BÀI NGHIÊN CỨU

Xây dựng phương pháp định lượng natri diclofenac trong nước mắt thỏ nhằm hướng đến đánh giá giải phóng thuốc *in vivo*

Đào Văn Nam, Vũ Thị Hồng Hạnh, Võ Quốc Ánh*
Trường Đại học Dược Hà Nội
**Tác giả liên hệ: anhvq@hup.edu.vn*
(Ngày gửi đăng: 12/4/2022 – Ngày duyệt đăng: 26/5/2022)

SUMMARY

In view that as Diclofenac (DF) is a widely used NSAID for relieving symptoms of inflammation and pain in the eyes, but the bioavailability of its conventional dosage forms (0.1 % eye drop solutions) is low and fluctuated due to continuous lacrimation and eye blinking, and thereby, and therefrom, rises the need of prolonging drug retention time of in the eyes and increasing treatment outcomes, at first through evaluation of the time-dependent levels of formulated drugs in the eyes, … a qualitative method for analysing DF in rabbit lacrimal fluid was developed. The lacrimal fluid samples were absorbed directly from the eyes with absorbing paper trips, and then, the absorbed DF was extracted therefrom by a mixture of phosphate buffer (0,01 M; pH 2,5) and methanol (15 : 85, v/v). Finally, the obtained extracts were analysed by reverse-phase HPLC (in observation to USP 41–NF 36, Monographs NPG – 2018; with: HPLC system - Agilent 1200 Series, Agilent Technologies - Germ.); Column - C18 (4.6 x 250 mm); Packed particle size - 5 µm; Temperature - 35 °C). The method was validated by the US-FDA and ICH guidance and proposed for bioanalytical evaluation. The method proved evidently potent for quantification of DF in the rabbit lacrimal fluid at 6 minutes after administion of a commercial DF eye drop products of the kind. The developed method showed viable as a useful approach for the quality control of DF eye drop products and further development of new DF ophthalmic dosage forms.

Từ khóa: *diclofenac, HPLC, nước mắt, thuốc nhỏ mắt, lưu thuốc trên mắt.*

Đặt vấn đề

Trong điều trị nhãn khoa, chế phẩm chứa DF được sử dụng để giảm đau, giảm phù nề và được lưu hành chủ yếu ở dạng dung dịch 0,1 % (w/v). Tuy nhiên, thuốc nhanh bị rửa trôi dẫn đến sinh khả dụng của thuốc thấp và dao động lớn. Các biện pháp tăng thời gian lưu của thuốc tại mắt (bao gồm tăng độ nhớt của dung dịch thuốc, hoặc bào chế thuốc dưới dạng gel, thuốc mỡ hoặc thuốc đặt tại mắt) có thể giúp tăng hiệu quả điều trị của DF. Việc xây dựng một phương pháp định lượng DF trong nước mắt là cần thiết để làm cơ sở theo dõi biến thiên nồng độ DF trên giác mạc cũng như để nghiên cứu động học giải phóng dược chất tại mắt từ các công thức bào chế khác nhau.

Trong định lượng thuốc trong nước mắt, hai phương pháp phổ biến được sử dụng là

dùng vi mao quản để hút nước mắt hoặc giấy thấm thương mại có chia vạch để thấm nước mắt, sau đó mẫu được xử lý và phân tích [9], [11]. Phương pháp dùng mao quản có ưu điểm là thu được trực tiếp nước mắt, tuy nhiên lượng nước mắt lấy được rất hạn chế và khó được lấy ra do phần lớn nước mắt tồn tại ở dạng film trên giác mạc. Hơn nữa, kĩ thuật này có thể gây kích ứng mắt và tăng tiết nước mắt làm cho thuốc bị pha loãng và kết quả thiếu tin cậy. Phương pháp dùng giấy thấm thương mại có khó khăn trong việc xác định chính xác thể tích nước mắt do chỉ căn cứ trên các vạch chia sẵn trên giấy. Do đó, cần thiết phải có một kĩ thuật lấy mẫu để đảm bảo độ chính xác của kết quả phân tích và có thể áp dụng để định lượng DF trong nước mắt.

Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã phát triển một phương pháp định lượng dược chất trong nước mắt thỏ, trong đó nước mắt được thấm vào các mảnh giấy thấm; sau đó dược chất được chiết và định lượng bằng kĩ thuật HPLC với detector UV-Vis [1]. Trên cơ sở đó, phương pháp chiết trực tiếp dược chất từ các mảnh giấy thấm nước mắt và kĩ thuật HPLC đã được lựa chọn để định lượng DF trong nước mắt động vật thí nghiệm. Thỏ là động vật thí nghiệm được lựa chọn do có sự tương tương tự về cấu trúc giải phẫu giữa mắt thỏ và mắt người. Phương pháp đã được thẩm định theo hướng dẫn của US-FDA và ICH về xây dựng phương pháp phân tích trong dịch sinh học [3], [4]. Kết quả của nghiên cứu này có thể được áp dụng trong việc đánh giá hiệu quả của các chế phẩm thương mại cũng như trong nghiên cứu phát triển các dạng thuốc dùng tại mắt của DF.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Hóa chất, dung môi

