách đáng kể. Sau 45 phút, độ hoà tan của Vitamin B₁₂ trong cả 3 mẫu đều đạt trên 75%.

Bảng 3.4.24. Độ hoà tan Vitamin B₁₂ từ các mẫu bột vi nang.

Mẫu bột vi nang	Độ hoà tan (%) theo HL ở các thời điểm (phút)						
	5'	15'	30'	45'	60'	90'	120'
A' ₂	55,69	68,37	85,05	85,76	87,49	90,16	95,86
A' ₃	52,06	63,51	77,42	79,12	84,61	89,20	93,67
A' ₄	48,51	59,01	69,84	77,71	80,43	86,34	92,84



Hình 3.4.1. Đồ thị tốc độ hoà tan của Vitamin B₁₂ khi có Tween 80.

d) Qui hoạch thực nghiệm theo mô hình toán bậc 1 dạng $N = 2^k$ để lựa chọn công thức tối ưu bào chế vi nang Vitamin B₁₂.

Bước 1: Lựa chọn yếu tố ảnh hưởng và xác định khoảng biến đổi của các yếu tố đó.

Độ giảm hàm lượng Vitamin B₁₂ sau thời gian lão hoá (y) được chọn làm thông số tối ưu hoá. Giá trị ở mức tâm và khoảng biến đổi của 4 yếu tố định lượng được lựa chọn theo các thí nghiệm sơ bộ. Các giá trị này được trình bày trong bảng 3.4.25

Bảng 3.4.25 Giá trị khoảng biến đổi của các yếu tố định lượng (Giá trị tính cho 1 viên)

Các yếu tố	Ký hiệu	Mức tâm	Khoảng biến đổi
Castor wax A (mg)	X_1	1	0,25
isopropanol (%)	X_2	5	3
Tween 80 (mg)	X_3	0,025	0,005
Tốc độ khuấy (vòng/phút)	X_4	600	200

Bước 2: Bố trí ma trận thí nghiệm

Các thí nghiệm được bố trí theo mô hình bậc 1 đầy đủ, dạng $N = 2^k$. Số thí nghiệm phải làm là $N = 2^4 = 16$.

Bước 3: Làm các thí nghiệm theo ma trận thực nghiệm.

Bào chế 16 mẫu bột vi nang với các thông số như ma trận thí nghiệm (theo một trình tự ngẫu nhiên để tránh sai số), sau đó bào chế 16 mẫu viên nén tương ứng. Trong quá trình bào chế, ngoài các yếu tố biến đổi như trong ma trận, các yếu tố còn lại được kiểm soát, đảm bảo thực hiện như nhau đối với tất cả 16 mẫu nghiên cứu. Một số chỉ tiêu của 16 mẫu viên nghiên cứu được trình bày trong bảng 3.4.26

- Tất cả 16 mẫu viên nghiên cứu đều đảm bảo độ đồng đều về khối lượng và độ rã đạt yêu cầu của dược điển.
- Do kích thước vi nang rất nhỏ được phân tán đều trên bề mặt các hạt nên các mẫu viên khảo sát đạt yêu cầu về độ đồng đều hàm lượng Vitamin B₁₂.
- Đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố định lượng tới độ hoà tan của Vitamin B₁₂ từ các mẫu viên:

Tất cả 16 mẫu nghiên cứu đều đạt yêu cầu về độ hoà tan theo chuyên luận của dược điển Anh 1998 (bảng 3.4.27)

Sau thời gian lão hoá, các mẫu viên lại được đánh giá độ hoà tan của Vitamin B₁₂ ở tất cả các mẫu, độ hoà tan hầu như không bị thay đổi.

- Đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố định lượng tới hàm lượng Vitamin B₁₂ trong các mẫu viên:

Hàm lượng Vitamin B₁₂ trong tất cả các mẫu viên được xác định tại hai thời điểm trước và sau khi bảo quản viên ở điều kiện lão hoá. Mỗi phép định lượng được thực hiện 6 lần. Độ giảm hàm lượng Vitamin B₁₂ trong các mẫu viên sau thời gian lão hoá được trình bày trong bảng 3.4.28.

Bảng 3.4.26. Một số chỉ tiêu của 16 mẫu viên nén (không bao)

Mẫu TN	Khối lượng trung bình (g)	Lực gây vỡ viên (kg)	Độ rã (phút)
1	$0,4282 \pm 0,0138$	8,5	7,0
2	$0,4282 \pm 0,0175$	8,7	7,1
3	$0,4282 \pm 0,0200$	9,0	7,0
4	$0,4282 \pm 0,0210$	9,0	7,0
5	$0,4282 \pm 0,0179$	9,1	7,2
6	$0,4282 \pm 0,0115$	8,7	7,5
7	$0,4282 \pm 0,0108$	8,5	7,0
8	$0,4282 \pm 0,0202$	8,8	7,0
9	$0,4277 \pm 0,0179$	9,0	7,0
10	$0,4277 \pm 0,0080$	9,0	7,5
11	$0,4277 \pm 0,0098$	8,6	7,2
12	$0,4277 \pm 0,0185$	8,7	7,0
13	$0,4277 \pm 0,0200$	8,8	7,1
14	$0,4277 \pm 0,0180$	8,5	7,0
15	$0,4277 \pm 0,0146$	8,7	7,0
16	$0,4277 \pm 0,0111$	9,0	7,2

- Độ giảm hàm lượng có sự khác biệt rõ ràng giữa các mẫu. Vì vậy xác định công thức có độ giảm hàm lượng Vitamin B₁₂ cực tiểu ($y'_{\min}$) là mục tiêu của những nghiên cứu tiếp theo.

Bảng 3.4.27. Độ hoà tan của Vitamin B₁₂ từ các mẫu viên sau 45 phút

Mẫu TN	Độ hoà tan của Vitamin B ₁₂ (%)	Mẫu TN	Độ hoà tan của Vitamin B ₁₂ (%)
1	83,52 ± 0,26	9	83,71 ± 0,29
2	80,58 ± 0,28	10	85,19 ± 0,27
3	77,16 ± 0,19	11	78,41 ± 0,28
4	75,27 ± 0,19	12	81,88 ± 0,30
5	83,52 ± 0,23	13	86,61 ± 0,25
6	78,50 ± 0,19	14	85,13 ± 0,27
7	75,36 ± 0,26	15	78,41 ± 0,25
8	74,88 ± 0,27	16	79,55 ± 0,22

Bảng 3.4.28. Độ giảm hàm lượng Vitamin B₁₂ sau thời gian lão hoá

Mẫu TN	y _i (%)	Mẫu TN	y _i (%)
1	5,86	9	6,24
2	2,51	10	4,46
3	2,12	11	4,17
4	4,25	12	5,73
5	3,91	13	4,91
6	2,01	14	3,66
7	4,36	15	4,94
8	5,74	16	4,39

Bước 4: Đánh giá sự lặp lại của các thí nghiệm.

So sánh 2 phương sai chung theo chuẩn F:

$$F_{\text{bảng}}(0,05;80;80) = 1,40; F_{\text{tính}} = \frac{0,1295}{0,1049} = 1,23 < F_{\text{bảng}}$$

Vậy các phương sai này đồng nhất ; thực nghiệm lặp lại .

Bước 5: Tính các hệ số bj của phương trình hồi qui.

Các hệ số bj của phương trình hồi qui được trình bày trong bảng 3.4.29

Bảng 3.4.29. Các hệ số bj của phương trình hồi qui

Hệ số hồi qui	b_0	b_1	b_2	b_3	b_4	$b_{1.2}$	$b_{1.3}$	$b_{1.4}$
Giá trị	4,33	-0,48	-0,13	0,09	0,24	-0,14	-0,25	-0,02
Hệ số hồi qui	$b_{2.3}$	$b_{2.4}$	$b_{3.4}$	$b_{1.2.3}$	$b_{1.2.4}$	$b_{1.3.4}$	$b_{2.3.4}$	$b_{1.2.3.4}$
Giá trị	0,48	0,80	-0,06	0,29	0,30	0,14	0,30	-0,03

Bước 6: Đánh giá tính có ý nghĩa của các hệ số hồi qui (Sử dụng chuẩn t) và xác định phương trình hồi qui

Phương trình hồi qui thu được là:

$$y' = 4,33 - 0,48 x'_1 - 0,13x'_2 + 0,09x'_3 + 0,24x'_4 - 0,14x'_1x'_2 - 0,25x'_1x'_3 - 0,48x'_2x'_3 + 0,80x'_2x'_4 + 0,29x'_1x'_2x'_3 + 0,30x'_1x'_2x'_4 + 0,14x'_1x'_3x'_4 + 0,30x'_2x'_3x'_4$$

Bước 7: Đánh giá tính phù hợp của phương trình hồi qui (Sử dụng chuẩn F).

Phương trình mô tả đúng thực nghiệm.

Căn cứ vào phương trình hồi qui cho thấy:

- Castor wax và isopropanol (X_1 ; X_2) có ảnh hưởng tích cực đến thông số tối ưu hoá; Tức là làm tăng tính ổn định của Vitamin B₁₂ trong vi nang. Mức độ ảnh hưởng theo thứ tự: Castor wax > isopropanol.

Tween 80 và tốc độ khuấy (X_3 ; X_4) làm giảm tính ổn định của Vitamin B₁₂ trong vi nang. Mức độ ảnh hưởng theo thứ tự: Tốc độ khuấy > Tween 80.

Bước 8: Tìm điều kiện tối ưu (y'min) bằng phương pháp Gradient.

Tiến hành bào chế 6 viên (mẫu 17 đến mẫu 22) theo bảng 3.4.31 quy hoạch thực nghiệm để tìm điều kiện tối ưu, sau đó bảo quản ở điều kiện lão hoá. Qui trình tương tự đối với 16 mẫu viên ban đầu.

Độ hoà tan và độ giảm hàm lượng Vitamin B₁₂ của các mẫu viên được trình bày trong các bảng 3.4.31 và 3.4.32.

Nhận xét: 6 mẫu viên thực nghiệm đều có độ hoà tan Vitamin B₁₂ đạt yêu cầu theo tiêu chuẩn chung của Dược điển.

Sau khi lão hoá, mẫu viên số 20 có độ giảm hàm lượng Vitamin B₁₂ là thấp nhất.

Kết luận: công thức 20 là công thức tối ưu.

Bảng 3.4.30 Quy hoạch thực nghiệm để tìm điều kiện tối ưu

Các yếu tố	X ₁ '(mg) castor wax	X ₂ '(%) Isopropanol	X ₃ '(mg) Tween 80	X ₄ '(vòng /phút) Tốc độ khuấy
Mức tâm	1	5	0,025	600
Khoảng biến đổi λ_j	0,25	3	0,005	200
Hệ số b_j	- 0,48	- 0,13	+ 0,09	+ 0,24
$\lambda_j \times b_j$	- 0,12	- 0,39	+ 0,00045	+ 48
Bước tiến	+ 0,12	+ 0,4	- 0,0005	- 50
Các thí nghiệm				
17	1,12	5,4	0,0245	550
18	1,24	5,8	0,0240	500
19	1,36	6,2	0,0235	450
20	1,48	6,6	0,0230	400
21	1,60	7,0	0,0225	350
22	1,72	7,4	0,0220	300

Bảng 3.4.31. Độ hoà tan Vitamin B₁₂ từ các mẫu viên sau 45 phút

Mẫu	Độ hoà tan (%)
17	83,76 ± 0,59
18	80,10 ± 0,37
19	76,63 ± 0,54
20	75,96 ± 0,59
21	73,96 ± 0,76
22	71,77 ± 0,47

Bảng 3.4.32. Độ giảm HL Vitamin B₁₂ sau thời gian lão hoá

Mẫu	y' (%)
17	3,45
18	2,81
19	2,23
20	1,82
21	2,34
22	3,56

e) Nghiên cứu nâng qui mô thí nghiệm bào chế vi nang Vitamin B₁₂

Trong phần nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng công thức tối ưu vừa lựa chọn được để bào chế vi nang Vitamin B₁₂ nhưng qui mô thí nghiệm cho mỗi mẻ được nâng lên như sau:

Ký hiệu mẫu	Khối lượng Vit. B ₁₂ (g)	Thể tích dung môi (ml) (n Hexan + 6,6% isopropanol)
M ₁	3	1.500
M ₂	3	1.200
M ₃	3	1.500 (Sử dụng dung môi lần 2)
N ₁	5	2.500
N ₂	5	2.000
N ₃	5	2.500 (sử dụng dung môi lần 2)

Trong quá trình bào chế vi nang, sử dụng bình có dung tích 10 lít và máy khuấy motor điện công suất 60W, cánh khuấy dài 10cm.

Mỗi phép thử được lặp lại 3 lần.

Kích thước vi nang và hiệu suất tạo vi nang được trình bày trong bảng 3.4.3

Bảng 3.4.33. Thành phần phân đoạn theo kích thước và hiệu suất tạo vi nang Vitamin B12

Kích thước vi nang (μm)	Thành phần phân đoạn theo kích thước của vi nang B ₁₂ (%)						
	M ₂₀	M ₁	M ₂	M ₃	N ₁	N ₂	N ₃
≤ 15	5,1	6,5	4,1	6,3	5,3	7,1	4,0
15 ÷ 30	15,7	16,8	13,7	15,8	19,7	11,5	13,6
30 ÷ 45	26,3	24,2	26,8	25,9	23,8	25,7	23,4
45 ÷ 60	27,2	25,7	27,9	25,7	24,6	28,5	32,0
> 60	25,7	26,8	27,5	26,3	26,6	28,5	32,0
Hiệu xuất tạo vi nang (%)	83,25	84,16	75,17	77,58	83,92	77,05	75,31

(M₂₀ là mẫu vi nang bào chế theo công thức tối ưu số 20 phần trên)

Kết quả cho thấy: Khi nâng qui mô bào chế vi nang cho 1 nghìn viên (dùng máy khuấy từ) lên qui mô cho 6 nghìn viên và 10 nghìn viên (dùng máy cánh khuấy), hiệu suất tạo vi nang hầu như không thay đổi.

Khi giảm lượng dung môi và khi sử dụng lại dung môi (lần 2), hiệu suất tạo vi nang giảm đáng kể.

Nhìn chung trong tất cả các mẫu, kích thước của các vi nang tạo thành không khác nhau nhiều.

f. Nghiên cứu độ ổn định của vitamin B₁₂ trong viên 3B bào chế từ vi nang

Các mẫu viên 3B tương ứng với các mẫu vi nang được bào chế ở qui mô nâng cao lần lượt được kí hiệu là M'₁, M'₂, M'₃, N'₁, N'₂, N'₃.

Qui trình bào chế và điều kiện theo dõi độ ổn định của các mẫu viên tương tự như của mẫu viên số 20 (M₂₀).

Độ giảm hàm lượng của vitamin B₁₂ trong các mẫu viên sau khi lão hoá như sau:

Mẫu	M' ₂₀	M' ₁	M' ₂	M' ₃	N' ₁	N' ₂	N' ₃
Độ giảm HL (%)	1,82	1,88	1,83	2,03	1,80	1,94	1,85

So với mẫu M'₂₀, độ giảm hàm lượng vitamin B₁₂ trong các mẫu bào chế ở qui mô nâng cao không thay đổi nhiều. Điều đó cho thấy, có thể bào chế vi nang vitamin B₁₂ ở qui mô nâng cao.

3.4.5. Nghiên cứu chế tạo vi nang vitamin B₁₂ bằng phương pháp phun đông tụ

Qua các thí nghiệm khảo sát, các thông số kĩ thuật được lựa chọn như sau:

- Nhiệt độ đầu phun và ống dẫn khí nén 85 - 88⁰C được bảo ôn bằng cách bọc tấm điện trở đốt nóng đảm bảo không bị tắc đầu phun (có lỗ phun đường kính 3mm).
- Nhiệt độ hỗn hợp phun tạo vi nang 90⁰C ± 2 được bảo ôn bằng hệ cách thuỷ có bọc tấm điện trở đốt nóng, đảm bảo hỗn hợp phun nóng chảy hoàn toàn.
- Nhiệt độ hệ bình đông tụ 25⁰ ± 2 được đặt trong phòng điều hoà có luồng thổi không khí qua hệ bình, quá trình phun không liên tục để đảm bảo cân bằng nhiệt độ.
- Tốc độ phun 3-5 g/phút với áp lực phun 4kg/cm².

Do thiết bị phun đồng tụ tự lắp đặt, các thông số dao động trong khoảng rộng nên chúng tôi không bố trí qui hoạch thực nghiệm tối ưu hoá các thông số. Chỉ khảo sát lựa chọn thành phần tá dược nhằm đảm bảo vi nang có kích thước nhỏ mịn thích hợp cho việc trộn đều với các hạt khi dập viên 3B và đảm bảo độ hoà tan vitamin B₁₂ từ viên .

Kết quả thực nghiệm được nêu trong bảng 3.4.34

Trong các mẫu I₁₁, I₁₂, I₁₃, I₁₄ tinh bột được trộn đều đồng lượng với vitamin B₁₂, thêm dần nước cất khối lượng 30% so với bột kép, trộn đều đồng nhất, sấy khô, rây qua rây 0,07mm. Sau đó tạo hỗn hợp phun đồng tụ theo phương pháp đã nêu. Tween 80 được thêm vào Castor wax nóng chảy khuấy trộn đồng nhất (trong các mẫu từ I₅ đến I₁₀), sau đó tạo hỗn hợp phun đồng tụ.

Nhận xét:

Về kích thước vi nang:

- Vi nang có kích thước chủ yếu 15 - 60mcm, chiếm khoảng 66-70%
- Khi tá dược có Tween 80 tỉ lệ vi nang <15mcm tăng lên
- Khi tá dược có tỉ lệ Castor wax tăng, tỉ lệ vi nang có kích thước lớn hơn 60mcm tăng lên.
- Khi có tinh bột trong thành phần tỉ lệ vi nang <15mcm giảm đi, tỉ lệ vi nang > 60mcm tăng lên.

Bảng 3.4.34. Kích thước tiểu phân và độ hoà tan vitamin B₁₂ của các mẫu vi nang có thành phần tá dược khác nhau

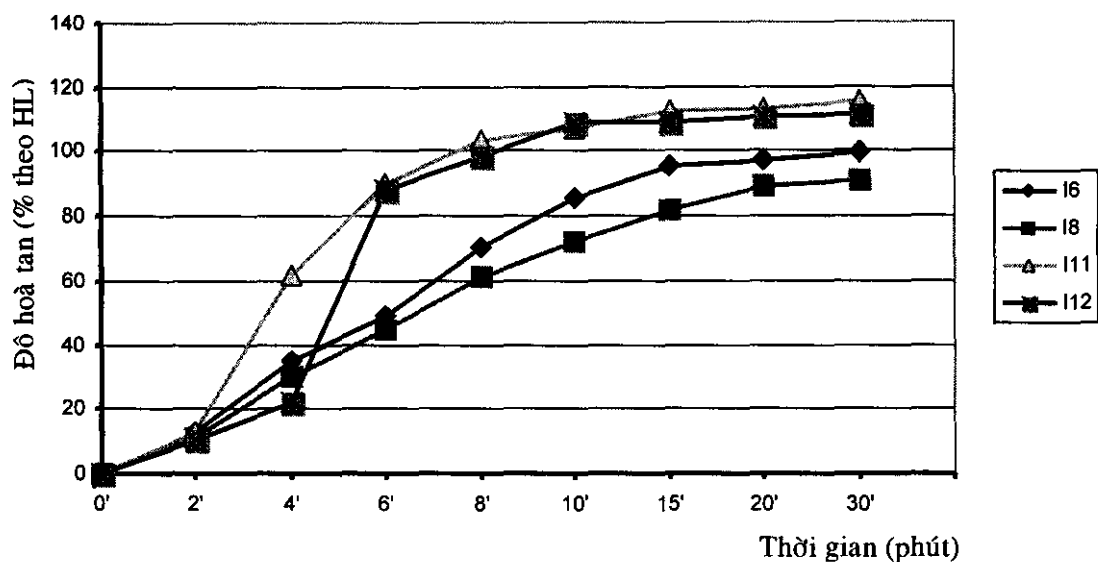
Mẫu vi nang	Tỉ lệ thành phần				% phân đoạn tiểu phân			Độ hoà tan %
	vitamin B12	Tinh bột	Castor wax	Tween 80	< 15 mcm	15 -60 mcm	> 60 mcm	
I ₁	1		3		18,4	67,6	14,3	85,4
I ₂	1		4		16,8	68,4	14,8	65,2
I ₃	1		5		13,2	69,5	17,3	56,8
I ₄	1		10		5,5	67,3	27,2	45,8
I ₅	1		3	0,1	25,5	70,3	4,2	<u>112,4</u>
I ₆	1		4	0,1	23,7	69,6	6,7	<u>99,9</u>
I ₇	1		5	0,1	22,0	69,5	8,5	<u>90,1</u>
I ₈	1		6	0,1	21	68,0	10,5	<u>91,2</u>
I ₉	1		8	0,1	20,3	65,2	14,5	<u>65,2</u>
I ₁₀	1		10	0,1	13,5	66,3	20,2	<u>63,9</u>
I ₁₁	1	1	4	0,1	23,2	70,1	6,7	<u>115,7</u>
I ₁₂	1	1	6	0,1	20,7	68,8	10,5	<u>111,2</u>
I ₁₃	1	1	8	0,1	15,5	68,3	16,2	<u>89,9</u>
I ₁₄	1	1	10	0,1	4,3	73,7	22,0	<u>64,1</u>

Bảng 3.4.35. Tốc độ hoà tan vitamin B₁₂ từ các mẫu vi nang phun đồng tự

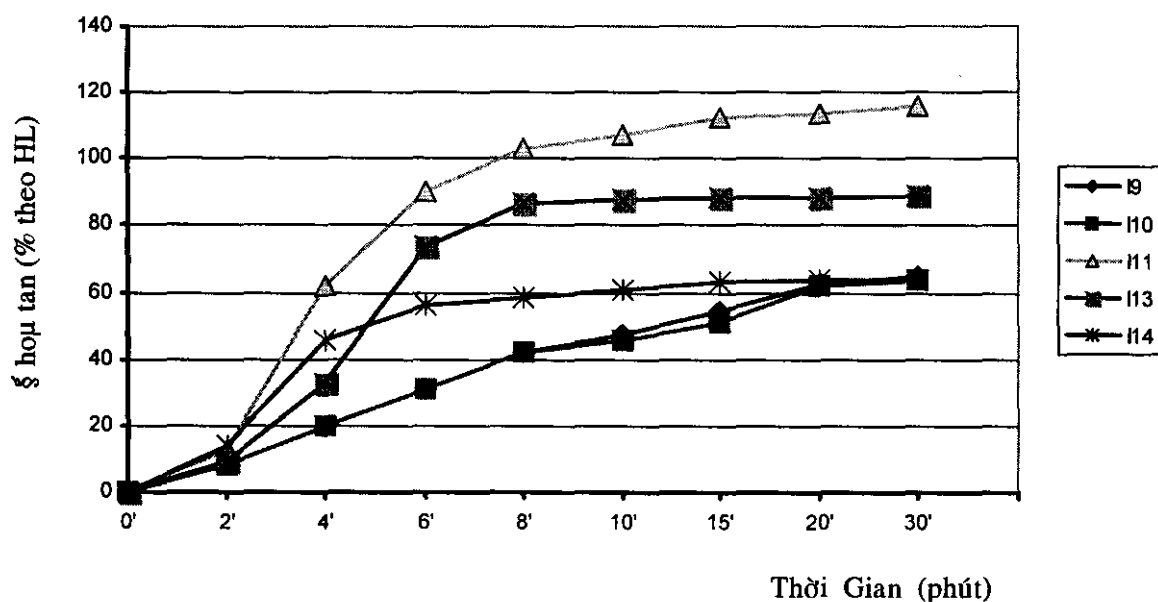
Mẫu vi nang	% vitamin B ₁₂ hoà tan ở các thời điểm (phút)							
	2	4	6	8	10	15	20	30
I ₁	9,1	21,3	27,0	42,2	51,1	65,4	73,4	85,4
I ₂	6,4	19,3	25,0	37,0	48,0	59,5	60,9	65,2
I ₃	6,5	16,5	21,0	34,5	41,9	54,7	55,1	56,8
I ₄	5,0	9,9	16,0	25,9	32,1	43,3	44,1	45,8
I ₅	15,4	35,6	53,1	76,5	93,1	101,4	101,3	112,4
I ₆	12,6	35,0	45,0	70,1	85,4	95,4	97,4	<u>99,9</u>
I ₇	11,2	30,3	47,3	62,9	74,5	86,5	91,0	<u>96,1</u>
I ₈	11,3	30,0	44,6	61,3	72,0	82,1	89,2	<u>91,2</u>
I ₉	8,2	20,0	31,2	41,9	47,3	54,5	62,6	65,2
I ₁₀	8,1	19,8	31,0	42,0	45,8	51,1	62,3	63,9
I ₁₁	12,9	62,0	90,1	<u>103,1</u>	107,1	112,5	113,4	115,7
I ₁₂	10,5	52,2	88,3	98,7	<u>108,6</u>	108,9	110,7	111,2
I ₁₃	9,4	33,0	74,1	86,7	87,6	88,5	88,7	<u>88,9</u>
I ₁₄	14,1	45,9	56,3	61,0	61,0	63,0	63,7	<u>64,1</u>

Ghi chú:

Kết quả ghi trong bảng là trung bình của 6 phép đo độ hoà tan trên 6 cốc,% vitamin B₁₂ hoà tan so với hàm lượng theo công thức lý thuyết.



Hình 3.4.2. Đồ thị tốc độ hoà tan vitamin B₁₂ từ các mẫu vi nang I₆, I₈, I₁₁, I₁₂



Hình 3.4.3. Đồ thị tốc độ hoà tan vitamin B₁₂ từ các mẫu vi nang I₉, I₁₀, I₁₃, I₁₄

Nhận xét:

- Khi sử dụng tinh bột để phân tán, hấp thụ vitamin B₁₂ tham gia vào thành phần hỗn hợp phun đồng tự, độ hoà tan của vi nang tăng lên đáng kể so với mẫu vi nang chỉ dùng Tween 80 làm chất tăng độ tan. Điều này được biểu thị rõ trên đồ thị so sánh

mẫu I₆, I₁₁ có cùng tỉ lệ được chất - Castor wax 1:4 và mẫu I₈, I₁₂ có cùng tỉ lệ được chất - Castor wax 1:8. (Hình 3.4.2 và 3.4.3)

- Nếu tỉ lệ Wax gấp trên 8 lần được chất vi nang có độ hoà tan sau 30 phút nhỏ hơn 90% và nhỏ hơn 70% khi tỉ lệ này gấp 10 lần tuy có thêm các chất làm tăng độ tan.

3.4.6. Đánh giá độ ổn định của các mẫu vi nang vitamin B₁₂ và viên 3 B bào chế từ vi nang vitamin B₁₂.

3.4.6.1 Đánh giá độ ổn định của các mẫu vi nang vitamin B₁₂

Các mẫu vi nang được đánh giá độ ổn định theo phương pháp thử nghiệm cấp tốc ở 45°C ± 2; 75% ± 5% RH:

- Mẫu A - vi nang Vitamin B₁₂ chế tạo bằng phương pháp tách pha đông tụ, có thành phần B₁₂ - Castor wax tinh bột - Tween 80: 1-2-9-0,05.

- Mẫu I₅, I₁₃ - Vi nang Vitamin B₁₂ chế tạo bằng phương pháp phun đông tụ. Mẫu I₁₃ có thành phần B₁₂-tinh bột -Castor wax-Tween 80: 1- 1- 8- 0,1.

Sau thử nghiệm lão hoá cấp tốc các mẫu vi nang không có thay đổi về hình thức cảm quan như màu sắc, mức độ khô toi (độ ẩm thay đổi không đáng kể 2,0% - 2,5%).

Kết quả xác định độ suy giảm hàm lượng và độ hoà tan sau thử nghiệm lão hoá cấp tốc được nêu trong bảng 3.4.36

Bảng 3.4.36 Độ suy giảm hàm lượng và độ hoà tan của các mẫu vi nang Vitamin B₁₂ sau 3 tháng bảo quản ở 45°C ± 2°C, 75% ± 5% RH

Mẫu vi nang	Hàm lượng (%)		Độ giảm hàm lượng (%)	Độ hoà tan (%)	
	Ban đầu	Sau 3 tháng		Ban đầu	Sau 3 tháng
A					
Mẻ 1	101,63	98,49	3,14	79,5	78,6
Mẻ 2	99,06	95,52	3,85	80,7	81,2
Mẻ 3	100,24	96,58	3,66	81,5	79,8
			Trung bình 3,51		
I ₅					
Mẻ 1	101,18	97,70	3,48	99,4	100,0
Mẻ 2	98,91	95,64	3,27	98,8	97,9
Mẻ 3	99,17	96,24	2,93	100,1	98,5
			Trung bình 3,23		
I ₁₃					
Mẻ 1	101,52	120,26	0,26	87,5	86,3
Mẻ 2	100,31	100,10	0,21	89,1	88,5
Mẻ 3	99,25	99,02	0,23	86,8	85,6
			Trung bình 0,23		

3.4.6.2. Đánh giá độ ổn định của các mẫu viên 3B điều chế thuốc từ vi nang vitamin B₁₂

Các mẫu viên nén 3B điều chế từ vi nang vitamin B₁₂ được đánh giá độ ổn định theo phương pháp thử nghiệm cấp tốc ở 45°C ± 2°C, 75% ± 5% RH.

- Mẫu viên VA bào chế từ vi nang mẫu A với hạt vitamin B₁, hạt vitamin B₆ theo qui trình đã nêu .

- Mẫu viên VI₅ bào chế từ vi nang mẫu I_{5a} với hạt vitamin B₁, hạt vitamin B₆ qui trình bào chế đã nêu .

- Mẫu viên VI₁₃ bào chế từ vi nang mẫu I₁₃ với hạt vitamin B₁, hạt vitamin B₆, theo

qui trình bào chế đã nêu.

Mỗi mẫu viên được bào chế 3 mẻ thí nghiệm, mỗi mẻ 300g cốm tương ứng 500 viên. Với mục đích so sánh độ ổn định mỗi mẫu số lượng viên ít nên các mẫu viên dùng để thử nghiệm độ ổn định là viên nén không bao film.

Sau thử nghiệm lão hoá cấp tốc các mẫu viên có hình thức cảm quan không thay đổi, độ ẩm thay đổi không đáng kể (2,5% - 3,2%).

Kết quả xác định độ suy giảm hàm lượng và độ hoà tan sau thử nghiệm lão hoá cấp tốc được nêu trong bảng 3.4.37

Bảng 3.4.37 Độ suy giảm hàm lượng và độ hoà tan vitamin B₁₂ của các mẫu viên nén sau 3 tháng bảo quản ở 45°C ± 2°C, 75% ± 5% RH.

Mẫu viên 3B	Hàm lượng %		Độ suy giảm hàm lượng (%)	Độ hoà tan (%)	
	Ban đầu	Sau 3 tháng		Ban đầu	Sau 3 tháng
VA				(Độ hoà tan sau 45 phút)	
Mẻ 1	10,52	97,40	4,12	80,1	79,5
Mẻ 2	98,65	94,80	3,85	78,5	80,2
Mẻ 3	102,15	98,53	3,62	81,2	78,3
			Trung bình 3,86		
VI5				(Độ hoà tan sau 30 phút)	
Mẻ 1	100,15	96,69	3,46	101,2	100,5
Mẻ 2	99,4	95,44	4,27	98,5	97,2
Mẻ 3	98,47	94,95	3,52	100,3	99,6
			Trung bình 3,75		
VI13				(Độ hoà tan sau 30 phút)	
Mẻ 1	102,27	102,04	0,23	88,9	88,5
Mẻ 2	101,12	100,93	0,19	86,7	87,7
Mẻ 3	99,30	99,10	0,20	89,5	85,9
			Trung bình 0,21		

Nhận xét:

- Về độ ổn định vitamin B₁₂: Mẫu viên 3B bào chế từ vi nang vitamin B₁₂ thu được từ phương pháp phun đông tụ với tỉ lệ Castor wax. - dược chất 8: 1 có độ ổn định cao nhất. Với tỉ lệ Castor wax - dược chất thấp hơn (4: 1) mẫu viên 3B bào chế từ vi

nang phun đông tụ có độ ổn định vitamin B12 tương đương mẫu viên 3B bào chế từ vi nang thu được bằng phương pháp tách pha đông tụ (sự sai khác giữa 2 mẫu này về độ suy giảm hàm lượng không có ý nghĩa thống kê).

- Về độ hoà tan vitamin B12: Thay đổi không đáng kể đối với các mẫu sau 3 tháng thử nghiệm lão hoá cấp tốc.

Các mẫu vi nang vitamin B12, viên nén 3B mẫu VA được bảo quản ở điều kiện thường dài hạn theo sự biến đổi khí hậu nhiệt độ từ 15°C - 30°C, độ ẩm tương đối của không khí 65% - 90% sau 12 tháng vẫn đảm bảo chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở đề ra.

3.4.6.3. Thử nghiệm cấp tốc độ ổn định dự tính tuổi thọ của viên 3B

Viên 3B bào chế từ vi nang vitamin B12 bằng phương pháp tách pha đông tụ, có qui trình bào chế tương đối hoàn thiện được thử nghiệm lão hoá cấp tốc ở 3 nhiệt độ 35°C ± 2°C, 45°C ± 2°C, 55°C ± 2°C (75% ± 5% RH) để dự tính tuổi thọ theo phương trình Arrhenius:

$$\log \frac{KT_1}{KT_2} = \frac{-E}{2,303R} \left(\frac{1}{T_1} - \frac{1}{T_2} \right)$$

Mẫu viên thử được lấy ngẫu nhiên trong 3 mẻ viên, trộn đều sau khi bao film, chia ra thử ở 3 điều kiện nhiệt độ nêu trên.

Kết quả kiểm nghiệm xác định sự thay đổi hàm lượng vitamin B₁₂ trong mẫu viên 3B ở các điều kiện lão hoá được nêu trong bảng 3.4.38

Bảng 3.4.38: Sự thay đổi hàm lượng của vitamin B₁₂ trong viên 3B ở các điều kiện lão hoá cấp tốc theo thời gian

Hàm lượng vitamin B ₁₂ (%)					
Điều kiện 1		Điều kiện 2		Điều kiện 3	
Tháng	35°C ± 2°C	Tháng	45°C ± 2°C	Tháng	55°C ± 2°C
0	111,95 ± 0,71	0	111,95 ± 0,71	0	111,95 ± 0,71
2	110,02 ± 0,32	1	110,01 ± 0,85	0,5	109,82 ± 0,68
4	109,27 ± 0,44	2	109,05 ± 0,86	1,0	109,01 ± 0,73
6	105,73 ± 0,62	3	105,73 ± 0,86	1,5	107,12 ± 0,74
8	105,02 ± 0,58	4	105,02 ± 0,98	2	103,58 ± 0,72
10	103,17 ± 0,41	5	103,17 ± 0,89	2,5	100,17 ± 0,68
12	101,3 ± 0,38	6	101,31 ± 0,87	3,0	99,97 ± 0,71

Phân tích tương quan giữa hàm lượng vitamin B12 (Y) và thời gian bảo quản (X) ở các điều kiện nhiệt độ khác nhau như sau (bảng 3.4.39).

- Phương trình biểu thị tương quan $Y = a_0 + aX$
- Hệ số tương quan r
- Phương sai thực nghiệm δ_o^2 của các phương trình hồi qui.
- Giá trị chuẩn t, $t_{\text{bảng}}(0,05 ; 35) = 2,04/$
- Phương sai lý thuyết δ_R^2 của các phương trình hồi qui.
- Giá trị chuẩn F, $F_{\text{bảng}}(0,05 ; 35) = 2,50$.

