

Nghiên cứu kéo dài thời gian tiềm tàng *in vitro* và *in vivo* cho viên nén berberin giải phóng tại đại tràng

Nguyễn Văn Lâm*,

Nguyễn Thạch Tùng, Phạm Thị Minh Huệ

Trường Đại học Dược Hà Nội

*Tác giả liên hệ: lamnv@hup.edu.vn

(Ngày gửi đăng: 26/10/2020 – Ngày duyệt đăng: 07/4/2021)

SUMMARY

*Rheology study was used for characterizing viscoelastic properties of pectin – water dispersion and the effect of calcium hydrophosphate portion on its sol – gel transformation. Calcium hydrophosphate (DCP) was mixed with pectin and coated on berberin tablets using dry powder coating technique as described in previous study. There was a significant correlation between DCP portion and T_{lag} . The *in vitro* T_{lag} was about 5 – 8h but *in vivo* T_{lag} was 1,5 – 2 higher (about 8-15h). X-ray imaging study in healthy volunteers showed most of tablets located at colon before disintegrating.*

Từ khóa: Bao khô, giải phóng tại đại tràng, pectin, lưu biến học, chuyển dạng rắn – lỏng.

Đặt vấn đề

Viên nén berberin giải phóng tại đại tràng được bào chế nhằm tập trung nồng độ thuốc cao tại đại tràng để tăng hiệu quả điều trị của thuốc. Các nghiên cứu trước sử dụng pectin làm tá dược bao để kiểm soát quá trình giải phóng theo mô hình phân hủy sinh học nhờ vi sinh vật đại tràng. Tuy nhiên, thời gian tiềm tàng (T_{lag}) của viên bao vẫn còn thấp chưa đảm bảo đưa được dược chất tới đại tràng. Nguyên nhân là do vỏ bao pectin dễ bị hòa tan bởi môi trường hòa tan nên hạn chế khả năng kiểm soát giải phóng dược chất [1], [2].

Mục đích của nghiên cứu là tăng độ ổn định của vỏ bao bằng cách kết hợp pectin và ion calci ở dạng calci hydrophosphat (DCP) nhằm kéo dài T_{lag} với 2 mục tiêu chính: Chứng minh được sự thay đổi đặc tính lưu biến của pectin có ảnh hưởng tới khả năng giải phóng dược chất và đánh giá được khả năng rã *in vivo* của viên berberin bao bởi pectin kết hợp DCP. Phương pháp phân tích lưu biến học được áp dụng để xác định cơ chế kéo dài T_{lag} cũng như lựa chọn tỉ lệ kết hợp giữa DCP và pectin. Khả năng đưa thuốc tới đại tràng và khả năng rã *in vivo* của viên được đánh giá bằng phương pháp chụp X-quang trên người tình nguyện có dùng thuốc.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu: Berberin clorid (ĐDVN V), Pectin LM102 AS (GENIUS Pectin), sorbitol (ĐDVN V), glycerin (ĐDVN V), natri croscamelose (ĐDVN V), cellulose vi tinh thể (ĐDVN V), Erapac (TCCS), ethanol (ĐDVN V), calci hydrophosphat (ĐDVN V), Xenetic® 300 (Guerbet – Pháp), bari sulfat (ĐDVN V), magnesi stearat (ĐDVN V), talc (TCCS), magnesi stearat (TCCS), Aerosil (TCCS).

Thiết bị: Thiết bị bao bột khô (cải tiến từ thiết bị bao truyền thống ERWEKA). Thiết bị phân tích lưu biến Anton Par MCR 302

Phương pháp bào chế viên berberin 100 mg:

Thành phần 1 viên: Berberin hydroclorid (100 mg), Avicel (33 mg), Erapac (33 mg), natri croscarmelose (10 mg). Nhào ẩm với dung dịch PVP 10 % trong ethanol rồi

xát hạt qua rây 1000. Sấy ở 60 °C tới hàm ẩm 9 %, sửa hạt qua rây 350 và 800 rồi trộn với tá dược trơn (cứ 100 mg berberin trộn với 3 mg talc, 1 mg Aerosil, 1 mg magnesi stearat) và dập viên có đường kính 10 mm, độ cứng 8 – 10 kp.

