

Tối ưu hóa các yếu tố ảnh hưởng đến việc điều chế tiểu phân nano poly-(D,L-lactid-co-glycolid) tải ethambutol

Nguyễn Thái Dương, Phạm Đình Duy*

Khoa Dược, Trường Đại học Y dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 26/8/2019; ngày chuyển phân biện 29/8/2019; ngày nhận phân biện 30/9/2019; ngày chấp nhận đăng 4/10/2019

Tóm tắt:

Mục đích của nghiên cứu là thiết kế và tối ưu hóa công thức tiểu phân nano tải ethambutol. Phương pháp: thiết kế mô hình thực nghiệm Taguchi L16 (4^5) bằng phần mềm Design-Expert phiên bản 10.0.7 gồm 16 thực nghiệm với 5 biến số độc lập (tỷ lệ ethambutol/poly-(D,L-lactid-co-glycolid); tỷ lệ ethyl acetat/dicloromethan; mức độ siêu âm giai đoạn 1; mức độ siêu âm giai đoạn 2; áp suất cô quay), mỗi yếu tố khảo sát 4 mức. Thông qua phân tích phương sai các biến phụ thuộc (kích thước tiểu phân trung bình; chỉ số phân tán; hiệu suất mang dược chất; khả năng tải dược chất) và sự ảnh hưởng của các biến độc lập lên biến phụ thuộc mà phần mềm đưa ra các công thức tối ưu với các chỉ số mong muốn (desirability) khác nhau. Kết quả cho thấy, phần mềm Design-Expert đã thiết lập thực nghiệm tối ưu với chỉ số mong muốn cao nhất (0,897). Các giá trị tối ưu của các biến độc lập bao gồm: tỷ lệ ethambutol/poly-(D,L-lactid-co-glycolid) là 1:1; tỷ lệ ethyl acetat/dicloromethan là 0:10; mức độ siêu âm giai đoạn 1 là 150 W; mức độ siêu âm giai đoạn 2 là 150 W; áp suất cô quay là 150 mbar. Thực nghiệm kiểm chứng (n=3) thu được các giá trị phân tích có tính lặp lại cao và tương đồng với các số liệu dự đoán từ phần mềm. Kết luận: các yếu tố ảnh hưởng đến việc điều chế tiểu phân nano poly-(D,L-lactid-co-glycolid) tải ethambutol được tối ưu hóa thành công với sự trợ giúp của phần mềm Design-Expert.

Từ khóa: Design-Expert, ethambutol, thuốc kháng lao, tiểu phân nano.

Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Theo báo cáo của Tổ chức Y tế thế giới (WHO), lao là một trong mười nguyên nhân gây tử vong hàng đầu trên thế giới. Nếu chỉ xét riêng trong các bệnh truyền nhiễm, lao chiếm số ca tử vong hàng đầu. Mặc dù đã có những cải thiện đáng kể trong chăm sóc và quản lý, bệnh lao vẫn là một vấn đề sức khỏe đáng lo ngại tại Việt Nam. Phác đồ điều trị kéo dài, phức tạp và các tác dụng không mong muốn, độc tính của thuốc là những nguyên nhân dẫn đến tình trạng tái nhiễm và kháng thuốc đang ngày càng gia tăng hiện nay [1].

Giống như các thuốc kháng lao hàng thứ nhất khác, ethambutol hấp thu tốt qua đường tiêu hóa. Tuy nhiên, sự phân bố dược chất vào mô không chọn lọc, bao gồm cả phổi, thận và hồng cầu. Bên cạnh đó, quá trình đào thải ethambutol nhanh, khoảng 80% bị thải trừ qua thận trong vòng 24 giờ. Tác dụng không mong muốn cũng là một yếu tố cản trở hiệu quả điều trị của ethambutol [2]. Do đó, việc nghiên cứu các dạng bào chế thuốc kháng lao thay thế tối

ưu hơn, đặc biệt cho ethambutol là cần thiết để giải quyết những vấn đề này.

Trong nhiều năm qua, công nghệ nano được ứng dụng rộng rãi trong lĩnh vực dược phẩm. Tiểu phân nano có khả năng cải thiện độ tan của các dược chất kém tan, làm tăng diện tích tiếp xúc của tác nhân trị liệu với môi trường sinh học. Bên cạnh đó, khả năng tích điện bề mặt của tiểu phân nano còn góp phần tăng tính kháng khuẩn thông qua việc ảnh hưởng đến điện tích màng tế bào vi khuẩn [3]. Mặt khác, tiểu phân nano còn đóng vai trò như một hệ phân phối thuốc với khả năng kiểm soát sự phóng thích dược chất theo thời gian, giúp duy trì nồng độ thuốc hằng định trong thời gian dài [4].

Nhằm góp phần xây dựng một hướng đi mới trong điều trị lao đạt hiệu quả tốt hơn, giảm thiểu nhất độc tính cho bệnh nhân, đề tài thực hiện nghiên cứu điều chế tiểu phân nano mang thuốc kháng lao ethambutol.

