

Nghiên cứu bào chế hệ phân tán rắn chứa itraconazol

Nguyễn Như Nam¹, Nguyễn Hữu Mạnh¹, Ngô Thị Thanh Nga¹
Lê Minh Anh¹, Nguyễn Thị Hồng Ngọc², Nguyễn Thạch Tùng¹

¹ Trường Đại học Dược Hà Nội

² Viện Kiểm nghiệm an toàn vệ sinh thực phẩm Quốc gia

Summary

The objective of this study was to formulate solid dispersion containing itraconazole (ITZ) to enhance dissolution of ITZ through investigation of the effects of both polymers and surfactants on the dissolution rate of drug from these systems. The solids were dissolved in a mixture of methanol and dichloromethane solvents, then the solvents were evaporated in a vacuum oven to obtain a solid dispersion system. Based on the solubility test of ITZ in various media together with use of optical microscope and polarized microscope, the selected solid dispersion system consisted of: ITZ, HPMC E606, HPMCP 55, Cremophor RH40, with the optimal ratio of 1:2:4:0.1 (w/w). The obtained results indicated that the dissolution rate of ITZ has significantly improved in both pH 1.2 and pH 6.8 media compared to raw material, which showed the high potential of solid dispersion in the improvement of drug oral bioavailability.

Keywords: Itraconazole, solid dispersion, polymer, surfactant.

Đặt vấn đề

Itraconazol (ITZ) là một tác nhân kháng nấm phổ rộng dùng phổ biến qua đường uống đã được chứng minh trên lâm sàng là có hiệu quả trong điều trị một loạt các bệnh nhiễm nấm. Do thuộc nhóm II trong hệ thống phân loại sinh dược học (có độ tan trong nước kém và tính thấm tốt qua màng sinh học) nên sinh khả dụng đường uống của ITZ không cao. Hơn nữa, nhiều nghiên cứu cho thấy sự dao động lớn về khả năng hấp thu giữa các cá thể và ngay trên cùng một cá thể^[1]. Dùng liều cao cùng với sự hấp thu không ổn định có thể dẫn đến tác dụng không mong muốn ở một số bệnh nhân, cũng như làm giảm hiệu quả điều trị. Như vậy, với mục đích cải thiện và ổn định sinh khả dụng (giúp giảm liều, giảm tác dụng không mong muốn), việc phát triển các công thức cải thiện độ hòa tan của ITZ là rất cần thiết.

Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu về các phương pháp tăng độ hòa tan của itraconazol. Tuy nhiên, phần lớn các nhà bào chế chỉ tập trung vào việc tăng nhanh tỷ lệ hòa tan itraconazol trong môi trường acid dạ dày. Như đã biết, độ tan của ITZ ở pH cao (1 ng/mL ở pH 7) có thể kém hơn hàng nghìn lần so với

ở pH thấp (5 µg/mL ở pH 1)^[2]. Sự hấp thu dược chất (DC) này lại xảy ra chủ yếu ở đoạn đầu ruột non, nơi có pH cao hơn hẳn pH acid trong dịch dạ dày. Nếu không có biện pháp duy trì độ hòa tan ở mức cao trong môi trường này thì khi chuyển từ dạ dày xuống ruột non, DC sẽ nhanh chóng bị kết tủa.

Từ lý do trên, đề tài được thực hiện với mục tiêu nghiên cứu bào chế hệ phân tán rắn (HPTR) chứa ITZ nhằm tăng độ hòa tan *in vitro* của ITZ trong cả môi trường pH 1,2 và pH 6,8, với mong muốn đạt được sinh khả dụng đường uống cao và ổn định hơn.

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu

Itraconazol (Ấn Độ) đạt tiêu chuẩn Dược điển Anh 2010 (BP 2010). Các tá dược hypromellose (HPMC) E606, HPMCP 55, HPMC K4M có nguồn gốc Nhật Bản (TCNSX), Gelucire 44/14, 48/16; Cremophor RH40 (CreRH) và Cremophor EL (CreEL) có nguồn gốc Pháp (EP), methanol (MeOH), dicloromethan (DCM) có nguồn gốc Trung Quốc và một số hóa chất, dung môi khác đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất.

