

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

Nguyễn Văn Hân

**CẢI TIẾN PHƯƠNG PHÁP
BÁN TỔNG HỢP ARTESUNAT,
BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG SINH HỌC
VIÊN NÉN ARTESUNAT - PIPERAQUIN**

Chuyên ngành: Công nghệ dược phẩm

Mã số: 62 73 01 01

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI – 2010

Công trình được hoàn thành tại:

Trường Đại học Dược Hà Nội

Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương

Người hướng dẫn khoa học:

PGS. TS. Đỗ Hữu Nghị

TS. Nông Thị Tiến

Phản biện 1: **GS.TS. Đào Văn Phan**

Phản biện 2: **GS.TSKH. Phan Đình Châu**

Phản biện 3: **PGS.TS. Nguyễn Văn Minh**

Luận án đã được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Nhà nước, họp tại Trường Đại học Dược Hà Nội, vào hồi 8 giờ 00 ngày 09 tháng 04 năm 2010.

Có thể tìm hiểu luận án tại:

Thư viện Quốc gia Việt Nam

Thư viện Trường Đại học Dược Hà Nội

CÁC CHỮ VIẾT TẮT DÙNG TRONG LUẬN ÁN

ASU	: Artesunat
CP	: Dược điển Trung Quốc (Chinese Pharmacopoeia)
DDVN	: Dược điển Việt Nam
HPTR	: Hệ phân tán rắn
IP	: Dược điển Quốc tế (International Pharmacopoeia)
IR	: Phổ hồng ngoại (Infra Red spectrometry)
KST	: Ký sinh trùng
LD ₅₀	: Liều gây chết 50% (Lethal dose)
MS	: Phổ khối lượng (Mass Spectrometry)
NMR	: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance spectrometry)
<i>p</i>	: Ngưỡng xác suất trong kiểm định thống kê
SD	: Độ lệch chuẩn (Standard deviation)
USP	: Dược điển Mỹ (The United States Pharmacopoeia)
\bar{X}	: Giá trị trung bình
β -CD	: β -cyclodextrin

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

Bệnh sốt rét do ký sinh trùng kháng thuốc đang gia tăng ở nhiều nơi trong vùng nhiệt đới, gây khó khăn cho việc chọn thuốc điều trị. Để chống hiện tượng kháng thuốc lan rộng, xu hướng được chấp nhận hiện nay là sử dụng phác đồ phối hợp giữa một dẫn xuất artemisinin với một thuốc khác có thời gian bán thải dài. Trên thực tế, các thuốc phối hợp có hiệu quả cao hiện nay còn ít và đều có những nhược điểm nhất định. Việc phát triển các thuốc phối hợp hiệu quả, an toàn, dễ cung ứng là nhu cầu cấp thiết.

Trong số các dẫn xuất của artemisinin, artesunat được dùng rộng rãi nhất và là thuốc then chốt trong điều trị bệnh sốt rét nặng. Tuy nhiên, artesunat rất khó tan trong nước nên sinh khả dụng không ổn định. Do vậy, cần có biện pháp cải thiện độ tan của artesunat trước khi đưa vào các dạng bào chế.

Ở Việt Nam, nguyên liệu artesunat đã được sản xuất trên quy mô công nghiệp. Nhưng quy trình sản xuất có sử dụng xúc tác pyridin, một hoá chất độc hại và gây ô nhiễm. Nghiên cứu cải tiến quy trình, qua đó giảm ô nhiễm và độc hại trong quá trình sản xuất cũng là việc làm cần thiết.

Từ thực tế đó, đề tài được tiến hành nhằm khắc phục những tồn tại của artesunat và nhằm phát triển một thuốc phối hợp mới của artesunat trong điều trị bệnh sốt rét.

Mục tiêu của luận án

- 1. Cải tiến phương pháp bán tổng hợp artesunat nhằm hạn chế độc hại trong quá trình sản xuất.*
- 2. Cải thiện độ tan của artesunat bằng kỹ thuật phân tán rắn.*

3. *Bào chế viên nén phối hợp artesunat - piperacquin.*
4. *Đánh giá độc tính cấp và tác dụng diệt ký sinh trùng sốt rét trên chuột nhắt trắng của viên phối hợp artesunat-piperacquin.*

Nội dung của luận án

1. Đánh giá khả năng xúc tác của natri bicarbonat cho phản ứng bán tổng hợp artesunat, khảo sát các yếu tố ảnh hưởng và lựa chọn phản ứng cho hiệu suất cao.
2. Chế tạo hệ phân tán rắn (HPTR) của artesunat với chất mang β -cyclodextrin. Đánh giá một số tính chất của HPTR thu được: trạng thái vật lý, kích thước tiểu phân, độ tan, tốc độ hoà tan, độ ổn định và hoạt tính chống sốt rét.
3. Bào chế viên nén phối hợp artesunat-piperacquin: xây dựng công thức và phương pháp bào chế, xây dựng tiêu chuẩn và phương pháp kiểm tra chất lượng, theo dõi độ ổn định của viên phối hợp.
4. Xác định độc tính cấp và đánh giá hiệu lực chống sốt rét trên động vật thực nghiệm của viên phối hợp đã bào chế.

Những đóng góp mới của luận án

1. Bán tổng hợp được artesunat đạt tiêu chuẩn DĐVN III bằng phản ứng sử dụng natri bicarbonat/acetone với hiệu suất 89,4%. Natri bicarbonat dễ kiếm, rẻ tiền, ít độc, có thể thay thế được pyridin độc hại và gây ô nhiễm.
2. Lần đầu tiên trong nước đã ứng dụng thành công kỹ thuật phân tán rắn để cải thiện độ tan của artesunat. HPTR artesunat dễ tan trong nước, ổn định và có hoạt tính chống sốt rét tốt hơn so với artesunat nguyên liệu.

3. Xây dựng được phương pháp định lượng piperacilin trong chế phẩm bào chế bằng sắc ký lỏng. Phương pháp đơn giản, phù hợp với điều kiện thiết bị hiện có.
4. Lần đầu tiên trong nước và trên thế giới, viên nén phối hợp artesunat-piperacilin được nghiên cứu bào chế và đánh giá hiệu lực chống sốt rét. Những nghiên cứu tiền lâm sàng cho thấy phối hợp artesunat-piperacilin rất có triển vọng trong điều trị bệnh sốt rét. Phối hợp có các ưu điểm tiện dùng, an toàn, hiệu quả và giá thành hợp lý.