Bảng 3.4.39: Các số liệu phân tích tương quan và phương trình hồi qui ở các điều kiện lão hoá cấp tốc

Dữ liệu	35°C ± 2°C	45°C ± 2°C	55°C ± 2°C
r	- 0,9913	- 0,9699	- 0,9812
a	-0,89	-1,99	-4,33
a ₀	111,98	112,19	112,45
δ_o^2	0,2378	0,6492	0,4577
t _a	19,31	13,07	16,93
t _{ao}	336,98	204,35	243,93
Y	Y=111,98 - 0,89X	Y=112,19-1,99X	Y=112,45-4,33X
δ_R^2	0,3235	0,7304	1,0074
F	1,36	1,13	2,20

Các phân tích thống kê nêu trên cho thấy các phương trình hồi qui tuyến tính trong bảng đều mô tả đúng thực nghiệm, là cơ sở tin cậy để dự tính tuổi thọ của mẫu viên 3B.

Các mẫu viên sau thử nghiệm lão hoá cấp tốc đảm bảo chất lượng về hình thức cảm quan, hàm lượng vitamin B12 trên 90% theo qui định, độ hoà tan của vitamin B12 từ viên nén sau 45 phút đạt trên 75%. Khi các chỉ tiêu đều đạt yêu cầu chất lượng đề ra, tuổi thọ của viên 3B được xem xét dự tính trên chỉ tiêu hàm lượng vitamin B12 như sau:

Từ các phương trình:

$$Y_{35^\circ C} = 111,98 - 0,89X$$

$$Y_{45^\circ C} = 112,19 - 1,99X$$

$$Y_{55^{\circ}C} = 112,45 - 4,33X$$

Tính được tuổi thọ ở thời gian t ứng với Y còn 90%.

$$t_{35^{\circ}C} = 24,7 \text{ tháng}$$

$$t_{45^{\circ}C} = 11,2 \text{ tháng}$$

$$t_{55^{\circ}C} = 5,2 \text{ tháng}$$

Giá trị hằng số tốc độ phân huỷ K được tính từ công thức:

$$K = \frac{2,303}{t} \log \frac{y_0}{90} = \frac{2,303}{t} \log \frac{111,95}{90} = \frac{0,2183}{t}$$

$$K_{35^{\circ}C} = 0,088$$

$$K_{45^{\circ}C} = 0,0195$$

$$K_{55^{\circ}C} = 0,0420$$

$$\log \frac{K_{35^{\circ}C}}{K_{45^{\circ}C}} = \frac{-E_1}{2,303.1,987} \left[\frac{1}{35 + 273,15} - \frac{1}{45 + 273,15} \right] \rightarrow E_1$$

$$\log \frac{K_{45^{\circ}C}}{K_{55^{\circ}C}} = \frac{-E_2}{2,303.1,987} \left[\frac{1}{45 + 273,15} - \frac{1}{35 + 273,15} \right] \rightarrow E_2$$

$$E = \frac{E_1 + E_2}{2} \rightarrow K_{25^{\circ}C} = 0,0037$$

$$t_{25^{\circ}C} = \frac{0,2183}{K_{25^{\circ}C}} = 59,0 \text{ tháng}$$

Như vậy với mẫu viên 3B bào chế đôi hàm lượng vitamin B12 là 111,95% dự tính tuổi thọ trên 4 năm (59 tháng) với điều kiện bảo quản $\leq 25^{\circ}C$ 75% RH. Nếu hàm lượng 105% tuổi thọ dự tính sẽ trên 3 năm (40 tháng) với tiêu chuẩn viên có không ít hơn 90% vitamin B12.

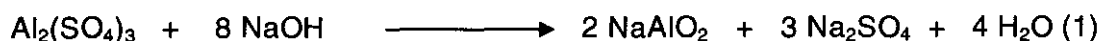
Nếu tiêu chuẩn viên 3B yêu cầu không ít hơn 95% vitamin B12 mẫu viên bào chế đôi hàm lượng vitamin B12 là 105% sẽ có tuổi thọ dự tính trên 2 năm (30 tháng).

3.5. NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ NGUYÊN LIỆU DƯỢC DỤNG VÀ VIÊN NÉN MAGALDRAT

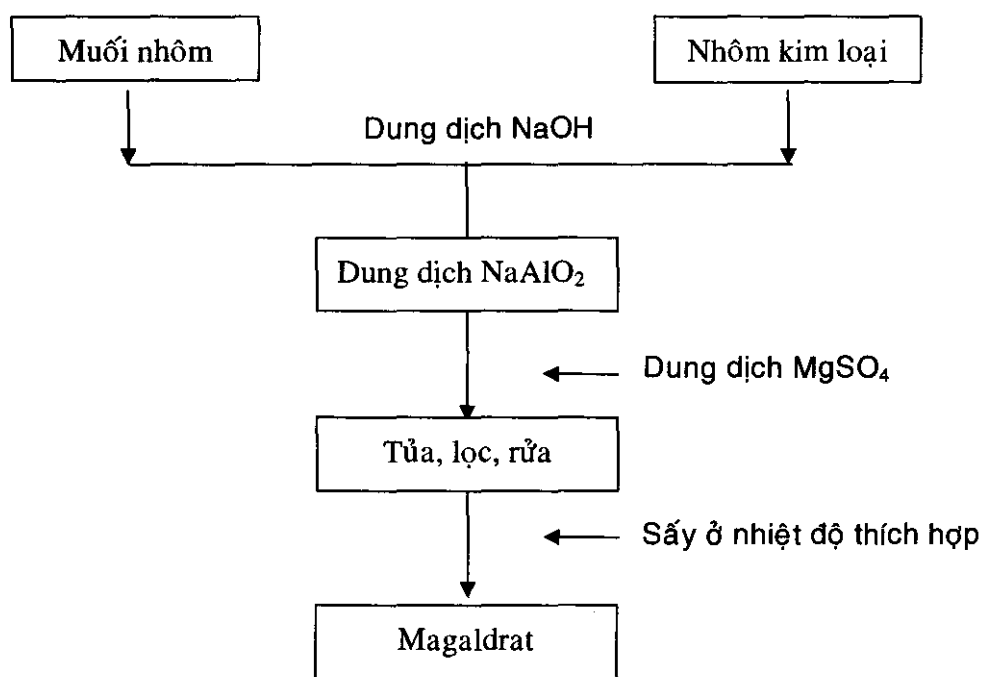
3.5.1. Quy trình điều chế Magaldrat

3.5.1.1. Điều chế Magaldrat và khảo sát các yếu tố ảnh hưởng

Muối nhôm và nhôm phản ứng với dd NaOH tạo dd aluminat (NaAlO_2):



Hoà tan MgSO_4 vào nước để được dd có nồng độ 20%, lọc loại tạp. Cho dd MgSO_4 tác dụng từ từ với dd aluminat, tốc độ khuấy 100 vòng/phút, thực hiện phản ứng ở nhiệt độ phòng (khoảng 30°C). Magaldrat tạo thành được lọc, rửa, ly tâm đến khi rửa sạch (nước rửa có độ dẫn $30 \mu\text{S}$). Rửa được sấy ở nhiệt độ 100°C trong 2 giờ. Bảo quản Magaldrat trong lọ kín, tránh ánh sáng. Quy trình điều chế Magaldrat được trình bày ở sơ đồ:



Sơ đồ 3.5.1. Điều chế nguyên liệu Magaldrat

Để khảo sát và tìm các thông số thích hợp cho quy trình điều chế Magaldrat. Qua các thử nghiệm thăm dò, trước hết chúng tôi cố định tỷ lệ mol các chất tham gia phản ứng là $\text{Al} : \text{Mg} : \text{NaOH} = x : y : z$. Tiến hành phản ứng với Al (x mol), MgSO_4 (y mol), NaOH (z mol). Thay đổi một số yếu tố ảnh hưởng như: nồng độ, nhiệt độ của dd phản ứng và phương pháp sấy (sấy thường và sấy phun sương).

Ảnh hưởng của nồng độ dd NaAlO_2 và dd MgSO_4

Hoà a mol muối nhôm vào dd NaOH (x mol) được dd NaAlO₂ có nồng độ lần lượt là 3, 6, 9, 12, 15% và điều chế dd MgSO₄ có nồng độ 5, 10, 15, 20, 25%. Thực hiện phản ứng điều chế Magaldrat ở 30°C. Lọc, rửa, sấy và cân tủa Magaldrat tạo thành.

Bảng 3.5.1. Ảnh hưởng của nồng độ dd NaAlO₂ và MgSO₄ lên khối lượng Magaldrat

Nồng độ MgSO ₄ (%)	Nồng độ NaAlO ₂ (%)				
	3	6	9	12	15
	(G)	(G)	(G)	(G)	(G)
05	76,2	75,9	78,1	76,5	75,6
10	73,5	75,2	73,5	73,9	77,0
15	75,9	75,3	76,6	78,3	74,8
20	75,1	74,2	81,4	81,0	75,9
25	73,5	75,2	77,4	77,2	77,4

Nhận xét. Phân tích phương sai hai yếu tố đối với dữ liệu Bảng 3.5.1 cho kết quả:

- **Đối với nồng độ MgSO₄ (theo cột)** $F_c = 1,93 < F_{0,05} = 3,01 \Rightarrow$ Khối lượng Magaldrat tạo thành không bị ảnh hưởng bởi nồng độ MgSO₄.

- **Đối với nồng độ NaAlO₂ (theo hàng)** $F_H = 2,5 < F_{0,05} = 3,01 \Rightarrow$ Khối lượng Magaldrat tạo thành không bị ảnh hưởng bởi nồng độ NaAlO₂.

- Điều kiện thích hợp cho phản ứng điều chế Magaldrat là: dd MgSO₄ có nồng độ 15-20% và dd NaAlO₂ từ 9-12%. Khối lượng Magaldrat nhiều nhất, tủa dễ lọc, rửa sấy và nghiền.

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất điều chế Magaldrat

Hoà a mol muối nhôm vào dd NaOH (x mol) được dd NaAlO₂ 12% và chuẩn bị dd MgSO₄ 20% (0,8 mol). Điều chế Magaldrat ở các nhiệt độ 20, 30, 40, 50, 60 °C. Lọc, rửa, sấy và cân tủa Magaldrat. Khối lượng tủa Magaldrat được trình bày ở Bảng 3.5.2.

Bảng 3.5.2 . Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khối lượng Magaldrat

Mẫu		Nhiệt độ phản ứng (°C)				
		20	30	40	50	60
1	(g)	78,55	78,92	79,12	80,25	79,56
2	(g)	76,23	80,54	80,34	79,62	80,63
3	(g)	79,62	81,62	80,65	81,54	81,23
Trung bình	(g)	78,13	80,36	80,04	80,47	80,48

Kết quả phân tích phương sai 1 yếu tố đối với dữ liệu Bảng 3.5.2 cho thấy nhiệt độ không ảnh hưởng đến hiệu suất điều chế Magaldrat $F = 2.092 < F_{0,05} = 3.478$.

Nhận xét. Magaldrat có thể được điều chế ở nhiệt độ từ 20-60°C. Khi thực hiện phản ứng ở 60°C, tốc độ phản ứng có nhanh trong giai đoạn đầu nhưng hiệu suất vẫn không đổi, thiết bị điều chế cần phải gia nhiệt, điều này sẽ bất lợi khi sản xuất lớn. Vì vậy, quy trình điều chế Magaldrat vẫn có thể thực hiện ở nhiệt độ từ 28-32°C.

3.5.1.2. Tối ưu hoá quy trình điều chế Magaldrat

Nhận xét. Hoạch định thí nghiệm và tối ưu hoá bằng cách chuyển dịch theo gradient nồng độ của các chất tham gia (Phương pháp của Box và Wilson). Qua thực nghiệm, đã xác định được miền tối ưu, chất lượng tủa Magaldrat thu được tốt, dễ nghiền và khả năng trung hoà acid cao. Các thông số thích hợp cho quy trình điều chế Magaldrat đã được chọn:

- Nhiệt độ phản ứng 28 -32°C, nhiệt độ sấy tủa từ 80 - 100°C.
- Nồng độ dd $MgSO_4$ 20% và dd $NaAlO_2$ 12%

3.5.2. Xác định thành phần công thức của phức hợp Magaldrat

Định tính. Các ion Al^{3+} , Mg^{2+} , OH^- và SO_4^{2-} của Magaldrat đúng theo USP 24.

Thành phần công thức của Magaldrat

Định lượng các thành phần Al, Mg, SO_4^{2-} , OH^- trong Magaldrat theo USP 24.

Độ ẩm của nguyên liệu Magaldrat là 16,52% . Kết quả số liệu phân tích:

- Định lượng Al: Phương pháp tạo phức với EDTA
- Định lượng Mg: Phương pháp tạo phức với EDTA
- Định lượng OH^- : Phương pháp trung hoà
- Định lượng SO_4^{2-} : Phương pháp trao đổi ion

Thực hiện trên 3 mẫu, lấy giá trị trung bình. Kết quả phân tích ở Bảng 3.5.3.

Bảng 3.5.3. Kết quả phân tích thành phần công thức của phức hợp Magaldrat

Phân tích Magaldrat	Thành phần công thức của Magaldrat (%)				
	Al	Mg	SO_4^{2-}	S	OH^-
Theo Remington's $[AlMg_5(OH)_7]$	13,92	24,74	00,00	0,00	61,34
Mẫu Magaldrat điều chế	12,29	21,72	17,50	5,83	47,88

Với số liệu phân tích, thiết lập tỷ lệ mol các thành phần trong phức hợp:

$$Al : Mg : OH^- : SO_4^{2-} = \frac{12,29}{27} : \frac{21,72}{24} : \frac{47,88}{17} : \frac{17,50}{96} = 0,455 : 0,905 : 2,816 : 0,182$$

Chia tỷ lệ trên cho 0,182

Ta được tỷ lệ $Al : Mg : OH^- : SO_4^{2-} = 2,5 : 4,97 : 15,5 : 1$

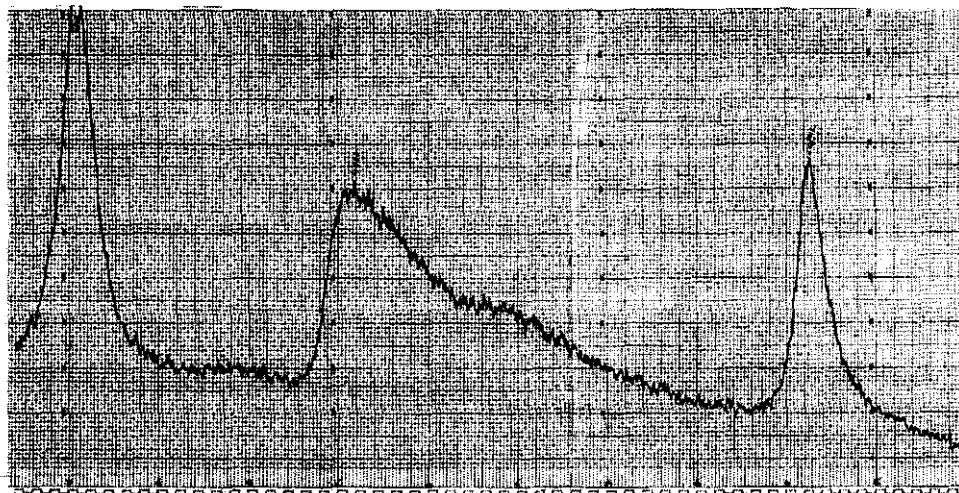
Nhân cho 2 và làm tròn $Al : Mg : OH^- : SO_4^{2-} = 5 : 10 : 31 : 2$

Vậy công thức phân tử gần đúng của Magaldrat là: $\text{Al}_5\text{Mg}_{10}(\text{OH})_{31}(\text{SO}_4)_2$.

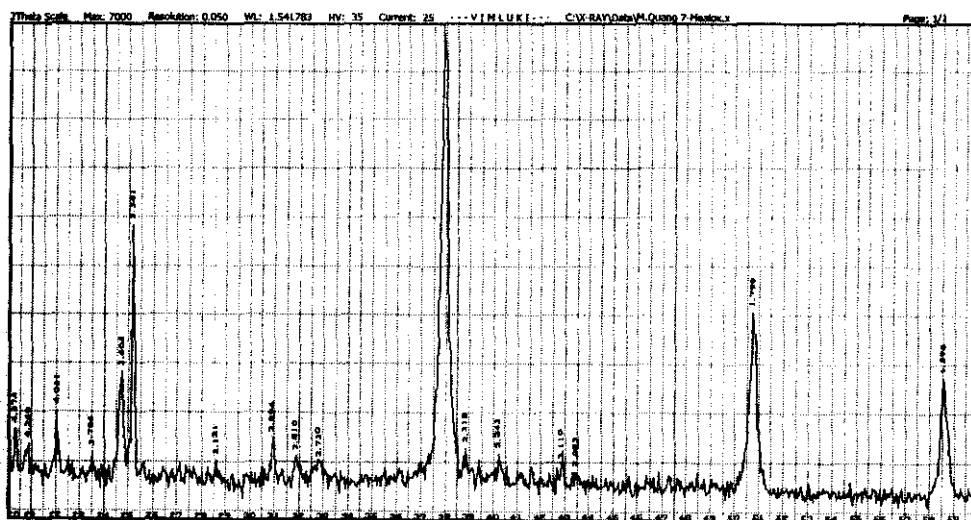
Nhận xét. Kết quả phân tích cho thấy công thức của Magaldrat điều chế có thành phần tương tự như Magaldrat trong tài liệu của USP 24.

3.5.3. Đặc điểm cấu trúc và phổ nhiễu xạ tia X của Magaldrat.

Mẫu Magaldrat được đo phổ nhiễu xạ tia X tại Viện Nghiên cứu mỏ và Luyện kim, Phân Viện TP HCM, trên máy: Shimadzu X-ray Diffractometer XD - 5A.



Hình 3.5.1. Phổ nhiễu xạ tia X của Magaldrat điều chế $\text{Al}_5\text{Mg}_{10}(\text{OH})_{31}(\text{SO}_4)_2$



Hình 3.5.2. Phổ nhiễu xạ tia X của hỗn hợp $\text{Al}(\text{OH})_3$ và $\text{Mg}(\text{OH})_2$

Nhận xét. Phổ nhiễu xạ tia X của Magaldrat có hằng số mạng $d < 2,57$ angstrom, là dạng phổ của chất phức hợp đại phân tử, có trật tự liên kết xa và không có đỉnh nhiễu xạ đặc trưng như của $\text{Al}(\text{OH})_3$ và $\text{Mg}(\text{OH})_2$. Magaldrat là một phức hợp mới, khác biệt với sự pha trộn đơn thuần của $\text{Al}(\text{OH})_3$ và $\text{Mg}(\text{OH})_2$.

3.5.4. Chất lượng của nguyên liệu Magaldrat

Kết quả kiểm nghiệm nguyên liệu làm khô bằng sấy phun sương.

Kết quả kiểm nghiệm tại Phân viện Kiểm nghiệm TP HCM, tiêu chuẩn áp dụng USP 23. Phiếu kiểm nghiệm số: 262 /PVKN-YC 99.

Bảng 3.5.4 . Kết quả kiểm nghiệm nguyên liệu Magaldrat.

<i>Yêu cầu</i>	<i>Kết quả</i>
Tính chất:	Bột mịn, trắng
Định tính: phải có phản ứng hoá học đặc trưng Al, Mg	Đúng
Giảm khối lượng do sấy khô: từ 10 – 20%	Đạt (16,28 %)
Clorid hoà tan: < 3,5 %	Đạt
Sulfat hoà tan < 1,9 %	Đạt
Natri: < 0,11 %	Đạt
Kim loại nặng: < 0,006 %	Đạt
Magnesi hydroxyd: từ 49,2 – 66,6 % trên chế phẩm khô	Đạt (50,07 %)
Nhôm hydroxyd: từ 32,1 – 45,9 % trên chế phẩm khô	Đạt (33,19 %)
Định lượng: hàm lượng Magaldrat từ 90-105% / khan	Đạt (91,72 %)
<u>Tap chất hữu cơ bay hơi:</u>	
- Methylen clorid: < 500 ppm	Đạt
- Benzen: < 100 ppm	Đạt
- Trichloroethylen: < 100 ppm	Đạt
- Cloroform: < 50 ppm	Đạt
- 1,4- Dioxan: < 100 ppm	Đạt
Hàm lượng sulfat: từ 16-21% trên chế phẩm khan	Đạt (19,62 %)
Độ nhiễm khuẩn: Phải đạt yêu cầu qui định	Đạt

Kết luận. Mẫu thử Magaldrat đạt yêu cầu phẩm chất theo USP 23

Kết quả kiểm nghiệm nguyên liệu Magaldrat làm khô bằng tủ sấy.

Bảng 3.5.5: Kết quả kiểm tra 5 mẫu nguyên liệu Magaldrat:

Chỉ tiêu	Mẫu				
	1	2	3	4	5
Định Tính	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng	Đúng
Độ ẩm (%)	14	17,2	16	15,2	16,5
Hàm lượng $Mg(OH)_2$ (%)	55,28	50,93	52,03	62,27	50,68
Hàm lượng $Al(OH)_3$	36,32	34,68	38,90	37,63	42,30
Hàm lượng Sulfat	16,43	20,41	17,35	18,83	18,40
Magaldrat toàn phần	93,42	92,83	96,50	96,20	94,15
Kết luận	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt

Nhận xét:

Sau khi kiểm tra 5 mẫu, chúng tôi nhận thấy các mẫu trên đều đạt tiêu chuẩn chất lượng của USP 23.

Tiếp tục tiến hành thăm dò, thiết kế và bào chế viên nén chứa Magaldrat

- **Bảo quản Magaldrat.** Trong lọ kín, tránh ẩm và ánh sáng.

3.5.5. Độ an toàn của Magaldrat.

Thử độc tính cấp trên chuột nhắt trắng tại Viện Pasteur.

Kết quả cho thấy nguyên liệu Magaldrat không gây độc tính cấp trên chuột với liều 5 g/kg/24 giờ (liều này cao gấp 73 lần liều bình thường).

3.5.6. Thiết kế công thức và bào chế viên nén Malumix

3.5.6.1. Các đặc tính hoá lý của nguyên liệu Magaldrat

- **Magaldrat sấy phun sương**

Hình thức cảm quan. Quan sát bằng kính hiển vi, Magaldrat là bột vô định hình hoặc kết tinh, qua rây số 180, không mùi, không vị.

Độ hoà tan: Không tan trong nước, cồn, dung môi hữu cơ (benzen, acetone, chloroform..). Tan một phần trong dung dịch kiềm, tan trong acid loãng.

Tính chất hoá lý

Tỷ trọng thể. Cân một lượng nguyên liệu chính xác, cho vào ống đong, xác định thể tích bột không gõ lắc. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.5.6.

Bảng 3.5.6. Tỷ trọng thô của nguyên liệu Magaldrat (sấy phun sương)

Mẫu	1	2	3	4	5	6	Trung bình
Khối lượng M (g)	25,02	25,04	25,03	25,04	25,05	25,06	
Thể tích V ₁ (ml)	52,00	53,00	52,60	53,60	52,10	52,50	
Tỷ trọng thô (g/ml)	0,481	0,472	0,476	0,467	0,481	0,477	0,476

Tỷ trọng biểu kiến. Thực hiện như đo tỷ trọng thô nhưng gõ nhẹ ống đong đến khi thể tích không đổi. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.5.7.

Bảng 3.5.7. Tỷ trọng do gõ của nguyên liệu Magaldrat (sấy phun sương)

Mẫu	1	2	3	4	5	6	TB
Khối lượng M (g)	24,98	25,01	25,06	25,04	25,05	25,06	
Thể tích V ₂ (ml)	43,00	42,50	43,60	42,60	43,10	43,50	
Tỷ trọng do gõ (g/ml)	0,581	0,588	0,575	0,588	0,581	0,576	0,581

Nhận xét: Kết quả ở Bảng 3.5.9 và 3.5.10 cho thấy cấu trúc của bột nguyên liệu Magaldrat tương đối đồng đều, ít có khoảng trống giữa các tiểu phân.

Độ giảm khối lượng do sấy khô. Kết quả trình bày ở Bảng 3.5.8.

Bảng 3.5.8. Độ giảm khối lượng do sấy khô của Magaldrat

Mẫu	Khối lượng mẫu (g)	Khối lượng sau khi sấy (g)	Hàm ẩm %
1	1,0064	0,8534	15,20
2	1,0045	0,8287	17,50
3	1,0026	0,8439	15,83
4	1,0072	0,8496	15,65
5	1,0054	0,8395	16,50
6	1,0085	0,8504	15,68
Trung bình			16,06 ± 0,86

Khả năng trung hoà acid

Bảng 3.5.9. Khả năng trung hoà acid của Magaldrat (KNTHA)

Mẫu	Khối lượng Mẫu (g)	Hàm ẩm (%)	Thể tích HCl (ml)	KNTHA/1 g nguyên Liệu khan (mEq)
1	0,500	15,20	10,52	24,81
2	0,501	17,50	10,35	25,09
3	0,502	15,83	10,50	24,95
4	0,501	15,65	10,45	24,78
5	0,500	16,50	10,55	25,27
Trung bình				24,98 ± 0,25

Nhận xét: Magaldrat có KNTHA cao, tương đương với các antacid ngoại nhập

- Các đặc tính hoá lý của Magaldrat sấy bằng phương pháp (tủ sấy)

Hình thức cảm quan. Quan sát bằng kính hiển vi, Magaldrat là bột vô định hình hoặc kết tinh, qua rây số 300, không mùi, không vị.

Độ hoà tan: Không tan trong nước, cồn, dung môi hữu cơ (benzen, acetone, chloroform...). Tan một phần trong dung dịch kiềm, tan trong acid loãng.

Tính chất hoá lý

Tỷ trọng thô.

Cân một lượng nguyên liệu chính xác 50 g, cho vào ống đóng, xác định thể tích bột không gõ lắc. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.5.10.

Bảng 3.5.10. Tỷ trọng thô của nguyên liệu Magaldrat (sấy tủ sấy)

Mẫu	1	2	3	4	5	6	Trung bình
Khối lượng M (g)	50,02	50,01	50,03	50,04	50,12	50,06	
Thể tích V ₁ (ml)	70,05	69,55	69,01	69,53	69,42	69,72	
Tỷ trọng thô (g/ml)	0,714	0,719	0,725	0,720	0,722	0,718	0,720

Tỷ trọng biểu kiến.

Thực hiện như đo tỷ trọng thô nhưng gõ nhẹ ống đóng đến khi thể tích không đổi. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.5.11.

Bảng 3.5.11. Tỷ trọng biểu kiến của nguyên liệu Magaldrat (sấy tủ sấy)

Mẫu	1	2	3	4	5	6	Trung bình
Khối lượng M (g)	50,08	50,04	50,12	50,20	50,05	50,06	
Thể tích V ₂ (ml)	62,13	62,08	61,72	62,67	61,49	62,03	
Tỷ trọng do gõ (g/ml)	0,806	0,806	0,812	0,801	0,814	0,807	0,807

Nhận xét: Kết quả ở Bảng 3.5.10 và 3.5.11 cho thấy cấu trúc của bột nguyên liệu

Magaldrat tương đối đồng đều, ít có khoảng trống giữa các tiểu phân.

Độ giảm khối lượng do sấy khô. Kết quả trình bày ở Bảng 3.5.12.

Bảng 3.5.12. Độ giảm khối lượng do sấy khô của Magaldrat

Mẫu	Khối lượng mẫu (g)	Khối lượng sau khi sấy (g)	Hàm ẩm %
1	1,0164	0,8614	15,50
2	1,0245	0,8641	17,84
3	1,0016	0,8421	15,95
4	1,0027	0,8264	17,63
5	1,0154	0,8504	16,50
6	1,0025	0,8397	16,28
Trung bình			16,62

Khả năng trung hoà acid

Bảng 3.5.13. Khả năng trung hoà acid của Magaldrat (KNTHA)

Khả năng trung hoà acid mEq/g	Mẫu Magaldrat					
	1	2	3	4	5	6
	24,25	24,58	25,06	24,08	24,80	25,30

Nhận xét: Magaldrat có KNTHA cao, tương đương với các antacid ngoại nhập

3.5.6.2. Bào chế viên Malumix bằng phương pháp xát hạt ướt

Tiêu chuẩn viên. Dạng bào chế là viên uống, dự kiến khối lượng viên khoảng 700 mg trong đó chứa Magaldrat 400 mg khan (500 mg chứa kể độ ẩm), độ cứng viên 150 N, đường kính viên 11 mm, độ rã < 2 phút và KNTHA > 9,03 mEq (USP 24).

Bào chế. Magaldrat được phối hợp lần lượt với các tá dược Avicel, tinh bột, Era-Gel, PVP theo phương pháp xát hạt ướt. Trộn đều hỗn hợp bột, tạo cốm với tá dược dính PVP, sấy nhẹ cốm đến độ ẩm thích hợp, sửa hạt, thêm tá dược trơn và dập trên máy xoay tròn, lực nén ứng với độ cứng khoảng 150 N.

Kiểm nghiệm. Kết quả cho thấy độ rã viên đều > 2 phút (không đạt).

3.5.6.3. Bào chế viên nén Malumix bằng phương pháp dập thẳng.

Bào chế viên nén Malumix 400 mg: Các bước thực hiện:

Thăm dò thời gian trộn đều. Trộn đều hỗn hợp Malumix theo công thức 4 (Bảng 3.5.14), mỗi thời điểm lấy 5 mẫu ở các vị trí khác nhau trong máy trộn.

Nhận xét. Kết quả phân tích thống kê cho thấy khi $t > 10$ phút thì khối bột đã được trộn đều (Hệ số phân tán CV hay độ lệch chuẩn tương đối RSD < 2%).

Đặc điểm về độ trơn chảy của hỗn hợp bột Malumix

Đo độ trơn chảy của bột Malumix trên máy ERWEKA hỗn hợp gồm: Magaldrat

71,4%, Avicel từ 8,5 - 25%, talc-Mg stearat (8:2) từ 1-2,85%, lactose vừa đủ 100%, hỗn hợp bột dễ chảy, tiến hành bào chế viên nén bằng cách dập thẳng.

Thiết kế công thức viên Malumix 400mg (M400)

Thăm dò một số công thức ban đầu, kiểm tra các tính chất kỹ thuật của viên , từ đó chọn công thức có thành phần: Magaldrat, Avicel, talc/Mg stearat (8:2), lactose làm cơ sở cho việc thiết kế 6 công thức thực nghiệm, mỗi lô 1000 viên.

Bảng 3.5.14. Thành phần hoạt chất và tá dược của 6 công thức thực nghiệm

Công thức	Magaldrat (Mg)	Avicel (Mg)	Talc/Mgstearat (Mg)	Lactose (Mg)
1	500	60	7	133
2	500	60	14	126
3	500	120	7	73
4	500	120	14	66
5	500	180	7	13
6	500	180	14	6

Nhận xét: Viên Malumix sau khi dập có màu trắng hai mặt hơi cong, khối lượng khoảng 700 mg. Các chỉ tiêu kỹ thuật của viên Malumix trình bày trong Bảng 3.5.15.

Bảng 3.5.15. Đặc tính kỹ thuật của viên Malumix 400 mg

Thứ tự (Công thức)	Các chỉ tiêu kiểm nghiệm			
	Khối lượng (Mg)	Độ rắn (Kg)	Độ rã (Giây)	KNTHA (MEq)
1	698	16,3	33	10,4
2	693	15,5	91	10,6
3	700	15,9	35	11,0
4	693	15,9	132	10,9
5	699	16,1	153	10,4
6	698	15,3	154	10,4

Độ mài mòn. Thử trên máy ERWEKA, mỗi công thức cân 10 viên (A g), thời gian thử 4 phút, vận tốc quay của máy 25 vòng/phút, sau đó cân lại khối lượng 10 viên (B g). Kết quả các lô viên nén thực nghiệm có độ mài mòn từ 0,13-0,29%. Kết luận độ mài mòn của các công thức viên đều đạt.

Bào chế viên nén Malumix 480 mg (phương pháp dập thẳng).

Các bước thực hiện:

- **Thiết kế công thức viên nén Magaldrat 480 mg (M480)**

Thăm dò một số công thức viên mới với sự thay đổi thành phần các tá dược và giữ nguyên thành phần hoạt chất nhằm mục đích bào chế viên đạt chỉ tiêu về độ rã và độ đồng đều khối lượng. Để nâng cao tác dụng trung hoà acid viên Malumix tương đương với viên Riopan 480 (Mỹ), chúng tôi đã tăng hàm lượng Magaldrat lên 480 mg khan (tương ứng khoảng 600 mg Magaldrat chưa tính đến độ ẩm). Trộn đều hỗn hợp Malumix 480 mg và tá dược trong 10 phút. Tiến hành kiểm tra các thông số của cốm viên. Bào chế bằng kỹ thuật dập thẳng mỗi lô 1000 viên.

- Các thông số kỹ thuật của cốm viên 480 mg (Magaldrat sấy tử sấy)

Bảng 3.5.16: Kết quả kiểm tra thông số cốm dập viên

Thông số	Công thức			
	1	2	3	4
Độ ẩm (%)	7,85	6,37	6,58	4,82
Tỷ trọng biểu kiến (g/ml)	0,725	0,769	0,893	0,892
Hệ số nén	13,9	13,6	14,5	15,5
Tốc độ chảy (g/giây)	5,5	4	3,5	3,5
Góc chảy (độ)	32	34	31	35

Nhận xét: Cốm ở các công thức thiết kế đều đạt tiêu chuẩn kỹ thuật cho dập viên

Bảng 3.5.17. Kết quả chỉ tiêu kỹ thuật các công thức viên nén Magaldrat 480mg

Phương pháp dập thẳng	Công thức			
	1	2	3	4
Magaldrat (mg)	600	600	600	600
TD1 (mg)	20	45	00	90
TD2 (mg)	70	45	90	00
Talc- Mg steartat (mg)	10	10	10	10
Chỉ tiêu kỹ thuật				
Khối lượng trung bình (mg)	710,5	710,3	712,1	714,5
Độ cứng trung bình (N)	90 N	80 N	85 N	70 N
Độ rã (giây)	40	38	50	45

Nhận xét: - Trong thời gian máy hoạt động: cốm chảy đều vào cối

- Viên có hình thức cảm quan bóng, đẹp, không bị bong mặt, hỏng cạnh.
- Các lô đều đạt về: Khối lượng viên, độ rã và độ cứng

Bào chế viên nén Malumix 540 mg (phương pháp dập thẳng).

- **Thiết kế công thức viên nén Magaldrat 540 mg (M540)**

Thăm dò một số công thức viên mới với sự thay đổi thành phần các tá dược và giữ

nguyên thành phần hoạt chất nhằm mục đích bào chế viên đạt chỉ tiêu về độ rã và độ đồng đều khối lượng. Để nâng cao tác dụng trung hoà acid, chúng tôi đã tăng hàm lượng Magaldrat lên 540 mg khan (tương ứng khoảng 680 mg Magaldrat chưa tính đến độ ẩm). Ứng với 5ml hỗn dịch Riopan 540 mg. Tiến hành kiểm tra các thông số của cốm viên. Bào chế bằng kỹ thuật dập thẳng.

• **Các thông số kỹ thuật của cốm dập viên (Magaldrat sấy tử sấy)**

Bảng 3.5.18. Kết quả kiểm tra thông số cốm dập viên

Thông số	Công thức			
	1	2	3	4
Độ ẩm (%)	7,93	5,87	6,89	4,93
Tỷ trọng biểu kiến (g/ml)	0,725	0,769	0,893	0,892
Hệ số nén	13,8	13,3	15	16,5
Tốc độ chảy (g/giây)	5,5	2	3,3	2,5
Góc chảy (độ)	35	36	40	39

Nhận xét: Cốm ở các công thức thiết kế đều đạt tiêu chuẩn kỹ thuật.

Bảng 3.5.19. Kết quả đặc tính kỹ thuật các công thức viên nén Magaldrat 540 mg

Phương pháp dập thẳng	Công thức			
	1	2	3	4
Magaldrat (mg)	680	680	680	680
TD1 (mg)	60	0	60	0
TD2 (mg)	50	110	50	110
Talc- Mg steartat (mg)	10	10	10	10
Chỉ tiêu kỹ thuật				
Khối lượng trung bình (mg)	802,5	810,3	813,2	810,3
Độ cứng trung bình (mg)	250N	276N	207N	253N
Độ rã (giây)	40	38	38	50

Nhận xét:

- Trong thời gian máy hoạt động: cốm chảy đều vào cối
- Viên có hình thức cảm quan bóng, đẹp, không bị bong mặt, hỏng cạnh.
- Các lô đều đạt về: Khối lượng viên, độ rã và độ cứng

3.5.7. Kiểm nghiệm viên nén Malumix 400 mg, 480 mg và 540 mg

Kết quả kiểm nghiệm viên nén Malumix 400mg

Mẫu kiểm nghiệm: Viên uống Malumix

Số sản xuất : Mẫu nghiên cứu viên nén Malumix công thức 03 (Bảng 3.5.14)

Yêu cầu kiểm nghiệm: Phân tích chất lượng .

