

BỘ Y TẾ

BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI CẤP BỘ

**NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ TƯƠNG ĐƯƠNG
SINH HỌC CỦA CHẾ PHẨM METFORMIN
SẢN XUẤT TRONG NƯỚC**

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. HOÀNG THỊ KIM HUYỀN

Cơ quan chủ trì đề tài: TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

6889

06/6/2008

HÀ NỘI - 2008

BỘ Y TẾ

BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI CẤP BỘ

**NGHIÊN CỨU ĐÁNH GIÁ TƯƠNG
ĐƯƠNG SINH HỌC CỦA CHẾ PHẨM
METFORMIN
SẢN XUẤT TRONG NƯỚC**

Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. HOÀNG THỊ KIM HUYỀN

Cơ quan chủ trì đề tài: TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI

Cấp quản lý : BỘ Y TẾ

Thời gian thực hiện: từ tháng 09/2006 đến tháng 03/2008

Tổng kinh phí thực hiện đề tài: 200 triệu đồng

Trong đó : kinh phí sự nghiệp khoa học: 0 đồng

Nguồn khác: 200 triệu đồng

Hà nội 2008

BÁO CÁO KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỀ TÀI CẤP BỘ

1. Tên đề tài:

**Nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học
của chế phẩm metformin sản xuất trong nước**

2. Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. Hoàng Thị Kim Huyền

3. Cơ quan chủ trì đề tài: Trường đại học Dược Hà Nội

4. Cơ quan quản lý đề tài: Bộ Y tế

5. Thư ký đề tài: Phan Quỳnh Lan

6. Danh sách những người thực hiện chính:

Họ và tên	Nơi công tác
Th.S. Phan Quỳnh Lan	Trường đại học Dược Hà nội
Th.S. Nguyễn Liên Hương	Trường đại học Dược Hà nội
ThS. Phạm Thị Thúy Vân	Trường đại học Dược Hà nội
ThS. Nguyễn Thị Hương Giang	Trường đại học Dược Hà nội
ThS. Vũ Đình Hoà	Trường đại học Dược Hà nội
BS. Trần Thị Thanh Huyền	Trường đại học Dược Hà nội
DS. Nguyễn Tứ Sơn	Trường đại học Dược Hà nội
DS. Trịnh Trung Hiếu	Trường đại học Dược Hà nội
TS. Lê Thị Luyến	Vụ Khoa học Đào tạo - Bộ Y tế
DS. Lê Thuý Hương	Cục Quản lý Dược- Bộ Y tế

7. Đề tài nhánh: không có

8. Thời gian thực hiện: từ tháng 09/2006 đến tháng 03/2008

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

ANOVA	: Phân tích phương sai (<i>Analysis of Varian</i>)
AUC₀₋₁₂	: Diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian từ thời điểm ban đầu tới 12h (<i>Area Under the Curve of Concentration versus Time from time 0 to 12</i>)
AUC_{0-inf}	: Diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian từ thời điểm ban đầu tới vô cùng (<i>Area Under the Curve of Concentration versus Time to infinity</i>)
BMI	: Chỉ số khối cơ thể (<i>Body Mass Index</i>)
C_{max}	: Nồng độ tối đa
ĐTĐ	: Đái tháo đường
FDA	: Cơ quan quản lý Thực phẩm – Dược phẩm (<i>Food And Drug Administration</i>)
HPLC	: Sắc ký lỏng hiệu năng cao (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HQC	: Mẫu kiểm chứng nồng độ cao (<i>High Quality Control sample</i>)
LLOQ	: Giới hạn định lượng dưới (<i>Lower Limit of Quantification</i>)
LQC	: Mẫu kiểm chứng nồng độ thấp (<i>Lower Quanlity Control Sample</i>)
MQC	: Mẫu kiểm chứng nồng độ trung bình (<i>Middle Quanlity Control Sample</i>)
RSD	: Độ lệch chuẩn tương đối (<i>Relative Standard Deviation</i>)
SD	: Độ lệch chuẩn (<i>Standard Deviation</i>)
T_{1/2}	: Nửa đời thải trừ của thuốc
T_{max}	: Thời gian thuốc đạt nồng độ tối đa trong huyết tương kể từ khi đưa thuốc
ULOQ	: Giới hạn định lượng trên (<i>Upper Limit of Quantification</i>)
WHO	: Tổ chức y tế thế giới (<i>World Health Organization</i>)
λ_z	: Hằng số tốc độ thải trừ pha cuối.

MỤC LỤC

	Trang
BẢN TỰ ĐÁNH GIÁ	1
BÁO CÁO TÓM TẮT	3
NỘI DUNG BÁO CÁO CHI TIẾT KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	4
1. ĐẶT VẤN ĐỀ	4
2. TỔNG QUAN	5
2.1. Tổng quan sơ lược về metformin	5
2.2. Một số nghiên cứu trong và ngoài nước có liên quan	5
2.2.1. Nghiên cứu ngoài nước	5
2.2.2. Nghiên cứu trong nước	7
3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	8
3.1 Đối tượng nghiên cứu	8
3.1.1. Người tình nguyện	8
3.1.2. Thuốc nghiên cứu	8
3.2. Vật liệu và phương tiện nghiên cứu	9
3.2.1. Máy móc thiết bị	9
3.2.2. Hoá chất thí nghiệm	9
3.3. Phương pháp nghiên cứu	9
3.3.1. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng metformin trong huyết tương	10
3.3.2. Nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học của chế phẩm metformin sản xuất trong nước	12
4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN	16
4.1. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng metformin trong huyết tương	16
4.1.1. Xây dựng phương pháp định lượng Metformin trong huyết tương	16
4.1.2. Thẩm định phương pháp định lượng Metformin trong huyết tương	17
4.2. Đánh giá tương đương sinh học trên người tình nguyện khoẻ mạnh	26
4.2.1. Đặc điểm người tình nguyện trong mẫu nghiên cứu	26
4.2.2. Nồng độ metformin trong huyết tương	26
4.2.3. Các thông số dược động học của 2 chế phẩm nghiên cứu	30
4.2.4. Phân tích các số liệu thu được và đánh giá tương đương sinh học	33
4.2.5. Các tác dụng bất lợi của thuốc gặp trong nghiên cứu	35
5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT	38
5.1. Kết luận	38

5.2. Đề xuất	39
Tài liệu tham khảo	40
Phụ lục 1: Quy trình phân tích metformin trong huyết tương	
Phụ lục 2: Bảng phân tích phương sai và khoảng tin cậy 90%	
Phụ lục 3: Bảng mã hoá và phân nhóm ngẫu nhiên	
Phụ lục 4: Bảng theo dõi thời điểm lấy mẫu máu người tình nguyện	
Phụ lục 5: Phiếu theo dõi sức khoẻ người tình nguyện	
Phụ lục 6: Đơn tình nguyện tham gia nghiên cứu	
Phụ lục 7: Phiếu kiểm nghiệm thuốc thử và đối chiếu	
Phụ lục 8: Biên bản họp hội đồng đạo đức trong nghiên cứu y sinh học	
Phụ lục 9: Một số sắc đồ của người tình nguyện	

BẢN TỰ ĐÁNH GIÁ
Về tình hình thực hiện và những đóng góp mới
của đề tài khoa học và công nghệ cấp bộ

1. Tên đề tài:

*Nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học của
chế phẩm metformin sản xuất trong nước*

2. Thuộc chương trình : không

3. Chủ nhiệm đề tài: PGS.TS. Hoàng Thị Kim Huyền

4. Cơ quan chủ trì đề tài: Trường Đại học Dược Hà Nội

5. Thời gian thực hiện: từ tháng 09/2006 đến tháng 03/2008

6. Tổng kinh phí thực hiện đề tài: 200 triệu đồng

Trong đó : Kinh phí từ ngân sách nhà nước: 0 đồng

Nguồn khác: 200 triệu đồng

7. Tình hình thực hiện đề tài so với đề cương nghiên cứu đã được phê duyệt

7.1. Về mức độ hoàn thành khối lượng công việc

Đã đạt được mục tiêu nghiên cứu đề ra:

+ Đánh giá tương đương sinh học của metformin.

+ Rút ra kết luận về chất lượng của metformin trong lựa chọn thuốc điều trị.

7.2. Về các yêu cầu khoa học và chỉ tiêu cơ bản của các sản phẩm khoa học công nghệ

Các sản phẩm tạo ra so với dự kiến:

- Phương pháp chiết xuất và định lượng metformin từ huyết tương người.

- Chất lượng của sản phẩm thử (Glucosfine)

Đánh giá việc sử dụng kinh phí: Sử dụng hợp lý, tiết kiệm.

7.3. Về tiến độ thực hiện: Luôn hoàn thành đúng tiến độ

8. Về những đóng góp mới của đề tài:

Trên cơ sở so sánh với những thông tin đã được công bố trên các ấn phẩm trong và ngoài nước cho đến thời điểm kết thúc đề tài, đề tài có những điểm mới sau đây:

8.1. Về giải pháp khoa học công nghệ:

Lần đầu tiên xác định sinh khả dụng và TĐSH của Glucofine 850mg (metformin của Domesco sản xuất). Số liệu thu được cho phép kết luận về tương đương sinh học của Glucofine so với biệt dược của hãng phát minh (Glucophage), mở ra khả năng thay thế nhau trong điều trị với giá cả chỉ bằng một nửa.

8.2. Về phương pháp nghiên cứu:

- Giúp cho các cơ sở kiểm nghiệm một phương pháp định lượng metformin từ huyết tương người có độ ổn định và độ chính xác cao; một quy trình đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học của metformin.
- Góp thêm kiến thức, kinh nghiệm về thử TĐSH, cụ thể là thử TĐSH một chế phẩm hạ đường huyết. Những kiến thức này sẽ là tài liệu tham khảo thêm để Bộ Y tế xây dựng quy định về đánh giá TĐSH sau này.
- Mở ra hướng mới trong các nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học: sự phối hợp giữa các đơn vị nghiên cứu trong đó có Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương và trường đại học Dược Hà nội.

8.3. Những đóng góp khác:

- Đào tạo: 1 luận án tiến sỹ

Hà nội ngày 01 tháng 3 năm 2008

Chủ nhiệm đề tài

PGS.TS. Hoàng Thị Kim Huyền

BÁO CÁO TÓM TẮT

Đề tài “*Nghiên cứu tương đương sinh học của chế phẩm metformin sản xuất trong nước*” được tiến hành với các mục tiêu:

- (1) Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng metformin trong huyết tương người
- (2) Đánh giá tương đương sinh học của Glucofine 850mg- một chế phẩm chứa hoạt chất là metformin do công ty cổ phần xuất nhập khẩu Y tế Đồng tháp Domesco sản xuất; chế phẩm đối chứng là Glucophage 850mg- thuốc của hãng phát minh Merck Santé (Pháp).

Phương pháp nghiên cứu:

- Tiến hành xây dựng phương pháp định lượng metformin trong huyết tương người bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC);
- Thẩm định phương pháp theo các chỉ tiêu của FDA về thẩm định phương pháp phân tích trong dịch sinh học bao gồm độ đặc hiệu- chọn lọc, độ đúng, độ lặp lại, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, độ tìm lại và độ ổn định của mẫu.
- Nghiên cứu tương đương sinh học của viên nén Glucofine 850mg so với Glucophage 850mg trên 18 người tình nguyện theo phương pháp ngẫu nhiên, đơn liều, chéo đôi, hai giai đoạn. Cho người tình nguyện uống thuốc, lấy mẫu máu định lượng nồng độ thuốc, tính các thông số dược động học của hai chế phẩm, phân tích phương sai và tính khoảng tin cậy 90% của tỉ lệ giá trị trung bình các thông số C_{max} , AUC_{0-12} , AUC_{0-inf} của 2 chế phẩm để đánh giá tương đương sinh học.

Kết quả nghiên cứu:

- Đã xây dựng được phương pháp định lượng metformin trong huyết tương bằng HPLC đạt các chỉ tiêu thẩm định phương pháp phân tích trong dịch sinh học.
- Đã có kết luận về tương đương sinh học của viên nén Glucofine 850mg do Domesco sản xuất so với viên nén Glucophage 850mg do Merck Santé (Pháp) sản xuất: khoảng tin cậy 90% của tỉ lệ giá trị trung bình các thông số C_{max} , AUC_{0-12} , AUC_{0-inf} của chế phẩm thử và chế phẩm đối chứng đều nằm trong giới hạn từ 80%- 125% chứng tỏ hai chế phẩm là tương đương sinh học *in vivo*.

Kết luận:

Đề tài đã đạt được các mục tiêu đề ra thể hiện qua kết quả nghiên cứu. Đề tài thực hiện đúng tiến độ và tiết kiệm kinh phí.

NỘI DUNG BÁO CÁO CHI TIẾT

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Metformin là thuốc hạ đường huyết nhóm biguanid. Metformin được chỉ định cho bệnh ĐTĐ typ 2 (ĐTĐ không phụ thuộc insulin). Metformin có thể sử dụng đơn trị liệu hoặc sử dụng phối hợp với các thuốc điều trị ĐTĐ khác. Ngoài tác dụng gây hạ đường huyết, metformin có ảnh hưởng tốt trên chuyển hoá lipoprotein, rối loạn thường gặp ở người bệnh ĐTĐ typ 2, vì vậy rất thích hợp khi điều trị ĐTĐ cho bệnh nhân béo phì.

Hiện nay, metformin là thuốc duy nhất của nhóm biguanid còn được sử dụng. Với vai trò rộng lớn trong điều trị đái tháo đường như nêu ở trên, metformin là thuốc điều trị ĐTĐ được nhiều nhà sản xuất trong nước lựa chọn nhất với rất nhiều hàm lượng và dạng bào chế. Tại Việt nam, không kể các thuốc nhập ngoại, hiện cũng có tới gần 20 chế phẩm biệt dược của metformin do các công ty dược trong nước sản xuất được phép lưu hành. Điều đáng lưu ý là metformin thuộc nhóm III trong phân loại sinh dược học (Biopharmaceutical Classification System, BCS), tức là thuốc có độ tan tốt nhưng khả năng hấp thu qua màng ruột kém; vì vậy, kỹ thuật bào chế sẽ ảnh hưởng đến sinh khả dụng của thuốc. Chính vì vậy metformin thuộc loại phải tiến hành đánh giá tương đương sinh học in vivo khi đăng ký sản phẩm generic.

Hiện nay ở nước ta, chủ trương tăng cường sử dụng thuốc nội và việc quy định kê đơn theo tên generic là những biện pháp nhằm khuyến khích sản xuất, phát triển ngành công nghiệp dược Việt nam, đồng thời giảm chi phí cho người sử dụng. Tuy nhiên, tâm lý chung của người kê đơn cũng như bệnh nhân chưa thực sự yên tâm khi sử dụng thuốc generic. Điều này xuất phát từ việc chưa có quy định về đánh giá tương đương sinh học khi đăng ký sản phẩm, trong khi theo đúng định nghĩa về thuốc generic thì đó là “những sản phẩm có cùng hoạt chất, cùng hàm lượng với thuốc gốc (original drug)” và phải “đạt tương đương sinh học” với thuốc gốc.

Xuất phát từ những lý do nêu trên, chúng tôi tiến hành đề tài này với các mục tiêu sau:

- *Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng metformin trong huyết tương người*

- *Đánh giá tương đương sinh học giữa Glucofine - một chế phẩm chứa hoạt chất là metformin do công ty cổ phần xuất nhập khẩu Y tế Đồng Tháp Domesco sản xuất; với chế phẩm đối chiếu là Glucophage - thuốc của hãng phát minh Merck Santé (Pháp).*

2. TỔNG QUAN

2.1. Vài nét sơ lược về metformin

Metformin là thuốc hạ đường huyết nhóm biguanid. Metformin làm giảm glucose huyết khi đói và sau bữa ăn ở người bệnh ĐTĐ typ 2. Cơ chế tác dụng ngoại biên của thuốc là làm tăng sử dụng glucose ở tế bào, cải thiện liên kết của insulin với thụ thể và có thể có cả tác dụng sau thụ thể, ức chế tổng hợp glucose tại gan và giảm hấp thu glucose ở ruột. Thuốc không có tác dụng kích thích tế bào beta tuy tiết insulin, không có tác dụng hạ đường huyết ở người không bị ĐTĐ [5], [26], [27].

Metformin hấp thu chậm và không hoàn toàn ở đường tiêu hoá. Sinh khả dụng tuyệt đối của metformin với liều 500mg- 1500mg uống lúc đói xấp xỉ 50-60%. $T_{1/2}$ hấp thu khoảng 0,9-2,6 giờ. Không có sự tỉ lệ giữa nồng độ thuốc trong máu với liều dùng khi tăng liều do hấp thu thuốc giảm. Thức ăn làm giảm mức độ và tốc độ hấp thu metformin. Thuốc liên kết với protein không đáng kể, phân bố nhanh chóng vào các mô và dịch. Metformin cũng phân bố vào trong hồng cầu. Thể tích phân bố của thuốc là $654 \pm 358L$. Thuốc không bị chuyển hoá ở gan và không bài tiết qua mật. Sau khi uống, khoảng 90% lượng thuốc hấp thu được thải trừ qua thận trong vòng 24 giờ ở dạng không chuyển hoá. Nửa đời trong huyết tương là 1,5 - 4,5 giờ. Thuốc bị tích lũy trong trường hợp suy giảm chức năng thận. Độ thanh thải metformin qua thận giảm ở người bệnh suy thận và người cao tuổi [5], [26], [27].

