

NGHIÊN CỨU CÁCH BÀO CHẾ VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG CỦA DUNG DỊCH XỊT HỌNG HYALURONIC ACID PLUS TRONG DỰ PHÒNG VÀ ĐIỀU TRỊ VIÊM LOÉT VÙNG MIỆNG HỌNG TRONG PHÒNG THÍ NGHIỆM

Phạm Huy Tấn^{1,✉}, Vũ Mạnh Tuấn¹, Nguyễn Viết Đa Đô¹,
Lâm Văn Việt², Vương Minh Việt²

¹Trường Đại học Y Hà Nội

²Công ty Cổ phần Phát triển Thương mại Yersin

Hyaluronic acid trọng lượng phân tử cao có các chức năng quan trọng trong sửa chữa mô, hydrat hóa mô, bảo vệ chống lại các vi khuẩn và điều tiết phản ứng viêm. Trong nghiên cứu trong phòng thí nghiệm, chúng tôi đã thực hiện bào chế và đánh giá hiệu quả kết hợp của sodium hyaluronate trọng lượng phân tử cao từ nguồn ngoại sinh và chlorhexidine digluconate. Kết quả cho thấy dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus ổn định sau 6 tháng bào chế. Vi khuẩn gram dương bị tiêu diệt ở cả hai nhóm *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumonia* sau 30 giây khi sử dụng dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus. Do đó, nghiên cứu cung cấp các thông tin bổ sung và hiệu quả về điều trị viêm loét vùng miệng họng bằng cách sử dụng dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus mặc dù cần có thêm nhiều nghiên cứu tiếp theo.

Từ khóa: Hyaluronic acid, chlorhexidine digluconate, loét vùng miệng họng

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hyaluronic acid là một glycosaminoglycan không sunfat tự nhiên có trọng lượng phân tử cao 4.000 - 20.000.000 Da. Nó là một polysaccharide của ma trận ngoại bào mô liên kết, dịch bao hoạt dịch, phôi trung mô, da và nhiều cơ quan và mô khác của cơ thể.¹ Hyaluronic acid có vai trò điều tiết trong phản ứng viêm. Hyaluronic acid có trọng lượng phân tử cao bị phân mảnh dưới tác động của các loại oxy phản ứng (ROS), bao gồm các gốc superoxide và gốc hydroxyl, gốc này được tạo ra chủ yếu bằng cách xâm nhập vào bạch cầu đa nhân và các tế bào viêm khác trong quá trình thực bào của vi khuẩn. Các mảnh trọng lượng phân tử thấp đóng vai trò báo hiệu tổn thương

mô và huy động các tế bào miễn dịch, trong khi hyaluronic acid có trọng lượng phân tử cao ngăn chặn phản ứng miễn dịch, ngăn chặn tình trạng viêm quá mức.² Hyaluronic acid hỗ trợ tính toàn vẹn cấu trúc và cân bằng nội môi của các mô điều chỉnh áp suất thẩm thấu và bôi trơn mô.³ Hyaluronic acid là một trong những phân tử hút ẩm nhất được biết đến trong tự nhiên. Hyaluronic acid cũng thể hiện tính chất nhớt quan trọng làm giảm sự xâm nhập của virus và vi khuẩn vào mô.⁴ Hyaluronic acid là thành phần chính trong chuỗi các giai đoạn liên quan đến quá trình chữa lành vết thương (viêm, hình thành mô hạt, hình thành biểu mô và tái tạo mô).^{5,6} Do có nhiều chức năng, hyaluronic acid đã được phát triển và ứng dụng vào các vật liệu sinh học trong điều trị các tình trạng viêm khác nhau.³ Một số nghiên cứu tập trung sự chú ý vào việc sử dụng hyaluronic acid như điều trị tại chỗ cho loét miệng. Nolan đã chỉ ra rằng việc bôi gel hyaluronic acid 0,2% hai lần mỗi ngày