Cấu trúc của luận án

Luận án có 135 trang (không kể phụ lục và tài liệu tham khảo), 47 bảng, 31 hình. Bố cục gồm các phần: Mở đầu (2 trang); Tổng quan (39 trang); Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu (15 trang); Thực nghiệm và kết quả (53 trang); Bàn luận (23 trang); Kết luận và đề xuất (2 trang); Danh mục các bài báo đã công bố liên quan đến luận án (1 trang). Luận án có 170 tài liệu tham khảo (15 trang) và 11 phụ lục (34 trang).

Chương 1. TỔNG QUAN

Phần tổng quan trình bày khái quát về tình hình kháng thuốc của ký sinh trùng (KST) sốt rét, sự cần thiết phải phối hợp thuốc và ưu nhược điểm của một số thuốc phối hợp hiện có trong điều trị bệnh sốt rét. Tổng quan về hai dược chất artesunat và piperacilin, những biện pháp đã sử dụng để tăng độ tan và độ ổn định của artesunat. Khái niệm về HPTR, thành phần, cấu trúc, phương pháp chế tạo, cơ chế làm tăng độ tan dược chất, các biện pháp hạn chế tái kết tinh dược chất và các phương pháp xác định tính chất của HPTR.

Chương 2. NGUYÊN LIỆU, THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu, dung môi, hoá chất

Các nguyên liệu, hóa chất, dung môi, tá dược đều là loại dược dụng hoặc tinh khiết phân tích. Các dung môi sắc ký đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC.

2.2. Ký sinh trùng và động vật thực nghiệm

KST sốt rét loài *P. berghei* chủng kháng cloroquin (K70), được giữ giống tại Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương. Chuột nhắt trắng chủng Swiss, do Viện Vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

2.3. Thiết bị nghiên cứu

Sử dụng các thiết bị bào chế, thiết bị phân tích tin cậy của Trường Đại học Dược Hà Nội, Trường Đại học Khoa học tự nhiên - Đại học quốc gia Hà Nội, Viện Hoá học các hợp chất thiên nhiên - Trung tâm Khoa học tự nhiên và Công nghệ Quốc gia, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

2.4.1. Phương pháp bán tổng hợp artesunat

- Đánh giá khả năng xúc tác của natri bicarbonat cho phản ứng bán tổng hợp artesunat, so sánh với xúc tác pyridin truyền thống. Khảo sát ảnh hưởng của các yếu tố dung môi, nhiệt độ, tỉ lệ các chất tham gia phản ứng đến hiệu suất, mức độ triệt để và thời gian phản ứng, từ đó lựa chọn được các điều kiện phản ứng thích hợp để có hiệu suất cao.
- Chứng minh cấu trúc sản phẩm artesunat tổng hợp được dựa trên các dữ liệu phổ IR, ¹H-NMR, MS.
- Đánh giá chất lượng sản phẩm artesunat theo DĐVN III.

2.4.2. Phương pháp bào chế

Chế tạo HPTR của artesunat:

HPTR của artesunat được chế tạo bằng phương pháp phun sấy, tiến hành qua 2 bước:

Bước 1: chuẩn bị dung dịch artesunat và chất mang

Hoà tan artesunat trong ethanol 96%. Hoà tan chất mang β -cyclodextrin trong nước ở 80⁰C, để nguội đến khoảng 40⁰C. Phối hợp 2 dung dịch, siêu âm trong 15 phút.

Bước 2: phun sấy

Tiến hành phun sấy dung dịch trên máy Büchi Mini Spray Dryer B-191 với các thông số thiết bị thích hợp.

Bào chế viên nén phối hợp artesunat-piperaquin:

Tiến hành theo phương pháp dập thẳng: trộn đều dược chất và tá dược, dập viên trên máy thủ công Unicam hoặc máy tâm sai KP2. Viên có hình trụ dẹt, đường kính 12 mm.

Máy thủ công Pye Unicam: cân lượng bột kếp cho từng viên. Nạp bột vào cối và nén thành viên dưới lực nén xác định.

Máy tâm sai KP2: cho bột kếp vào phễu phân phối hạt. Điều chỉnh máy để viên có khối lượng và độ cứng theo qui định.

2.4.3. Phương pháp kiểm nghiệm

Phương pháp đánh giá tính chất của HPTR:

- *Hình dạng, kích thước:* hình dạng tiểu phân HPTR được xác định trên kính hiển vi điện tử quét. Kích thước tiểu phân được xác định với sự hỗ trợ của phần mềm CorelDraw 12.
- *Khối lượng riêng biểu kiến:* dùng máy ERWEKA SVM.
- *Mất khối lượng do làm khô:* dùng cân xác định hàm ẩm nhanh YMC IB-30.

- *Tốc độ trơn chảy*: đo trên máy ERWEKA GWF.
- *Độ tan của artesunat*: hoà tan bão hoà artesunat trong nước ở $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Xác định lượng artesunat hoà tan bằng phương pháp sắc ký lỏng.

Phương pháp đánh giá chất lượng viên nén:

- *Độ mài mòn*: xác định trên máy ERWEKA TA10.
- *Lực gãy vỡ viên*: đo trên máy ERWEKA TBH20.
- *Độ rã*: xác định trên máy ERWEKA ZT31.
- *Độ đồng đều khối lượng và hàm lượng viên*: tiến hành theo DĐVN III.
- *Giới hạn tạp chất liên quan*: phương pháp sắc ký lớp mỏng, tiến hành theo DĐVN III.

Phương pháp định lượng:

Định lượng artesunat: phương pháp sắc ký lỏng. Các điều kiện sắc ký được tham khảo từ IP 2003 và DĐVN III.

Định lượng piperquin phosphat:

- Phương pháp đo quang: đo độ hấp thụ của dung dịch ở bước sóng 347 nm (tham khảo CP 2005).
- Phương pháp sắc ký lỏng: các điều kiện sắc ký như sau:
Cột sắc ký: Discovery C₁₈, 150 x 4,6 mm, 5 μm
Bước sóng phát hiện: 347 nm
Thể tích mẫu tiêm: 20 μL
Tốc độ dòng: 1 mL/phút
Pha động: dung dịch đệm phosphat 0,01M pH 2,7 - acetonitril - triethylamin (94:6:1).