Thiết bị

Bể lắc điều nhiệt WiseBath (Đức), kính hiển vi Nikon Eclipse Ci-L/Camera: DS-Fi2-U3 (Nhật), kính hiển vi quang học Leica được cải tiến với hai bộ lọc phân cực (Đức), máy sắc ký HPLC Agilent 1260 (Mỹ), máy quang phổ UV – VIS HITACHI U – 5100 (Nhật Bản), máy thử

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Thạch Tùng

Email: nguyenthachtung@hup.edu.vn

Ngày nhận: 22/4/2021

Ngày phản biện: 19/5/2021

Ngày duyệt bài: 22/6/2021

độ hòa tan ERWERKA DT 600 (Đức), tủ sấy chân không LV02040 Daihan Labtech (Nhật Bản), máy nghiền bi Retsch MM 200 (Mỹ) và một số thiết bị khác trong phòng thí nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp bào chế

Quy trình bào chế hệ phân tán rắn: Cân các thành phần theo tỷ lệ đã định. Hòa tan lần lượt dược chất, hypromellose, chất diện hoạt (CDH) vào hỗn hợp dung môi DCM : MeOH (1:1) với hàm lượng chất rắn là 10% (kl/tt). Phân tán 0,5% Aerosil vào dung dịch trên. Sau đó bốc hơi dung môi trong tủ sấy chân không ở 40°C đến khối lượng không đổi. Nghiền HPTR bằng máy nghiền bi và thu sản phẩm qua rây 0,25 mm. Bảo quản HPTR trong túi polyetylen để trong bình thủy tinh có chứa hạt silica gel ở điều kiện phòng và tránh ánh sáng.

Phương pháp đánh giá độ tan và độ hòa tan

Đánh giá độ tan của itraconazol trong một số môi trường

Tham khảo nghiên cứu của Kang và CS [3], phương pháp tiến hành như sau: Cho vào mỗi ống thủy tinh có nắp đậy khoảng 5 mL môi trường HCl pH 1,2 (không có hoặc có CDH đã hòa tan trước đó với nồng độ 1%) hoặc môi trường đệm phosphat pH 6,8. Thêm lượng dư ITZ vào ống, đậy chặt nắp và đặt vào bể lắc điều nhiệt ở nhiệt độ 37°C trong 48 giờ với tốc độ 100 vòng/phút. Sau đó ly tâm các ống thử ở 5000 vòng/phút trong 10 phút, hút lớp dịch phía trên, lọc qua màng lọc cellulose acetat 0,2 µm. Pha loãng bằng MeOH và định lượng nồng độ ITZ hòa tan bằng phương pháp đo quang **UV – VIS** tại bước sóng 261 nm.

Thử hòa tan trong pH 1,2

Tiến hành thử hòa tan 100 mg ITZ nguyên liệu hoặc HPTR chứa khoảng 100 mg ITZ trong 750 mL môi trường HCl pH 1,2 không có hoặc có natri lauryl sulfat (NaLS) 0,1% . Sử dụng máy thử độ hòa tan loại cánh khuấy với các thông số: tốc độ khuấy 50 vòng/phút, nhiệt độ 37 ± 0,5°C, thời gian lấy mẫu: 5, 15, 30, 60, 90, 120 phút. Mỗi lần hút 5 mL dịch, lọc qua màng lọc cellulose acetat 0,2 µm, bổ sung 5 mL môi trường mới trở lại cốc thử hòa tan. Định lượng nồng độ ITZ bằng phương pháp **HPLC**.

Thử hòa tan chuyển pH

Tham khảo nghiên cứu của Miller [1], tiến hành thử hòa tan 100 mg ITZ nguyên liệu hoặc HPTR chứa khoảng 100 mg ITZ để đánh giá độ hòa tan trong 2 môi trường có chuyển pH: 2 giờ đầu ở môi trường pH 1,2 (750 mL dung dịch HCl

pH 1,2) sau đó chuyển sang môi trường pH 6,8 trong 4 giờ tiếp theo bằng cách dùng xi lanh thêm nhanh 250 mL Na₃PO₄ 0,2 M. Các môi trường đều chứa NaLS 0,1%. Thiết bị thử là máy thử hòa tan loại cánh khuấy với các thông số như sau: tốc độ khuấy 50 vòng/phút, nhiệt độ 37 ± 0,5°C, thời gian lấy mẫu: 15, 30, 60, 90, 120, 125, 135, 150, 180, 240, 300 và 360 phút. Mỗi lần hút 5 mL dịch, lọc qua màng lọc cellulose acetat 0,2 µm, bổ sung 5 mL môi trường tương ứng trở lại cốc thử hòa tan. Định lượng nồng độ ITZ bằng phương pháp **HPLC**.