Tác giả liên hệ: Phạm Huy Tấn,

Trường Đại học Y Hà Nội

Email: phamhuytan@hmu.edu.vn

Ngày nhận: 10/10/2020

Ngày được chấp nhận: 03/12/2020

trong 2 tuần là một liệu pháp hiệu quả và an toàn ở những bệnh nhân bị loét áp tơ tái phát (RAU).⁷ Lee và cộng sự đã nghiên cứu hiệu quả của việc sử dụng hyaluronic acid HA 0,2% tại chỗ trong điều trị loét miệng ở bệnh nhân RAU và loét miệng của bệnh Behcet (BD).⁸

Ngày nay hyaluronic acid được sử dụng rộng rãi trong y học để điều trị viêm loét vùng miệng họng. Kết quả thu được từ các nghiên cứu lâm sàng chứng minh tác động tích cực của hyaluronic acid vào việc sửa chữa mô và chữa lành vết thương. Công nghệ hiện tại có đủ khả năng nghiên cứu và phát triển sản phẩm dung dịch súc xịt họng chứa hyaluronic acid trong bối cảnh nhu cầu và hiểu biết của người dân tăng cao. Đề tài này được thực hiện nhằm xây dựng công thức dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus và đánh giá tác dụng và bào chế dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus trong dự phòng và điều trị viêm loét vùng miệng họng trong phòng thí nghiệm.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

1. Đối tượng

Một số loại vi khuẩn được nuôi cấy từ dịch họng của bệnh nhân tại khoa Vi sinh - Ký sinh trùng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Bao gồm một số chủng vi khuẩn *Streptococcus pyogenes* (Liên cầu nhóm A), *Streptococcus pneumoniae* (Phế cầu khuẩn). Sử dụng dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus được pha chế theo quy trình.

2. Phương pháp nghiên cứu:

Thiết kế nghiên cứu: Nghiên cứu thực nghiệm trong phòng thí nghiệm

Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm nghiên cứu Răng Hàm Mặt, Viện Đào tạo Răng Hàm Mặt, và Trung tâm Đào tạo và Chăm sóc Sức khỏe Cộng đồng, Trường Đại học Y Hà Nội trong thời gian từ tháng 01/2020 đến tháng 11/2020.

Nguyên vật liệu, thiết bị

Nguyên vật liệu

Bảng 1. Nguyên vật liệu sử dụng trong quá trình thực nghiệm

STT	Nguyên liệu	Nhà sản xuất	Nguồn gốc	Tiêu chuẩn
1	Sodium hyaluronate	Givaudan France SAS Route de Bazancourt, 51110 Pomacle, France	Pháp	Nhà sản xuất
2	Chlorhexidine	Smaart Pharmaceuticals B - 23, MIDC, Ajantha Road, Jalgaon - 425003, Maharashtra, India	Ấn Độ	Nhà sản xuất
3	Xylitol	Roquette Freres 1, Rue de la Haute Loge, 62136 Lestrem, France	Pháp	Nhà sản xuất
4	Cremonophor rh 40	BASF SE Carl - Bosch - Str 38, 67056 Ludwigshafen, Germany	Đức	Nhà sản xuất
5	Tinh dầu bạc hà	Công ty cổ phần tinh dầu thiên nhiên Hà Nội 514/52/9 Thụy Khuê, Tây Hồ, Hà Nội, Việt Nam	Việt Nam	Nhà sản xuất