* Tác giả liên hệ: Email: duyphamding1981@gmail.com

Optimisation of the factors affecting the preparation of ethambutol-loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles

Thai Duong Nguyen, Dinh Duy Pham*

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy
at Ho Chi Minh City

Received 26 August 2019; accepted 4 October 2019

Abstract:

The aim of this study was to design and optimize ethambutol-loaded nanoparticles. Methods: a Taguchi L16 (4^5) experimental model was designed by Design-Expert software v.10.0.7 including 16 experiments. Five independent variables were ethambutol/poly-(D,L-lactide-co-glycolide) ratio, acetate ethyl/dichloromethane ratio, amplitude of first-stage (W), amplitude of second-stage (W), pressure of evaporation (mbar). Each independent variable was studied at four levels. Dependent variables were size, polydispersity index, entrapment efficacy, drug loading. Based on ANOVA results and the influence of independent variables on dependent variables, Design-Expert software offered optimal formulas with different desirability values. Results exhibited that, the experiment with the highest desirability value (0.897) was selected; optimized parameters of independent variables included: ethambutol/poly-(D,L-lactide-co-glycolide) ratio was 1:1; acetate ethyl/dichloromethane ratio was 0:10; amplitude of first-stage was 150 (W); amplitude of second-stage was 150 (W). Verification experiments ($n=3$) obtained highly repeatable analytical values and were similar to the predicted data from the software. Conclusion: the factors that affect the preparation of ethambutol-loaded poly-(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles were successfully optimised by Design-Expert software.

Keywords: anti-tuberculosis drugs, Design-Expert, ethambutol, nanoparticles.

Classification number: 3.4

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Ethambutol hydroclorid độ tinh khiết $\geq 99\%$, đạt tiêu chuẩn nhà sản xuất (Sigma Aldrich, Mỹ); poly-(D,L-lactid-co-glycolid) với tỷ lệ lactid:glycolid 75:25 có M_w 76.000-115.000 (Sigma Aldrich, Mỹ); poly(vinyl alcol) thủy phân 87-90% có M_w 30.000-70.000 (Sigma Aldrich, Mỹ); natri clorid (Merck, Đức); ethyl acetat (Merck, Đức), dicloromethan (Scharlau, Tây Ban Nha), nước cất 2 lần (Việt Nam) đạt tiêu chuẩn phân tích.

Phương pháp nghiên cứu

Bào chế tiểu phân nano tải ethambutol (ETB): tiểu phân nano tải ETB được bào chế bằng phương pháp bốc hơi dung môi từ nhũ tương: poly-(D,L-lactid-co-glycolid) (PLGA) được hòa tan trong 10 ml các dung môi khác nhau [ethyl acetat (EA); dicloromethan (DCM) hoặc hỗn hợp EA:DCM]. Nhũ hóa 1 ml dung dịch ETB (1 mg/ml) vào dung dịch trên bằng siêu âm (Topt-500, Toption Instrument, Trung Quốc) trong thời gian 1 phút ở tần số 20 kHz, mức siêu âm thay đổi tùy từng thực nghiệm (giai đoạn 1). Tiền nhũ tương được nhũ hóa tiếp trong 10 ml dung dịch chứa 1% (khối lượng/thể tích) poly(vinyl alcol) và 0,5% (khối lượng/thể tích) natri clorid bằng siêu âm trong thời gian 3 phút ở tần số 20 kHz, mức siêu âm thay đổi tùy từng thực nghiệm (giai đoạn 2). Dung môi hữu cơ được loại bằng thiết bị cô quay (Heidolph laborota 4001 efficient, Heidolph, Đức) với tốc độ 150 vòng/phút.

Thiết kế và tối ưu hóa thực nghiệm: mô hình Taguchi L16 (4^5) được thiết kế bằng phần mềm Design-Expert phiên bản 10.0.7 (Stat-Ease Inc., Mỹ) gồm 16 thực nghiệm với 5 biến số độc lập gồm 4 mức (bảng 1). Các biến số phụ thuộc là những đặc tính tiêu biểu của tiểu phân nano như kích thước tiểu phân trung bình (nm), chỉ số phân tán, hiệu suất mang dược chất (%) và khả năng tải dược chất (%).

Bảng 1. Các mức của biến độc lập trong mô hình Taguchi L16 (4^5).

| Biến số độc lập | Mức | | | | |
|----------------------------------|-----------------|-----|-----|------|-----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| Tỷ lệ ETB/PLGA | 1:1 | 1:2 | 1:3 | 1:4 | |
| Tỷ lệ EA/DCM | 10:0 | 7:3 | 3:7 | 0:10 | |
| Mức độ siêu âm với tần số 20 kHz | Giai đoạn 1 (W) | 50 | 100 | 150 | 200 |
| | Giai đoạn 2 (W) | 100 | 150 | 200 | 250 |
| Áp suất cô quay (mbar) | 100 | 150 | 200 | 250 | |

Phần mềm Design-Expert xác định những biến độc lập quan trọng ảnh hưởng đến từng biến phụ thuộc thông qua phân tích phương sai (ANOVA). Từ đó, phần mềm đưa ra phương trình hồi quy của các biến phụ thuộc. Thực nghiệm tối ưu được lựa chọn là thực nghiệm có chỉ số mong muốn cao nhất được đưa ra từ phần mềm Design-Expert. Việc lựa chọn dựa vào chỉ số mong muốn nhằm đảm bảo khả năng thu được thực nghiệm tối ưu cho tiểu phân nano có các tính chất gần với dự đoán nhất.

Khảo sát các tính chất của tiểu phân nano tải ethambutol:

Kích thước tiểu phân trung bình (nm) và chỉ số phân tán (polydispersity index - PDI): được xác định dựa vào cơ chế tán xạ ánh sáng động trên thiết bị ZetaPALS (Brookhaven Instruments Corporation, Mỹ). Kết quả được xác định là giá trị trung bình của 3 lần đo lặp lại. Để đạt được mật độ tiểu phân phù hợp, mẫu được pha loãng 100 lần bằng nước cất 2 lần trước khi đo. Tiến hành đo ở nhiệt độ 25°C, góc tán xạ cố định 90°.

