

Thẩm định quy trình xác định đồng thời Zidovudin và Lamivudin trên hệ chất mang nano dendrimer G3.0-F127@AZT/3TC bằng phương pháp HPLC-PDA

Nguyễn Thị Thịnh^{1,2*}, Nguyễn Cửu Khoa²

¹Viện Kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh

²Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng

Ngày nhận bài 22/3/2021; ngày chuyển phân biện 25/3/2021; ngày nhận phân biện 24/4/2021; ngày chấp nhận đăng 28/4/2021

Tóm tắt:

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định đồng thời Zidovudin (AZT) và Lamivudin (3TC) trên nền dendrimer PAMAM biến tính với pluronic F127, ứng dụng làm thuốc chống HIV có kiểm soát. Một phương pháp xác định AZT và 3TC bằng kỹ thuật HPLC-PDA nhanh, chính xác với độ tin cậy và độ chọn lọc cao đã được xây dựng và thẩm định theo hướng dẫn của ICH (Hội nghị quốc tế về hài hòa các thủ tục đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người). Quá trình sắc ký được thực hiện trên cột pha đảo C18 sử dụng pha động là dung dịch đệm phosphat pH 2,5 - methanol (65:35), tốc độ dòng 1,0 ml/phút. Bước sóng phát hiện 266 nm. Thời gian lưu của AZT và 3TC lần lượt là 3,5 và 4,3 phút với độ phân giải 3,15. Đường tuyến tính từ 2,16 đến 324,53 µg/ml đối với AZT, và 2,54 đến 152,10 µg/ml đối với 3TC ($r=1,000$); tỷ lệ phục hồi trung bình là 100,30% (RSD=0,36%) đối với AZT và 3TC là 99,73% (RSD=0,50%). Kết quả thẩm định cho thấy đạt độ đúng, chính xác và tính phù hợp của phương pháp trong phân tích hoạt chất AZT và 3TC trên hệ chất mang nano dendrimer PAMAM G3.0-F127@AZT/3TC là đạt yêu cầu.

Từ khóa: dendrimer PAMAM, HIV, HPLC, Lamivudin, Zidovudin.

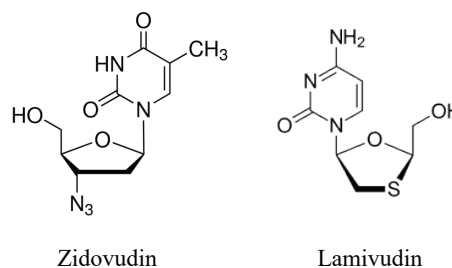
Chỉ số phân loại: 3.4

Mở đầu

HIV (Human Immunodeficiency Virus) là một loại virus gây suy giảm miễn dịch, làm cho cơ thể người mất dần sức đề kháng với các vi sinh vật gây bệnh, tạo ra các nhiễm trùng cơ hội... [1]. Năm 2019, ước tính có 38 triệu người nhiễm HIV-1 trên toàn thế giới [2]. Liệu pháp điều trị sử dụng thuốc kháng retrovirus ARV đã cải thiện đáng kể chất lượng sống của người nhiễm HIV. Tuy nhiên, phác đồ điều trị của phương pháp ARV rất phức tạp và đòi hỏi sự tuân thủ nghiêm ngặt... [3]. Bên cạnh đó, khi xuất hiện đột biến ở gen mã hóa enzyme tích hợp sẽ xuất hiện sự kháng thuốc. Kết quả, có sự kháng thuốc trong phác đồ điều trị và dẫn đến thất bại trong trị liệu. Nhằm cải thiện khả năng điều trị, giảm tác dụng phụ và đơn giản hóa quá trình trị liệu, điều trị kết hợp các thuốc kháng retrovirus có hoạt tính cao với hệ nano mang thuốc phóng thích kéo dài đã được nghiên cứu.

AZT và 3TC là hai loại thuốc đầu tay thuộc nhóm ức chế enzym sao chép ngược tương tự nucleosid và nucleotid (NRTI) nằm trong phác đồ điều trị HIV/AIDS của Bộ Y tế [4] (hình 1). 3TC có thể ức chế cả hai loại (1 và 2) men sao chép ngược trên HIV và trên bệnh viêm gan B [5]. Trong khi đó, AZT làm chậm sự phát triển bệnh và sự nhân lên của virus. 3TC kết hợp với AZT thể hiện tác dụng hiệp đồng chống HIV đối với các chủng

đề kháng với 3TC, bao gồm xuất hiện sự thay đổi acid amin M184V gần vị trí hoạt động của chuỗi sao chép ngược (RT). Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, các chủng virus kháng AZT có thể trở nên nhạy với AZT hơn khi chúng đồng thời đề kháng với 3TC [6, 7]. Đi đôi với hiệu quả điều trị, kết hợp thuốc gây ra nhiều tác dụng phụ thường gặp như nhức đầu, mệt mỏi, buồn nôn, tiêu chảy và sốt. Tác dụng phụ nghiêm trọng có thể gặp là ức chế tủy xương, tổn thương cơ, làm trầm trọng thêm bệnh viêm gan B, tăng lactat trong máu và phình gan [8].