So sánh hai đường cong hòa tan: Chỉ số f_2 (similarity factor) biểu hiện cho sự giống nhau giữa hai đồ thị hòa tan và được tính toán theo công thức sau:

$$f_2 = 50 \times \lg \left\{ \left[1 + \frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n (R_i - T_i)^2 \right]^{-0.5} \times 100 \right\}$$

Trong đó: R_i : % DC hòa tan tại thời điểm i của mẫu chuẩn ($i = 1, 2, 3, \dots, n$).

T_i : % DC hòa tan tại thời điểm i của mẫu so sánh ($i = 1, 2, 3, \dots, n$).

Hai đồ thị được coi là tương tự nhau nếu f_2 nằm trong khoảng 50 đến 100. Giá trị này càng lớn thì hai đồ thị càng giống nhau.

Nghiên cứu ảnh hưởng của polyme đến quá trình kết tinh của itraconazol

Tiến hành phương pháp tráng phim tham khảo nghiên cứu của Parikh và CS [4], hòa tan một lượng ITZ và polyme vào hỗn hợp dung môi DCM : MeOH (1:1) sao cho hàm lượng chất rắn đạt 0,1 g/mL. Nhỏ một giọt lên phiến kính thủy tinh, tiến hành cán một lớp mỏng bề dày khoảng 0,2 mm. Để khô mẫu ở nhiệt độ phòng 24 giờ, quan sát dưới kính hiển vi quang học và kính hiển vi phân cực. Sau đó, mẫu được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ 40°C, độ ẩm 75% và quan sát theo thời gian. Những mẫu cho thấy hiện tượng khúc xạ kép (birefringence) (có hình ảnh tinh thể trên kính hiển vi) biểu thị có sự kết tinh.

Phương pháp xử lý số liệu

Tiến hành thực nghiệm mẫu thí nghiệm $n = 3$, tính giá trị trung bình, độ lệch chuẩn, các số liệu thống kê được xử lý bằng phần mềm Excel 2013.

Kết quả và bàn luận

Ảnh hưởng của chất diện hoạt tới quá trình hòa tan của itraconazol

Ảnh hưởng của loại chất diện hoạt tới độ tan của itraconazol trong môi trường pH 1,2

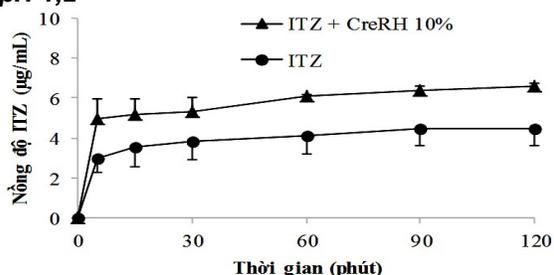
Tiến hành đánh giá độ tan của ITZ trong môi trường pH 1,2 có hòa tan các CDH khác nhau. Kết quả được trình bày trong bảng 1.

Bảng 1. Độ tan của ITZ trong môi trường pH 1,2 có CDH nồng độ 1% (37°C)

STT	Môi trường pH 1,2	Độ tan ($\mu\text{g/mL}$) ($n = 3, \text{TB} \pm \text{ĐLC}$)
1	Không có CDH	4,959 \pm 0,141
2	NaLS 1%	13,128 \pm 0,532
3	Tween 80 1%	7,916 \pm 0,421
4	CreEL 1%	16,480 \pm 0,320
5	CreRH 1%	24,365 \pm 1,002

Từ bảng 1 cho thấy với cùng lượng 1% (kl/tt), CreRH giúp làm tăng độ tan của ITZ trong môi trường pH 1,2 tốt hơn so với các CDH còn lại. Do đó, lựa chọn CreRH làm CDH để làm tăng tính thấm ướt của các tiểu phân DC vào môi trường hòa tan, từ đó sẽ làm tăng độ hòa tan của ITZ từ hệ nghiên cứu trong môi trường pH 1,2.