Thế zeta: cũng được xác định trên thiết bị ZetaPALS, dựa vào cơ chế tán xạ ánh sáng điện di. Kết quả được xác định là giá trị trung bình của 3 lần đo lặp lại. Mẫu được pha loãng 50 lần bằng dung dịch KCl 0,1 M trước khi đo. Tiến hành đo ở nhiệt độ 25°C, góc tán xạ cố định 90°.

Hiệu suất mang dược chất (Entrapment efficacy - EE) và khả năng tải dược chất (Drug loading - DL): giá trị EE và DL giúp đánh giá lượng dược chất được bắt giữ vào tiểu phân nano. Các giá trị này được tính gián tiếp thông qua xác định lượng dược chất tự do. Phần dược chất không được bắt giữ vào tiểu phân nano được tách ra bằng cách rửa 2 lần với nước cất 2 lần kết hợp ly tâm 4.000 vòng/phút trong 30 phút, sử dụng ống ly tâm lọc có giới hạn trọng lượng phân tử lọc (MWCO) là 100 kDa (Pall Laboratory, Mỹ). Tiến hành tạo phức màu với đồ tía bromo cresol và định lượng bằng quang phổ UV-Vis (Beckman DU530, Beckman Instruments, Mỹ) ở bước sóng 407 nm. Các giá trị EE và DL được tính dựa vào công thức:

$$EE (\%) = \frac{\text{Tổng lượng dược chất ban đầu (mg)} - \text{lượng dược chất tự do (mg)}}{\text{Tổng lượng dược chất ban đầu (mg)}} \times 100\%$$

$$DL (\%) = \frac{\text{Tổng lượng dược chất ban đầu (mg)} - \text{lượng dược chất tự do (mg)}}{\text{Tổng lượng polymer (mg)} + \text{lượng dược chất được bắt giữ (mg)}} \times 100\%$$

Kết quả và bàn luận

Ở nghiên cứu này, mô hình thực nghiệm Taguchi L16 (4⁵) được thiết kế với 5 biến độc lập đã được đề cập như trên, các thông số còn lại được giữ cố định. Dữ liệu thực nghiệm của 16 công thức được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Dữ liệu thiết kế thực nghiệm Taguchi L16 (4⁵).

| TN | A | B | C | D | E | R ₁ (n=3) | R ₂ (n=3) | R ₃ | R ₄ |
|----|-----|------|-----|-----|-----|----------------------|----------------------|----------------|----------------|
| 1 | 1:1 | 3:7 | 150 | 200 | 200 | 142,37±1,46 | 0,49±0,10 | 36,26 | 24,79 |
| 2 | 1:2 | 3:7 | 200 | 100 | 150 | 141,30±8,07 | 0,50±0,07 | 36,26 | 14,73 |
| 3 | 1:1 | 10:0 | 50 | 100 | 100 | 130,47±1,67 | 0,67±0,08 | 5,88 | 5,08 |
| 4 | 1:2 | 10:0 | 100 | 200 | 250 | 121,53±8,91 | 0,41±0,12 | 4,86 | 2,26 |
| 5 | 1:4 | 3:7 | 100 | 250 | 100 | 168,00±8,40 | 0,17±0,03 | 2,39 | 0,58 |
| 6 | 1:4 | 7:3 | 150 | 100 | 250 | 142,70±6,94 | 0,22±0,05 | 10,09 | 2,40 |
| 7 | 1:3 | 3:7 | 50 | 150 | 250 | 154,17±13,27 | 0,24±0,09 | 8,08 | 2,54 |
| 8 | 1:3 | 0:10 | 100 | 100 | 200 | 151,37±5,75 | 0,47±0,10 | 16,67 | 5,10 |
| 9 | 1:3 | 7:3 | 200 | 200 | 100 | 90,73±23,38 | 1,05±0,15 | 31,03 | 9,10 |
| 10 | 1:2 | 7:3 | 50 | 250 | 200 | 127,47±4,68 | 0,36±0,13 | 3,33 | 1,56 |
| 11 | 1:1 | 0:10 | 200 | 250 | 250 | 78,07±15,21 | 0,90±0,64 | 6,02 | 5,19 |
| 12 | 1:3 | 10:0 | 150 | 250 | 150 | 136,43±0,91 | 0,31±0,05 | 7,14 | 2,25 |
| 13 | 1:4 | 0:10 | 50 | 200 | 150 | 169,60±12,08 | 0,31±0,05 | 46,46 | 10,18 |
| 14 | 1:2 | 0:10 | 150 | 150 | 100 | 167,10±10,05 | 0,49±0,15 | 42,84 | 16,94 |
| 15 | 1:1 | 7:3 | 100 | 150 | 150 | 185,73±30,49 | 0,99±0,06 | 36,67 | 25,00 |
| 16 | 1:4 | 10:0 | 200 | 150 | 200 | 118,67±12,20 | 0,61±0,03 | 13,72 | 3,24 |

Ghi chú: A: tỷ lệ ETB/PLGA, B: tỷ lệ EA/DCM, C: mức độ siêu âm giai đoạn 1 (W), D: mức độ siêu âm giai đoạn 2 (W), E: áp suất cô quay (mbar), R₁: kích thước tiểu phân trung bình (nm), R₂: chỉ số phân tán, R₃: hiệu suất mang dược chất (%), R₄: khả năng tải dược chất (%).