Chất chuẩn natri diclofenac là chất chuẩn nội bộ (xuất xứ Trung Quốc, số lô 301181113-5). Acid hydrocloric, acid phosphoric, natri dihydrophosphat, natri hydroxyd đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích có xuất xứ từ Trung Quốc. Methanol đạt tiêu chuẩn HPLC được sản xuất bởi Fisher (Mỹ). Chế phẩm thị trường Dilorop 0,1 % (dung dịch natri diclofenac 5 mg trong 5 mL, Hanlim pharmaceutical Co. Ltd, Korea). Động vật thí nghiệm là thỏ đực trắng New Zealand trưởng thành, cân nặng khoảng 3,0 - 4,0 kg.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị mẫu chuẩn

Các mảnh giấy thấm kích thước 3 x 10 mm được chuẩn bị từ giấy lọc định lượng (Newstar, Trung Quốc). Quá trình lấy mẫu nước mắt placebo được thực hiện như sau: dùng panh kẹp y tế giữ chặt một đầu mẫu giấy thấm, đầu còn lại cho tiếp xúc nhẹ với niêm mạc, ở vùng ống dẫn lệ trên mắt thỏ để mao dẫn nước mắt lên giấy thấm trong 10 giây. Thể tích nước mắt mao dẫn lên giấy thấm được xác định bằng cách cân khối lượng mảnh giấy thấm trước và sau mao dẫn nước mắt, sử dụng cân phân tích điện tử có độ nhạy cao (model ES-2255M-DR, Mettler Toledo, Thụy sĩ, d = 0,01 mg) [1]. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C trong lọ thủy tinh có đậy kín bằng nút cao su.

Chuẩn bị các dung dịch chuẩn của DF có nồng độ xác định trong hỗn hợp nước : methanol (30:70, tt/tt). Rã đông các mảnh giấy thấm placebo và chuyển từng mẫu giấy placebo vào các lọ đựng mẫu dung tích 0,5 mL. Nhanh chóng đưa 5 µL các dung dịch chuẩn bằng micropipet (model EMC-5720000, khoảng hoạt động 0,5-5,0 µL, EMCLAB Instruments GmbH, Đức) lên các mảnh giấy thấm này, sau đó đậy nắp lọ đựng mẫu. Các mảnh giấy thấm chứa dược chất được xử lý và phân tích trong ngày, hoặc được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C cho đến khi được xử lý và phân tích.

Chuẩn bị mẫu thử

Nhỏ dung dịch Dilorop 0,1 % vào mắt thỏ. Sau đó dùng các mảnh giấy thấm để lấy nước mắt, thao tác như đối với mẫu placebo. Mẫu thử được đặt vào lọ đựng mẫu riêng biệt (dung tích 0,5 mL) và được bảo quản ở nhiệt độ -20 °C để chờ xử lý và phân tích mẫu.

Xử lý mẫu

Các mẫu giấy thấm chứa nước mắt bảo quản lạnh (mẫu nước mắt trắng (placebo); mẫu chuẩn; hoặc mẫu thử) được rã đông ở điều kiện nhiệt độ phòng trong 30 phút. Sau đó DF được chiết ra khỏi giấy thấm bằng cách thêm 200 µL hỗn hợp đệm phosphat (0,01 M; pH 2,5) : methanol (15 : 85, tt/tt), lắc xoáy trong 10 phút. Dịch chiết được chuyển vào lọ chèn của lọ sắc ký, đặt vào buồng bơm mẫu tự động của hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao chờ phân tích.

Điều kiện sắc ký

Phương pháp phân tích mẫu được tham khảo từ phương pháp định lượng DF trong Dược điển Mỹ 41 [6] và được điều chỉnh để phù hợp với điều kiện thực tế: thiết bị HPLC (Agilent 1200 Series, Agilent Technologies, Đức); cột C18 4,6 x 250 mm, kích thước hạt nhồi 5 µm và được duy trì ở 35 ^{o}C bởi bộ ổn nhiệt cột (Athena Technology, India); pha động là hỗn hợp đệm phosphat (0,01 M; pH 2,5) : methanol (15 : 85, tt/tt); tốc độ rửa giải 1,030 mL/phút; tiêm mẫu tự động thể tích 40 µL; bước sóng phát hiện 277 nm (cực đại hấp thụ khi quét phổ DF trong pha động). Kết quả được xử lý trên phần mềm ChemStation.

Phương pháp định lượng DF trong nước mắt được thẩm định trên các tiêu chí: độ thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ tìm lại, độ lặp lại, theo tham khảo hướng dẫn của US-FDA và ICH [3], [4].

Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thực nghiệm được xử lý thống kê trên phần mềm Microsoft Excel 2021 và được trình bày dưới dạng trung bình ± độ lệch chuẩn (TB ± SD).

Kết quả nghiên cứu và bàn luận

Độ thích hợp hệ thống

Phân tích HPLC 6 lần dung dịch chuẩn của DF trong pha động (10,00 µg/mL), với các thông số sắc ký được nêu ở trên. Kết quả cho thấy: thời gian lưu của DF là 5,935 ± 0,004 phút (RSD = 0,1 %), diện tích píc của DF là 902,4 ± 0,0 mAu.s (RSD < 0,1 %), hệ số cân đối píc là 0,888 ± 0,002. Điều đó chứng tỏ hệ thống có tính tương thích tốt.

Lựa chọn điều kiện chiết DF từ nước mắt thỏ

Tiến hành khảo sát 3 hệ dung môi chiết là methanol, nước tinh khiết, và hỗn hợp đệm pH 2,5 : methanol (15 : 85, tt/tt) để lựa chọn hệ dung môi phù hợp dựa trên tiêu chí về độ tìm lại và mức độ thuận lợi khi xử lý mẫu. Các mẫu giấy placebo đã được thấm nước mắt và hấp phụ 0,05; 0,50 và 5,00 µg DF được chiết lần lượt bằng 3 loại dung môi và được phân tích bằng kĩ thuật HPLC sử dụng đường chuẩn của chất chuẩn được pha trong pha động (y = 84,73x + 3,555; R_2 = 0,9999). Kết quả thí nghiệm ở Bảng 1 cho thấy độ tìm lại thu được khi sử dụng methanol không ổn định, dao động từ 95-126 %. Khi dùng nước tinh khiết làm dung môi, độ tìm lại dao động mạnh ở mẫu chứa 0,05 µg dược chất (74-95 %). Nếu xử lý mẫu bằng hỗn hợp dung dịch đệm pH 2,5: methanol (15 : 85, tt/tt), độ tìm lại thu được cao và ổn định (91-106 %) ở cả ba mức nồng độ. Từ những kết quả trên, hỗn hợp dung dịch đệm pH 2,5 : methanol (15 : 85, tt/tt) được chọn làm dung môi chiết DF từ mẫu nước mắt cho các thí nghiệm tiếp theo.

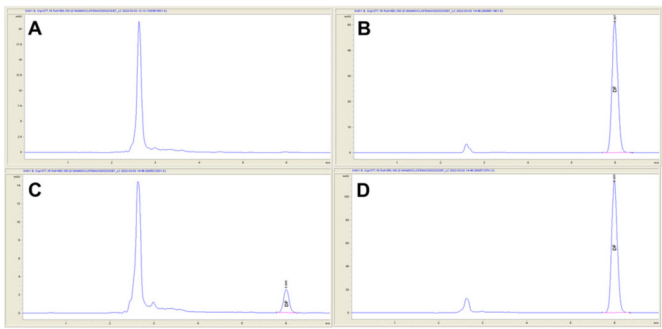
Độ đặc hiệu

Phân tích HPLC các mẫu: placebo (dịch chiết từ giấy thấm chỉ chứa nước mắt), dung dịch DF pha trong pha động, và dịch chiết từ các mảnh giấy thấm nước mắt được hấp phụ DF. Các thí nghiệm trên mẫu nước mắt placebo được lấy từ 3 thỏ thí nghiệm. Sắc ký đồ đại diện của các mẫu được trình bày trong Hình 1.

Kết quả thí nghiệm cho thấy sắc ký đồ của mẫu placebo (Hình 1A) không xuất hiện píc có cùng thời gian lưu với píc trong các sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (Hình 1B) và mẫu thử (Hình 1C và 1D). Sắc ký đồ của dung dịch DF pha trong pha động (Hình 1B) và mẫu dịch chiết DF từ giấy thấm nước mắt (Hình 1C và 1D) xuất hiện các píc chính có thời gian lưu giống nhau (khoảng 6,0 phút). Như vậy

Bảng 1. Độ tìm lại DF khi sử dụng các hệ dung môi khác nhau (n=3).