Hiệu quả điều trị của metformin không phụ thuộc vào tuổi, cân nặng, thời gian mắc bệnh, nồng độ insulin và C- peptid của bệnh nhân. Mức độ giảm đường huyết tùy thuộc vào nồng độ glucose huyết trước khi điều trị của bệnh nhân [27].

Metformin còn có tác dụng lên chuyển hoá lipid ở người bệnh ĐTĐ typ 2. Thuốc làm tăng HDL, giảm triglycerid và LDL-cholesterol. Liều khởi đầu của metformin viên nén 500mg là 1 viên/lần, ngày uống 2 lần vào bữa ăn sáng và bữa ăn tối. Có thể tăng liều tới mức tối đa là 2500mg/ngày, chia làm ba lần trong ngày, uống vào các bữa ăn [5].

Tác dụng không mong muốn của metformin chủ yếu là trên đường tiêu hoá, bao gồm tiêu chảy, chướng bụng, chán ăn, nôn, buồn nôn. Dùng metformin kéo dài có thể gây thiếu vitamin B₁₂. Hiếm khi gặp hạ đường huyết. Nhiễm toan lactic xảy ra với tỉ lệ 0,03 ca/ 1000 bệnh nhân mỗi năm, có thể gây tử vong nếu không điều trị kịp thời [5], [27].

2.2. Một số nghiên cứu trong và ngoài nước có liên quan

2.2.1. Nghiên cứu ngoài nước

Tương đương sinh học (Bioequivalence, TĐSH) là khái niệm được sử dụng để chỉ các sản phẩm có chứa cùng một hoạt chất và có sinh khả dụng (Bioavailability) tương đương nhau trên cùng đối tượng và điều kiện thử. Thử TĐSH ngày càng quan trọng với các tiêu chuẩn kiểm nghiệm thông thường nhiều khi không phản ánh được chất lượng sản phẩm thuốc. Với xu hướng sử dụng thuốc generic như hiện nay, rất nhiều hoạt chất được nhiều nhà bào chế cùng sản xuất và được tung ra thị trường với các biệt dược khác nhau. Với quy trình bào chế, thành phần tá dược của các thuốc cùng hoạt chất do các xí nghiệp khác nhau rất khác nhau nên khả năng đạt được TĐSH không phải dễ dàng với mọi sản phẩm trong khi chỉ những chế phẩm đạt TĐSH mới được thay thế nhau trong điều trị. Trắc nghiệm hoà tan (Disolution Test) cũng góp phần giảm thiểu sai khác về TĐSH nhưng không phải lúc nào test in vitro này cũng thay được in vivo. Điều này dẫn đến nhiều nước trên thế giới, để cấp phép cho các biệt dược này lưu hành trên thị trường, đều yêu cầu các nhà sản xuất phải có kết quả đánh giá TĐSH in vivo.

Để thống nhất tiêu chuẩn đánh giá, nhiều nước trên thế giới đã thành lập các ban chuyên môn về đánh giá TĐSH và đưa ra văn bản hướng dẫn cụ thể về vấn đề này. Ví dụ tại Mỹ, ngay từ đầu những năm 70 của thế kỷ XX, FDA đã đưa những quy định về đánh giá sinh khả dụng và TĐSH vào tiêu chuẩn chất lượng của chế phẩm, đồng thời trung tâm đánh giá và nghiên cứu thuốc của Mỹ (CDER) [25] cũng phải chịu trách nhiệm đưa ra các văn bản hướng dẫn phương pháp đánh giá TĐSH. Hướng dẫn đầu tiên về đánh giá TĐSH ở Australia ra đời vào năm 1975 và đến năm 1980, hướng dẫn đánh giá TĐSH cho các chế phẩm đường uống tác dụng kéo dài đã được tách hẳn riêng một phần. Tương tự ở Canada, bộ Y tế Canada cũng ra văn bản hướng dẫn thử TĐSH với hai phần riêng biệt: hướng dẫn cho các chế phẩm đường uống có dạng bào chế kinh điển (part A) [32] và cho các chế phẩm đường uống có dạng bào chế tác dụng kéo dài (part B) [33]... Không chỉ có văn bản hướng dẫn thử TĐSH ở từng quốc gia, các tổ chức y tế đa quốc gia như TCYTTG (WHO) [37] hay uỷ ban thuốc bản quyền châu Âu (CPMP) [23] cũng đưa ra văn bản hướng dẫn thử TĐSH.

Tại châu Á, một số các quốc gia có nền công nghiệp dược phát triển như Ấn Độ [31], Trung Quốc [21], Nhật Bản, Hàn Quốc... đều đã có văn bản hướng dẫn thử TĐSH cho riêng quốc gia mình. Ngay cả ở một số nước trong khu vực ASEAN như

Indonesia, Malaysia, Philippin cũng đã ban hành hướng dẫn thử TĐSH áp dụng cho quốc gia mình.

Nghiên cứu tương đương sinh học có thể tiến hành dưới nhiều hình thức: đánh giá *in vitro*, đánh giá *in vivo* ở người bằng cách xác định sự biến thiên nồng độ dược chất theo thời gian, hoặc so sánh hiệu quả trên lâm sàng... [34], [37], [39].

Chúng tôi cũng đã tham khảo được một số công trình nghiên cứu định lượng metformin trong huyết tương người. Trong đó phương pháp phổ biến nhất là sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao với detector tử ngoại [17], [19], [34], [36], [40].

2.2.2. Nghiên cứu trong nước

Đánh giá tương đương sinh học cũng đã được thực hiện ở một số đơn vị nghiên cứu như Viện Kiểm nghiệm, trường Đại học Dược Hà Nội, trường Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh.... [1-4], [6-13], [15], [16]. Tuy nhiên chúng tôi chưa thấy công bố một kết quả nghiên cứu nào về đánh giá tương đương sinh học của metformin cả *in vitro* và *in vivo*.

Trường Đại học Dược Hà Nội, trong đó có Bộ môn Dược lâm sàng, đã và đang tiến hành một số nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng/ tương đương sinh học. Các nghiên cứu chủ yếu tập trung vào đánh giá so sánh những dạng bào chế tác dụng kéo dài (dạng bào chế hiện đại) do trường đại học Dược sản xuất với các viên cùng cấu tạo bào chế của các hãng có uy tín trên thị trường, ví dụ viên theophyllin tác dụng kéo dài cấu tạo cốt (matrix), cấu tạo pellet "bôi dần" với viên Theostat của hãng Anova, Euphylin của Laboratoires BYK LA., viên Nifedipin cấu tạo cốt với viên Adalat retard của hãng Bayer.. [11], [13]. Các nghiên cứu gần đây nhất của bộ môn Dược lâm sàng là đánh giá tương đương sinh học của Rifampicin trong viên thuốc chống lao cố định liều và đánh giá tương đương sinh học của viên Omeprazol sản xuất trong nước, đều nhằm phục vụ cho các bệnh viện quyết định đưa vào danh mục thuốc trong trường hợp một hoạt chất có nhiều biệt dược với giá cả chênh lệch.

Nhiều đơn vị nghiên cứu như viện Kiểm nghiệm, phân viện kiểm nghiệm thành phố Hồ Chí Minh, các trường đại học Y Dược cũng đã tiến hành nhiều công trình nghiên cứu nhằm định lượng thuốc trong dịch sinh học. Tuy nhiên chúng tôi cũng chưa thấy phương pháp định lượng metformin trong huyết tương nào được công bố.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

3.1.1. Người tình nguyện

- **Số lượng người tình nguyện: 18**

Người tình nguyện khoẻ mạnh được lựa chọn theo các tiêu chuẩn sau:

- **Tiêu chuẩn lựa chọn**

- Nam giới, tuổi 18 – 25 tuổi, cân nặng 55- 65kg.
- Chỉ số khối lượng cơ thể (BMI) từ 18 – 23.
- Người khoẻ mạnh bình thường, được xác định là khoẻ mạnh dựa trên dữ liệu lâm sàng và cận lâm sàng sau:
 - + Chức năng gan (xét nghiệm ASAT, ALAT, bilirubin trong máu)
 - + Chức năng thận (xét nghiệm ure, creatinin trong máu)
 - + Các xét nghiệm huyết học (số lượng hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu, hemoglobin)
 - + Glucose máu, HIV, HBsAg

Tất cả các xét nghiệm trên đều phải cho kết quả trong giới hạn bình thường, HIV và HBSAg phải âm tính.

- Không uống rượu hay sử dụng bất kỳ loại thuốc nào 72h trước khi bắt đầu và trong suốt quá trình nghiên cứu.

- **Tiêu chuẩn loại trừ:**

- Đang mắc bệnh (mạn tính hoặc cấp tính).
- Có tiền sử dị ứng thuốc.
- Nghiện ma túy, nghiện thuốc lá, nghiện rượu.
- Có tiền sử mắc bệnh tim mạch, thần kinh hoặc nội tiết.
- Tham gia vào bất cứ một nghiên cứu lâm sàng nào trong vòng 30 ngày trước khi bắt đầu nghiên cứu.

3.1.2. Thuốc nghiên cứu

- Chế phẩm thử: Glucofine 850mg
- Chế phẩm đối chiếu: Glucophage 850mg

Trong đề cương nghiên cứu có ghi chọn chế phẩm đối chiếu là Glucophage 850mg do Lipha Pharmaceutical Industries (Pháp) sản xuất. Thực chất đây là công ty sản xuất nhượng quyền của Merck Santé. Các chế phẩm Glucophage lưu hành trên thị

trường tại thời điểm nghiên cứu đều ghi tên nhà sản xuất là Merck Santé. Số đăng ký lưu hành của chế phẩm đối chiếu trong nghiên cứu chính là của chế phẩm đã được đề cập tới trong đề cương.

Một số đặc điểm của hai biệt dược dùng trong nghiên cứu

Đặc điểm	Chế phẩm thử	Chế phẩm đối chiếu
Hoạt chất - Hàm lượng	Metformin 850mg	Metformin 850mg
Biệt dược	Glucofine	Glucophage
Dạng bào chế	Viên nén bao phim	Viên nén bao phim
Nhà sản xuất	Công ty cổ phần XNK y tế Đồng tháp (Domesco)	Merck Santé (Pháp)
Số đăng ký	V154-H12-05	VN-1928-06
Số lô	210907	106951
Ngày sản xuất	09/2007	07/2006
Hạn sử dụng	09/2010	07/2011

*** Đặc điểm của chế phẩm metformin nghiên cứu**

Các thuốc sử dụng trong nghiên cứu này không phải là những chế phẩm mới, đây là những thuốc đang sử dụng điều trị cho bệnh nhân. Các lô thuốc của hai chế phẩm đưa vào nghiên cứu đều có phiếu kiểm nghiệm cho thấy cả hai chế phẩm đều đạt tiêu chuẩn về định lượng, độ đồng đều khối lượng, độ hoà tan theo tiêu chuẩn qui định của dược điển (phụ lục 8).

3.2. Vật liệu và phương tiện nghiên cứu:

3.2.1. Máy móc thiết bị

- Hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1100 series
- Máy li tâm: Hettich EBA20
- Máy lắc siêu âm: Bandelin SONOREX
- Cân phân tích: Presia XT220A (Thủy Sỹ) với độ chính xác 0,1mg
- Tủ lạnh sâu - 40°C: Sanyo
- Máy đo pH510: CyberScan (EUTECH).
- Các dụng cụ thí nghiệm khác: Máy lọc, pipet tự động, pipet thủy tinh chính xác, các dụng cụ thủy tinh thí nghiệm.

3.2.2. Hoá chất thí nghiệm:

- Metformin (Chất đối chiếu quốc gia, Viện kiểm nghiệm thuốc trung ương)
- Acetonitril (dùng cho HPLC, Merck, Đức)
- Methanol (dùng cho HPLC, VRM International)
- NaOH (loại tinh khiết phân tích, Merck, Đức)
- Kali dihydrophosphat (loại tinh khiết phân tích, Merck, Đức)

3.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.3.1 Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng metformin trong huyết tương

3.3.1.1. Xây dựng phương pháp

Có nhiều phương pháp định lượng metformin trong huyết tương, chúng tôi chọn phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) do phương pháp này có độ chính xác cao, thời gian phân tích hợp lý và chi phí chấp nhận được. Phương pháp xử lý mẫu huyết tương và chương trình sắc ký được nghiên cứu như sau:

- *Phương pháp xử lý mẫu:* Tham khảo các tài liệu và nghiên cứu đã công bố, tiến hành khảo sát các phương pháp chiết tách metformin từ huyết tương.
- *Chương trình sắc ký*

Khảo sát phương pháp phân tích trên hệ thống sắc ký HPLC Agilent 1100 series với các điều kiện sắc ký khác nhau về cột sắc ký, pha động, lưu lượng dòng, thể tích tiêm, bước sóng hấp thụ cực đại để phân tích. Từ kết quả khảo sát, chọn những điều kiện sắc ký thích hợp để tiến hành định lượng metformin trong huyết tương người tình nguyện.

3.3.1.2. Thẩm định phương pháp

Thẩm định phương pháp phân tích đã lựa chọn theo các tiêu chuẩn về thẩm định phương pháp phân tích trong dịch sinh học. [24]

Tiến hành thẩm định phương pháp dựa trên các mẫu :

+ Mẫu chuẩn:

Dung dịch chuẩn gốc: 3,2 mg/ml

Dung dịch chuẩn làm việc : 64 µg/ml

Mẫu chuẩn: Pha dung dịch chuẩn làm việc với huyết tương trắng để thu được các mẫu chuẩn có nồng độ metformin từ 1/20 hoặc 1/40 C_{\max} (mẫu LLOQ); tới khoảng 2 -3 lần C_{\max} (mẫu ULOQ).

+ Mẫu trắng: Huyết tương trắng không chứa metformin.

+ Mẫu thử: Huyết tương người tình nguyện sau khi uống viên metformin 850mg.

+ Mẫu QC: Chuẩn bị tương tự như các mẫu chuẩn. Mẫu QC chuẩn bị từ dung dịch chuẩn gốc độc lập với dung dịch chuẩn gốc để pha mẫu chuẩn. Theo quy định của hướng dẫn, mẫu QC gồm 3 loại ở 3 nồng độ khác nhau.

Mẫu LQC có nồng độ = 3 lần nồng độ mẫu LLOQ.

Mẫu MQC có nồng độ = 50-80% nồng độ C_{max} .

Mẫu HQC có nồng độ = 60-80% nồng độ mẫu ULOQ.

❖ *Tính đặc hiệu - chọn lọc của phương pháp:*

Xử lý mẫu theo qui trình được lựa chọn. Tiến hành sắc ký với các mẫu (mẫu trắng, mẫu chuẩn và mẫu thử).

Quy trình phân tích phải đảm bảo có khả năng phát hiện và phân biệt metformin với các tạp chất có trong mẫu. Đáp ứng của mẫu trắng tại thời điểm trùng với thời gian lưu của metformin không vượt quá 20% đáp ứng của mẫu chuẩn.

❖ *Đường chuẩn và khoảng tuyến tính*

Tiến hành phân tích các mẫu chuẩn metformin trong huyết tương từ 1/20 hoặc 1/40 của giá trị C_{max} dự kiến (tham khảo trong các tài liệu đã được công bố) tới khoảng 2 lần nồng độ C_{max} . Từ đáp ứng pic của metformin và nồng độ tương ứng, xây dựng phương trình hồi quy và hệ số tuyến tính. Đường chuẩn phải có hệ số tương quan lớn hơn 0,98 và ít nhất 75% số điểm của đường chuẩn bao gồm cả mẫu nồng độ thấp nhất và nồng độ cao nhất phải có độ đúng nằm trong khoảng từ 85 đến 115%, riêng điểm thấp nhất của đường chuẩn cho phép sai số không quá 20%.

❖ *Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)*

Tiến hành sắc ký các mẫu trắng và mẫu chuẩn có nồng độ bằng 1/30 - 1/10 nồng độ C_{max} . Ghi lại đáp ứng pic của mẫu trắng và mẫu chuẩn.

Nồng độ được coi là LLOQ nếu trên sắc ký đồ mẫu chuẩn ở nồng độ đó cho pic metformin tách biệt với các pic tạp, có độ đúng trong khoảng 80 - 120%, độ lặp lại với RSD nhỏ hơn 20%, đáp ứng pic metformin lớn hơn 5 lần đáp ứng của mẫu trắng.

❖ *Độ đúng - độ chính xác trong ngày và khác ngày.*

- Độ đúng: Tiến hành sắc ký các lô mẫu QC bao gồm LQC, MQC, HQC, mỗi lô gồm ít nhất 5 mẫu độc lập có cùng nồng độ. Xác định kết quả định lượng các mẫu QC theo đường chuẩn pha trong huyết tương trắng, tiến hành trong cùng điều kiện. Xác định độ đúng của phương pháp bằng cách so sánh giá trị trung bình của các lần định lượng của mỗi nồng độ với giá trị thực có trong mẫu. Độ đúng tại mỗi nồng độ phải nằm trong khoảng 85 - 115%.

