

NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ VI NHỮ TƯƠNG CHỨA 2% DICLOFENAC

Huỳnh Trúc Thanh Ngọc*, Trương Đình Quỳnh Ngân, Bùi Nguyễn Huyền Linh

Trường Đại học Y Dược TP.HCM

*Email: huynhtngoc@ump.edu.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Tình trạng đau xương khớp ngày càng tăng cao ở các độ tuổi dẫn đến nhu cầu lớn hơn các thuốc giảm đau chứa hoạt chất NSAIDs dùng ngoài, trong đó diclofenac được sử dụng phổ biến. Vi nhũ tương (VNT) cho thấy nhiều ưu điểm trên cải thiện độ tan của các NSAIDs, tăng thời gian lưu trữ và tính thấm qua da. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng và đánh giá công thức VNT chứa 2 % diclofenac. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Sàng lọc các tá dược pha dầu, điện hoạt, đồng điện hoạt dựa trên khả năng hòa tan diclofenac diethylamin (DDEA) và khả năng nhũ hóa. Xây dựng 10 giản đồ pha và điều chế VNT, đánh giá các chỉ tiêu lý hóa, kích thước giọt, độ dẫn điện, pH, định lượng và tính thấm DDEA qua thử nghiệm tế bào Franz. **Kết quả:** Công thức VNT chứa 2 % diclofenac được hoàn thiện với pha dầu là Capryol 90, chất điện hoạt là Tween 20, đồng dung môi là PEG 400 với tỉ lệ tương ứng là (2:1). VNT nghiên cứu chứa 2 % diclofenac có kích thước giọt trung bình $216,80 \pm 0,28$ nm, pH 7,26, độ thấm qua màng (thử nghiệm tế bào Franz) là $41,72$ mg/cm² sau 180 phút thử nghiệm. **Kết luận:** Đề tài đã điều chế thành công công thức VNT 2 % diclofenac.

Từ khóa: Vi nhũ tương, diclofenac, diclofenac diethylamin.

ABSTRACT

FORMULATION OF THE MICROEMULSION SYSTEM CONTAINING 2% DICLOFENAC

Huynh Truc Thanh Ngoc, Truong Dinh Quynh Ngan, Bui Nguyen Huyen Linh

University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

Background: Arthritis becoming a common disease in society which affects negatively the patients. Therefore, there is an increase in the NSAIDs usage as pain reliever. Among NSAIDs, diclofenac is widely used for treatment of arthritis. Microemulsion has some advantages such as improvement of NSAIDs solubility; increase of retention time and drug permeability. **Objectives:** Develop and evaluate microemulsion containing 2 % diclofenac. **Materials and methods:** The oil phase, surfactant and co-surfactant or co-solvent was chosen based on diclofenac diethylamine (DDEA) solubility and capacity of emulsification. Then 10 phase diagrams were constructed and microemulsion containing 2% diclofenac was prepared and evaluated for physico-chemical properties, droplet size, electrical conductivity, pH, dosage and permeability test via Franz cell. **Results:** The microemulsion containing 2 % diclofenac formulation was successfully developed containing Capryol as the oil phase, Tween 20 and PEG 400 as surfactant and co-solvent (2:1), respectively. The studied microemulsion had the particle size of $216,80 \pm 0,28$ nm, pH 7,26 and permeability through cellulose acetate membrane $41,72$ mg/cm² after 180 minutes. **Conclusion:** The study has completed the goal of the formulation of microemulsion containing 2 % diclofenac.

Keywords: Microemulsion, diclofenac, diclofenac diethylamine.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Diclofenac là thuốc kháng viêm không steroid, dẫn xuất từ acid phenylacetic, có tác dụng kháng viêm, giảm đau và giảm sốt nhanh nhờ ức chế chọn lọc COX-2 hơn COX-1. Diclofenac được sử dụng phổ biến điều trị các bệnh viêm khớp, đau xương khớp [1].