6	Tinh dầu cam	Công ty cổ phần tinh dầu thiên nhiên Hà Nội 514/52/9 Thụy Khuê, Tây Hồ, Hà Nội, Việt Nam	Việt Nam	Nhà sản xuất
7	Maltodextrin	Roquette Freres 1, Rue de la Haute Loge, 62136 Lestrem, France	Pháp	Nhà sản xuất
8	Betacyclodextrin hpb	Roquette Freres 1, Rue de la Haute Loge, 62136 Lestrem, France	Pháp	Nhà sản xuất
9	Sucralose	JK Sucralose Inc 118 Renmin East Road, Sheyang County, Jiangsu - 224300, P.R. China	Trung Quốc	Nhà sản xuất
10	Viscarin	Dupont Nutrition USA, Inc 974 Centre road Wilmington, DE 19805, United States	Mỹ	Nhà sản xuất
11	Sodium citrat	TTCA Co., Ltd No.27 Xin an nan road, Anqiu, Shandong, China	Trung Quốc	Nhà sản xuất
12	Sorbitol 70	Roquette Freres 1, Rue de la Haute Loge, 62136 Lestrem, France	Pháp	Nhà sản xuất
13	Nước cất 2 lần	Công ty cổ phần dược phẩm công nghệ cao Abipha Lô đất CN - 2, KCN Phú Nghĩa, X. Phú Nghĩa, H. Chương Mỹ, TP Hà Nội, Việt Nam	Việt Nam	Nhà sản xuất

Thiết bị nghiên cứu

Máy khuấy từ Hanna (Hanna HI 190M Magnetic - Stirrers, Hanna Instruments, 350 Trousdale Drive, Chula Vista CA 91910 USA), máy đo nồng độ đa năng (Orion Star A214, Thermo Scientific), cân điện tử (Pocket Scale MH - Series), cốc đong, pipet và các thiết bị thí nghiệm khác.

Nội dung nghiên cứu

Nghiên cứu phát triển dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus

Đánh giá được một số tính chất của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus sau bào chế.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp bào chế

Bào chế dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus

Quá trình khảo sát sơ bộ dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus được xây dựng công thức như sau: Sodium hyaluronat (chistalhyal), Chlorhexidine 20%, Xylitol, Cremophor rh 40, tinh dầu bạc hà, tinh dầu cam, Maltodextrin, Betacyclodextrin hpb, Sucralose, Viscarin, Sodium citrate, Sorbitol 70,

nước cất 2 lần.

Quy trình bào chế dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus được tóm tắt như sau:

Bước 1: Pha nước cất 2 lần với maltodextrin, chlorhexidine 20%, betacyclodextrin hpb, xylitol, sucralose, sorbitol 70. Khuấy đều trong máy khuấy từ, thu được được hỗn hợp 1.

Bước 2: Thêm tinh dầu bạc hà, tinh dầu cam, cremophor rh 40 vào nước cất 2 lần. Khuấy đều trong máy khuấy từ, thu được được hỗn hợp 2.

Bước 3: Hòa tan Sodium hyaluronat (chistalhyal), viscarin vào nước cất 2 lần. Khuấy đều trong máy khuấy từ, thu được được hỗn hợp 3.

Bước 4: Gộp 3 hỗn hợp 1, 2 và 3, thêm sodium citrate. Khuấy đều trong máy khuấy từ.

Dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus được bảo quản dưới 30 độ C, nơi khô mát, tránh ánh sáng trực tiếp.

3.3.2. Phương pháp đánh giá dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus

Phương pháp kiểm nghiệm dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus.

Sau khi bào chế dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus theo công thức NSMHAPT128 chuẩn nhóm nghiên cứu đánh giá một số tiêu chuẩn chất lượng sau:

- Đánh giá hình thức cảm quan: Dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus dung dịch trong, không đục, không kết tủa, vị hơi ngọt, không có mùi lạ. - Đánh giá nồng độ hyaluronic acid của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus

* Hóa chất, thuốc thử:

Dung dịch kali dihydrophosphat 0,05M pH: Hòa tan 6,80g KH_2PO_4 trong 900 ml nước, điều chỉnh pH của dung dịch về $\text{pH} = 7,0 \pm 0,1$ bằng dung dịch KOH 10%. Thêm nước vào vừa đủ 1000 ml. Lọc dung dịch đệm qua màng lọc 0,45 μm . Pha động: Dung dịch đệm kali dihydrophosphat 0,05M pH 7,0

* Tiến hành:

- Dung dịch thử: Hút chính xác 2,0 ml chế phẩm vào bình định mức 10 ml, thêm pha động vừa đủ, lắc đều.