Hình 1. Cấu trúc của AZT và 3TC [9].

Dendrimer PAMAM là một loại vật liệu polyme nano mới lần đầu được phát hiện và tổng hợp trong giai đoạn từ 1970-1990. Trái ngược với các polyme tuyến tính, dendrimer

*Tác giả liên hệ: Email: nguyenthithinh73@gmail.com

Process evaluation for simultaneous determination of Zidovudine and Lamivudine on the nanocarrier dendrimer by HPLC-PDA method

Thi Thinh Nguyen^{1,2*}, Cuu Khoa Nguyen²

¹Institute of Drug Quality Control - Ho Chi Minh City (IDQC-HCMC)

²Institute of Applied Materials Science

Received 22 March 2021; accepted 28 April 2021

Abstract:

To determine Zidovudine (AZT) and Lamivudine (3TC) at the same time based on PAMAM dendrimer modified with Pluronic F127, application as anti-HIV drug control. A fast, accurate HPLC-PDA determination of AZT and 3TC with high reliability and selectivity has been developed and validated according to ICH (International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) guidelines. The chromatography was carried out by C18 inversion column using the mobile phase of phosphate buffer solution of pH 2.5 - methanol (65:35), flow rate 1.0 ml/min, and detective wavelength 266 nm. The retention times of AZT and 3TC are 3.5 and 4.3 minutes, respectively with 3.15 resolution. Linearity ranges from 2.16 to 324.53 µg/ml for AZT, and from 2.54 to 152.10 µg/ml for 3TC ($r=1.000$); mean recovery 100.3% (RSD=0.36%) for AZT and 99.73% (RSD=0.50%) for 3TC. The evaluation results showed that the accuracy and suitability of the method in the analysis of active ingredients AZT and 3TC on the PAMAM G3.0-F127@AZT/3TC dendrimer nano carrier system are adequate.

Keywords: HIV, HPLC, Lamivudine, PAMAM dendrimer, Zidovudine.

Classification number: 3.4

PAMAM có các nhóm chức được kiểm soát chính xác và tinh chỉnh được [10]. Sau khi biến tính với các polyme ưa nước có tính tương thích sinh học cao, dendrimer PAMAM có khả năng tránh được sự loại bỏ khỏi hệ tuần hoàn bởi lưới nội chất, đồng thời tăng lượng thuốc mang thông qua cơ chế hấp phụ trên bề mặt hạt, cuốn vào và liên kết với các nhóm chức bên trong hạt [11-13]. Điều này không chỉ giúp vận chuyển thuốc đến đúng mục tiêu, mà còn giảm lượng thuốc sử dụng, giảm độc tính và các tác dụng phụ. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh rằng ARV có thể được mang bên trong các dendrimer PAMAM biến tính như một hệ thống phân phối thuốc [14, 15].

Thuốc được sử dụng trong điều trị HIV trên người nên việc đánh giá chất lượng thuốc cũng không kém phần quan trọng. Kỹ thuật HPLC là một lựa chọn tốt để định lượng đồng thời AZT và 3TC cho độ chính xác cao và có tính chọn lọc. Đã có nhiều chuyên luận trong Dược điển Hoa Kỳ (USP) về xác định AZT hoặc 3TC ở các dạng khác nhau như nguyên liệu, viên nén, viên nang, dung dịch uống, thuốc tiêm [16]. Tuy nhiên, không có phương pháp nào trong số này phân tích đồng thời AZT và 3TC mang trong hạt nano đơn giản và nhanh chóng. Do vậy, nhóm nghiên cứu đã dựa theo chuyên luận của AZT và chuyên luận 3TC [16] trong USP có thay đổi để phù hợp với đối tượng là chất mang nano dendrimer PAMAM G3.0-F127 được mang đồng thời hai thuốc AZT và 3TC, phương pháp đề nghị được thẩm duyệt theo hướng dẫn của ICH và Cục Quản lý dược do có sự thay đổi so với chuyên luận USP.