Thử theo tài liệu: USP 24 và Tiêu chuẩn cơ sở viên nén TC 01

YÊU CẦU	KẾT QUẢ
1. Trình bày: 2. Tính chất: Viên nén màu trắng , không mùi. 3. Độ đồng đều khối lượng: $\bar{m} \pm 5 \%$ 4. Độ tan rã: không quá 120 giây 5. Độ nhiễm khuẩn: chế phẩm không có <i>Escherichia coli</i> 5. Định tính: Phải có phản ứng - Nhôm và Magnesi 6. Khả năng trung hoà acid: $> 9,03 \text{ mEq HCl/viên}$ 7. Định lượng chế phẩm phải chứa: - Mg(OH)_2 : 197-266 mg - Al(OH)_3 : 128-183 mg - Magaldrat $\text{Al}_5\text{Mg}_{10}(\text{OH})_{31}(\text{SO}_4)_2$: 360 - 440 mg Tính theo khối lượng trung bình thuốc trong viên .	Viên nén trong vỉ Đúng Đạt $(0,699 \text{ g} \pm 0,035\text{g})$ Đạt 72 giây Đạt Dương tính Đạt $10,6 \text{ mEq HCl/viên}$ Đạt 210,31 mg/viên Đạt 134,42 mg/viên Đạt 400,25 mg/viên

Kết luận: Viên Malumix 400 mg đạt tiêu chuẩn chất lượng USP 24 và TC cơ sở 01.

Kết quả kiểm nghiệm viên nén Malumix 480mg

Mẫu kiểm nghiệm: Viên uống Malumix

Số sản xuất : Mẫu nghiên cứu viên nén Malumix công thức 03 (Bảng 3.5.17)

Yêu cầu kiểm nghiệm : Phân tích chất lượng .

Thử theo tài liệu: Tiêu chuẩn USP 24 và TC cơ sở viên nén TC 02

YÊU CẦU	KẾT QUẢ
1. Trình bày: 2. Tính chất: Viên nén màu trắng , không mùi. 3. Độ đồng đều khối lượng: $\bar{m} \pm 5 \%$ 4. Độ tan rã: không quá 120 giây 5. Độ nhiễm khuẩn: chế phẩm không có <i>Escherichia coli</i> 5. Định tính: Phải có phản ứng - Nhôm và Magnesi 6. Khả năng trung hoà acid: $> 9,03 \text{ mEq HCl/viên}$ 7. Định lượng chế phẩm phải chứa: - Mg(OH)_2 : 236,16 – 319,68 mg - Al(OH)_3 : 154,08 – 220,32 mg - Magaldrat $\text{Al}_5\text{Mg}_{10}(\text{OH})_{31}(\text{SO}_4)_2$: 432,00 - 528,00 mg Tính theo khối lượng trung bình thuốc trong viên .	Viên nén trong vỉ Đúng Đạt $(0,712 \text{ g} \pm 0,035\text{g})$ Đạt 50 giây Đạt Dương tính Đạt $13,5 \text{ mEq HCl/viên}$ Đạt 268,27 mg/viên Đạt 169,65 mg/viên Đạt 502,68 mg/viên

Kết luận: Viên Malumix 480 mg đạt chất lượng theo tiêu chuẩn USP 24 và TC cơ sở

Kết quả kiểm nghiệm viên nén Malumix 540 mg

Mẫu kiểm nghiệm : Viên uống Malumix

Số sản xuất : Mẫu nghiên cứu viên nén Malumix công thức 03 (Bảng 3.5.20)

Yêu cầu kiểm nghiệm : Phân tích chất lượng .

Thử theo tài liệu : Tiêu chuẩn USP 24 và tiêu chuẩn cơ sở viên nén TC 03

YÊU CẦU	KẾT QUẢ
1. Trình bày:	Viên nén trong lọ
2. Tính chất: Viên nén màu trắng , không mùi, nhẵn	Đúng
3. Độ đồng đều khối lượng: $\bar{m} \pm 5\%$	Đạt (0,813 g $\pm$ 0,04g)
4. Độ tan rã: không quá 120 giây	Đạt 45 giây
5. Độ nhiễm khuẩn: chế phẩm không có <i>Escherichia coli</i>	Đạt
5. Định tính: Phải có phản ứng - Nhôm và Magnesi	Dương tính
6. Khả năng trung hoà acid: > 12,4 mEq HCl/viên	Đạt 15,06 mEq HCl/viên
7. Định lượng chế phẩm phải chứa:	
- Mg(OH) ₂ : 270,6 – 366,3 mg	Đạt 303,89 mg/viên
- Al(OH) ₃ : 176,5 – 252,5 mg	Đạt 211,52 mg/viên
- Magaldrat Al ₅ Mg ₁₀ (OH) ₃₁ (SO ₄) ₂ : 495 - 605 mg	Đạt 569,0 mg/viên
Tính theo khối lượng trung bình thuốc trong viên .	

Kết luận: Viên Malumix 540 mg đạt chất lượng tiêu chuẩn USP 24 và TC cơ sở TC 03.

3.5.8. Kết quả nghiên cứu tác dụng sinh học và tương đương sinh học của malumix so với dược phẩm cùng nhóm

3.5.8.1. Tác dụng dược lý của chế phẩm Malumix

a. Khả năng trung hoà acid của Malumix

Khảo sát KNTHA của viên Malumix, so sánh với một số chế phẩm ngoại nhập. Mỗi chế phẩm thử 3 lần lấy giá trị trung bình. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.5.20

Bảng 3.5.20. Khả năng trung hoà acid của một số chế phẩm kháng acid

Chế phẩm khảo sát			Công thức		K N T H A	
			Al(OH) ₃ (Mg)	Mg(OH) ₂ (mg)	Magaldrat (g)	MEq/viên
Maalox plus	Mỹ		200	200		11,40
Maloxal 2	VN		400	400		20,68
Maalox	Pháp		400	400		22,65
Mylanta II	Úc		400	400		24,10
Riopan plus	(Ayerst)				480	13,5
Malumix 480	N/ cứu				480	13,50
Malumix 540	N/ cứu				540	15,48
Marax 800	Đức				800	20,65

Nhận xét.

Các chế phẩm chứa Magaldrat là loại antacid có khả năng trung hoà acid khá cao, tương tự với các chế phẩm ngoại nhập cùng loại.

b. Khả năng ức chế hoạt độ pepsin của Malumix

Lượng albumin thử nghiệm: 500 mg, lượng thuốc khảo sát 100 mg. Mỗi mẫu thuốc thử 5 lần lấy giá trị trung bình. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.5.21.

Bảng 3.5.21. Khả năng ức chế pepsin của Malumix và thuốc đối chiếu ($p < 0,05$)

Thuốc Khảo sát	Lượng albumin còn lại (mg)	Lượng albumin Thuỷ phân (mg)	(%) Hoạt độ Pepsin còn lại	(%) Pepsin Bị ức chế
1. Chứng	258,56 ± 3,66	241,44 ± 3,66	100,00	00,00
2. Maalox	400,43 ± 5,03	99,57 ± 5,03	41,24	58,76
3. Malumix	391,48 ± 6,14	108,52 ± 6,14	44,95	55,05
4. Mylanta II	383,18 ± 4,20	116,82 ± 4,20	48,39	51,61
5. Maloxal 2	361,19 ± 6,89	138,81 ± 6,89	57,50	42,50

Phân tích phương sai một yếu tố cho thấy: $F = 4,285 < F_{0,05} = 161,446$

Nhận xét. Với cùng một lượng thuốc khảo sát, Malumix có khả năng ức chế pepsin tương đương với các kháng acid hiện hành như: Maalox, Mylanta II.

c. Tác động bảo vệ niêm mạc dạ dày và chống loét của Malumix

Hiệu lực bảo vệ tế bào niêm mạc của thuốc thử nghiệm được đánh giá dựa trên giá trị "chỉ số loét U.I". Với $U.I = X_s (\%) \cdot X_v (\%)$.

X_s : Tổng số vết loét được tính theo % của tổng số vết loét ở lô chứng (100%)

X_v : Độ lớn vết loét được tính theo % của độ lớn vết loét ở lô chứng (100%)

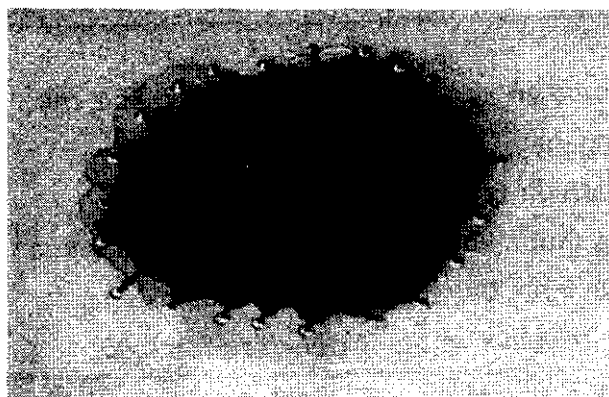
Kết quả chỉ số loét của Malumix.

Bảng 3.5.22. Kết quả chỉ số loét của Malumix và thuốc đối chiếu

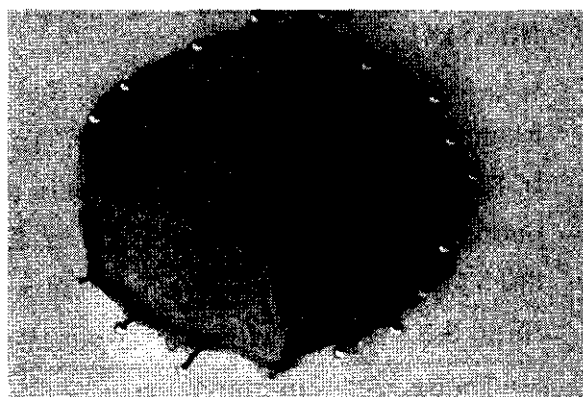
Thuốc	Tổng số vết loét X_s (%)	Tổng độ lớn vết loét X_v (%)	Chỉ số loét $UI = X_s(\%) \cdot X_v(\%)$
Ethanol	100,00	100,00	1,000
Maalox	45,26	30,00	0,136
Malumix	27,99	16,37	0,046

Nhận xét: Kết quả thực nghiệm và phân tích phương sai cho thấy:

Chỉ số loét U.I của Malumix (0,04) < Maalox (0,136) < 1 nên hai thuốc đều có khả năng bảo vệ tế bào niêm mạc dạ dày. Chỉ số U.I càng bé, hiệu lực bảo vệ tế bào niêm mạc dạ dày càng tốt.



Hình 3.5.3. Niêm mạc dạ dày chuột bị loét do Ethanol



Hình 3.5.4. Malumix bảo vệ niêm mạc dạ dày chuột trên mô hình gây loét do Ethanol

3.5.9. Kết quả độ an toàn của malumix

3.5.9.1. Độc tính cấp của Malumix

Thử tại Viện Pasteur TP. HCM. Mẫu xét nghiệm số N 14674

Theo dõi trên lô 10 chuột nhắt trắng, được cho uống Malumix liều 5 g/kg thể trọng, theo dõi tình trạng hoạt động của chuột trong 3 ngày. Kết quả: Không có chuột nào chết cũng như biểu hiện các triệu chứng khác thường về các rối loạn về tiêu hoá.

Kết luận: Mẫu thuốc Malumix không gây độc tính cấp trên chuột nhắt trắng.

3.5.9.2. Độc tính bán cấp của chế phẩm Malumix

Thử tại bộ môn Dược lý, bộ môn Giải phẫu bệnh và bệnh viện Chợ Rẫy.

Liều cho chuột uống Malumix 0,45 g/kg/24 giờ, thời gian 45 ngày. Theo dõi các chỉ số huyết học, chỉ số sinh hoá (men), tình trạng thể trọng, các tổ chức như gan, thận.

- **Kết quả về chỉ số huyết học**

Chỉ số huyết học chuột sau 45 ngày uống Malumix được trình bày trong Bảng 3.5.23.

Bảng 3.5.23. Chỉ số huyết học của chuột sau 45 ngày uống Malumix

TT	Chỉ tiêu xét nghiệm	Nhóm	N	Trước thí nghiệm	Sau thí nghiệm
1	Số lượng hồng Cầu ($10^{12}/l$)	Khảo sát	10	$8,78 \pm 1,91$	$8,18 \pm 1,27$
2	Huyết sắc tố (g/l) Hemoglobin	Khảo sát	10	$141,70 \pm 31,26$	$140,40 \pm 24,70$
3	Thể tích hồng cầu Hematocrit (%)	Khảo sát	10	$45,31 \pm 10,31$	$41,93 \pm 7,34$
4	Bạch cầu ($10^9/l$)	Khảo sát	10	$9,07 \pm 3,27$	$9,21 \pm 2,73$

- **Kết quả về chỉ số men ASAT, ALAT của chuột sau 45 ngày uống Malumix**

Bảng 3.5.24. Chỉ số ASAT, ALAT của chuột sau 45 ngày uống Malumix

TT	Chỉ tiêu xét nghiệm	Nhóm	N	Trước thí nghiệm	Sau thí nghiệm
1	ASAT huyết thanh (U/l)	Khảo sát	10	$215,00 \pm 60,83$	$204,80 \pm 23,14$
2	ALAT huyết thanh (U/l)	Khảo sát	10	$69,24 \pm 21,40$	$72,00 \pm 11,79$

Nhận xét. Phân tích phương sai hai yếu tố không lặp (MS-Excel) đối với dữ liệu ở các Bảng cho thấy các chỉ số huyết học và chỉ số men của các lô chuột trước và sau khi uống Malumix sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê.

Bảng 3.5.23: $\Rightarrow F = 2,876 < F_{0,05} = 10,128$,

Bảng 3.5.24: $\Rightarrow F = 0,329 < F_{0,05} = 161,45$

- **Tình trạng chung về thể trọng**

Cho chuột uống Malumix liều 0,45 g/kg/ngày và lô chứng uống nước cất 45 ngày. Chuột ăn uống tốt, không thấy triệu chứng bất thường trong những ngày thử nghiệm.

- **Quan sát đại thể gan, thận của chuột khi uống Malumix**

Bộ môn Giải phẫu bệnh trường Đ H Y Dược nhận xét: Tế bào gan, các khoảng cửa và tĩnh mạch trung tâm, vi cầu thận, ống thận, mô kẽ và mạch máu bình thường. Không thấy có sự khác biệt về gan, thận giữa các nhóm thử và chứng sau khi uống Malumix 45 ngày.

3.5.10. Kết quả độ ổn định của magaldrat và malumix

3.5.10.1. Độ ổn định của nguyên liệu Magaldrat

- **Bảo quản nguyên liệu Magaldrat ở điều kiện tự nhiên (30°C).**

Bảo quản Magaldrat trong lọ thủy tinh ở 28 -32°C, độ ẩm tương đối 72 - 85%, thời gian 48 tháng. Khảo sát chất lượng của nguyên liệu Magaldrat

Bảng 3.5.25. Chất lượng của Magaldrat bảo quản ở 30°C sau 48 tháng.

Chỉ tiêu thử	0 Tháng	08 tháng	16 Tháng	24 Tháng	32 tháng	48 Tháng
Hình thức	Màu trắng	Màu trắng	Màu trắng	Màu trắng	Màu trắng	Màu trắng
Mg(OH) ₂ (%)	51,07	50,65	51,08	51,02	50,87	51,02
Al(OH) ₃ (%)	33,95	33,58	33,84	34,50	33,95	33,84
SO ₄ ²⁻ (%)	16,50	16,85	16,67	17,34	17,02	17,24
Magaldrat (%)	92,72	92,83	92,55	93,02	93,32	93,02

Nhận xét:

Nguyên liệu Magaldrat sau khi bảo quản 48 tháng, ở điều kiện bình thường, sự thay đổi về chất lượng không có ý nghĩa thống kê (vẫn đạt tiêu chuẩn USP 24).

3.5.10.2. Độ ổn định của viên Malumix

- **Khảo sát viên Malumix bằng phương pháp phân tích nhiệt vi sai**

Bảo quản viên Malumix trong vỉ ép, nhiệt độ 60°C, độ ẩm từ 72-85%, trong 2 tháng. Khảo sát giản đồ phân tích nhiệt vi sai (DTG) của viên Malumix.

Nhận xét. Giản đồ DTG cho thấy khi tăng nhiệt từ 29,8 – 138,6°C chỉ có sự mất nước, khối lượng nước mất 6,67%, ít có biến đổi hoá học xảy ra trong hỗn hợp bột Malumix khi $t^{\circ} < 60^{\circ}\text{C}$. Tiếp tục tăng nhiệt đến 198,9°C, lượng nước mất thêm 4,67%. KNTHA của Malumix trước và sau khi gia nhiệt sự thay đổi không có ý nghĩa thống kê.

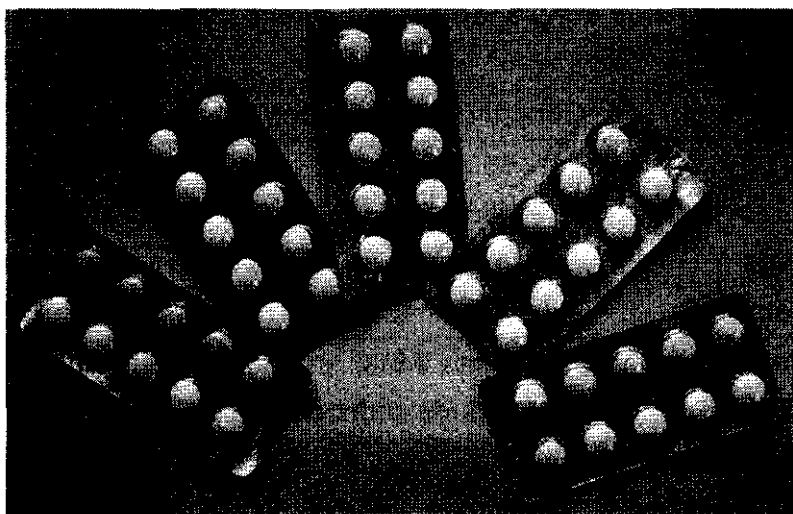
- **Khảo sát viên Malumix ở điều kiện tự nhiên (30°C).**

Bảo quản viên Malumix trong vỉ ép ở 28-32°C, độ ẩm tương đối 72-85%, thời gian 30 tháng. Khảo sát các đặc tính kỹ thuật của viên Malumix

Bảng 3.5.25. Các đặc tính kỹ thuật của viên Malumix 400 ở 30°C sau 30 tháng.

Thử nghiệm	Chỉ tiêu	0 Tháng	06 Tháng	12 Tháng	18 Tháng	24 tháng	30 Tháng
Hình thức	Viên trắng	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi	Không đổi
Khối lượng	702,0	703,5	702,4	701,4	700,0	703,2	705,2
Độ tan rã (giây)	<	57	65	78	76	87	85
KNTHA mEq/v %	100,00	100,00	99,65	99,25	98,82	98,32	98,02

Nhận xét: viên Malumix sau khi bảo quản 30 tháng, ở điều kiện bình thường chất lượng viên thay đổi vẫn trong giới hạn cho phép.



Hình 3.5.5: Viên nén Malumix

3.6.NGHIÊN CỨU BÀO CHẾ VIÊN NANG PTKD VỚI HOẠT CHẤT DICLOFENAC NATRI

3. 6.1. Điều chế và khảo sát đặc tính của vi hạt

Vi hạt được điều chế bằng phương pháp tạo hạt trực tiếp trên máy tạo hạt tầng sôi có đĩa quay.

Thành phần của vi hạt gồm:

Diclofenac natri

Hoạt chất

Avicel

Tá dược độn và làm tròn hạt

Nước cất vừa đủ

Tá dược dính

Điều chế: DFN và Avicel được trộn bằng máy trộn nhào trong thời gian 20 phút trước khi được đưa vào máy tạo hạt tầng sôi với đĩa quay có khắc rãnh. Trong giai đoạn tạo hạt, nước được dùng để làm ẩm hỗn hợp Avicel: DFN và được phun với tốc độ

ổn định cho đến khi thu được các hạt kết tụ. Các hạt sau đó được làm tròn và sấy sơ bộ ở nhiệt độ 40-50°C trong máy tạo hạt tầng sôi. Sản phẩm được chuyển qua tủ sấy và sấy ở nhiệt độ 50°C trong 4 giờ.

Qui trình gồm 3 giai đoạn: tạo hạt ướt, làm tròn hạt và sấy vi hạt.

Các yếu tố ảnh hưởng đến chất lượng và hiệu suất điều chế vi hạt được khảo sát gồm: tỉ lệ tá được làm tròn hạt so với được chất (Avicel: DFN), tỉ lệ và tốc độ phun nước.

3.6.1.1. Khảo sát ảnh hưởng của lượng Avicel đến cấu trúc bề mặt của vi hạt

Khả năng làm tròn vi hạt phụ thuộc vào tỉ lệ của Avicel có trong công thức. Ba công thức với lượng Avicel tăng dần đã được khảo sát, các lô khảo sát được điều chế trong cùng điều kiện thiết bị.

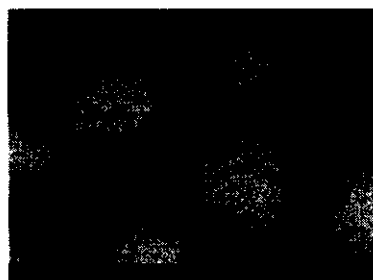
Bảng 3.6.1. Các công thức dùng khảo sát ảnh hưởng của lượng Avicel đến cấu trúc bề mặt vi hạt

Thành phần	Công thức 1A	Công thức 2A	Công thức 3A
Avicel (g)	450	540	600
DFN (g)	450	360	300
Nước cất (g)	1140	1140	1140
Tỉ lệ Avicel: DFN	1:1	1,5:1	2:1

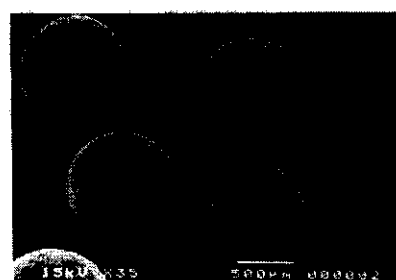
Hỗn hợp Avicel:DFN với tỉ lệ 2:1 (hình 3.6.3) tạo thành vi hạt có bề mặt rất nhẵn, rất thích hợp cho giai đoạn bao nên được chọn để nghiên cứu tiếp tục.



Hình 3.6.1. Vi hạt điều chế với hỗn hợp Avicel:DFN (1:1) (35X)



Hình 3.6.2. Vi hạt được điều chế từ hỗn hợp Avicel: DFN (1,5:1) (45X)



Hình 3.6.3. Vi hạt được điều chế từ hỗn hợp Avicel:DFN (2:1) (35X)

3.6.1.2. Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ nước đến hiệu suất điều chế vi hạt

Tỉ lệ nước có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất điều chế vi hạt, tỉ lệ nước thấp sẽ không tạo được vi hạt bề mặt nhẵn và các vi hạt tạo thành có kích thước nhỏ, tỉ lệ nước càng lớn sẽ tạo ra nhiều vi hạt lớn và phân bố kích thước hạt rộng. Năm công thức với tỉ lệ nước khác nhau đã được khảo sát. Mỗi công thức được thực hiện trên 6 lô (tổng cộng 30 lô). Hiệu suất của qui trình được đánh giá bằng tỉ lệ phần trăm vi hạt

có kích thước trong khoảng 16-20 mesh (840–1190 μm) thu được trên 6 lô.

Bảng 3.6.2. Các công thức dùng khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ nước đến hiệu suất điều chế vi hạt

Thành phần	Công thức 1B	Công thức 2B	Công thức 3B	Công thức 4B	Công thức 5B
DFN (g)	250	250	250	250	250
Avicel (g)	500	500	500	500	500
Nước cất (g)	800	850	900	950	1000

Bảng 3.6.3. Tỉ lệ (%) vi hạt 16-20 mesh từ các công thức có tỉ lệ nước khác nhau

Lô số	Công thức 1B	Công thức 2B	Công thức 3B	Công thức 4B	Công thức 5B
1	28,32	55,65	62,35	76,82	53,12
2	42,56	52,37	70,56	72,56	52,55
3	41,75	59,85	59,55	76,58	48,65
4	40,58	49,56	63,18	58,45	62,45
5	45,12	59,12	68,72	79,52	63,85
6	42,48	52,48	72,56	77,51	96,58
TB (%)	40,14	54,84	66,15	73,57	62,87

Kết quả thử nghiệm được so sánh bằng phân tích ANOVA.

Phân tích phương sai 2 yếu tố không lặp cho thấy hiệu suất thu được từ các công thức khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p = 0,005$). Hiệu suất của qui trình đạt cao nhất khi tỉ lệ các thành phần Avicel:DFN: nước có tỉ lệ 2:1:3,8.

Qua khảo sát trên, công thức điều chế cho 1 lô vi hạt được xác định như sau:

Diclofenac natri	300 g
Avicel	600 g
Nước cất	1140 g

3.6.1.3. Khảo sát ảnh hưởng của tốc độ phun nước đến hiệu suất tạo hạt

Năm công thức với tỉ lệ các thành phần giống nhau (Avicel 600 g; DFN 300 g; nước 1140 g) được khảo sát bằng cách thay đổi tốc độ phun nước, mỗi công thức được điều chế 6 lần (tổng cộng 30 lô thực nghiệm). Hiệu suất của qui trình điều chế được đánh giá bằng tỉ lệ phần trăm vi hạt trong khoảng 16-20 mesh.

Bảng 3.6.4. Tỷ lệ (%) vi hạt 16-20 mesh từ một công thức khi thay đổi tốc độ phun nước

STT	Tốc độ phun nước				
	15 g/phút	20 g/phút	25 g/phút	30 g/phút	35 g/phút.
1	15,22	48,51	52,64	75,26	62,35
2	24,56	50,48	59,86	69,89	52,47
3	21,12	38,56	62,58	80,12	64,15
4	19,95	45,25	59,58	72,58	50,79
5	22,15	42,78	45,26	67,18	59,72
6	14,23	45,26	57,15	71,36	60,82
TB (%)	19,54	45,14	56,18	72,73	58,38

Phân tích phương sai 2 yếu tố không lập cho thấy hiệu suất thu được từ các công thức khác nhau có ý nghĩa thống kê ($p = 0,005$).

Kết quả thực nghiệm và xử lý thống kê cho thấy tốc độ phun tá được định cho hiệu suất cao nhất là 30 g/phút.

Từ kết quả của khảo sát này, các thông số của qui trình điều chế vi hạt được thiết lập và trình bày trên bảng 3.6.5.

Bảng 3.6.5. Các thông số của qui trình điều chế vi hạt bằng máy tăng sôi

Thông số kỹ thuật	Giá trị điều chỉnh
Vận tốc đĩa quay trong giai đoạn tạo hạt	600 vòng/phút
Lưu lượng khí tạo tăng sôi	100-120 m ³ /giờ
Nhiệt độ khí vào	24-25°C
Nhiệt độ khí ra	20-24°C
Nhiệt độ trong buồng chứa hạt	17-20°C
Tốc độ phun nước	30 g/phút
Thời gian tạo hạt trung bình	40 phút
Vận tốc đĩa quay trong giai đoạn sấy sơ bộ	300 vòng/phút
Thời gian sấy sơ bộ	20 phút

3.6.1.4. Khảo sát các tính chất của vi hạt

Các vi hạt được khảo sát phân bố kích thước hạt, hàm ẩm, độ mài mòn, định lượng, khảo sát vi thể và xác định độ phóng thích dược chất trước khi thực hiện giai đoạn bao.

Hàm ẩm

Hàm ẩm của vi hạt được xác định bằng phương pháp sấy ở nhiệt độ 105°C trong thời

gian 4 giờ. Lượng mẫu cho mỗi lần thử khoảng 1g. Hàm ẩm trung bình của vi hạt chưa bao được xác định là 0,97% (n = 6).

Độ mài mòn

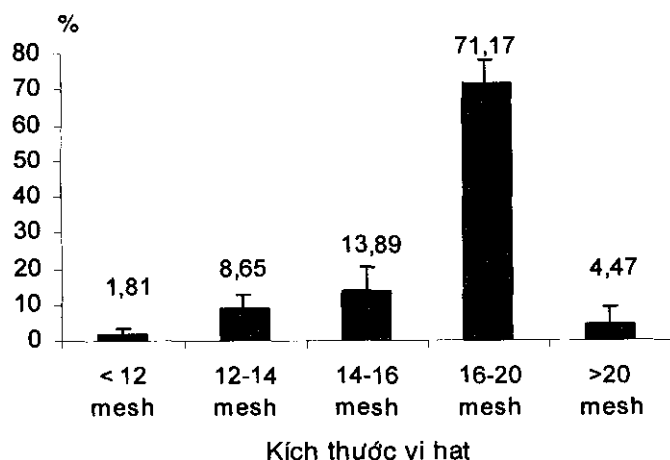
Độ mài mòn của vi hạt được xác định bằng tỉ lệ phần trăm giảm khối lượng của mẫu vi hạt sau khi thử. Kết quả: các vi hạt có độ bền khá cao, độ mài mòn phần trăm của vi hạt chưa bao là 0,15%.

Khảo sát phân bố kích thước vi hạt

Kết quả khảo sát phân bố kích thước vi hạt bằng phương pháp rây được trình bày trong bảng 3.6.6. Có khoảng 85% hạt nằm trong khoảng 14-20 mesh và tỉ lệ vi hạt cao nhất nằm trong khoảng 16-20 mesh (trung bình 71,17%)

Bảng 3.6.6. Phân bố kích thước vi hạt.

Lô số	Tỉ lệ phần trăm còn lại trên rây				
	< 12 mesh	12-14 mesh	14-16 mesh	16-20 mesh	>20 mesh
1A	3,76	6,24	12,71	77,30	0,00
2A	0,63	13,12	10,56	75,62	0,07
3A	0,00	13,13	17,74	68,08	1,06
4A	0,63	4,28	25,14	61,76	8,19
5A	2,70	6,21	7,23	73,35	10,51
6A	1,63	10,08	15,97	64,32	8,00
7A	2,62	13,29	12,70	70,39	1,00
8A	4,12	11,60	10,17	74,10	0,00
9A	1,51	10,05	10,08	76,80	1,56
10A	0,00	2,10	6,65	80,85	10,40
11A	0,00	6,63	11,55	71,07	10,76
12A	4,13	7,13	26,23	60,46	2,06
Trung bình	1,81	8,65	13,89	71,17	4,47
Độ lệch chuẩn	1,62	3,75	6,34	6,44	4,62



Biểu đồ 3.6.1. Phân bố kích thước hạt (tính theo tỉ lệ phần trăm)

Xác định hàm lượng hoạt chất

Hàm lượng DFN trong hạt được xác định bằng phương pháp đo phổ hấp thụ tử ngoại ở bước sóng 283 nm trong methanol.

Hàm lượng (mg) DFN có trong 300 mg vi hạt cho bởi công thức.

$$X = \frac{A_t}{A_c} \times \frac{300}{M} \times m \times C$$

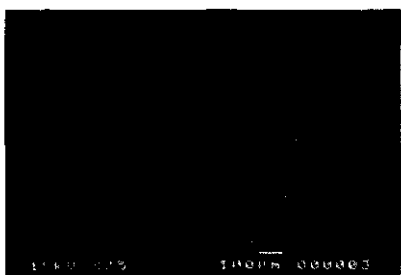
Ac: độ hấp thụ của mẫu chuẩn; At: độ hấp thụ của mẫu thử; M: lượng bột thuốc đã cân (mg); m: lượng chất chuẩn đã cân (mg); C: Hàm lượng % của chất chuẩn.

Kết quả định lượng cho thấy sự khác biệt về hàm lượng giữa các lô rất nhỏ. Hàm lượng cao nhất là 100,11 mg và thấp nhất là 98,38 mg (trung bình $99,40 \pm 0,63$ mg; n = 6).

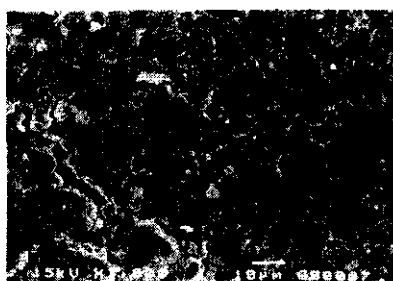
Khảo sát hình thể và cấu trúc vi hạt

Các hình chụp vi hạt qua kính hiển vi điện tử cắt lớp được dùng để phân tích hình thể và cấu trúc vi hạt. Kích thước và cấu trúc bề mặt của vi hạt được trình bày trên hình 3.6.4. Các vi hạt có dạng gần như hình cầu và bề mặt khá nhẵn (hình 3.6.4).

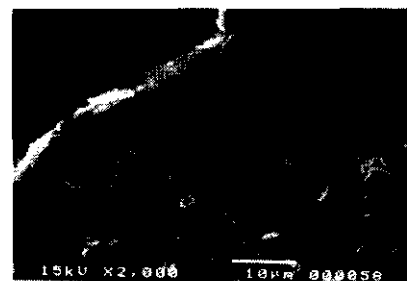
Ảnh chụp bề mặt và mặt cắt cho thấy các tiểu phân DFN và Avicel liên kết với nhau khá chặt chẽ, có thể có những lỗ xấp nhỏ với kích thước khoảng 2-3 μm .



Hình 3.6.4. Vi hạt diclofenac natri chưa bao (75X)



Hình 3.6.5. Bề mặt vi hạt diclofenac natri chưa bao (1000X)

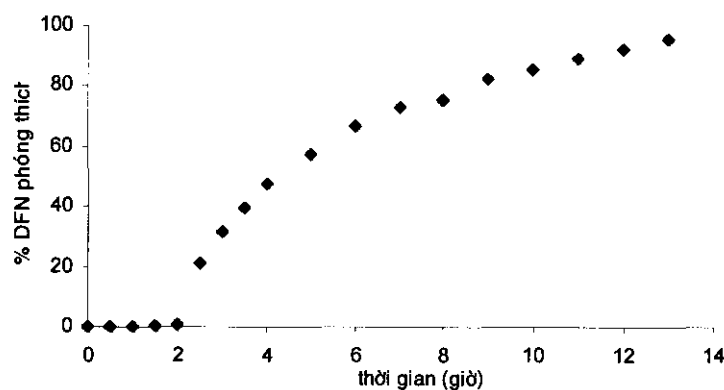


Hình 3.6.6. Mặt cắt của vi hạt diclofenac natri chưa bao (2000X)

Khảo sát độ phóng thích dược chất của vi hạt chưa bao

Kết quả thử nghiệm độ phóng thích dược chất cho thấy lượng DFN phóng thích trong 2 giờ đầu trong môi trường acid hầu như không đáng kể (khoảng 1%). Trong môi trường đệm pH 6,8, DFN được phóng thích khoảng 40% sau 1 giờ, và sau 6 giờ, lượng dược chất đã phóng thích được khoảng 70%; sau 12 giờ dược chất trong vi hạt đã phóng thích hơn 90%.

Như vậy bản thân các vi hạt chưa bao đã có khả năng phóng thích dược chất chậm. Sau khi thử độ phóng thích dược chất, vi hạt vẫn còn nguyên dạng hình cầu, ảnh chụp dưới kính hiển vi điện tử cắt lớp cho thấy có nhiều kênh khuếch tán xuất hiện trên bề mặt hạt, chứng tỏ vi hạt có cấu trúc là khung matrix.



Biểu đồ 3.6.2. Đường biểu diễn độ phóng thích của vi hạt chưa bao



Hình 3.6.7. Vi hạt trước khi thử độ phóng thích hoạt chất (80X)



Hình 3.6.8. Vi hạt sau khi thử độ phóng thích hoạt chất (80X)

3.6.2 . Bao vi hạt

Các vi hạt có kích thước 16-20 mesh được lựa chọn để bao phóng thích kéo dài. Vi hạt được thiết kế gồm 3 lớp bao sau:

Lớp 1: bao lót bằng HPMC

Lớp 2: bao phóng thích kéo dài bằng Eudragit không tan trong dịch tiêu hoá.