Từ dữ liệu thực nghiệm thu được (bảng 2), tiến hành phân tích phương sai nhằm xác nhận ý nghĩa thống kê của mô hình phân tích (bảng 3). Các thông số đánh giá bao gồm trị số p-value, R², R² hiệu chỉnh (Adjusted R²), R² dự đoán (Predicted R²) và độ chính xác thích hợp (Adequate precision).

Phân tích phương sai

Bảng 3. Phân tích ANOVA các biến R₁, R₂, R₃ và R₄.

| | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|---------------------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| Tổng hợp | 0,0471 | 0,0010 | 0,0017 | 0,0208 |
| A: Tỷ lệ ETB/PLGA | | 0,0007 | | 0,0142 |
| B: Tỷ lệ EA/DCM | | 0,0030 | 0,0027 | |
| p-value (Prob>F) | | | | |
| C: Mức độ siêu âm giai đoạn 1 | 0,0471 | 0,0007 | | 0,0449 |
| D: Mức độ siêu âm giai đoạn 2 | | | 0,0022 | 0,0216 |
| E: Áp suất cô quay | | | 0,0046 | 0,0200 |
| R² | 0,471 | 0,991 | 0,988 | 0,999 |
| R² hiệu chỉnh | 0,3396 | 0,9710 | 0,9612 | 0,9992 |
| R² dự đoán | 0,0608 | 0,8867 | 0,8577 | N/A |
| Độ chính xác thích hợp | 4,280 | 20,496 | 16,705 | 105,546 |

N/A: not applicable (không áp dụng).

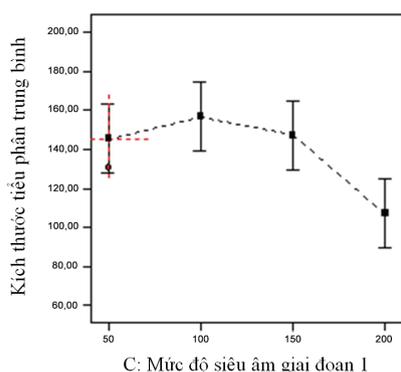
Kết quả phân tích phương sai các biến phụ thuộc được trình bày trong bảng 3. Trị số p-value <0,05 cho thấy sự ảnh hưởng có ý nghĩa về mặt thống kê của các biến độc lập lên biến phụ thuộc.

Giá trị R² thể hiện mối liên quan giữa sự biến thiên của biến độc lập và biến phụ thuộc. Giá trị này cho biết các biến độc lập ảnh hưởng bao nhiêu phần trăm đến sự biến thiên của biến phụ thuộc. R² của các biến R₂, R₃ và R₄ đều đạt 0,99 chứng tỏ 99% sự thay đổi của các biến này là do các biến độc lập gây nên. R² của biến R₁ chỉ đạt 0,47 cho thấy chỉ khoảng 50% sự thay đổi kích thước tiểu phân là do biến C (mức độ siêu âm ở giai đoạn 1) gây ra, còn lại là do ảnh hưởng của các biến số ngoài mô hình và sai số ngẫu nhiên.

R² hiệu chỉnh cung cấp thông tin tương tự R², tuy nhiên giá trị này loại trừ được ảnh hưởng của số lượng mẫu đến kết quả phân tích. Trong khi đó, R² dự đoán phản ánh khả năng dự đoán của mô hình. R² hiệu chỉnh và R² dự đoán lệch nhau 0,2 thì mô hình được xem là phân tích và dự đoán hợp lý. Trong các biến phụ thuộc, biến R₁ có R² hiệu chỉnh và R² dự đoán thấp, đồng thời hai giá trị này lệch nhau >0,2. Nguyên nhân có thể do vấn đề ở dữ liệu thực nghiệm hoặc mô hình phân tích. Tuy nhiên, với kết quả kiểm chứng thực nghiệm thu được (trình bày ở phần “**Thực nghiệm kiểm chứng**”), kết quả thu được tương đồng với kết quả dự đoán (lệch 0,85%). Các biến R₂, R₃ và R₄ đều có R² hiệu chỉnh và R² dự đoán trên 85%, riêng biến R₄ xấp xỉ 1 nên không xác định trong thống kê.

Độ chính xác thích hợp thể hiện tỷ lệ giữa “tín hiệu” và “nhiều”. Hay nói cách khác, giá trị này là tỷ số giữa khoảng giá trị dự đoán (xung quanh giá trị dự đoán) và sai số dự đoán trung bình. Trị số này >4 được xem là phù hợp, chứng tỏ “tín hiệu” tạo ra là thích hợp. Tất cả các biến đều thỏa mãn yêu cầu này. Giá trị R² của biến R₁ nhỏ, tuy nhiên giá trị độ chính xác thích hợp thỏa mãn >4 nên vẫn có thể chấp nhận được.

Phân tích ảnh hưởng của các biến độc lập lên biến phụ thuộc

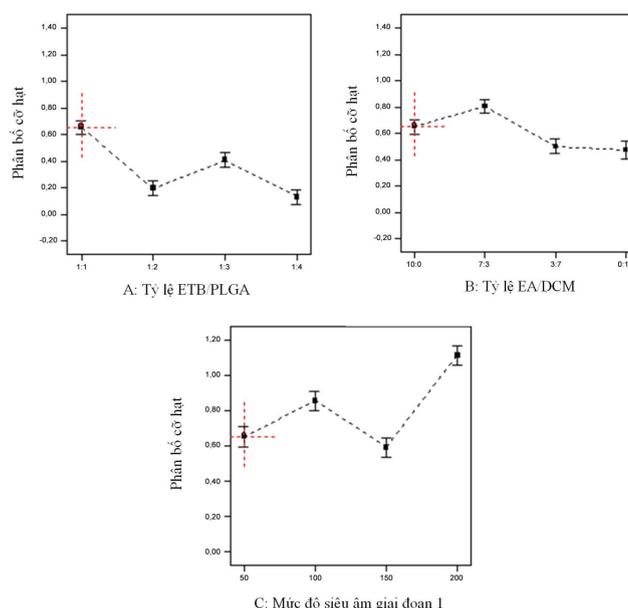


Hình 1. Ảnh hưởng của biến độc lập lên kích thước tiểu phân trung bình.