VNT là một hệ đẳng hướng chứa pha dầu, chất điện hoạt và đồng điện hoạt. Hoạt chất được phân bố trong những giọt dầu kích thước hàng nanomet, do đó cho khả năng tải được tỷ lệ lớn dược chất và giúp tăng tính thấm qua da [2]. Đã có các công bố về VNT chứa các NSAIDs như diclofenac [3], meloxicam [4], piroxicam [5], celecoxib [6]... với ưu điểm cải thiện độ tan của các NSAIDs, tăng tính thấm vào da, tăng thời gian lưu trữ trong da [7].

Trong nước chưa có các nghiên cứu công bố về VNT chứa 2% diclofenac, do đó đề tài “Nghiên cứu điều chế VNT chứa 2% diclofenac” được thực hiện nhằm khảo sát các tá dược để xây dựng công thức VNT chứa 2% diclofenac và đánh giá các chỉ tiêu lý-hóa và dược học.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

DDEA (Trung Quốc), diclofenac natri chuẩn (Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM), isopropyl myristat, dầu thầu dầu, dầu đậu nành, dầu oliu, PEG 400, propylen glycol, glycerol, Carbomer 940 (Trung Quốc), acid oleic, Capryol 90, Tween 20, Tween 80, Labrasol, Transcutol P, Plurol oleique CC 497, Lauroglycol 90, Labrafac PG, Labrafac lipophile 497 (Pháp), Kolliphor RH 40 (Đức), Hydroxy propyl methyl cellulose (HPMC) (Singapore), Hydroxy ethyl cellulose (HEC) (Mỹ). Các hoá chất khác đạt tiêu chuẩn Dược dụng hoặc phân tích.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Xác định độ tan của DDEA trong các tá dược

Độ tan của DDEA trong các tá dược (pha dầu, chất diện hoạt, đồng diện hoạt hoặc đồng hòa tan) được xác định bằng phương pháp quá bão hòa: cho một lượng dư DDEA vào các eppendorf có chứa sẵn 1 g tá dược. Vortex 15 phút, và cho vào bể lắc trong 72 giờ. Các mẫu thu được đem ly tâm (3000 vòng/phút, 15 phút), lọc qua màng lọc (cellulose acetat 0,45 μ m), sau đó được pha loãng trong methanol và đo nồng độ hoạt chất bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis đã được thẩm định ở bước sóng 282 nm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Lựa chọn các tá dược nhằm xây dựng hệ VNT chứa DDEA

Pha dầu được chọn dựa trên độ tan của DDEA. Chất diện hoạt và đồng diện hoạt/đồng dung môi được lựa chọn dựa trên khả năng hòa tan DDEA và khả năng nhũ hóa, được đánh giá bằng phương pháp đo độ truyền qua của hỗn hợp ở bước sóng 638 nm. Hỗn hợp có độ truyền qua T% càng lớn thì khả năng nhũ hóa càng cao.

Xây dựng giản đồ pha

Sử dụng các tá dược đã chọn để xây dựng giản đồ pha. Vùng VNT được xác định bằng phương pháp chuẩn độ với nước. Cụ thể, pha dầu và Smix (hỗn hợp chất diện hoạt và đồng diện hoạt/đồng dung môi) được phối hợp theo các tỷ lệ lần lượt là 1:9, 2:8,... 8:2, 9:1, ghi nhận lượng nước thêm vào làm hỗn hợp trở nên đục [8].

Xây dựng công thức VNT chứa 2% diclofenac

Dược điển Mỹ quy định tính toán hàm lượng theo diclofenac natri. Khi sử dụng nguyên liệu DDEA, tỷ lệ dùng trong công thức là 2,32% tương đương 2% diclofenac natri. Chọn ngẫu nhiên các điểm trong giản đồ pha nêu trên, có vùng tạo VNT lớn nhất, điều chế các công thức VNT nền và đánh giá khả năng tải 2,32% DDEA. Các công thức được xây dựng ứng với lượng nước từ 85-50% và được tiếp tục đánh giá với các chỉ tiêu lý hóa và dược học.