Phương pháp bào chế viên berberin 100 mg chứa chất cản quang: Trộn bột kép theo tỉ lệ: 100 mg berberin, 50 mg barisulfat, 33 mg Avicel, 33 mg Erapac, 10 mg natri croscarmellose. Nhào ẩm với dung dịch chứa 10% PVP và 10 % Xenetic® 300 trong ethanol rồi xát hạt qua rây 1000. Sấy ở 60 °C tới hàm ẩm 9 %, sửa hạt qua rây 350 và 800 rồi trộn với tá dược trơn (cứ 100 mg berberin trộn với 3 mg talc, 1 mg Aerosil, 1 mg magnesi stearat) và dập viên có đường kính 10 mm, độ cứng 8 – 10 kp.

Phương pháp bao viên: Chuẩn bị bột bao (Pectin : talc tỉ lệ khối lượng 95 : 5 hoặc pectin : DCP tỉ lệ khác nhau) và dịch bao (Sorbitol : glycerin : nước tỉ lệ 20: 60 : 20). Cho khoảng 50 g viên nhân (khoảng 250 viên) vào nồi bao. Điều chỉnh tốc độ nồi bao phù hợp. Quá trình bao trải qua các bước: Phun dịch (15 giây) – ngừng phun dịch – phun bột (15 giây) – ngừng phun bột . Quá trình sẽ lặp đi lặp lại cho đến khi viên đạt được khối lượng vỏ bao 200% so với khối lượng viên nhân. Viên sau khi bao được ủ ở nhiệt độ 60 °C trong 12 giờ và bảo quản ở nhiệt độ phòng trong lọ nhựa, nắp kín.

Phương pháp phân tích lưu biến học: Phân tán pectin hoặc hỗn hợp pectin – calci hydrophosphat vào dung dịch đệm phosphat pH 6,8 ở tỉ lệ 10%. Tiến hành phân tích đặc tính lưu biến trên thiết bị Anton Par, kiểu thiết bị plate – plate (đường kính đĩa 40mm, khoảng cách 2 đĩa từ 1 – 2 mm), chọn chức năng đo biến thiên tần số từ 0,1 – 100 rad/s. Đặc tính lưu biến của mẫu được đánh giá qua sự thay đổi giá trị của *modul lưu trữ* (storage modulus) – đặc trưng cho khả năng bền vững của cấu trúc mẫu và *modul hao tổn* (loss modulus) – đặc trưng cho khả năng biến dạng của cấu trúc mẫu.

Phương pháp đánh giá giải phóng in vitro: Đánh giá liên tiếp qua các môi trường: 900ml acid hydrocloric 0,1M trong 2 giờ, tiếp theo là 900 ml dung dịch đệm phosphat pH 6,8 trong 6 giờ tại nhiệt độ thử 37 °C , tốc độ khuấy 100 vòng/phút. Định lượng dược chất giải phóng ra bằng phương pháp đo quang tại bước sóng 345 nm.

Phương pháp đánh giá giải phóng in vivo: Được tiến hành dựa trên phương pháp của tác giả Nguyễn Thạch Tùng [3]. Cho người tình nguyện uống 1 viên nén bao chứa berberin 100 mg + chất cản quang. Thời điểm uống là 2 tiếng trước khi ăn. Sau đó tiến hành chụp X-quang để theo dõi đường đi của thuốc trong đường tiêu hóa và đánh giá thời điểm + vị trí rã của viên. Khoảng cách giữa các lần chụp là 1 giờ.