- Độ chính xác trong ngày: Xác định độ lệch chuẩn tương đối (RSD) giữa các lần định lượng của mỗi nồng độ được phân tích trong cùng ngày. Giá trị RSD phải không quá 15%.

- Độ chính xác giữa ngày: Tương tự như khi xác định độ chính xác trong ngày. Tính RSD của kết quả định lượng cho mỗi mẫu QC trong ít nhất 3 ngày phân tích. RSD phải không quá 15%.

❖ *Độ tìm lại*

Tiến hành sắc ký các mẫu LQC, MQC và HQC theo qui trình đã xây dựng. Song song tiến hành định lượng với các mẫu chuẩn pha trong pha động có nồng độ tương ứng. Xác định độ tìm lại bằng cách so sánh kết quả định lượng metformin trong các mẫu QC có qua chiết tách so với nồng độ metformin trong mẫu chuẩn pha trong pha động.

Độ tìm lại cần không quá 110% và không thấp hơn 30%. RSD của giá trị độ tìm lại tại các nồng độ không quá 15% và độ tìm lại trung bình tại các nồng độ khác nhau không quá 15%.

❖ *Độ ổn định của mẫu thử:*

+ Độ ổn định của metformin trong huyết tương:

Xác định độ ổn định của metformin sau 3 chu kỳ đông - rã đông; trong quá trình xử lý mẫu và trong quá trình bảo quản dài ngày trên các mẫu LQC và HQC.

+ Độ ổn định sau ba chu kỳ đông- rã đông:

Bảo quản các mẫu ở các nhiệt độ -35°C trong 24 giờ, lấy ra để tan ở nhiệt độ phòng. Sau khi đã tan chảy hoàn toàn, để mẫu trở lại đông lạnh trong 12 - 24 giờ. Lập lại chu kỳ đông rã đông 2 lần nữa. Tiến hành phân tích mẫu sau lần rã đông thứ 3. Kết quả định lượng metformin có trong mẫu sau 3 chu kỳ đông - rã đông phải tương đương với lượng metformin có trong mẫu phân tích ngay sau khi rã đông.

+ Độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu:

So sánh nồng độ metformin có trong mẫu được chiết tách ngay sau khi rã đông và trong mẫu có nồng độ tương ứng được chiết tách sau khi rã đông và để ở nhiệt độ phòng thêm 4 giờ. Kết quả phải sai khác không có ý nghĩa thống kê.

+ Độ ổn định dài ngày:

Bảo quản mẫu trong điều kiện -35°C . Phân tích xác định nồng độ metformin trong các mẫu tại thời điểm ban đầu và sau 30 ngày bảo quản (là khoảng thời gian phù hợp để phân tích hết số mẫu huyết tương người tình nguyện). So sánh kết quả tại hai thời điểm này phải khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

3.3.2. Nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học của chế phẩm metformin sản xuất trong nước

3.3.2.1. Thiết kế nghiên cứu:

Thiết kế nghiên cứu ngẫu nhiên, đơn liều, chéo đôi, hai giai đoạn trên người tình nguyện.

Thiết kế nghiên cứu ngẫu nhiên:

- 18 người tình nguyện được mã hoá từ A đến T.
- Chia ngẫu nhiên 18 người tình nguyện thành 2 nhóm, nhóm 1 và nhóm 2.
- Sau khi có kết quả chia nhóm, lên danh sách mỗi nhóm theo mã người tình nguyện.

Thiết kế nghiên cứu chéo đôi, hai giai đoạn:

Mỗi người tình nguyện đều trải qua 2 giai đoạn, cách nhau 1 tuần, mỗi giai đoạn uống một trong hai thuốc sau:

- Viên nén metformin 850 mg (biệt dược Glucofine do Domesco sản xuất).
- Viên nén metformin 850 mg (biệt dược Glucophage do Merck Santé sản xuất).

Trình tự các giai đoạn thử nghiệm của các nhóm như sau:

Giai đoạn	I	Nghỉ giữa hai GD (1 tuần)	II
Nhóm 1	Glucofine 850 mg		Glucophage 850 mg
Nhóm 2	Glucophage 850 mg		Glucofine 850 mg

3.3.2.2. Cho người tình nguyện uống thuốc, lấy mẫu máu:

▪ Uống thuốc

- Người tình nguyện phải nhịn ăn từ 20h tối hôm trước ngày lấy mẫu.
- Ngày lấy mẫu, người tình nguyện được cho uống thuốc trong khoảng 6-7h sáng, uống thuốc với 200 ml nước tinh khiết đóng chai.
- Sau khi uống thuốc, người tình nguyện sẽ được cho uống khoảng 100ml dung dịch glucose 10% vào các thời điểm 0,5; 1,5; 2; 2,5; 3,5 và 5h.
- Người tình nguyện được uống nước tinh khiết đóng chai tùy theo nhu cầu (trừ trong khoảng 1h trước và 1h sau khi uống thuốc), được ăn trưa 5h sau và ăn tối 12h sau khi uống thuốc. Người tình nguyện được đi lại trong thời gian lấy mẫu, nhưng không được hoạt động thể lực mạnh.
- Trong suốt thời gian nghiên cứu, người tình nguyện không được dùng thêm bất cứ loại thuốc nào khác.
- Cho uống thuốc và giám sát việc uống thuốc là người của nhóm nghiên cứu.

▪ Lấy và xử lý mẫu máu:

- Lịch lấy mẫu máu: Dự kiến ban đầu, mỗi người tình nguyện được lấy máu 14 điểm tại các thời điểm trước khi uống (0 h) và 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 12.0 và 24.0 h sau khi uống metformin. Tuy nhiên sau khi khảo sát sơ bộ thấy AUC_{0-12} đạt trên 80% AUC_{0-inf} , chúng tôi quyết định chỉ lấy máu 13 thời điểm, kết thúc tại 12.0 h sau khi uống thuốc.
- Số lượng máu mỗi mẫu: 3 ml máu tĩnh mạch.
- Xử lý mẫu máu thu được: mẫu máu được chuyển vào ống nghiệm đã tráng heparin để chống đông. Trong vòng 15 phút sau khi lấy, mẫu được ly tâm trong 15 phút với tốc độ 6000 vòng/phút để tách huyết tương. Huyết tương tách ra cho vào ống nghiệm, nút kín, dán nhãn có mã hoá mẫu, bảo quản - 35°C cho đến khi định lượng.
- Việc khám lâm sàng, xét nghiệm, uống thuốc, lấy mẫu máu được thực hiện tại Bệnh viện Việt Nam – Cuba trong tháng 10 năm 2007: Lấy máu, theo dõi sức khoẻ người tình nguyện và xử trí cấp cứu các tình huống bất thường trong quá trình thử nghiệm do bác sĩ và y tá khoa Nội của bệnh viện đảm nhận. Các tác dụng bất lợi của thuốc (ADE) và các biện pháp xử trí cần thiết được ghi nhận. Người của nhóm nghiên cứu có trách nhiệm giám sát việc lấy mẫu và tiến hành xử lý mẫu máu sau khi lấy.

3.3.2.3. Phân tích định lượng nồng độ metformin bằng phương pháp HPLC

Sử dụng phương pháp định lượng metformin huyết tương đã được xây dựng và thẩm định để định lượng metformin trong các mẫu huyết tương của người tình nguyện. Phân tích mẫu được tiến hành ngay sau khi lấy đủ các mẫu, trong tháng 10-11 năm 2007.

3.3.2.4. Phân tích dược động học và đánh giá tương đương sinh học của viên Glucofine:

- Từ nồng độ đo được, xây dựng đường cong nồng độ - thời gian của mỗi chế phẩm.
- Xác định các thông số dược động học của mỗi dạng chế phẩm
 - + C_{max} - Nồng độ tối đa của metformin trong huyết tương
 - + T_{max} - Thời gian đạt C_{max} .
 - + AUC_{0-12} - Diện tích dưới đường cong nồng độ thời gian từ thời điểm 0 đến 12 giờ (thời điểm lấy mẫu máu cuối cùng), theo qui tắc hình thang:

$$AUC_{0-12} = \frac{C_1 \cdot t_1}{2} + \left(\sum_{i=2}^n \frac{(C_i + C_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i)}{2} \right)$$

+ AUC_{0-inf}: diện tích dưới đường cong nồng độ thời gian từ thời điểm 0 đến vô cùng, tính theo công thức:

$$AUC_{0-inf} = \frac{C_1 \cdot t_1}{2} + \left(\sum_{i=2}^t \frac{(C_i + C_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i)}{2} \right) + \frac{C_t}{\lambda_z}$$

$$+ \text{Thời gian bán thải } T_{1/2} = \frac{\ln 2}{\lambda_z}$$

(λ_z : hằng số tốc độ thải trừ)

Hai thông số C_{max} , T_{max} lấy trực tiếp từ số liệu của thực nghiệm. Các thông số còn lại được xác định nhờ phần mềm Kinetica 4.4.

- Đánh giá tương đương sinh học:

Thông qua so sánh các thông số dược động học chính là C_{max} , AUC₀₋₁₂, AUC_{0-inf} của thuốc thử với thuốc đối chiếu. Phân tích phương sai (ANOVA), xác định khoảng tin cậy (CI) 90% của sự sai khác giữa hai giá trị trung bình của hai chế phẩm nghiên cứu. Các thông số trên được chuyển logarith tự nhiên. Khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ giá trị trung bình các thông số dược động giữa viên Glucofine và Glucophage tính theo công thức sau:

$$CI_{Glucofine / Glucophage} = 100 \times e^{\mu_{Glucofine} - \mu_{Glucophage} \pm t_{(0,1;n)} \times \sqrt{2 \times S^2 / N}}$$

Với:

- μ là giá trị trung bình của thông số đã chuyển logarith.
- $t_{(0,1;n)}$ – tra từ bảng Student t-test với bậc tự do n và mức ý nghĩa 0,1.
- S – Căn bậc 2 của bình phương sai số trung bình thu được từ kết quả phân tích phương sai của thiết kế chéo đôi, đơn liều.
- N – Số người tình nguyện.

Kết luận chế phẩm đạt tương đương sinh học nếu khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ các giá trị trung bình của C_{max} , AUC₀₋₁₂, AUC_{0-inf} giữa 2 chế phẩm nằm trong giới hạn 80% – 125%.

3.3.2.5. Thông qua hội đồng đạo đức

Để đảm bảo vấn đề đạo đức trong nghiên cứu Y- sinh học, toàn bộ nội dung đề tài bao gồm đề cương nghiên cứu và các biểu mẫu liên quan đã được nhóm nghiên cứu và nhà tài trợ đệ trình lên hội đồng đạo đức theo đúng các qui định và hướng dẫn về GCP. Nghiên cứu được tiến hành sau khi đã được hội đồng đạo đức xem xét và chấp nhận ngày 20 tháng 10 năm 2006 (phụ lục 7).

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ BÀN LUẬN

4.1. XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH METFORMIN TRONG HUYẾT TƯƠNG

4.1.1. Xây dựng phương pháp phân tích metformin trong huyết tương

- *Xử lý mẫu*: chọn phương pháp tủa protein huyết tương. Các dung môi được nghiên cứu để tủa protein bao gồm:

- + Acid trichloroacetic 5%, tiêu chuẩn HPLC
- + Acetonitril tinh khiết, tiêu chuẩn HPLC

Nghiên cứu trên các dung môi thấy, acetonitril có khả năng kết tủa protein dưới dạng tủa bông, khi li tâm dễ dàng tách được dịch chiết.

Lấy 1 ml huyết tương, thêm 1,5 ml acetonitril, lắc bằng máy lắc trong 2 phút. Sau đó li tâm trong 15 phút, tốc độ 6000 vòng/phút. Dịch li tâm được lọc qua màng lọc 0,45 μm rồi được tiêm vào cột sắc ký.

- *Chương trình sắc ký*

- Xác định cột sắc ký:

Khảo sát các cột:

Cột sắc ký Zorbax SB-C18 (sử dụng phương pháp tạo cặp ion).

Cột CN (Zorbax SB-CN, Cột VertiSep UPS CN HPLC).

Kết quả: Dựa vào tính thuận tiện của phương pháp, thời gian lưu, hình dạng pic và khả năng tách của metformin chúng tôi lựa chọn cột VertiSep UPS CN HPLC (4,6x150mm, kích thước hạt 5 μm)

- Xác định pha động:

Sử dụng hệ pha động gồm đệm phosphat và acetonitril với pH đệm và tỷ lệ pha động khác nhau, chúng tôi lựa chọn được pha động là acetonitril:đệm phosphat pH 6,0 tỷ lệ 70:30. Hệ pha động này đảm bảo tách tốt metformin, hình dạng pic đẹp và thời gian lưu hợp lý (khoảng 9 phút). Nồng độ đệm chúng tôi lựa chọn là 0,05M dựa trên cơ sở các tham khảo các nghiên cứu trước đó [19], [34].

- Lựa chọn bước sóng phát hiện

Dựa trên các tài liệu đã công bố kết hợp với quét phổ hấp thụ tử ngoại, chúng tôi lựa chọn bước sóng phù hợp cho phương pháp định lượng là 234 nm.

- Xác định lưu lượng dòng:

Khảo sát sự thay đổi lưu lượng dòng từ 0,5-1,5 ml/phút, chúng tôi lựa chọn được lưu lượng dòng 1 ml/phút để pic tách tốt và thời gian lưu hợp lý (khoảng 9 phút).

Từ các kết quả nghiên cứu trên, chúng tôi đã lựa chọn được các điều kiện sắc ký như sau:

- Pha tĩnh: Cột VertiSep UPS CN HPLC (4,6x150mm, kích thước hạt 5 μ m).
- Pha động: ACN : Đệm phosphat pH 6,0 (0,05M) = 70:30
- Detector UV bước sóng 234 nm
- Thể tích tiêm mẫu: 60 μ l
- Lưu lượng dòng: 1ml/phút
- Thời gian phân tích cho 1 mẫu là: 12 phút

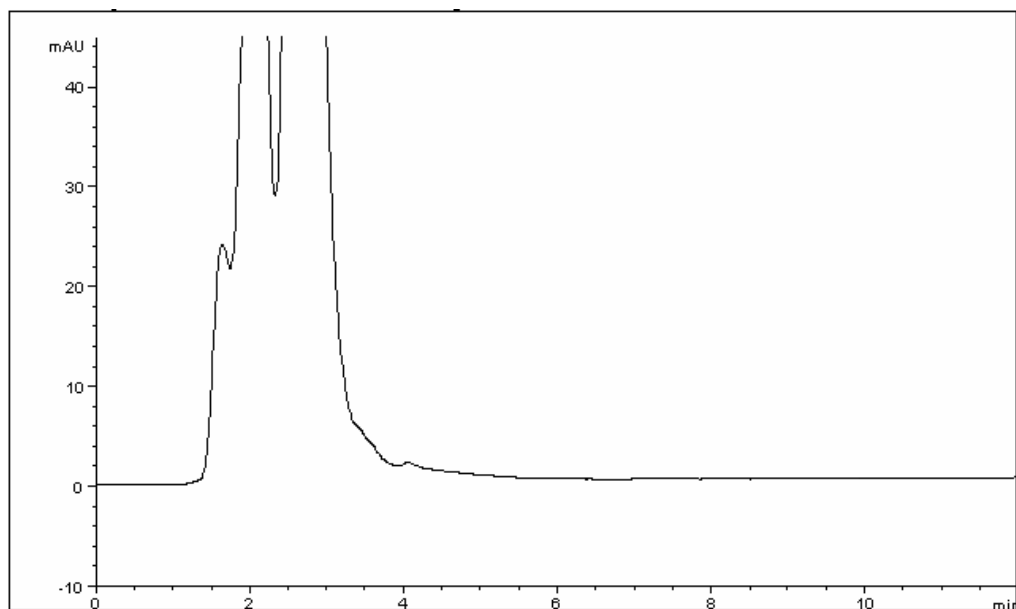
Chương trình sắc ký trên cho phép tách pic metformin ra khỏi các pic tạp huyết tương, pic thu được có hình dáng cân đối, nhọn. Thời gian phân tích 12 phút/mẫu là thuận lợi để có thể định lượng nhiều mẫu trong cùng một ngày, phù hợp cho nghiên cứu tương đương sinh học có số lượng mẫu cần phân tích rất lớn.