Phương pháp thử độ hoà tan:

Điều kiện hoà tan:

Thiết bị: máy cánh khuấy.

Môi trường hoà tan: 900 mL nước cất.

Tốc độ quay: 100 vòng/phút.

Xác định lượng artesunat hoà tan bằng phương pháp sắc ký lỏng và lượng piperquin phosphat hoà tan bằng phương pháp đo quang.

Phương pháp đánh giá độ ổn định của thuốc:

Độ ổn định của HPTR artesunat:

Mẫu theo dõi được đựng trong ống nghiệm thủy tinh sạch, nút nhựa kín, bảo quản trong điều kiện nhiệt độ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$, thời gian theo dõi 6 tháng. Các chỉ tiêu theo dõi: hàm lượng artesunat, độ hoà tan, trạng thái vật lý.

Độ ổn định của viên nén artesunat-piperaquin:

Viên nén phối hợp artesunat-piperaquin sau khi bào chế được đóng gói trong lọ thủy tinh, nắp nhựa kín và bảo quản trong tủ vi khí hậu (nhiệt độ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$) trong thời hạn 24 tháng. Các chỉ tiêu đánh giá: hình thức, hàm lượng, tạp chất liên quan và độ hoà tan. Tuổi thọ của thuốc được tính toán bằng phần mềm STAB của FDA.

Các phương pháp phân tích phổ:

Phổ nhiễu xạ tia X: ghi trên máy D8-Advance với các thông số: góc quét $10^{\circ} - 50^{\circ}$, bước quét $0,030^{\circ}$.

Giản đồ nhiệt vi sai: xác định trên máy DSC-TGA 131 với các thông số: tốc độ gia nhiệt $10^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, thời gian 30-35 phút.

Phổ hồng ngoại (IR): ghi trên máy Perkin Elmer theo kỹ thuật đĩa nén với kali bromid.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): ghi trên máy AVANCE-500-BRUKER.

Phổ khối lượng (MS): đo trên máy Agilent 6310 Ion Trap.

2.4.4. Phương pháp đánh giá tác dụng sinh học

Phương pháp xác định độc tính cấp của thuốc:

Chuột nhắt trắng cả hai giống, cân nặng 20 ± 2 gam, chia mỗi nhóm 10 con. Cho mỗi nhóm chuột uống một liều thuốc duy nhất và tăng dần giữa các nhóm. Thuốc được phân tán trong dung dịch gồm arabic 1% ngay trước khi cho uống. Theo dõi tình trạng chung và tỉ lệ chết ở mỗi nhóm trong vòng 72 giờ. Kết quả LD₅₀ được tính toán với sự trợ giúp của phần mềm EPA Probit 1.5.

Đánh giá hoạt tính chống sốt rét *in vivo* của thuốc:

Hoạt tính chống sốt rét *in vivo* của thuốc được đánh giá trên chuột nhắt trắng nhiễm *P. berghei* chủng kháng cloroquin, theo phương pháp thường qui của Viện Sốt rét - Ký sinh trùng - Côn trùng Trung ương.

Gây mô hình sốt rét thực nghiệm bằng cách tiêm vào màng bụng chuột 0,2 mL dịch treo hồng cầu chứa khoảng 10^7 KST. Cho chuột uống thuốc sau 24 giờ gây nhiễm. Thuốc được chia thành 3 liều, mỗi ngày cho chuột uống 1 liều. Theo dõi diễn biến mật độ KST hằng ngày, từ ngày N0 (là ngày chuột uống liều thuốc đầu tiên) đến ngày N7, sau đó tại các ngày N10, N14, N17, N21, N24 và N28. Các chỉ số đánh giá: thời gian sạch KST, tỷ lệ chuột khỏi bệnh, tỷ lệ chuột tái phát KST, tỷ lệ chuột chết.

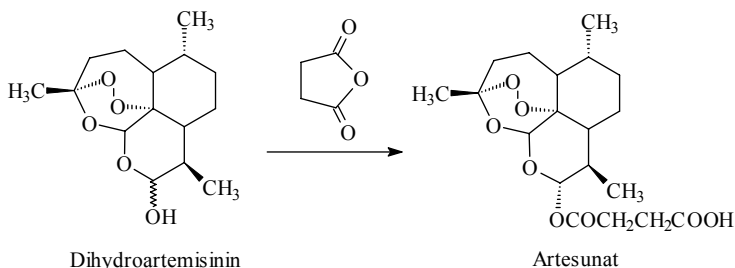
2.4.5. Xử lý và biểu thị các kết quả nghiên cứu

Các kết quả nghiên cứu được xử lý bằng công cụ thống kê thích hợp và được biểu thị dưới dạng giá trị trung bình \pm độ lệch chuẩn ($\bar{X} \pm SD$).

Chương 3. THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ

3.1. CẢI TIẾN PHƯƠNG PHÁP BÁN TỔNG HỢP ARTESUNAT

Nguyên tắc phương pháp bán tổng hợp artesunat là tiến hành phản ứng ester hóa giữa dihydroartemisinin (DHA) và anhydrid succinic (hình 3.1).



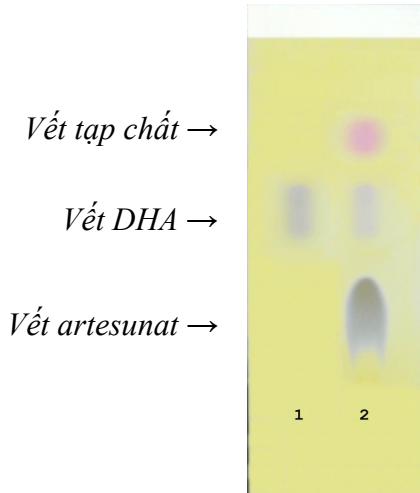
Hình 3.1. Nguyên tắc phản ứng bán tổng hợp artesunat.

Phản ứng thường được tiến hành trong dung môi dicloromethan với chất xúc tác là pyridin, một nguyên liệu độc hại và gây ô nhiễm. Chúng tôi tiến hành khảo sát khả năng sử dụng xúc tác natri bicarbonat, thay thế cho pyridin, với mục đích giảm độc hại trong quá trình sản xuất.