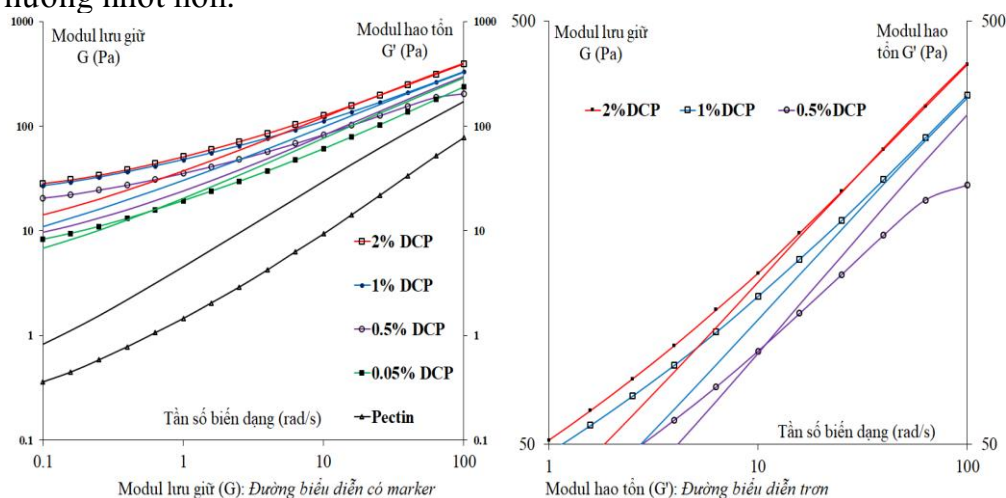
Kết quả nghiên cứu

Phân tích lưu biến học

Tất cả các mẫu pectin : nước, pectin : calci hydrophosphat : nước đều được khảo sát khoảng tuyến tính nhớt để xác định thông số đo lưu biến phù hợp. Kết quả khảo sát cho thấy khoảng tuyến tính nhớt của các mẫu đo đều nằm trong khoảng 0,1 – 10 % biên độ dao động tại tần số 10 rad/s. Do đó, phép đo biến thiên tần số dao động sẽ được thực hiện ở biên độ dao động 1 % để đảm bảo ổn định mẫu đo. Kết quả phân tích cho thấy:

Pectin khi phân tán ở tỉ lệ 10% trong nước có tính chất của 1 dung dịch kể cả ở trạng thái nghỉ (*modul hao tổn* có giá trị cao hơn *modul lưu trữ* ở tất cả các giá trị tần số biến dạng), khi phối hợp DCP với pectin, khoảng cách modul lưu trữ và modul hao tổn hẹp dần và giá trị của cả modul hao tổn và modul lưu trữ đều tăng dần cho thấy hệ

có xu hướng chuyển từ trạng thái dung dịch “loãng” sang trạng thái “đậm đặc” hơn, tức hệ có xu hướng nhớt hơn.

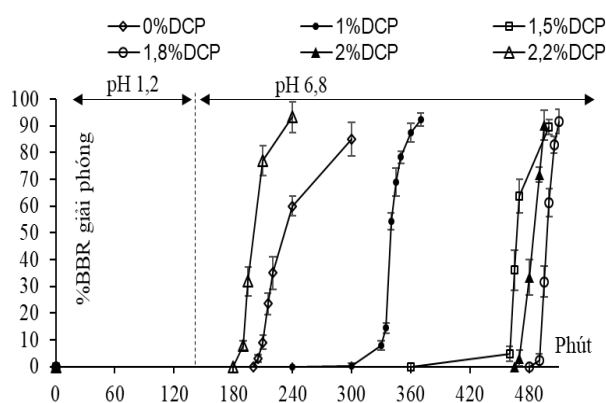


Hình 1. Kết quả phân tích lưu biến học đánh giá ảnh hưởng của tỉ lệ DCP kết hợp đến đặc tính chuyển dạng rắn – lỏng của hệ pectin – nước