4.1.2. Thẩm định phương pháp phân tích Metformin trong huyết tương

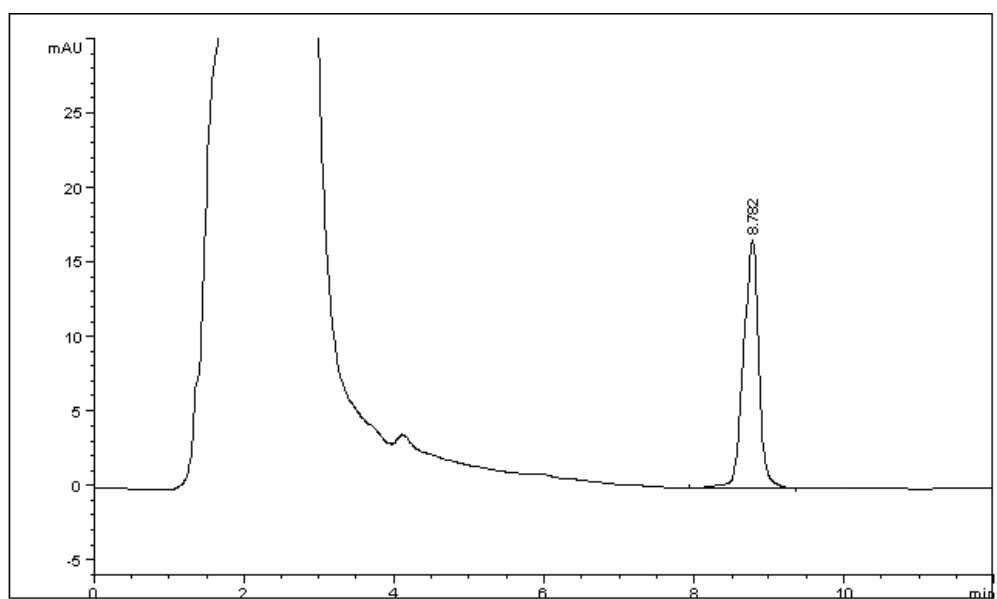
Các tiêu chuẩn theo FDA được thẩm định bao gồm:

4.1.2.1. Độ chọn lọc.

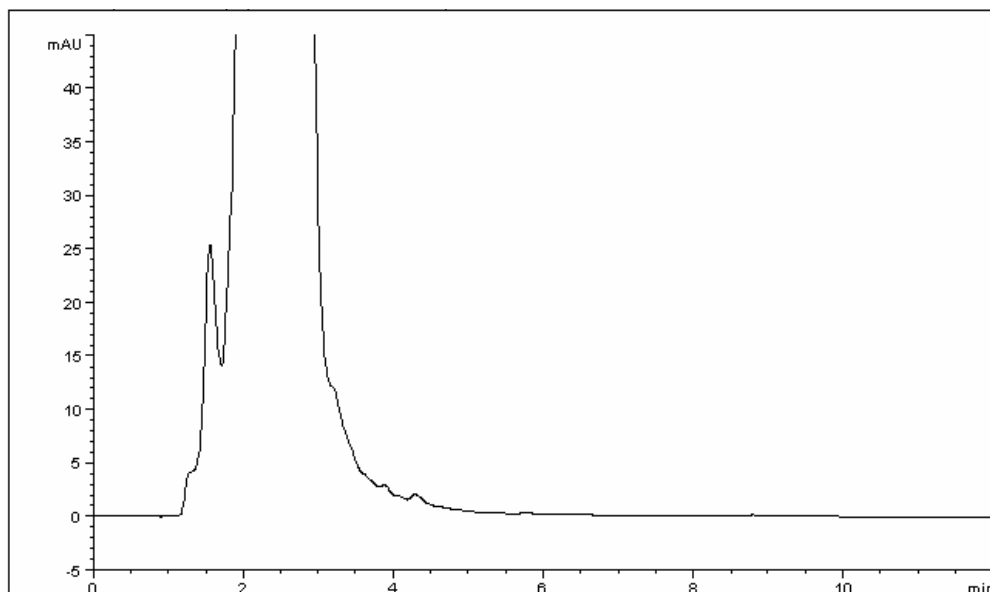
Phân tích các mẫu trắng, mẫu chuẩn (nồng độ 2400 ng/ml) và mẫu thử được chuẩn bị như trên. Kết quả phân tích cho kết quả các sắc đồ như sau:



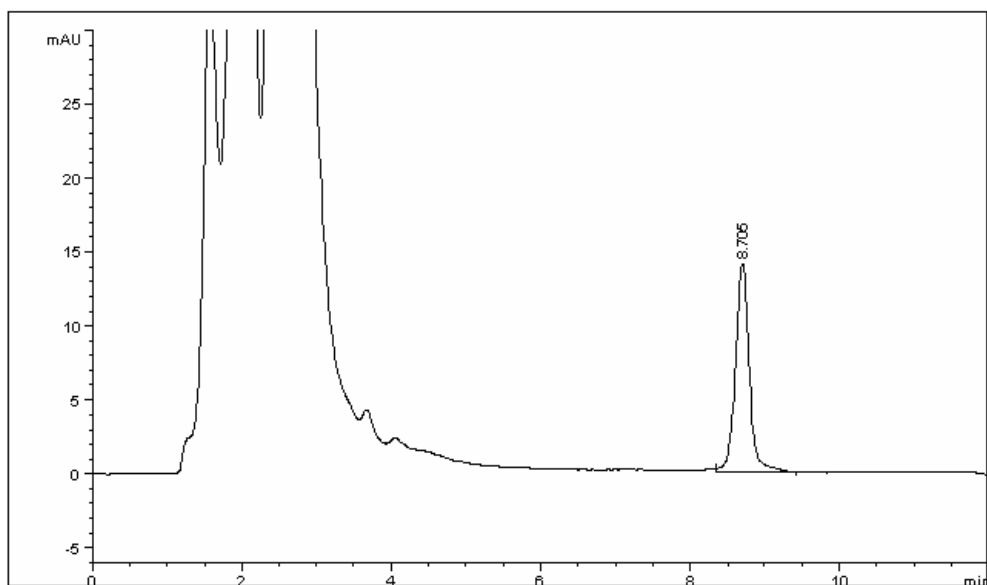
Hình 4.1: Sắc đồ mẫu huyết tương trắng.



Hình 4.2: Sắc đồ mẫu huyết tương có metformin (với nồng độ 2400 ng/ml)



Hình 4.3: Sắc đồ mẫu huyết tương người tình nguyện trước khi uống thuốc



Hình 4.4: Sắc đồ mẫu huyết tương người tình nguyện tại thời điểm 4 giờ sau khi uống thuốc(1639ng/ml).

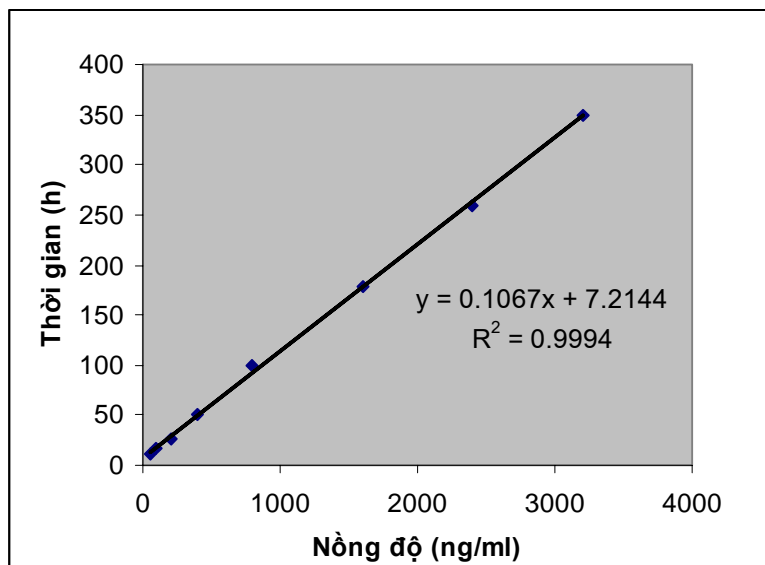
Trên sắc đồ mẫu chuẩn (hình 4.2) xuất hiện một pic có thời gian lưu khoảng 8,8 phút, xác định là metformin. Mẫu trắng không có pic tại vị trí này (hình 4.1). Sắc đồ mẫu huyết tương của người tình nguyện trước khi uống thuốc tại thời điểm khoảng 8 và 9 phút không xuất hiện các pic trùng thời gian lưu với pic metformin (hình 4.3), nhưng sau khi uống thuốc (hình 4.4) thấy có xuất hiện pic tại thời điểm 8,7 phút. Thời gian lưu của pic xuất hiện trong mẫu thử trùng với thời gian lưu của metformin trong mẫu chuẩn. Như vậy phương pháp phân tích đã đảm bảo nhận diện, phân biệt được metformin và không bị ảnh hưởng bởi các tạp chất có trong huyết tương, có độ chọn lọc- đặc hiệu tốt.

4.1.2.2. Độ tuyến tính:

Phân tích các mẫu chuẩn metformin trong huyết tương có nồng độ 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 2400, 3200 ng/ml theo quy trình đã xây dựng. Xác định sự tương quan giữa nồng độ metformin trong huyết tương và tỷ lệ diện tích pic metformin đo được. Kết quả như sau:

Bảng 4.1: Sự phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ metformin chuẩn pha trong huyết tương

Nồng độ thực (ng/ml)	50	100	200	400	800	1600	2400	3200
Diện tích (mAU.s)	11,44	16,58	25,80	50,22	99,50	178,59	259,72	349,41



Hình 4.5: Sự phụ thuộc giữa diện tích pic vào nồng độ dung dịch metformin

Kết quả cho thấy nồng độ của metformin trong huyết tương có tương quan tuyến tính với đáp ứng (diện tích pic) trong khoảng từ 50 - 3200 ng/ml (đường chuẩn có hệ số tương quan $R=0,9997$). Phương trình hồi quy là $y = 0,1067x + 7,2144$.

4.1.2.3. Giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Phân tích các mẫu trắng và mẫu chuẩn có nồng độ thấp nhất trong khoảng tuyến tính (50 ng/ml). Xác định đáp ứng pic của mẫu chuẩn, mẫu trắng. Tính nồng độ metformin trong mẫu chuẩn từ diện tích pic metformin và đường chuẩn, từ đó xác định độ đúng bằng cách so sánh với giá trị thực có trong mẫu. Kết quả xác định giá trị LLOQ của phương pháp được trình bày trong bảng 4.2.

Bảng 4.2. Kết quả xác định giới hạn định lượng dưới (LLOQ)

Mẫu	STT	Đáp ứng của mẫu chuẩn so với mẫu trắng	Hàm lượng (ng/ml)	Độ đúng so với nồng độ thực (%)	Thống kê
LLOQ (50 ng/ml)	1	> 5 lần	50,50	101,00	T. Bình = 52,6 SD = 6,07 RSD = 11,53
	2	> 5 lần	43,11	86,22	
	3	> 5 lần	57,99	115,98	
	4	> 5 lần	56,39	112,78	
	5	> 5 lần	49,16	98,32	
	6	> 5 lần	58,45	116,90	

Kết quả trong bảng trên cho thấy rằng đáp ứng của mẫu chuẩn tại khoảng thời gian lưu của metformin (nồng độ 50 ng/mL) cao gấp trên 5 lần đáp ứng mẫu trắng. Tính nồng độ metformin trong mẫu chuẩn dựa vào đường chuẩn làm trong ngày, thấy độ đúng so với nồng độ thực là từ 86 tới 117% và độ lặp lại sau 6 lần phân tích RSD là 11,53%. Như vậy mẫu chuẩn chứa metformin có nồng độ 50 ng/ml đáp ứng yêu cầu là giới hạn định lượng dưới của phương pháp phân tích dịch sinh học. Giá trị LLOQ của phương pháp được xác định là 50 ng/ml.

4.1.2.4. Độ đúng, độ chính xác

❖ *Độ đúng, độ chính xác trong ngày*

Tiến hành phân tích với các mẫu LQC (200ng/ml), MQC (1600ng/ml) và HQC (2400ng/ml). Mỗi loại mẫu QC làm 6 mẫu độc lập cùng nồng độ, thu được kết quả như sau:

Bảng 4.3: Kết quả khảo sát độ đúng, độ chính xác trong ngày

Mẫu	STT	Hàm lượng	Độ đúng so với nồng độ thực(%)	Thống kê
LQC (200 ng/ml)	1	204,14	102,07	T. Bình = 102,27% SD = 1,78 RSD = 1,74%
	2	201,02	100,51	
	3	204,17	102,09	
	4	200,92	100,46	
	5	210,23	105,12	
	6	206,76	103,38	
MQC (1600 ng/ml)	1	1620,18	101,26	T. Bình = 107,49% SD = 3,32 RSD = 3,09%
	2	1713,09	107,07	
	3	1724,76	107,80	
	4	1754,49	109,66	
	5	1735,43	108,46	
	6	1771,24	110,70	
HQC (2400 ng/ml)	1	2774,98	115,02	T. Bình = 110,25% SD = 3,26 RSD = 2,95%
	2	2679,95	111,66	
	3	2604,57	108,52	
	4	2551,76	106,32	
	5	2672,26	111,34	
	6	2606,65	108,61	

Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp định lượng có độ đúng tốt (từ 102,27-110,35%), độ lệch nằm trong giới hạn cho phép ($\pm 15\%$); độ lặp lại trong ngày với giá trị RSD nhỏ (1,74-3,09%), đáp ứng yêu cầu về độ đúng, chính xác của phương pháp phân tích trong dịch sinh học.

❖ **Độ đúng và độ chính xác khác ngày**

Tiến hành phân tích các LQC, MQC, HQC được chuẩn bị tương tự như xác định độ đúng, độ chính xác trong ngày theo phương pháp đã xây dựng, mỗi nồng độ làm 6 mẫu độc lập, trong 5 ngày liên tiếp. Xác định nồng độ metformin trong các

mẫu QC dựa vào đường chuẩn tiến hành song song trong từng ngày. Kết quả xác định độ đúng, độ chính xác khác ngày của phương pháp được trình bày ở bảng sau:

Bảng 4.4: Kết quả khảo sát độ đúng, độ chính xác khác ngày

	LQC (200ng/ml)		MQC(1600ng/ml)		HQC(2400ng/ml)	
	Hàm lượng (ng/ml)	Độ đúng (%)	Hàm lượng (ng/ml)	Độ đúng (%)	Hàm lượng (ng/ml)	Độ đúng (%)
Trung bình	220,06	110,03	1756,83	109,80	2716,00	113,17
SD	15,78	7,89	55,97	3,50	115,79	4,82
RSD%		7,17		3,19		4,26

Kết quả thực nghiệm cho thấy ở cả ba nồng độ (200, 1600, 2400 ng/ml), phương pháp đều cho độ đúng nằm trong khoảng giới hạn cho phép (85-115%) và độ chính xác khác ngày với giá trị RSD nhỏ hơn 10% (3,19-7,17%) chứng tỏ phương pháp được nghiên cứu có độ đúng, độ chính xác cao, đáp ứng yêu cầu đối với phương pháp phân tích trong dịch sinh học.

4.1.2.4. Độ tìm lại

Chuẩn bị các mẫu LQC, MQC, HQC và các mẫu chuẩn có nồng độ tương ứng là 200, 1600, và 2400 ng/ml pha trong pha động. Xử lý các mẫu metformin pha trong huyết tương theo phương pháp đã xây dựng và sắc ký xác định nồng độ metformin. Song song định lượng các mẫu chuẩn metformin pha trong pha động. Xác định độ tìm lại bằng cách so sánh kết quả lượng metformin của mẫu QC có qua chiết tách và mẫu chuẩn không qua chiết tách (pha trong pha động). Kết quả được trình bày trong bảng sau.

Bảng 4.5. Kết quả xác định độ tìm lại

STT	Mẫu LQC(200ng/ml)			Mẫu MQC(1600ng/ml)			Mẫu HQC(2400ng/ml)		
	MET/ HT	MET/ PD	Độ tìm lại (%)	MET/ HT	MET/ PD	Độ tìm lại (%)	MET/ HT	MET/ PD	Độ tìm lại (%)
1	19,7	18,6	105,9	164,5	173,8	94,6	239	262,2	91,2
2	19,2	19,8	97,0	165,1	166,4	99,2	271,4	261,4	103,8
3	19,9	20,9	95,2	155,8	176,6	88,2	284,3	266,9	106,5
4	19,8	20,7	95,7	154,8	171,3	90,4	268,4	269,1	99,7
5	19,6	21	93,3	157,1	173,5	90,5	258,8	262,4	98,6
6	20,6	21,6	95,4	156	168,2	92,7	250,1	255,8	97,8
Trung bình			97,1			92,6			99,6
SD			4,5			3,9			5,3
RSD (%)			4,6			4,2			5,3

Kết quả cho thấy ở cả ba nồng độ 200, 1600, và 2400 ng/ml, phương pháp đều cho độ tìm lại cao (từ 92,6 tới 99,6%); độ lặp lại tốt (RSD nhỏ hơn 10%), và độ tìm lại tại các nồng độ chênh lệch nhau dưới 10%. Do vậy, phương pháp xử lý mẫu đã xây dựng là phù hợp để chiết tách metformin từ huyết tương người tình nguyện.

4.1.2.5. Độ ổn định của mẫu trong huyết tương

❖ Độ ổn định sau 3 chu kỳ đông – rã đông

Tiến hành pha các mẫu LQC và HQC sau đó xử lý và chạy sắc ký theo điều kiện đã chọn. Xác định nồng độ metformin trong các mẫu từ đường chuẩn tiến hành song song trong ngày. Kết quả xác định nồng độ metformin trong các mẫu LQC, HQC sau 3 chu kỳ đông – rã đông và các mẫu tiến hành phân tích ngay sau khi rã đông được trình bày trong bảng 4.6

**Bảng 4.6: Kết quả khảo sát độ ổn định
sau 3 chu kì đông-rã đông của huyết tương**

Giai đoạn	STT	Kết quả định lượng MET (ng/ml)			
		Mẫu LQC(200ng/ml)		Mẫu HQC(2400ng/ml)	
		Nồng độ (ng/ml)	Thống kê	Nồng độ (ng/ml)	Thống kê
Phân tích ngay ban đầu	1	212,27	TB = 218,19 SD = 7,29	2507,79	TB = 2539,96 SD = 35,09
	2	227,06		2588,68	
	3	221,26		2523,09	
	4	212,16		2540,27	
Sau 3 chu kỳ đông - rã đông	1	205,39	TB = 206,78 SD = 7,80 P = 0,076	2389,17	TB = 2520,25 SD = 88,51 P = 0,693
	2	217,71		2580,38	
	3	199,24		2565,47	
	4	204,76		2545,96	

Kết quả $P > 0,05$ cho thấy mẫu huyết tương ổn định qua 3 chu kỳ đông – rã đông.