Phương pháp nghiên cứu

Vật liệu và thiết bị

Hóa chất: chuẩn AZT và 3TC được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh. Các hóa chất khác gồm: kali dihydrophosphat, acid phosphoric, triethylamin (Merk, Đức), methanol (J.T. Baker, Mỹ) đều đạt tinh khiết phân tích hoặc HPLC.

Chế phẩm: dendrimer PAMAM G3.0-F127 được Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam cung cấp theo kết quả từ các nghiên cứu trước đây [17, 18].

Thiết bị: hệ thống sắc ký lỏng cao áp (HPLC Shimadzu UFLC 20A, đầu dò PDA SPD-M20A, Nhật); cột sắc ký C18 150 x 4,6 mm, 5 µm (Phenomenex, Mỹ); cân phân tích 5 số lẻ MS 105 (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); máy đo pH S220-K (Mettler Toledo, Thụy Sĩ); một số thiết bị nghiên cứu khác.

Điều kiện sắc ký:

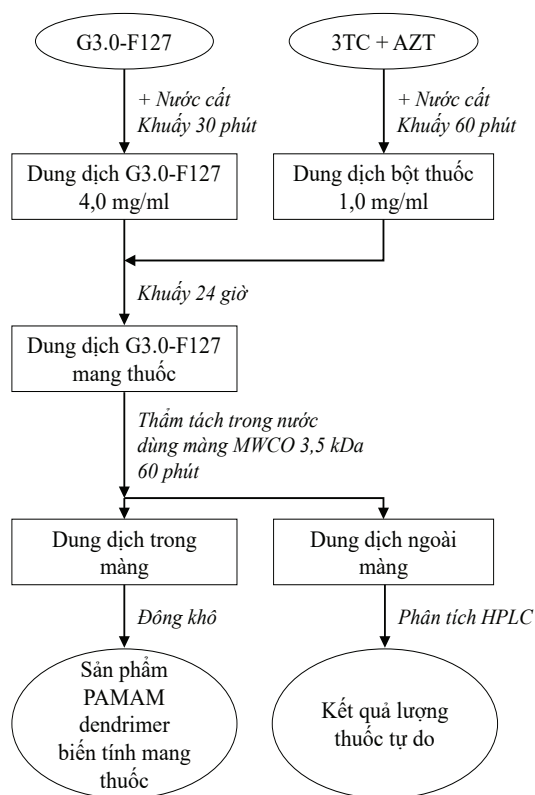
- Pha động: dung dịch đệm phosphat pH 2,5 - methanol (65:35).
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
- Bước sóng phát hiện: 266 nm.
- Thể tích tiêm: 10 µl.

Dung dịch đệm phosphat pH 2,5: cân 0,68 g kali dihydrophosphat hòa tan trong nước vừa đủ 1000 ml, thêm 1

ml triethylamin khuấy đều, điều chỉnh pH $2,5 \pm 0,05$ bằng acid phosphoric. Lọc qua màng lọc $0,45 \mu\text{m}$.

Chuẩn bị dendrimer PAMAM biến tính mang thuốc AZT và 3TC (G3.0-F127@AZT/3TC)

Chất mang và thuốc AZT và 3TC được hòa tan trong nước để thu được dung dịch có nồng độ lần lượt là 4,0, 1,0 và 0,5 mg/ml. Nhỏ từ từ dung dịch chứa thuốc vào dung dịch chứa chất mang, khuấy đều trong 24h ở nhiệt độ phòng. Tiến hành thẩm tách 30 phút trong nước sử dụng màng bán thấm MWCO 3,5 kDa, thực hiện lặp lại 2 lần. Lấy phần dung dịch bên trong màng đông khô để thu dendrimer PAMAM biến tính đã mang thuốc. Phần dung dịch bên ngoài màng cũng được thu lại để xác định lượng thuốc tự do. Quy trình mang thuốc được thể hiện ở hình 2 và sản phẩm dendrimer PAMAM biến tính mang thuốc được thể hiện ở hình 3.



Hình 2. Quy trình mang thuốc.



Hình 3. Sản phẩm dendrimer PAMAM biến tính mang thuốc.

Dung dịch AZT chuẩn: cân chính xác 20,0 mg chuẩn AZT cho vào bình định mức 20 ml, thêm khoảng 14 ml nước tinh khiết, lắc đều cho tan hoàn toàn, thêm nước đến vạch. Lắc đều, lọc qua màng lọc $0,45 \mu\text{m}$.

Dung dịch 3TC chuẩn: cân chính xác 10,0 mg chuẩn 3TC cho vào bình định mức 20 ml, thêm khoảng 14 ml nước tinh khiết, lắc đều cho tan hoàn toàn, thêm nước đến vạch. Lắc đều, lọc qua màng lọc $0,45 \mu\text{m}$.