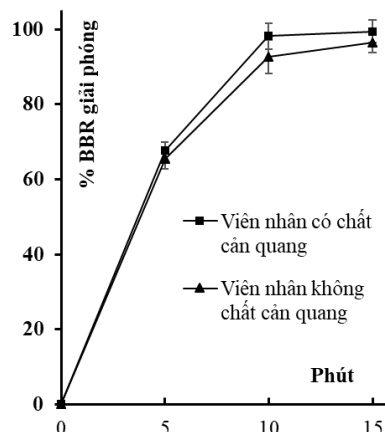
Ở tỉ lệ phối hợp là 0,04 % DCP, hệ có đặc tính của chất rắn khi ở trạng thái nghỉ (tần số biến dạng thấp <1 rad/s) và quay trở lại tính chất dung dịch nhớt khi tần số biến dạng > 1 rad/s. Khi tăng tỉ lệ DCP phối hợp lên 0,5 %, hệ đã có tính chất của chất rắn nhiều hơn nên phải ở tần số biến dạng > 10% mới chuyển sang trạng thái dung dịch nhớt. Ở các tỉ lệ 1 và 2 % DCP, *modul lưu trữ* luôn cao hơn *modul hao tổn* ở tất cả các tần số biến dạng chứng tỏ hệ ở trạng thái rắn hoàn toàn. Như vậy, khi phối hợp pectin với DCP, sẽ thay đổi đặc tính của hệ pectin – nước từ thuộc tính chất lỏng sang thuộc tính chất rắn do đó sẽ làm tăng độ ổn định vật lý của hệ hơn. Cơ chế của sự chuyển dạng này có lẽ là do DCP khi gặp nước đã điện ly 1 phần tạo ra Ca^{2+} kết hợp với các nhóm $-COO^-$ trên mạch pectin tạo ra calci pectinat là chất không tan do đó thay đổi đặc tính lưu biến của hệ.

Kết quả thử giải phóng *in vitro*

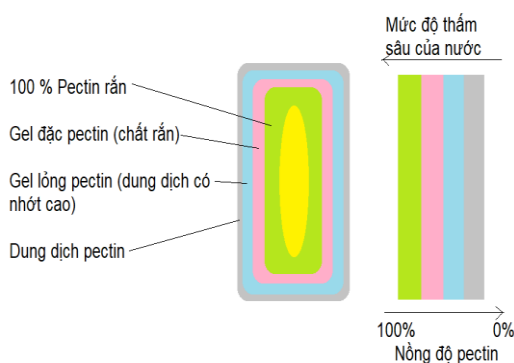
Kết quả thử giải phóng ở hình 2 cho thấy kết hợp DCP và pectin, sẽ kéo dài thời gian tiềm tàng (T_{lag}) cho viên bao so với chỉ sử dụng pectin làm vỏ bao. Ở các tỉ lệ DCP là 1 %, 1,5 %, 2 % đều cho T_{lag} đảm bảo đưa được thuốc đến đại tràng (> 5 giờ). Tỉ lệ DCP càng cao thì T_{lag} càng kéo dài, tuy nhiên khi lượng DCP vượt quá 1,8 % thì T_{lag} có xu hướng giảm. Không những vậy, tại tỉ lệ 2,2 % viên lại giải phóng dược chất nhanh hơn cả so với không dùng DCP ở vỏ bao ($T_{lag} = 3$ giờ). Các tỉ lệ DCP từ 1 – 2 % đều giúp tạo ra T_{lag} từ 5-8 giờ rất thích hợp cho viên giải phóng tại đại tràng. Như vậy, việc phối hợp DCP vào vỏ bao để kéo dài T_{lag} chỉ có hiệu quả ở tỉ lệ thấp của DCP (1-2 %). Kết quả kéo dài T_{lag} nhờ kết hợp DCP với pectin trong công thức vỏ bao phù hợp với dự đoán ở nghiên cứu tính chất lưu biến của hệ pectin – nước.



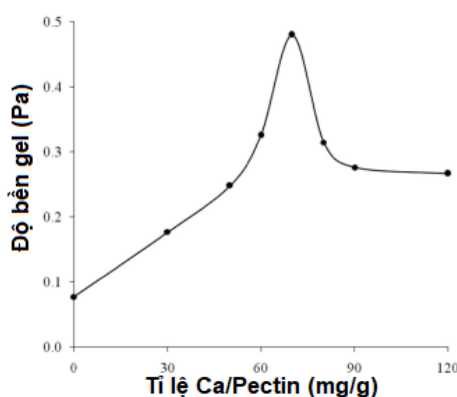
Hình 2. Khả năng giải phóng của viên BBR bao với bột bao là hỗn hợp pectin : DCP



Hình 3. Đồ thị giải phóng của viên nhân BBR trong môi trường pH 6,8



Hình 4. Mô hình các lớp trạng thái tồn tại khác nhau của hệ pectin – nước tạo ra trong quá trình viên berberin bao tiếp xúc với môi trường hòa tan



Hình 5. Ảnh hưởng của calci đến độ bền của hệ gel pectin – nước [4]