❖ **Độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu**

Đánh giá độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu trên các mẫu LQC, HQC. So sánh nồng độ metformin trong các mẫu LQC và HQC xử lý mẫu theo quy trình lựa chọn ngay sau khi tan chảy hoàn toàn ở nhiệt độ phòng và các mẫu LQC và HQC để thêm 4 giờ sau khi tan chảy hoàn toàn ở nhiệt độ phòng. Kết quả nghiên cứu trình bày ở bảng 4.7

Bảng 4.7: Kết quả khảo sát độ ổn định trong quá trình xử lý mẫu

Giai đoạn	STT	Kết quả định lượng MET (ng/ml)			
		Mẫu LQC(200ng/ml)		Mẫu HQC(2400ng/ml)	
		Nồng độ	Thống kê	Nồng độ	Thống kê
Mẫu được xử lý ngay	1	212,27	TB = 218,19 SD = 7,29	2507,79	TB = 2539,96 SD = 35,09
	2	227,06		2588,68	
	3	221,26		2523,09	
	4	212,16		2540,27	
Mẫu được xử lý sau 4 giờ sau khi tan chảy ở nhiệt độ phòng	1	231,37	TB = 231,33 SD = 17,21 P = 0,209	2582,72	TB = 2551,97 SD = 47,22 P = 0,697
	2	255,23		2588,4	
	3	215,47		2551,24	
	4	223,25		2485,52	

Kết quả cho thấy nồng độ metformin trong mẫu LQC và HQC được xử lý mẫu ngay theo quy trình so với nồng độ metformin trong mẫu LQC và HQC được xử lý mẫu sau 4 giờ sau khi tan chảy ở nhiệt độ phòng khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Điều này cho thấy metformin ổn định trong quá trình xử lý mẫu.

❖ **Độ ổn định dài ngày**

Đánh giá độ ổn định dài ngày của metformin trong huyết tương trên các mẫu LQC và HQC tại thời điểm ban đầu và sau 30 ngày bảo quản ở -35°C theo quy trình đã xây dựng. Kết quả thu được trong bảng 4.8

Bảng 4.8: Kết quả khảo sát độ ổn định dài ngày

Giai đoạn	STT	Kết quả định lượng metformin (ng/ml)*			
		Mẫu LQC(200ng/ml)		Mẫu HQC(2400ng/ml)	
Mẫu ban đầu	1	212,27	TB = 218,19 SD = 7,29	2507,79	TB = 2539,96 SD = 35,09
	2	227,06		2588,68	
	3	221,26		2523,09	
	4	212,16		2540,27	
Sau 30 ngày	1	215,35	TB = 213,17 SD = 5,78 P = 0,321	2512,06	TB = 2528,74 SD = 35,85 P = 0,672
	2	205,64		2487,87	
	3	219,33		2546,31	
	4	212,34		2568,72	

(*): Nồng độ được xác định từ đường chuẩn mỗi ngày

Kết quả cho thấy nồng độ metformin trong các mẫu huyết tương LQC và HQC bảo quản ở -35°C sau 30 ngày so với nồng độ metformin trong mẫu mới pha khác biệt không có ý nghĩa thống kê ($P > 0,05$). Như vậy metformin ổn định trong huyết tương trong 30 ngày ở điều kiện bảo quản - 35°C .

Nhận xét chung

Kết quả thẩm định độ đặc hiệu- chọn lọc, độ đúng, độ lặp lại, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng dưới, độ tìm lại và độ ổn định cho thấy phương pháp đã xây dựng đáp ứng các yêu cầu của một phương pháp phân tích trong dịch sinh học. Phương pháp có thể áp dụng để định lượng metformin trong máu người tình nguyện trong các nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học của các chế phẩm chứa metformin.

4.2. ĐÁNH GIÁ TƯƠNG ĐƯƠNG SINH HỌC TRÊN NGƯỜI BÌNH NGUYÊN KHOẺ MẠNH

Trong phần này, chúng tôi cho người tình nguyện uống thuốc và lấy máu theo quy định của nghiên cứu, sau đó tiến hành:

- Định lượng nồng độ metformin trong huyết tương mỗi người tình nguyện tại 13 thời điểm lấy mẫu theo phương pháp vừa xây dựng.
- Xác định các thông số dược động học của từng cá thể: C_{max} , T_{max} , $T_{1/2}$, AUC_{0-12} , AUC_{0-inf} .
- Phân tích các số liệu thu được, đánh giá tương đương sinh học.

4.2.1. Đặc điểm người tình nguyện trong mẫu nghiên cứu

Bảng 4.9. Một số chỉ số của 18 người tình nguyện

Đặc điểm	Trung bình	SD	Phạm vi
Cân nặng (kg)	57,00	2,40	55 - 64
Chiều cao (cm)	1,67	0,03	1,60 - 1,72
Tuổi (năm)	21,61	0,98	19 - 24
BMI	20,50	0,90	19,61- 22,23

Nhận xét:

Tất cả 18 người tình nguyện được chọn đều là nam giới, có các chỉ số huyết học, sinh hoá và lâm sàng đều trong giới hạn bình thường; có cân nặng và chiều cao trung bình của người Việt nam với BMI nằm trong khoảng người bình thường theo tiêu chuẩn của WHO và tiêu chuẩn dành cho người châu Á (IDI&WPRO) (18,5 – 22,5).

4.2.2. Nồng độ metformin trong huyết tương

Mã hoá và trình tự thử của từng người tình nguyện được trình bày ở phụ lục 3.

Như đã trình bày ở phần 3.3.2.2, sau khi khảo sát sơ bộ thấy AUC_{0-12} đạt trên 80% AUC_{0-inf} , chúng tôi quyết định chỉ lấy máu 13 thời điểm, kết thúc tại 12 h sau khi uống thuốc.

Nồng độ metformin trong huyết tương người tình nguyện khi dùng chế phẩm thử (Glucofine) được trình bày trong bảng 4.10 và của người tình nguyện khi dùng chế phẩm đối chứng (Glucophage) được trình bày trong bảng 4.11. Hình 4.8 là đồ thị biểu diễn nồng độ thuốc theo thời gian của 2 chế phẩm nghiên cứu.

**Bảng 4.10: Nồng độ thuốc trong huyết tương (ng/ml) người tình nguyện
khi dùng chế phẩm thử (Glucosfine)**

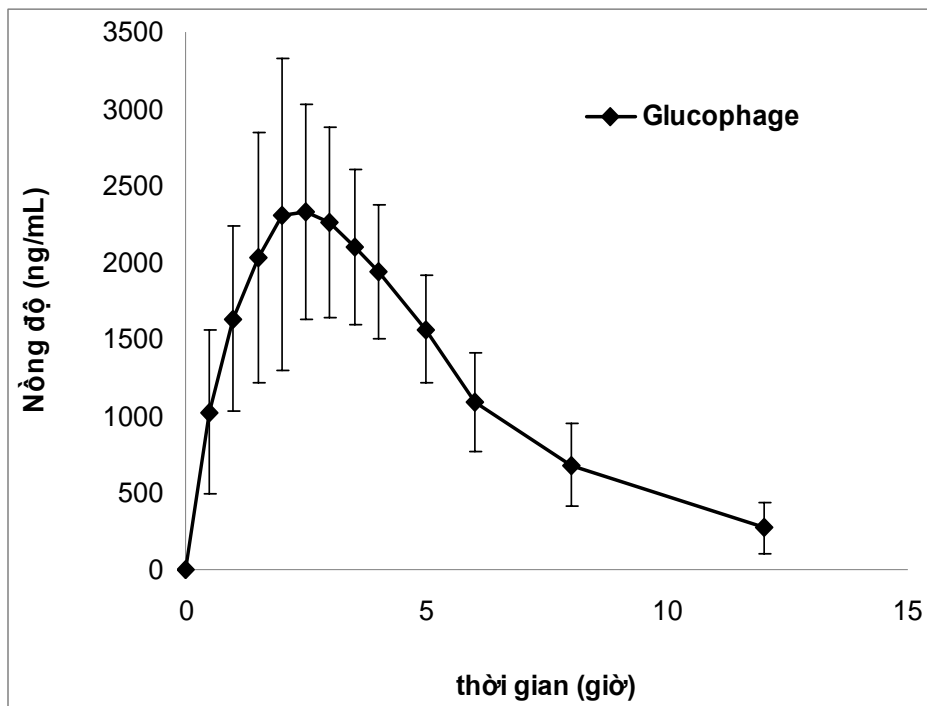
Mã	Trình tự thử	Thời điểm lấy mẫu (h)												
		0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8	12
A	T - R	0	3597	-	4020	3670	3135	2469	2064	1826	1305	938	531	185
B	R - T	0	899	826	1599	2121	-	2237	1759	1557	1305	991	578	228
C	R - T	0	641	1703	2135	2765	2858	2574	2188	1862	-	1609	1027	535
D	R - T	0	-	1554	1533	1749	1653	1697	1625	1509	1153	856	543	185
E	T - R	0	500	928	1463	1744	1917	2208	2230	1909	1538	1408	975	209
F	T - R	0	431	1118	1530	1989	2575	2793	3294	3166	2237	1825	940	460
G	R - T	0	1343	1823	2112	2094	2390	2677	3381	2764	2203	1564	839	245
H	T - R	0	1518	1806	1846	2112	2404	2183	2136	2085	1589	1062	666	179
K	R - T	0	1259	1791	2061	2474	2704	2545	2568	1735	1513	1018	612	287
L	T - R	0	1033	1268	1227	1301	1411	1432	1227	1263	985	868	570	254
M	R - T	0	674	1359	1602	1870	2157	2135	1844	1639	1221	857	498	191
N	T - R	0	1149	1863	2200	2526	2487	2252	1900	1831	1433	1122	647	277
O	R - T	0	414	1456	2375	2369	2705	2820	2801	2708	2239	1712	926	327
P	T - R	0	561	868	1281	1493	1601	1638	1720	1956	1930	1094	699	200
Q	R - T	0	794	1114	1134	1195	1412	1490	1399	1418	1078	731	490	188
R	R - T	0	780	1198	1362	1399	1383	1341	1571	1346	998	807	494	209
S	T - R	0	827	1482	1987	2450	2900	3065	2708	2501	2248	1426	783	376
T	T - R	0	1838	2192	2143	2754	2754	2452	2229	1872	1439	975	700	274
TB		0	1074	1432	1867	2115	2261	2223	2147	1941	1554	1159	695	267
SD		0	763	396	657	617	586	515	608	525	452	340	178	101
CV%		NA	71	28	35	29	26	23	28	27	29	29	26	38

Ghi chú : (-) mẫu máu bị hỏng trong quá trình lấy máu, không có mẫu để xác định nồng độ

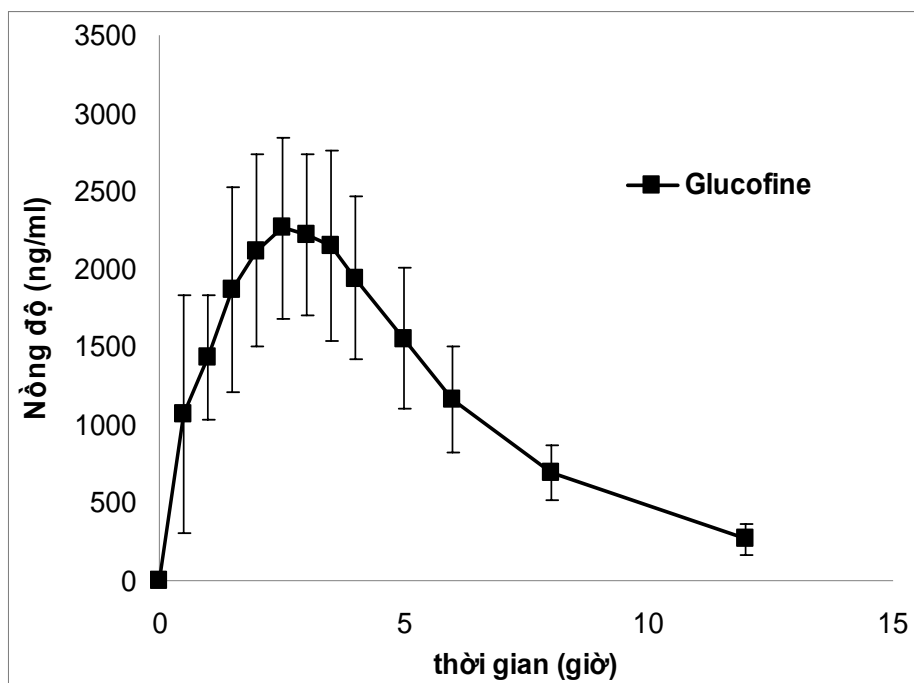
**Bảng 4.11: Nồng độ thuốc trong huyết tương (ng/ml) người tình nguyện
khi dùng thuốc đối chứng (Glucophage)**

Mã	Trình tự thử	Thời điểm lấy mẫu (h)												
		0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	5	6	8	12
A	T - R	0	1624	3155	3541	4402	3680	3118	2590	2225	1492	1004	499	128
B	R - T	0	652	1429	2014	2457	2840	2732	2496	2270	1751	1201	576	213
C	R - T	0	676	1707	1882	1887	2248	2151	1960	1847	1493	1091	660	199
D	R - T	0	1252	1640	1520	1675	1982	2074	2034	1795	1440	986	660	220
E	T - R	0	2050	-	2356	2957	2928	2661	2656	2431	1787	1073	592	155
F	T - R	0	1994	2751	4311	4720	3291	3469	2966	2450	1754	1016	475	102
G	R - T	0	73	1059	1209	1345	1534	1455	1577	1392	1209	788	529	185
H	T - R	0	727	1259	1658	1966	2527	2630	1982	1893	1505	1198	796	298
K	R - T	0	1220	1574	1774	1804	1491	1279	1128	1088	959	573	393	223
L	T - R	0	1291	1291	1320	1427	1429	1661	1783	1745	1228	941	545	243
M	R - T	0	149	1145	1488	2216	2613	2289	1978	1979	-	990	721	236
N	T - R	0	1170	1951	2592	3212	3255	2894	2836	2746	2333	1820	1239	766
O	R - T	0	1081	1560	1595	-	1959	1840	1675	1719	1632	1108	701	229
P	T - R	0	631	870	1328	1444	1924	2101	2363	2286	2173	1884	1453	629
Q	R - T	0	690	1105	1831	1728	1672	1690	1577	1412	1210	774	393	237
R	R - T	0	1004	1507	1554	1404	1400	1454	1609	1492	1307	887	582	264
S	T - R	0	1080	1493	1817	1856	2444	2463	2468	2308	1793	1168	805	353
T	T - R	0	1122	2274	2746	2804	2660	2661	2159	1916	1555	1039	667	267
TB		0	1027	1634	2030	2312	2327	2257	2102	1944	1566	1086	683	275
SD		0	533	605	818	1015	700	619	502	435	351	321	271	166
CV%		NA	52	37	40	44	30	27	24	22	22	30	40	60

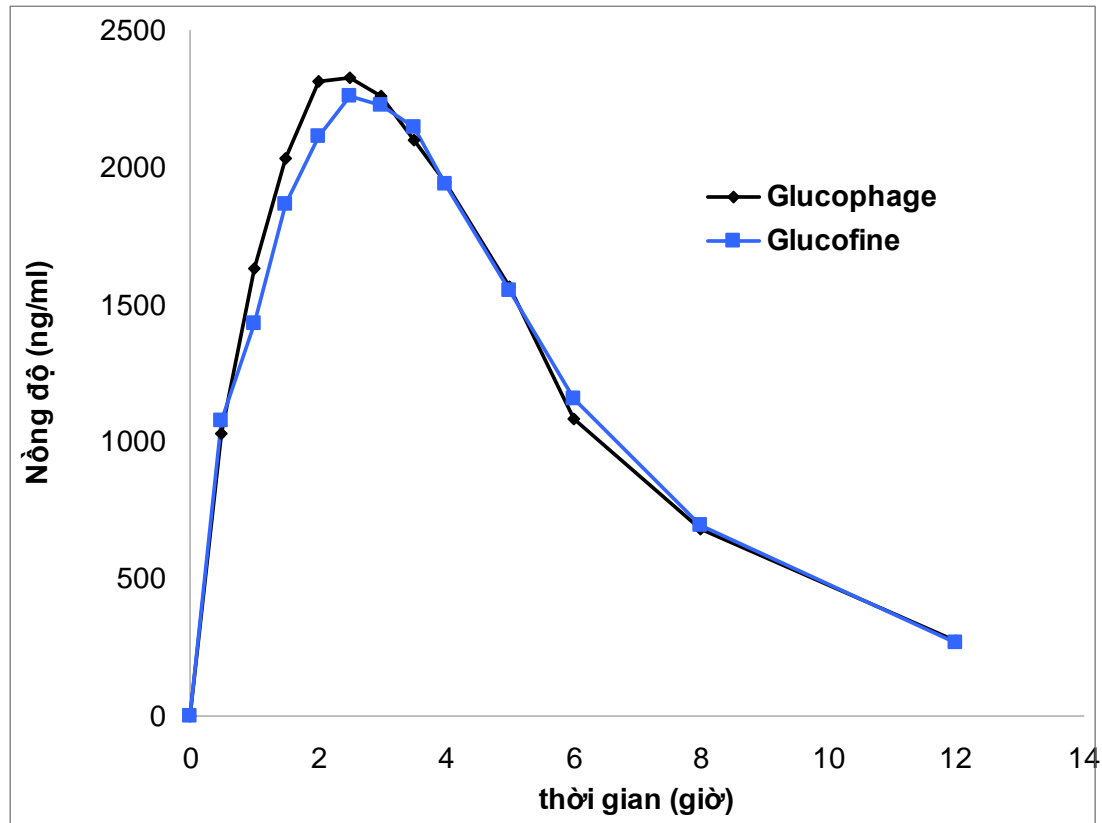
Ghi chú : (-) mẫu máu bị hỏng trong quá trình lấy máu, không có mẫu để xác định nồng độ



Hình 4.6: Đồ thị biểu diễn nồng độ metformin theo thời gian của Glucophage (*trung bình \pm độ lệch chuẩn*)



Hình 4.7: Đồ thị biểu diễn nồng độ metformin theo thời gian của Glucosfine (*trung bình \pm độ lệch chuẩn*)



Hình 4.8: Đồ thị biểu diễn nồng độ metformin theo thời gian của 2 chế phẩm nghiên cứu

4.2.3. Các thông số dược động học của 2 chế phẩm nghiên cứu

Từ nồng độ metformin trong huyết tương thu được, xác định được các thông số dược động học của từng cá thể: C_{max} , T_{max} được lấy trực tiếp từ số liệu thực nghiệm, xử lý bằng phần mềm Kinetica 4.4 thu được các thông số AUC_{0-12} , AUC_{0-inf} , $T_{1/2}$. Kết quả được trình bày trong bảng 4.12. và 4.13.