- Dùng dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 40 mg sodium hyaluronat chuẩn vào bình định mức 200 ml, thêm khoảng 150 ml pha động, lắc đều, siêu âm điều âm nghĩa là gì ? đến tan hoàn toàn. Thêm pha động vừa đủ đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm (Nồng độ sodium hyaluronat 0,2 mg/ ml).

- Sự phù hợp hệ thống: Tiêm 6 lần dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic $\leq 2,0 \%$; hệ số kéo đuôi $0,8 \leq T \leq 1,2$.

- Tiêm dung dịch thử, dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc ký.

- Đánh giá nồng độ chlorhexidine của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus dựa trên tỷ lệ giữa diện tích pic sắc ký của dung dịch chuẩn so với dung dịch thử.

Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Dung môi khai triển: Ethyl acetat - amoniac đậm đặc - nước - ethanol 96% (10:10:30:50).

Dung dịch thử: Pha loãng 10,0 ml chế phẩm với nước thành 50 ml.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan 25 mg calci gluconat chuẩn trong 1 ml nước.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên trên bản mỏng 5 μL các dung dịch trên. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được 10 cm. Sấy khô bản mỏng ở 100°C trong 20 phút, để nguội và phun dung dịch kali dicromat 5% trong dung dịch acid sulfuric 40%. Sau 5 phút quan sát trên bản mỏng. Vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử, có cùng màu sắc, vị trí và kích thước với vết chính trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

- Đánh giá độ ổn định của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus

Đánh giá độ ổn định của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus ở 03 lô sản phẩm trong điều kiện nhiệt độ phòng trong 6 tháng bảo

quản.

- Đánh giá độ pH theo thời gian.

Nghiên cứu này nhằm đánh giá độ pH của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus theo thời gian ở 2 lô ở thời điểm ngay sau pha chế và sau pha chế 6 tháng.

Đánh giá tác dụng dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus

- Nuôi cấy một số loại vi khuẩn trong miệng họng thường gặp

Hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus được xác định trên một số chủng vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí sau đây được phân lập từ các bệnh nhân bị viêm loét vùng miệng họng được thực hiện tại khoa Vi sinh - Ký sinh trùng, Bệnh viện Đại học Y Hà Nội. Các chủng bao gồm:

Vi khuẩn là căn nguyên gây bệnh: *Streptococcus pyogenes* (Liên cầu nhóm A) In nghiêng tên vi khuẩn theo quy định

Vi khuẩn là vi hệ có thể gây nhiễm khuẩn hô hấp trên: *Streptococcus pneumoniae* (Phế cầu khuẩn)) In nghiêng tên vi khuẩn theo quy định

Các sinh phẩm thu thập từ bệnh nhân được tiêm vào môi trường chọn lọc và không chọn lọc thích hợp cho các vi khuẩn nhất định, được ủ trong bình kỵ khí hoặc điều kiện hiếu khí trong thời gian thích hợp. Các chủng vi khuẩn kỵ khí và vi khuẩn hiếu khí được xác định theo các nguyên tắc hiện tại.

- Xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu

Để xác định nồng độ diệt khuẩn tối thiểu của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus, 0,1 ml huyền phù của các chủng vi khuẩn kỵ khí hoặc hiếu khí, được thêm vào 1 ml chế phẩm (không pha loãng). Môi trường được tiêm vào 0,1 ml môi trường nuôi cấy vi khuẩn thích hợp để kiểm soát sự phát triển của một chủng nhất định.

Việc ủ môi trường thử nghiệm và kiểm soát được tiến hành ở 37°C trong 48 giờ trong các bình kỵ khí (trong điều kiện yếm khí) đối với

vi khuẩn kỵ khí và ở 37°C trong 24 giờ trong điều kiện hiếu khí đối với vi khuẩn hiếu khí. Việc thiếu bất kỳ vi khuẩn phát triển trong môi trường sau khi ủ dài thích hợp đã chứng minh hoạt động diệt khuẩn của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus.