3.1.1. Lựa chọn dung môi cho phản ứng bán tổng hợp

Các dung môi khảo sát gồm: diethyl ether, ethyl acetat, dicloromethan, toluen, n-hexan, aceton, acetonitril, methanol. Tiến hành thí nghiệm thu được một số nhận xét như sau:

- Trong các dung môi khác nhau, phản ứng xảy ra với tốc độ, mức độ khác nhau. Phản ứng trong aceton là thuận lợi hơn cả (triệt để và tạo ra ít tạp chất nhất).
- Sắc ký lớp mỏng hỗn hợp phản ứng (hình 3.2) cho thấy ngoài vết artesunat (màu xanh tím, $R_f = 0,26$) và vết DHA (màu xanh, $R_f = 0,56$) còn xuất hiện một vết tạp chất (màu hồng, $R_f = 0,82$).



Hình 3.2. Sắc ký đồ lớp mỏng của DHA (1) và hỗn hợp phản ứng (2)

Sau khi tiến hành các thí nghiệm để khảo sát ảnh hưởng của một số yếu tố đến phản ứng bán tổng hợp, đã chọn được phản ứng cho hiệu suất cao với công thức điều chế như sau:

Dihydroartemisinin	14,20 g (50 mmol)
Anhydrid succinic	18,00 g (180 mmol)
Natri bicarbonat	20 g
Aceton	75 mL

Tiến hành phản ứng ở nhiệt độ 20-28⁰C. Với các điều kiện như trên, phản ứng xảy ra trong khoảng 24 giờ, cho hiệu suất phản ứng 94,8%. Sau khi tinh chế thu được sản phẩm với hiệu suất sau tinh chế 89,4%.

3.1.2. Bán tổng hợp artesunat qui mô 500 g DHA/mẻ

Thực hiện 6 mẻ phản ứng, mỗi mẻ 500 g DHA. Kết quả khi tăng cỡ mẻ từ 2,82g DHA lên 500g DHA, phản ứng kéo dài

hơn (32 giờ so với 24 giờ) và hiệu suất có giảm đi nhưng không đáng kể (88,1% so với 89,4%).

3.1.3. Số liệu các phổ và chất lượng sản phẩm artesunat

- Cấu trúc hoá học của artesunat được khẳng định bằng các dữ liệu phổ IR, ¹H-NMR và MS.
- Sản phẩm artesunat đã được kiểm tra chất lượng tại Viện Kiểm Nghiệm thuốc Trung Ương và được xác nhận đạt tất cả các chỉ tiêu chất lượng theo qui định của ĐDVN III.

3.2. CHẾ TẠO HỆ PHÂN TÁN RẮN CỦA ARTESUNAT

3.2.1. Xây dựng công thức và phương pháp chế tạo

Chế tạo HPTR theo phương pháp phun sấy với chất mang là β -cyclodextrin. Tiến hành khảo sát 3 công thức với tỉ lệ artesunat/ β -cyclodextrin lần lượt là (1:2), (1:4) và (1:6).

Qua khảo sát, lựa chọn được các thông số phun sấy như sau:

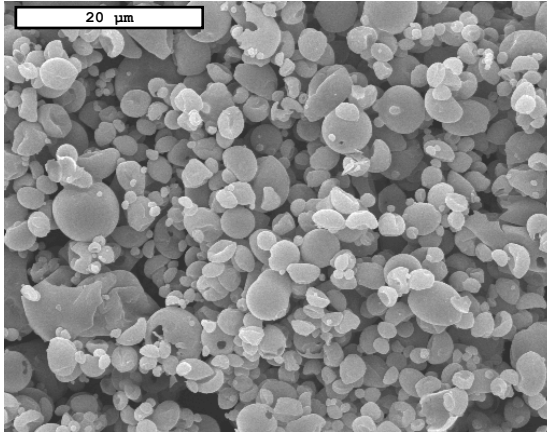
Nhiệt độ khí vào:	80 ⁰ C.
Nhiệt độ khí ra:	50-60 ⁰ C.
Lưu lượng khí vào:	700 L/giờ
Bơm hút khí thải:	maximum (khoảng 35 m ³ /giờ)
Áp suất khí phun:	0,34 MPa.
Tốc độ phun dịch:	10 mL/phút.

Sản phẩm HPTR thu được có màu trắng, khô toi, hiệu suất trên 75%. Quá trình phun sấy với các điều kiện như trên không làm phân hủy artesunat.

3.2.2. Khảo sát một số tính chất của HPTR artesunat

Hình dạng và kích thước tiểu phân:

Các tiểu phân HPTR có dạng hình cầu rỗng, bề mặt tiểu phân tương đối nhẵn. Kích thước tiểu phân phân bố trong giới hạn khá hẹp, hầu hết dưới 10 μ m, phần lớn dưới 3 μ m (hình 3.4).



Hình 3.4. Hình ảnh tiêu phân HPTR artesunat/ β -cyclodextrin (1:4) trên kính hiển vi điện tử quét, độ phóng đại 2000 lần.

Trạng thái vật lý:

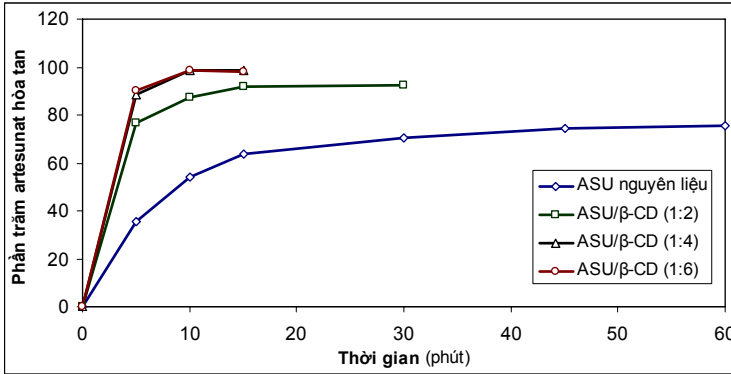
Phổ nhiễu xạ tia X và giản đồ nhiệt vi sai cho thấy artesunat trong HPTR với β -cyclodextrin tỉ lệ (1:2) tồn tại phần lớn ở dạng vô định hình. Trong khi đó các HPTR tỉ lệ (1:4) và (1:6), artesunat tồn tại chủ yếu ở dạng vô định hình.