Dung dịch placebo: dung dịch dendrimer PAMAM biến tính (G3.0-F127) không mang thuốc nồng độ 4,0 mg/ml.

Dung dịch placebo bổ sung chuẩn AZT và 3TC: dung dịch placebo bổ sung đồng thời chuẩn AZT và 3TC với nồng độ lần lượt 100 và 50 $\mu\text{g/ml}$.

Dung dịch mẫu thử: pha dung dịch mẫu thử từ hệ mang thuốc G3.0-F127@AZT/3TC trong nước để có nồng độ AZT khoảng 100 $\mu\text{g/ml}$.

Tiến hành thẩm định

Thẩm định phương pháp phân tích với các chỉ tiêu: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ chính xác và độ đúng.

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống sắc ký: tiêm dung dịch chuẩn hỗn hợp vào hệ thống sắc ký. Hệ số đối xứng của AZT và 3TC trong khoảng 0,8-2,0, độ lệch chuẩn tương đối về diện tích pic AZT và 3TC của 6 lần tiêm không quá 2,0%. Độ phân giải giữa AZT và 3TC không nhỏ hơn 2,0. Số đĩa lý thuyết của AZT và 3TC không ít hơn 2000.

Tính đặc hiệu: tính đặc hiệu được đánh giá bằng cách so sánh các pic sắc ký sau: dung dịch AZT chuẩn nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$, dung dịch 3TC chuẩn nồng độ 50 $\mu\text{g/ml}$, dung dịch placebo và dung dịch mẫu trắng bổ sung AZT (100 $\mu\text{g/ml}$) và 3TC (50 $\mu\text{g/ml}$).

Để đạt được tính đặc hiệu, trên sắc ký đồ của mẫu trắng và placebo không được có pic trùng với pic của AZT và 3TC. Các pic trên sắc ký đồ của placebo bổ sung AZT và 3TC tương ứng với pic của AZT và 3TC. Ngoài ra, độ tinh khiết của pic sắc ký trong dung dịch AZT chuẩn và dung dịch 3TC chuẩn phải được đánh giá thông qua phổ UV ghi nhận bằng đầu dò PDA.

Tính tuyến tính: xây dựng đường chuẩn từ dãy chuẩn gồm năm điểm nồng độ. Mỗi dung dịch được đo ba lần độc lập. Hệ số tương quan tuyến tính (R^2) của đường chuẩn không nhỏ hơn 0,998.

LOD và LOQ: là hai thông số quan trọng nhằm đánh giá độ nhạy của phương pháp. Giá trị LOD và LOQ được xác định thông qua đường chuẩn.

LOD và LOQ được tính bằng phương trình hồi quy theo công thức sau:

$$LOD = 3,3 * SD/a$$

$$LOQ = 10 \cdot SD/a$$

Trong đó: a là độ dốc của đường chuẩn tuyến tính; SD là độ lệch chuẩn của tín hiệu.

Độ chính xác: độ lặp lại được đánh giá thông qua phân tích mẫu thử 6 lần độc lập trong cùng một ngày. Trong khi đó, độ chính xác trung gian được đánh giá thông qua việc chuẩn bị mẫu thử theo quy trình giống nhau, nhưng tiến hành phân tích khác thời điểm, khác thiết bị và điều kiện môi trường. Độ chính xác được biểu thị thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD).

Độ đúng: các dung dịch placebo bổ sung chuẩn AZT và 3TC ở các nồng độ 80, 100 và 120% so với nồng độ định lượng được chuẩn bị và phân tích. Mỗi nồng độ thực hiện 3 mẫu độc lập. Tỷ lệ phục hồi cho phép từ 98 đến 102%.

Xử lý kết quả: sử dụng Microsoft Excel 2019 để xử lý số liệu thực nghiệm. Sự tương quan giữa các dữ liệu được kiểm định thông qua hồi quy tương quan với khoảng tin cậy 95%.

Kết quả và thảo luận

Thẩm định phương pháp

Tính tương thích hệ thống: kết quả bảng 1 và 2 cho thấy các thông số ghi nhận đều đạt yêu cầu. Do đó, phương pháp đạt tương thích hệ thống phân tích AZT và 3TC.

Bảng 1. Tính tương thích hệ thống AZT.