Đánh giá các chỉ tiêu lý-hóa VNT chứa 2% diclofenac

i. Cảm quan: Các công thức VNT chứa DDEA phải trong suốt, không màu hoặc vàng nhạt, đồng nhất.

ii. Đánh giá độ bền của các VNT tạo thành

o Ly tâm: Các công thức VNT chứa DDEA được ly tâm 4000 vòng/phút trong 30 phút [8].

o Chu kì nóng lạnh: Các công thức VNT chứa hoạt chất được trải qua 2 nhiệt độ 45°C và 5°C, ở mỗi nhiệt độ lưu trữ trong ít nhất 48 giờ [8].

o Chu kì đông – rã đông: Các công thức VNT chứa hoạt chất được trải qua 2 điều kiện nhiệt độ -4°C và nhiệt độ phòng, ở mỗi nhiệt độ lưu trữ trong ít nhất 48 giờ [8].

Đối với thử nghiệm độ bền, lựa chọn công thức nếu sau thử nghiệm không xảy ra hiện tượng tách lớp, kết bông hoặc kết tủa hoạt chất độ đồng nhất, không bị kết tủa hay tách pha.

iii. Đo kích thước giọt của VNT: Mẫu VNT được pha loãng 10 lần với nước cất, kích thước giọt được đo bằng máy đo kích thước giọt Zetasizer Nano ZS (Malvern, Anh Quốc).

iv. Độ dẫn điện: Mẫu VNT nền và VNT chứa 2 % diclofenac được đo độ dẫn điện sử dụng máy đo pH

v. Độ pH: Tiến hành đo pH của VNT placebo và VNT chứa 2 % diclofenac.

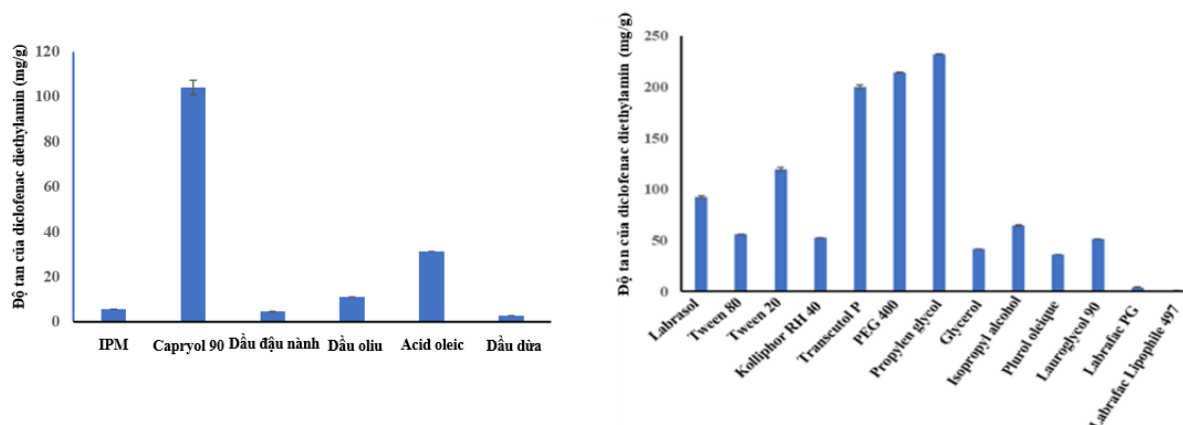
Định lượng: Cân chính xác khoảng 0,431 g VNT chứa 2,32% DDEA vào bình định mức 100 ml, thêm khoảng 30 ml dung dịch đệm phosphat pH 7,4 vào bình định mức, lắc đều, thêm đệm đến vạch, lắc đều và lọc qua màng cellulose acetat (lỗ lọc 0,45 μm). Hút 1 ml dịch lọc cho vào bình định mức 10 ml, thêm đệm tới vạch. Tiến hành đo UV ở bước sóng 275 nm. Tiến hành 3 lần.

vi. Tính thấm qua tế bào Franz: mẫu VNT 2% diclofenac (2,46 g) được cho vào khoang nhận của tế bào Franz, màng thử nghiệm sử dụng là màng cellulose acetat (diện tích màng 3,46 cm^2 , đường kính lỗ 0,45 μm), khoang nhận chứa 18 ml đệm pH 7,4. Rút mẫu thử ở các thời điểm 15, 30, 45, 60, 90, 120 phút và bù lại bằng đệm 7,4 đã ổn nhiệt. Định lượng hàm lượng DDEA trong mẫu tại từng thời điểm khác nhau để đánh giá khả năng phóng thích hoạt chất bằng phương pháp quang phổ hấp thụ UV-Vis, bước sóng 275nm. Tiến hành lặp lại 6 lần [9].