Sự ảnh hưởng của biến độc lập lên biến kích thước tiểu phân được thể hiện ở hình 1. Trong các biến số độc lập, kích thước tiểu phân nano ethambutol bị chi phối bởi mức độ siêu âm ở giai đoạn 1 (=0,0471). Khi mức siêu âm vượt quá 150 W, kích thước tiểu phân giảm đáng kể.

Ở một nghiên cứu khác, tác giả Sonia Iurian và cộng sự khảo sát ảnh hưởng của các thông số quy trình siêu âm đến kích thước tiểu phân nano. Thông số ảnh hưởng lớn nhất lên kích thước là thời gian và mức độ siêu âm. Hai thông số này càng lớn thì kích thước hạt càng giảm [5].

Sự gia tăng mức độ siêu âm đồng thời làm gia tăng nhiệt độ môi trường phân tán. Để tránh bị tác động của nhiệt độ, tiểu phân nano được duy trì nhiệt độ cố định 8-10°C.



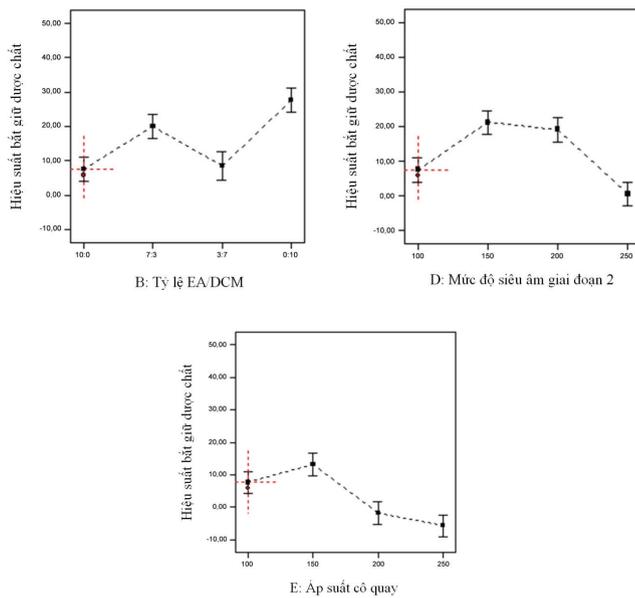
Hình 2. Ảnh hưởng của các biến độc lập lên chỉ số phân tán.

Sự ảnh hưởng của các biến số độc lập lên chỉ số phân tán không có sự nhất quán chung (hình 2). Khi lượng polymer tăng, nhìn chung chỉ số phân tán giảm, với tỷ lệ ETB/PLGA là 1:2 và 1:4 thì chỉ số phân tán thấp nhất, tiểu phân nano có sự đồng nhất cao (p=0,0007). Kết quả này có sự tương đồng với Kabiru Dauda và cộng sự khi nghiên cứu tiểu phân nano PLGA tải artesunat bằng phương pháp nhũ tương kép kết hợp bay hơi dung môi. Khi tỷ lệ artesunat:PLGA thay đổi từ 1:5 xuống 1:10 thì PDI lần lượt là 1,000±0,000 và 0,355±0,040 [6].

Loại dung môi sử dụng để hòa tan polymer cũng ảnh hưởng đến PDI. Sử dụng DCM làm dung môi hòa tan PLGA thu được các tiểu phân nano đồng nhất hơn so với sử dụng EA (p=0,0030). Điều này có thể giải thích là do tốc độ bay hơi của DCM nhanh hơn EA, khiến DCM được loại nhanh chóng và tiểu phân nano hình thành dễ dàng hơn với cỡ hạt

đồng nhất hơn [7]. Tuy nhiên, điều này còn tùy thuộc vào phương pháp loại dung môi hữu cơ. Ở một nghiên cứu khác, Phạm Đình Duy và cộng sự đã nghiên cứu tiểu phân nano tải pyrazinamid sử dụng DCM, EA và hỗn hợp EA/DCM làm dung môi hòa tan PLGA; và các dung môi này được loại bỏ bằng cách bay hơi tự nhiên. Khi đó, sử dụng EA giúp thu được tiểu phân nano có độ đồng nhất cao hơn [8].

Mức độ siêu âm ở giai đoạn 1 thay đổi cũng ảnh hưởng đến chỉ số phân tán của tiểu phân nano, sự thay đổi chỉ số phân tán không tuyến tính theo sự thay đổi mức độ siêu âm ($p=0,0007$). Về mặt lý thuyết, khi mức độ siêu âm tăng thì khả năng nhũ hóa tăng, đồng thời lực phân tán mạnh sẽ tạo ra tiểu phân nano có kích thước nhỏ, đồng nhất. Tuy nhiên, khi lực phân tán càng mạnh, nhiệt độ môi trường càng cao thì các tiểu phân nano có kích thước nhỏ tạo thành có năng lượng bề mặt lớn sẽ chuyển động hỗn loạn, dễ dẫn đến tình trạng kết tập, làm tăng PDI.