Lớp 3: bao bảo vệ (bao chống dính) bằng HPMC

Thiết bị. Thiết bị dùng trong giai đoạn bao là thiết bị bao tầng sôi, kiểu phun từ dưới lên và có buồng trong (kiểu Wurster).

3.6.2.1. Bao lót: Công thức dịch bao

HPMC	5%	PEG 6000	1,5%
Talc	5%	Titan dioxid	3,4%
Nhũ tương phá bọt	0,2%	Nước cất vừa đủ	100%

Các thông số của quá trình bao được trình bày trong bảng 3.6.7

Bảng 3.6.7. Các thông số kỹ thuật của qui trình bao vi hạt bằng HPMC

Thông số	Giá trị điều chỉnh
Lượng hạt cho mỗi lần bao	900 g
Nhiệt độ phòng	24-26°C
Độ ẩm tương đối	65 ± 5%
Nhiệt độ khí vào	60°C
Nhiệt độ buồng chứa sản phẩm	40-45°C
Nhiệt độ khí thoát	35-40°C
Áp suất buồng bao	2 bar
Lưu lượng dịch bao	13-15 g/phút

Các vi hạt được cho vào buồng bao và được sấy trong thời gian 10 phút cho đến khi nhiệt độ khối hạt đạt đến 40-45°C. Các vi hạt được phun dịch bao với tốc độ 13-15 g/phút cho đến khi hết khối lượng dịch bao dự kiến. Các vi hạt sau đó được sấy trong

buồng bao bằng cách tăng nhiệt độ 5°C cách mỗi 5 phút cho đến khi nhiệt độ khối vi hạt lên đến 50°C. Vi hạt được sấy trong tủ sấy ở nhiệt độ 50°C trong 4 giờ. Giai đoạn bao lót được thực hiện đến khi khối lượng hạt tăng 5%.

3.6.2.2. Bao phóng thích dược chất kéo dài

Nghiên cứu loại và tỉ lệ chất bao

Để kéo dài hơn nữa thời gian phóng thích dược chất, các vi hạt được bao với các Eudragit RS, Eudragit RL dùng riêng rẽ hoặc phối hợp với nhau.

Công thức dịch bao phóng thích kéo dài.

Eudragit	50 gam	PEG 6000	5 gam
Nước cất	10 gam	Aceton: isopropanol(35:52,2)	vđ 1000 gam

Các lô vi hạt được khảo sát với 3 tỉ lệ chất bao khác nhau là 1%, 3% và 5% (tính theo khối lượng chất rắn).

Bảng 3.6.8. Các thông số kỹ thuật của qui trình bao vi hạt bằng các Eudragit

Thông số	Giá trị điều chỉnh
Lượng hạt cho mỗi lần bao	950 gam
Nhiệt độ phòng	24-26°C
Độ ẩm tương đối	65 ± 5%
Nhiệt độ khí vào	50°C
Nhiệt độ buồng chứa sản phẩm	30-32°C
Nhiệt độ khí thoát	30°C
Áp suất buồng bao	1,5 bar
Lưu lượng dịch bao	13-15 g/phút
Thời gian bao	Khoảng 40 phút

3.6.2.3. Bao bảo vệ

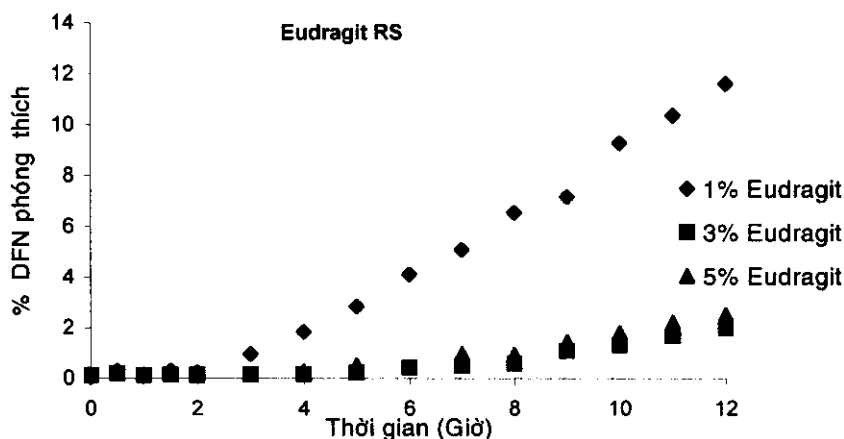
Các vi hạt sau khi được bao phóng thích kéo dài được bao bảo vệ với công thức tương tự công thức dịch bao lót, tỉ lệ lớp bao là 1% tính theo khối lượng vi hạt.

Các vi hạt đã bao sau đó được khảo sát độ phóng thích dược chất để xác định loại chất bao và lượng chất bao phù hợp nhất.

Nghiên cứu lựa chọn loại Eudragit và tỉ lệ Eudragit

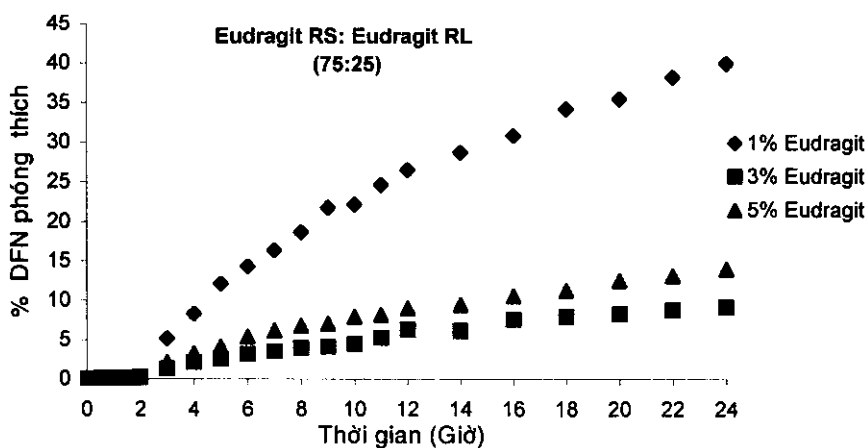
Vi hạt có kích thước trong khoảng 16-20 mesh đã được chọn để bao phóng thích kéo dài. Các chất bao được khảo sát là Eudragit RS, Eudragit RL hoặc hỗn hợp Eudragit RS: Eudragit RL với các tỉ lệ khác nhau là 75:25, 50:50, 25:75 (KL/KL). Tỉ lệ lớp bao (tính trên khối lượng chất rắn) được lựa chọn là 1%, 3% và 5% so với khối lượng vi hạt. Tất cả các dịch bao đều chứa 10% PEG 6000 (tính theo Eudragit). Tất cả các lô thử nghiệm đều được bao với cùng một qui trình và các thông số đã nêu ở

bảng 3.6.8. Kết quả thử nghiệm cho thấy Eudragit RS làm chậm độ phóng thích rất nhiều: với tỉ lệ lớp bao 1%, chỉ có 11,56% DFN được phóng thích sau 12 giờ; các tỉ lệ lớp bao 3% và 5% chỉ phóng thích 2,5% và 1,97% (biểu đồ 3.6.3).

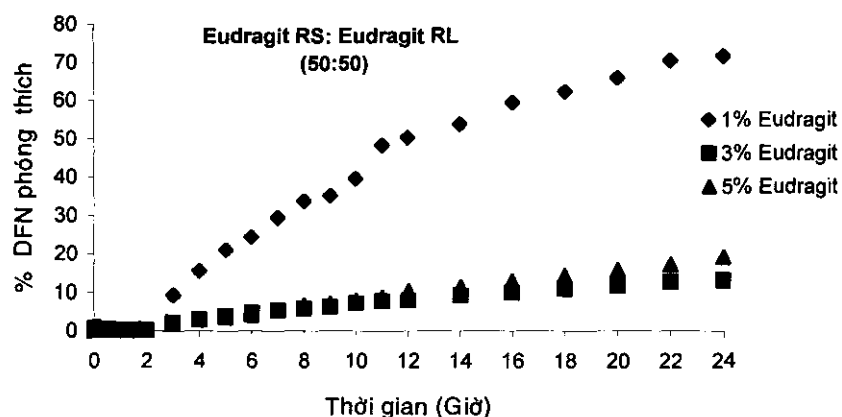


Biểu đồ 3.6.3. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao bằng Eudragit RS 100 với các tỉ lệ lớp bao 1%,3% và 5%

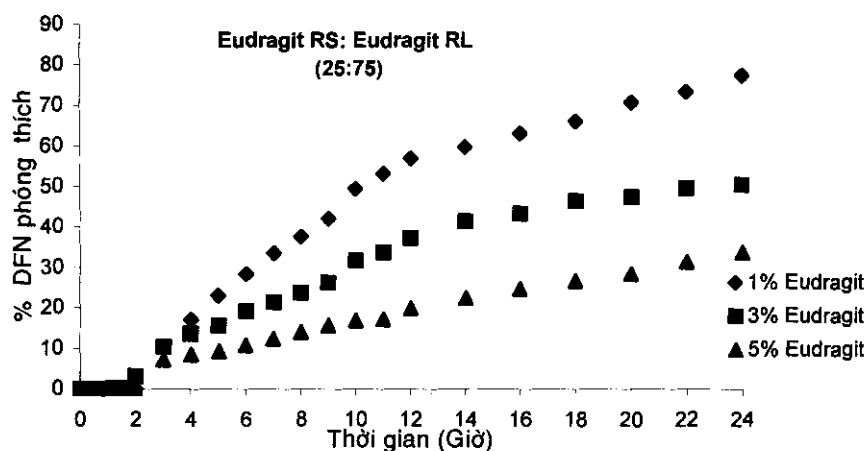
Các vi hạt có màng bao có thành phần là hỗn hợp Eudragit RS: Eudragit RL có độ phóng thích được chất theo thời gian nhanh hơn so với màng bao chỉ chứa Eudragit RS. Lượng được chất phóng thích tại mỗi thời điểm tăng nhanh khi tăng tỉ lệ Eudragit RL trong hỗn hợp. Với tỉ lệ lớp bao 1%, các vi hạt được bao bằng hỗn hợp Eudragit RS: Eudragit RL với tỉ lệ 50:50 và 25:75 đều có thể phóng thích hơn 70% DFN sau 24 giờ (xem biểu đồ 3.6.5, biểu đồ 3.6.6).



Biểu đồ 3.6.4. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao bằng hỗn hợp Eudragit RS:RL (75:25) với các tỉ lệ lớp bao 1%, 3% và 5%



Biểu đồ 3.6.5. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao bằng hỗn hợp Eudragit RS:RL (50:50) với các tỉ lệ lớp bao 1%, 3% và 5%



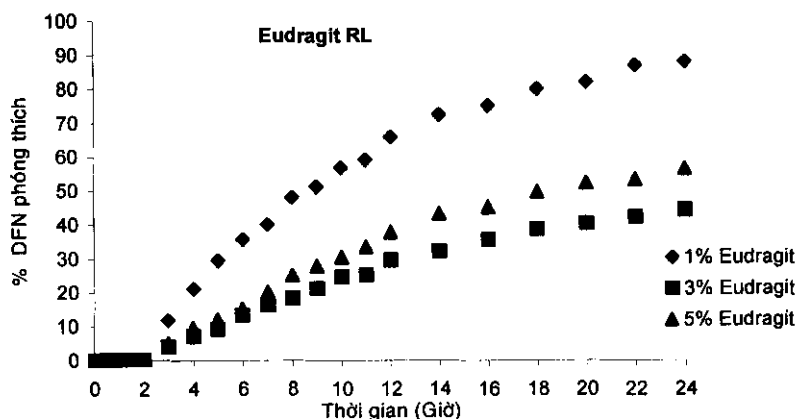
Biểu đồ 3.6.6. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao bằng hỗn hợp Eudragit RS:RL (25:75) với các tỉ lệ lớp bao 1%, 3% và 5%

Các hạt được bao với dịch bao chứa Eudragit RL có thể phóng thích được 87,62% sau 24 giờ. Độ độ phóng thích dược chất của mẫu này gần giống viên Voltaren® 100 mg nên được dùng để nghiên cứu tiếp tục.

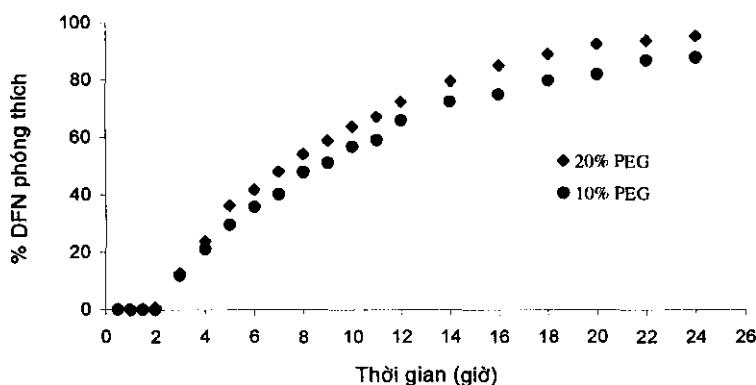
Chất hoá dẻo được dùng là PEG 6000, được khảo sát ở 2 tỉ lệ khác nhau là 10% và 20% so với lượng Eudragit RL. Các thông số của qui trình bao được cố định như đã nêu trong bảng 3.6.8. Đường biểu diễn độ phóng thích dược chất của 2 lô vi hạt được bao với Eudragit RL có tỉ lệ PEG 10% và 20% được trình bày trong biểu đồ 3.6.8.

Vi hạt được bao với màng bao có tỉ lệ chất hoá dẻo là 20% có thể phóng thích đến 95% dược chất sau 24 giờ, so với vi hạt được bao với màng bao có tỉ lệ chất hoá dẻo là 10% chỉ phóng thích được 87,62% tại cùng thời điểm (biểu đồ 3.6.3). Công thức màng bao với 20% PEG được lựa chọn để điều chế vi hạt phóng thích kéo dài dùng

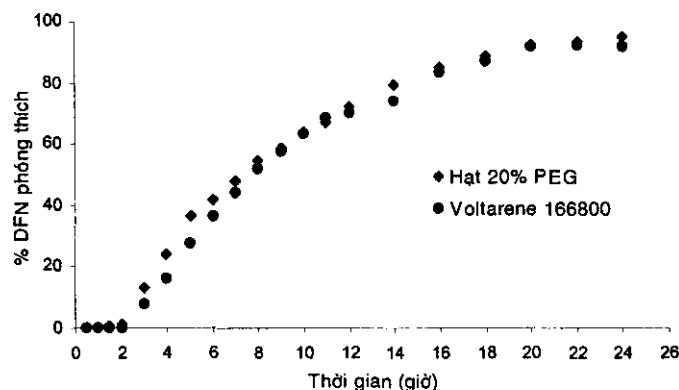
cho viên nang có hàm lượng 100 mg. Khi so sánh với viên Voltaren® 100 mg, độ phóng thích được chất của vi hạt tương đương với viên Voltaren® 100 mg (biểu đồ 3.6.9).



Biểu đồ 3.6.7. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao bằng Eudragit RL với các tỉ lệ lớp bao 1%, 3% và 5%

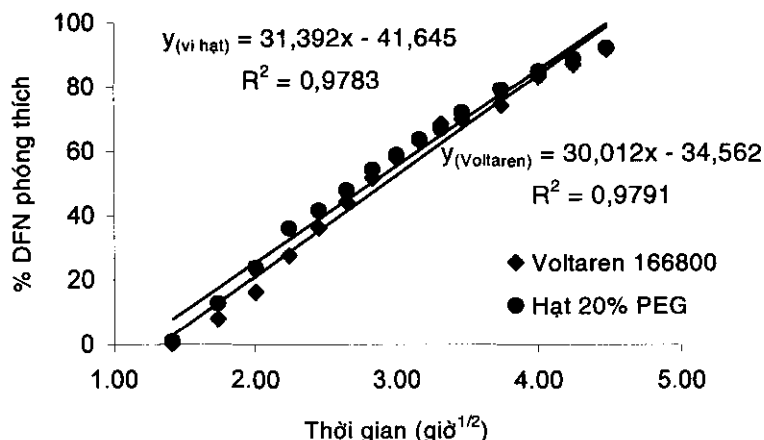


Biểu đồ 3.6.8. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt được bao với Eudragit RL có 20% chất hoá dẻo so với 10% chất hoá dẻo



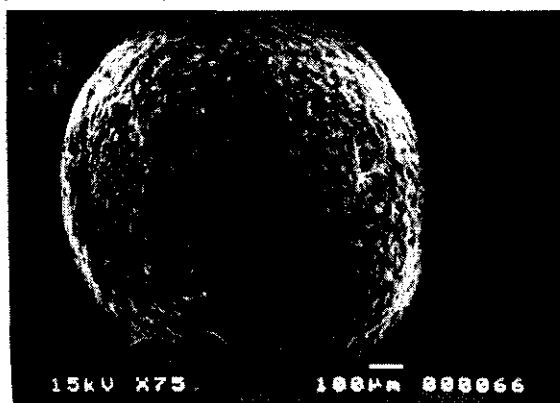
Biểu đồ 3.6.9. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ vi hạt có lớp màng bao chứa 20% PEG 6000 so với Voltaren® 100 mg (lô số 166800)

Tương tự viên Voltaren® 100 mg, động học phóng thích dược chất của vi hạt cũng tuân theo mô hình Higuchi. Tỷ lệ phần trăm dược chất phóng thích tại mỗi thời điểm có thể dự đoán được theo phương trình $Q=31,392\sqrt{t}-41,65$, đặc trưng cho sự phóng thích dược chất do khuếch tán qua màng hoặc qua khung.

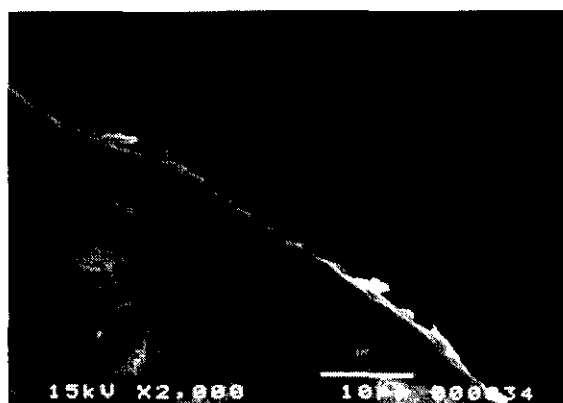


Biểu đồ 3.6.10. Phần trăm DFN phóng thích theo mô hình Higuchi từ vi hạt có lớp màng bao chứa 20% PEG 6000 so với Voltaren® 100 mg

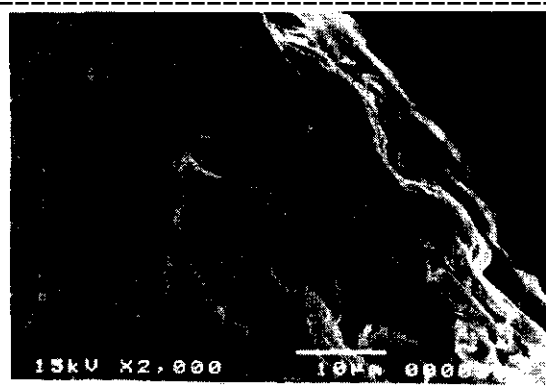
Hình chụp dưới kính hiển vi điện tử cắt lớp cho thấy lớp bao phân bố khá đồng đều trên bề mặt hạt, bề dày lớp bao khoảng 6-8 μm , cấu trúc đậm đặc, không chứa các lỗ xốp (hình 3.6.10). Sau khi thử độ phóng thích dược chất trong môi trường HCl 0,1N, màng bao bắt đầu trương nở (hình 3.6.11) nhưng lượng dược chất phóng thích chỉ đạt tối đa khoảng 1%. Sau khi thử trong môi trường đệm phosphate pH 6,8 vi hạt biến dạng do lớp bao trương nở nhiều, ảnh chụp mặt cắt lớp bao cho thấy có nhiều kênh khuếch tán có kích thước khá đồng nhất, đường kính trung bình khoảng 10 μm (hình 3.6.12).



Hình 3.6.9. Vi hạt được bao bằng Eudragit RL (75X)



Hình 3.6.10. Màng bao trước khi thử độ phóng thích hoạt chất (2000X)

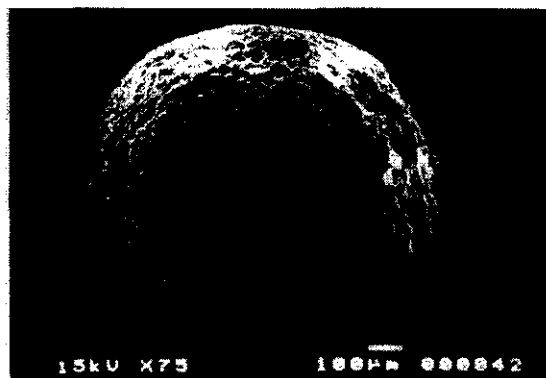


Hình 3.6.11. Màng bao sau khi thử độ phóng thích trong môi trường acid (2000X)

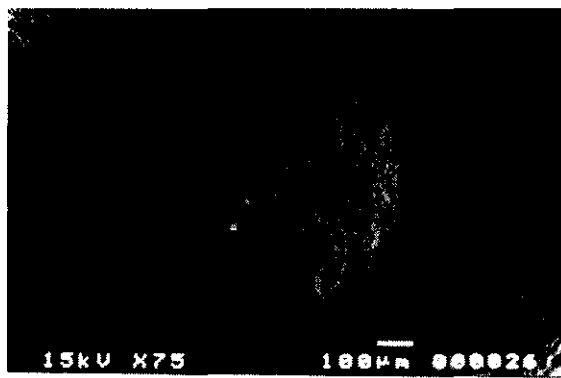


Hình 3.6.12. Màng bao sau khi thử trong môi trường đệm phosphat pH 6,8; các kênh khuếch tán hình thành rất rõ trên lớp bao (2000X)

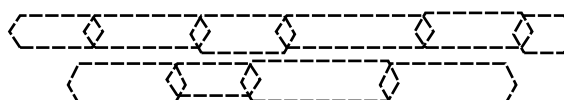
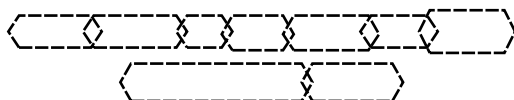
So với vi hạt được bao bằng dịch bao chỉ chứa 10% chất hoá dẻo, các vi hạt được bao bằng dịch bao có chứa 20% chất hoá dẻo trương nở rất nhiều, nên được chất được phóng thích nhanh hơn (hình 3.6.14 và 3.6.15). Quan sát bề mặt hạt sau khi thử độ phóng thích được chất thấy có xuất hiện rất nhiều lỗ khuếch tán (hình 3.6.16).

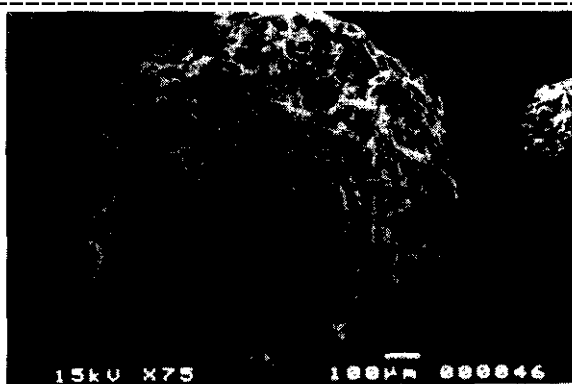


Hình 3.6.13. Vi hạt sau khi thử độ phóng thích được chất trong HCl 0,1 N (75X)

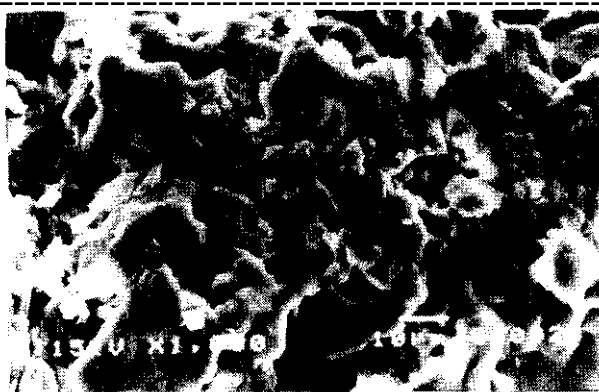


Hình 3.6.14. Vi hạt đã bao Eudragit RL với 10% PEG sau khi thử trong môi trường đệm phosphat pH 6,8 (75X)





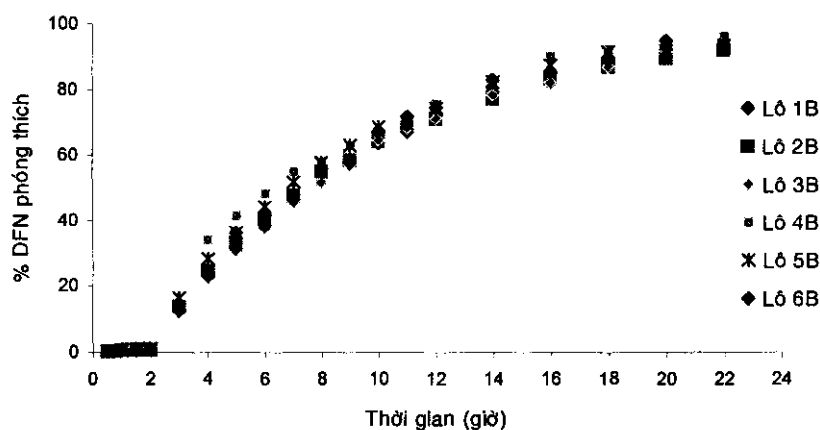
Hình 3.6.15. Vi hạt đã bao Eudragit RL với 20% PEG sau khi thử trong môi trường đệm phosphate pH 6,8 (75X)



Hình 3.6.16. Bề mặt vi hạt đã bao sau khi phóng thích được chất (1000X)

3.6.2.4. Khảo sát độ ổn định của qui trình bao vi hạt

Sáu lô vi hạt (cỡ lô 3500 viên) đã được bao trong cùng điều kiện giống nhau như đã xác định. Hàm lượng và độ phóng thích DFN của các lô đều tương đương nhau, cho thấy qui trình điều chế có tính ổn định cao.



Biểu đồ 3.6.11. Đường biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích từ 6 lô vi hạt

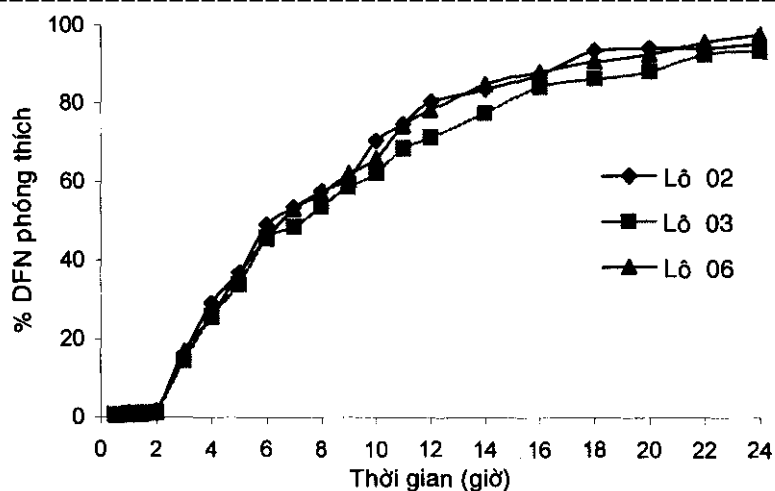
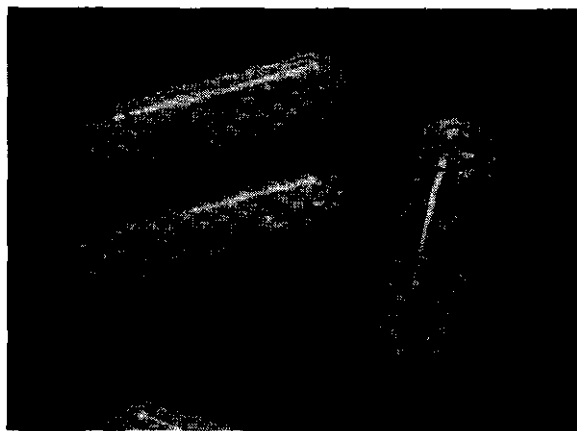
3.6.3. Điều chế viên nang DFN 100 mg phóng thích kéo dài

Các vi hạt được bao với Eudragit RL với tỉ lệ chất bao 1% được chọn để đóng vào nang số 1, hàm lượng trung bình của DFN trong mỗi nang là 100 mg.

Bảng 3.6.9. Khối lượng trung bình và hàm lượng của các lô viên nang

Lô	Khối lượng trung bình (mg) (n= 20)	Khối lượng nang nhỏ nhất (mg)	Khối lượng nang lớn nhất (mg)	Hàm lượng trung bình (%) (n = 3)
01	394,0	378,4	409,0	101,32
02	400,6	391,8	410,1	102,75
03	407,1	395,2	421,6	102,98
04	393,3	370,6	409,6	100,88
05	395,7	381,5	404,0	100,56
06	404,6	393,7	428,2	101,29

Tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích theo thời gian của 3 lô (chọn ngẫu nhiên) được trình bày trong biểu đồ 3.6.12. Tương tự như các vi hạt ban đầu, các lô viên nang có độ phóng thích khá đồng nhất.

**Biểu đồ 3.6.12.** Đường biểu diễn phần trăm DFN phóng thích từ viên Difenac-KD**Hình 3.6.17.** Viên nang Diclofenac 100 mg tác dụng kéo dài (viên DIFENAC – KD)

3.6.4. Thử nghiệm độc tính cấp

Thú thử nghiệm. Chuột nhắt trắng cân nặng 18-22 g, chủng ddY do viện Pasteur TP.HCM cung cấp.

Mẫu thử nghiệm. Nghiền vi hạt thành bột mịn, dùng bột thu được điều chế hỗn dịch có hàm lượng chất rắn 7%, hỗn dịch không chứa chất gây thối hoặc chất phụ gia nào khác.

Đường cho thuốc. Đường uống, chuột được cho nhịn đói 12 giờ trước khi cho uống thuốc. Sau khi thực hiện thử nghiệm thăm dò, 100 chuột nhắt trắng đã được cho uống thuốc với liều tăng dần, phân suất tử vong (%) được trình bày trong bảng 3.6.10.

Bảng 3.6.10. Cỡ liều và tỉ lệ phần trăm chuột chết trong thử nghiệm độc tính cấp

Liều thử nghiệm (mg/kg)	Số thú trong lô (con)	Tỉ lệ chuột chết (%) ghi nhận được 48 giờ sau khi dùng thuốc
9	10	0
27	20	20
81	20	30
213	20	60
426	10	100

Kết quả LD₅₀ được tính toán theo phương pháp Karber và Behrens.

$$LD_{50} = Df - \frac{\sum ab}{n}$$

Df: Liều tối thiểu làm chết tất cả thú vật; a: Chỉ số thú vật chết ở 2 liều kế tiếp; b: hiệu số giữa 2 liều kế tiếp; n: số thú vật dùng ở mỗi liều hoặc số trung bình của những trị số trên (trường hợp số thú vật thay đổi ở mỗi liều)

Bảng 3.6.11. Phân suất tử vong trong thử nghiệm độc tính cấp

Liều (mg/kg)	9	27	81	213	426
Số thú vật /lô (con)	10	20	20	20	10
Số thú vật chết/ lô (con)	0	4	6	12	10
Phân suất tử vong %	0	20	30	60	100

Bảng 3.6.12. Số liệu chi tiết dùng tính toán LD₅₀

A	2	5	9	11
B	18	54	132	213
Ab	36	270	1188	2343

$$\sum ab = 3837 \quad n = \frac{80}{5} = 16$$

$$LD50 = 426 - \frac{3837}{16} = 186,2 \text{ mg/kg}$$

Với LD50 = 186,2 mg/kg, có thể kết luận các tá dược dùng trong công thức điều chế vi hạt không làm tăng độc tính của DFN. Thử nghiệm cho thấy vi hạt DFN có độc tính thấp, nên thuốc có thể được thử nghiệm trên người để đánh giá tương đương sinh học.

3.6.5. Nghiên cứu tương đương sinh học so với thuốc đối chiếu Voltaren

3.6.5.1. Người tình nguyện và thuốc thử nghiệm

Mười bốn NTN khoẻ mạnh, phái nam đã tham gia vào nghiên cứu. Các NTN đều được kiểm tra chiều cao, cân nặng, điện tâm đồ, nhịp tim, và xác định các thông số sinh học (ure huyết, creatinin, đường huyết, AST, ALT). Tất cả các NTN đều không được dùng bất kỳ loại thuốc nào trước đó 2 tuần và trong thời gian tham gia thử nghiệm. Không có NTN nào có tiền sử quá mẫn với diclofenac hoặc các thuốc kháng viêm không steroid khác.

NTN có độ tuổi trung bình $27,36 \pm 8,31$ năm, cân nặng trung bình $55,47 \pm 6,24$ kg và chiều cao trung bình $165,36 \pm 5,93$ cm; các thông số chức năng gan thận của NTN đều bình thường. Ngoài ra, nhịp tim và điện tâm đồ của NTN đều không có những dấu hiệu bất thường.

NTN đã được phổ biến về mục tiêu nghiên cứu, cách cho thuốc, thời gian lấy mẫu máu, lượng mẫu máu mỗi lần lấy và các tác dụng phụ có thể xảy ra khi tham gia thử nghiệm.

Thử nghiệm được tiến hành theo các điều khoản đã ghi trong tuyên bố Helsinki về thử nghiệm thuốc trên người.

NTN đã đọc và ký vào bản "Phiếu tình nguyện tham gia thử nghiệm tương đương sinh học" trước khi tham gia thử nghiệm.

Thuốc thử nghiệm: Viên Difenac-KD, lô số 02, sản xuất ngày 15/01/2001.

Thuốc đối chiếu: Voltaren® 100 mg (lô số 166800, Novartis), hạn dùng: 02/2003.

Độ phóng thích dược chất của 2 thuốc đã được khảo sát và xác định là tương đương nhau. Hàm lượng trung bình của viên Voltaren® 100 mg là 101,3 mg/viên và của viên Difenac-KD là 100,9 mg/viên.

3.6.5.2.. Mô hình nghiên cứu

Thử nghiệm được tiến hành theo mô hình nghiên cứu liều đơn, ngẫu nhiên, chéo đôi (mỗi nhóm 7 NTN); thời gian nghỉ giữa 2 lần dùng thuốc là 7 ngày.

Nơi nghiên cứu. Bệnh viện Trưng Vương (tổ chức lấy máu) và Phân viện Kiểm Nghiệm TP.HCM (phân tích mẫu).

Dùng thuốc

NTN phải nhịn đói qua đêm trong thời gian ít nhất 10 giờ và sau khi uống thuốc thử nghiệm ít nhất 2 giờ. Vào ngày nghiên cứu, mỗi NTN uống một viên Difenac-KD (nhóm I) hoặc một viên Voltaren® 100 mg (nhóm II) với 200 ml nước vào lúc 7 giờ 30 sáng. NTN không được dùng các thực phẩm hoặc nước uống có chứa cafein hoặc cồn trong thời gian 24 giờ trước thử nghiệm cho đến khi lấy xong mẫu máu cuối cùng.

Bữa ăn điểm tâm được phục vụ sau khi lấy mẫu máu 2 giờ, các bữa ăn chính sau khi lấy mẫu máu 6 giờ và 12 giờ.

NTN lưu lại tại bệnh viện cho đến khi lấy xong mẫu máu 12 giờ để đảm bảo đúng thời gian lấy máu và để bác sĩ theo dõi thể trạng và chăm sóc sức khỏe; NTN trở lại bệnh viện để lấy mẫu máu 24 giờ vào sáng hôm sau.