Dung môi	Lượng dược chất thêm vào (µg)	Kết quả phân tích (µg)	Độ tìm lại (%)	Lượng dược chất thêm vào (µg)	Kết quả phân tích (µg)	Độ tìm lại (%)	Lượng dược chất thêm vào (µg)	Kết quả phân tích (µg)	Độ tìm lại (%)
MeOH		0,06 ± 0,01	110,3 ± 13,6		0,54 ± 0,04	107,1 ± 7,3		2,51 ± 0,11	100,5 ± 4,5
Nước	0,05	0,04 ± 0,01	87,5 ± 11,1	0,50	0,51 ± 0,02	102,9 ± 3,9	5,00	2,45 ± 0,05	97,8 ± 1,8
Đệm pH 2,5 : methanol (15:85, tt/tt)		0,05 ± 0,00	93,2 ± 2,3		0,51 ± 0,01	101,8 ± 1,9		2,53 ± 0,10	101,2 ± 3,8

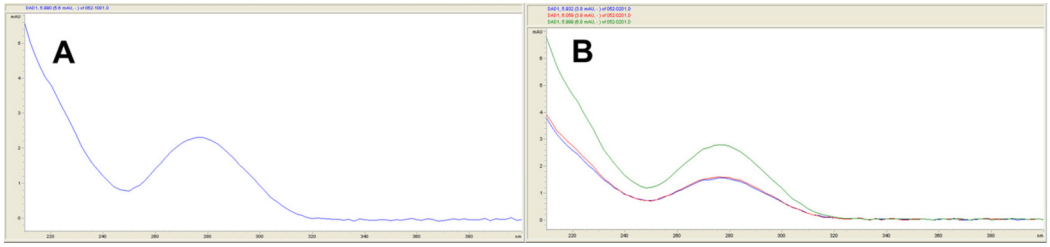


Hình 1. Sắc ký đồ của mẫu nước mắt trắng (A); mẫu DF nồng độ 5,00 µg/mL pha trong pha động (B); dịch chiết từ mẫu giấy thấm nước mắt thỏ và chứa 0,05 µg DF (C); dịch chiết từ mẫu giấy thấm nước mắt thỏ và chứa 2,50 µg DF (D).

phương pháp phân tích mẫu là chọn lọc với DF. Hình 1A thể hiện phổ hấp thụ UV tại đỉnh píc DF của mẫu pha trong pha động ở nồng độ 0,20 µg/mL. Đáng chú ý, khi phân tích mẫu nước mắt chứa 0,05 µg DF (tương ứng với nồng độ DF trong dịch chiết là 0,244 µg/mL), phổ hấp thụ UV tại đỉnh píc DF đồng dạng với phổ đồ tại các điểm khác của píc (điểm giữa đường lên và điểm giữa đường xuống, Hình 2B) và đồng dạng với phổ đồ trong pha động ở cùng mức nồng độ (Hình 2A). Hệ số purity factor đặc trưng cho mức độ giống nhau (match or similarity) của các phổ thuộc píc so với phổ tại đỉnh (píc DF trong nước mắt) được tính bằng phần mềm Chemstation là 999,937 (giá trị gần với 1000 thể hiện độ tinh khiết của píc cao). Hệ số match giữa phổ hấp thụ UV tại đỉnh píc DF của mẫu DF trong pha động và mẫu DF trong nước mắt ở cùng mức nồng độ (Hình 2) tính được là 0,9989 (giá trị ~ 1 cho thấy 2 phổ tương tự nhau) [2]. Các kết quả này cho thấy, píc chính trong các dịch chiết từ mẫu nước mắt là chọn lọc và tinh khiết với DF.

Khoảng tuyến tính

Các mẫu chuẩn DF trong nước mắt được chuẩn bị bằng cách đưa 5 µL các dung dịch chuẩn của DF trong pha động có nồng độ chính xác khoảng 10,00; 20,00; 50,00; 100,00; 200,00; 500,00; 1000,00 µg/mL lên các mảnh giấy thấm chứa nước mắt. Sau đó DF được



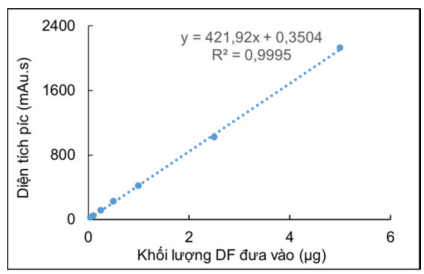
Hình 2. (A) Phổ hấp thụ UV tại đỉnh píc DF của mẫu DF pha trong pha động (0,20 µg/mL). (B) Phổ hấp thụ UV tại đỉnh píc, điểm giữa đường lên và điểm giữa đường xuống của píc DF khi phân tích HPLC của dịch chiết từ mẫu giấy thấm nước mắt thỏ và chứa 0,05 µg DF.

chiết và phân tích theo phương pháp đã được mô tả ở trên. Đường chuẩn biểu diễn tương quan giữa lượng DF có trong mẫu chuẩn với diện tích píc được xây dựng bằng phương pháp hồi quy tuyến tính. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 2 và Hình 3.

Bảng 2. Kết quả khảo sát độ tuyến tính.