Độ tan:

Độ tan trong nước của artesunat xác định được là $0,41 \pm 0,03$ mg/mL, của HPTR artesunat/ β -cyclodextrin (1:4) là $2,62 \pm 0,04$ mg/mL. Như vậy độ tan của artesunat tăng lên 6,4 lần khi chế dưới dạng HPTR với β -cyclodextrin.

Tốc độ hoà tan:

Artesunat nguyên liệu có tốc độ tan chậm, sau 60 phút tan được 75,3%. HPTR artesunat/ β -cyclodextrin tỉ lệ (1:2) có trên 90% artesunat hoà tan sau 15 phút. HPTR các tỉ lệ (1:4) và (1:6), artesunat hoà tan gần như hoàn toàn sau 10 phút (hình 3.8).



Hình 3.8. Tốc độ hoà tan artesunat từ các HPTR

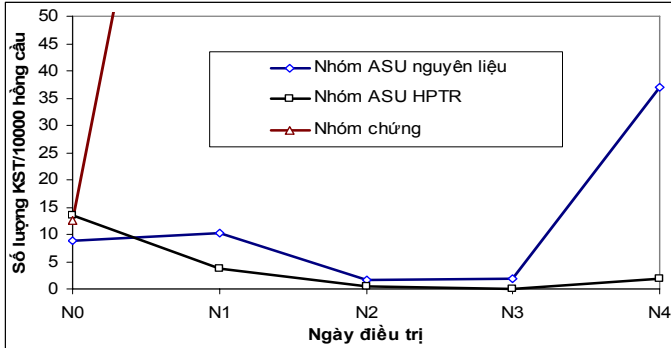
Tóm lại, HPTR artesunat/ β -cyclodextrin (1:4) có tỉ lệ dược chất ở dạng vô định hình cao hơn, tốc độ hoà tan nhanh hơn so với HPTR tỉ lệ (1:2) và không khác biệt đáng kể so với HPTR tỉ lệ (1:6). Do đó HPTR tỉ lệ (1:4) được chọn sử dụng trong các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.3. Đánh giá độ ổn định của HPTR artesunat

Theo dõi độ ổn định của HPTR artesunat/ β -cyclodextrin (1:4) theo phương pháp lão hoá cấp tốc. Kết quả cho thấy HPTR artesunat ổn định sau 6 tháng bảo quản về các chỉ tiêu hàm lượng dược chất, tốc độ hoà tan và trạng thái vật lý.

3.2.4. Đánh giá hoạt tính chống sốt rét của HPTR artesunat

HPTR artesunat có tác dụng làm giảm mật độ KST trong máu nhanh hơn so với artesunat dạng nguyên liệu (hình 3.11). Ở nhóm chuột uống artesunat nguyên liệu, mật độ KST chỉ giảm được 82% sau 48 giờ, sau đó tăng dần trở lại từ ngày N3. Trong khi đó, mật độ KST ở nhóm điều trị bằng HPTR artesunat giảm 72% sau 24 giờ, 97% sau 48 giờ và 99,7% sau 72 giờ điều trị.



Hình 3.11. Diễn biến mật độ KST trong các ngày N0 – N4

3.3. BÀO CHẾ VIÊN NÉN ARTESUNAT-PIPERAQUIN

3.3.1. Sự tương hợp giữa artesunat và piperacuin phosphat

Sự tương hợp của artesunat và piperacuin phosphat được khảo sát bằng 2 phương pháp: phân tích nhiệt và lão hóa cấp tốc. Kết quả đã chứng minh 2 dược chất này khi tiếp xúc với nhau không có những tương tác lý hoá ảnh hưởng đến độ ổn định của nhau. Như vậy có thể phối hợp chúng trong cùng một viên.

3.3.2. Xây dựng công thức và phương pháp bào chế viên nén phối hợp

Qua khảo sát trên máy dập viên thủ công Unicam, lựa chọn được công thức và phương pháp bào chế viên nén artesunat-piperacuin như sau:

Công thức bào chế (tính cho 1 viên):

HPTR artesunat/ β -cyclodextrin (1:4)	230 mg
(tương đương 50 mg artesunat)	
Piperacuin phosphat tetrahydrat	350 mg
(tương đương 320 mg piperacuin phosphat khan)	
Tinh bột mì	60 mg
Talc	15 mg
Acid stearic	15 mg

Với công thức bào chế như trên, tiến hành dập viên trên máy tâm sai KP2. Điều chỉnh máy để viên có khối lượng trung bình khoảng 670 mg và lực gây vỡ viên trong khoảng 60 - 80 N. Các mẫu viên thu được có một số chỉ tiêu chất lượng như sau:

Độ bền cơ học và độ rã:

Các mẫu viên nén có độ mài mòn 0,5-0,6%, đạt yêu cầu theo USP 28 (không quá 0,8%) và độ rã 7-8 phút, đạt yêu cầu theo ĐĐVN III (không quá 15 phút).

Độ đồng đều khối lượng và hàm lượng:

Độ đồng đều khối lượng và hàm lượng viên đạt qui định theo ĐĐVN III.

Độ hoà tan:

Các mẫu viên có tỉ lệ dược chất hoà tan sau 30 phút cao và khá đồng đều giữa các mẻ (bảng 3.29).

Bảng 3.29. Phần trăm dược chất hoà tan sau 30 phút (n=6)

Mẻ	Artesunat	Piperaquin
1	92,4 ± 2,2	85,7 ± 2,9
2	92,6 ± 2,4	86,8 ± 4,4
3	91,2 ± 4,2	83,6 ± 2,6

Tóm lại, các mẫu viên bào chế với máy dập viên tâm sai đạt các chỉ tiêu chất lượng chung của viên nén theo qui định của ĐĐVN III và có độ hoà tan tốt.

3.3.3. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng artesunat và piperaquin trong viên phối hợp

▪ Phương pháp định lượng artesunat

Định lượng artesunat trong viên nén đơn thành phần bằng sắc ký lỏng đã được qui định trong ĐĐVN III và IP 2003. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đạt yêu cầu các tiêu chuẩn:

tính chọn lọc, tính tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng, có thể áp dụng để định lượng artesunat trong viên phối hợp.