3.6.5..3. Phân tích nồng độ diclofenac trong huyết tương

Thu thập mẫu máu

Các mẫu máu được lấy từ tĩnh mạch tay, mỗi lần lấy 5 ml máu. Thời điểm lấy máu là ngay trước khi uống thuốc (0 giờ) và 1, 2, 3, 4, 5, 5.5, 6, 8, 10, 12, 24 giờ sau khi uống thuốc. Các mẫu máu được cho vào ống nghiệm chứa heparin–lithium và được ly tâm ở tốc độ 3000 vòng/phút trong thời gian 10 phút để tách huyết tương và được bảo quản ở nhiệt độ –20°C cho đến khi được phân tích.

Điều chế mẫu thử nghiệm

Cho vào ống ly tâm 500 µl huyết tương, thêm vào 2 ml acetonitril. Lắc bằng vortex trong 3 phút và ly tâm 5000 vòng/phút trong 5 phút. Thu lấy dịch trong cho vào ống nghiệm và bốc hơi đến cạn. Hoà cần trong 500 µl pha động và chuyển hỗn hợp sang 1 ống eppendorf. Hỗn hợp được lắc bằng máy vortex trong 5 phút và ly tâm 10.000 vòng/phút trong 5 phút. Thu lấy dịch sau khi ly tâm và lọc qua màng lọc 0,22 µm trước khi bơm vào máy sắc ký.

Xác định nồng độ DFN trong huyết tương

Nồng độ DFN trong huyết tương được xác định bằng phương pháp SKLHNC.

Điều kiện sắc ký

Cột: C18 pha đảo, đường kính 4,6 mm, dài 250 mm (Inertsil ODS-3-GL Sciences Inc. Japan), mã số: 1B186014

Pha động: Methanol: đệm phosphat pH 2,5 (75:25)

Tốc độ dòng: 1,3 ml/phút

Lượng bơm mẫu: 20 μ l

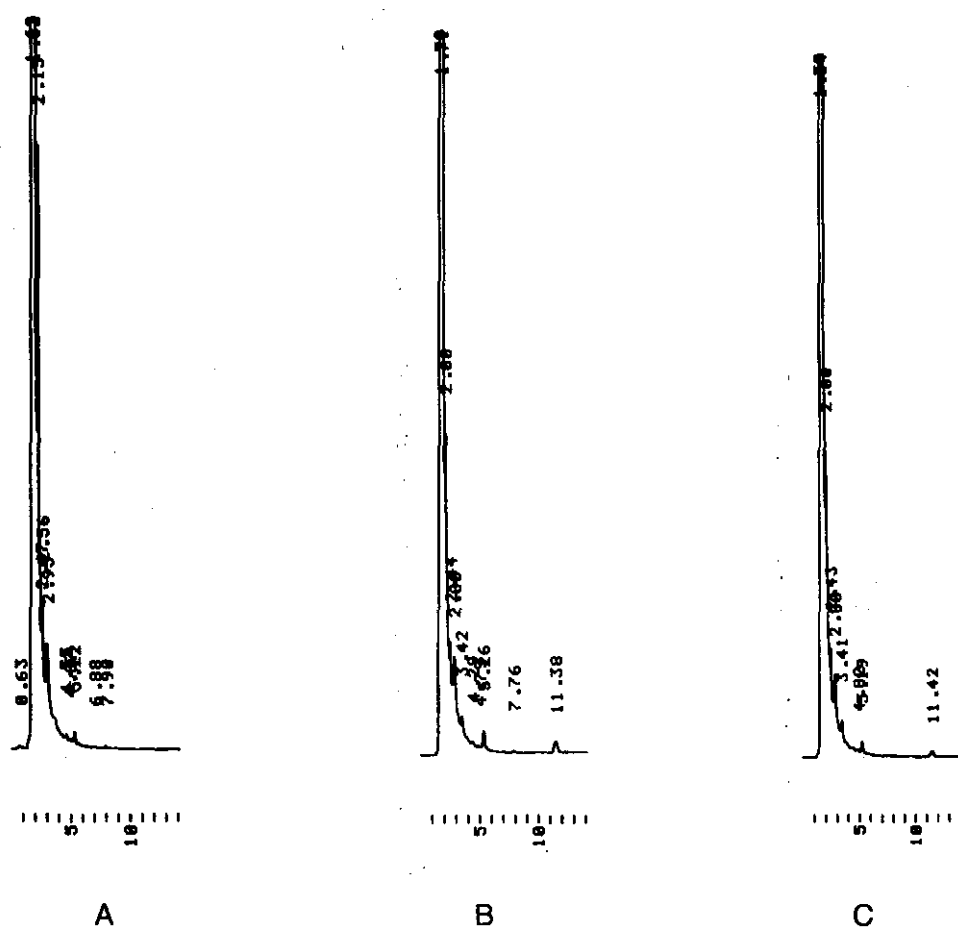
Detector: UV

Bước sóng phát hiện: 282 nm

Nhiệt độ phân tích: Nhiệt độ phòng

Thẩm định qui trình phân tích.

Qui trình phân tích nồng độ DFN trong huyết tương đã được thẩm định về các chỉ tiêu: Tính đặc hiệu, độ chính xác trong ngày, độ chính xác liên ngày, độ đúng, giới hạn định lượng, tỉ lệ phục hồi của phương pháp chiết cũng đã được xác định. Kết quả phân tích cho thấy phương pháp định lượng phù hợp với những qui định của FDA và Châu Âu trong phân tích nồng độ thuốc trong dịch sinh học.



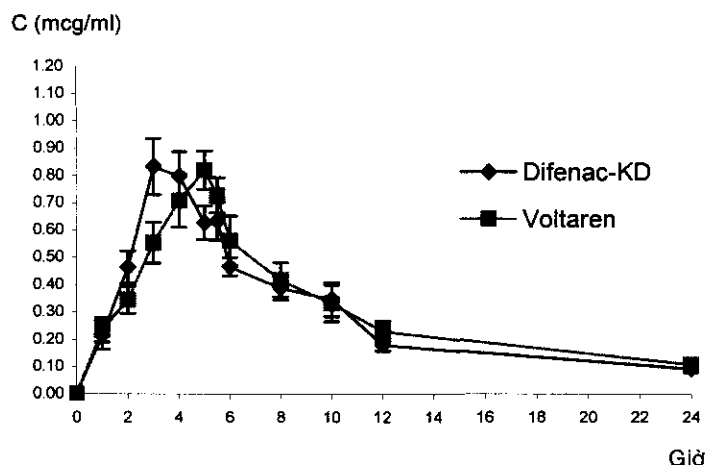
Hình 3.6.18. Sắc ký đồ DFN trong huyết tương

- A. Mẫu huyết tương trắng (mẫu trắng); B. Mẫu huyết tương có nồng độ 1 μ g/ml điều chế bằng cách pha DFN vào huyết tương trắng (mẫu chuẩn-thời gian lưu của DFN là 11,38 phút); C. Mẫu huyết tương của NTN uống chế phẩm chứa DFN (mẫu thử nghiệm-thời gian lưu của DFN là 11,42 phút)

3.6.5.4. Kết quả phân tích nồng độ DFN trong huyết tương và đánh giá TĐSH

Kết quả phân tích nồng độ diclofenac trong huyết tương NTN

Biểu đồ 3.6.13 trình bày đường biểu diễn nồng độ Diclofenac trung bình trong huyết thu được ở 14 NTN sau khi uống viên Voltaren® 100 mg và viên Difenac-KD.



Biểu đồ 3.6.13. Đường biểu diễn nồng độ DFN (TB ± SEM) trong huyết tương 14 NTN sau khi uống Voltaren® 100 mg và Difenac-KD

Ở thời điểm 24 giờ sau khi uống viên Difenac-KD nồng độ DFN trong huyết tương còn duy trì ở mức $0,092 \pm 0,041 \mu\text{g/ml}$ và nồng độ DFN trong huyết tương NTN uống viên Voltaren® 100 mg còn lại $0,107 \pm 0,045 \mu\text{g/ml}$ (biểu đồ 3.6.13). Như vậy cả 2 chế phẩm đều thể hiện tính chất hấp thu kéo dài *in vivo*.

Khảo sát các thông số sinh khả dụng

Các kết quả tính toán $AUC_{0-\infty}$, $C_{\max}$ và $T_{\max}$ trung bình được trình bày trong bảng 3.6.13.

Nồng độ DFN cực đại trong huyết tương NTN trong khoảng $0,572-1,265 \mu\text{g/ml}$ ($0,960 \pm 0,201 \mu\text{g/ml}$) khi uống viên nang Difenac-KD và $0,630-1,155 \mu\text{g/ml}$ ($0,964 \pm 0,166 \mu\text{g/ml}$) khi uống viên Voltaren®100 mg. Thời gian đạt nồng độ tối đa dao động trong khoảng 3-8 giờ ($3,64 \pm 1,34$ giờ) đối với viên nang Difenac-KD và 3-6 giờ ($4,75 \pm 0,91$ giờ) đối với viên Voltaren®100 mg. Thời gian đạt nồng độ tối đa ở NTN số 7 lên đến 8 giờ sau khi dùng viên nang Difenac-KD mặc dù các thông số sinh học của đối tượng này không thể hiện các dấu hiệu bất thường. Các số liệu trung bình cho thấy độ hấp thu DFN từ viên nang Difenac-KD nhanh hơn so với viên Voltaren® 100 mg.

Diện tích dưới đường cong nồng độ-thời gian từ 0-24 giờ của viên Difenac-KD đạt $6,953 \pm 1,045 \mu\text{g.giờ/ml}$ và của viên Voltaren® đạt $7,212 \pm 1,433 \mu\text{g.giờ/ml}$. Giá trị trung bình $AUC_{0-\infty}$ của viên nang Difenac-KD thấp hơn $AUC_{0-\infty}$ của Voltaren® 100 mg ($7,218 \pm 1,163 \mu\text{g.giờ/ml}$ so với $7,508 \pm 1,525 \mu\text{g.giờ/ml}$) tuy nhiên mức độ hấp thu

giữa các cá thể ít dao động hơn so với Voltaren® 100 mg.

Kết quả so sánh diện tích dưới đường cong ($AUC_{0-\infty}$) của 2 thuốc cho thấy SKD tương đối của viên Difenac-KD so với Voltaren® 100 mg đạt 96,13%.

Bảng 3.6.13. Các thông số dược động học của DFN sau khi uống viên Difenac-KD và Voltaren® 100 mg

NTN	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$)		$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g.giờ/ml}$)		T_{max} (giờ)	
	Voltaren	Difenac-KD	Voltaren	Difenac-KD	Voltaren	Difenac-KD
1	0,889	0,99	7,37	6,90	5	3
2	0,661	0,879	5,48	7,69	3	3
3	0,630	0,738	6,79	7,36	5,5	3
4	0,868	0,866	7,66	7,99	5,5	3
5	1,126	0,824	12,06	8,94	5	3
6	1,073	0,877	7,05	5,92	3	4
7	1,155	0,572	7,86	6,60	4	8
8	1,104	1,203	8,99	5,55	6	3
9	1,131	1,160	7,03	8,08	4	4
10	0,856	0,851	6,37	6,74	5,5	4
11	1,012	1,231	7,14	6,85	5	3
12	1,020	1,025	7,42	6,95	5	3
13	0,984	0,956	6,93	8,08	5	3
14	0,982	1,265	6,93	7,41	5	4
TB	0,964	0,960	7,51	7,22	4,75	3,64
SD	0,166	0,201	1,53	1,16	0,91	1,34

Phân tích thống kê và đánh giá tương đương sinh học

Các thông số $AUC_{0-\infty}$, C_{max} , T_{max} đã được phân tích bằng phương pháp thống kê ANOVA. Tương đương sinh học đã được xác định bằng phương pháp “two one-sided t test”.

Tương đương sinh học giữa 2 thuốc được xác định bằng khoảng tin cậy 90% của các số liệu trung bình $AUC_{0-\infty}$, C_{max} và T_{max} . Các số liệu dùng trong phân tích được trình bày trong bảng 3.6.14.

Bảng 3.6.14. Các thông số dùng phân tích khoảng tin cậy 90% các số liệu trung bình $AUC_{0-\infty}$, C_{max} và T_{max} của DFN giữa viên nang Difenac-KD và Voltaren®

Số liệu tính toán	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g.giờ/ml}$) (n=14)	C_{max} ($\mu\text{g/ml}$) (n=14)	T_{max} (giờ) (n=14)
μ_T	7,22	0,960	3,64
μ_C	7,51	0,964	4,75
$ \mu_T - \mu_C $	0,29	0,004	1,11
Độ tự do	13	13	13
$T_{0,95}$	1,77	1,77	1,77
Căn bậc hai của biên phương sai số trung bình	1,11	0,161	1,31

So sánh $AUC_{0-\infty}$

Khoảng tin cậy 90% của $AUC_{0-\infty}$: $0,29 \pm 1,77 \times 1,11 \times \sqrt{\frac{2}{14}} = 0,29 \pm 0,74$

$Ci_1 = -0,45$ (khoảng tin cậy của giới hạn dưới)

$Ci_2 = 1,03$ (khoảng tin cậy của giới hạn trên)

Giới hạn dưới: $7,22 - 0,45 = 6,77 \mu\text{g.giờ/ml}$

Vì $AUC_{0-\infty}$ thu được từ NTN uống Voltaren® 100 mg là $7,51 \mu\text{g.giờ/ml}$, nên giới hạn dưới của $AUC_{0-\infty}$ ở NTN uống Difenac-KD tương đương với 90,15% của $AUC_{0-\infty}$ ở NTN uống Voltaren® 100 mg.

Giới hạn trên: $7,22 + 1,03 = 8,25 \mu\text{g.giờ/ml}$; tương đương với 109,85% của $AUC_{0-\infty}$ thu được từ NTN uống Voltaren® 100 mg.

So sánh C_{max}

Khoảng tin cậy 90% của C_{max} : $0,004 \pm 1,77 \times 0,161 \times \sqrt{\frac{2}{14}} = 0,004 \pm 0,107$

$Ci_1 = -0,103$; $Ci_2 = 0,111$

Giới hạn dưới: $0,960 - 0,103 = 0,857 \mu\text{g/ml}$; tương đương với 88,90% của C_{max} thu được từ NTN uống Voltaren® 100 mg.

Giới hạn trên: $0,960 + 0,111 = 1,071 \mu\text{g/ml}$; tương đương với 111,09% của C_{max} thu được từ NTN uống Voltaren® 100 mg.

So sánh T_{max}

Khoảng tin cậy 90% của T_{max} : $1,11 \pm 1,77 \times 1,31 \times \sqrt{\frac{2}{14}} = 1,11 \pm 0,88$

$$Ci_1 = 0,23 \text{ và } Ci_2 = 1,99$$

Giới hạn dưới: $3,64 + 0,23 = 3,87$ giờ; tương đương với 81,47% của $T_{\max}$ thu được ở NTN uống Voltaren® 100 mg.

Giới hạn trên: $3,64 + 1,99 = 5,63$ giờ; tương đương với 118,52% của $T_{\max}$ thu được ở NTN uống Voltaren® 100 mg.

Kết luận Cả 3 thông số $AUC_{0-\infty}$, $C_{\max}$ và $T_{\max}$ thu được từ NTN uống viên Difenac-KD đều nằm trong giới hạn 80-120% của các giá trị tương ứng thu được trên NTN uống Voltaren® 100 mg; các kết quả này cho phép kết luận viên Difenac-KD 100 mg tương đương sinh học với viên Voltaren® 100 mg.

3.6.6. Khảo sát độ hấp thu dược chất từ viên nang Difenac-KD.

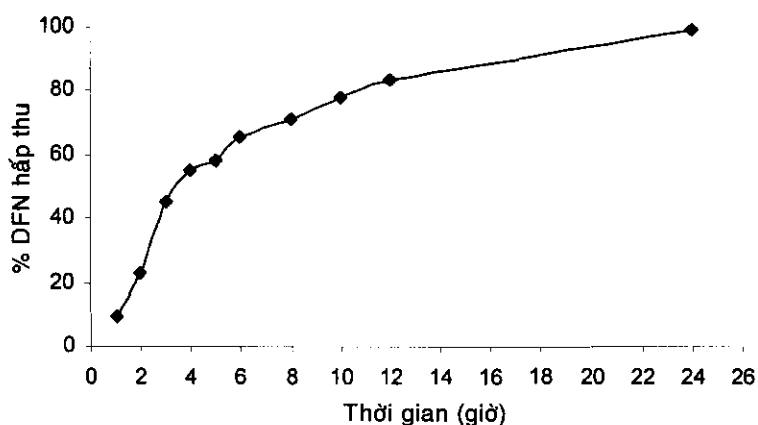
Kết quả tính toán tỉ lệ phần trăm dược chất hấp thu *in vivo* trên NTN sau khi uống 1 viên Difenac-KD được trình bày trong bảng 3.6.15.

Bảng 3.6.15. Kết quả chi tiết để tính toán tỉ lệ phần trăm dược chất hấp thu *in vivo*

Thời gian (giờ)	C_t ($\mu\text{g/ml}$)	AUC_{0-t} ($\mu\text{g.giờ/ml}$)	$K_{el} \times AUC_{0-t}$	$C_t + K_{el}(AUC_{0-t})$	% hấp thu
1	0,22	0,11	0,040	0,11	9,49
2	0,46	0,45	0,164	0,45	22,78
3	0,83	1,10	0,402	1,10	44,95
4	0,80	1,91	0,697	1,91	54,64
5	0,63	2,62	0,956	2,62	57,89
6	0,47	3,20	1,168	3,20	65,62
8	0,39	4,05	1,478	4,05	71,10
10	0,35	4,78	1,745	4,78	77,91
12	0,17	5,30	1,935	5,30	83,38
24	0,09	6,93	2,529	6,93	98,52

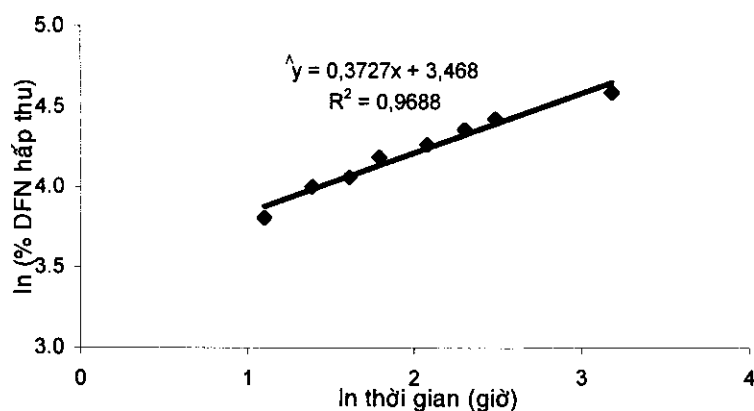
Ghi chú: $K_{el} = 0,693/t_{1/2} = 0,693/1,9 = 0,365 \text{ giờ}^{-1}$

Trong khoảng 12 giờ đầu, dược chất từ viên Difenac-KD được hấp thu khá nhanh và đạt đến 83,38% tại giờ thứ 12; sau giờ thứ 12, sự hấp thu chậm dần và đến 24 giờ có 98,52% dược chất được hấp thu. Đường biểu diễn phần trăm dược chất được hấp thu được trình bày trên biểu đồ 3.6.14.



Biểu đồ 3.6.14. Đồ thị biểu diễn độ hấp thu DFN từ viên Difenac-KD

Đường biểu diễn độ hấp thu dược chất theo thời gian không thể hiện một sự tương quan tuyến tính, có thể kết luận sự hấp thu không tuân theo động học bậc 0. Khi biểu diễn đồ thị trên hệ trục tọa độ logarit tự nhiên toàn phần, sự hấp thu dược chất từ viên Difenac-KD thể hiện sự tuyến tính rõ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9688$.



Biểu đồ 3.6.15 . Đồ thị biểu diễn tỉ lệ phần trăm DFN hấp thu *in vivo* trên hệ trục tọa độ logarit

Phương trình biểu diễn độ hấp thu dược chất có thể viết lại như sau:

$\ln A = 0,3727 \ln t + 3,468$ (A: % dược chất được hấp thu tại thời điểm t)

Vì $\ln 32,072 = 3,468$; nên tỉ lệ phần trăm tại thời điểm t cho bởi:

$$\ln A = \ln t^{0,3727} + \ln 32,072 = \ln (t^{0,3727} \times 32,072)$$

Do đó, tỉ lệ phần trăm dược chất được hấp thu có thể được tính theo công thức đơn giản:

$$A = 32,072 t^{0,3727}$$

A: Tỉ lệ phần trăm dược chất được hấp thu; t: thời gian (giờ).

3.6.7. Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn viên nang phóng thích kéo dài

3.6.7.1. Khảo sát tương quan giữa mức độ phóng thích dược chất *in vitro* với mức độ hấp thu dược chất *in vivo*

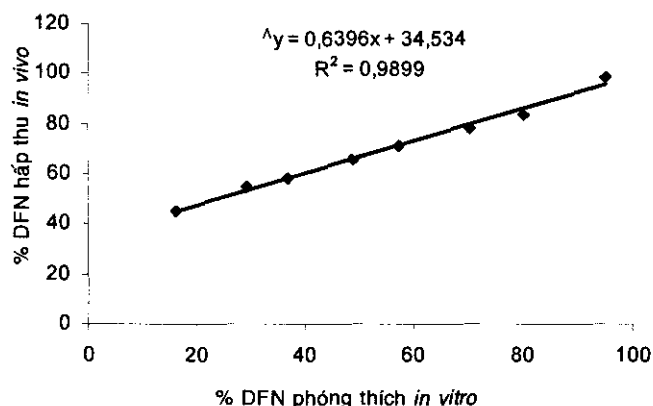
Xây dựng phương trình tương quan giữa mức độ phóng thích in vitro và mức độ hấp thu dược chất in vivo

Tương quan giữa mức độ phóng thích DFN *in vitro* với mức độ hấp thu DFN *in vivo* được thực hiện bằng cách so sánh tỉ lệ phần trăm thuốc được phóng thích *in vitro* với tỉ lệ phần trăm thuốc được hấp thu *in vivo* và được trình bày trong bảng 3.6.16.

Bảng 3.6.16. Tương quan giữa tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích *in vitro* và phần trăm DFN hấp thu *in vivo* trên NTN (n =14) uống viên nang Difenac- KD

Thời gian (giờ)	% hấp thu	% phóng thích
1	9,49	1,21
2	22,78	1,24
3	44,95	16,08
4	54,64	29,19
5	57,89	36,86
6	65,62	48,86
8	71,10	57,48
10	77,91	70,37
12	83,38	80,29
24	98,52	95,13

Phân tích hồi qui tuyến tính giữa mức độ phóng thích dược chất *in vitro* và mức độ hấp thu dược chất *in vivo* cho thấy 2 thông số này có sự tương quan tuyến tính rõ với hệ số tương quan $R^2 = 0,9899$ (biểu đồ 3.6.16). Phương trình tương quan giữa mức độ phóng thích dược chất *in vitro* và mức độ hấp thu dược chất *in vivo* là $A = 0,6396D + 34,534$ (A: phần trăm dược chất hấp thu tại thời điểm t. D: phần trăm dược chất phóng thích tại thời điểm t tương ứng). Trong khoảng thời gian 1 đến 2 giờ, mức độ phóng thích dược chất *in vitro* chỉ đạt đến 1,64%, do đó khoảng thời gian này được xem như tiềm thời và không xét đến khi xác định tương quan *in vitro/in vivo*.



Biểu đồ 3.6.16. Đường biểu diễn tương quan giữa mức độ phóng thích dược chất *in vitro* và mức độ hấp thu *in vivo* của viên Difenac-KD

Đánh giá sai số dự đoán phần trăm của tương quan mức độ A

Khả năng dự đoán của tương quan mức A được đánh giá bằng cách so sánh tỉ lệ phần trăm giữa giá trị thực nghiệm và giá trị dự đoán (được tính toán từ số liệu phóng thích trên cơ sở phương trình hồi qui giữa phần trăm dược chất phóng thích *in vitro* và phần trăm dược chất được hấp thu *in vivo*). Theo cơ quan FDA, để đánh giá khả năng dự đoán có thể tính toán theo sai số dự đoán (% predicted error- %PE) (khả năng dự đoán = 100 – sai số dự đoán %).

Sai số dự đoán được tính theo công thức:

$$\%PE = \frac{\text{Giá trị thực nghiệm} - \text{Giá trị lý thuyết}}{\text{Giá trị thực nghiệm}} \times 100$$

Sự tương quan được đánh giá là đạt yêu cầu khi giá trị dự đoán sai lệch không quá 10% so với giá trị thực.

Bảng 3.6.17. Sai số dự đoán của tương quan mức độ A của viên nang TDKD

Giờ thứ	% dược chất phóng thích	% dược chất hấp thu dự đoán	% dược chất hấp thu thực nghiệm	Sai số dự đoán phần trăm
3	16,08	44,83	44,95	0,26
4	29,19	53,21	54,64	2,61
5	36,86	58,12	57,89	-0,39
6	48,86	65,79	65,62	-0,26
8	57,48	71,31	71,10	-0,29
10	70,37	79,55	77,91	-2,11
12	80,29	85,90	83,38	-3,02
24	95,13	95,39	98,52	3,18

Kết quả tính toán sai số dự đoán phần trăm cho thấy sai số dự đoán tại mỗi thời điểm đều nhỏ hơn 10%, do đó, tương quan đã được thiết lập có khả năng dự đoán cao. Phương pháp thử độ phóng thích được chọn có thể được dùng để đánh giá chất lượng thuốc thông qua các số liệu phóng thích *in vitro*.

3.6.7.2. Nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn

* *Xây dựng tiêu chuẩn về độ hoà tan.*

Tiêu chuẩn về độ hoà tan được xây dựng căn cứ vào kết quả thử nghiệm của lô được dùng để xác định tương đương sinh học.

Các thử nghiệm về độ hoà tan đã cho thấy DFN là một dược chất rất khó tan trong acid loãng, nên có thể bỏ qua giai đoạn thử trong môi trường acid. Các thời điểm dự kiến được chọn là 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ và 8 giờ trong môi trường đệm pH 6,8.

Giới hạn xác định cho mỗi thời điểm là phần trăm dược chất phóng thích trung bình $\pm 2,5$ độ lệch chuẩn. Tiêu chuẩn dự kiến được trình bày trong bảng 3.6.1.8.

Bảng 3.6.1.8. Giới hạn độ hoà tan của viên nang Difenac-KD

Thời gian (giờ)	% dược chất hoà tan	Độ lệch chuẩn	Độ lệch chuẩn $\times 2,5$	Tiêu chuẩn dự kiến (%)	
				Giới hạn dưới	Giới hạn trên
1	16,08	1,07	2,67	13,41	18,76
2	29,19	5,0	12,5	17,4	42,4
4	58,86	5,2	15	43,86	73,86
8	75,56	4,37	10,92	Không ít hơn 75%	

Theo USP, tiêu chuẩn có thể được tính theo giá trị trung bình ± 3 lần độ lệch chuẩn; cơ quan FDA cho phép mở rộng giới hạn tại mỗi điểm sao cho các lô sản xuất thực tế sau này có thể đạt được yêu cầu về độ hoà tan, tuy nhiên giới hạn trên và giới hạn dưới không được vượt quá giá trị trung bình $\pm 20\%$. Tiêu chuẩn về độ hoà tan được đề xuất như sau:

Giờ thứ 1	: không quá 10%
Giờ thứ 2	: 10 – 25% (17,5 $\pm$ 7,5%)
Giờ thứ 4	: 45 – 75% (50 $\pm$ 15%)
Giờ thứ 8	: không ít hơn 75%

* *Xây dựng tiêu chuẩn về độ đồng đều độ hoà tan.*

Độ đồng nhất về độ hoà tan được xây dựng ở 3 mức:

Gọi: Q: phần trăm dược chất hoà tan tại thời điểm t của mỗi viên.

Q_L : phần trăm dược chất hoà tan tại thời điểm t theo tiêu chuẩn.

Q_{TB} : Giá trị trung bình của phần trăm dược chất hoà tan tại thời điểm t .

$Q_L \pm q$: giới hạn phần trăm được chất hoà tan tại thời điểm t .

A: Hàm lượng được chất có trong 1 viên nang.

Chế phẩm được xem là đồng đều về độ hoà tan nếu đạt được các mức sau đây:

Mức 1: thử trên 6 viên, tất cả 6 viên đều phải có Q nằm trong giới hạn $Q_L \pm q$ tại mỗi thời điểm và tại thời điểm cuối cùng $Q \geq Q_L$. Nếu không đạt, thử tiếp mức hai.

Mức 2: thử trên 6 viên tiếp theo, giá trị trung bình của 12 viên phải nằm trong giới hạn cho phép.

$$Q_L - q \leq Q_{TB} \leq Q_L + q$$

Tất cả các viên đều phải có Q thoả: $Q_L - q - 10\%A \leq Q \leq Q_L + q + 10\%A$

Tại thời điểm cuối cùng: $Q_{TB} \geq Q_L$

và không được viên nào có: $Q \leq Q_L - 10\%A$, nếu không đạt thử tiếp mức 3.

Mức 3: Thử 12 viên tiếp theo, giá trị trung bình của 24 viên (Q_{TB}) phải nằm trong giới hạn cho phép:

$$Q_L - q \leq Q_{TB} \leq Q_L + q$$

Không được quá 2 viên có: $Q \leq Q_L - q - 10\%A$ hoặc $Q \geq Q_L + q + 10\%A$

Không được có viên nào có: $Q \leq Q_L - q - 20\%A$ hoặc $Q \geq Q_L + q + 20\%A$

Tại điểm cuối phải thoả: $Q_{TB} \geq Q_L$

và không được có viên nào có $Q \leq Q_L - 10\%A$

** Khảo sát phương pháp định tính*

Phương pháp định tính được chọn là phương pháp sắc ký lớp mỏng theo dược điển Việt Nam III.

Thực nghiệm.

Bản mỏng: Silicagel F₂₅₄ Merck

Hệ dung môi: Acetat ethyl-methanol- amoniac (80:10:10)

Lượng chấm: 5 μ l dung dịch

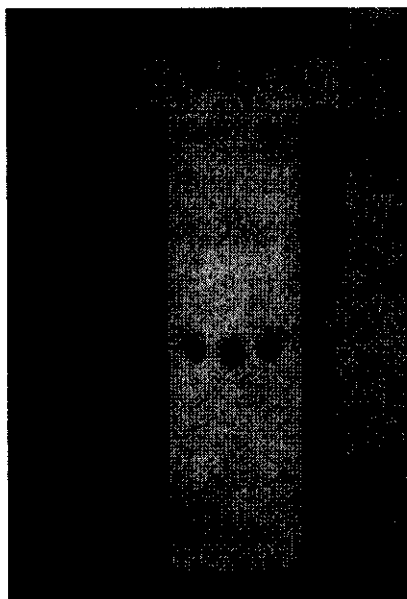
Phát hiện vết: Soi bản mỏng dưới đèn UV 254 nm

Dung dịch thử: Lấy một lượng vi hạt tương ứng khoảng 100 mg diclofenac natri, nghiền thành bột mịn, hoà tan trong khoảng 20 ml methanol, lọc, thu được dung dịch để phân tích sắc ký lớp mỏng.

Dung dịch chuẩn đối chiếu: hoà tan 25 mg DFN chuẩn trong 5 ml methanol.

Triển khai sắc ký tới khi dung môi đi được khoảng 10 cm, làm khô bản mỏng ngoài không khí, quan sát dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm.

Kết quả. Với hệ dung môi đã chọn, vết đối chiếu có $R_f = 0,45$; vết thu được từ dung dịch thử có cùng R_f và có cường độ phát quang dưới ánh sáng tử ngoại tương tự vết chuẩn.



Hình 3.6.1.9. Sắc ký đồ định tính DFN (1: dung dịch DFN chuẩn; 2: hỗn hợp dung dịch thử và dung dịch chuẩn; 3: dung dịch thử)

* *Khảo sát phương pháp định lượng.* Phương pháp định lượng được chọn là phương pháp SKLHNC theo BP 2001 [17, tr. 364] và USP XXIV [107, tr.547], độ chính xác, độ đúng và khoảng tuyến tính đã được thẩm định (xem phụ lục).

3.6.7.3. Dự thảo tiêu chuẩn chất lượng viên Difenac-KD 100 mg

Căn cứ vào các thực nghiệm đã khảo sát, tiêu chuẩn cơ sở của viên nang Difenac-KD đã được đề nghị và đã được thẩm định bởi Phân viện Kiểm Nghiệm TP. Hồ Chí Minh (xem phụ lục).

3.6.8. Nghiên cứu độ ổn định và tuổi thọ của chế phẩm

3.6.8.1. Nghiên cứu độ ổn định bằng phương pháp lão hoá cấp tốc

Quy trình nghiên cứu và chỉ tiêu chất lượng

Thử nghiệm được tiến hành ở 2 điều kiện: $40 \pm 2^\circ\text{C}$ / độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$ và $30 \pm 2^\circ\text{C}$ / độ ẩm tương đối $60 \pm 5\%$. Các mẫu được kiểm tra cách mỗi 30 ngày trong thời gian bảo quản 6 tháng.

Thuốc khảo sát:

Lô số 02 sản xuất ngày 15/01/2001

Lô số 03 sản xuất ngày 20/01/2001

Lô số 06 sản xuất ngày 20/01/2001

Thuốc được bảo quản trong vỉ bấm (vỉ chứa 10 viên), các vỉ được cho vào hộp giấy (hộp chứa 10 vỉ).

Thuốc đã được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường trong 290 ngày (lô 02) và 285 ngày (lô 03 và lô 06) trước khi đưa vào nghiên cứu.

Chỉ tiêu chất lượng.

- Cảm quan: Viên được xem là không đạt tiêu chuẩn khi nang biến màu hoặc/và cứng.
- Hàm lượng: thuốc được xem là không đạt tiêu chuẩn khi hàm lượng DFN giảm đến 90% so với hàm lượng ban đầu. Hàm lượng DFN được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.
- Độ phóng thích dược chất: Thuốc được xem là không đạt tiêu chuẩn khi không đạt các giới hạn về độ phóng thích dược chất như đã ghi trong phần dự thảo tiêu chuẩn chất lượng.

Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian bảo quản đến hình dạng cảm quan của chế phẩm

So với các viên nang ban đầu, các viên nang bảo quản ở nhiệt độ 40°C/độ ẩm tương đối 75% chỉ đổi màu ít, vỏ nang chỉ bị dòn và biến màu ở tháng thứ 6, tuy nhiên các vi hạt bên trong không bị biến màu và độ phóng thích vẫn đạt yêu cầu.

Hình dạng cảm quan của các viên nang bảo quản ở nhiệt độ 30°C/độ ẩm tương đối 60% hầu như không thay đổi trong 6 tháng bảo quản.

Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian đến độ phóng thích dược chất

Ở nhiệt độ bảo quản thực nghiệm 30°C/ độ ẩm tương đối 60% và 40°C/ độ ẩm tương đối 75%, độ phóng thích dược chất khá ổn định theo thời gian bảo quản. Tỷ lệ phần trăm dược chất phóng thích trung bình đều đạt tiêu chuẩn sau thời gian bảo quản đến 6 tháng ở các nhiệt độ thực nghiệm 30°C và 40°C.