- Xác định nồng độ ức chế tối thiểu

Nồng độ ức chế tối thiểu của các chủng vi khuẩn được xác định bằng phương pháp pha loãng nối tiếp. Các nồng độ tăng dần của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus được thử nghiệm. Môi trường nuôi cấy và môi trường đối chứng được ủ trong môi trường kỵ khí (trong bình kỵ khí) hoặc điều kiện hiếu khí, ở 37°C trong khoảng thời gian thích hợp tùy thuộc vào loại vi khuẩn: trong 48 giờ trong trường hợp vi khuẩn kỵ khí và trong 24 giờ trường hợp vi khuẩn hiếu khí. Nồng độ ức chế tối thiểu được định nghĩa là nồng độ thấp nhất của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus ức chế hoàn toàn sự phát triển của các chủng vi khuẩn kỵ khí hoặc hiếu khí được thử nghiệm.

Thu thập số liệu

Thu thập số liệu theo các bảng thu thập số liệu

3. Xử lý số liệu

Thu thập bằng phần mềm Epidata 3.1, phân tích số liệu và phân tích sự khác biệt bằng T - test (Stata 11.0)

Sai số và cách khắc phục

Dùng một biểu mẫu thống nhất để thu thập thông tin nghiên cứu.

Tất cả các số liệu ghi nhận đều được các nghiên cứu viên trực tiếp thực hiện.

Các thông tin đều thống nhất rõ ràng, làm sạch số liệu trước khi xử lý.

Khi nhập số liệu và xử lý được tiến hành hai lần để đối chiếu kết quả.

4. Đạo đức trong nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Trung tâm nghiên cứu Răng hàm mặt, Viện Đào tạo Răng

Hàm Mặt, Trung tâm Đào tạo và Chăm sóc Sức khỏe Cộng đồng, Trường Đại học Y Hà Nội được tuân thủ chặt chẽ các quy trình Trung tâm nghiên cứu Răng hàm mặt.

Các sản phẩm của nghiên cứu chỉ được sử dụng trong phòng thí nghiệm.

III. KẾT QUẢ

1. Xây dựng công thức và cách bào chế

- Công thức chung
- + Công thức chung được mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu
- Cách bào chế:
- + Phương pháp bào chế được mô tả trong phần phương pháp nghiên cứu
- + Phương pháp bào chế tối ưu sẽ được lựa chọn sau khi có kết quả đánh giá sơ bộ về hình thức cảm quan ngay sau pha, kết hợp với kết quả phân tích sâu hơn về sự ổn định về nồng độ Sodium hyaluronate, chlorhexidine, pH, tại các thời điểm sau 6 tháng.

2. Đánh giá được một số tính chất của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus sau bào chế.

2.1. Đánh giá hình thức cảm quan:

Bảng 2. Đặc điểm dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus sau khi pha

Quan sát qua kính hiển vi lỗi phóng đại 200 lần

Cách pha	Mẫu	n	Màu sắc		Độ tủa		Hương vị	
			Đạt (%)	Không đạt (%)	Không tủa (%)	Tủa (%)	Đắng, chua	Ngọt, nhẹ
Cách pha 1	Dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus	20	100%	0,0	100%	0,0	Không	Ngọt nhẹ
Cách pha 2	Dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus	20	100%	0,0	100%	0,0	Không	Ngọt nhẹ

Dung dịch pha chế theo 2 cách cho kết quả tốt ngay sau pha về màu sắc và độ tủa lại tức thì của dung dịch, hương vị ngọt, nhẹ. 100% số mẫu sau pha không có tủa và màu sắc đồng nhất so với mẫu màu chuẩn.