**Bảng 4.12: Các thông số dược động học
của người tình nguyện khi dùng thuốc thử (Glucofine)**

Mã	Trình tự thử thuốc	Thông số DDH						
		C _{max} (ng/ml)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₁₂ (ng.h/ml)	AUC _{0-inf} (ng.h/ml)	AUC ₀₋₁₂ /AUC _{0-inf}	λ _z (h ⁻¹)	T _{1/2} (h)
A	T - R	4020	1,5	17228	17910	96	0,27	2,6
B	R - T	2237	3,0	11798	12729	93	0,24	2,8
C	R - T	2858	2,5	16967	19878	85	0,18	3,8
D	R - T	1749	2,0	10696	11411	94	0,26	2,7
E	T - R	2230	3,5	13505	14181	95	0,33	2,1
F	T - R	3294	3,5	17709	19470	91	0,24	2,9
G	R - T	3381	3,5	17193	17985	96	0,31	2,2
H	T - R	2404	2,5	13836	14436	96	0,30	2,3
K	R - T	2704	2,5	14304	15659	91	0,21	3,3
L	T - R	1432	3,0	9788	11028	89	0,20	3,4
M	R - T	2157	2,5	11280	12041	94	0,25	2,8
N	T - R	2526	2,0	14008	15164	92	0,23	3,0
O	R - T	2820	3,0	17437	18603	94	0,28	2,5
P	T - R	1956	4,0	11844	12558	94	0,29	2,4
Q	R - T	1490	3,0	9223	10056	92	0,23	3,0
R	R - T	1571	3,5	9515	10438	91	0,22	3,1
S	T - R	3065	3,0	16875	18313	92	0,24	2,9
T	T - R	2754	2,0	14959	16020	93	0,25	2,8
TB		2480	2,8	13787	14882	93	0,25	2,8
SD		708	0,7	2992	3264	3	0,04	0,4

CV%	29	24	22	22	3	15	15,5
-----	----	----	----	----	---	----	------

**Bảng 4.13: Các thông số dược động học của người tình nguyện
khi dùng thuốc đối chứng (Glucophage)**

Mã	Trình tự thử thuốc	Thông số ĐDH						
		C _{max} (ng/ml)	T _{max} (h)	AUC ₀₋₁₂ (ng.h/ml)	AUC _{0-inf} (ng.h/ml)	AUC ₀₋₁₂ /AUC _{0-inf}	λz (h ⁻¹)	T _{1/2} (h)
A	T - R	4402	2,0	17197	17569	98	0,34	2,0
B	R - T	2840	2,5	14494	15181	95	0,30	2,3
C	R - T	2248	2,5	12914	13620	95	0,29	2,4
D	R - T	2074	3,0	12572	13422	94	0,26	2,7
E	T - R	2957	2,0	15926	16409	97	0,32	2,1
F	T - R	4720	2,0	18162	18428	99	0,38	1,8
G	R - T	1577	3,5	9364	10100	93	0,25	2,7
H	T - R	2630	3,0	13871	15193	91	0,23	3,0
K	R - T	1804	2,0	9329	10748	87	0,16	4,5
L	T - R	1783	3,5	11032	12053	92	0,23	3,0
M	R - T	2613	2,5	12720	13682	93	0,25	2,8
N	T - R	3255	2,5	21196	25828	82	0,16	4,4
O	R - T	1959	2,5	12666	13542	94	0,27	2,6
P	T - R	2363	3,5	17411	21075	83	0,18	3,9
Q	R - T	1831	1,5	10140	11047	92	0,23	3,0
R	R - T	1609	3,5	10876	12182	89	0,20	3,4
S	T - R	2468	3,5	15029	16800	89	0,20	3,5
T	T - R	2804	2,0	15121	16301	93	0,23	3,1

TB	2552	2,6	13890	15177	92	0,25	3,0
SD	880	0,7	3258	3922	5	0,06	0,7
CV%	34	25	23	26	5	25	25,3

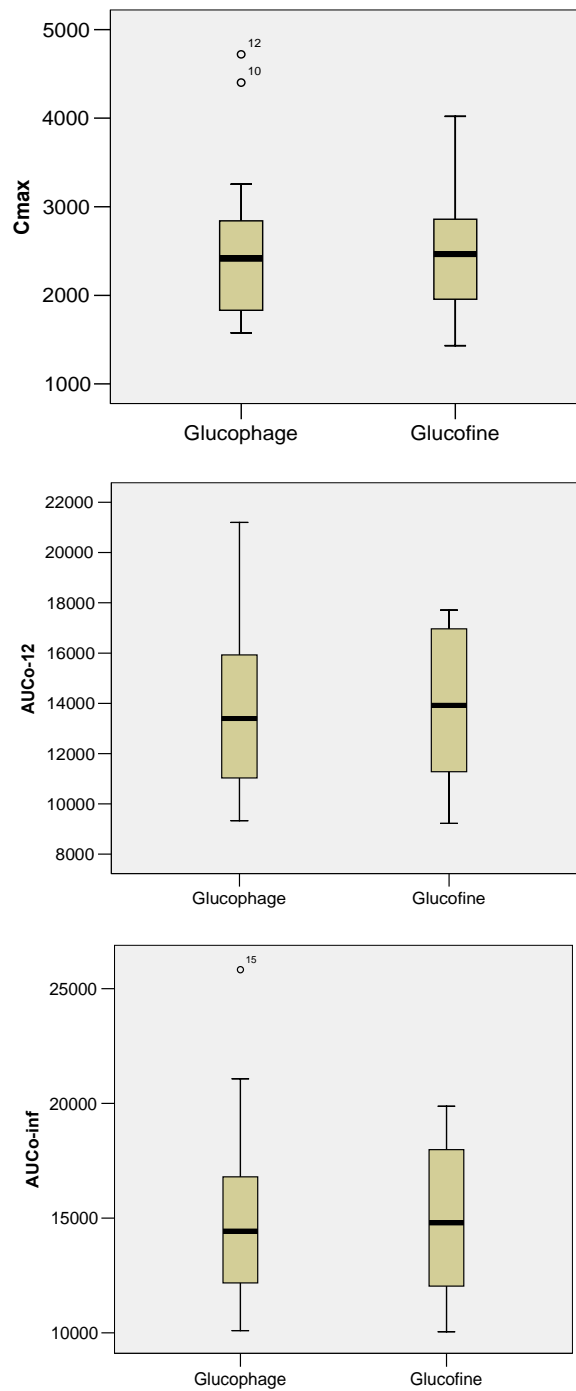
Từ kết quả trong bảng 4.12 và 4.13 cho thấy:

- Viên thử Glucofine khi dùng ở liều đơn 850 mg có nồng độ metformin đạt cực đại trong huyết tương C_{max} là 2480 ng/ml (SD= 708), tại thời điểm T_{max} là 2,8 h (SD=0,7) trong khi viên chứng Glucophage có C_{max} là 2552 ng/ml (SD= 880), tại thời điểm là T_{max} là 2,6 giờ (SD=0,7).
- Viên thử Glucofine có diện tích dưới đường cong từ thời điểm 0 đến thời điểm cuối cùng lấy mẫu AUC_{0-12} là 13787 ng.h/ml (SD = 2.992) và diện tích dưới đường cong từ thời điểm 0 cho đến khi thuốc thải trừ hết AUC_{0-inf} là 14882 ng.h/ml (SD = 3264). Trong khi đó, viên chứng Glucophage có các giá trị tương ứng là AUC_{0-12} = 13890 ng.h/ml (SD = 3258) và AUC_{0-inf} = 15177 ng.h/ml (SD = 3922).
- Viên thử Glucofine có thời gian bán thải trong huyết tương $T_{1/2}$ = 2,8 h (SD=0,4) và hằng số tốc độ thải trừ trong huyết tương λ_z = 0,25 h⁻¹ (SD = 0,04). Trong khi đó, viên chứng Glucophage có $T_{1/2}$ = 3,0 h (SD = 0,7) và λ_z = 0,25 h⁻¹ (SD = 0,06).

4.2.4. Phân tích các số liệu thu được và đánh giá tương đương sinh học

Từ kết quả xác định các thông số dược động học của thuốc thử và thuốc đối chứng, tiến hành phân tích thống kê:

❖ *Phân bố của các thông số C_{max} , AUC_{0-12} , AUC_{0-inf}*



Hình 4.9 . Đồ thị biểu diễn sự dao động các thông số dược động học (trung vị, phân vị 25%, giá trị min-max)

Biểu diễn mô tả ba thông số được động học chính như trong hình 4.9 cho thấy sự sai khác của từng thông số C_{\max} , AUC_{0-12} , $AUC_{0-\infty}$ giữa hai chế phẩm nghiên cứu là không nhiều.

❖ ***Phân tích phương sai và xác định khoảng tin cậy 90%***

Kết quả phân tích thống kê ANOVA đánh giá ảnh hưởng của 4 yếu tố: chế phẩm, giai đoạn, trình tự thử, người tình nguyện đến các giá trị C_{\max} , AUC_{0-12} , $AUC_{0-\infty}$ được trình bày trong phụ lục 2. Từ đó, xác định khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ các giá trị trung bình của C_{\max} , AUC_{0-12} , $AUC_{0-\infty}$ giữa 2 chế phẩm. Kết quả thu được trình bày trong bảng 4.14.

Bảng 4.14. Khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ C_{max} , AUC_{0-12} , AUC_{0-inf}
(Với số liệu chuyển dạng logarith tự nhiên)

Thông số Được động học	Trung bình (Glucofine/Glucophage)	Khoảng tin cậy 90%	
		Giới hạn dưới	Giới hạn trên
C_{max}	0,9810	86,8%	110,8%
AUC_{0-12}	0,9948	89,1%	111,0%
AUC_{0-inf}	0,9857	87,5%	111,1%

Như vậy có thể thấy khoảng tin cậy 90% của tỷ lệ các giá trị C_{max} , AUC_{0-12} , AUC_{0-inf} của 2 chế phẩm đều nằm trong khoảng 80-125%. Viên nén Glucofine 850mg tương đương sinh học *in vivo* với viên nén Glucophage 850mg.

4.2.5. Các tác dụng bất lợi của thuốc gặp trong nghiên cứu

Các tác dụng bất lợi của thuốc (ADE) gặp phải trong quá trình cho người tình nguyện uống thuốc với từng thuốc cụ thể được trình bày trong bảng 4.15.

Bảng 4.15: Tác dụng bất lợi của thuốc nghiên cứu

Tác dụng bất lợi	Số người tình nguyện	
	Nhóm uống thuốc thử (Glucofine) (n = 18)	Nhóm uống thuốc đối chứng (Glucophage) (n = 18)
Đau bụng kèm đi ngoài	4	3
Cảm giác khó chịu ở bụng	1	1

Có thể thấy tác dụng bất lợi gặp phải khi uống metformin tương tự nhau đối với hai chế phẩm nghiên cứu. Các tác dụng trên đều thoáng qua, xuất hiện khoảng 2- 4 giờ sau khi uống thuốc và tự hết sau đó, không cần có sự can thiệp của nhân viên y tế.

BÀN LUẬN:

❖ Về phương pháp định lượng metformin:

Để định lượng được metformin trong huyết tương người tình nguyện, ứng dụng cho các nghiên cứu sinh khả dụng và tương đương sinh học, chúng tôi đã xây dựng được phương pháp định lượng bằng HPLC với detector UV, xử lý mẫu bằng phương pháp tủa protein. Vì metformin là một chất rất phân cực nên việc tách metformin ra khỏi dịch sinh học bằng các dung môi hữu cơ rất khó. Tủa protein là phương pháp thường được sử dụng trong trường hợp này. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tủa protein bằng acetonitril là một phương pháp hiệu quả (với hiệu suất chiết trên 90%), đơn giản, nhanh gọn, không đòi hỏi trang thiết bị đặc biệt, dễ dàng triển khai và mang lại hiệu quả kinh tế cao khi mà tổng số mẫu trong nghiên cứu TĐSH là rất lớn.

Phương pháp định lượng metformin trong dịch sinh học bằng HPLC đã được công bố trong một số tài liệu [19], [34-36], [39], [40]. Tuy nhiên ở đây chúng tôi đã xây dựng được một phương pháp HPLC với cột CN, phù hợp điều kiện thực tế của Việt nam để định lượng metformin trong huyết tương người và đã thẩm định phương pháp đạt yêu cầu đầy đủ theo các chỉ tiêu của FDA bao gồm: tính chọn lọc - đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác, khoảng tuyến tính, giới hạn định lượng, độ tìm lại và độ ổn định của mẫu.

Tham khảo các tài liệu đã công bố về dược động học của metformin thấy giá C_{max} trung bình thu được sau khi uống viên nén metformin 500mg dao động từ 680 đến 1007 ng/ml, với giá trị C_{max} lớn nhất thu được là 1590ng/ml [34], [36], [39], [40]. Giá trị C_{max} thu được sau khi uống viên 850mg được báo cáo là khoảng 1700ng/ml [35]. Căn cứ trên đặc tính của metformin là thuốc không có sự tỉ lệ giữa nồng độ trong máu với liều dùng khi tăng liều do hấp thu thuốc giảm, chúng tôi đã quyết định khảo sát khoảng tuyến tính từ 50 tới 3200ng/ml với ba nồng độ QC được lựa chọn là LQC bằng 200ng/ml, MQC bằng 1600ng/ml và HQC bằng 2400ng/ml; và thu được kết quả đạt yêu cầu.

Giá trị LLOQ trong phương pháp của chúng tôi là 50 ng/ml, cũng tương tự như của các phương pháp đã được công bố [19], [34], [36], [39], [40]. Kết quả định lượng mẫu huyết tương của 18 người tình nguyện cho thấy LLOQ xấp xỉ 1/50 nồng độ C_{max} , cho phép xác định nồng độ thuốc trong huyết tương người tình nguyện ngay tại cả thời điểm sau 5 lần thời gian bán thải của thuốc ($1/32 C_{max}$).

Khảo sát độ ổn định cũng cho thấy metformin trong mẫu ổn định sau 3 chu kỳ đông-rã đông, trong quá trình xử lý mẫu (4 giờ ở nhiệt độ phòng) và trong thời gian dài (-35°C trong 30 ngày). Thời gian 30 ngày đủ để toàn bộ số mẫu của 18 người

tình nguyện trong nghiên cứu được phân tích hết. Chính vì vậy, kết quả nghiên cứu là đáng tin cậy.

Thời gian triển khai sắc ký cho một mẫu huyết tương trong nghiên cứu là 12 phút, cho phép định lượng toàn bộ số lượng mẫu của một người tình nguyện trong cùng một ngày làm việc (khoảng 8 giờ), phù hợp để áp dụng cho nghiên cứu TĐSH trong điều kiện Việt nam.

❖ Về đánh giá tương đương sinh học của viên nén Glucofine 850mg.