Ảnh hưởng của lượng chất điện hoạt tới độ hòa tan của itraconazol trong môi trường pH 1,2



Hình 1. Ảnh hưởng của lượng CDH tới quá trình hòa tan của ITZ trong môi trường pH 1,2

Chọn lượng 10 mg CreRH (bằng 10% so với lượng DC của mẫu thử) hòa tan trong môi trường, thu được nồng độ là 0,013 mg/mL. Lượng CreRH dùng như vậy chưa đủ để tạo micell^[5] nhưng có thể giúp tăng tính thấm ướt của tiểu phân DC vào môi trường hòa tan, đặc biệt với dược chất sơ nước như ITZ ($\log P_{o/w} = 5,66$ ở pH 8,1). Tiến hành thử hòa tan 100 mg nguyên liệu ITZ trong môi trường pH 1,2 không có hoặc có 10 mg CreRH hòa tan trước. Kết quả thể hiện trong hình 1.

Có thể thấy khi dùng CreRH 10 mg giúp tăng mức độ hòa tan của ITZ trong môi trường pH 1,2 khoảng 1,5 lần. Sự cải thiện độ hòa tan với nồng độ CDH dưới nồng độ micell tới hạn không thực sự rõ ràng, nếu tăng thêm lượng CreRH trong thí nghiệm này (vẫn dưới nồng độ micell tới hạn) thì sự khác biệt có thể cũng không đáng kể. Do đó, lựa chọn lượng CreRH là 10% so với lượng ITZ trong công thức để tiếp tục các thí nghiệm sau đó.

Ảnh hưởng của polyme tới quá trình kết tinh và hòa tan của itraconazol

Ảnh hưởng của polyme tới quá trình kết tinh của itraconazol

Kính hiển vi quang học

Kết quả tráng phim của ITZ với các polyme khác nhau quan sát bằng kính hiển vi quang học được thể hiện trong hình 2.



Hình 2. Kết quả tráng phim ITZ – polyme quan sát bằng kính hiển vi quang học theo thời gian

Kết quả tráng phim cho thấy 3 polyme cellulose acetat, HPMC E606 và HPMCP 55 có khả năng ức chế sự kết tinh ITZ tốt khi sau khoảng 3 - 4 tuần mới xuất hiện kết tinh, mật độ kết tinh thưa bảo quản trong điều kiện nhiệt độ 40°C, độ ẩm 75% trong khi với các mẫu còn lại sự kết tinh xuất hiện chỉ sau 1 ngày. Do cellulose acetat là polyme không tan trong nước, nên chọn HPMC E606 và HPMCP 55 để tiếp tục nghiên cứu. Tuy nhiên, có thể thấy hình ảnh quan sát bằng kính hiển vi quang học không thực sự đặc hiệu và khách quan, do đó

cần tiến hành quan sát các mẫu tráng phim bằng kính hiển vi phân cực – một kỹ thuật khá phổ biến trên thế giới nhưng chưa được áp dụng nhiều ở Việt Nam.

Kính hiển vi phân cực

Tiến hành tráng phim ITZ với HPMCP 55 và HPMC E606. Quan sát sự kết tinh ở các mẫu đồng thời bằng kính hiển vi quang học và kính hiển vi phân cực theo thời gian để có sự so sánh 2 phương pháp. Kết quả được thể hiện trong hình 3.

		ITZ	ITZ : HPMCP 55 = 1:1	ITZ : HPMC E606 =1:1
Polyme trắng	KHVQH			
	KHVPC			
1 ngày	KHVQH			
	KHVPC			
1 tuần	KHVQH			
	KHVPC			
2 tuần	KHVQH			
	KHVPC			
4 tuần	KHVQH			
	KHVPC			

Hình 3. Kết quả tráng phim ITZ với HPMC và HPMCP quan sát bằng kính hiển vi quang học (KHVQH) và kính hiển vi phân cực (KHVPC) theo thời gian

Như vậy, việc sử dụng phương pháp kính hiển vi phân cực (đặc hiệu, rõ ràng và đáng tin cậy hơn) cho thấy kết quả có sự tương đồng so với khi quan sát bằng kính hiển vi quang học khi mẫu tráng phim của ITZ với HPMCP và HPMC sau 1 tháng lưu giữ ở điều kiện nhiệt độ 40°C, độ ẩm 75% mới xuất hiện hiện tượng khúc xạ kép, biểu thị tinh thể của DC; còn mẫu ITZ nguyên liệu xuất hiện kết tinh chỉ sau 1 ngày, tinh thể rất rõ ràng và kích thước lớn dần theo thời gian.