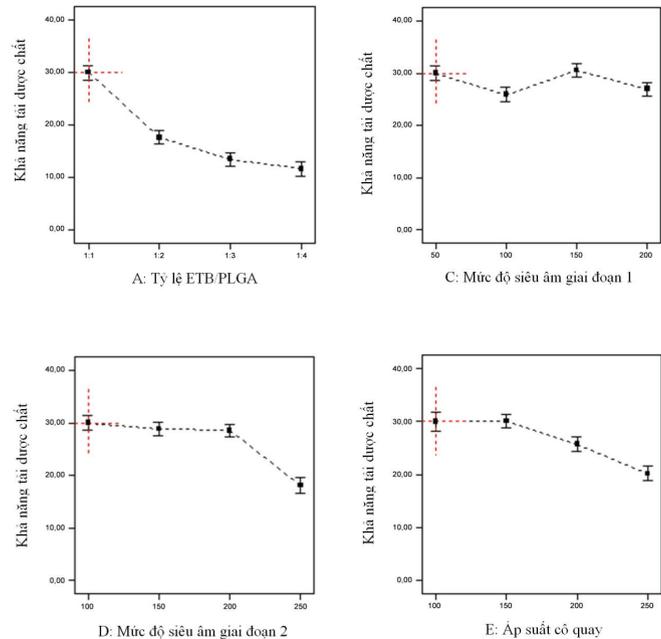
Hình 3. Ảnh hưởng của các biến độc lập lên hiệu suất mang dược chất.

Các biến độc lập và xu hướng ảnh hưởng đến hiệu suất mang dược chất được thể hiện ở hình 3. Giá trị EE có sự thay đổi đáng kể khi sử dụng các dung môi hữu cơ khác nhau ($p=0,003$). Khi dung môi được loại nhanh chóng sẽ giúp tiểu phân nano dễ hình thành hơn, khi đó khả năng bắt giữ dược chất hiệu quả hơn [7]. Do đó, khi sử dụng DCM sẽ tác động tích cực hơn đến giá trị EE so với sử dụng riêng EA hoặc phối hợp 2 loại dung môi.

Tương tự, mức độ siêu âm ở giai đoạn 2 cũng có ảnh hưởng mạnh đến giá trị EE ($p=0,002$). Khả năng nhũ hóa

tăng khi mức độ siêu âm tăng dần, tuy nhiên, cấu trúc nhũ tương đã được tạo thành có khả năng bị phá vỡ khi sự siêu âm diễn ra ở cường độ quá cao, dẫn đến thất thoát dược chất.

Trong khi mức độ siêu âm giai đoạn 2 tỷ lệ thuận với EE thì áp suất cô quay loại dung môi tác động ngược lại. Áp suất cô quay càng nhỏ thì sự loại dung môi hữu cơ hiệu quả hơn. Do vậy, khi tăng áp suất cô quay, giá trị EE có xu hướng giảm ($p=0,005$).



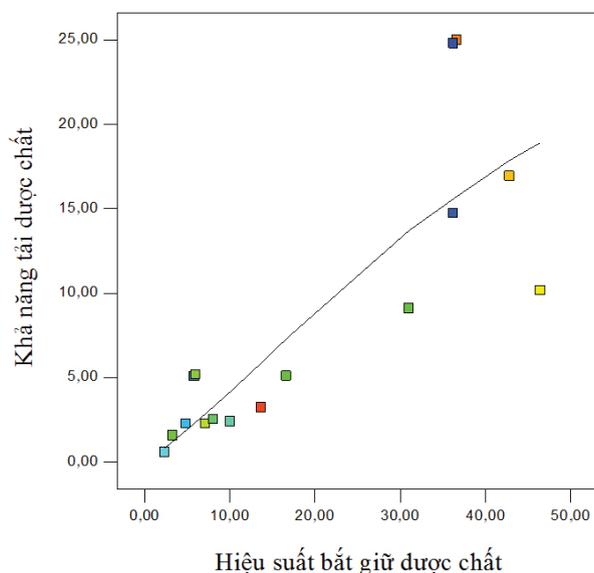
Hình 4. Ảnh hưởng của các biến độc lập lên khả năng tải dược chất.

Các biến độc lập và xu hướng ảnh hưởng đến khả năng tải dược chất được thể hiện ở hình 4. Giá trị DL giảm mạnh khi tỷ lệ ETB/PLGA tăng lên, nguyên nhân là do khi tăng lượng polymer làm tổng lượng chất rắn trong công thức tăng, trong khi lượng dược chất được bắt giữ không tăng theo tương ứng. Đây cũng là biến số ảnh hưởng lớn nhất lên DL ($p=0,014$).

Trong khi đó, giá trị DL không có sự thay đổi đáng kể khi mức độ siêu âm ở giai đoạn 1 thay đổi ($p=0,045$). Sự thay đổi mức độ siêu âm ở giai đoạn 2 cũng ảnh hưởng gần như tương tự lên giá trị DL, tuy nhiên, khi tăng đến 250 W giá trị DL có sự giảm sâu ($p=0,02$). Mức độ siêu âm quá lớn ở giai đoạn này có thể làm phá vỡ cấu trúc nhũ tương đã hình thành, gây ra thất thoát dược chất ra ngoài pha ngoại, dẫn đến làm giảm EE và DL.

Tương tự như đối với EE, áp suất cô quay cũng ảnh hưởng tỷ lệ nghịch với khả năng tải dược chất. Áp suất cô

quay càng nhỏ thì sự loại dung môi hữu cơ càng hiệu quả hơn. Do vậy, khi tăng áp suất cô quay, giá trị DL có xu hướng giảm ($p=0,02$).