Để có được kết quả chính xác, phù hợp, một nghiên cứu TĐSH phải có thiết kế phù hợp. Kết quả thực nghiệm cho thấy với thiết kế ngẫu nhiên, đơn liều, chéo đôi, hai giai đoạn, nghiên cứu đã cho kết quả phù hợp. Chương trình lấy mẫu với 13 mẫu máu của mỗi người tình nguyện đã cho đường cong nồng độ thuốc trong máu theo thời gian phản ánh được các thông số dược động học của thuốc, đảm bảo có ít nhất 3 điểm ở pha hấp thu, 3 điểm xung quanh C_{max} và 6 điểm ở pha thải trừ. Thời gian lấy mẫu máu kết thúc tại thời điểm 12h là hoàn toàn phù hợp vì đảm bảo AUC_{0-12} đạt trên 80% của AUC_{0-inf} , đồng thời có thể hoàn thành lấy mẫu máu trong một ngày, thuận lợi cho việc tổ chức nghiên cứu.

Kết quả phân tích phương sai và xác định khoảng tin cậy 90% cho thấy viên nén Glucofine 850mg tương đương sinh học với Glucophage 850mg của nhà phát minh. Nghiên cứu tiến hành trên 18 người tình nguyện, phân tích phương sai cho thấy sự khác nhau giữa các cá thể không ảnh hưởng có ý nghĩa thống kê đến các thông số dược động học. Như vậy với metformin, có thể áp dụng hướng dẫn của Asean [18] hoặc dược điển Trung Quốc [21], tiến hành thử nghiệm TĐSH ở mức tối thiểu trên 18 người, vừa đảm bảo tiêu chuẩn đạo đức trong nghiên cứu, vừa tiết kiệm chi phí nghiên cứu.

Trên thị trường hiện có khoảng 20 biệt dược metformin do các công ty dược phẩm trong nước sản xuất. Tuy nhiên do bộ Y tế chưa ban hành qui định về thử TĐSH khi đăng kí sản phẩm nên hầu hết các thuốc này đều chưa được thử TĐSH. Mặc dù khả năng TĐSH của các chế phẩm metformin khá lớn, nhưng với trình độ kỹ thuật bào chế còn chưa đồng đều ở các cơ sở sản xuất dược phẩm trong nước, việc thử TĐSH trước khi cho phép lưu hành của các chế phẩm metformin là cần thiết. Qui trình nghiên cứu của chúng tôi ở đây hoàn toàn phù hợp để áp dụng nghiên cứu TĐSH cho các chế phẩm metformin tại Việt nam.

5. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

5.1. KẾT LUẬN

Đề tài nghiên cứu đã xây dựng được phương pháp định lượng metformin trong huyết tương bằng HPLC. Tiến hành thẩm định cho thấy phương pháp đạt các tiêu chuẩn của hướng dẫn về thẩm định phương pháp phân tích trong dịch sinh học.

Nghiên cứu tương đương sinh học của viên nén Glucofine 850 mg do công ty cổ phần xuất nhập khẩu y tế Đồng tháp (Domesco) sản xuất, được tiến hành trên 18 người tình nguyện khỏe mạnh bằng cách chéo đôi cho kết quả như sau:

	Glucofine	Glucophage
$C_{\max} \pm SD$ (ng/ml)	2480 ± 708	2552 ± 880
$AUC_{0-12} \pm SD$ (ng.h/ml)	13787 ± 2992	13890 ± 3258
$AUC_{0-\infty} \pm SD$ (ng.h/ml)	14882 ± 3264	15177 ± 3922
$T_{\max} \pm SD$ (h)	$2,8 \pm 0,7$	$2,6 \pm 0,7$
$T_{1/2} \pm SD$ (h)	$2,8 \pm 0,4$	$3,0 \pm 0,7$
$\lambda_z \pm SD$ (h ⁻¹)	$0,25 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,06$

Trên cơ sở phân tích phương sai, xác định khoảng tin cậy 90% cho thấy giá trị C_{\max} , AUC_{0-12} , $AUC_{0-\infty}$ của thuốc thử và thuốc đối chứng tương đương nhau. Như vậy, viên nén **Glucofine 850 mg** do công ty cổ phần xuất nhập khẩu y tế Đồng tháp (Domesco) sản xuất **tương đương sinh học *in vivo*** với viên đối chứng là viên nén Glucophage 850mg do công ty Merck Santé (Pháp) sản xuất.

5.2. ĐỀ XUẤT

Bộ Y tế nên sớm ban hành quy định thử tương đương sinh học khi đăng ký sản phẩm generic để bảo đảm chất lượng của thuốc sản xuất trong nước cũng như thuốc nhập khẩu, chính điều này sẽ làm cho quy định kê đơn theo tên generic mới thực sự có cơ sở khoa học.

CƠ QUAN CHỦ TRÌ ĐỀ TÀI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI
HIỆU TRƯỞNG

Lê Viết Hùng

CHỦ NHIỆM ĐỀ TÀI

Hoàng Thị Kim Huyền

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TÀI LIỆU TIẾNG VIỆT

1. Trần Tử An (2001). *Nghiên cứu triển khai đánh giá tương đương sinh học của viên Cephalexin sản xuất ở Việt Nam*. Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cấp bộ.
2. Trần Tử An (2006). *Đánh giá tương đương sinh học hai chế phẩm Amoxicilin và acid clavulanic*. Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cấp bộ.
3. Trần Tử An, Trần Tích, Nguyễn Văn Tuyền, Nguyễn Thị Kiều Anh, Trần Nguyên Hà, Lại Việt Hà (2003). *Đánh giá tương đương sinh học viên nang cephalixin sản xuất trong nước*. Tạp chí Dược học số 10. tr. 15 – 19.
4. Nguyễn Thị Kiều Anh, Nguyễn Thị Thanh Lâm, Từ Minh Koóng (2003). *Đánh giá sinh khả dụng viên nén ketoprofen 200mg tác dụng kéo dài*. Tạp chí Dược học số 6. tr. 22 – 24.
5. Bộ Y tế (2002), *Dược thư Quốc gia Việt nam*, tr. 676-678.
6. Trần thị Thanh Hà (2004), *Đánh giá tương đương điều trị của Folliculin Alpha và Folliculin Beta trong điều trị vô sinh bằng phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm tại bệnh viện phụ sản trung ương*, Luận văn tốt nghiệp Thạc sĩ Dược học chuyên ngành Dược lâm sàng, trường Đại học Dược Hà nội.
7. Bùi Tùng Hiệp (2004), *Khảo sát sinh khả dụng và tương đương sinh học của ba chế phẩm Amoxicillin*. Tạp chí dược học số 12, tr. 21 – 24.
8. Bùi Tùng Hiệp (2004), *Nghiên cứu tương đương sinh học của hai chế phẩm ranitidin*. Tạp chí Dược học số 7. tr. 14 – 16.
9. Phạm Thị Minh Huệ (2003), *Nghiên cứu bào chế viên nén nifedipin tác dụng kéo dài*. Luận án tiến sĩ Dược học.
10. Hoàng Kim Huyền (2005), *Nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng của rifampicin từ hỗn hợp 3 thuốc chống lao RHZ trên người tởnh nguyện*, Báo cáo kết quả nghiên cứu thu đề tài cấp bộ.
11. Nguyễn Trần Linh, Võ Xuân Minh, Trần Tử An, Nguyễn Thị Hường, Lê Thị Thanh Thảo (2004), *Nghiên cứu sinh khả dụng và tương đương sinh học viên nang Theophylin tác dụng kéo dài*, Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc số 2, tr. 21 – 24.
12. Nguyễn Văn Long (1999), *Nghiên cứu sinh khả dụng của một số dược chất dùng theo đường bôi xoa ngoài da*, Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cấp bộ.

13. Võ Xuân Minh, Hoàng Kim Huyền (1999), *Nghiên cứu bào chế và sinh khả dụng thuốc tác dụng kéo dài chứa Theophyllin, Nifedipin, Diclofenac*, Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cấp bộ.
14. Đỗ Trung Quân (2001), *Bệnh đái tháo đường*, Nhà xuất bản y học.
15. Đoàn Cao Sơn (2005), *Đánh giá sinh khả dụng của hệ trị liệu qua da chứa Paroxetin bằng phương pháp HPLC với detector huỳnh quang*. Tạp chí kiểm nghiệm thuốc số 2, tr. 20 – 24.
16. Phùng Thị Vinh và cs (2005), *Khảo sát khả năng sử dụng chó nhà để đánh giá sinh khả dụng và tương đương sinh học*, Tạp chí viện kiểm nghiệm số 4, tr. 26 – 29.

TÀI LIỆU TIẾNG ANH

17. AbuRuz S., Millership J., McElnay J. (2005), “The development and validation of liquid chromatography method for the imultaneous determination of metformin and glipizide, gliclazide, glibenclamide or glimperide in plasma”, *Journal of Chromatography B*, 817: 277–286.
18. ACCSQ/PPWG (2004), Asean Guidelines for the Conduct of Bioavailability and Bioequivalence studies (Final draft 21 July 2004).
19. Caille G. et al (1993), “Bioavailability of metformin in tablet form using a new high pressure liquid chromatography assay method”, *Biopharm Drug Dispos.* 14 (3): 257-63.
20. Chen M. et al. (2001), “Bioavailability and Bioequivalence: An FDA Regulatory Overview”, *Pharmaceutical research* 18 (12): 1645 – 1650.
21. Chinese Pharmacopeia (Appendix XX: Guidance In vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Drug Preparations).
22. Costa P., Lobo J.M. (2001), "Review Modeling and Comparison of Dissolution Profiles", *Eu. J. Pharm. Sci.* 13: 123 - 133.
23. European Agency for the Evaluation of Medicinal Product – Committee for Proprietary Medicinal Products (2001), Note for guidance on the investigation of bioavailability and bioequivalence. CPMP/EWP/QWP/1401/98.
24. Food and Drug Administration – CDER - CVM (2001), *Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation*.

25. Food and Drug Administration – CDER (2003), *Bioavailability and bioequivalence studies for Orally Administered Drug Products – General Considerations*.
26. Hardman J.G., Limbird L.E. (2001), *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, pp. 1690-1710.
27. Kirpichnikov D., McFarlane S. and Sowers J. R. (2002), "Metformin: An Update", *Annals of Internal Medicine* 137 (1): 25-33.
28. Le C. T. (2003), *Introductory Biostatistics*, John Wiley & Sons INC, pp. 472 - 483.
29. Lunn G. , Schmuff N. R. (1997), *HPLC Methods For Pharmaceutical Analysis*, John Wiley & Sons INC, pp. 1044 – 1051.
30. Martindale editorial staff (2005). *Martindale the complete drug reference*. Royal Pharmaceutical Society.
31. Ministry of Health and Family Welfare, Government of India (2005), *Guidelines for Bioavailability and Bioequivalence studies*
32. Ministry of Health of Canada (1992), *Guidance for industry, Conduct and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies – Part A: Oral Dosage Formulations Used for Systemic Effect*. Minister of Public Works and Government Services Canada.
33. Ministry of Health of Canada (1996), *Guidance for Industry Conduct and Analysis of Bioavailability and Bioequivalence Studies – Part B: Oral Modified Release Formulation*. Minister of Public Works and Government Services Canada.
34. Najib N. et al (2002), "Bioequivalence evaluation of two brands of metformin 500 mg tablets (Dialon & Glucophage) - in healthy human volunteers", *Biopharm Drug Dispos.*, 23 (7):301-6.
35. Porta V. et al (2007), "HPLC- UV determination of metformin in human plasma for application in pharmacokinetics and bioequivalence studies", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 46 (2008) 143-147.
36. Vlahov V. et al (2005), "Bioequivalence studies with metformin: comparability of reference tablets from different origins", *Int J Clin Pharmacol Ther.* 43 (9) : 457-62.
37. Welling P.G. et al (1991), *Pharmaceutical Bioequivalence*, Marcel Dekker, Inc.

38. WHO (2005), Multisource (generic) Pharmaceutical Products Guidelines on Registration Requirements to Establish Interchangeability (draft revision).
39. Yuen KH et al. (1999), "Bioequivalence of a generic metformin tablet preparation", *Int J Clin Pharmacol Ther* 37 (7) : 319-22.
40. Zarghi A., Foroutan S.M., Shafaati A., Khoddam A.(2003), "Rapid determination of metformin in human plasma using ion-pair HPLC", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 31 : 197- 200.

QUY TRÌNH PHÂN TÍCH METFORMIN TRONG HUYẾT TƯƠNG

1. Hoá chất, thiết bị

Chất chuẩn:

- Metformin chất đối chiếu hoặc chuẩn làm việc

Dung môi, hoá chất:

- Acetonitril, methanol dùng cho HPLC - Merck
- Các hoá chất khác đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích dùng trong chiết tách và chạy sắc kí.
- Huyết tương: dùng huyết tương trắng của người tình nguyện khoẻ mạnh

Thiết bị và dụng cụ phân tích:

Các thiết bị đã được hiệu chuẩn theo quy định đạt tiêu chuẩn dùng cho phân tích

- Hệ thống máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1100 series hoặc tương đương.
- Máy li tâm, máy lắc siêu âm, cân phân tích.
- Tủ lạnh sâu (-20°C tới -80°C), máy đo pH.
- Các dụng cụ thí nghiệm khác: Máy lọc, pipet tự động, pipet thuỷ tinh chính xác, các dụng cụ thủy tinh thí nghiệm.

2. Mẫu thử

Mẫu thử là huyết tương của người sau khi đã dùng chế phẩm metformin

Lấy mẫu máu bệnh nhân hay người tình nguyện vào ống nghiệm có chứa sẵn chất chống đông. Lắc nhẹ 3-4 lần để chống đông, li tâm 5000vòng/phút để tách lấy huyết tương ngay sau khi lấy máu.

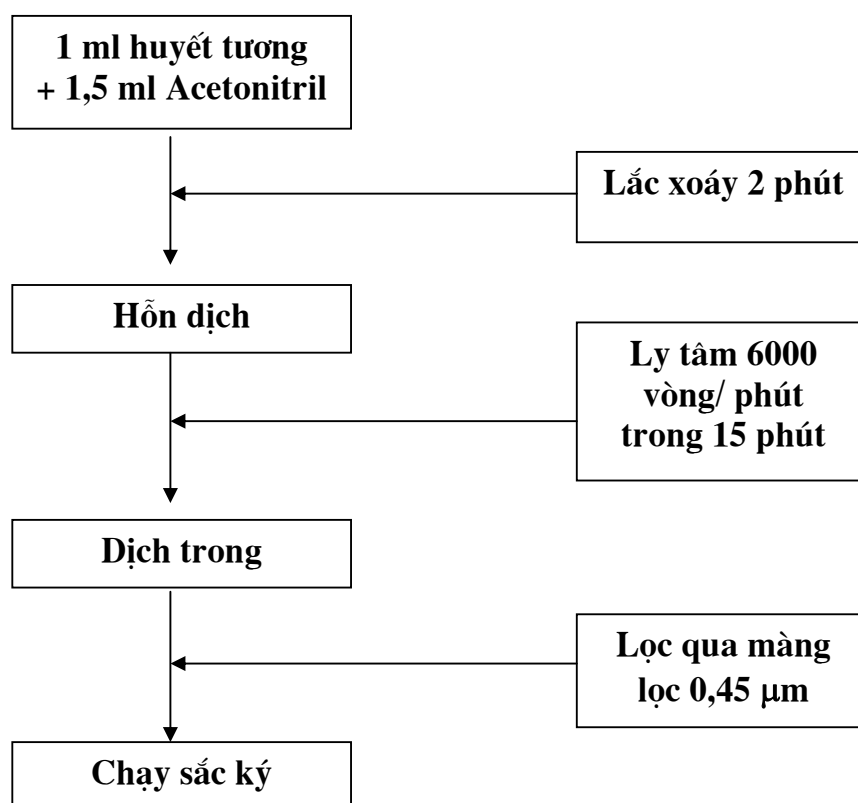
Cho huyết tương vào các ống PE có nắp kín ghi nhãn và bảo quản ở tủ lạnh sâu -35°C cho đến khi phân tích. Mẫu ổn định trong vòng 30 ngày.

3. Chuẩn bị mẫu chuẩn mẫu thử

- **Dung dịch chuẩn gốc:** Hoà tan metformin trong methanol để thu được dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 3,2 mg/ml.
- **Mẫu chuẩn:** Pha dãy nồng độ từ 50 ng/ml tới 3200 ng/ml từ dung dịch chuẩn gốc.
- **Mẫu trắng:** Huyết tương trắng của bệnh nhân / người tình nguyện trước khi dùng chế phẩm chứa metformin.
- **Mẫu thử:** Huyết tương bệnh nhân / người tình nguyện sau khi dùng chế phẩm chứa metformin.

4. Tiến hành:

- **Xử lý mẫu:** Mẫu huyết tương được tan chảy ở nhiệt độ phòng trước khi phân tích. Lấy chính xác 1 ml huyết tương (chuẩn/thử), thêm vào chính xác 1,5 ml acetonitril , sau đó tiến hành như sơ đồ sau:



Sơ đồ 1: Quy trình chiết tách metformin trong huyết tương

- Định lượng metformin: Xác định lượng metformin chiết được bằng phương pháp sắc lý lỏng hiệu năng cao (HPLC) với các điều kiện sau:

- Pha tĩnh: Cột VertiSep UPS CN HPLC (4,6x150mm, kích thước hạt 5 μ m).
- Pha động: ACN : Đệm phosphat pH 6,0 (0,05M) = 70:30
- Detector UV bước sóng 234 nm
- Thể tích tiêm mẫu: 60 μ l
- Lưu lượng dòng: 1ml/phút

(Có thể điều chỉnh điều kiện phân tích nếu cần để có đáp ứng tốt nhất).