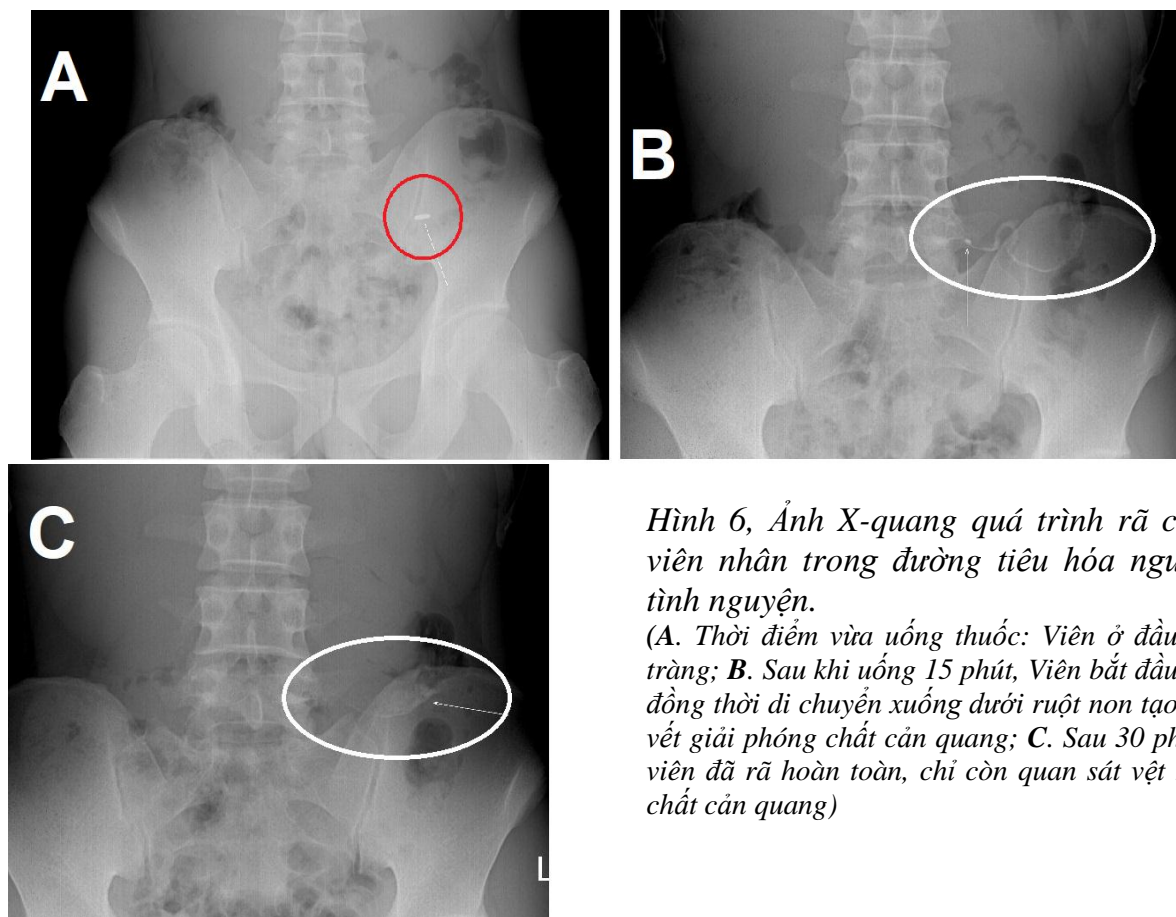
Kết hợp giữa kết quả phân tích lưu biến và thử hòa tan *in vitro*, có thể đưa ra giả thiết: Viên nén bao berberin có vỏ bao là pectin ở trạng thái rắn (100 % pectin), khi tiếp xúc môi trường hòa tan, nước sẽ liên tục thâm vào khiến nồng độ pectin ở lớp ngoài cùng sẽ giảm dần từ 100 % (vỏ bao nguyên vẹn) đến 0 % khi vỏ bao đã bị hòa tan hoàn toàn (**Hình 4**). Tốc độ hòa tan vỏ bao bị ảnh hưởng bởi độ bền của hệ pectin nước tạo ra, nếu hệ pectin – nước có tính chất của chất lỏng đặc trưng bởi khả năng dễ dịch chuyển, biến dạng, hệ sẽ nhanh chóng bị bào mòn. Ngược lại, nếu hệ pectin – nước mang đặc tính của chất rắn, với khả năng duy trì trạng thái ổn định lâu, khó bị biến dạng hay dịch chuyển, hệ sẽ tồn tại lâu hơn, nhờ đó kéo dài T_{lag} cho viên hơn. Trong quá trình thử hòa tan, nồng độ của pectin ở lớp ngoài cùng sẽ giảm dần. Các phân tích lưu biến học cho thấy, khi nồng độ pectin giảm còn 10 % thì hệ đã có tính chất của 1 dung dịch nhớt và do đó dễ dàng bị bào mòn do chuyển động của viên cũng như của môi trường hòa tan. Khi kết hợp với DCP ở tỉ lệ >1 % thì hệ vẫn duy trì trạng thái gel (elastic) ngay cả khi nồng độ pectin trong hệ pectin - nước giảm xuống 10 %, nhờ đó làm chậm quá trình thâm sâu tiếp theo của nước và do đó làm chậm quá trình