Hình 5. Mối tương quan giữa EE và DL.

Giữa EE và DL có mối tương quan thuận, mức độ tương quan chặt chẽ với hệ số tương quan là 0,822. Hai thông số này cùng giúp đánh giá lượng dược chất được bắt giữ vào tiểu phân nano. EE biểu thị phần trăm lượng dược chất mà tiểu phân tải được, DL biểu thị tỷ lệ dược chất đã được bắt giữ so với tổng lượng chất rắn có trong công thức. Ở nghiên cứu này, EE và DL cùng bị chi phối bởi mức độ siêu âm giai đoạn 2 và áp suất cô quay giai đoạn loại dung môi hữu cơ. Ngoài ra, DL còn bị tác động bởi tỷ lệ ETB/PLGA. Chính tỷ lệ ETB/PLGA thay đổi làm tổng lượng chất rắn thay đổi nên giá trị DL không tuyến tính tuyệt đối so với EE (hệ số tương quan 0,822). Mối tương quan giữa EE và DL được thể hiện ở hình 5.

Tối ưu hóa

Dựa vào dữ liệu thực nghiệm, phần mềm Design-Expert tiến hành phân tích phương sai nhằm đánh giá ảnh hưởng của biến độc lập lên biến phụ thuộc (bảng 3). Kết hợp với điều kiện ràng buộc cho các biến độc lập và phụ thuộc, các thực nghiệm tối ưu với các chỉ số mong muốn (Desirability value) khác nhau được phần mềm đề xuất. Chỉ số mong muốn càng cao phản ánh khả năng tái lập càng cao khi so sánh giữa các dữ liệu được đề xuất bởi phần mềm và các dữ liệu thực nghiệm kiểm chứng. Thực nghiệm có chỉ số mong muốn cao nhất (0,897) được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Thông số công thức và quy trình của công thức tối ưu.

| Thông số | Giá trị | Ghi chú |
|--------------------------------|---------|---------------|
| Tỷ lệ ETB/PLGA | 1:1 | |
| Tỷ lệ EA/DCM | 0:10 | |
| Mức độ siêu âm giai đoạn 1 (W) | 150 | 1 phút |
| Mức độ siêu âm giai đoạn 2 (W) | 150 | 3 phút |
| Áp suất cô quay (mbar) | 150 | 150 vòng/phút |

Thực nghiệm kiểm chứng

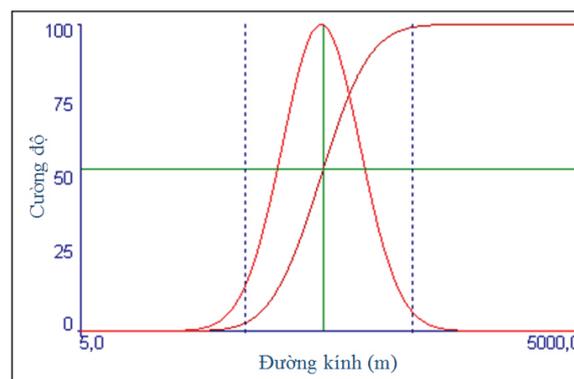
Tiến hành lặp lại 3 lần thực nghiệm tối ưu đã được đề xuất. Dữ liệu đánh giá được thể hiện trong bảng 5.

Bảng 5. Kết quả kiểm chứng công thức tối ưu (n=3).

| | Size (nm) | PDI | EE (%) | DL (%) | |
|--|---------------|-----------|------------|------------|-------|
| Dự đoán | 147,15±23,12 | 0,41±0,05 | 46,92±3,07 | 29,50±0,23 | |
| Khoảng tin cậy 95% cho giá trị dự đoán | Giới hạn trên | 172,33 | 0,56 | 53,97 | 32,43 |
| | Giới hạn dưới | 121,97 | 0,27 | 39,86 | 26,58 |
| Thực nghiệm | 148,40±8,22 | 0,39±0,03 | 44,94±0,61 | 29,00±0,28 | |

Kết quả thực nghiệm kiểm chứng thu được các thực nghiệm tối ưu có tính lặp lại cao. Đồng thời, giá trị thực nghiệm có sự tương đồng cao với giá trị dự đoán bởi phần mềm.

Các tiểu phân nano tải ethambutol có kích thước trung bình 148,40±8,22 nm (hình 6). Các tiểu phân có kích thước dưới 150 nm bị thanh thải ở phổi chậm hơn so với các tiểu phân lớn hơn, do đó duy trì hiệu lực điều trị lâu hơn [9]. Chỉ số phân tán là 0,39±0,03, kiểu phân bố một đỉnh. Hiệu suất bắt giữ và khả năng tải dược chất lần lượt là 44,94±0,61% và 29,00±0,28%. Hiệu suất này ở mức chấp nhận được do phương pháp nhũ tương kép kết hợp bay hơi dung môi (DE) để làm thất thoát dược chất ra pha ngoài [10]. So sánh với các phương pháp khác khi bào chế cùng một dược chất, phương pháp DE cho hiệu suất mang dược chất cũng thấp hơn [11].