STT	Khối lượng DF (µg)	Diện tích píc (mAu.s)	Khối lượng DF tính lại sử dụng đường chuẩn (µg)
1	0,05	23,2	0,05
2	0,10	46,1	0,11
3	0,25	110,5	0,26
4	0,50	223,9	0,53
5	1,00	418,9	0,99
6	2,50	1018,4	2,41
7	5,00	2127,4	5,04

Phân tích số liệu cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa khối lượng DF được hấp phụ (trên giấy thấm nước mắt thỏ) và diện tích píc trong khoảng từ 0,05 đến 5,00 µg (R^2 = 0,9995), tương ứng với nồng độ DF trong nước mắt khoảng từ 10 đến 1000 µg/g. Theo hướng dẫn ICH M10 và US-FDA đối với phương pháp phân tích sinh học có thể coi điểm thấp nhất của đường chuẩn là giới hạn định lượng dưới (LLOQ) (CV = 4,9 % < 20 %, n=5) [4]. Khi so sánh giá trị tính lại theo đường chuẩn đã xây dựng (y = 421,92x + 0,3504) với giá trị thực của mẫu, các sự sai khác đều nằm ở khoảng -1 % đến 9 % và thấp hơn ngưỡng giá trị chấp nhận (< 20 % ở LLOQ và < 15 % ở các nồng độ còn lại).



Hình 3. Đồ thị biểu diễn tương quan giữa khối lượng DF trong giấy thấm và diện tích píc tương ứng trên sắc ký đồ.

Độ đúng, độ lặp lại

Độ đúng và độ lặp lại của phương pháp được xác định trên 3 mức hàm lượng dược chất trên giấy thấm nước mắt: 0,05; 0,50 và 2,50 µg. Sau đó DF được chiết từ các mảnh giấy thấm và được phân tích theo phương pháp đã mô tả ở trên, kết quả được trình bày ở Bảng 3. Nồng độ DF định lượng được dao động từ 96,5-117,1 % so với nồng độ ban đầu (đạt yêu cầu về độ đúng, ± 20 % ở LLOQ và ± 15 % ở các nồng độ khác). Phương pháp phân tích DF trong nước mắt có độ lặp lại tốt ở cả 3 mức hàm lượng DF (RSD < 5,0 %, đạt yêu cầu < 15 % đối với phương pháp phân tích dịch sinh học).

Độ tìm lại

Độ tìm lại được xác định ở ba mức nồng độ của dược chất trong giấy thấm: thấp, trung

Bảng 3. Kết quả khảo sát độ đúng và độ lặp lại (n=5).

STT	Lượng chuẩn DF thêm vào (µg)	Diện tích píc (mAu.s)	Kết quả phân tích (µg)	Độ đúng (%)	RSD (%)
1	0,05	23,2 ± 1,1	0,05 ± 0,00	108,2 ± 5,3	4,9
2	0,50	219,2 ± 8,1	0,52 ± 0,02	103,8 ± 3,9	3,7
3	2,50	1062,3 ± 45,3	2,52 ± 0,11	100,7 ± 4,3	4,3

Bảng 4. Kết quả định lượng dược chất được chiết ra từ giấy thấm (n=3).

STT	Lượng DF đưa vào (µg)	Diện tích píc ± SD (mAu.s)	Lượng DF tìm lại ± SD (µg)	Tỷ lệ thu hồi ± SD (%)
1	2,50	1048,8 ± 39,6	2,53 ± 0,10	101,2 ± 3,8
2	0,50	213,9 ± 4,0	0,51 ± 0,01	101,8 ± 1,9
3	0,05	22,8 ± 0,5	0,05 ± 0,00	93,2 ± 2,3

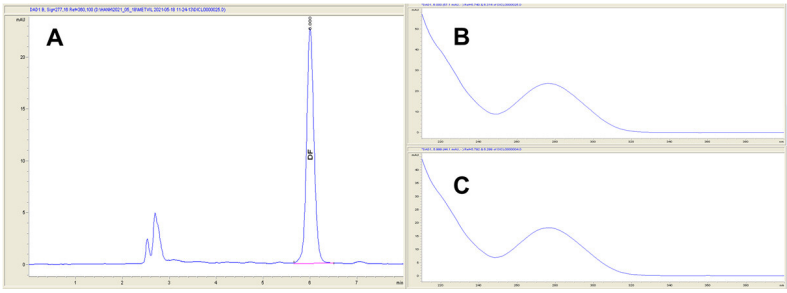
Bảng 5. Kết quả định lượng dược chất trong các mẫu thử độ ổn định (n=4).