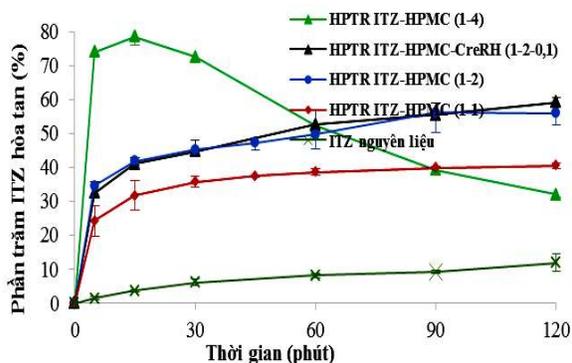
Qua các thí nghiệm trên, lựa chọn 2 polyme là HPMC E606 và HPMCP 55 để tiếp tục đánh giá ảnh hưởng của các polyme tới quá trình hòa tan ITZ.

Ảnh hưởng của polyme tới quá trình hòa tan của itraconazol

Ảnh hưởng của HPMC đến quá trình hòa tan của ITZ trong môi trường pH 1,2

Tiến hành thử hòa tan trong môi trường pH 1,2 có chứa NaLS 0,1% với các mẫu: Nguyên liệu ITZ, HPTR của ITZ và HPMC ở tỷ lệ khác nhau. Kết quả được thể hiện trong hình 5.

HPTR của ITZ và HPMC E606 ở các tỷ lệ khác nhau được bào chế bằng phương pháp bốc hơi dung môi đã cải thiện đáng kể độ hòa tan của ITZ so với ITZ nguyên liệu. Tốc độ hòa tan của ITZ từ HPTR tăng theo tỷ lệ HPMC và mức độ hòa tan có sự khác nhau đáng kể. Khi kết hợp thêm CreRH ở lượng 10% so với ITZ vào HPTR tỷ lệ 1–2, nhận thấy độ hòa tan được chất vẫn tương đương so với khi không có CreRH ($f_2 = 82,14$). Tuy nhiên với mục đích đảm bảo khả năng thấm ướt của tiểu phân DC vào môi trường hòa tan, CreRH vẫn được đưa vào trong hệ nghiên cứu.

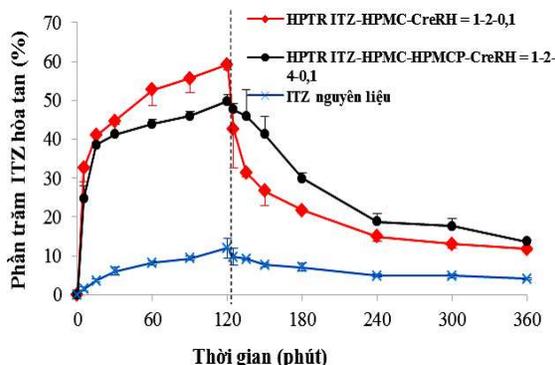


Hình 4. Đồ thị hòa tan của ITZ từ HPTR với HPMC trong môi trường pH 1,2

Từ các kết quả trên, HPTR ITZ–HPMC–CreRH tỷ lệ 1:2:0,1 được lựa chọn để tiếp tục các thí nghiệm sau. Mặc dù bào chế HPTR bằng phương pháp bốc hơi dung môi còn tồn tại nhiều hạn chế, đặc biệt là khó khăn trong việc phân tán đều DC vào pha polyme dẫn đến hiện tượng tốc độ hòa tan tăng nhanh thời gian đầu nhưng sau đó tỷ lệ hòa tan được chất giảm dần do được chất bị kết tủa như trong mẫu HPTR tỷ lệ 1:4, nhưng do tính đơn giản, dễ áp dụng của phương pháp và điều kiện cơ sở, nhóm nghiên cứu vẫn sử dụng phương pháp này trong khuôn khổ nghiên cứu.

Ảnh hưởng của HPMCP đến quá trình hòa tan của ITZ trong môi trường pH 6,8

Tiến hành thử hòa tan khi pH môi trường thay đổi từ 1,2 sang 6,8 với các mẫu: Nguyên liệu ITZ; HPTR chứa ITZ, HPMC, CreRH có hoặc không có HPMCP. Hình 5 thể hiện kết quả hòa tan của các mẫu nghiên cứu.