2.2. Định lượng sodium hyaluronate

Bảng 3. Định lượng phần % sodium hyaluronate trong dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus

Lần	1	2	3	4	5
Thể tích dung dịch chế phẩm: V(ml)	50	50	50	50	50
% Sodium hyaluronate (cách pha 1)	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
% Sodium hyaluronate (cách pha 2)	0,03	0,03	0,03	0,03	0,03

Cân chỉnh giữa các số cho bằng cân đối

Phần trăm sodium hyaluronate ngay sau pha có nồng độ là của cách pha là những biến chuẩn, đạt $0,025 \pm 0,01\%$ và $0,03 \pm 0,01\%$

2.3. Định lượng Chlorhexidine

Bảng 4. Định lượng phần % Chlorhexidine trong dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus

Lần	1	2	3
Thể tích dung dịch chế phẩm: V(ml)	50	50	50
% Chlorhexidine gluconate	0,11 ± 0,01	0,11 ± 0,01	00,11 ± 0,01

Cân chỉnh giữa các số cho bằng cân đối

Phần trăm Chlorhexidine gluconate ngay sau pha có nồng độ là của cách pha là những biến chuẩn, đạt 0,11 ± 0,01%

2.4. Đánh giá độ pH theo thời gian

Bảng 5. Đánh giá độ pH của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus theo thời gian

Cách pha	Thời điểm	N	pH max	pH min	pH trung bình	p
Cách 1	Ngay sau pha	10	7,30	7,11	7,22 ± 0,10	0,38
	Sau 6 tháng	10	7,40	7,15	7,31 ± 0,13	
Cách 2	Ngay sau pha	10	7,40	7,12	7,25 ± 0,20	0,25
	Sau 6 tháng	10	7,43	7,21	7,32 ± 0,21	

Độ ổn định pH ở thời điểm sau pha là 7,22 ± 0,10 (n = 10), 7,25 ± 0,20 (n = 10), pH trung bình sau pha 6 tháng là 7,31 ± 0,13 (n = 10), 32 ± 0,21 (n = 10). Sự khác biệt pH ngay sau pha và pH sau 6 tháng là không có ý nghĩa thống kê (p = 0,38).

2.5. Đánh giá tác dụng của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus

Bảng 6. Hoạt tính diệt khuẩn (MBC - nồng độ diệt khuẩn tối thiểu) với dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus của vi khuẩn được phân lập từ bệnh nhân bị nhiễm trùng đường hô hấp

Vi khuẩn	Số lượng chủng được thử nghiệm	Số lượng chủng nhạy cảm với dung dịch				
		Sau 30 giây	Sau 1 phút	Sau 30 phút	Sau 1 giờ	Sau 8 giờ
Vi khuẩn Gram dương:						
Streptococcus pyogenes	2	2	2	2	2	2
Streptococcus pneumoniae	2	2	2	2	2	2
Tổng cộng	4	4	4	4	4	4

Trong trường hợp vi khuẩn Gram dương, 30 giây phút sau khi sử dụng dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus chứa 0,12% chlorhexidine, 100% vi khuẩn Gram dương được thử nghiệm đã bị tiêu diệt theo cả hai cách pha.

Bảng 7. Độ nhạy (MIC - nồng độ ức chế tối thiểu) với dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus của vi khuẩn được phân lập từ bệnh nhân bị nhiễm trùng đường hô hấp

Vi khuẩn	Số lượng chủng được thử nghiệm	Nồng độ sodium hyaluronate	
		0,025	0,03
Vi khuẩn Gram dương:			
Streptococcus pyogenes	2	2	2
Streptococcus pneumonia	2	2	2
Tổng cộng	4	4	4

Trong trường hợp vi khuẩn Gram dương, 100% vi khuẩn Gram dương được thử nghiệm đã bị tiêu diệt theo cả hai cách pha, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa hai cách pha

IV. BÀN LUẬN

Đã xây dựng được công thức và quy trình bào chế dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus trong phòng thí nghiệm dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus sau khi pha có dung dịch trong, không kết tủa, vị hơi ngọt, không có mùi lạ. Với thành phần công thức xây dựng, mẫu pha có sự ổn định về pH, phần trăm sodium hyaluronate, Chlorhexidine và không tủa, màu sắc tốt sau theo dõi 6 tháng.