▪ **Phương pháp định lượng piperquin phosphat**

Phương pháp đo quang:

Định lượng piperquin phosphat trong viên nén đơn thành phần bằng đo quang đã được qui định trong CP 2005. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đạt yêu cầu các tiêu chuẩn: tính chọn lọc, tính tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng, có thể áp dụng để định lượng piperquin phosphat trong viên phối hợp.

Phương pháp sắc ký lỏng:

Qua khảo sát, nhận thấy với các cột pha đảo thông thường và với pha động tham khảo từ các tài liệu là acetonitril - dung dịch kali dihydrophosphat 0,01M (8:92), pic của piperquin luôn có hiện tượng kéo đuôi rõ rệt. Với một điều chỉnh nhỏ là thêm vào pha động 1% triethylamin, hiện tượng kéo đuôi giảm rõ rệt, pic nhọn và cân xứng.

Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp định lượng piperquin phosphat bằng sắc ký lỏng đã xây dựng đảm bảo tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng và độ lặp lại, có thể áp dụng để định lượng piperquin phosphat trong viên phối hợp.

3.3.4. Xây dựng tiêu chuẩn và đánh giá độ ổn định

▪ **Xây dựng tiêu chuẩn viên nén artesunat-piperquin**

Căn cứ vào kết quả nghiên cứu và dựa theo chuyên luận “viên nén artesunat” của ĐĐVN III và chuyên luận “viên nén piperquin” của CP 2005, dự thảo tiêu chuẩn viên nén phối hợp được đề xuất như bảng 3.40.

Bảng 3.40. Dự thảo tiêu chuẩn của viên nén phối hợp

Chỉ tiêu	Yêu cầu
Hình thức	Viên nén không bao màu vàng, thành và cạnh viên lành lặn.
Độ đồng đều khối lượng	Độ lệch không quá 5% so với khối lượng trung bình viên.
Định tính	Có pic của artesunat trên sắc đồ HPLC và có pic của piperacuin phosphat trên sắc ký lớp mỏng.
Độ hoà tan	Không dưới 70% lượng artesunat và 70% lượng piperacuin phosphat được hoà tan sau 30 phút.
Tạp chất liên quan	Phải đạt qui định.
Hàm lượng	Chế phẩm phải chứa 90-110% artesunat và 93-107% piperacuin phosphat so với lượng ghi nhãn.

Mẫu viên đã được kiểm tra chất lượng tại Viện Kiểm Nghiệm thuốc Trung Ương và được xác nhận đạt chất lượng theo tiêu chuẩn cơ sở đã đề ra.

▪ **Theo dõi độ ổn định của viên nén artesunat-piperacuin**

Kết quả nghiên cứu cho thấy viên nén artesunat-piperacuin ổn định sau 24 tháng bảo quản ở điều kiện nhiệt độ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$ trên các chỉ tiêu: hình thức cảm quan, tạp chất liên quan, độ hoà tan và hàm lượng dược chất. Với sự trợ giúp của phần mềm STAB, tuổi thọ của các mẫu viên được dự đoán là 35 tháng dựa trên chỉ tiêu hàm lượng dược chất.

3.4. ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA VIÊN NÉN ARTESUNAT-PIPERAQUIN

3.4.1. Xác định độc tính cấp

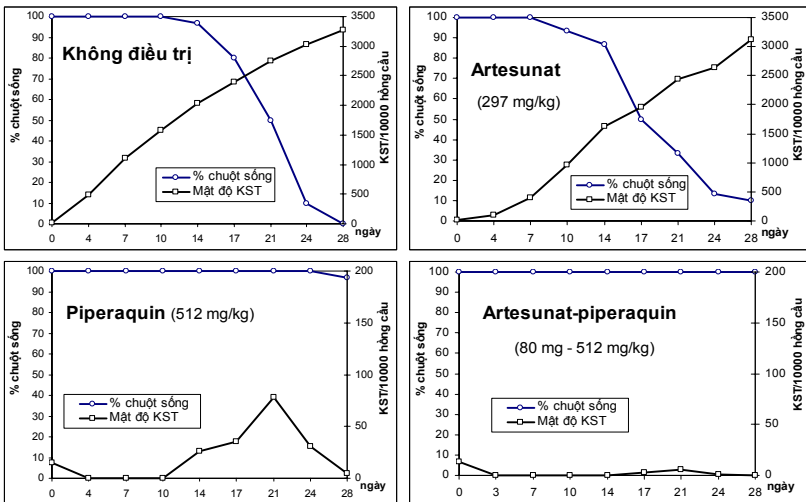
Xác định được liều gây chết 50% số chuột (LD_{50}) là:

$$\text{LD}_{50} = 1550,5 (1393,9 - 1734,8) \text{ mg/kg cân nặng.}$$

3.4.2. Đánh giá hoạt tính chống sốt rét

Hoạt tính chống sốt rét *in vivo* của viên phối hợp artesunat-piperaquin được đánh giá trên chuột nhắt trắng nhiễm *P.berghei* chủng kháng cloroquin. Kết quả tóm tắt như sau:

- Artesunat đơn thuần có tác dụng ức chế KST phát triển so với nhóm chứng, nhưng không diệt sạch hoàn toàn KST.
- Piperaquin phosphat đơn thuần cho tỉ lệ khỏi bệnh và không tái phát là 10/30 chuột (33,3%). KST trong máu sạch hoàn toàn từ ngày thứ 4 sau điều trị, nhưng xuất hiện trở lại từ ngày thứ 10. Tổng số chuột tái phát trong vòng 28 ngày là 20/30 chuột (66,7%).
- Thuốc phối hợp artesunat-piperaquin có tác dụng diệt sạch KST từ ngày thứ 3. Chỉ có 2/30 chuột (6,7%) tái phát KST trong vòng 28 ngày, nhưng sau đó 2 chuột này đều khỏi bệnh trở lại. Đến ngày 28, tất cả 30 chuột đều sống và sạch KST (khỏi bệnh 100%) (hình 3.22).