Tiến hành sắc ký các mẫu chuẩn, mẫu trắng, mẫu thử theo các điều kiện trên. Ghi lại đáp ứng và tính kết quả dựa vào đường chuẩn trong từng ngày phân tích. Sắc ký đồ có giá trị xem xét sự phân biệt của pic metformin đối với các pic có trong huyết tương.

5. Hồ sơ báo cáo

- Ghi chép chi tiết các điều kiện thử nghiệm, số liệu chuẩn bị các dung dịch chuẩn, kết quả, sắc ký đồ. Lưu hồ sơ gốc.
- Báo cáo kết quả cần ghi rõ điều kiện phân tích, thông tin về chất chuẩn, thiết bị và các số liệu tính toán được.

PHÂN TÍCH PHƯƠNG SAI VÀ KHOẢNG TIN CẬY 90%*(Xử lý trên phần mềm Kinetica 4.4)***Bảng PL2. Phân tích phương sai đối với $\ln C_{\max}$**

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F	P
Giai đoạn	1	0,057	0,0571	1,30	0,270
Người tình nguyện (trình tự thử)	16	1,860	0,1162	2,65	0,030
Chế phẩm	1	0,003	0,0033	0,08	0,787
Trình tự thử	1	0,529	0,5292	12,08	0,003
Sai số	16	0,701	0,0438		
Tổng	35	3,150			
Hệ số biến thiên cá thể (CV): 2,69%					

Bảng PL3. Phân tích phương sai đối với $\ln AUC_{0-12}$

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F	P
Giai đoạn	1	0,036	0,0364	1,02	0,327
Người tình nguyện (trình tự thử)	16	0,785	0,0491	1,38	0,265
Chế phẩm	1	0,000	0,0002	0,01	0,935
Trình tự thử	1	0,402	0,4023	11,29	0,004
Sai số	16	0,570	0,0356		
Tổng	35	1,794			
Hệ số biến thiên cá thể (CV): 1,99%					

Bảng PL4. Phân tích phương sai đối với $\ln AUC_{0-\infty}$

Nguồn biến thiên	Bậc tự do	Tổng bình phương	Trung bình bình phương	F	P
Giai đoạn	1	0,034	0,0343	0,82	0,380
Người tình nguyện (trình tự thử)	16	0,745	0,0466	1,11	0,421
Chế phẩm	1	0,002	0,0019	0,04	0,836
Trình tự thử	1	0,400	0,3997	9,50	0,007
Sai số	16	0,673	0,0421		
Tổng	35	1,855			
Hệ số biến thiên cá thể (CV): 2,14 %					

MÃ HOÁ VÀ PHÂN NHÓM NGẪU NHIÊN**Bảng PL 3. Kết quả phân nhóm ngẫu nhiên của nghiên cứu chéo đôi**

Người tình nguyện			Giai đoạn	
STT	Mã	Trình tự thử	Giai đoạn I	Giai đoạn II
1	A	T - R	T	R
2	B	R - T	R	T
3	C	R - T	R	T
4	D	R - T	R	T
5	E	T - R	T	R
6	F	T - R	T	R
7	G	R - T	R	T
8	H	T - R	T	R
9	K	R - T	R	T
10	L	T - R	T	R
11	M	R - T	R	T
12	N	T - R	T	R
13	O	R - T	R	T
14	P	T - R	T	R
15	Q	R - T	R	T
16	R	R - T	R	T
17	S	T - R	T	R
18	T	T - R	T	R

Ghi chú: **T** (test- thuốc thử): Glucofine**R** (reference- thuốc đối chứng): Glucophage

BẢNG THEO DÕI THỜI ĐIỂM LẤY MẪU MÁU NGƯỜI TÌNH NGUYỄN

Giai đoạn

Họ tên người tình nguyện:ID:

Ngày thử nghiệm :

Thuốc uống:.....

Mẫu	Thời điểm	Dự tính	Thời điểm thực	Ghi chú
0	0	Uống thuốc		
1	30'			
2	60'			
3	90'			
4	2h			
5	2h30			
6	3h			
7	3h30			
8	4h			
9	5h			
10	6h			
11	8h			
12	12h			

NGƯỜI THEO DÕI

PHIẾU THEO DÕI SỨC KHOẺ NGƯỜI TÌNH NGUYÊN

Đề tài "Nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học của chế phẩm metformin sản xuất trong nước"

Giai đoạn:

Ngày:

Thuốc:

Liều dùng: 850mg

Đường dùng: uống

Họ tên NTN: *Tuổi* *Giới*

Địa chỉ liên lạc:

.....

Tình trạng sức khỏe trước khi uống thuốc:

Mạch

Huyết áp

Nhịp thở

Tình trạng sức khỏe sau khi uống thuốc (trong thời gian lấy mẫu máu)

(Mô tả những diễn biến bất thường xảy ra: thời điểm, triệu chứng, các biện pháp đã can thiệp)

Kết luận về tình trạng sức khỏe người tình nguyện trong thời gian thử nghiệm

TRƯỞNG NHÓM NGHIÊN CỨU

BS TRỰC

Họ tên người tình nguyện (viết tay).....

ĐƠN TÌNH NGUYỆN THAM GIA NGHIÊN CỨU

Tên tôi là:

Giới:

Ngày tháng năm sinh:

Địa chỉ nơi cư trú:

Điện thoại:

Nghề nghiệp:

Nơi công tác:

Điện thoại:

Đồng ý tình nguyện tham gia đề tài:

***" Nghiên cứu đánh giá tương đương sinh học của chế phẩm
metformin sản xuất trong nước"***

Sau khi được thông báo về việc tuyển người tham gia nghiên cứu của bộ môn Dược lâm sàng trường đại học Dược Hà nội, tôi đã đọc bản đề cương nghiên cứu và hiểu rõ các mục tiêu, nội dung nghiên cứu như sau:

1. MỤC TIÊU VÀ NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

1.1. Mục tiêu nghiên cứu

Đánh giá tương đương sinh học giữa một chế phẩm metformin sản xuất trong nước (Glucophage) với chế phẩm metformin có uy tín nhất trên thị trường (Glucophage)

1.2. Nội dung nghiên cứu

1.2.1. Thuốc nghiên cứu

- Chế phẩm đối chiếu:

Glucophage viên nén 850mg của công ty Merck Santé (Pháp), biệt dược có uy tín hàng đầu của metformin trên thị trường thế giới.

- **Chế phẩm thử:** Glucophage viên nén 850mg do công ty cổ phần xuất nhập khẩu y tế Domesco sản xuất.

Cả hai lô thuốc đưa vào nghiên cứu của chế phẩm thử và chế phẩm đối chiếu đều đang lưu hành trên thị trường, có hạn sử dụng tương đương nhau và đạt yêu cầu về độ đồng đều hàm lượng và độ hoà tan.

1.2.2 . Thiết kế nghiên cứu

Nghiên cứu đơn liều, chéo đôi, hai giai đoạn, ngẫu nhiên trên người tình nguyện.

Họ tên người tình nguyện (viết tay).....

** Thiết kế cụ thể:*

- 18 người tình nguyện đủ tiêu chuẩn nghiên cứu được chia ngẫu nhiên thành 2 nhóm, mỗi nhóm 9 người.
- Nghiên cứu chéo đôi 2 giai đoạn, các giai đoạn cách nhau 1 tuần.
- Mỗi giai đoạn người tình nguyện uống **1 viên Metformin 850mg**
 - + Người tình nguyện phải nhịn đói qua đêm (ít nhất là 10h).
 - + Uống thuốc lúc 6-7h sáng với 200 ml nước tinh khiết đóng chai.
 - + Sau khi uống thuốc, người tình nguyện sẽ được cho uống khoảng 100ml dung dịch glucose 10% vào các thời điểm 0,5; 1,5; 2; 2,5; 3,5 và 5h (lấy mẫu máu trước rồi uống glucose). Những người có biểu hiện tụt đường huyết sẽ được xử trí theo qui trình cấp cứu của khoa Cấp cứu, bệnh viện Việt nam-Cuba.
 - + Người tình nguyện được uống nước tinh khiết đóng chai tùy theo nhu cầu (trừ trong khoảng 1h trước và 1h sau khi uống thuốc), được ăn trưa 5h sau và ăn tối 12h sau khi uống thuốc. Người tình nguyện được đi lại trong thời gian lấy máu, nhưng không được hoạt động thể lực mạnh.
- Giai đoạn 1: nhóm 1 uống Glucofine, nhóm 2 uống Glucophage.
 Giai đoạn 2: nhóm 1 uống Glucophage, nhóm 2 uống Glucofine.
 Hai giai đoạn được tiến hành cách nhau một tuần để thải trừ hết thuốc của giai đoạn trước ($t_{1/2}$ của metformin khoảng 1,5 - 4,5h) .
- Trong suốt thời gian nghiên cứu, người tình nguyện không được dùng thêm bất cứ loại thuốc nào khác.

** Lấy mẫu máu*

- Lịch lấy mẫu máu:

Mỗi người tình nguyện được lấy máu 13 điểm tại các thời điểm trước khi uống (0 h) và 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0, 12.0 h sau khi uống metformin.

- Số lượng máu của mỗi mẫu là 3ml máu tĩnh mạch, chống đông bằng heparin; trong vòng 15 phút sau khi lấy, ly tâm máu để tách huyết tương.
- Huyết tương tách ra cho vào ống nghiệm bằng nhựa, nút kín, dán nhãn có mã hoá mẫu, bảo quản trong tủ lạnh sâu - 40°C cho đến khi định lượng.

Họ tên người tình nguyện (viết tay).....

* Nơi tiến hành thử nghiệm: Bệnh viện Việt Nam - Cu Ba

1.3. Lựa chọn người tình nguyện

Tiêu chuẩn lựa chọn người tình nguyện:

- Người khỏe mạnh bình thường
- Nam giới, tuổi 18 – 25 tuổi, cân nặng 55- 65kg.
- Chỉ số khối lượng cơ thể (BMI) từ 18 – 22.
- Được xác định là khỏe mạnh dựa trên dữ liệu lâm sàng và cận lâm sàng sau:
 - + Các xét nghiệm huyết học (số lượng hồng cầu, số lượng bạch cầu, công thức bạch cầu, hemoglobin, số lượng tiểu cầu, thời gian máu chảy- máu đông)
 - + Chức năng gan (xét nghiệm ASAT, ALAT, bilirubin trong máu)
 - + Chức năng thận (xét nghiệm ure, creatinin trong máu)
 - + Glucose máu
 - + HIV, HBsAg

Tất cả các xét nghiệm trên đều phải cho kết quả trong giới hạn bình thường, HIV và HBSAg phải âm tính.

- Không uống rượu hay sử dụng bất kỳ loại thuốc nào 72h trước khi bắt đầu và trong suốt quá trình nghiên cứu.

Tiêu chuẩn loại trừ:

- Đang mắc bệnh (mạn tính hoặc cấp tính).
- Tiền sử dị ứng thuốc.
- Nghiện ma túy, nghiện thuốc lá, nghiện rượu.
- Tiền sử mắc bệnh tim mạch, thần kinh hoặc nội tiết.
- Tham gia vào bất cứ một nghiên cứu lâm sàng nào trong vòng 30 ngày trước khi bắt đầu nghiên cứu.

2. TỔNG QUAN VỀ THUỐC DỪNG TRONG NGHIÊN CỨU

Metformin là thuốc hạ đường huyết nhóm biguanid. Metformin làm giảm glucose huyết ở người bệnh ĐTĐ typ 2. Cơ chế tác dụng ngoại biên của thuốc là làm tăng sử dụng glucose ở tế bào, cải thiện liên kết của insulin với thụ thể và có thể có cả tác dụng sau thụ thể, ức chế tổng hợp glucose tại gan và giảm hấp thu glucose ở ruột. Thuốc không có tác dụng kích thích tế bào beta tuy tiết insulin, không có tác dụng hạ đường huyết ở người không bị ĐTĐ

Họ tên người tình nguyện (viết tay).....

- Tác dụng không mong muốn:

Những ADR thường gặp nhất của metformin là về tiêu hoá. Những tác dụng này liên quan đến liều và thường xảy ra vào lúc bắt đầu điều trị và thường là nhất thời.

- Hay gặp ADR $>1/100$
 - . Tiêu hoá: chán ăn, buồn nôn, nôn, ỉa chảy, đầy thượng vị, táo bón, ợ nóng
 - . Da: Ban, mề đay, cảm thụ với ánh sáng
 - . Chuyển hoá: giảm nồng độ vitamin B₁₂
- Ít gặp $1/1000 < \text{ADR} < 1/100$
 - . Huyết học: Loạn sản máu, thiếu máu bất sản, thiếu máu tan huyết, suy tủy, giảm tiểu cầu, mất bạch cầu hạt
 - . Chuyển hoá: Nhiễm toan lactic

Những tác dụng không mong muốn trên sẽ hết khi ngừng thuốc

- Liều điều trị thông thường: 500mg – 3.000 mg/24h

3. QUYỀN LỢI VÀ NGHĨA VỤ CỦA ĐỐI TƯỢNG THAM GIA NGHIÊN CỨU

3.1. Quyền lợi của đối tượng tham gia nghiên cứu:

- Được cung cấp đầy đủ thông tin về nghiên cứu mà mình tham gia.
- Có quyền viết đơn tình nguyện tham gia nghiên cứu hoặc đơn phương chấm dứt việc tiếp tục tham gia nghiên cứu.
- Các thông tin cá nhân của đối tượng nghiên cứu cũng như các kết quả nghiên cứu sẽ được giữ bí mật trong hồ sơ nghiên cứu. Tên của đối tượng tham gia nghiên cứu sẽ không được công bố công khai trong các báo cáo kết quả nghiên cứu hoặc trong các tạp chí, báo chuyên ngành nếu không được sự đồng ý của đối tượng nghiên cứu.
- Được khám lâm sàng và làm các xét nghiệm cận lâm sàng miễn phí để xác định tình trạng sức khỏe.
- Được nhận tiền bồi dưỡng: khi hoàn thành 2 giai đoạn thử nghiệm uống thuốc và lấy máu, người tình nguyện sẽ được nhận số tiền thù lao là 1.200.000đ (một triệu hai trăm nghìn đồng chẵn). Trong trường hợp chấm dứt tham gia nghiên cứu trước thời hạn, số tiền bồi dưỡng sẽ được chi trả phụ thuộc vào mức độ hoàn tất công việc.

Họ tên người tình nguyện (viết tay).....

- Khi có tai biến trong quá trình nghiên cứu, được xử trí kịp thời. Những trường hợp nặng sẽ được điều trị tại bệnh viện, mọi chi phí cho điều trị sẽ được chi trả theo bảo hiểm.
- Thời gian theo dõi đối tượng thử nghiệm về tác dụng phụ kéo dài tiếp tục 24h sau khi lấy máu lần cuối.

3.2. Nghĩa vụ của đối tượng tham gia nghiên cứu:

- Viết đơn tình nguyện tham gia nghiên cứu (đơn viết tay), bao gồm:
 - . Cam kết thực hiện đúng các qui trình, yêu cầu của nghiên cứu
 - . Trong trường hợp không muốn tiếp tục tham gia nghiên cứu, phải có thông báo trước bằng bản viết tay cho bên nghiên cứu.
- Trong quá trình tham gia nghiên cứu, không được đồng thời tham gia một nghiên cứu khác hoặc sử dụng các thuốc để điều trị một bệnh nào đó.
- Cung cấp thông tin phản hồi chính xác về nghiên cứu thử nghiệm.

Tôi đã đọc kỹ và hiểu rõ các thông tin trên, hiểu rõ các quyền lợi và trách nhiệm của đối tượng tham gia nghiên cứu, tôi nhận thấy mình đủ tiêu chuẩn để tham gia nghiên cứu. Tôi làm đơn này với ý thức hoàn toàn tự nguyện xin được tham gia vào nghiên cứu này.

Tôi xin cam đoan thực hiện đúng những qui định của quy trình nghiên cứu đề ra.

Hà nội, ngày tháng năm
2007

(Ký và ghi rõ họ tên)

Chúng tôi đã thông báo đầy đủ thông tin trên cho đối tượng tham gia nghiên cứu, đồng ý tiếp nhận..... tham gia vào nghiên cứu. Chúng tôi cam kết thực hiện những điều đã nêu trên.

Hà nội, ngày tháng năm
2007

Thay mặt nhóm nghiên cứu

Họ tên người tình nguyện (viết tay).....

(Ký và ghi rõ họ tên)

Tôi xin chịu trách nhiệm về hậu quả của những sai sót thực hiện không đúng như trong bản cam kết nêu trên.

Hà Nội, ngày tháng năm
2007

Chủ nhiệm đề tài
(Ký và ghi rõ họ tên)

Thông qua Hội đồng đạo đức
Ngày: tháng năm 2006