Bảng 3.6.19. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 02 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 30°C/độ ẩm tương đối 60%

Thời gian bảo quản	Phần trăm dược chất phóng thích				
	2 giờ	3 giờ	7 giờ	12 giờ	16 giờ
Ban đầu	1,04	16,08	53,44	80,29	
1 tháng	0,61	16,20	49,69	79,09	
2 tháng	0,29	10,47	47,86	75,73	
3 tháng	0,73	14,94	43,82	66,91	79, 53
4 tháng	0,88	16,24	48,97	77,47	
5 tháng	0,94	13,35	43, 03	77 87	
6 tháng	0,79	13,29	41,72	64,28	78,68

Bảng 3.6.20. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 03 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 30°C/độ ẩm tương đối 60%

Thời gian bảo quản	Phần trăm dược chất phóng thích				
	2 giờ	3 giờ	7 giờ	12 giờ	16 giờ
Ban đầu	1,14	14,69	51,52	78,32	
1 tháng	0,87	17,12	50,34	79,49	
2 tháng	1,06	16,50	48,85	72,15	81,16
3 tháng	1,15	13,41	41,55	66,47	78,53
4 tháng	0,74	19,66	59,79	79,09	
5 tháng	0,70	12,61	41,77	65,42	78,36
6 tháng	1,05	13,17	40,94	75,44	

Bảng 3.6.21. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 06 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 30°C/độ ẩm tương đối 60%

Thời gian bảo quản	Phần trăm dược chất phóng thích				
	2 giờ	3 giờ	7 giờ	12 giờ	16 giờ
Ban đầu	0,66	15,66	47,58	77,18	
1 tháng	1,03	14,49	43,84	74,42	77,77
2 tháng	1,02	14,83	44,22	62,25	75,19
3 tháng	1,24	16,11	46,86	69,76	80,05
4 tháng	1,12	13,94	41,59	63,24	79,15
5 tháng	0,94	14,43	43,21	75,54	
6 tháng	1,18	13,42	40,73	74,07	82,92

Bảng 3.6.22. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 02 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 40°C/độ ẩm tương đối 75%

Thời gian bảo quản	Phần trăm dược chất phóng thích				
	2 giờ	3 giờ	7 giờ	12 giờ	16 giờ
Ban đầu	1,64	16,08	53,44	80,29	
1 tháng	1,26	16,22	47,78	73,73	81,84
2 tháng	1,00	16,20	49,69	70,09	79,15
3 tháng	0,87	15,99	46,71	62,96	80,56
4 tháng	1,13	19,91	60,68	89,09	
5 tháng	0,75	15,07	60,39	74,60	82,79
6 tháng	1,05	16,25	42,18	72,16	81,56

Bảng 3.6.23. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 03 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 40°C/ độ ẩm tương đối 75%

Thời gian	Phần trăm dược chất phóng thích				
bảo quản	2 giờ	3 giờ	7 giờ	12 giờ	16 giờ
Ban đầu	1,14	14,69	51,52	78,32	
1 tháng	0,63	18,75	53,63	85,85	
2 tháng	1,06	21,88	54,73	78,28	
3 tháng	0,70	13,71	43,03	69,99	78,46
4 tháng	0,84	19,78	55,34	70,71	82,65
5 tháng	0,78	14,09	41,25	62,37	76,59
6 tháng	0,67	18,28	58,06	79,59	

Bảng 3.6.24. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 06 ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 40°C/ độ ẩm tương đối 75%

Thời gian	Phần trăm dược chất phóng thích				
bảo quản	2 giờ	3 giờ	7 giờ	12 giờ	16 giờ
Ban đầu	0,66	15,66	47,58	77,18	
1 tháng	1,06	13,88	42,74	68,88	77,90
2 tháng	1,07	19,80	52,19	75,50	
3 tháng	0,79	20,26	62,65	80,19	
4 tháng	1,00	18,01	48,25	69,95	
5 tháng	0,74	19,86	59,79	79,09	82,15
6 tháng	0,63	15,19	47,91	81,52	

Ảnh hưởng của nhiệt độ và thời gian bảo quản đến hàm lượng DFN

Bảng 3.6.25. Sự giảm hàm lượng của mẫu bảo quản ở 30°C/độ ẩm tương đối 60%

Lô số	Hàm lượng ban đầu (mg)	Tỷ lệ phần trăm so với hàm lượng ban đầu					
		1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng	5 tháng	6 tháng
02	102,72	99,74	99,42	99,28	98,96	98,84	98,12
03	102,98	99,57	99,40	99,16	99,02	98,51	98,32
06	101,29	99,69	99,34	99,17	98,84	98,60	98,12

Tương quan giữa hàm lượng phần trăm và thời gian bảo quản thực nghiệm được xây dựng theo phương trình hồi qui $\hat{y} = ax + b$. Sự tương quan giữa 2 yếu tố này của các lô thuốc được trình bày trong bảng 3.6.26.

Bảng 3.6.26. Kết quả phân tích tương quan giữa hàm lượng phần trăm và thời gian bảo quản ở điều kiện thực nghiệm 30°C/độ ẩm tương đối 60%

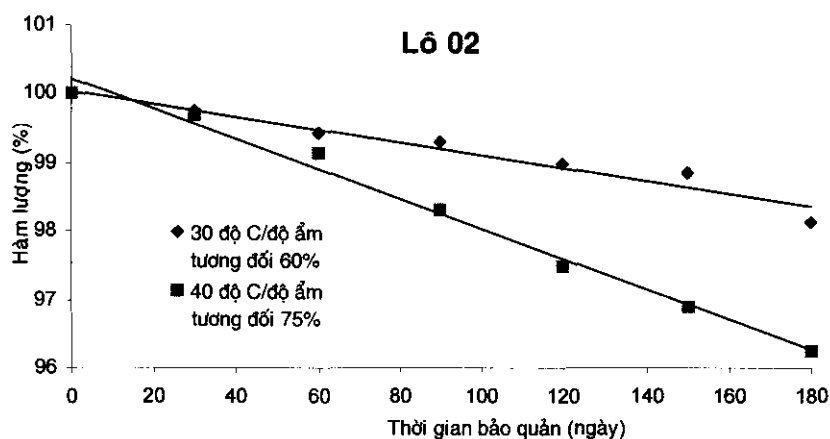
Lô số	r	A	B	Tuổi thọ thực nghiệm (t_{90}) (ngày)
02	-0,9759	-0,0094	100,04	1068
03	-0,9888	-0,0090	99,95	1105
06	-0,9947	-0,0099	100,00	1010

Bảng 3.6.27. Sự giảm hàm lượng của mẫu bảo quản ở 40°C/độ ẩm tương đối 75%

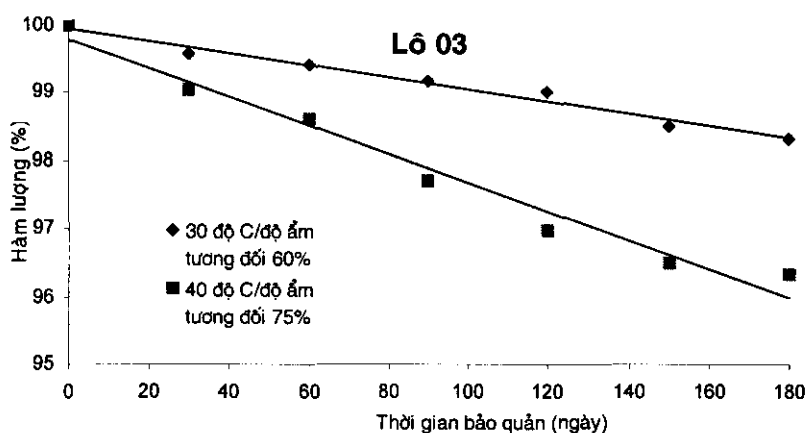
Lô số	Hàm lượng ban đầu (mg)	Tỷ lệ phần trăm so với hàm lượng ban đầu					
		1 tháng	2 tháng	3 tháng	4 tháng	5 tháng	6 tháng
02	102,72	99,69	99,12	98,31	97,47	96,87	96,25
03	102,98	99,03	98,62	97,90	96,99	96,49	96,35
06	101,29	99,30	98,84	98,37	97,86	96,91	96,32

Bảng 3.6.28. Kết quả phân tích tương quan giữa hàm lượng phần trăm và thời gian bảo quản ở điều kiện thực nghiệm 40°C/độ ẩm tương đối 75%

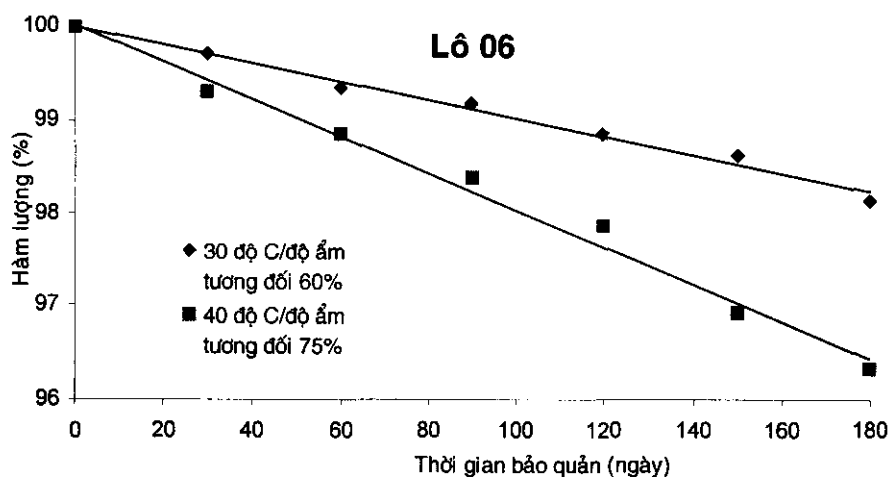
Lô số	r	a	B	Tuổi thọ thực nghiệm (t_{90}) (ngày)
02	-0,9945	-0,0221	100,23	463
03	-0,9874	-0,0210	98,80	467
06	-0,9942	-0,0200	100,03	502



Biểu đồ 3.6.17. Sự giảm hàm lượng của lô 02 khi bảo quản ở $30 \pm 2^\circ\text{C}$ / độ ẩm tương đối $60 \pm 5\%$ và $40 \pm 2^\circ\text{C}$ /độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$



Biểu đồ 3.6.18. Sự giảm hàm lượng của lô 03 khi bảo quản ở $30 \pm 2^\circ\text{C}$ / độ ẩm tương đối $60 \pm 5\%$ và $40 \pm 2^\circ\text{C}$ /độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$



Biểu đồ 3.6.19 . Sự giảm hàm lượng của lô 06 khi bảo quản ở $30 \pm 2^\circ\text{C}$ / độ ẩm tương đối $60 \pm 5\%$ và $40 \pm 2^\circ\text{C}$ /độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$

Dự báo tuổi thọ của thuốc

Tuổi thọ của thuốc được tính toán theo công thức:

$$P = P_i \times \sigma^{\frac{(t-25)}{10}} + P_o$$

Với: P: tuổi thọ của thuốc; P_i : tuổi thọ thực nghiệm khi bảo quản ở nhiệt độ t; σ : hệ số nhiệt độ của tốc độ phản ứng, biểu thị mức độ tăng tốc độ phản ứng khi nhiệt độ tăng 10°C, chấp nhận $\sigma = 2$; P_o : khoảng thời gian (ngày) tính từ khi sản xuất đến ngày bảo quản thực nghiệm.

Kết quả tính toán tuổi thọ dự kiến được trình bày trong bảng 3.6.29.

Bảng 3.6.29. Tuổi thọ dự kiến của các lô thuốc thử nghiệm

Lô số	Tuổi thọ xác định ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 30°C (ngày)	Tuổi thọ xác định ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 40°C (ngày)
02	1796	1595
03	1844	1601
06	1709	1699

Kết quả phân tích phương sai 2 yếu tố không lặp cho thấy kết quả thu được ở hai điều kiện thực nghiệm khác nhau không có ý nghĩa ($p = 0,953$), tương tự kết quả thu được từ 3 lô thực nghiệm đều khác nhau không có ý nghĩa ($p = 0,169$).

Ở nhiệt độ 30°C, độ ẩm tương đối 60%, tuổi thọ của lô 02 (1796 ngày) và lô số 03 (1844 ngày) đều lớn hơn tuổi thọ của lô 06 (1709 ngày) đến hơn 60 ngày, nên tuổi thọ của 2 lô này không được sử dụng để tính toán tuổi thọ trung bình; tuổi thọ trung bình xác định được ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 30°C là 1709 ngày.

Ở nhiệt độ 40°C, độ ẩm tương đối 75%, tuổi thọ của lô 6 không sử dụng để tính toán vì 1699 ngày – 1595 ngày = 104 ngày > 60 ngày.

Tuổi thọ trung bình xác định ở điều kiện bảo quản thực nghiệm 40°C:

$$(1595 \text{ ngày} + 1601 \text{ ngày})/2 = 1598 \text{ ngày.}$$

Chênh lệch tuổi thọ xác định ở 2 điều kiện bảo quản 30°C và 40°C: 1709 – 1598 = 111 < 180 ngày; nên cả 2 số liệu đều sử dụng để tính toán.

Dự báo tuổi thọ trung bình của chế phẩm: $(1709 + 1598)/2 = 1654$ ngày, tương ứng với 55 tháng 23 ngày # 4 năm 07 tháng.

3.6.8.2. Nghiên cứu độ ổn định ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường

Các mẫu thử nghiệm được bảo quản ở nhiệt độ và độ ẩm bình thường, tránh ánh sáng trực tiếp, qui cách bao bì giống như trong trường hợp nghiên cứu độ ổn định trong điều kiện lão hoá cấp tốc.

Sau 36 tháng bảo quản ở nhiệt độ và độ ẩm bình thường, hình dạng cảm quan của

Difenac-KD hầu như không thay đổi.

Độ phóng thích dược chất của các lô thuốc bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường được nêu ở các bảng 3.6.30, 3.6.31 và 3.6.32. Tỷ lệ phần trăm DFN phóng thích tại các thời điểm 2 giờ, 3 giờ, 7 giờ, và 12 giờ chỉ thay đổi rất ít so với mẫu ban đầu.

Bảng 3.6.30. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 02, bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường

Thời gian bảo quản	Phần trăm dược chất phóng thích				
	2 giờ	3 giờ	7 giờ	12 giờ	16 giờ
Ban đầu	1,64	16,08	53,44	80,29	
3 tháng	0,98	14,89	52,49	78,59	
6 tháng	1,32	15,97	54,26	82,16	
9 tháng	0,93	14,56	53,16	81,32	
12 tháng	0,98	16,20	49,69	79,09	
18 tháng	1,12	15,50	47,26	77,65	
24 tháng	0,95	16,53	52,00	81,50	
36 tháng	1,23	17,23	55,36	83,14	

Bảng 3.6.31. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 03, bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường

Thời gian bảo quản	Phần trăm dược chất phóng thích				
	2 giờ	3 giờ	7 giờ	12 giờ	16 giờ
Ban đầu	1,32	14,49	48,56	71,13	84,25
3 tháng	1,08	15,09	52,38	82,16	
6 tháng	0,98	16,02	55,27	76,13	
9 tháng	1,12	16,36	52,12	78,38	
12 tháng	1,14	14,69	51,52	78,32	
18 tháng	1,40	16,96	57,32	81,86	
24 tháng	1,03	15,49	52,76	81,86	
36 tháng	1,00	16,16	57,12	78,42	

Bảng 3.6.32. Phần trăm dược chất phóng thích theo thời gian của Difenac-KD 100 mg lô số 06, bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường

Thời gian bảo quản	Phần trăm dược chất phóng thích				
	2 giờ	3 giờ	7 giờ	12 giờ	16 giờ
Ban đầu	1,16	16,90	53,04	78,17	
3 tháng	1,12	15,93	54,59	80,43	
6 tháng	0,98	17,53	57,12	82,96	
9 tháng	1,32	16,56	56,72	81,86	
12 tháng	1,11	15,23	54,12	80,02	
18 tháng	1,08	16,72	58,64	82,79	
24 tháng	1,02	15,98	59,70	82,08	
36 tháng	0,98	16,76	69,29	79,78	

Hàm lượng DFN trong viên nang thay đổi rất ít theo thời gian bảo quản. Ở tháng thứ 36, hàm lượng chỉ giảm khoảng 3%. Hàm lượng còn lại trong viên nang sau 36 tháng bảo quản ở nhiệt độ và độ ẩm bình thường được nêu trong bảng 3.6.33.

Bảng 3.6.33. Sự giảm hàm lượng của mẫu khảo sát bảo quản ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường

Lô số	Hàm lượng ban đầu (mg)	Tỷ lệ phần trăm so với hàm lượng ban đầu						
		3 tháng	6 tháng	9 tháng	12 tháng	18 tháng	24 tháng	36 tháng
02	102,72	99,83	99,74	99,56	98,96	99,02	98,12	98,06
03	102,98	99,89	99,69	99,36	99,02	98,93	98,33	97,89
06	101,29	99,79	99,80	99,67	99,32	99,16	98,79	97,38

KẾT LUẬN

1. Nghiên cứu bào chế viên bao tan trong ruột SER 5mg

1.1. Khảo sát phương pháp và các qui trình định lượng Ser

Thẩm định và đề nghị chọn qui trình B để định lượng SER

1.2. Khảo sát hàm lượng SER của 17 chế phẩm lưu hành trên thị trường

Tỉ lệ đạt tiêu chuẩn : 6/17 chiếm 35,29%

Tỉ lệ không đạt tiêu chuẩn : 11/17 chiếm 64,71%

1.3. Khảo sát các điều kiện và xây dựng qui trình thử độ hoà tan của các chế phẩm SER để nghị đưa vào Dược điển

1.4. Ứng dụng phương pháp để khảo sát độ hoà tan của 4 chế phẩm chứa SER trên thị trường đạt tiêu chuẩn hàm lượng: Đạt theo tiêu chuẩn 3/4 chiếm tỉ lệ 75%

1.5. Khảo sát chất lượng nguyên liệu SER: Chất lượng nguyên liệu không đồng nhất, là vấn đề cần lưu ý khi sản xuất.

1.6. Xây dựng mô hình đánh giá độ ổn định của SER

Đã nghiên cứu đề xuất 4 thử nghiệm để nghiên cứu độ ổn định của nguyên liệu, bán thành phẩm và thuốc thành phẩm chứa ser :

-Thử nghiệm đánh giá nhanh hoạt chất và bán thành phẩm: Nhiệt độ 50°C và môi trường khan thích hợp để khảo sát độ ổn định của SER. dưới dạng nguyên liệu hay bán thành phẩm: cốm, viên chưa bao..

-Thử nghiệm đánh giá nhanh chất lượng thành phẩm: Nhiệt độ 50°C, độ ẩm 60 ± 50% và thời gian 10 – 30 ngày, định lượng so sánh với mẫu chuẩn.

-Thử nghiệm đánh giá khả năng chống ẩm của lớp bao: viên bao không đóng gói kín, đặt trong điều kiện nóng ẩm T =30 - 35°C, H= 70 -75%, theo dõi khối lượng viên trong 10 – 30 ngày. Yêu cầu viên không tăng khối lượng quá 1%.

-Thử nghiệm xác định độ ổn định của thuốc thành phẩm: Điều kiện khống chế: T= 25 ± 2°C H= 60 ± 5 % và điều kiện nóng ẩm T=30 - 35°C, H= 70 -75 %. Định kỳ 6 tháng 1 lần lấy mẫu kiểm nghiệm, xác định hạn sử dụng thuốc .

1.7. Bào chế viên bao tan trong ruột SER 5 mg

- Viên được thử nghiệm theo 2 bước: thăm dò và thực nghiệm tối ưu hợp lý hoá công thức và thử nghiệm pilot .Qua 5 công thức thử nghiệm thăm dò và 3 mẫu thử pilot 10.000 viên /mẻ đã xây dựng được quy trình và tiêu chuẩn viên bao SER 5mg.

Công thức viên nhân: cho 10.000 viên ~ 1600 g

Thành phần	Cho 1 viên	Cho 1 mẻ =10.000 viên
Serrapeptase*	5,935 mg	59,35 g (3,70940 %)
PVP	7,4 mg	74,00 g (4,6250 %)
Lactose	117,5 mg	1175 ,00 g (73,4375 %)
Tinh bột	19,5 mg	195 ,00 g (12,1875 %)
Magnesi stearat	4,0 mg	40,00 g (2,5000 %)
Chất phụ	6,6 mg	56,65 g (3,5410 %)
Dập viên 160 mg $\pm$ 7,5 %	148 – 172 mg	148 – 172 mg

Quy trình :

-Xát hạt từng phần → cốm trơ đến độ ẩm $\leq 0,5\%$.Trộn hoạt chất,chất phụ trong máy trộn kiểu hành tinh,thời gian trộn 7 – 8 phút. Lấy mẫu để định lượng hoạt chất, xác nhận sự đồng đều của cốm.

-Dập viên: chày khum 7 mm, khối lượng viên 160 mg.

Dịch bao phim:cho 1 mẻ 10.000 viên ~ 1,6 kg nhân

Thành phần	Khối lượng	Tỷ lệ
1-Eudragit L100	290,28 g	8,8 5 %
2-CAP	47,888 g	1,46%
3-Chất làm trơn PEG 4000 & 6000 ... V đ	 11,36 %.	
4-Màu Sunset yellow, chất phụ Vđ .		
5-Dung môi:Aceton, Isopropanol ,Ethanol Vđ.	3280 ml	100% (KL/TT)

-Quy trình: Viên nhân loại sạch bụi,cho vào nổi bao.Tốc độ quay 20 – 25 vòng phút sao cho viên chuyển động đều trong nổi. Phun dịch bao qua đầu phun, áp suất 2 kg / cm²

luôn khuấy đều dịch bao. Thời gian nhiệt độ thường hoặc mát, khô. Bao liên tục khi lớp bao đạt độ dày tương đương với khối lượng viên 176 – 182 mg, tăng 10,47 – 11,52 %. Thời gian bao khoảng 150 phút. Kết thúc bao viên, chọn bỏ viên không đạt yêu cầu.

Ngoài việc bào chế viên hàm lượng Ser. 5 mg như đăng ký, còn thử nghiệm thành công viên Ser. 10 mg.

Qua nghiên cứu đã thực sự kiểm soát tốt một quy trình bào chế với hoạt chất khá nhạy cảm, dễ hư hỏng và hướng tới áp dụng vào thử nghiệm pilot công nghiệp.

1.8. Tiêu chuẩn chất lượng viên bao

Viên bao đạt tiêu chuẩn cơ sở được xây dựng theo các tiêu chí quy định bởi Dược điển Việt Nam.

1.9. Độ ổn định và tuổi thọ viên bao

- Chế phẩm đã trải qua phương thức đánh giá nhanh độ ổn định trong khi thành lập công thức và qua bảo quản gần 2 năm. Kết quả cho phép suy đoán hạn dùng của mẫu thuốc mới khoảng ≥ 26 tháng trong điều kiện bình thường

- So sánh độ ổn định của hoạt chất S2 là nguyên liệu dùng nghiên cứu cho thấy dạng bào chế nâng cao được độ ổn định của hoạt chất từ 14- 16 %.

2. Nghiên cứu bào chế bột đông khô của vi khuẩn lactic làm men tiêu hoá

2.1. Đã xây dựng được quy trình nuôi cấy *B.bifidum* và *L.acidophilus* là hai vi khuẩn phức tạp cần môi trường phong phú và yếu tố tăng trưởng. Qua khảo sát 20 loại môi trường đã xác định được thành phần và hàm lượng các nguồn dinh dưỡng quan trọng để nuôi cấy hai vi khuẩn phức tạp này như pepton, đường, yếu tố tăng trưởng... xác định được các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tăng trưởng của hai vi khuẩn này như pH, nhiệt độ, tác động của oxy.

Từ những kết quả trên, đã xây dựng được quy trình nuôi cấy để thu sinh khối *B.bifidum* và *L.acidophilus* với hiệu suất tăng trưởng gấp 3000 so với bình thường. Thể tích mỗi lần nuôi cấy ở qui mô phòng thí nghiệm là hai lít. Sinh khối vi khuẩn sau khi xử lý được bảo quản bằng phương pháp đông khô.

2.2. Đã xây dựng quy trình bảo quản bằng phương pháp đông khô, Xác định được các yếu tố bổ sung thích hợp cho quá trình đông khô gồm:

25% đường và 50 % sữa. Tỷ lệ vi khuẩn và môi trường đông khô : tỷ lệ cần ly tâm / môi trường là 35g:100ml cho kết quả tốt nhất . Thời gian nuôi cấy tối ưu là 26h. Điều kiện

bảo quản tốt nhất là ở 4°C

2.3. Xây dựng qui trình kiểm nghiệm : Đã xây dựng được qui trình phân lập định danh , định lượng hai vi khuẩn *B.bifidum* và *L.acidophilus*, độ nhiễm khuẩn, độ ẩm của chế phẩm

2.4. Khả năng đề kháng/ kháng sinh

-Chủng *Bifidobacterium* đề kháng với Imidazol, Cefamandol, Cefotaxim, Cefoperazon, Cefalexin, Tetracyclin, Erythromycin, Rifampicin; nhạy với Amoxicillin, Amoxicillin + acid clavulanic, Ampicillin + sulbactam, Chloramphenicol, Clindamycin, Metronidazol, Vancomycin. Nhạy cảm trung gian với Ciprofloxacin.

-Chủng *Lactobacillus* nhạy cảm với Amoxicillin, Amoxicillin + acid clavulanic, Ampicillin + sulbactam, Cefamandol, Vancomycin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Erythromycin, Rifampicin; đề kháng với Imidazol, Cefotaxim, Cefalexin, Clindamycin, Metronidazol; nhạy cảm trung gian với Cefotaxim

Như vậy có thể sử dụng các probiotic này cùng với một số kháng sinh đường uống để phòng ngừa loạn khuẩn.

2.5. Chiết tách và xác định plasmid *B.bifidum* và *L.acidophilus*: có plasmid đề kháng . Vạch plasmid của *B. bifidum* khoảng 17kb, *L. acidophilus* khoảng 15kb.

Thử nghiệm tiếp hợp giữa *L. acidophilus* với *E. coli* K12F⁻ và tiếp hợp giữa *L. acidophilus*, *S. faecalis*, kết quả không có sự tiếp hợp xảy ra.

2.6. Kết quả thử độc tính cấp và bán cấp chế phẩm *B.bifidum* và *L.acidophilus* cho thấy bột vi khuẩn đông khô không độc tính.

2.7. Độ ổn định: Bột vi khuẩn đông khô bảo quản được 12 tháng vẫn cho kết quả tốt, hiện nay đang tiếp tục theo dõi.

2.8. Hiệu quả kinh tế: với môi trường tự chế và hiệu suất tăng trưởng cao gấp 3000 lần, sau khi đông khô 1g thành phẩm chỉ bằng 1/5 giá cùng loại biệt dược đang lưu hành trên thị trường.

3.Nghiên cứu bào chế viên bao chứa amoxicillin và acid clavulanic

3.1.Nghiên cứu công thức và quy trình bào chế viên bao amoxicillin và acid clavulanic

Quá trình thăm dò, thiết lập qui hoạch thực nghiệm, bào chế thực nghiệm, xử lý

bằng phần mềm Inform tìm công thức và qui trình tối ưu, kết quả:

- Công thức 1viên nhân được xác định gồm:

Amoxicilin trihydrat (*) 500 mg Clavulanat kali (**) 125 mg

Tá dược A (rã) 44 mg Tá dược B (rã) 7,7 mg

Tá dược C(trơn) 11 mg Tá dược D(độ) 137,8 mg

- Qui trình bào chế theo phương pháp xát hạt khô

- Thành phần dịch bao và các thông số của qui trình bao viên

Công thức cho 10 kg hỗn dịch bao:

HPMC	0,66 kg	PEG	0,20 kg
Talc	0,20 kg	Titandioxyd	0, 44 kg
Ethanol	6,00 kg	Nước cất	2,50 kg

- Thông số của quy trình bao

Cho viên vào nồi bao, thổi sạch bụi trên bề mặt viên và làm nóng viên trong 10 phút.

Điều chỉnh các thông số của qui trình bao:

Vận tốc nổi bao 1-2 vòng/ phút. Áp suất khí phun 2 kg/ cm².

Tốc độ phun 25-35 g/ phút Nhiệt độ khí vào 50 °C.

Nhiệt độ khí ra 40 °C. Sấy khô sau khi bao 50 °C/ 10 phút.

- Công thức và qui trình bào chế ổn định, có tính lặp lại, thích hợp cho viên chứa 2 thành phần amoxicilin và acid clavulanic. Lớp bao có khả năng bảo vệ tốt, kéo dài tuổi thọ của thuốc.

3.2.Về tiêu chuẩn chất lượng viên bao

Viên bao đạt tiêu chuẩn chất lượng theo USP XXIV

3.3.Về độ ổn định và tuổi thọ của viên bao

- Độ ổn định của thuốc được khảo sát ở 2 điều kiện 25 °C/ 60% RH và 30 °C/ 65% RH. Cảm quan bên ngoài của viên không thay đổi theo thời gian bảo quản. Tuy nhiên, bột viên bên trong thay đổi màu theo thời gian từ trắng ngà đến vàng chanh, vàng nhạt, vàng sậm, đến vàng nâu. Hàm lượng và độ hòa tan giảm theo thời gian bảo quản, tốc độ giảm càng nhanh khi nhiệt độ và độ ẩm càng cao.

- Tuổi thọ được tính ở điều kiện bảo quản 25 °C/ 60% RH là 27 tháng, tuổi thọ của sản phẩm được đề nghị là 24 tháng (2 năm) với điều kiện bảo quản ở 25 °C và độ ẩm tương đối là 60%.

3.4. Về tương đương sinh học

- Kết quả thử độ hòa tan của viên nghiên cứu và viên đối chiếu cho thấy thuốc nghiên cứu tương đương sinh học *in vitro* với thuốc đối chiếu Augmentin về độ hòa tan

- Các thông số dược động học C_{max}, AUC₀₋₅ và T_{max} đạt được từ 12 người Việt Nam tình nguyện sau khi uống viên nghiên cứu và viên đối chiếu Augmentin được dùng để đánh giá tương đương sinh học *in vivo* của thuốc. Các phương pháp phân tích phương sai và khoảng tin cậy 90% được sử dụng để phân tích thống kê

- Trường hợp amoxicillin

- C_{max}: 6,148 - 7,275 µg/ ml; giới hạn 80-120% của C_{max} từ thuốc đối chiếu là 5,181-7,772 µg/ ml.

- AUC₀₋₅: 15,234-18,017 µg.giờ/ ml; giới hạn 80-120% của AUC₀₋₅ từ thuốc đối chiếu là 13,052-19,579 µg.giờ/ ml.

- T_{max}: 1,66 - 2,11 giờ; giới hạn 80-120% của T_{max} từ thuốc đối chiếu là 1,47-2.20 giờ

- Trường hợp acid clavulanic

- C_{max}: 3,058 - 3,389 µg/ ml; giới hạn 80-120% C_{max} của acid clavulanic từ thuốc đối chiếu là 2,287 - 3,430 µg/ ml.

- AUC: 7,299-8,305µg.giờ/ ml; giới hạn 80-120% AUC của acid clavulanic từ thuốc đối chiếu là 5,923-8,884µg.giờ/ ml.

- T_{max}: 1,72-2,06 giờ; giới hạn 80-120% T_{max} của acid clavulanic từ thuốc đối chiếu là 1,51-2,2 giờ.

- **Kết luận:** thuốc nghiên cứu tương đương sinh học *in vivo* với thuốc đối chiếu Augmentin.

3.5. Khả năng ứng dụng

- Hồ sơ nghiên cứu viên bao chứa amoxicillin và acid clavulanic 625mg đáp ứng yêu cầu hồ sơ đăng ký thuốc generic theo thông lệ quốc tế, lần đầu tiên loại thuốc generic được sản xuất trong nước có xác định tương đương sinh học và đã được CỤC DƯỢC

Việt Nam cấp số đăng ký.

• Quy trình bào chế có thể triển khai sản xuất công nghiệp

4. Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật vi nang để bào chế thuốc viên vitamin có sinh khả dụng và độ ổn định cao

4.1. Đề tài đã nghiên cứu tương đối hoàn thiện kỹ thuật vi nang bằng phương pháp tách pha đông tụ chế tạo vi nang vitamin B₁₂ trên thiết bị bình đông tụ 10 lít có mô tơ cánh khuấy. Một số thông số kỹ thuật chính đã được nghiên cứu lựa chọn như sau :

Cyanocobalamin 5g, Castor Wax 14,8g ; môi trường đông tụ n-hexan 1868ml + isopropanol 132ml, tốc độ khuấy 400 vòng/phút.

Nhiệt độ môi trường đông tụ khi hoà tan Castor wax $70^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, nhiệt độ đông tụ tạo vi nang $40^{\circ}\text{C} - 35^{\circ}\text{C}$, nhiệt độ làm cứng vỏ vi nang $5^{\circ}\text{C} - 10^{\circ}\text{C}$.

Cần cho thêm Tween 80 tỉ lệ 2,5% so với vỏ vi nang vào thành phần bột vi nang để đảm bảo độ hoà tan vitamin.

4.2. Đã nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của vi nang vitamin B₁₂, bào chế bằng phương pháp tách pha đông tụ, và viên nén vitamin B₁, B₆, B₁₂ (bào chế từ vi nang vitamin B₁₂).

4.3. Đã nghiên cứu xây dựng được qui trình bào chế vi nang vitamin B₁₂ qui mô thử nghiệm 5g vitamin B₁₂. Qua thử nghiệm dự tính vi nang có độ ổn định trên 2 năm, độ hoà tan vitamin trên 75%.

4.4. Đã nghiên cứu xây dựng được qui trình bào chế viên nén chứa vitamin B₁, vitamin B₆, vitamin B₁₂ qui mô thử nghiệm 1 - 5 vạn viên. Qua thử nghiệm dự tính viên nén có độ ổn định trên 2 năm và độ hoà tan vitamin trên 75%.

4.5. Đã nghiên cứu kỹ thuật vi nang bằng phương pháp phun đông tụ chế tạo vi nang vitamin B₁₂. Tuy thiết bị tự tạo chưa hoàn chỉnh nhưng cho thấy một số thông số kỹ thuật thích hợp tạo vi nang như sau :

- Nhiệt độ đầu phun, khí nén $87^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Nhiệt độ buồng đông tụ $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Nhiệt độ cách thuỷ nóng chảy hỗn hợp phun $90^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Áp lực phun 4KG/cm², tốc độ phun 3 - 5 g/phút.
- Cần thêm vào tá dược vỏ vi nang Castor Wax tỉ lệ 5% PEG 4000 hoặc Tween

80 (2,5%) để đảm bảo độ hoà tan vitamin.

4.6. Kết quả nghiên cứu cho thấy việc áp dụng phương pháp tách pha đông tụ và phương pháp phun đông tụ chế tạo vi nang vitamin B₁₂ đã nâng cao độ ổn định của các vitamin này trong viên nén nhiều thành phần.

4.7. Các số liệu nghiên cứu cho thấy kỹ thuật vi nang vitamin B₁₂ có tính khả thi ứng dụng vào sản xuất. Để triển khai công nghệ vi nang trong sản xuất thuốc viên vitamin cần tiếp tục đầu tư nghiên cứu hoàn thiện và nâng công suất thiết bị chế tạo vi nang cũng như quy trình bào chế vi nang, qui trình sản xuất thuốc viên từ vi nang ở qui mô lớn hơn.

5. Nghiên cứu điều chế nguyên liệu dược dụng và viên nén magaldrat

5.1. Điều chế nguyên liệu Magaldrat

Đã xác định các thông số thích hợp cho quy trình điều chế Magaldrat đạt tiêu chuẩn dược dụng (USP 23), phổ nhiễu xạ tia X đã chứng minh đây là phức hợp nhôm-magnesi hydroxyd sulfat hoàn toàn mới, không phải là sự pha trộn của hỗn hợp nhôm hydroxyd và magnesi hydroxyd tạo thành.

5.2. Bào chế viên nén Malumix 400 mg, 480 mg và 550 mg từ Magaldrat

Từ nguyên liệu Magaldrat đạt tiêu chuẩn, đã tiến hành nghiên cứu dạng bào chế viên nén Malumix trị viêm loét DDTT ở các liều thích hợp tương tự như thuốc ngoại nhập cùng loại.

5.3. Tiêu chuẩn hoá chất lượng cho các dạng bào chế Malumix

Đã xây dựng dự thảo tiêu chuẩn cơ sở viên nén Malumix 400 mg TC 01, 480 mg TC 02 và nén Malumix 540 mg TC 03 và kiểm nghiệm chế phẩm theo USP 24.

5.4. Đánh giá tác động dược lý và tương đương sinh học của chế phẩm Malumix

Trên mô hình thực nghiệm về tác dụng sinh học của Malumix *in vitro* và *in vivo* đã chứng minh chế phẩm Malumix có khả năng trung hoà acid và ức chế hoạt độ pepsin cao tương đương với các chế phẩm ngoại nhập cùng loại.

Trên mô hình gây loét bởi ethanol, các chế phẩm Malumix thể hiện khả năng bảo vệ tế bào niêm mạc dạ dày chuột tốt. Chỉ số loét của Malumix là 0,046 đã chứng minh thuốc có khả năng bảo vệ niêm mạc dạ dày tương đương với các thuốc ngoại nhập cùng loại.