Hình 3.22. Hiệu lực điều trị của artesunat, piperaquin và thuốc phối hợp artesunat-piperaquin

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Phương pháp bán tổng hợp artesunat

Nhằm thay thế pyridin và dicloromethan độc hại trong tổng hợp artesunat, chúng tôi đã khảo sát và nhận thấy phản ứng dùng xúc tác natri bicarbonat/acetone cho hiệu suất tốt (89,4%), không kém nhiều so với phản ứng dùng pyridin/dicloromethan (91,9%). Phản ứng dùng xúc tác natri bicarbonat/acetone có 2 ưu điểm quan trọng, đó là các nguyên liệu sử dụng ít độc, ít gây ô nhiễm và phương pháp tinh chế đơn giản.

4.2. Hệ phân tán rắn của artesunat

So với các biện pháp tăng độ tan khác, kỹ thuật phân tán rắn áp dụng với artesunat, sử dụng phương pháp phun sấy và chất mang β -cyclodextrin có một số ưu điểm sau:

- Khắc phục đồng thời hai nhược điểm của artesunat là ít tan và kém ổn định.
- Sản phẩm phun sấy trơn chảy tốt và dễ chịu nén, thích hợp để bào chế viên nén bằng phương pháp dập thẳng.

Artesunat dưới dạng HPTR có tác dụng làm giảm mật độ KST trong máu nhanh hơn so với artesunat dạng nguyên liệu thông thường. Kết quả này chứng tỏ artesunat dưới dạng HPTR được hấp thu qua đường tiêu hóa tốt hơn so với artesunat dạng nguyên liệu ban đầu.

4.3. Bào chế viên nén artesunat-piperaquin

▪ Công thức và phương pháp bào chế

Để đảm bảo độ ổn định của các dược chất, phương pháp dập thẳng được áp dụng để bào chế viên nén. Hơn nữa, piperaquin phosphat và HPTR artesunat cũng có đặc tính trơn chảy và dễ chịu nén, thích hợp cho phương pháp dập thẳng.

Nói chung, công thức và phương pháp bào chế viên nén phối hợp khá đơn giản. Tá dược sử dụng ít và đều là những nguyên liệu thông dụng, nhưng vẫn đảm bảo viên nén đạt các chỉ tiêu chất lượng qui định. Tuy nhiên, công thức và qui trình bào chế mới được nghiên cứu ở qui mô phòng thí nghiệm. Để có thể áp dụng trong sản xuất, cần thêm những khảo sát với máy dập viên công nghiệp và ở qui mô lớn hơn.

▪ **Phương pháp định lượng artesunat và piperacuin**

Phương pháp định lượng artesunat:

Để định lượng artesunat trong viên phối hợp, chúng tôi sử dụng phương pháp sắc ký lỏng với các điều kiện sắc ký được tham khảo từ DĐVN III và IP 2003. Kết quả cho thấy thành phần piperacuin phosphat không ảnh hưởng đến quá trình phân tích artesunat. Phương pháp đảm bảo tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại và độ đúng, đạt yêu cầu của một phương pháp định lượng.

Phương pháp định lượng piperacuin phosphat:

Định lượng piperacuin bằng đo quang là phương pháp đơn giản, nhưng có thể không thích hợp trong những thử nghiệm yêu cầu tính đặc hiệu cao. Vì vậy, chúng tôi tiến hành xây dựng thêm phương pháp định lượng piperacuin bằng sắc ký lỏng.

Năm 2001, Bruce Sunderland nêu ra những khó khăn khi phát triển một phương pháp phân tích piperacuin bằng sắc ký lỏng: đó là hiệu lực tách kém và hệ số bất đối xứng cao. Qua khảo sát chúng tôi cũng nhận thấy với các cột pha đảo thông thường, pic của piperacuin luôn có hiện tượng kéo đuôi rõ rệt. Việc điều chỉnh tỉ lệ dung môi hay pH của pha động không cải thiện được hệ số bất đối xứng của pic.

Piperaquin là một base amin, rất phân cực ở pH acid, nên có thể bị hấp phụ mạnh trên bề mặt pha tĩnh, gây nên hiện tượng pic kéo đuôi. Có thể khắc phục nhược điểm này bằng cách thêm vào pha động một base amin cạnh tranh, để chất này bị hấp phụ ưu tiên dẫn đến giảm thiểu sự hấp phụ của piperaquin. Kết quả cho thấy khi thêm vào pha động 1% triethylamin, pic trở nên nhọn và cân xứng. Dựa trên cơ sở đó, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp định lượng piperaquin bằng sắc ký lỏng. Phương pháp đơn giản, chỉ sử dụng các dung môi thông dụng và phù hợp với điều kiện thiết bị hiện có.

▪ **Tiêu chuẩn chất lượng và độ ổn định**

Tiêu chuẩn viên nén phối hợp artesunat-piperaquin được xây dựng trên cơ sở tham khảo các chuyên luận “viên nén artesunat” của ĐĐVN III và “viên nén piperaquin phosphat” của CP 2005. Trong đó bổ sung chỉ tiêu độ hòa tan của piperaquin. Chỉ tiêu độ hòa tan của artesunat được điều chỉnh tăng từ 60% lên 70%. Định lượng piperaquin phosphat có thể áp dụng phương pháp đo quang, hoặc áp dụng phương pháp sắc ký lỏng được xây dựng dựa trên kết quả đã nghiên cứu.

Bằng phương pháp theo dõi dài hạn, đã chứng minh viên nén artesunat-piperaquin ổn định sau 24 tháng bảo quản. Căn cứ vào tốc độ giảm hàm lượng dược chất, tuổi thọ của thuốc được dự đoán là 35 tháng.

4.4. Tác dụng sinh học của viên phối hợp

▪ **Độc tính cấp**

Liều chết trung bình đường uống (LD_{50}) của thuốc phối hợp artesunat- piperaquin xác định được là 1550,5 mg/kg cân nặng chuột, ít độc hơn so với các thuốc thành phần và một số thuốc

chống sốt rét khác (ví dụ LD₅₀ của artesunat là 1180 mg/kg, của piperquin phosphat là 1080 mg/kg, của cloroquin là 400 mg/kg). So với liều điều trị dự kiến ở người (8 viên chia 4 liều/đợt điều trị, tương đương 29,6 mg/kg ngày đầu và 14,8 mg/kg trong 2 ngày tiếp theo) thì LD₅₀ của thuốc phối hợp cao gấp 26 lần tổng liều điều trị ở người. Như vậy thuốc phối hợp có chỉ số điều trị khá rộng.