TT	(1)	(2)	(3)	(4)
1	3,523	2579177	2689	1,30
2	3,528	2580087	2708	1,30
3	3,520	2581305	2711	1,30
4	3,516	2580284	2708	1,30
5	3,526	2579433	2713	1,30
6	3,525	2580606	2705	1,30
Trung bình	3,523	2580149	2706	1,18
RSD (%)	0,12	0,03		

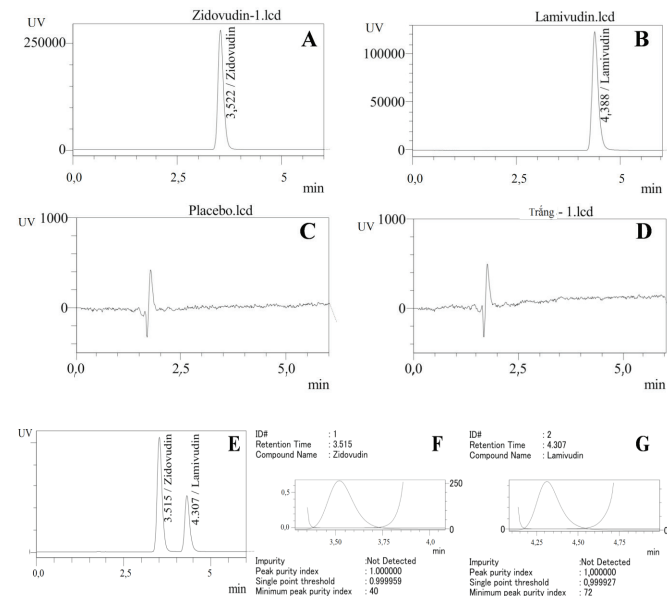
Yêu cầu: (1) Thời gian lưu (phút): %RSD≤2,0%; (2) Diện tích pic: %RSD≤2,0%; (3) Số đĩa lý thuyết: ≥2000; (4) Hệ số đối xứng: ≤2,0.

Bảng 2. Tính tương thích hệ thống 3TC.

TT	(1)	(2)	(3)	(4)
1	4,388	1290596	4007	1,38
2	4,394	1293165	4036	1,38
3	4,385	1293468	4041	1,38
4	4,379	1294678	4027	1,38
5	4,388	1291936	4056	1,38
6	4,385	1294378	4054	1,39
Trung bình	4,387	1293037	4037	1,18
RSD (%)	0,11	0,12		

Yêu cầu: (1) Thời gian lưu (phút): %RSD≤2,0%; (2) Diện tích pic: %RSD≤2,0%; (3) Số đĩa lý thuyết: ≥2000; (4) Hệ số đối xứng: ≤2,0.

Tính đặc hiệu: thời gian lưu của AZT và 3TC lần lượt là 3,5 và 4,3 phút (hình 4A và 4B). Không xuất hiện pic có cùng thời gian lưu với AZT và 3TC khi phân tích mẫu placebo và mẫu trắng (hình 4C và 4D). Mẫu placebo bổ sung AZT và 3TC có các pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của AZT và 3TC trong mẫu chuẩn. Ngoài ra, độ tinh khiết pic thu được từ mẫu placebo bổ sung AZT và 3TC lớn hơn 99,0% cho thấy rằng các thành phần khác trong mẫu thử không rửa giải cùng lúc với AZT và 3TC (hình 4E, 4F và 4G). Từ kết quả thu được cho thấy, phương pháp đạt tính đặc hiệu đối với AZT và 3TC trên nền dendrimer PAMAM biến tính.