bào mòn vỏ pectin. Hiện tượng giảm T_{lag} khi tỉ lệ DCP cao trên 2 % có thể do, khi hệ gel pectin – nước hình thành, việc thừa ion calci sẽ làm mất tính ổn định của gel do hình thành các tủa calci pectinat ngay trong gel hiện tượng này đã được mô tả trong các thử nghiệm của Wanasawas (**Hình 5**) [4].

Kết quả đánh giá *in vivo*

Trước khi đánh giá độ rã *in vivo* với viên nén berberin có phối hợp thêm chất cản quang, cần đánh giá xem chất cản quang có làm thay đổi giải phóng dược chất từ viên không. Quá trình thẩm định phương pháp định lượng đã cho thấy chất cản quang sử dụng trong viên không ảnh hưởng tới kết quả phân tích. **Hình 3** cho thấy không có sự khác biệt về khả năng giải phóng dược chất *in vitro* từ viên nén berberin có sử dụng chất cản quang và không sử dụng chất cản quang ($f_2 = 81$ và quá trình thẩm định phương pháp định lượng đã chứng minh chất cản quang không ảnh hưởng tới kết quả định lượng).

Viên nhân BBR rã hoàn toàn sau khi uống từ 15 – 30 phút (**Hình 6**). Quá trình rã được quan sát khá rõ với hình ảnh vệt chất cản quang được giải phóng ra trong quá trình viên thuốc di chuyển xuống phía dưới đường tiêu hóa. Thời gian rã *in vivo* khá phù hợp với kết quả thu được khi thử giải phóng *in vitro* ở **hình 3**. Như vậy, việc thêm chất cản quang không ảnh hưởng tới quá trình giải phóng dược chất của viên.



Hình 6, Ảnh X-quang quá trình rã của viên nhân trong đường tiêu hóa người tình nguyện.

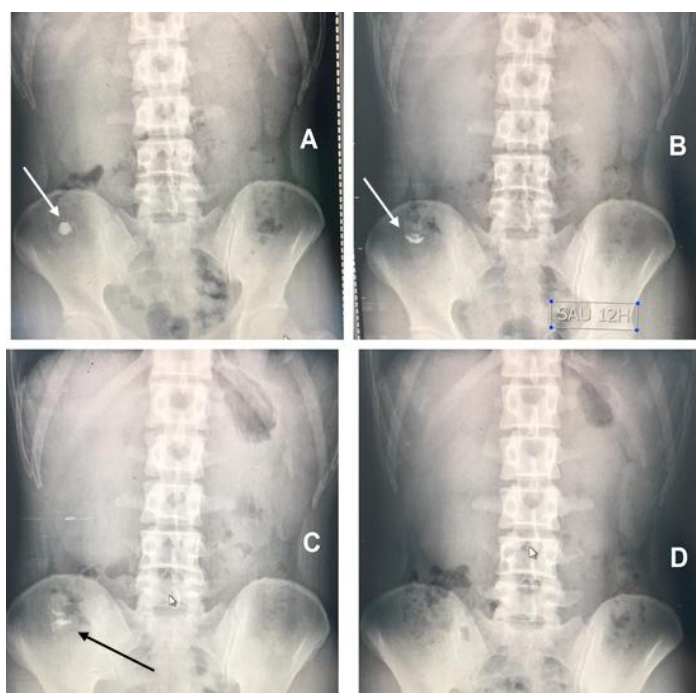
(A. Thời điểm vừa uống thuốc: Viên ở đầu tá tràng; B. Sau khi uống 15 phút, Viên bắt đầu rã đồng thời di chuyển xuống dưới ruột non tạo ra vệt giải phóng chất cản quang; C. Sau 30 phút, viên đã rã hoàn toàn, chỉ còn quan sát vệt mờ chất cản quang)