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Xác định độ tan của DDEA trong các tá dược

Độ tan của DDEA trong tá dược được biểu diễn trong các biểu đồ ở hình 1:



Hình 1. Độ tan của DDEA trong các tá dược

Trong các tá dược pha dầu được khảo sát, Capryol 90 cho thấy khả năng hòa tan DDEA vượt trội, sau đó theo thứ tự là acid oleic, dầu oliu, IPM, dầu đậu nành và dầu dừa. Do đó, cố định Capryol 90 là pha dầu.

Trong các chất diện hoạt được khảo sát thứ tự đạt được là Kolliphor RH 40 < Tween 80 < Labrasol < Tween 20. Trong các chất đồng diện hoạt/ đồng hòa tan được khảo sát, các chất đồng hòa tan cho khả năng hòa tan DDEA tốt nhất.

Đánh giá khả năng hỗn hòa các tá dược

Cố định Capryol 90, khảo sát khả năng hỗn hòa của các chất diện hoạt:

Bảng 1. Khả năng nhũ hóa của chất diện hoạt

Chất diện hoạt	Độ truyền qua T (%) (n=3)
Kolliphor RH 40	99,99 \pm 0,01

Như vậy, trong các chất diện hoạt khảo sát, đề tài đề xuất sử dụng Tween 20 do có khả năng nhũ hóa cao (T (%) = 93,00 \pm 0,06%) và hòa tan được lượng nhiều nhất DDEA.

Tween 80	91,30 ± 0,06
Tween 20	93,00 ± 0,07
Labrasol	61,46 ± 0,12

Khảo sát khả năng nhũ hóa của một số chất đồng diện hoạt với Capryol 90 và Tween 20, số liệu được trình bày trong bảng 2:

Bảng 2. Khả năng nhũ hóa của chất đồng diện hoạt hoặc đồng dung môi

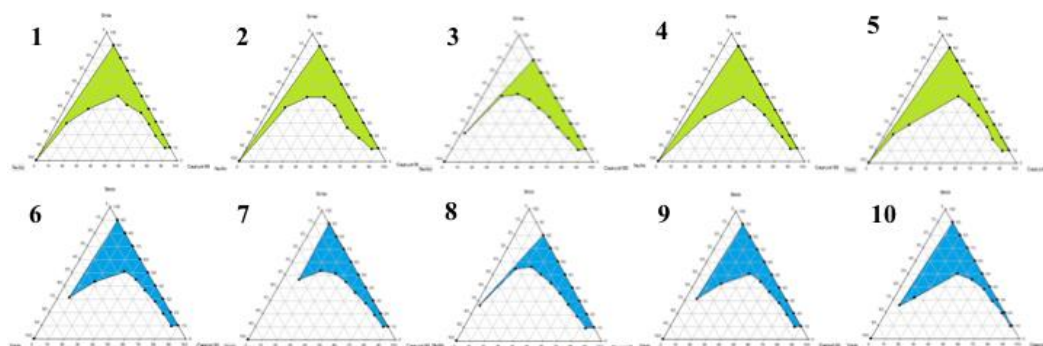
Chất đồng diện hoạt/ đồng dung môi	Độ truyền qua T (%) (n=3)
Transcutol P	92,78 ± 0,18
PEG 400	87,98 ± 0,03
Propylen glycol	91,31 ± 0,10
Isopropyl glycol	79,84 ± 0,23
Lauroglycol 90	46,10 ± 0,17

Transcutol P cho thấy khả năng nhũ hóa tốt nhất với độ truyền qua trung bình (T) 92,78%, propylen glycol và PEG 400 lần lượt có các giá trị trung bình là 91,31% và 87,98%. Isopropyl glycol và lauroglycol 90 cho khả năng nhũ hóa kém nhất trong các tá dược được khảo sát. Transcutol P có khả năng nhũ hóa tốt nhất, tuy nhiên lại có khả năng hòa tan DDEA kém hơn so với propylen glycol và PEG 400.