5.5. Độ an toàn của chế phẩm Malumix

Kết quả thử nghiệm về độ an toàn cho thấy chế phẩm Malumix không gây độc tính cấp

và bán cấp trên chuột nhắt trắng với liều gấp 30 -73 lần liều điều trị.

5.6.Độ ổn định của nguyên liệu và thành phẩm Malumix

Bảo quản các nguyên liệu Magaldrat trong lọ thủy tinh nút mài và chế phẩm Malumix ở nhiệt độ từ 28-32°C, độ ẩm tương đối 72-85%, trong thời gian 48 tháng và 36 tháng. Kết quả cho thấy các đặc tính kỹ thuật của nguyên liệu và chất lượng thuốc khảo sát thay đổi không có ý nghĩa thống kê. Dự kiến tuổi thọ cho nguyên liệu Magaldrat là 48 tháng và các chế phẩm viên nén Malumix là 36 tháng.

Đề tài đã hoàn thành 2 mục tiêu nghiên cứu là tổng hợp được nguyên liệu Magaldrat được dụng đồng thời bào chế được viên nén Malumix 400 mg, 480 mg và 540mg có tác dụng điều trị viêm loét dạ dày-tá tràng tương tự thuốc ngoại nhập cùng loại, sẵn sàng triển khai sản xuất công nghiệp.

6.Nghiên cứu bào chế viên nang PTKD với diclofenac natri

Về kỹ thuật bào chế

6.1.Đã nghiên cứu thành công qui trình điều chế viên nang diclofenac 100 mg tác dụng kéo dài 24 giờ (viên Difenac-KD) bằng thiết bị tăng sôi, tỉ lệ Avicel: diclofenac 2:1 tạo được vi hạt tròn đều, có bề mặt nhẵn; hiệu suất của qui trình điều chế vi hạt (tính trên vi hạt 16-20 mesh, tương ứng 840-1190 μ m) đạt 71,16% khi tỉ lệ Avicel:diclofenac:nước được dùng là 2:1:3,8 và tốc độ phun nước là 30 g/phút. Qui trình điều chế vi hạt đã được thực nghiệm trên 12 lô (cỡ lô khoảng 3500 viên) để kết luận qui trình điều chế vi hạt có hiệu suất ổn định.

6.2.Đã xác định được chất được phóng thích theo cơ chế khuếch tán qua khung trơ, đặc trưng bởi phương trình động học phóng thích

$$Q = 36,336 \sqrt{t} - 28,23$$

(Q: tỉ lệ phần trăm được chất được phóng thích tại thời điểm t ; t : giờ)

Vi hạt chưa bao có thể kéo dài độ phóng thích được chất đến 12 giờ.

6.3.Các khảo sát ở giai đoạn bao vi hạt cho phép kết luận loại polymer phù hợp là Eudragit RL. Với tỉ lệ lớp bao 1% so với lượng vi hạt, chất hoá dẻo là PEG 6000 với tỉ lệ 20% so với Eudragit RL, có thể điều chế được vi hạt phóng thích 95% diclofenac sau 24 giờ. Các khảo sát vi thể cho thấy lớp bao có độ dày khoảng 6-8 μ m và được chất phóng thích từ vi hạt theo cơ chế khuếch tán qua màng bao.

6.4.Mô hình Higuchi đã được vận dụng để phân tích động học phóng thích được chất

của viên nén Voltaren® 100 mg và của chế phẩm. Động học phóng thích dược chất của vi hạt đã bao đặc trưng bởi phương trình $Q = 30,012\sqrt{t} - 34,562$ (Q: tỉ lệ phần trăm dược chất phóng thích tại thời điểm t). Tốc độ phóng thích dược chất từ vi hạt tương đương với tốc độ phóng thích của viên nén TDKD Voltaren® 100 mg ($Q=31,392\sqrt{t} - 41,645$).

Sự phóng thích dược chất từ vi hạt đã bao được xác định là sự kết hợp 2 cơ chế khuếch tán qua khung trơ và khuếch tán qua màng bao không tan.

6.5.Độ ổn định của qui trình bao đã được khảo sát bằng cách bao 6 lô (cỡ lô khoảng 3500 viên) trong cùng điều kiện, kết quả thử độ phóng thích dược chất cho thấy độ phóng thích dược chất của 6 lô vi hạt khác nhau không có ý nghĩa.

6.6.Đã điều chế 6 lô viên nang Difenac-KD, các lô thuốc đều đạt các tiêu chuẩn về hàm lượng, độ đồng đều khối lượng (theo DĐVN). Tốc độ phóng thích dược chất giữa các lô viên nang rất đồng nhất.

Về độc tính của chế phẩm

6.7.Thử nghiệm độc tính cấp đã được thực hiện, LD₅₀ của viên Difenac-KD trên chuột nhắt trắng được xác định là 186,2 mg/kg. So với các tài liệu đã công bố, kết quả này cho thấy các tá dược và qui trình bào chế không làm tăng độc tính của diclofenac.

Về tương đương sinh học và tính chất hấp thu của viên Difenac-KD

6.8.Nghiên cứu tương đương sinh học đã được thực hiện trên 14 người tình nguyện. Đã xác định các thông số sinh khả dụng của viên Difenac-KD là: $C_{max} = 0,960 \pm 0,201$ µg/ml; $T_{max} = 3,64 \pm 1,34$ giờ; $AUC_{0-24} = 6,953 \pm 1,045$ µg.giờ/ml; $AUC_{0-\infty} = 7,218 \pm 1,163$ µg.giờ/ml và của Voltaren® 100 mg là: $C_{max} = 0,964 \pm 0,166$ µg/ml ; $T_{max} = 4,75 \pm 0,91$ giờ; $AUC_{0-24} = 7,212 \pm 1,433$ µg.giờ/ml; $AUC_{0-\infty} = 7,508 \pm 1,525$ µg.giờ/ml. Phương pháp “two one-side t test” đã được dùng để phân tích sự khác biệt giữa các số liệu của 2 thuốc và kết luận là Difenac-KD tương đương sinh học với Voltaren®100 mg (Novartis). Động học hấp thu của Difenac-KD được xác định theo phương trình $A = 32,072 t^{0,3727}$ (A: tỉ lệ phần trăm dược chất được hấp thu tại thời điểm t; t: giờ).

Về nghiên cứu xây dựng tiêu chuẩn

6.9.Tương quan giữa độ phóng thích *in vitro* và độ hấp thu *in vivo* ở mức A đã được xác định với phương trình tương quan là: $A = 0,6396D + 34,534$ ($R^2 = 0,9899$) (D: tỉ lệ phần trăm DFN phóng thích *in vitro*; A: tỉ lệ phần trăm DFN hấp thu *in vivo*). Sai số dự đoán phần trăm đã được xác định là nhỏ hơn 10% tại các thời điểm.

6.10. Dự thảo tiêu chuẩn chất lượng viên nang Difenac-KD đã được thiết lập, giới hạn phần trăm được chất phóng thích được xây dựng trên cơ sở số liệu *in vitro* của lô đã dùng để thử nghiệm sinh học. Giới hạn về độ phóng thích được chất được xây dựng tại 4 thời điểm: Giờ thứ 1: phóng thích trong khoảng 10-25%; giờ thứ 2: phóng thích trong khoảng 25-45%, giờ thứ 4: phóng thích trong khoảng 45-70%; giờ thứ 8: không ít hơn 75%.

Về độ ổn định và tuổi thọ của chế phẩm

6.11. Nghiên cứu độ ổn định theo phương pháp lão hoá cấp tốc đã được thực hiện trên 3 lô ở 2 điều kiện (30°C/độ ẩm tương đối 60% và 40°C/độ ẩm tương đối 75%). Qua kết quả khảo sát độ ổn định ở điều kiện lão hoá cấp tốc, có thể sơ bộ dự kiến tuổi thọ của thuốc là 36 tháng.

6.12. Nghiên cứu độ ổn định ở điều kiện nhiệt độ và độ ẩm bình thường đã được thực hiện trên 3 lô trong bao bì hoàn chỉnh. Kết quả thử nghiệm cho thấy viên Difenac-KD vẫn đạt được những chỉ tiêu chất lượng về cảm quan, hàm lượng và độ phóng thích được chất sau 36 tháng bảo quản. Các kết quả nghiên cứu về độ ổn định trong 2 điều kiện đã chọn khá phù hợp với nhau, cho thấy thuốc có độ ổn định cao có thể đưa ra thị trường.

7. Các kết quả khác

7.1. Về đào tạo: đề tài đã góp phần đào tạo 02 Tiến sĩ dược học, 04 Thạc sĩ dược học và nhiều dược sĩ đại học.

7.2. Về phương pháp luận nghiên cứu

- Đề tài đã ứng dụng các kỹ thuật hiện đại trong thực tiễn nghiên cứu bào chế thuốc: kỹ thuật đông khô để bảo quản vi khuẩn, kỹ thuật tạo hạt bằng máy tăng sôi, kỹ thuật vi nang hoá, kỹ thuật tối ưu hoá công thức và qui trình bào chế bằng phần mềm thông minh.

- Lần đầu tiên nghiên cứu thành công, đủ cơ sở khoa học để có thể triển khai sản xuất công nghiệp chế phẩm phóng thích kéo dài tại Việt Nam, góp phần phát triển loại chế phẩm mới.

- Triển khai trong thực tiễn các nghiên cứu xác định sinh khả dụng và tương đương sinh học của thuốc, là vấn đề mới mẻ đối với ngành dược Việt Nam.

ĐỀ NGHỊ

1. Về ứng dụng kết quả nghiên cứu trong kiểm nghiệm, đảm bảo chất lượng dược phẩm

- 1.1. Thống nhất ứng dụng phương pháp B để định lượng SER ở các đơn vị sản xuất trong nước và các cơ quan kiểm nghiệm để đảm bảo sự chính xác và tránh tranh cãi do sự chênh lệch trong kết quả định lượng.
- 1.2. Quy định thử nghiệm độ hoà tan đối với viên bao SER theo phương pháp và điều kiện đã đề nghị.
- 1.3. Cơ quan thẩm quyền nhà nước phải khẩn trương ban hành hướng dẫn thử nghiệm tương đương sinh học một cách phù hợp đối với từng loại chế phẩm generic để vừa đảm bảo chất lượng dược phẩm lưu hành vừa hướng dẫn về kỹ thuật cho cơ sở sản xuất, nghiên cứu thống nhất thực hiện.
- 1.4. Tăng cường kiểm tra và thu hồi các dược phẩm chứa SER không đảm bảo tiêu chuẩn chất lượng

2. Về ứng dụng các kỹ thuật mới trong nghiên cứu phát triển thuốc

Các kỹ thuật tạo vi hạt bằng thiết bị tăng sôi, kỹ thuật vi nang hoá, kỹ thuật đông khô, phương pháp tối ưu hoá bằng phần mềm thông minh được chứng minh là các công cụ có hiệu lực cao, có thể áp dụng hiệu quả trong thực tiễn bào chế thuốc

3. Về ứng dụng triển khai sản xuất công nghiệp

Các sản phẩm nghiên cứu đều có thể triển khai sản xuất ở qui mô công nghiệp và có ý nghĩa quan trọng trong thay thế nguồn thuốc ngoại nhập, tuy nhiên trong số này có những dược phẩm đòi hỏi đầu tư cao, đề nghị được hỗ trợ triển khai dưới hình thức dự án sản xuất 04 đối tượng: viên nang Difenac-KD phóng thích kéo dài, bột đông khô vi khuẩn lactic Bifilac, nguyên liệu Magaldrat, viên nén chứa amoxicilin và acid clavulanic.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Dược điển Việt Nam III(2002), tr.18-19, 21-22, Phụ lục 6.6, 8.2, 8.3, 8.4 và 8.6.
2. Đặng Văn Giáp (2002), *Thiết kế và tối ưu hóa công thức và quy trình*, NXB Y học, tr. 1-97.
3. Đặng Văn Giáp (2003), *Phân tích thống kê trong kiểm nghiệm Dược phẩm*, Đại học Y Dược Tp Hồ Chí Minh, tr. 36- 44, 50- 62
4. Đặng Văn Giáp (2003), *Trắc nghiệm giả thuyết trong nghiên cứu khoa học*, Đại học Y Dược Tp Hồ Chí Minh, tr. 16-26, 36-46, 55-61.
5. Phạm Thị Minh Huệ, Võ Xuân Minh, Nguyễn Văn Long, Hồ Anh Tuấn, Nguyễn Huy Vân, (2001), "Nghiên cứu phương pháp thử hoà tan cho viên nén Nifedipine tác dụng kéo dài bằng thiết bị bơm tuần hoàn" *Tạp Chí Dược Học*(305),tr. 20-22.
6. Phạm Thị Minh Huệ, Võ Xuân Minh, Hồ Gia Huệ (2002), "Nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng viên nén Nifedipin tác dụng kéo dài", *Tạp Chí Dược Học* (315), tr. 20-22.
7. Trịnh Văn Lầu (2003), "Xác định tuổi thọ và hạn dùng của thuốc", *Thông báo kiểm nghiệm*, Viện kiểm nghiệm – Bộ Y tế, tr. 1-6.
8. Vũ Thị Bảy (1993), *Định lượng kháng sinh*, NXB Y học Hà Nội, tr. 77, 101-102.

TIẾNG ANH

9. A.Pryde and M.T. Gilbert (1980), *The Application of HPLC in Pharmaceutical Analysis, Application of High Performance Liquid Chromatography*, pp.6-11, 61-67.
10. Aratani H, Tateishi H, Negita S, " Studies on the distributions of antibiotics in the oral tissues: Experimental staphylococcal infection in rats, and effect of serratiopeptidase on the distributions of antibiotics "
11. Arthur H. Kibbe (2000), *Handbook of Pharmaceutical excipients*, 3rd ed., pp. 252-255, 392-398, 555-557, 565-567.
12. BP (1998), pp. 90 – 94; 1064 – 1066; 1592 – 1593.

13. Carl M. Metzler (1991), "Statistical Criteria", *Pharmaceutical Bioequivalence*, Marcel Dekker Inc., pp. 35-65.
14. Cheng-Hsiung Liu, Yun-Horng Kao, Shou-Chiung Chen, Theodore D. Sokoloski, Ming-Thau Sheu (1995), "In-vitro and in-vivo studies of diclofenac sodium controlled release matrix tablets", *J. Pharm. Pharmacol.*, (41), pp. 360-364.
15. Dale E. Fonner, Neil R. Anderson and Gilbert S. Banker (1981), "Material properties; Powder Characterization; Granulation and Tablet Characteristics". In: Herbert A. Lieberman and Leon Lachman. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* Vol. II, Marcel Dekker Inc., New York, pp. 22-29; 112-141; 185-261.
16. David J. Weber (1984), "Amoxicillin and Potassium Clavulanate". *An Antibiotic Combination*, pp. 120-130.
17. EP (2002), Fourth Edition, Volume I, II, pp. 383 – 386, 647, 1788.
18. Ehab A. Hosny (1996), "Formulation and comparative evaluation of bioadhesive containing diclofenac sodium and commercial enteric coated tablets in-vitro and in dogs". *Inter. J. Pharm.* (133), pp. 149-153.
19. Francis L. S. Tse, William T. Robinson and Miles G. Choc (1991), "Study design for the Assessment of Bioavailability and Bioequivalence", *Pharmaceutical Bioequivalence*, Marcel Dekker Inc., pp. 17-19.
20. Frank W. Goodhart (1989), "Centrifugal equipment", *Pharmaceutical Pelletization Technology*, Marcel Dekker Inc., pp. 101-194.
21. Giagoudakis G., Markantonis S.L. (1998), "An alternative high-performance liquid-chromatography for the determination of diclofenac and flurbiprofen in plasma", *Pharm. Bio. Anal.*, (17), pp. 897-901.
22. Gerald K. Mc Evoy (1989), "AHFs Drug Information", American Society of Hospital Pharmacists Inc., pp. 254-261.
23. Gregg Stetko, Gilbert S. Banker, and Garnete E. Peck (1993), "Mathematical modeling of an aqueous film coating process", *Pharmaceutical Technology*, p. 50-60.
24. Hincan A. Atilla, Kag H. Siherlyla (1994), "Preparation of micropellets by spray congealing", *Multiparticulate Oral Drug Delivery*, Marcel Dekker Inc., pp. 21-33.

25. Hooper L.T., Allen E., McLaughlin K., Ward C., Sioufi A. (1996) "Bioavailability of a generic sustained-release formulation of diclofenac compared with the standard sustained release formulation". *Clin. Drug Invest.*, 12 (5), pp. 259-270.
26. Hsiu-O Ho, Cheng-Hsiung Lin, Hua-Mei Lin, Ming-Thau Sheu (1997), "The development of matrix tablets for diclofenac sodium based on empirical in vitro and in vivo correlation", *J. Control. Rel.* (49), pp. 149-156.
27. ICH (2003), *Stability Testing of new Drug Substances and Products*, Q1A, pp.1-25.
28. ICH Harmonised Tripartite guideline (2003), *Stability data package for registration applications in climatic zones III and IV*, Q1F.
29. Isaac Ghebre-Sellassie, Axel Knock (1995), "Pelletization techniques", *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Marcel Dekker Inc., Vol.11, pg. 369.
30. Kenji Maeda (1993), *Requirements for Antibiotic Products of Japan*, pp. 182-185, 381, 517-521.
31. Klimes J., Sochor J., Dolezal P., Kroner J. (2001), "HPLC evaluation of diclofenac in transdermal therapeutic preparations", *Inter. J. Pharm.*, (217), pp. 153-160.
32. Lain J. McGilveray (1991), Bioequivalence: A Canadian Regulatory Perspective, *Pharmaceutical Bioequivalence*, Marcel Dekker Inc., pp 393-406.
33. Lansdorp D., Janssen T.J., Guelen P.J.M., Vree T.B. (1990), "High-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac and its hydroxy metabolites in human plasma and urine", *J. of Chromatog.*, (528), pp. 487-494.
34. Libo Yang, Reza Fassihi (1997), "Modulation of diclofenac release from a total soluble controlled release drug delivery system". *J. Control. Rel.*, (44), pp. 135-140.
35. Leon Shargel and Andrew B. Yu, Bioavailability and Bioequivalence, pp 247-271.
36. Mazzone A, et al (1990), "Evaluation of Serratiopeptidase in acute or chronic inflammation of otorhinolaryngology pathology: a multicent, double-blind, randomized trial versus placebo"
37. Moritya N. Nakata M, Nakamusa M, Takaoka M, Iwasa S, Kato K, Kakinuma A (1980), *Intestinal absorption of serrapeptase in rats*
38. N. Kochar, A. Mehta, P. Abraham and R. Bhatt, In vitro effect of *Lactobacilli* on intestinal anaerobic flora and intestinal gas, *Microecol. Ther.* 19, 1989, p.119-120

39. Palomo M.E, Ballesteros M.E., Frutos P. (1999), "Analysis of diclofenac sodium and derivatives", *J. Pharm. Biomed. Anal.*, (21), pp. 83-94.
40. Peter G. Welling (1991), "In vitro methods to determine bioavailability: In vitro-in vivo correlation", *Pharmaceutical Bioequivalence*, Marcel Dekker Inc., pp. 223-231.
41. Rong- Kun Chang, Joseph R. Robinson (1990), "Sustained drug release from tablets and particles through coating", *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets*, Marcel Dekker Inc., Vol.3, pp. 199-205.
42. Shrikant V. Dighe and Wallace P. Adams (1991), *Bioequivalence: A United States Regulatory Perspective*, Marcel Dekker Inc., pp 347-374.
43. Stuart C. Porter, Charles H. Bruno, and Gerald J. Jackson (1982), "Pan Coating of Tablets and granules". In: Herbert A. Lieberman and Leon Lachman. *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets* Vol. III, pp 73-116. Marcel Dekker, Inc., New York.
44. Santosh J. Vetticaden (1992), "Dissolution testing and the assessment of bioavailability/bioequivalence", *Pharmaceutical Dissolution*, Marcel Dekker Inc., 1992, pg. 263.
45. Susan Walter and Rodney Charles Hall (1991), *Bioequivalence: An Australian Perspective*, Marcel Dekker Inc., pp 443-450.
46. Takeda Chemical Industries, Ltd -1982 :Patent de la serrapeptase – N° 82 21599. Republique Française (bản song ngữ Nhật - Pháp).
47. US. Department of Health and Human Services – Food and Drug Administration (2001), *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, pp 1-25.
48. US. Department of Health and Human Services – Food and Drug Administration (2001), *Guidance for Industry: Stability Testing of Drug substances and Drug Products*, pp 1-5.
49. USP XXIV (2000), Vol. I, II, pp. 129-134, 182-185, 426-427, 517-521, 2000-2149. Adeyeye C.M., Li P. (1990), "Diclofenac sodium", *Analytical profiles of drug substances*, Vol.19, California Academic Press Inc., pp. 123-144.
50. W.P. Charteris, P.M. Kelly, L. Morelli and J.K Collins, Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations, *International journal of*

food microbiology 35, 1997, p. 1-27

51. W.P. Charteris, P.M. Kelly, L. Morelli and J.K Collins, Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Bifidobacterium* isolates from the human gastrointestinal tract, The society for applied microbiology, 1998, p. 333-337
52. Yi-Ming Sun, Chih-Cheng Chang, Wei-Fung Huang, Huang-Chien Liang (1997), "Fluidized-bed spray coated porous hydrogel beads for sustained release of diclofenac sodium", *J. Control. Rel.*, (47), pp. 247 -260.

LỜI CẢM ƠN

Xin Chân Thành Cảm Ơn:

Viện Kiểm nghiệm Dược phẩm Bộ Y tế - Hà nội ,
Phân Viện Kiểm nghiệm Dược phẩm tại Tp HCM,
Công ty CP Xuất Nhập Khẩu Y Tế Đồng tháp Domesco,
Công ty Dược Phẩm 3/2 Tp HCM,
Công ty Hoá - Dược Phẩm Mekopha,
Công ty Dược Phẩm TW 25,
Bệnh viện Trưng Vương,
Trường Đại học dược Mahidol Thái lan,

đã tận tình giúp đỡ để chúng tôi thực hiện tốt nghiên cứu này



Louis Pasteur

INSTITUT PASTEUR

VIỆN PASTEUR THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

XÉT NGHIỆM SINH Y HỌC – KIỂM ĐỊNH NƯỚC, THỰC PHẨM-TIÊM NGỪA-KHÁM BỆNH

252, đường Nam Kỳ Khởi Nghĩa, Quận 3 – Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Điện thoại : (84.8) 8.297303 – 8.230352 - Fax: (84.8) 8.201882

MAU XET NGHIEM SO : N 37421

NƠI GỬI : ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP HCM

LOẠI MAU XET NGHIEM : VIEN SERRAPEPTASE 5 mg M504 100604

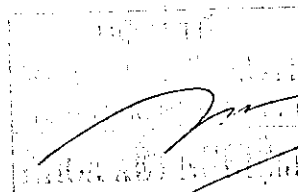
THỰC HIỆN NGÀY 24 THÁNG VIII 2004

TỔ T.X.LIEN, BS L.T.D.HUONG, XS P.N.TRAC, BS N.T.THU, BS P.M.THU, BS N.D.THUAN, BS V.T.YEN

STT	CÁC CHỈ TIÊU XÉT NGHIỆM	KẾT QUẢ	ĐƠN VỊ	TIÊU CHUẨN
1	TỔNG SỐ VI KHUẨN HIỆU KHI 37°C /24h	40	KHUẨN LAC/GR	
2	ENTEROBACTERIA	0	"	
3	TỔNG SỐ NAM MỐC NHIỆT ĐỘ THƯỜNG/5ngay/g	0	"	
4	STAPHYLOCOCCUS AUREUS	0	"	

CHÚ THÍCH :

CÁC KẾT QUẢ TRÊN CHỈ CÓ GIÁ TRỊ TRÊN CÁC MẪU THU.
MẪU THU CHỈ ĐƯỢC LƯU 2 TUẦN KÈ TỪ NGÀY NHẬN MẪU.





BỘ Y TẾ
PHÂN VIỆN KIỂM NGHIỆM
200 Cô Bắc – Q.1 – TP.HCM
☎ 8368453 – Fax: 8367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



ISO/IEC 17025
VILAS 108

PHIẾU PHÂN TÍCH

(Kết quả được đảm bảo theo mẫu gửi tới kiểm nghiệm)

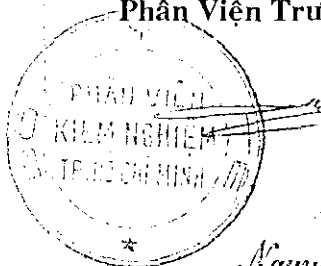
Số: 718 /PVKN-YC2004

Mẫu phân tích : Viên Serratiopeptidase 5 mg
Nơi sản xuất : Khoa dược Trường ĐHYD TP. Hồ Chí Minh
Số lô : M. 25/2002 Hạn dùng :
Số đăng ký phân tích : 23G 718 Số đăng ký :
Nơi gửi mẫu : Khoa dược Trường ĐHYD TP. Hồ Chí Minh
Người giao mẫu : Lê Văn Lăng
Người nhận mẫu : Trần Nguyễn Phương Thảo
Ngày giao nhận mẫu : 25.8.2004
Yêu cầu phân tích : Định tính, định lượng, đồng đều khối lượng, độ rã
Tiêu chuẩn áp dụng : MT/WI-VL-01*02
Tình trạng mẫu khi nhận : Viên bao phim màu vàng, đóng trong lọ đầy kín, có nhãn tạm.
Lượng mẫu gửi: 100v.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Nhận xét cảm quan		Viên nén tròn bao phim màu vàng
Độ đồng đều khối lượng	$\pm 7,5 \%$ so với KLTB viên	Đạt ($\bar{P} = 0,1794$ g)
Độ rã	Theo ĐCVN III	Đạt
Định tính	Serratiopeptidase	Đúng
Định lượng - Serratiopeptidase	90,0 % - 120,0 % Serratiopeptidase tính theo hàm lượng nhãn	Đạt (90,89 %)

Ngày 22 tháng 9 năm 2004

Phân Viện Trưởng D



Nguyễn Văn Mỏ



BỘ Y TẾ
PHÂN VIỆN KIỂM NGHIỆM
200 Cù Bắc - Q.1 - TP.HCM
☎ 8368453 – Fax: 8367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



ISO/IEC 17025
VILAS 108

PHIẾU PHÂN TÍCH

(Kết quả được đảm bảo theo mẫu gửi tới kiểm nghiệm)

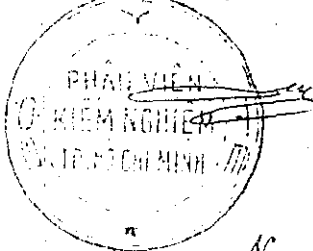
Số: 712 /PVKN-YC2004

Mẫu phân tích : Viên Serratiopeptidase 10 mg
Nơi sản xuất : Khoa dược Trường ĐHYD TP. Hồ Chí Minh
Số lô : M2. 10/2002 Hạn dùng :
Số đăng ký phân tích : 23G 717 Số đăng ký :
Nơi gửi mẫu : Khoa dược Trường ĐHYD TP. Hồ Chí Minh
Người giao mẫu : Lê Văn Lăng
Người nhận mẫu : Trần Nguyễn Phương Thảo
Ngày giao nhận mẫu : 25.8.2004
Yêu cầu phân tích : Định tính, định lượng
Tiêu chuẩn áp dụng : MT/WI-VL-01*02
Tình trạng mẫu khi nhận : Viên bao phim màu vàng đóng trong lọ đầy kín, có nhãn tạm.
Lượng mẫu gửi: 100v.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Nhận xét cảm quan		Viên nén tròn bao phim màu vàng
Định tính	Serratiopeptidase	Đúng
Định lượng - Serratiopeptidase	90,0 % - 120,0 % Serratiopeptidase tính theo hàm lượng nhãn	Đạt (90,82 %)

Ngày 22 tháng 9 năm 2004

Phân Viện Trưởng



Nguyễn Văn Mô



BỘ Y TẾ
PHÂN VIỆN KIỂM NGHIỆM
200 Cô Bắc - Q.1 - TP.HCM
☎ 8368453 - Fax: 8367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



ISO/IEC 17025
VILAS 108

PHIẾU PHÂN TÍCH

(Kết quả được đảm bảo theo mẫu gửi tới kiểm nghiệm)

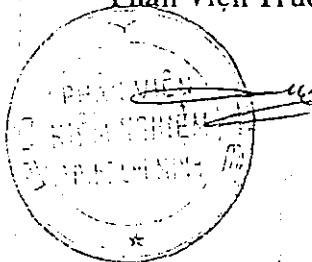
Số: 75 /PVKN-YC2004

Mẫu phân tích : Nguyên liệu Lactobacillus acidophylus
Nơi sản xuất : Bộ môn vi sinh, khoa dược - ĐHY dược TP. Hồ Chí Minh
Số lô : 01 NC Hạn dùng :
Số đăng ký phân tích : 23G 756 Số đăng ký :
Nơi gửi mẫu : Bộ môn vi sinh, khoa dược - ĐHY dược TP. Hồ Chí Minh
Người giao mẫu : Lê Thị Thanh Thảo
Người nhận mẫu : Trần Thị Quỳnh Chi
Ngày giao nhận mẫu : 06.9.2004
Yêu cầu phân tích : Định tính, định lượng, độ nhiễm khuẩn
Tiêu chuẩn áp dụng : TCNSX
Tình trạng mẫu khi nhận : Bột màu vàng nhạt, đựng trong gói nilông hàn kín, có nhãn tạm.
Số lượng mẫu gửi: 20 g.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Định tính	Lactobacillus acidophylus	Đúng
Định lượng	Không ít hơn 10^9 CFU/g	$2,3 \cdot 10^9$ CFU/g
Độ nhiễm khuẩn	Phải đạt yêu cầu quy định	Đạt

Ngày 16 tháng 9 năm 2004

Phân Viện Trưởng TC



Nguyễn Văn Mát



BỘ Y TẾ
PHÂN VIỆN KIỂM NGHIỆM
200 Cô Bắc — Q.1 — TP.HCM
☎ 8368453 — Fax: 8367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



ISO/IEC 17025
VILAS 108

PHIẾU PHÂN TÍCH

(Kết quả được đảm bảo theo mẫu gửi tới kiểm nghiệm)

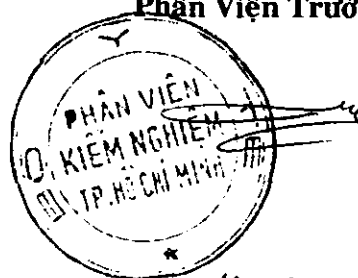
Số: 1163 /PVKN-YC2004

Mẫu phân tích : Bột vi khuẩn (*Bifido bacterium bifidum*)
Nơi sản xuất : Bộ môn Vi sinh – Ký sinh Khoa Dược ĐHYD
Số lô : Hạn dùng :
Số đăng ký phân tích : 23G 1163 Số đăng ký :
Nơi gửi mẫu : Bộ môn Vi sinh – Ký sinh Khoa Dược ĐHYD
Người giao mẫu : Lê Thị Thanh Thảo
Người nhận mẫu : Trần Nguyễn Phương Thảo
Ngày giao nhận mẫu : 24.12.2004
Yêu cầu phân tích : Định danh vi khuẩn *Bifido bacterium bifidum* + định lượng
Tiêu chuẩn áp dụng :
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đựng trong ống nhựa, không có nhãn. Lượng mẫu gửi: 05 g

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Định danh	Đúng như mô tả của Bergay's Manual of determinative bacteriology (1975)	
Định lượng	Không ít hơn 10^9 tế bào sống/1 g	Đạt (1.9×10^9 CFU/g)

Ngày 30 tháng 12 năm 2004

Phân Viện Trưởng



Nguyễn Văn Mô



BỘ Y TẾ
PHÂN VIỆN KIỂM NGHIỆM
 200 Cô Bắc — Q.1 — TP.HCM
 ☎ 8368453 — Fax: 8367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



ISO/IEC 17025
VILAS 108

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

(Kết quả được đảm bảo theo mẫu gửi tới kiểm nghiệm)

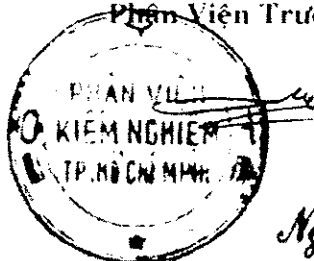
Số: 454/PVKN-YC2003

Mẫu kiểm nghiệm : Viên bao phim Co – Amoxiclav
 Nơi sản xuất : Khoa Dược – Đại học Y Dược TP.HCM
 Số lô : 010203 Hạn dùng :
 Số đăng ký kiểm nghiệm : 22G 454 Số đăng ký :
 Nơi gửi mẫu : Khoa Dược – Đại học Y Dược TP.HCM
 Người giao mẫu : Trịnh Thị Thu Loan
 Người nhận mẫu : Trần Nguyễn Phương Thảo
 Ngày giao nhận mẫu : 30.12.2003
 Yêu cầu kiểm nghiệm : Phẩm chất
 Tiêu chuẩn áp dụng : USP 24
 Tình trạng mẫu khi nhận : Viên bao phim màu trắng, dạng caplet, đóng trong bao giấy nhôm ép kín. Lượng mẫu gởi: 60v.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất		Viên bao phim màu trắng, dạng viên caplet
Định tính	Amoxicilin Acid clavulanic	Đúng Đúng
Độ hòa tan		
- Amoxicilin	Không ít hơn 85 %	Đạt (99,90 %)
- Acid clavulanic	Không ít hơn 80 %	Đạt (100,80 %)
Độ đồng đều hàm lượng		
- Amoxicilin	85 – 115 %	Đạt (RSD = 1,16 %)
- Acid clavulanic	85 – 115 %	Đạt (RSD = 2,06 %)
Hàm lượng nước	Không quá 10,5 %	Đạt (9,16 %)
Định lượng		
- Amoxicilin	90 – 120 %, $C_{16}H_{19}N_3O_5S$	Đạt (99,94 %)
- Acid clavulanic	90 – 120 %, $C_8H_9NO_5$ so với hàm lượng ghi trên nhãn	Đạt (100,14 %)

Ngày 12 tháng 1 năm 2004

Phân Viện Trưởng



Nguyễn Văn An

Phụ lục 1 :

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI	VI NANG Vitamin B ₁₂	Số TC :
TRUNG TÂM KHCN DƯỢC		Có hiệu lực từ ngày ký

1. YÊU CẦU KỸ THUẬT

1.1. Công thức điều chế :

- Cyanocobalamin	10g
- Castor Wax	29,6g
- Tween 80	0,9g
- Tinh bột sắn	vừa đủ
	200g

1.2. Nguyên liệu :

- Cyanocobalamin	Đạt tiêu chuẩn DDVN III
- Tinh bột sắn	Đạt tiêu chuẩn DDVN III - tập 3
- Castor wax	Đạt tiêu chuẩn USP 23
- Tween 80	Đạt tiêu chuẩn BP 2000

1.3. Chất lượng thành phẩm :

1.3.1. Hình thức : Bột mịn (qua rây 0,125mm), khô tới, màu hồng.

1.3.2. Độ ẩm : Không quá 3%

1.3.3 . Độ hoà tan : Không ít hơn 70% lượng vitamin B₁₂ so với hàm lượng có trong chế phẩm bột vi nang ghi trên nhãn sau 45phút.

1.3.4. Định tính : Chế phẩm phải cho phép thử định tính của vitaminB₁₂.

1.3.5. Định lượng :

- 1g chế phẩm bột vi nang phải chứa từ 0,045g - 0,055g vitamin B₁₂

2. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1. Hình thức : Thử bằng cảm quan và rây bột chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

2.2. Độ ẩm : Thử theo DDVN III, phụ lục 5.16, thực hiện ở 70⁰⁰ trong 2 giờ

2.3. Độ hoà tan : Thử theo nguyên tắc của phép thử độ hoà tan của viên nén và viên nang (phụ lục 8.4. Dược điển Việt Nam III).