Các kết quả đánh giá khả năng giải phóng *in vivo* của viên nén berberin bao giải phóng tại đại tràng được tổng hợp ở **bảng 1** và **hình 7**. Nhìn chung, ở cả 2 tỉ lệ pectin : DCP khảo sát đều đảm bảo đưa được thuốc tới đại tràng với tỉ lệ 1,5 % DCP sẽ giúp viên bao rã ở ½ cuối của đại tràng trong khi với tỉ lệ 1,0 % DCP sẽ giúp viên rã ở đoạn

đầu đại tràng. Tuy nhiên, thời gian di chuyển của viên trong được tiêu hóa không đồng nhất giữa các NTN, điều này là do đặc điểm sinh lý khác nhau giữa từng người. So với kết quả đánh giá *in vitro*, dễ dàng nhận thấy là thời gian tiềm tàng thực tế đã kéo dài hơn nhiều (khoảng 1,5 đến 2 lần) so với thử nghiệm *in vitro*.

Bảng 1. Kết quả đánh giá khả năng giải phóng thuốc *in vivo* của viên nén BBR bao với hỗn hợp pectin và DCP ở các tỉ lệ DCP khác nhau

Người tình nguyện	Thời điểm rã (giờ)		Vị trí viên rã		Thời gian đến đại tràng (giờ)	
	Tỉ lệ 1,0 %	Tỉ lệ 1,5 %	Tỉ lệ 1,0 %	Tỉ lệ 1,5 %	Tỉ lệ 1,0 %	Tỉ lệ 1,5 %
1	15,5-16,5	-	Cuối ruột non	-	-	-
2	9,5-10,5	10,0 – 11,0	Đại tràng ngang	Đại tràng lên	< 7,5	8,5 – 10,0
3	9,0 – 10,0	11,0 - 12,5	Cuối ruột non	Đại tràng lên	-	11,0 – 12,0
4	12,0 -13,0	13,0 - 13,5	Đại tràng lên	Đại tràng xuống	<12,0	<12,0
5	8,0 - 8,5	10,0 – 11,0	Đại tràng ngang	Đại tràng lên	<8,0	10,5
6	7,0 - 8,0	11,0 – 12,0	Cuối ruột non	Đại tràng xuống	-	<11,0



Hình 7. Ảnh chụp quá trình di chuyển và rã của viên nén BBR bao với hỗn hợp pectin : DCP (tỉ lệ 100 : 1) (A - Sau 11 giờ, viên tới đại tràng lên. B - Viên bắt đầu rã sau 12 giờ. C - Sau 12 giờ 30 phút, viên rã gần hết. D - Sau 13 giờ viên rã hoàn toàn)

Bàn luận

Các nghiên cứu trước đây đã xác định được thành phần dịch bao cho viên nén berberin giải phóng tại đại tràng bào chế bằng kỹ thuật bao bồi. Tuy nhiên, viên berberin bao vẫn chưa đạt được thời gian tiềm tàng phù hợp cho hệ giải phóng thuốc tại đại tràng [1], [2]. Nguyên nhân là do quá trình bao vẫn chỉ sử dụng 100 % pectin