Hình 5. Đồ thị hòa tan của các mẫu nghiên cứu chứa ITZ khi chuyển pH

Trong 2 giờ đầu, độ hòa tan của HPTR có chứa HPMCP thấp hơn so với HPTR không chứa HPMCP có thể giải thích do HPMCP không tan trong pH 1,2 cản trở một phần dược chất hòa tan vào môi trường, tuy nhiên hiệu quả cải thiện độ hòa tan DC của HPMCP được thể hiện rõ trong môi trường pH 6,8 (HPMCP 55 hòa tan tốt ở pH này). Thời điểm 5 phút ngay sau khi chuyển pH, ở mẫu HPTR chỉ sử dụng 1 polyme là HPMC lượng ITZ hòa tan giảm khoảng 20% do kết tủa thì ở mẫu HPTR kết hợp 2 polyme thông số này chỉ giảm gần 2%. Theo thời gian, HPMCP với vai trò là một chất ức chế

kết tinh, đã góp phần hạn chế mức giảm nồng độ DC hòa tan trong pha pH 6,8.

Kết quả hòa tan được đánh giá cụ thể bằng chỉ số diện tích dưới đường cong hòa tan AUCD (Area Under the Dissolution Curve) cho pha pH 1,2 và pH 6,8 theo phương pháp hình thang. Cả 2 mẫu HPTR đều có AUCD_{tổng} cao gấp hơn 3,5 lần so với mẫu ITZ nguyên liệu. Với HPTR có thêm HPMCP, AUCD_{tổng} tăng 3,6% so với HPTR chỉ có HPMC dù AUCD_{pH 1,2} thấp hơn nhờ hiệu quả tốt trong môi trường pH 6,8 thể hiện qua giá trị AUCD_{pH 6,8} cao hơn 38,5%. Điều này có ý nghĩa tiềm năng *in vivo* do tạo ra nồng độ ITZ hòa tan cao hơn trong ruột non - nơi hấp thu DC chủ yếu.

Như vậy, có thể thấy rằng polyme có khả năng làm chậm/lức chế sự kết tinh DC. Cụ thể, việc kết hợp 2 polyme HPMC và HPMCP trong công thức dùng đường uống của ITZ (ý tưởng mà ít nghiên cứu đã thực hiện) có tính khả thi cao trong việc cải thiện độ hòa tan của DC trong cả môi trường pH 1,2 và pH 6,8. Do đó, HPTR chứa ITZ, HPMC, HPMCP và CreRH tỷ lệ 1:2:4:0,1 được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

Kết luận

Nhóm nghiên cứu đã xây dựng công thức hệ phân tán rắn chứa ITZ, HPMC E606, HPMCP 55 và CreRH với tỷ lệ 1-2-4-0,1 có khả năng cải thiện đáng kể độ hòa tan của ITZ trong pH 1,2 và khi chuyển môi trường pH 6,8 có ý nghĩa quan trọng trong hấp thu *in vivo* vì có thể tạo ra nồng độ ITZ hòa tan cao hơn trong ruột non - là nơi hấp thu chủ yếu của DC.

Nghiên cứu này được tài trợ bởi Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ Quốc gia (NAFOSTED) trong đề tài mã số 108.05-2019.300.

Tài liệu tham khảo

1. D. J. C., Miller D. A., Yang W. et al. (2008), "Enhanced *in vivo* absorption of itraconazole via stabilization of supersaturation following acidic-to-neutral pH transition," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, Vol. 34, pp. 890-902.

2. A. Shevchenko et al. (2012), "A new cocrystal and salts of itraconazole: Comparison of solid-state properties, stability and dissolution behavior," *Int. J. Pharm.*, Vol. 436, No. 1-2, pp. 403-409.

3. B. K. Kang et al. (2004), "Development of self - microemulsifying drug delivery systems (SMEDDS) for oral bioavailability enhancement of simvastatin in beagle dogs," *Int. J. Pharm.*, Vol. 274, No. 1-2, pp. 65-73.

4. M. F. V., Nanjwade V. K., Nanjwade B. K. (2016), "New trends in the co-crystallization of active pharmaceutical ingredients," *J. Appl. Pharm. Sci.*, Vol. 1, pp. 1-5.

5. S. P. J., Rowe R. C., Quinn M. E. (2009), *Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6 ed.*, Pharmaceutical Press and American Pharmacists Association.