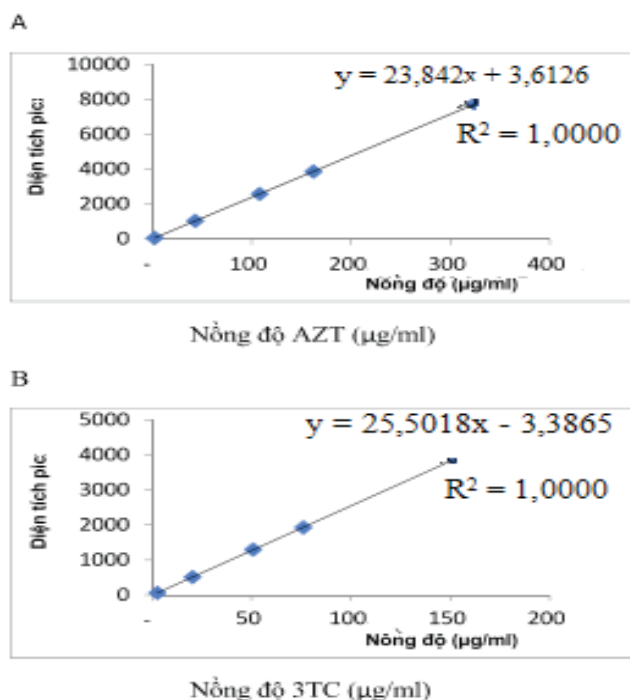


Hình 4. Sắc ký đồ của AZT nồng độ 100 µg/ml (A), 3TC nồng độ 50 µg/ml (B), mẫu placebo (C), mẫu trắng (D), sắc ký đồ và phổ UV từng thành phần của mẫu placebo bổ sung AZT 100 µg/ml và 3TC 50 µg/ml (E, F, G). min: phút; ID#: mã định danh; Retention Time: thời gian lưu; Compound Name: tên hoạt chất; Impurity: độ không tinh khiết; Not Detected: không phát hiện; Peak purity index: chỉ số độ tinh khiết pic; Single Point Threshold: ngưỡng điểm duy nhất; Minimum Peak Purity Index: chỉ số độ tinh khiết định tối thiểu.

Tính tuyến tính, LOD và LOQ: đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ thuốc và diện tích pic được xây dựng theo phương pháp hồi quy tuyến tính trên phần mềm Microsoft Excel 2019.

Đối với thuốc AZT, đồ thị là một đường thẳng đi từ 2,16 đến 324,53 µg/ml (hình 5A). Độ tuyến tính được xác định thông qua phương trình “y = 23,842x + 3,6126”, trong đó y và x lần lượt là diện tích pic và nồng độ AZT (µg/ml). Điểm chặn của đồ thị được kiểm tra (hồi quy tương quan, khoảng tin cậy 95%) và cho thông số không có ý nghĩa thống kê với p=0,29 (p>0,05). Do đó, có thể nhận định đồ thị đi qua gốc tọa độ [19, 20]. Hệ số tương quan tuyến tính (R²) bằng 1,0000 cho thấy mối tương quan có ý nghĩa giữa nồng độ và diện tích pic. LOD và LOQ có giá trị lần lượt là 0,58 và 1,76 µg/ml.

Tương tự, đồ thị của thuốc 3TC là một đường thẳng đi từ 2,54 đến 152,10 µg/ml (hình 5B). Độ tuyến tính được xác định thông qua phương trình “ $y = 25,5018x - 3,3865$ ”, trong đó y và x lần lượt là diện tích pic và nồng độ 3TC (µg/ml). Điểm chặn của đồ thị được kiểm tra (hồi quy tương quan, khoảng tin cậy 95%) và cho thông số không có ý nghĩa thống kê với $p=0,30$ ($p>0,05$). Hệ số tương quan tuyến tính (R^2) lớn hơn 0,998 cho thấy mối tương quan có ý nghĩa giữa nồng độ và diện tích pic. LOD và LOQ có giá trị lần lượt là 0,52 và 1,59 µg/ml.



Hình 5. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ AZT và diện tích pic (A); nồng độ 3TC và diện tích pic (B).

Độ chính xác: độ lặp lại và độ chính xác trung gian được thể hiện thông qua độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Dữ liệu độ chính xác được thể hiện trong bảng 3. Giá trị RSD ở tất cả các thời điểm của AZT và 3TC đều nhỏ hơn 2,0%, do đó phương pháp đạt độ chính xác.

Bảng 3. Độ chính xác của AZT và 3TC.

Độ chính xác	(1)	(2)	(3)	(4)
Hàm lượng (%)	10,81	10,60	4,90	4,95
	10,93	10,53	4,95	4,93
	10,90	10,61	4,93	4,95
	10,85	10,64	4,92	4,97
	10,89	10,59	4,93	4,95
	10,84	10,57	4,91	4,94
RSD ⁽¹⁾ (%)	0,41	0,35	0,36	0,26
x_b (%)	10,73		4,94	
RSD ⁽²⁾ (%)	1,41		0,40	

Ghi chú: (1): AZT (ngày 1); (2): AZT (ngày 2); (3): 3TC (ngày 1); (4): 3TC (ngày 2); RSD⁽¹⁾ (%): n=6; RSD⁽²⁾ (%): n=12.

Độ đúng và khoảng xác định: độ đúng của phương pháp sắc ký cao áp được thể hiện thông qua tỷ lệ phục hồi của AZT hoặc 3TC được thêm vào mẫu placebo. Tỷ lệ phục hồi nằm trong khoảng 98,98 đến 100,97% như mô tả ở bảng 4 và 5. Tất cả các giá trị này đều nằm trong khoảng 98-102% so với nồng độ lý thuyết.

Bảng 4. Kết quả khảo sát độ đúng AZT.