- Thiết bị thử độ hoà tan kiểu cánh khuấy.
- Môi trường hoà tan: nước cất 900ml.
- Nhiệt độ: $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$
- Tốc độ khuấy: 100vòng/phút.

Phép thử 6 mẫu chế phẩm, mỗi mẫu cân chính xác 0,02g.

Dung dịch thử: Sau 45 phút hút dịch hoà tan theo nguyên tắc quy định, lọc qua màng lọc 0,45mcm.

Dung dịch chuẩn: Phụ dung dịch chuẩn gốc vitamin B₁₂ trong nước có nồng độ khoảng 2mcg/ml.

Tiến hành định lượng mẫu thử theo phương pháp HPLC như trong mục định lượng (mục 2.6.2.).

Từ diện tích hoặc chiều cao pic của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và nồng độ của dung dịch chuẩn, tính lượng acid folic đã được hoà tan từ viên.

2.4. Định tính :

Trên sắc ký đồ thu được ở phần định lượng, thời gian lưu của vitamin B₁₂ trong dung dịch thử giống thời gian lưu của vitamin tương ứng trên trong dung dịch chuẩn

2.5. Định lượng vitamin B₁₂ : phương pháp HPLC

* Điều kiện sắc ký :

- Cột Lichrosorth RP 18 (250 x 4mm; 5 hoặc 10 μm)
- Detector : 550nm
- Pha động : Nước - Methanol = 65 : 35
- Thể tích tiêm : 100 μl

* Cách thử :

- Dung dịch thử : cân chính xác một lượng bột khoảng 0,02g cho vào bình định mức 50ml, thêm 30ml nước, lắc cơ học khoảng 15 phút, thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc, đo HPLC.

- Dung dịch chuẩn : Pha dung dịch chuẩn gốc vitamin B₁₂ trong nước có nồng độ khoảng 20µg/ml. Xác định nồng độ chính xác bằng phương pháp đo quang (E 1%, 1cm) của vitamin B₁₂ tại $\lambda = 361\text{nm}$ là 207.

- Từ diện tích hoặc chiều cao pic của dung dịch thử và chuẩn, và nồng độ của dung dịch chuẩn, tính hàm lượng của vitamin B₁₂ trong viên.

3. ĐÓNG GÓI - GHI NHÃN, BẢO QUẢN

- Bột vi nang được đóng trong 2 lần túi PE hàn kín, chống ẩm, tránh ánh sáng.

- Nhãn đúng quy chế.

- Bảo quản nơi khô mát, tránh sáng.

- Thời hạn sử dụng : 24 tháng kể từ ngày sản xuất.

Ngày 15 tháng 04 năm 2004

PHÓ GIÁM ĐỐC TT KHCN DƯỢC

ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



PGS. TS. Phạm Ngọc Bùng

Phụ lục 3 :

TIÊU CHUẨN CƠ SỞ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI	VIÊN NÉN BAO PHIM Vitamin B₁, B₆, B₁₂	Số TC :
TRUNG TÂM KHCN DƯỢC		Có hiệu lực từ ngày ký04/2004.....

1. YÊU CẦU KỸ THUẬT

1.1. Công thức điều chế :

- Thiamin hydroclrid Hai trăm năm mươi miligam 125mg
- Pyridoxin hydroclorid Hai trăm năm mươi miligam 125mg
- Cyanocobalamin Một nghìn microgam 500µg

Tá dược : (tinh bột, Talc, Magnesi stearat, màu crythosin, HPMC, P.E.G 6000, Castor wax...) vừa đủ một viên.

1.2. Nguyên liệu :

- Thiamin hydroclorid Đạt tiêu chuẩn DDVN III
- Pyridoxin hydroclorid Đạt tiêu chuẩn DDVN III
- Cyanocobalamin Đạt tiêu chuẩn DDVN III
- Tinh bột sắn Đạt tiêu chuẩn DDVN III - tập 3
- Talc Đạt tiêu chuẩn DDVN III
- Magnesi stearat Đạt tiêu chuẩn DDVN III
- Màu erythrosin Đạt tiêu chuẩn Dược điển Pháp X
- P.E.G 6000 Đạt tiêu chuẩn BP 2000
- HPMC Đạt tiêu chuẩn BP 200
- Castor wax Đạt tiêu chuẩn USP 23

1.3. Chất lượng thành phẩm :

1.3.1. Hình thức : Viên bao phim màu hồng, hai mặt nhẵn, cạnh và thành viên lành lặn.

1.3.2. Độ rã : không quá 30 phút.

1.3.3. Độ đồng đều khối lượng : $\pm 7,5\%$ so với khối lượng trung bình viên.

1.3.4. Định tính : Chế phẩm phải cho phép thử định tính của vitamin B₁, vitamin B₆, vitamin B₁₂.

1.3.5. Độ hoà tan : Không ít hơn 70% lượng vitamin B₁₂ có trong một viên ghi trên nhãn sau 45 phút.

1.3.6. Định lượng : Viên bao phim vitamin B₁, B₆, B₁₂ phải chứa :

- Thiamin hydroclorid	(C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₄ S)	90,0 - 120,0%
- Pyridoxin hydroclorid	(C ₈ H ₁₁ NO ₃ HCl)	90,0 - 120,0%
- Cyanocobalamin	(C ₆₃ H ₈₈ CON ₁₄ O ₁₄)P	90,0 - 120,0%

so với hàm lượng ghi trên nhãn, tính theo khối lượng trung bình viên.

2. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1. Hình thức : Thử bằng cảm quan chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu.

2.2. Độ rã : Thử theo DDVN III (Phụ lục 8.6)

2.3. Độ đồng đều khối lượng : Thử theo DDVN III (Phụ lục 8.3)

2.4. Độ hoà tan : Thử theo nguyên tắc của phép thử độ hoà tan của viên nén và viên nang (phụ lục 8.4. Dược điển Việt Nam III).

- Thiết bị thử độ hoà tan kiểu cánh khuấy.
- Môi trường hoà tan: nước cất 900ml.
- Nhiệt độ: 37°C ± 1°C
- Tốc độ khuấy: 100vòng/phút.

Phép thử 6 viên trong 6 cốc của máy.

Dung dịch thử: Sau 45 phút hút dịch hoà tan theo nguyên tắc quy định, lọc qua màng lọc 0,45µm.

Dung dịch chuẩn: Phụ dung dịch chuẩn gốc vitamin B₁₂ trong nước có nồng độ khoảng 2mcg/ml.

Tiến hành định lượng mẫu thử theo phương pháp HPLC như trong mục định lượng (mục 2.6.2.).

Từ diện tích hoặc chiều cao pic của dung dịch thử, dung dịch chuẩn và nồng độ của dung dịch chuẩn, tính lượng acid folic đã được hoà tan từ viên.

2.5. Định tính :

2.5.1. Trên sắc ký đồ thu được ở phần định lượng, thời gian lưu của các vitamin B₁, vitamin B₆, vitamin B₁₂ trong dung dịch thử giống thời gian lưu của các Vitamin tương ứng trên trong dung dịch chuẩn (thời gian lưu của vitamin B₆ khoảng 3 phút, vitamin B₁ khoảng 7 phút, vitamin B₁₂ khoảng 6 phút).

2.5.2. Phản ứng nitrat : Tiến hành theo DDVN III, Phụ lục 7.1.

2.6. Định lượng :

2.6.1. Định lượng vitamin B₁, B₆ : Phương pháp HPLC.

*** Điều kiện sắc ký :**

- Cột Lichrosorth RP 18 (250 x 4mm, 5 hoặc 10µm)

- Detector UV : 280nm.

- Pha động :

+ Kali clorid	2 gam
+ Acid acetic băng	10ml
+ PEG 400	2ml
+ Sodium heptan sulfonat	1,1 gam
+ Methanol	150ml
+ Nước cất vđ	1000ml

- Tốc độ dòng : 1,2ml/phút

- Thể tích : 20µl

*** Cách thử :**

- Dung dịch thử : Lấy 20 viên xác định khối lượng trung bình viên. Cân chính xác một lượng bột viên tương đương với 1/5 viên cho vào bình định mức 100ml, thêm 70ml dung dịch acid acetic 1%, lắc 15 phút, sau đó thêm acid acetic 1% đến vạch lắc đều, lọc. Lấy chính xác 5ml dịch lọc cho vào bình định mức 20ml thêm acid acetic 1% đến vạch lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45µm.

- Dung dịch chuẩn : Pha dung dịch hỗn hợp các dung dịch chuẩn các vitamin B₁, B₆ trong dung dịch acid acetic 1% để có nồng độ tương đương với các vitamin trong dung dịch thử.

Dựa vào diện tích hoặc chiều cao pic tương ứng của các vitamin trong dung dịch chuẩn và dung dịch thử và nồng độ dung dịch chuẩn các vitamin trên tính được hàm lượng các vitamin trong một viên.

2.5.2. Định lượng vitamin B₁₂ : phương pháp HPLC

*** Điều kiện sắc ký :**

- Cột Lichrosorth RP 18 (250 x 4mm; 5 hoặc 10µm)
- Detector : 550nm
- Pha động : Nước - Methanol = 65 : 35
- Thể tích tiêm : 100µl

*** Cách thử :**

- Dung dịch thử : Bỏ lớp bao phim, cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với 1 viên cho vào bình định mức 50ml, thêm 30ml nước, lắc cơ học khoảng 15 phút, thêm nước vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc, đo HPLC.

- Dung dịch chuẩn : Pha dung dịch chuẩn gốc vitamin B₁₂ trong nước có nồng độ khoảng 20µg/ml. Xác định nồng độ chính xác bằng phương pháp đo quang (E 1%, 1cm) của vitamin B₁₂ tại $\lambda = 361\text{nm}$ là 207.

- Từ diện tích hoặc chiều cao pic của dung dịch thử và chuẩn, và nồng độ của dung dịch chuẩn, tính hàm lượng của vitamin B₁₂ trong viên.

3. ĐÓNG GÓI - GHI NHÃN, BẢO QUẢN

- Thuốc ép vỉ, 1 vỉ 10 viên.
- Nhãn đúng quy chế.
- Bảo quản nơi khô mát, tránh sáng.
- Thời hạn sử dụng : 24 tháng kể từ ngày sản xuất.

Ngày 15. tháng 04 năm 2004

PHÓ GIÁM ĐỐC TT KHCN DƯỢC

ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



PGS. TS. Phạm Ngọc Bùng

Phụ lục 9

**TƯ LIỆU NGHIÊN CỨU
ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA VI NANG VITAMIN B₁₂**

Tên chế phẩm : Vi nang vitamin B₁₂

Dạng bào chế : Vi nang

Hàm lượng : Chế phẩm chứa $5\% \pm 0,5\%$ vitamin B₁₂

Thành phần công thức :

Cyanocobalamin	10g
Castor wax	29,6g
Twēen 80	0,9g
Tinh bột sắn	Vđ 200g

Các chỉ tiêu chất lượng được nghiên cứu đánh giá :

- Hình thức cảm quan
- Độ ẩm
- Định tính
- Định lượng
- Độ hoà tan

Phương pháp đánh giá :

Theo tiêu chuẩn cơ sở

Số mẫu thuốc : 3 lô vi nang được bào chế theo quy trình mỗi lô 200g.

- Lô 010303 ngày sản xuất 07/03/2003
- Lô 020303 ngày sản xuất 08/03/2003
- Lô 030303 ngày sản xuất 09/03/2003

Điều kiện thử nghiệm độ ổn định :

- Thử nghiệm cấp tốc : ở $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \pm 5\%$ RH trong 6 tháng.

- Thử nghiệm dài hạn bảo quản ở điều kiện thực : nhiệt độ và độ ẩm thay đổi theo khí hậu trong 1 năm (15°C - 32°C , 65% - 85% RH) .

Kết quả thử nghiệm độ ổn định :

Bảng kết quả nghiên cứu độ ổn định của vi nang vitamin B₁₂ trong thử nghiệm cấp tốc (ở $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% $\pm$ 5% RH)

Các chỉ tiêu	Ban đầu	Sau 3 tháng	Sau 6 tháng
	Lô 010303		
Hình thức	Đạt	Đạt	Đạt
Độ ẩm	2,0%	2,2%	2,5%
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng	0,052g	0,050g	0,048g
Độ hoà tan	82,5%	81,0%	79,2%
	Lô 020303		
Hình thức	Đạt	Đạt	Đạt
Độ ẩm	2,1%	2,4%	2,7%
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng	0,053g	0,052g	0,050g
Độ hoà tan	83,2%	82,5%	80,5%
	Lô 030303		
Hình thức	Đạt	Đạt	Đạt
Độ ẩm	1,7%	2,0%	2,4%
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng	0,051g	0,050g	0,049g
Độ hoà tan	80,2%	78,5%	79,1%

Kết luận : Vi nang vitamin B₁₂ ổn định sau 6 tháng thử nghiệm cấp tốc ở $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 75% $\pm$ 5% RH.

NGƯỜI KIỂM NGHIỆM

Nguyễn Trung Hiền

15/05/2004
GIÁM ĐỐC TTKHCN DƯỢC



PGS.TS: *Trần Tử An*

Bảng kết quả nghiên cứu độ ổn định của vi nang vitamin B₁₂ trong thử nghiệm dài hạn bảo quản ở điều kiện thực.

Các chỉ tiêu	Ban đầu	Sau 6 tháng	Sau 12 tháng
Hình thức	Lô 010303 Đạt	Đạt	Đạt
Độ ẩm	2,0%	2,2%	2,4%
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng	0,052g	0,051g	0,049g
Độ hoà tan	82,5%	80,0%	78,3%
Hình thức	Lô 020303 Đạt	Đạt	Đạt
Độ ẩm	2,1%	2,3%	2,7%
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng	0,053g	0,051g	0,050g
Độ hoà tan	83,2%	80,5%	84,5%
Hình thức	Lô 030303 Đạt	Đạt	Đạt
Độ ẩm	1,7%	2,0%	2,5%
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng	0,051g	0,050g	0,049g
Độ hoà tan	80,2%	75,5%	78,5%

Kết luận : Vi nang vitamin B₁₂ ổn định sau 1 năm bảo quản ở điều kiện thực nhiệt độ 15^{0C} - 32^{0C} , độ ẩm tương đối 65% - 85%. *Thử nghiệm theo 2 năm tiếp theo*

NGƯỜI KIỂM NGHIỆM

Nguyễn Trung Hiền

15/05/2004
GIÁM ĐỐC TTKHCN DƯỢC



PGS.TS: *Trần Trí An*

Phu lục 11

TƯ LIỆU NGHIÊN CỨU

ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA VIÊN NÉN BAO PHIM VITAMIN B₁, B₆, B₁₂

Tên chế phẩm : viên nén bao phim vitamin B₁, B₆, B₁₂

Dạng bào chế : viên nén bao phim

Hàm lượng : Mỗi viên có 125mg vitamin B₁, 125mg vitamin B₆, 500mcg vitamin B₁₂

1. Công thức thuốc	cho 1viên	Cho 100.000viên
Thiamin hydroclorid	125mg	1,25kg
Pyridoxin hydroclorid	125mg	1,25kg
Vinang vitamin B ₁₂	0,5mg	50g
Lycatab	90mg	0,9kg
Avicel	90mg	0,9kg
Tinh bột sắn	55mg	0,55kg
Hồ tinh bột 10%	150mg	1,5kg
Talc	4,5mg	45g
Aerosil	3mg	30g
HPMC	9mg	90g
Titan dioxyd	3mg	10g
PEG 6000	1mg	10g
Erythrosine lake	0,1mg	1g
Ethanol 90%	0,2ml	2 lít
Bột vi nang Vitamin B₁₂ gồm có :		
Vitamin B ₁₂	0,5mg	50g
Castor wax	1,48mg	148g
Tween 80	0,05mg	5g
Tinh bột sắn	vd 10mg	vd 100kg

Các chỉ tiêu chất lượng được nghiên cứu đánh giá :

- Hình thức cảm quan
- Định tính
- Định lượng
- Độ hoà tan

Phương pháp đánh giá :

Theo tiêu chuẩn cơ sở

Số mẫu thuốc : 3 lô vi nang được bào chế theo quy trình mỗi lô 200g.

- Lô 010503 ngày sản xuất 10/05/2003

- Lô 020503 ngày sản xuất 11/05/2003

- Lô 030503 ngày sản xuất 12/05/2003

Điều kiện thử nghiệm độ ổn định :

- Thử nghiệm cấp tốc : ở $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \pm 5\%$ RH trong 6 tháng.

- Thử nghiệm dài hạn bảo quản ở điều kiện thực: nhiệt độ và độ ẩm thay đổi theo khí hậu trong 1 năm ($15^{\circ}\text{C} - 32^{\circ}\text{C}$, $65\% - 85\%$ RH) .

Kết quả thử nghiệm độ ổn định :

Bảng kết quả nghiên cứu độ ổn định của viên nén vitamin B₁, B₆, B₁₂ trong thử nghiệm cấp tốc (ở $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $75\% \pm 5\%$ RH)

Các chỉ tiêu	Ban đầu	Sau 3 tháng	Sau 6 tháng
Hình thức	Lô 010503 Đạt	Đạt	Đạt
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng:			
- Thyamin HCl	99,0%	98,5%	97,2%
- Pyridoxin HCl	102,2%	100,5%	98,5%
- Cyanocobalamin	105,5%	97,5%	93,2%
Độ hoà tan	80,5%	75,0%	79,5%
Hình thức	Lô 020503 Đạt	Đạt	Đạt
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng :			
- Thyamin HCl	100,5%	98,7%	97,5%
- Pyridoxin HCl	101,1%	100,8%	97,7%
- Cyanocobalamin	106,7%	100,5%	95,7%
Độ hoà tan	81,7%	80,6%	78,5%

	Lô 030503		
Hình thức	Đạt	Đạt	Đạt
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng :			
- Thyamin HCl	102,5%	101,2%	99,5%
- Pyridoxin HCl	99,7%	98,1%	97,7%
- Cyanocobalamin	107,5%	101,3%	95,7%
Độ hoà tan	78,5%	82,3%	75,0%

Kết luận : Viên nén vitamin B₁, B₆, B₁₂ ổn định sau 6 tháng thử nghiệm cấp tốc ở 40^oC ± 2^oC, 75% ± 5% RH.

NGƯỜI KIỂM NGHIỆM

Nguyễn Trung Hiền

15/05/2004
GIÁM ĐỐC TTKHCN DƯỢC



PGS.TS: *Trần Tử Sơn*

Bảng kết quả nghiên cứu độ ổn định của vi nang vitamin B12 trong thử nghiệm dài hạn bảo quản ở điều kiện thực.

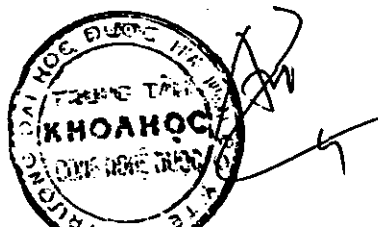
Các chỉ tiêu	Ban đầu	Sau 6 tháng	Sau 12 tháng
Hình thức	Lô 010503 Đạt	Đạt	Đạt
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng:			
- Thyamin HCl	99,0%	98,2%	97,5%
- Pyridoxin HCl	102,2%	101,3%	99,6%
- Cyanocobalamin	105,5%	98,7%	94,2%
Độ hoà tan	80,5%	77,2%	75,6%
Hình thức	Lô 020503 Đạt	Đạt	Đạt
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng :			
- Thyamin HCl	100,5%	99,2%	96,7%
- Pyridoxin HCl	101,1%	100,5%	98,5%
- Cyanocobalamin	106,7%	101,7%	95,0%
Độ hoà tan	81,7%	82,5%	79,0%
Hình thức	Lô 030503 Đạt	Đạt	Đạt
Định tính	Đạt	Đạt	Đạt
Định lượng :			
- Thyamin HCl	102,5%	100,9%	99,7%
- Pyridoxin HCl	99,7%	98,3%	97,5%
- Cyanocobalamin	107,5%	102,5%	96,2%
Độ hoà tan	78,5%	80,5%	77,5%

Kết luận : Viên nén vitamin B₁, B₆, B₁₂ ổn định sau 1 năm bảo quản ở điều kiện thực nhiệt độ 15^{0C} - 32^{0C} , độ ẩm tương đối 65% - 85%.
Hợp tác thực hiện nghiên cứu
 20/04/2004

NGƯỜI KIỂM NGHIỆM

Nguyễn Tuy Hiền

GIÁM ĐỐC TTKHCN DƯỢC



BỘ Y TẾ
PHÂN VIỆN KIỂM NGHIỆM
200 Cô Bắc - Q.1 - Tp/Hồ Chí Minh
☎ 8368453 - 8368518

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số: 262 /PVKN-YC99

Mẫu kiểm nghiệm : Nguyên liệu Magaldrate
Nơi sản xuất : Bộ môn hóa lý Đại Học Y Dược Tp.Hồ Chí Minh
Số lô sản xuất, hạn dùng : Mẫu nghiên cứu 3/98 – HD: 3-2000
Số đăng ký kiểm nghiệm : 18G 162
Nơi gửi mẫu : Đại Học Y Dược
Người giao mẫu : Đỗ Minh Quang
Người nhận mẫu : Trần Thị Phước
Ngày giao nhận mẫu : 19-11-99
Yêu cầu kiểm nghiệm : Phẩm chất
Tiêu chuẩn áp dụng, tài liệu kiểm nghiệm: USP 23
Tình trạng mẫu khi nhận : Nguyên liệu dạng bột trắng, đựng trong bao PE hàn kín.

YÊU CẦU	KẾT QUẢ
Tính chất:	Bột mịn màu trắng
Dinh tính: Phải có phản ứng hóa học đặc trưng của Magnesium Aluminum	Đúng Đúng
Giảm khối lượng do sấy khô: Phải từ 10,0 – 20,0%	Đạt (16,28%)
Chloride hòa tan: Không được quá 3,5%	Đạt
Sulfate hòa tan: Không được quá 1,9%	Đạt
Natrium: Không được quá 0,11%	Đạt
Kim loại nặng: Không được quá 0,006%	Đạt
Magnesium hydroxide $Mg(OH)_2$: Hàm lượng Magnesium hydroxide $Mg(OH)_2$, phải đạt từ 49,2 – 66,6% tính trên chế phẩm đã sấy khô	Đạt (50,07%)
Aluminum hydroxide $Al(OH)_3$: Hàm lượng Aluminum hydroxide, $Al(OH)_3$, phải đạt từ 32,1 – 45,9% tính trên chế phẩm đã sấy khô	Đạt (33,19%)
Định lượng: Hàm lượng Magaldrate, $Al_3Mg_{10}(OH)_3(SO_4)_2$, phải đạt từ 90,0 – 105,0%, tính trên chế phẩm đã sấy khô	Đạt (91,72%)
Tạp chất hữu cơ bay hơi:	
- Metylen clorid:	Không quá 500 ppm Đạt
- Benzen:	Không quá 100 ppm Đạt
- Trichloroethylen:	Không quá 100 ppm Đạt
- Chloroform:	Không quá 50 ppm Đạt
- 1,4 - Dioxan:	Không quá 100 ppm Đạt
Hàm lượng Sulfat: Hàm lượng SO_4 phải nằm trong khoảng 16,0 đến 21,0% tính trên chế phẩm khan	Đạt (19,62%)
Đô nhiễm khuẩn: Phải đạt yêu cầu qui định	Đạt



BỘ Y TẾ
PHÂN VIỆN KIỂM NGHIỆM
200 C6 Bắc — Q.1 — TP.HCM
☎ 8368453 — Fax: 8367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



ISO/IEC 17025
VILAS 108

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

(Kết quả được đảm bảo theo mẫu gửi tới kiểm nghiệm)

Số : 824 /PVKN-YC2004

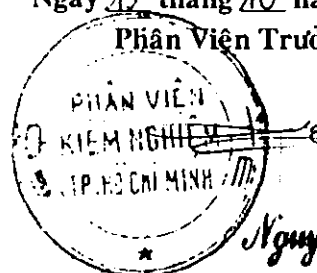
Mẫu kiểm nghiệm : Viên Malumix (Magaldrate 480 mg)
Nơi sản xuất : Khoa Dược ĐHYD – Bộ môn hóa lý
Số lô : Không Hạn dùng : Không
Số đăng ký kiểm nghiệm : 23G 824 Số đăng ký :
Nơi gửi mẫu : Khoa Dược ĐHYD – Bộ môn hóa lý
Người giao mẫu : Đỗ Minh Quang
Người nhận mẫu : Trần Nguyễn Phương Thảo
Ngày giao nhận mẫu : 20.9.2004
Yêu cầu kiểm nghiệm : Phẩm chất
Tiêu chuẩn áp dụng : USP 24
Tình trạng mẫu khi nhận : Thuốc màu trắng ngà đóng trong chai nhựa trắng có dán nhãn tam.
Lượng mẫu gửi: 100v.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất		Viên nén tròn, màu trắng, 2 mặt trơn, cạnh và thành viên lành lặn
Độ đồng đều khối lượng	Theo USP 24	Đạt (RSD = 0,9604)
Độ rã	Không quá 2 phút	Đạt (1 phút)
Định tính	Magnesi Nhôm	Đúng Đúng
Độ hấp thu acid	Theo USP 24	Đạt (14 mEq)
Hàm lượng magnesi hydroxyd	Từ 492 mg đến 666 mg $Mg(OH)_2$ /1 g magaldrat	Đạt (585,3 mg)
Hàm lượng nhôm hydroxyd	Từ 321 mg đến 459 mg $Al(OH)_3$ /1 g magaldrat	Đạt (345,7 mg)
Định lượng - Magaldrat	Từ 90,0 % đến 110,0 % $Al_5Mg_{10}(OH)_{31}(SO_4)_2$	Đạt (103,1 %)
Độ nhiễm khuẩn	Phải đạt yêu cầu quy định	Đạt

KẾT LUẬN: Mẫu thử đạt yêu cầu phẩm chất theo USP 24./-

Ngày 15 tháng 10 năm 2004

Phân Viện Trưởng,



Nguyễn Văn Mỏ

BỘ Y TẾ PHÂN VIỆN KIỂM NGHIỆM TIÊU CHUẨN CƠ SỞ		Số TC : 0610-33-14 M TRA Ngày 22 tháng 11 năm 04
BỘ Y TẾ SỞ Y TẾ ĐỒNG THÁP CÔNG TY CỔ PHẦN XNK Y TẾ DOMESCO	Viên nang DIFENAC-KD 100mg	Có hiệu lực từ :

I. YÊU CẦU KỸ THUẬT

1.1 Công thức điều chế cho một viên :

Diclofenac natri : Một trăm miligam 100 mg
Tá được vừa đủ một viên

1.2 Chất lượng nguyên phụ liệu :

Diclofenac natri : Đạt theo tiêu chuẩn USP 24
Avicel : Đạt theo tiêu chuẩn USP 24
HPMC : Đạt theo tiêu chuẩn USP 24
Eudragit RL : Đạt theo tiêu chuẩn USP 24
PEG 6000 : Đạt theo tiêu chuẩn USP 24

1.3 Chất lượng thành phẩm:

- 1.3.1 **Mô tả:** Viên nang không màu, trong suốt, bên trong có chứa các vi hạt hình cầu màu trắng hoặc trắng ngà.
- 1.3.2 **Độ đồng đều khối lượng:** $\pm 7,5\%$ so với khối lượng trung bình của lượng vi hạt chứa trong một nang.
- 1.3.3 **Độ hòa tan:** Lượng diclofenac natri hoà tan trong môi trường thử phải đạt các giới hạn sau
- | | |
|-----------|--------------------|
| Sau 1 giờ | : 10 – 25% |
| Sau 2 giờ | : 25 – 45% |
| Sau 4 giờ | : 45 – 70% |
| Sau 8 giờ | : Không ít hơn 75% |
- 1.3.4 **Định tính:** Bột thuốc nghiền từ vi hạt có trong nang phải cho phản ứng của diclofenac natri
- 1.3.5 **Định lượng:** Hàm lượng diclofenac natri $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ trong mỗi viên nang phải đạt từ 95 - 105 mg tính theo khối lượng trung bình của viên

II. PHƯƠNG PHÁP THỬ

2.1 **Mô tả:** Bằng cảm quan chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu

2.1 **Độ đồng đều khối lượng:** Thử theo ĐDVN III-2002, phụ lục 8.3

2.3 **Độ hòa tan:**

Điều kiện:

- Môi trường: 1000 ml đệm phosphat pH 6,8 (Lấy 22,4 ml NaOH 0,2M và 50 ml KH_2PO_4 0,2M pha loãng với nước vừa đủ 200 ml)
- Dụng cụ: giỏ.
- Tốc độ quay: 50 vòng /phút.

Cách tiến hành:

Cho vào mỗi giỏ 1 viên nang, sau mỗi 1 giờ, 2 giờ, 4 giờ, 8 giờ, rút chính xác 10 ml dung dịch pha loãng (nếu cần) để được các dung dịch thử như sau:

- Sau 1 giờ: không pha loãng
- Sau 2 giờ: hút chính xác 5 ml dung dịch pha loãng với đệm phosphat pH 6,8 thành 10 ml.
- Sau 4 giờ: hút chính xác 5 ml dung dịch pha loãng với đệm phosphat pH 6,8 thành 25 ml.
- Sau 8 giờ: hút chính xác 5 ml dung dịch pha loãng với đệm phosphat pH 6,8 thành 50 ml.

*Dung dịch chuẩn: cân chính xác khoảng 50 mg diclofenac natri chuẩn cho vào bình định mức 100 ml, hòa tan và thêm vừa đủ đến vạch bằng dung dịch đệm phosphat pH 6,8. Hút chính xác 1 ml dung dịch này pha loãng với đệm pH 6,8 thành 50 ml.

Đo độ hấp thụ của các dung dịch thử và chuẩn ở bước sóng 276 nm.

Nồng độ diclofenac natri hòa tan được tính theo công thức sau:

Sau 1 giờ:

$$C_1(\%) = \frac{A_t}{A_c} \times \frac{m_c}{100} \times \frac{1}{50} \times C\% \times \frac{1000}{0.1} \times 100$$

Sau 2 giờ:

$$C_2(\%) = \left(\frac{A_t}{A_c} \times m_c \times \frac{1}{50} \times C\% \times \frac{990}{0.1} \times \frac{10}{50} \right) + \frac{10}{1000} \times C_1$$

Sau 4 giờ:

$$C_3(\%) = \left(\frac{A_t}{A_c} \times m_c \times \frac{1}{50} \times C\% \times \frac{980}{0.1} \times \frac{25}{5} \right) + \frac{10}{1000} \times C_1 + \frac{10}{990} \times C_2$$

Sau 8 giờ:

$$C_4(\%) = \left(\frac{A_t}{A_c} \times m_c \times \frac{1}{50} \times C\% \times \frac{970}{0.1} \times \frac{50}{5} \right) + \frac{10}{1000} \times C_1 + \frac{10}{990} \times C_2 + \frac{10}{980} \times C_3$$

Với:

A_t : Độ hấp thụ của mẫu thử

A_c : Độ hấp thụ của mẫu chuẩn

m_c : Khối lượng chuẩn (g)

$C\%$: Hàm lượng của chuẩn

Yêu cầu:

a). *Lần thử thứ nhất*: Thử trên 6 viên, không được có viên nào vượt quá giới hạn cho phép tại mỗi các thời điểm 1, 2, 4 giờ và không được có viên nào hoà tan ít hơn 75% tại thời điểm 8 giờ; nếu không đạt thực hiện thử lần thử hai.

b). *Lần thử thứ hai*: Thử trên 6 viên, giá trị trung bình của 12 viên đã thử (Lần 1 + lần 2) phải nằm trong giới hạn cho phép tại mỗi thời điểm 1, 2, 4 giờ và không ít hơn 75% tại thời điểm 8 giờ. Không được có viên nào lệch quá giới hạn dưới -10% hoặc quá giới hạn trên +10% và không có viên nào hoà tan ít hơn 65% ở điểm cuối cùng (8 giờ), nếu không đạt, thực hiện thử nghiệm lần 3.

c). *Lần thử thứ 3*: Thử trên 12 viên, giá trị trung bình của 24 viên đã thử (lần 1+ lần 2+ lần 3) phải nằm trong giới hạn cho phép tại mỗi thời điểm 1, 2, 4 giờ và không ít hơn 75% tại thời điểm 8 giờ. Không quá 2 viên lệch quá giới hạn dưới -10% hoặc giới hạn trên +10% hoặc hoà tan ít

BỘ Y TẾ
PHẦN VIỆN KIỂM NGHIỆM
ĐÃ THẨM TRA

ĐÃ THẨM TRA

1. Ngày bắt đầu tính từ 1... năm ch

ch A).

ethanol.

ong khi, quan sát

1. có Kí phù hợp

gồm dung dịch

1 ml dung dịch

p 1 tìm dụng cụ

sắc ký lỏng hiệu

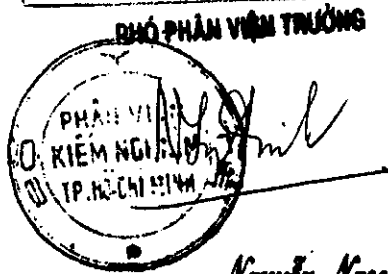
g 282 nm.

siêu âm loại khí

phosphoric 0,1% và

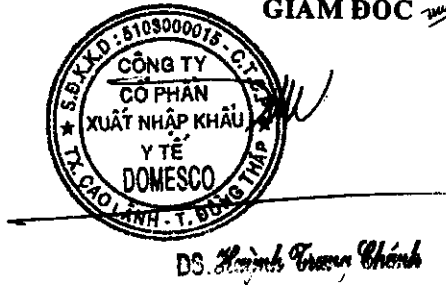
III. ĐÓNG GÓI - GHI NHÃN - BẢO QUẢN - HẠN DÙNG

- Ép vỉ 10 viên
- Nhãn đúng qui chế
- Bảo quản nơi khô mát, tránh ánh sáng
- Hạn dùng 24 tháng



Nguyễn Ngọc Vinh

Cao Lãnh, ngày 1 tháng 11 năm 2004
GIÁM ĐỐC



Như
Tô Huỳnh Thu?



BỘ Y TẾ
PHÂN VIỆN KIỂM NGHIỆM
200 Cô Bắc — Q.1 — TP.HCM
☎ 8368453 — Fax: 8367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



ISO/IEC 17025
VILAS 108

Số: 244 /PVKN-TC2004

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

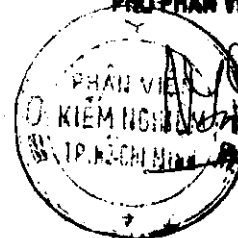
Mẫu kiểm nghiệm : Viên nang DIFENAC – KD (Diclofenac SR 100 mg)
Nơi sản xuất : Cty cổ phần XNK Y tế Domesco
Số lô : 02 Hạn dùng :
Số đăng ký kiểm nghiệm : 23Gtc 244 Số đăng ký :
Nơi gửi mẫu : Cty cổ phần XNK Y tế Domesco
Người giao mẫu : Lê Hậu
Người nhận mẫu : Trần Nguyễn Phương Thảo
Ngày giao nhận mẫu : 27.9.2004
Yêu cầu kiểm nghiệm : Thẩm tra tiêu chuẩn và kiểm tra phẩm chất
Tiêu chuẩn áp dụng : TCCS
Tình trạng mẫu khi nhận : Viên nang ép vỉ bấm 10v có in nhãn. Lượng mẫu gửi: 100v.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất	Viên nang không màu, trong suốt, bên trong có chứa các vi hạt hình cầu màu trắng hoặc trắng ngà	Đạt
Độ đồng đều khối lượng	$\pm 7,5$ KLTB vi hạt trong nang	Đạt ($\bar{M} = 0,4059$ g)
Định tính	Diclofenac natri	Đúng
Độ hòa tan	Theo TCCS	Đạt
Định lượng - Diclofenac natri	95 % - 105 % $C_{14}H_{10}Cl_2NNaO_2$ so với hàm lượng ghi trên nhãn	Đạt (100,83 %)

KẾT LUẬN: Mẫu thử lô số 02 đạt yêu cầu phẩm chất theo TCCS./-

Ngày 22 tháng 11 năm 2004

KT. Phân Viện Trưởng
PHÓ PHÂN VIỆN TRƯỞNG



Nguyễn Ngọc Vinh