Đánh giá được một số tính chất của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus sau bào chế: Dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus có phần trăm chlorhexidine trung bình ngay sau pha là $0,11 \pm 0,01$. Chlorhexidine với nồng độ khác nhau có sẵn trên thị trường, chủ yếu dao động từ 0,02 đến 0,3%; tuy nhiên, gần đây, Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) đã giới thiệu dung dịch nồng độ cao (3,5%) được pha loãng với nước trước khi sử dụng. Trong các nghiên cứu in vivo⁹, cơ chế hoạt động của chlorhexidine dường như phụ thuộc vào liều: ức chế vi khuẩn ở nồng độ rất thấp (0,02 - 0,06%) và diệt khuẩn ở nồng độ cao hơn (0,12 - 0,2%). Như vậy dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus bào chế đạt yêu cầu về nồng độ ở mức diệt khuẩn. FDA đề nghị sử dụng chlorhexidine (ở nồng độ 0,11 - 0,12%).^{10,11}

pH của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid

Plus trung bình ngay sau pha là $7,22 \pm 0,10$ và sau pha 6 tháng là $7,31 \pm 0,13$, pH trên đạt yêu cầu về pH theo tiêu chuẩn cơ sở. Không có sự khác biệt pH sau 6 tháng do đó dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus có pH ổn định sau bào chế. pH của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus có độ pH 7,1 - 7,4 tương ứng pH trung tính và tương hợp với pH môi trường họng miệng, do vậy việc sử dụng dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus an toàn trên lâm sàng.

Về tác dụng dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus trong dự phòng và điều trị viêm loét vùng miệng họng trong phòng thí nghiệm: Mục đích của nghiên cứu là xác định hoạt tính kháng khuẩn của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus chống lại vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí thường gặp nhất, được phân lập từ những bệnh nhân bị nhiễm trùng đường hô hấp.

Nghiên cứu được thực hiện trong điều kiện trong phòng thí nghiệm. Tất cả các thử nghiệm được thực hiện ở nhiệt độ 37°C, tương tự như nhiệt độ được tìm thấy trong khoang miệng và đường hô hấp trên của một người khỏe mạnh. Nhiễm trùng do vi khuẩn, vi rút hoặc nấm thường gây ra tăng nhiệt độ, có thể được kiểm soát bằng cách sử dụng thuốc hạ sốt. Độ pH trung tính được tìm thấy trong khoang miệng và

đường hô hấp trên tương tự như phản ứng pH của môi trường được sử dụng (7,1 - 7,4). Sự tiếp xúc của vi sinh vật với dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus trong các điều kiện thí nghiệm kéo dài 1 phút và 8 giờ đối với vi khuẩn kỵ khí và hiếu khí. Trong điều kiện *in vivo*, sự tiếp xúc của vi khuẩn với các thành phần của chế phẩm ban đầu được giới hạn trong hoạt động cục bộ trong vài phút của dung dịch, bao phủ niêm mạc của khoang miệng và cổ họng; tuy nhiên, sau khi hấp thụ các thành phần hoạt tính bởi niêm mạc của khoang miệng và cổ họng, các thành phần hoạt tính sẽ thể hiện hoạt tính kháng khuẩn. Các chủng vi khuẩn được sử dụng trong nghiên cứu được phân lập từ mẫu bệnh phẩm thu được từ các bệnh nhân bị nhiễm trùng đường hô hấp.

Dung dịch cho thấy hoạt tính diệt khuẩn tuyệt vời (nồng độ để sử dụng) chống lại các chủng vi khuẩn được thử nghiệm. Trong trường hợp vi khuẩn Gram dương, 30 giây sau khi sử dụng dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus, 100% vi khuẩn Gram dương đã bị tiêu diệt cả ở hai nhóm *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*. Kết quả của nghiên cứu về độ nhạy (MIC - nồng độ ức chế tối thiểu) cho thấy dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus ức chế sự phát triển của vi khuẩn Gram dương ở cả hai cách pha. Hiệu quả này là do có dung dịch chứa 0,12% chlorhexidine. Các vi khuẩn Gram dương được thử nghiệm cho thấy độ nhạy cao đối với dung dịch.