Độ đúng (%)	(1)	(2)	(3)	RSD
80	87,56	87,69	100,14	0,21
	87,76	87,69	99,93	
	88,06	87,82	99,73	
100	109,45	109,74	100,26	0,12
	109,65	109,87	100,20	
	109,25	109,73	100,44	
120	131,14	131,84	100,53	0,27
	131,34	131,96	100,47	
	130,84	132,11	100,97	
Tỷ lệ phục hồi trung bình			100,30	

Ghi chú: (1): nồng độ chuẩn AZT thêm vào (µg/ml); (2): nồng độ chuẩn AZT tìm lại (µg/ml); (3): tỷ lệ phục hồi (%).

Bảng 5. Kết quả khảo sát độ đúng 3TC.

Độ đúng (%)	(1)	(2)	(3)	RSD
80	40,20	39,91	99,28	0,52
	40,00	39,99	99,98	
	40,50	40,09	98,98	
100	50,00	50,06	100,12	0,51
	50,30	50,17	99,74	
	50,50	50,05	99,11	
120	60,20	60,25	100,09	0,28
	60,40	60,32	99,86	
	60,10	60,35	100,41	
Tỷ lệ phục hồi trung bình			99,73	

Ghi chú: (1): nồng độ chuẩn 3TC thêm vào (µg/ml); (2): nồng độ chuẩn 3TC tìm lại (µg/ml); (3): tỷ lệ phục hồi (%).

Áp dụng phương pháp đã thẩm định xác định AZT và 3TC được mang trên dendrimer PAMAM biến tính

Dung dịch chuẩn AZT, 3TC được chuẩn bị như trong quy trình, mẫu dendrimer PAMAM biến tính mang thuốc đơn và mang thuốc kết hợp được chuẩn bị như sau: cân chính xác một lượng chế phẩm cho vào bình định mức thích hợp, thêm nước, siêu âm và lắc trong 30 phút, để nguội về nhiệt độ phòng rồi thêm nước đến vạch để có nồng độ AZT khoảng 0,1 mg/ml, lọc qua màng lọc 0,45 µm, tiêm vào hệ thống sắc ký. Nồng độ thuốc tự do, tổng lượng thuốc mang trong hệ dendrimer PAMAM và các thông số mang thuốc được xác định (bảng 6).

Bảng 6. Kết quả mang thuốc.

Kết quả mang thuốc đơn					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
AZT	200,2	50,02	26,10	24,96	5,87
3TC	200,1	25,05	13,12	24,90	3,02
Kết quả mang thuốc phối hợp					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
AZT	200,0	50,20	35,04	29,92	5,54
3TC	200,0	25,04	17,14	31,44	2,94

Ghi chú: (1): khối lượng G3.0-F127 (mg); (2): khối lượng thuốc đầu vào (mg); (3): khối lượng thuốc tự do (mg); (4): hiệu quả mang thuốc (DLE %); (5): khả năng mang thuốc (DLC %).

Kết quả phân tích cho thấy, không có sự khác biệt đáng kể về hiệu quả mang thuốc (DLE), khả năng mang thuốc (DLC) khi tiến hành mang thuốc đơn và mang thuốc kết hợp.

Năm 2013, P. Dinesh Kumar và cs đã tổng hợp được dendrimer thế hệ G4.0 và G5.0, biến tính bề mặt với PEG và mang thuốc 3TC, xác định lượng thuốc được mang bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến ở bước sóng 272 nm [21]. Bên cạnh đó, đã có nhiều nghiên cứu mang thuốc kháng virus trên chất mang dendrimer, tuy nhiên chỉ mang một thuốc và xác định bằng phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến. Do vậy, với phương pháp đã nghiên cứu xây dựng cho phép xác định đồng thời hai thuốc AZT và 3TC bằng HPLC-PDA, mở ra hướng mới trong việc tạo ra hệ mang thuốc đôi hoặc ba trên nền chất mang nano dendrimer biến tính mà với phương pháp quang phổ tử ngoại khả kiến không thể xác định được.

Kết luận

Phương pháp sắc ký lỏng cao áp HPLC-PDA đã được xây dựng nhằm xác định đồng thời hai thuốc kháng virus AZT và 3TC được mang trên nền chất mang nano dendrimer PAMAM biến tính với pluronic F127 sử dụng cột pha đảo C18 được thẩm định theo hướng dẫn của ICH cho kết quả nhanh, chính xác, có độ chọn lọc cao. Kết quả nghiên cứu có thể ứng dụng và định hướng trong nghiên cứu xác định các hoạt chất khi mang cùng lúc 2 hay 3 hoạt chất trên cùng một chất mang nano sinh học là xu hướng mới hiện nay của ngành dược không những trong nước mà cả trên thế giới nhằm mục đích cải thiện hiệu quả điều trị, nâng cao chất lượng của sản phẩm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Marta K. Powell, et al. (2016), “Opportunistic infections in HIV-infected patients differ strongly in frequencies and spectra between patients with low CD4+ cell counts examined postmortem and compensated patients examined Antemortem irrespective of the HAART era”, *PLOS ONE*, **11(9)**, DOI: 10.1371/journal.pone.0162704.

