



Original Article

Investigation of Lyophilized Microspheres Loaded with Leuprolide Acetate

Nguyen Thanh Lam¹, Ngo Giao Thong¹, Tran Thi My Duyen¹,
Bui Thi Thuong², Tran Thi Hai Yen^{1,*}

¹Hanoi University of Pharmacy, 13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam

²VNU University of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Received 14 February 2023

Revised 27 February 2023; Accepted 10 March 2023

Abstract: Leuprolide acetate (LA) - a nonapeptide, used for the treatment of some hormone-depending diseases, is unstable and very susceptible to degradation in the aqueous media. Poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) is a copolymer of lactide and glycolide, that has generated tremendous interest in pharmaceuticals because of their excellent biocompatibility, biodegradability, and mechanical strength. PLGA is used for the preparation of biocompatible biodegradable extended-release microspheres. However, the PLGA undergoes hydrolytic degradation in an aqueous environment through cleavage of its backbone ester linkages. As a consequence, PLGA-based microspheres loaded with LA are usually lyophilized to ensure the stability of LA and PLGA and reduce agglomeration, sedimentation, and size change of microspheres during storage. The aim of this present study is to evaluate the influence of lyoprotectants namely mannitol, trehalose, lactose, and saccharose on the stability of LA and characteristics of PLGA-based microspheres loaded with LA upon lyophilization. DSC and FTIR were used to evaluate the biocompatibility of LA and lyoprotectants. The results showed that there was no incompatibility between the LA and lyoprotectants. Mannitol solution 1.25% was used in freeze-drying PLGA-based microspheres loaded with LA. The obtained lyophilized microspheres had a good appearance and low moisture. Lyophilized microspheres after reconstitution had no significant change in drug content, size, and size distribution in comparison to that before freeze-drying.

Keywords: Leuprolide acetate, PLGA, lyophilized, stability, biodegradable microspheres.

* Corresponding author.

E-mail address: yenthth@hup.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4487>

Nghiên cứu bào chế vi cầu leuprolid acetat đông khô

Nguyễn Thành Lâm¹, Ngô Giao Thông¹, Trần Thị Mỹ Duyên¹,
Bùi Thị Thương², Trần Thị Hải Yến^{1,*}

¹Trường Đại học Dược Hà Nội, 13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Trường Đại học Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Nhận ngày 14 tháng 02 năm 2023

Chỉnh sửa ngày 27 tháng 02 năm 2023; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 3 năm 2023

Tóm tắt: Leuprolide acetat (LA) - một nonapeptide, được sử dụng để điều trị một số bệnh phụ thuộc vào hormon, dễ bị phân hủy trong môi trường nước. Polyme poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) là một chất đồng trùng hợp của lactide và glycolide, đã được sử dụng nhiều làm chất mang trong dược phẩm vì khả năng tương thích sinh học, khả năng phân hủy sinh học và độ bền cơ học tuyệt vời của chúng. PLGA được sử dụng để bào chế các vi cầu giải phóng kéo dài phân hủy sinh học. Tuy nhiên, PLGA bị phân hủy trong môi trường nước do bị thủy phân thông qua sự phân cắt các liên kết este của nó. Do đó, các vi cầu sử dụng chất mang PLGA chứa dược chất LA (vi cầu PLGA-LA) thường được đông khô để đảm bảo tính ổn định của LA và PLGA, đồng thời giảm sự kết tụ, lắng đọng và thay đổi kích thước của các vi cầu trong quá trình bảo quản. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của các tá dược đông khô là mannitol, trehalose, lactose và saccharose đối với tính ổn định của LA và các đặc tính của các vi cầu dựa trên PLGA được nạp LA khi đông khô. DSC và FTIR đã được sử dụng để đánh giá khả năng tương thích sinh học của LA và chất bảo vệ tế bào. Kết quả cho thấy không có sự tương kỵ giữa LA và các tá dược đông khô. Dung dịch manitol 1,25% được lựa chọn sử dụng để đông khô vi cầu. Vi cầu PLGA-LA đông khô thu được có hình thức bánh đẹp, độ ẩm thấp. Vi cầu đông khô sau khi hoàn nguyên không có sự thay đổi đáng kể về hàm lượng dược chất, kích thước và sự phân bố kích thước so với trước khi đông khô.

Từ khóa: Leuprolide acetat, PLGA, đông khô, độ ổn định, vi cầu phân hủy sinh học.

1. Mở đầu

Leuprolid acetat là một nonapeptid tổng hợp có tác dụng tương tự chất chủ vận gonadotropin release hormon (GnRH), được sử dụng để điều trị các rối loạn liên quan đến hormon giới tính bao gồm: ung thư tuyến tiền liệt, lạc nội mạc tử cung, u xơ tử cung và dậy thì sớm phụ thuộc hormon [1]. Vi cầu phân hủy sinh học cấu tạo từ PLGA mang LA được nghiên cứu phát triển thành dạng thuốc giải phóng kéo dài để thuận lợi cho bệnh nhân điều trị dài ngày.

Leuprolid acetat có tính base yếu, có bản chất là một peptid chứa 9 acid amin khác nhau nên được chất dễ bị thủy phân thành dạng không còn hoạt tính. Poly (lactic-co-glycolic) acid (PLGA) là polyme phân hủy sinh học ổn định với nhiệt trong điều kiện không có mặt của nước. Tuy nhiên, trong môi trường nước PLGA bị thủy phân hay phân hủy sinh học thông qua sự phân cắt mạch tại các liên kết ester trong phân tử [2]. Vì vậy, cần thiết duy trì độ ổn định của hệ vi cầu PLGA chứa dược chất leuprolid acetat (PLGA-

* Tác giả liên hệ.