Trong quá trình bảo quản các mẫu tá dược được bão hòa DDEA, quan sát thấy sự đổi màu của dung dịch Transcutol P từ trong suốt sang vàng cam. Không ghi nhận hiện tượng đổi màu này với các dung dịch PEG 400 hoặc propylen glycol bão hòa DDEA. Như vậy, đề tài đề xuất tiếp tục khảo sát các công thức VNT sử dụng PEG 400 và Propylen glycol là chất đồng dung môi.

Xây dựng giản đồ pha

Cổ định pha dầu là Capryol 90, chất diện hoạt là Tween 20, chất đồng hòa tan là PEG 400 hoặc Propylen glycol, xây dựng 10 giản đồ pha như Hình 2.



Hình 2. Các GDP khảo sát bao gồm Capryol 90, Smix và nước. GDP 1-5 lần lượt có các tỷ lệ Smix (Tween:PEG 400) là 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1; GDP 6-10 lần lượt có các tỷ lệ Smix (Tween:Propylen glycol) là 1:1, 1:2, 1:3, 2:1, 3:1.

Giản đồ pha chứa PEG 400 có vùng tạo VNT rộng hơn so với propylen glycol.

Trong các giản đồ pha với Smix có PEG 400, Smix có tỉ lệ Tween 20: PEG 400 là 2:1 và 3:1 có diện tích vùng tạo VNT tương tự nhau và lớn hơn so với các tỉ lệ 1:1, 1:2 và 1:3. Do đó, đề tài chọn Smix (Tween 20: PEG 400) với tỉ lệ 2:1 để thu được vùng VNT rộng và tỷ lệ chất diện hoạt sử dụng ít nhằm giảm khả năng gây kích ứng trên da.

Xây dựng công thức VNT chứa 2% diclofenac

Cổ định tỷ lệ tại 2,32% DDEA, tiến hành khảo sát độ bền của các VNT với tỷ lệ nước từ 50 – 85% như trong bảng 3. Quy trình điều chế VNT như sau:

Bảng 3. Thành phần các VNT

Thành phần (%)				
VNT	DDEA	Dầu	Smix	Nước
1	2,32	2	13	vđ 100
2	2,32	3	17	vđ 100
3	2,32	5	25	vđ 100
4	2,32	10	30	vđ 100
5	2,32	10	40	vđ 100



Hình 3. Cảm quan các VNT sau

Đánh giá các tính chất lý-hóa của VNT chứa 2%

diclofenac:

Cảm quan của các VNT: Sau khi điều chế, cả 5 VNT đều đồng nhất, trong suốt.

Đánh giá độ bền của VNT tạo thành: qua ba thí nghiệm ổn định qua ly tâm, chu kỳ nóng lạnh và chu kỳ đông – rã đông: 5 công thức VNT khảo sát đều không tách lớp hay kết tủa sau khi ly tâm 4000 vòng/phút trong 30 phút. Khi thí nghiệm ở chu kỳ nóng-lạnh (6 chu kỳ ở điều kiện 45 °C và 5 °C) và chu kỳ đông – rã đông (6 chu kỳ ở điều kiện nhiệt độ phòng và 4°C), công thức VNT 4 tách lớp và có sự kết tinh ở chu kỳ đầu tiên của 2 thí nghiệm.