V. KẾT LUẬN

Đã xây dựng được công thức và cách bào chế dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus với thành phần công thức xây dựng, mẫu pha có sự ổn định về pH, tỷ lệ phần trăm sodium hyaluronate và chlorhexidine, không tủa, màu sắc tốt sau khi pha và sau theo dõi 6 tháng cho kết quả nồng độ sodium hyaluronate dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus là $0,025 \pm 0,001$

và $0,03 \pm 0,001$. Nồng độ Chlorhexidine sau bào chế của dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus là $0,110 \pm 0,001$. Độ pH sau bào chế nằm trong khoảng 7,1 - 7,4 ngay sau pha và sau 6 tháng. Dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus có độ ổn định tốt về màu sắc, mùi vị và không tủa sau 6 tháng trên thực nghiệm. Như vậy dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus ổn định tốt sau bào chế 6 tháng.

Dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus có khả năng diệt khuẩn và ức chế vi khuẩn tốt Vi khuẩn Gram dương, 30 giây sau khi sử dụng dung dịch xịt họng Hyaluronic Acid Plus, 100% vi khuẩn Gram dương đã bị tiêu diệt cả ở hai nhóm *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ialenti A, Di Rosa M. Hyaluronic acid modulates acute and chronic inflammation. *Agents and Actions*. 1994; 43: 44 - 47.
2. Manzanares D, Monzon ME, Savani RC, và cs. Apical oxidative hyaluronan degradation stimulates airway ciliary beating via RHAMM and RON. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 2007; 37: 160 - 168.
3. Laurent TC. The Chemistry, Biology and Medical Applications of Hyaluronan and its Derivatives. London: Portland Press 1998.
4. Sutherland IW. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends in Biotechnology*. 1998; 16: 41 - 46.
5. Chen WY, Abatangelo G. Functions of hyaluronan in wound repair. *Wound Repair and Regeneration*. 1999; 7: 79 - 89.
6. Bertolami CN, Messadi DV. The role of proteoglycans in hard and soft tissue repair. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1994; 5: 311 - 337.
7. Nolan A, Baillie C, Badminton J, và cs. The efficacy of topical hyaluronic acid in the management of recurrent aphthous ulceration.

Journal of Oral Pathology & Medicine. 2006;35: 461 - 465.

8. Lee JH, Jung JY, Bang D. The efficacy of topical 0.2% hyaluronic acid gel on recurrent oral ulcers: Comparison between recurrent aphthous ulcers and the oral ulcers of Behcet's disease. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2008;22: 590 - 595.

9. Jenkins S, Addy M, Wade W. The

mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *J Clin Periodontol*.1988;15:415 - 24.

10. Chlorhexidine - FDA Official Information, side effect and Use. www.drugs.com. www.drugs.com. 2011; Available at: <http://www.drugs.com/pro/chlorhexidine.html>.

11. Ellepola AN, Samaranayake LP. Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: a review. *Oral Dis*.2001;7:11.

Summary

IN VITRO PREPARATION OF HYALURONIC ACID IN THROAT SPRAY AND EVALUATION OF ITS EFFECTIVENESS IN OROPHARYNGEAL MUCOSITIS

High - molecular weight hyaluronate performs important functions on tissue repair, tissue hydration, defense against micro - organisms, and regulates inflammatory responses as well. Our open, in vitro study was carried out to investigate the efficacy of exogenous high molecular weight sodium hyaluronate and chlorhexidine digluconate. Results show significant stability of Hyaluronic Acid Plus throat spray after 6 months of preparation. Gram - positive bacteria were eradicated in both groups *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus pneumoniae* after using Hyaluronic Acid Plus throat spray in 30 seconds. We conclude that Hyaluronic Acid Plus throat spray is effective and safe in the treatment of oropharyngeal mucositis and the current study provides additional and useful information about treatment of oropharyngeal mucositis, by using Hyaluronic Acid Plus throat spray although more extended studies are recommended to confirm our findings.

Keywords: digluconate, oropharyngeal mucositis