Lượng DF ban đầu	Bảo quản 14 ngày ở -20°C			Bảo quản trong auto-sampler 10 giờ sau khi chiết		
	Diện tích píc (mAu.s)	Hàm lượng (µg)	% so với ban đầu	Diện tích píc (mAu.s)	Hàm lượng (µg)	% so với ban đầu
2,50	994,9 ± 40,8	2,36 ± 0,10	94,3 ± 3,9	1017,4 ± 41,3	2,41 ± 0,10	102,3 ± 0,4
0,50	203,0 ± 5,1	0,48 ± 0,01	96,1 ± 2,4	208,9 ± 6,6	0,49 ± 0,02	102,9 ± 1,3
0,05	22,5 ± 0,3	0,05 ± 0,00	105,2 ± 1,6	23,2 ± 0,5	0,05 ± 0,00	102,9 ± 0,9

bình và cao. Cụ thể, 5 µL các dung dịch chuẩn DF có 3 mức nồng độ chính xác khoảng 10,00; 100,00 và 500,00 µg/mL được đưa lên các mảnh giấy thấm chứa nước mắt. Sau đó, các mẫu giấy được xử lý và phân tích theo phương pháp đã trình bày ở trên. Sử dụng phương trình biểu diễn sự phụ thuộc của diện tích píc vào nồng độ DF trong pha động (y = 84,73x + 3,555; R2 = 0,9999) để tính được nồng độ DF trong dịch chiết, từ đó xác định được khối lượng DF trên các mảnh giấy và tỉ lệ thu hồi. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở Bảng 4. Độ tìm lại DF từ giấy thấm của phương pháp đã xây dựng ở mức cao (trên 90 %), có độ lặp lại tốt (RSD < 5 %) ở cả 3 nồng độ thí nghiệm.

Độ ổn định mẫu khi bảo quản

Độ ổn định bảo quản của mẫu được đánh giá ở hai điều kiện bảo quản: nhiệt độ -20 °C trong 14 ngày đối với mẫu giấy thấm chứa nước mắt và DF, và nhiệt độ phòng trong 10 giờ trong autosampler của mẫu dịch chiết DF (từ giấy thấm chứa nước mắt và DF). Ở mỗi điều kiện bảo quản, thí nghiệm được tiến hành ở ba mức hàm lượng của DF trên giấy thấm nước mắt: 0,05; 0,50 và 2,50 µg. Kết quả phân tích được trình bày ở Bảng 5. Các mẫu nước mắt chứa DF ổn định trong 2 tuần ở điều kiện bảo quản -20 °C và mẫu dịch chiết DF trong nước mắt ổn định sau 10 giờ bảo quản trong autosampler. Các kết quả này cũng gợi ý rằng có thể tiến hành thu thập mẫu nước mắt chứa DF và bảo quản dài hạn ở điều kiện -20 oC trong vòng 14 ngày trước khi phân tích, và có thể phân tích trong vòng 10 giờ sau khi chiết DF.



Hình 4. Sắc ký đồ (A) và phổ hấp thụ UV tại đỉnh píc DF (B) của mẫu nước mắt thỏ đại diện tại thời điểm 6 phút sau khi nhỏ dung dịch Dilorop 0,1 %. (C) Phổ hấp thụ UV tại đỉnh píc DF của dung dịch chuẩn DF trong pha động.

Ứng dụng định lượng DF trong nước mắt

Phương pháp phân tích DF đã được thẩm định ở trên được ứng dụng để định lượng DF trong nước mắt tại thời điểm 06 phút, sau khi nhỏ dung dịch Dilorop 0,1 %. Hình 4A minh họa sắc ký đồ của mẫu thử từ 1 cá thể thỏ và phổ UV-Vis tại đỉnh píc (Hình 4B). Kết quả cho thấy phổ hấp thụ của DF trong mẫu thực tại thời điểm 6 phút sau khi nhỏ thuốc đồng dạng với phổ của DF trong pha động (Hình 4C) và phổ của DF trong mẫu chứa nước mắt trắng được hấp phụ thêm DF (Hình 2B). Điều này cho thấy tính chọn lọc của phương pháp phân tích đã xây dựng đối với việc định lượng DF trong mẫu thực. Chi tiết kết quả phân tích ở 5 cá thể thỏ được trình bày trong Bảng 6.

Bảng 6. Kết quả định lượng nồng độ DF trong nước mắt thỏ tại thời điểm 06 phút sau khi nhỏ thuốc Dilorop 0,1 %.

Cá thể	Lượng nước mắt lấy được (mg)	Diện tích píc (mAu.s)	Lượng DF định lượng được (µg)	Nồng độ thuốc/ nước mắt (mg/g)
1	7,30	237,7	0,56	0,077
2	3,76	92,1	0,22	0,058
3	4,49	145,3	0,34	0,077
4	5,47	195,6	0,46	0,085
5	3,64	209,8	0,50	0,136
TB	4,93			0,086
SD	1,51			0,030