Kích thước giọt của VNT chứa 2 % diclofenac:

Bảng 4. Kích thước giọt trung bình của các VNT

VNT nền		VNT chứa 2% diclofenac	
VNT	Kích thước giọt (nm)	VNT	Kích thước giọt (nm)
1	22,73 ± 0,40	1	216,80 ± 0,28
2	30,54 ± 0,45	2	179,10 ± 0,23
3	61,92 ± 0,91	3	17,01 ± 0,59
4	30,79 ± 0,44	4	36,76 ± 0,84
5	96,20 ± 0,55	5	57,31 ± 0,65

Độ dẫn điện và pH:

Bảng 5. Giá trị độ dẫn điện và pH của các VNT

VNT	Độ dẫn điện (S/m)		pH	
	VNT nền	VNT chứa 2 % diclofenac	VNT nền	VNT chứa 2 % diclofenac
1	67615,2 ± 47,8	418343,3 ± 58,3	3,49	7,26
2	56665,8 ± 37,5	386635,7 ± 71,0	3,24	6,94
3	53193,1 ± 58,6	302748,7 ± 69,4	3,20	6,89
4	41823,7 ± 34,9	226106,0 ± 10,9	3,25	6,88
5	290018,1 ± 16,8	163797,0 ± 45,5	3,34	6,69

VNT có tỉ lệ dầu càng cao thì độ dẫn điện càng thấp, các VNT có chứa 2 % diclofenac có sự tăng độ dẫn điện đáng kể so với VNT nền.

Các công thức đều có giá trị pH trong khoảng sinh lý, phù hợp để sử dụng trên da.

Định lượng:

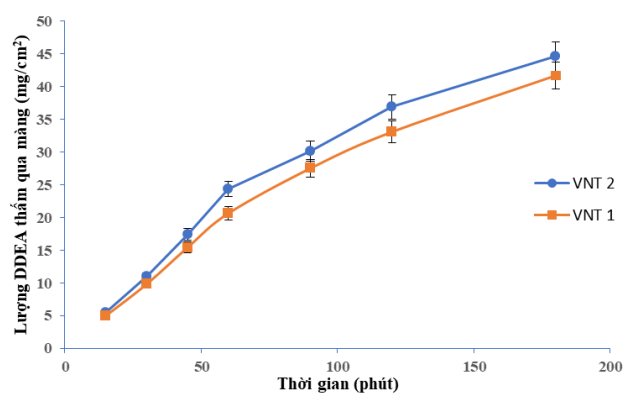
Bảng 6. Hàm lượng DDEA trong các VNT

VNT	Hàm lượng DDEA (g/100g)
1	2,316 ± 0,006
2	2,305 ± 0,007
3	2,302 ± 0,004
4	2,314 ± 0,005
5	2,317 ± 0,006

Như vậy, các VNT đều đạt về hàm lượng DDEA. Trong 5 công thức VNT, công thức số 4 với tỉ lệ của dầu: Smix: nước là 10:30:60 ở chu kỳ lạnh đầu tiên đã bị tách lớp. Các công thức 1, 2, 3, 5 đều đạt các chỉ tiêu, tuy nhiên đề tài ưu tiên khảo sát tính thấm tế bào Franz với 2 công thức VNT 1 và VNT 2 với tỉ lệ dầu: Smix: nước lần lượt là 2:13:85 và

3:17:80 với mục đích có được nhiều lượng nhất có thể để tạo môi trường thuận lợi cho sự gel hóa.

Tính thấm qua màng (thử nghiệm tế bào Franz):



Hình 4. Tính thấm của DDEA từ VNT 1 và

2. Qua đồ thị Hình 4, 2 công thức VNT thể hiện khả năng thấm DDEA tích lũy khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$), dù kích thước giọt của VNT 2 nhỏ hơn VNT 1. Ở 60 phút đầu của thử nghiệm, 2 công thức có tốc độ phóng thích hoạt chất qua màng cellulose acetat nhanh. Từ thời điểm 60 phút đến 180 phút, tốc độ thấm hoạt chất giảm nhẹ và kết thúc thử nghiệm với 49,21% (42,63 mg/cm²) DDEA được phóng thích từ VNT 2 và 46,23% (41,72 mg/cm²) DDEA được phóng thích từ VNT 1.

Tiến hành chọn tỷ lệ Capryol 90: Smix: nước là 2:13:85 (VNT 1) nhằm có lượng nước lớn hơn để tạo thuận lợi cho sự điều chế gel sau này.