[2] Joris Hemelaar, et al. (2020), “Global and regional epidemiology of HIV-1 recombinants in 1990-2015: a systematic review and global survey”, *The Lancet HIV*, **7(11)**, DOI: 10.1016/S2352-3018(20)30252-6.

[3] World Health Organization and Initiative Stop Tb (2010), *Treatment of tuberculosis: guidelines*, World Health Organization.

[4] World Health Organization (2002), *WHO model list of essential medicines*.

[5] Zoe Fox, et al. (2006), “A randomized trial to evaluate continuation versus discontinuation of lamivudine in individuals failing a lamivudine-containing regimen: the COLATE trial”, *Antiviral Therapy*, **11**, pp.761-770.

[6] Hiroaki Mitsuya, et al. (1990), “Molecular targets for AIDS therapy”, *Science*, **249**, pp.1533-1544.

[7] Marcus Vinícius Nora De Souza (2005), “Fármacos inibidores de fusão: uma nova estratégia no combate à replicação do vírus VIH”, *Acta Farmacéutica Bonaerense*, **24(2)**, pp.291-299.

[8] M.D. Faaem, et al. (2017), *Tarascon pocket pharmacopoeia 2017 deluxe lab-coat edition*, Publisher Jones & Bartlett Learning.

[9] Prashant M. Bhatt, et al. (2009), “Co-crystals of the anti-HIV drugs lamivudine and zidovudine”, *Crystal. Growth and Design*, **9(2)**, pp.951-957.

[10] Prashant Kesharwani, et al. (2014), “Dendrimer as nanocarrier for drug delivery”, *Progress in Polymer Science*, **39**, pp.268-307.

[11] Tong Nhat Anh, et al. (2015), “Preparation of the cationic dendrimer-based hydrogels for controlled heparin release”, *Journal of Macromolecular Science, Part A*, **52(10)**, pp.830-837.

[12] Thanh Luan Nguyen, et al. (2017), “Redox and pH responsive poly (amidoamine) dendrimer-heparin conjugates via disulfide linkages for letrozole delivery”, *BioMed Research International*, **2017**, DOI: 10.1155/2017/8589212.

[13] Ning Li, et al. (2017), “Enzyme-sensitive and amphiphilic PEGylated dendrimer-paclitaxel prodrug-based nanoparticles for enhanced stability and anticancer efficacy”, *ACS Applied Materials & Interfaces*, **9(8)**, pp.6865-6877.

[14] Sushama Telwate, et al. (2011), “Virucidal activity of the dendrimer microbicide SPL7013 against HIV-1”, *Antiviral Research*, **90**, pp.195-199.

[15] Tathagata Dutta, K. Jain Narendra (2007), “Targeting potential and anti-HIV activity of lamivudine loaded mannosylated poly (propyleneimine) dendrimer”, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **1770**, pp.681-686.

[16] United States Pharmacopeial Convention (2018), *U.S. Pharmacopeia National Formulary 2019: UPS42-NF37*.

[17] Vu Minh Thanh, et al. (2018), “Low systemic toxicity nanocarriers fabricated from heparin-mPEG and PAMAM dendrimers for controlled drug release”, *Mater. Sci. Eng. C*, **82**, pp.291-298.

[18] Nguyễn Cửu Khoa và cs (2018), *Báo cáo kết quả đề tài “Nghiên cứu tổng hợp phức chất carboplatin/PAMAM và oxaliplatin/PAMAM định hướng làm thuốc chống ung thư”*, Viện Khoa học Vật liệu ứng dụng.

[19] Joses Ho, et al. (2019), “Moving beyond P values: data analysis with estimation graphics”, *Nature Methods*, **16(7)**, pp.565-566.

[20] Milena Cristina Ribeiro Souza Magalhães, et al. (2017), “Development and validation of a high performance liquid chromatographic method determination of Zidovudine encapsulated in PCL nanoparticles”, *Drug. Analytical Research*, **1(2)**, pp.1-8.

[21] P. Dinesh Kumar, et al. (2013), “Prolonged drug delivery system of PEGylated PAMAM dendrimers with a anti-HIV drug”, *Research in Pharmacy*, **3(2)**, pp.8-17.