Bàn luận

Trong nghiên cứu này, quy trình xử lý mẫu và định lượng DF trong nước mắt thỏ đã được xây dựng và thẩm định. Phương pháp có thể dùng để đánh giá mức độ lưu thuốc trong mắt tại các thời điểm khác nhau. So với các kĩ thuật khác để định lượng trực tiếp dược chất trong võng mạc, như kỹ thuật sử dụng thuốc nhuộm huỳnh quang [5], hay mô hình microfluid sử dụng mắt động vật đã cô lập [8], phương pháp đã xây dựng có ưu điểm là đơn giản, có thể tiến hành với các phương tiện, thiết bị thường quy trong khi vẫn đảm bảo các yêu cầu khi thẩm định theo hướng dẫn của US-FDA và ICH. Việc sử dụng giấy thấm để lấy nước mắt thay vì dùng các phương pháp lấy nước mắt khác như ống mao quản, Schirmer paper strips hoặc ophthalmic sponges [9] giúp hạn chế tối đa kích ứng lên mắt thử nhưng vẫn đảm bảo độ chính xác của kết quả thí nghiệm.

Phương pháp chiết trực tiếp DF từ mẫu giấy thấm chứa nước mắt thỏ được lựa chọn dựa trên kết quả của nghiên cứu đã công bố [1]. Trong số các hệ dung môi chiết được khảo sát, methanol bay hơi nhanh làm sai lệch kết quả. Khi sử dụng nước tinh khiết, độ tìm lại dao động mạnh trong khi việc chuyển dịch chiết vào các lọ chèn (có đường kính mao quản nhỏ) không thuận lợi do nước có sức căng bề mặt lớn (so với dung môi hữu cơ). Nếu xử lý mẫu bằng hỗn hợp pha động, độ tìm lại thu được cao và ổn định ở cả ba mức

nồng độ. Do vậy, hỗn hợp dung dịch dung môi pha động là phù hợp nhất để chiết DF từ mẫu nước mắt. Phương pháp xử lý và định lượng DF trong nước mắt đã được thẩm định theo hướng dẫn về phương pháp phân tích trong dịch sinh học của US-FDA và ICH.

Kết quả của nghiên cứu này khẳng định tính phù hợp của quy trình lấy mẫu và phân tích dược chất trong nước mắt mà chúng tôi đã phát triển [1]. Đặc biệt, giới hạn định lượng dưới của cả hai dược chất đã khảo sát đều ở mức thấp so với nồng độ thuốc ban đầu ngay sau khi nhỏ thuốc (khoảng 1,0 % đối với DF và 0,1 % đối với brinzolamid). Điều này cho thấy tiềm năng áp dụng của phương pháp đối với các dược chất khác. Phương pháp đã xây dựng trong nghiên cứu này có thể được dùng để xác định thời gian lưu của DF trong nước mắt nhằm đánh giá giải phóng thuốc in vivo. Ngoài ra, một số phương pháp dùng để định lượng DF trong các tổ chức của mắt và nghiên cứu sinh khả dụng đã được công bố, bao gồm lấy mẫu từ dịch sau võng mạc hoặc dịch tiền phòng [10], hoặc cô lập mắt động vật để thử giải phóng sau đó bóc tách giác mạc [7] để chiết và định lượng.

Phương pháp đã được áp dụng để xác định nồng độ DF trong nước mắt thỏ ở thời điểm 06 phút sau khi nhỏ dung dịch Dilorop 0,1 %. Nồng độ DF tại thời điểm này dao động ở mức 50-150 µg/g, bằng khoảng 10 % nồng độ thuốc ban đầu, cho thấy rằng phần lớn thuốc bị rửa trôi nhanh chóng do sự tiết và dẫn lưu nước mắt liên tục qua ống thông mũi-lệ. Trong khi đó, dược chất brinzolamid được lưu lại trong nước mắt ở mức 20,00-100,00 µg/g tại thời điểm 30 phút sau khi nhỏ thuốc [1]. Sự khác biệt giữa hai kết quả có thể được lý giải dựa trên sự khác nhau giữa nồng độ và dạng bào chế của hai chế phẩm. Điều này khẳng định ý nghĩa của phương pháp đã xây dựng trong việc đánh giá mức độ giải phóng dược chất in vivo từ các dạng bào chế khác nhau. Sự dao động lớn giữa nồng độ thuốc tại thời điểm 06 phút sau khi nhỏ Dilorop ở các cá thể thỏ (mức chênh lệch lớn nhất khoảng 2,4 lần) có thể là do sự khác nhau về sinh lý mắt giữa các cá thể, như tốc độ tiết nước mắt và tần suất chớp mắt.