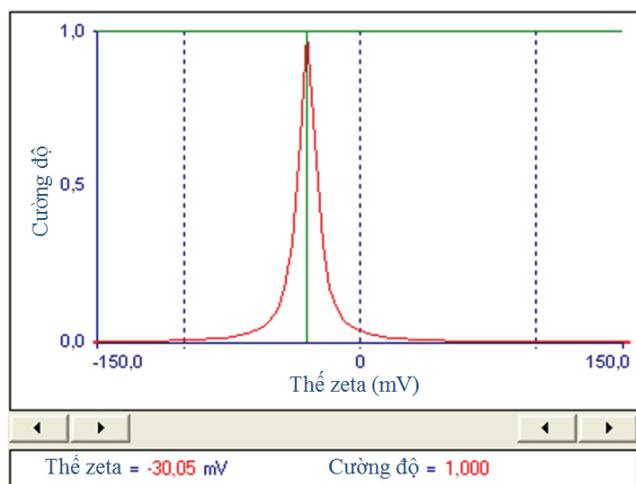
Hình 6. Đồ thị phân bố kích thước tiểu phân của công thức kiểm chứng.

Thế zeta

Kết quả xác định thế zeta từ 3 lô kiểm chứng được trình bày ở 6.

Bảng 6. Thế zeta các công thức kiểm chứng.

| Lô | Thế zeta (mV) |
|----------|---------------|
| 1 (n=10) | - 29,91±2,90 |
| 2 (n=10) | - 30,97±5,53 |
| 3 (n=10) | - 30,88±3,45 |



Hình 7. Đồ thị thế zeta của công thức kiểm chứng.

Các tiểu phân nano PLGA thường có thế zeta âm, trị số khác nhau tùy thuộc vào thành phần công thức và phương pháp bào chế [8, 11, 12]. Thế zeta của công thức kiểm chứng có giá trị trung bình là $-0,59 \pm 0,59$ mV (hình 7). Trị số này giúp tiểu phân nano tránh bị kết tập và bền vững trong quá trình bảo quản nhờ tạo sự ổn định tĩnh điện học do lực đẩy của các tiểu phân tích điện cùng dấu [13]. Sự tích điện bề mặt không những ảnh hưởng đến tính bền về mặt hóa lý, mà còn ảnh hưởng đến điện tích màng tế bào vi khuẩn. Điều này lại càng có ý nghĩa khi ethambutol thể hiện tác dụng thông qua quá trình tác động đến màng tế bào trực khuẩn lao [2].

Kết luận

Tối ưu hóa thành công các yếu tố ảnh hưởng đến việc điều chế tiểu phân nano poly-(D,L-lactid-co-glycolid) tải ethambutol bằng phương pháp nhũ tương kép kết hợp bay hơi dung môi với sự trợ giúp của phần mềm Design-Expert. Các giá trị tối ưu của các biến độc lập bao gồm: tỷ lệ ETB/

PLGA là 1:1; tỷ lệ EA/DCM là 0:10; mức độ siêu âm giai đoạn 1 là 150 W; mức độ siêu âm giai đoạn 2 là 150 W; áp suất cô quay là 150 mbar.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] WHO (2017), *Global Tuberculosis Report 2017*.
- [2] Bộ Y tế (2018), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tr. 631-633.
- [3] J.T. Seil, T.J. Webster (2012), “Antimicrobial applications of nanotechnology: methods and literature”, *International Journal of Nanomedicine*, **7**, pp.2767-2781.
- [4] R. Sagar Mudshinge, B. Amol Deore, Sachin Patil, M. Chetan Bhalgat (2011), “Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery”, *Saudi Pharmaceutical Journal*, **19(3)**, pp.129-141.
- [5] Sonia Iurian, Ioan Tomuta, Lucia Rus, Marcela Achim (2015), “Optimization of the sonication process for meloxicam nanocrystals preparation”, *Clujul Medical*, **88(3)**, pp.366-372.
- [6] Kabiru Dauda, Zulaikha Busari, Olajumoke Morenikeji, Funmilayo Afolayan, Oyetunde Oyeyemi, Jairam Meena, Debasis Sahu, Amulya Panda (2017), “Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid)-based artesunate nanoparticles: formulation, antimalarial and toxicity assessments”, *Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine & Biotechnology)*, **18(11)**, pp.977-985.
- [7] M. Ian Smallwood (1996), *Handbook of organic solvent properties*, Arnold.
- [8] Dinh-Duy Pham, Elias Fattal, Nicolas Tsapis (2015), “Pyrazinamide-loaded poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Optimization by experimental design”, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **30(Part B)**, pp.384-390.
- [9] A.H. Chow, H.H. Tong, P. Chattopadhyay, B.Y. Shekunov (2007), “Particle engineering for pulmonary drug delivery”, *Pharm. Res.*, **24(3)**, pp.411-437.
- [10] E. Cohen-Sela, et al. (2009), “A new double emulsion solvent diffusion technique for encapsulating hydrophilic molecules in PLGA nanoparticles”, *J. Control. Release*, **133(2)**, pp.90-95.
- [11] Sebastian Piepera, Klaus Langera (2017), “Doxorubicin-loaded PLGA nanoparticles - a systematic evaluation of preparation techniques and parameters”, *Materials Today: Proceedings*, **4(Supplement 2)**, pp.188-192.
- [12] Ceyda Tuba Sengel Turk, Umut Can Oz, Tugrul Mert Serim, Canan Hascicek (2014), “Formulation and optimization of nonionic surfactants emulsified nimesulide - loaded PLGA-based nanoparticles by design of experiments”, *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, **15(1)**, pp.161-176.
- [13] Beatrice Heurtault, Patrick Saulnier, Brigitte Pech, Jacques-Emile Proust, Jean-Pierre Benoit (2003), “Physico-chemical stability of colloidal lipid particles”, *Biomaterials*, **24(23)**, pp.4283-4300.