làm bột bao nên vỏ bao tạo ra rất dễ bị hòa tan trong quá trình thử giải phóng dược chất. Một giải pháp khắc phục khó khăn này là kết hợp pectin với HPMC đã được áp dụng thành công trên viên nén metronidazol giải phóng tại đại tràng với cùng phương pháp bào chế [3]. Tuy nhiên, tỉ lệ HPMC sử dụng khá cao (50 % so với pectin) ảnh hưởng đáng kể tới khả năng kiểm soát giải phóng nhờ vi sinh vật của pectin. Để giải quyết vấn đề khó khăn này, nghiên cứu đã tiến hành cải thiện đặc tính lưu biến của pectin để tăng độ bền của vỏ bao và đã thành công trong việc kéo dài T_{lag} lên 6 giờ trong thử nghiệm *in vitro* cũng như đưa được thuốc tới đại tràng trong thử nghiệm *in vivo*. Trong bào chế các hệ mang thuốc, polyme kiểm soát giải phóng là nhóm tá dược rất hay được sử dụng. Phần lớn các nghiên cứu tại Việt Nam về hệ mang thuốc đều sử dụng phân tích nhiệt để đánh giá tính chất của polyme nhằm lựa chọn công thức phù hợp nhưng lại ít lưu tâm tới tính chất lưu biến. Tính chất lưu biến của polyme không chỉ ảnh hưởng tới độ bền vật lý mà còn ảnh hưởng tới tốc độ di chuyển của phân tử thuốc trong hệ gel tạo ra bởi tương tác giữa polyme – nước do đó chắc chắn sẽ có ảnh hưởng tới khả năng giải phóng dược chất khỏi hệ. Do đó, xác định tính chất lưu biến của tá dược là một thao tác quan trọng cần được bổ sung để xác định thành phần công thức tối ưu của hệ mang thuốc cũng như để hiểu rõ hơn về cơ chế kiểm soát giải phóng.

Phương pháp đánh giá độ rã *in vivo* sử dụng trong nghiên cứu mới chỉ xác định được đường di chuyển và thời gian tiềm tàng một cách tương đối. Để có thể chứng minh thuyết phục hơn cần, tiến hành đánh giá khả năng giải phóng *in vivo*. Tuy nhiên, đây lại là các thử nghiệm rất phức tạp và tốn kém. Với điều kiện nghiên cứu có hạn thì đánh giá độ rã *in vivo* đơn giản và ít tốn kém hơn cũng là lựa chọn phù hợp bởi các kết quả thu được cũng giúp cung cấp cái nhìn trực diện về quá trình kiểm soát giải phóng của dạng thuốc, giúp người nghiên cứu sàng lọc nhanh để lựa chọn công thức phù hợp cho các nghiên cứu tiếp theo.

Kết luận

Bằng các kết quả phân tích lưu biến và thử giải phóng *in vitro*, nghiên cứu đã lựa chọn được hỗn hợp pectin : calci phosphat theo tỉ lệ 99 : 1 (khối lượng/khối lượng) làm vỏ bao cho viên nén berberin giải phóng tại đại tràng. Kết quả thử giải phóng *in vivo* cho thấy viên sau khi bao đã đưa thuốc tới đúng đại tràng và giải phóng hoàn toàn thuốc tại đó.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Lâm, Bùi Thị Oanh, Nguyễn Thạch Tùng, *et al.* (2018), "Nghiên cứu ảnh hưởng của thành phần dịch bao tới khả năng giải phóng dược chất của viên nén berberin giải phóng tại đại tràng bào chế bằng kỹ thuật bao bồi", *Tạp chí Nghiên cứu dược và thông tin thuốc*, 9(4), tr. 2-8.
2. Nguyễn Văn Lâm, Nguyễn Hồng Thúy, Nguyễn Thạch Tùng, *et al.* (2016), "Lựa chọn chất hóa dẻo cho lớp bao bồi viên berberin giải phóng tại đại tràng bằng kỹ thuật quét nhiệt vi sai điều biến nhiệt", *Tạp chí Nghiên cứu dược và thông tin thuốc*, 4+5, tr. 15-18.
3. Tung N.-T., Pham T.-M.-H., Nguyen T.-H., *et al.* (2016), "Pectin/HPMC dry powder coating formulations for colon specific targeting tablets of metronidazole", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 33, pp. 19-27.

4. Wanasawas P., Sinchaipanid N., Fell J. T., *et al.* (2013), "Influence of pectin and calcium pectinat films on in vitro drug release from coated theophylline pellets", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 23(5), pp. 465-470.