▪ Hoạt tính chống sốt rét

Hoạt tính chống sốt rét của thuốc phối hợp được đánh giá trên chuột nhiễm *P. berghei* là bước thử nghiệm quan trọng để xác định hiệu lực điều trị của các thuốc mới. Kết quả thí nghiệm cho thấy thuốc phối hợp có tác dụng diệt sạch KST trong máu nhanh và có hiệu lực điều trị cao. Tuy mới chỉ là nghiên cứu tiền lâm sàng ban đầu, nhưng cũng cho thấy phối hợp artesunat-piperquin rất có triển vọng trong điều trị bệnh sốt rét. Phối hợp có các ưu điểm tiện dùng, an toàn, hiệu quả và giá thành hợp lý (khoảng 1 đô la Mỹ cho 1 đợt điều trị), phù hợp với các yêu cầu của Tổ chức Y tế Thế giới.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

Kết luận:

1. Về cải tiến phương pháp bán tổng hợp artesunat

- Đã bán tổng hợp được artesunat đạt tiêu chuẩn DĐVN III bằng phản ứng dùng xúc tác natri bicarbonat và dung môi aceton với hiệu suất 89,4%.
- Natri bicarbonat và aceton là hóa chất dễ kiếm, rẻ tiền, ít độc, có thể thay thế được pyridin và dicloromethan độc hại và gây ô nhiễm trong qui trình sản xuất artesunat. Ngoài ra,

phản ứng dùng xúc tác natri bicarbonat dễ tinh chế hơn so với phản ứng dùng xúc tác pyridin.

2. Về hệ phân tán rắn của artesunat

- Đã chế tạo được HPTR của artesunat với chất mang β -cyclodextrin bằng phương pháp phun sấy. Sản phẩm có khả năng hoà tan tốt và thích hợp để sử dụng trong dạng thuốc viên nén.
- HPTR của artesunat ổn định về trạng thái vật lý, hàm lượng và khả năng giải phóng dược chất trong 6 tháng ở điều kiện lão hoá cấp tốc (nhiệt độ $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$).
- Artesunat dưới dạng HPTR có hoạt tính chống sốt rét tốt hơn so với artesunat nguyên liệu.

3. Về bào chế viên nén artesunat-piperaquin

- Đã xây dựng được công thức bào chế viên nén phối hợp artesunat 50 mg - piperaquin phosphat 320 mg bằng phương pháp dập thẳng ở qui mô phòng thí nghiệm.
- Đã xây dựng và thẩm định các phương pháp định lượng artesunat bằng sắc ký lỏng, phương pháp định lượng piperaquin bằng đo quang và sắc ký lỏng. Các phương pháp định lượng trên có thể ứng dụng để xác định hàm lượng artesunat và piperaquin trong viên phối hợp.
- Đã xây dựng được tiêu chuẩn cơ sở cho viên nén artesunat-piperaquin.
- Đã bước đầu theo dõi độ ổn định của viên nén artesunat-piperaquin. Sản phẩm giữ được chất lượng sau 24 tháng bảo quản ở nhiệt độ $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, độ ẩm tương đối $75 \pm 5\%$. Tuổi

thọ của sản phẩm được dự đoán là 35 tháng dựa trên chỉ tiêu hàm lượng dược chất.

4. Về tác dụng sinh học của viên nén artesunat-piperaquin

- Đã xác định được LD₅₀ của phối hợp artesunat-piperaquin là 1550,5 mg/kg, cao gấp 26 lần tổng liều điều trị dự kiến ở người. Như vậy phối hợp có chỉ số điều trị khá rộng.
- Phối hợp artesunat-piperaquin có tác dụng nhanh và hiệu lực cao trên chuột nhiễm *P. berghei* chủng kháng cloroquin. Với tổng liều 592 mg/kg (80 mg artesunat và 512 mg piperaquin phosphat), thuốc phối hợp có tác dụng diệt sạch KST ở tất cả các chuột thử nghiệm sau 3 ngày điều trị. Đến ngày 28, tỉ lệ khỏi bệnh đạt 100%. Với những ưu điểm về hiệu lực cao, an toàn, tiện dùng và dễ cung ứng, phối hợp artesunat-piperaquin rất có triển vọng trong điều trị bệnh sốt rét.

Đề xuất:

1. Bán tổng hợp artesunat với xúc tác natri bicarbonat ở qui mô lớn hơn để có thể ứng dụng vào sản xuất.
2. Tiếp tục các thử nghiệm tiền lâm sàng và trên bệnh nhân, khẳng định tính an toàn và hiệu lực điều trị của phối hợp artesunat-piperaquin.
3. Nghiên cứu hoàn thiện qui trình bào chế viên nén artesunat-piperaquin ở qui mô lớn hơn và tiếp tục theo dõi độ ổn định để xác định đúng tuổi thọ của thuốc.

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Đỗ Hữu Nghị, Nguyễn Văn Hân (2007), “Định lượng piperacilin trong viên nén bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao”, *Tạp chí kiểm nghiệm thuốc*, 18(5), tr. 11-13.
2. Đỗ Hữu Nghị, Nguyễn Văn Hân (2008), “Tổng hợp artesunat với xúc tác natri bicarbonat”, *Tạp chí dược học*, 384, tr. 29-31.
3. Nguyễn Văn Hân, Đỗ Hữu Nghị, Trần Văn Nam (2008), “Chế tạo hệ phân tán rắn artesunat với β -cyclodextrin bằng phương pháp phun sấy”, *Tạp chí dược học*, 388, tr. 14-17.
4. Nông Thị Tiên, Trương Văn Như, Nguyễn Văn Hân, Đỗ Mạnh Hà, Bùi Thị Sáu (2009), “Đánh giá bước đầu về tính an toàn và hiệu lực trên ký sinh trùng sốt rét thực nghiệm của artesunat-piperacilin (Asukin)”, *Tạp chí phòng chống bệnh sốt rét và các bệnh ký sinh trùng*, 3, tr. 7-13.