Kết luận

Quy trình xử lý mẫu và định lượng natri diclofenac trong nước mắt thỏ đã được thẩm định theo hướng dẫn của US-FDA và ICH. Phương pháp có độ chính xác cao, độ lặp lại tốt và được ứng dụng để định lượng nồng độ DF trong mắt thỏ 06 phút sau khi nhỏ sản phẩm thương mại Dilorop. Phương pháp này có thể sử dụng như một công cụ để đánh giá, so sánh thời gian lưu thuốc trên mắt giữa các công thức bào chế cũng như hiệu quả của các giải pháp kỹ thuật trong việc tăng thời gian lưu của thuốc trên mắt.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lê Văn Tú và cộng sự (2021), "Phát triển phương pháp định lượng brinzolamid trong nước mắt thỏ định hướng ứng dụng nghiên cứu hòa tan in vivo của thuốc nhỏ mắt", *Tạp chí Nghiên cứu Dược và thông tin thuốc,* 12(6), 145-50.
2. Samuel AZ, Mukojima R, Horii S, Ando M, Egashira S, Nakashima T, et al. (2021), "On Selecting a Suitable Spectral Matching Method for Automated Analytical Applications of Raman Spectroscopy", *ACS Omega,* 6(3), 2060-5.
3. Food, Drug Administration USA (2018), "Bioanalytical method validation guidance for industry", *US Department of Health and Human Services,* 1-41.
4. Guideline, ICH Harmonised Monographs, Nicotine Polacrilex Gum (2019), "Bioanalytical method validation M10".
5. Li X, Zhang Z, Chen H (2013), "Development and evaluation of fast forming nano-composite hydrogel for ocular delivery of diclofenac", *International Journal of Pharmaceutics,* 448(1), 96-100.

6. Monographs NPG (2018), "United States Pharmacopeia and Nafional Formulary USP 41–NF 36", 1, 1254-5.
7. Morgan SR, Pilia N, Hewitt M, Moses RL, Moseley R, Lewis PN, et al. (2020), "Controlled in vitro delivery of voriconazole and diclofenac to the cornea using contact lenses for the treatment of Acanthamoeba keratitis", *International Journal of Pharmaceutics,* 579, 119102.
8. Rohde F, Walther M, Wächter J, Knetzger N, Lotz C, Windbergs M (2022), "In-situ tear fluid dissolving nanofibers enable prolonged viscosity-enhanced dual drug delivery to the eye", *International Journal of Pharmaceutics*, 616, 121513.
9. Sebbag L, Showman L, McDowell EM, Perera A, Mochel JP (2018), "Impact of Flow Rate, Collection Devices, and Extraction Methods on Tear Concentrations Following Oral Administration of Doxycycline in Dogs and Cats", *J Ocul Pharmacol Ther,* 34(6), 452-9.
10. Seyda D, Filiz S, E BN, Sedef K, Hülya K (2005), "Determination of Diclofenac in Subretinal and Aqueous Humor Fluids by HPLC with Electrochemical Detector", *FABAD J Pharm Sci*,, 30, 33-9.
11. Small D, Hevy J, Tang-Liu D (2000), "Comparison of tear sampling techniques for pharmacokinetics analysis: ofloxacin concentrations in rabbit tears after sampling with schirmer tear strips, capillary tubes, or surgical sponges", *J Ocul Pharmacol Ther,* 16(5), 439-46.

Nghiên cứu bào chế

(Tiếp theo trang 7)

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Đỗ Thị Kim Oanh, Nguyễn Thanh Hà, Vũ Ngọc Mai, Vũ Thị Thu Giang (2014), "Nghiên cứu bào chế dung dịch natri diclofenac in situ gel nhỏ mắt", *Tạp chí Dược học,* 54(462), tr. 12-17.
2. Chakrabarty Sanheeta, Nath Bipul (2018), "Oral *in-situ* gel for Periodontitis: A review", World *Journal of Pharmaceutical Research,* 7(11), pp. 262-275.
3. Dumortier G., Grossiord J. L., et al. (2006), "A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics", *Pharm Res,* 23(12), pp. 2709-28.
4. Flemmig T. F., Petersilka G., et al. (2011), "Efficacy and safety of adjunctive local moxifloxacin delivery in the treatment of periodontitis", *J Periodontol,* 82(1), pp. 96-105.
5. Jones D. S., Bruschi M. L., et al. (2009), "Rheological, mechanical and mucoadhesive properties of thermoresponsive, bioadhesive binary mixtures composed of poloxamer 407 and carbopol 974P designed as platforms for implantable drug delivery systems for use in the oral cavity", *Int J Pharm,* 372(1-2), pp. 49-58.
6. Phạm Quốc Đạt, Nojd S., Edman M., et al. (2021), "Mucoadhesion: mucin-polymer molecular interactions", *International Journal of Pharmaceutics,* 610. pp.1-9.
7. Sheshala R., Quah S. Y., et al. (2019), "Investigation on solution-to-gel characteristic of thermosensitive and mucoadhesive biopolymers for the development of moxifloxacin-loaded sustained release periodontal in situ gels", *Drug Deliv Transl Res*, 9(2), pp. 434-443.
8. Yadav Ravishankar, Kanwar Indu Lata, et al. (2020), "*In situ* gel drug delivery system for periodontitis: an insight review", *Future Journal of Pharmaceutical Sciences,* 6(1), p. 33.