IV. BÀN LUẬN

Trong 10 giản đồ pha từ pha dầu là Capryol 90, chất diện hoạt Tween 20, đồng diện hoạt là PEG 400 và Propylen Glycol, ta lựa chọn được 2 giản đồ pha đại diện cho 2 chất đồng diện hoạt với tỉ lệ chất diện hoạt và đồng diện hoạt 2:1, tỉ lệ này đảm bảo vùng tạo VNT lớn và ổn định, đồng thời ít lượng chất diện hoạt ít hơn so với tỉ lệ 3:1, từ đó giảm nguy cơ gây kích ứng trên da.

Khi so sánh với một nghiên cứu VNT chứa diclofenac của Masthan Rao và cộng sự (2015), nghiên cứu này thu được VNT gồm acid oleic, Tween 80 và PEG 400 (tỉ lệ Smix là 2:1), trong đó tỉ lệ pha dầu, Smix và nước là 2:3:5. Hệ này tải được 1% diclofenac và có kích thước giọt trung bình 450 nm và độ thấm hoạt chất qua màng là 27,96 mg/cm² sau 240 phút thử nghiệm [3]. So sánh với một nghiên cứu khác của Stefan Dima và cộng sự (2008), VNT chứa diclofenac bao gồm dầu đậu nành, Brij 58, Span 80 và 1-butanol (tỉ lệ Smix là 4:1), tỉ lệ pha dầu, smix và nước là 4:8:1. Hệ tải được 1% diclofenac [10].

VNT được nghiên cứu trong đề tài hiện tại gồm Capryol 90, Tween 20 và PEG 400 (tỉ lệ Smix 2:1), trong đó tỉ lệ pha dầu, Smix và nước là 2:13:85. Hệ tải được 2% diclofenac, có kích thước giọt trung bình 216,18 nm và độ thấm hoạt chất qua màng là 41,72 mg/cm² sau 180 phút thử nghiệm. Như vậy, công thức VNT nghiên cứu đạt kích thước giọt, bền vững và có khả năng thấm qua màng, đồng thời lượng nước trong công thức nhiều hơn so với các công bố trước đó, giúp tạo thuận lợi để điều chế dạng bào chế sau này.

V. KẾT LUẬN

VNT chứa 2 % diclofenac được điều chế thành công với pha dầu là Capryol 90, Tween 20 và PEG 400 với tỷ lệ 2:13:85, đạt các chỉ tiêu lý-hóa và dược học.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. *Dược thư quốc gia Việt Nam* (2015), chuyên luận Diclofenac, 515-518.
2. Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh (2014), *Bào chế và sinh dược học*, 2, chuyên luận Thuốc mềm dùng trên da và niêm mạc. Thành phố Hồ Chí Minh, 55-67.

3. Masthan Rao et al., 2015. Formulation Development and Evaluation of Diclofenac Sodium Microemulsion, *Indo Am. J. Pharm. Sci.* 2(12), 1673-1688.
4. Yuan Y et al., 2006. Investigation of microemulsion system for transdermal delivery of meloxicam, *Int. J. Pharm.* 321(1-2), 117-123.
5. Eun-Seok Park et al., 2005. Transdermal delivery of piroxicam using microemulsions. *Arch Pharm Res*, 28(2), 243-248.
6. Cao M et al., 2017. Formulation optimization and ex vivo and in vivo evaluation of celecoxib microemulsion-based gel for transdermal delivery. *AAPS PharmSciTech*, 18(6), 1960-1971.
7. Vinod Singh et al., 2013. Topical non steroidal anti *inflammatory* drug (NSAIDs) microemulsions: Rationale, review and future prospective. *Asian J Pharm*, 7, 1-7.
8. Hamed R et al., 2016. Nanoemulsion-based gel formulation of diclofenac diethylamine: design, optimization, rheological behavior and in vitro diffusion studies. *Pharmaceutical development and technology*, 21(8), 980-989.
9. United state pharmacopoeia 39- NF34, monograph 1724, Semid solid drug performance test.
10. Stefan Dima et al., 2008. Topical Delivery of Diclofenac using Microemulsion Systems. *Roum. Biotechnol. Lett*, 13(6), 49-55.

(Ngày nhận bài: 21/9/2019- Ngày duyệt đăng: 06/11/2019)