Địa chỉ email: yentth@hup.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4487>

LA) trong quá trình bảo quản. Do đó, vi cầu PLGA-LA thường được đông khô để đảm bảo độ ổn định của dược chất và PLGA. Ngoài ra, đông khô vi cầu giúp giảm sự kết tụ, sa lắng, thay đổi về kích thước của vi cầu trong quá trình lưu trữ bảo quản. Chính vì vậy, để góp phần nâng cao tính ổn định của vi cầu PLGA-LA, nghiên cứu khảo sát ảnh hưởng của các tá dược đông khô với mục đích bào chế được vi cầu PLGA-LA đông khô.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu và thiết bị

Leuprolid acetat được cung cấp bởi Chengdu YoungShe Chemical Co. Ltd (Trung Quốc); PLGA (50:50), gelatin B được cung cấp bởi Sigma-Aldrich (Mỹ); polyvinyl alcohol (PVA) được cung cấp bởi Sinopharm chemical Reagent Co., Ltd.; acetonitril, methanol, amoni dihydrophosphat, kali dihydrophosphat, natri hydroxyd, dimethyl sulfoxid (DMSO) được cung cấp từ Merck (Đức); acid phosphoric, natri clorid, dicloromethan được mua từ Xilong Scientific, Trung Quốc; nước tinh khiết được điều chế tại phòng thí nghiệm (Việt Nam).

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Shimadzu (Nhật), cột InertSustain C18 5 μ m – 4,6 x 250 mm (Nhật), thiết bị đông khô (Alpha 1-2 LD Plus, Đức), máy quét nhiệt vi sai Mettler - Toledo DSC1 (Thụy sĩ), máy đo phổ hồng ngoại FTIR-1S (Nhật Bản), thiết bị đo KTTTP Mastersizer 3000E (Anh), máy chuẩn độ METTLER TOLEDO DL31/DL38 (Nhật), kính hiển vi điện tử quét SEM máy Regulus8100-HITACHI (Nhật Bản), thiết bị hấp thụ huỳnh quang Cary eclipse agilent (Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp đánh giá tính tương hợp của dược chất và tá dược đông khô

Cân chính xác khoảng 5 mg LA hòa tan hoàn toàn trong 1,5 ml các dung dịch đường mannitol, trehalose, lactose, saccarose (nồng độ 10% (kl/kl)) để tạo thành dung dịch rồi tiến hành đông khô. Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 2 °C-8 °C

trong lọ thủy tinh, đậy bằng nút cao su, bọc màng parafilm cho đến khi tiến hành phân tích. Trước khi phân tích, mẫu được đưa về nhiệt độ phòng trong bình hút ẩm. Ở các thời điểm ban đầu, ngày 4, ngày 8, ngày 15 và ngày thứ 21, mẫu nghiên cứu được đánh giá hàm lượng dược chất còn lại trong mẫu bằng phương pháp HPLC; những thông số về nhiệt như nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh (T_g), nhiệt độ nóng chảy (T_m), nhiệt độ phân hủy (T_d) (nếu có) được xác định dựa trên phổ DSC của mẫu nghiên cứu.

2.2.2. Phương pháp bào chế vi cầu PLGA-LA

Phương pháp bào chế vi cầu PLGA-LA đông khô

Qua tham khảo các tài liệu, vi cầu PLGA-LA được bào chế bằng phương pháp nhũ hóa kép bốc hơi dung môi [4]. Hòa tan 60 mg LA trong 0,6 ml đệm phosphat pH 7,4, sau đó thêm 6,6 mg gelatin, làm ấm cốc qua nước nóng cho đến khi gelatin tan hoàn toàn thu được pha nước nội. Hòa tan 360 mg PLGA (L:G 50:50) 7-17kDa và 24-38 kDa ở tỉ lệ 1:1 (kl/kl) bằng 4 ml DCM, thu được pha dầu. Ngâm cốc thủy tinh chứa pha nước nội vào nước đá để đạt nhiệt độ từ 5-10 °C. Phối pha dầu vào pha nước, tiến hành đồng nhất hóa ở tốc độ 12000 vòng/phút trong 5 phút, thu được nhũ tương N/D. Chuyển nhũ tương N/D sang cốc 25 ml được đặt trong cốc nước đá; thêm 10 ml dung dịch PVA 1,5% - NaCl 1,5% và tiến hành đồng nhất hóa ở tốc độ 4000 vòng/phút trong thời gian 40 giây, thu được nhũ tương kép N/D/N. Chuyển nhũ tương kép sang cốc có mỏ 100 ml, thêm 20 ml dung dịch PVA 1,5% - natri clorid 1,5% và sục khí nitrogen với tốc độ 20 ml/phút trong 30 phút để rắn hóa vi cầu. Sau khi rắn hóa, chuyển toàn bộ hỗn dịch vi cầu vào ống ly tâm, đem ly tâm lạnh với tốc độ 5000 vòng/phút, thời gian 5 phút, nhiệt độ 5 °C. Sau đó gạn bỏ nước, thu vi cầu. Rửa vi cầu bằng 20 ml nước cất 2 lần, rồi tiếp tục đem ly tâm lạnh lần 2 với tốc độ 5000 vòng/phút, thời gian 5 phút, nhiệt độ 5 °C. Gạn bỏ nước, thu được bột nhào vi cầu.

Phân tán toàn bộ bột nhào vi cầu trong 15 ml dung dịch tá dược đông khô phù hợp rồi rây qua rây 125 μ m thu được hỗn dịch vi cầu, đặt hỗn

dịch vi cầu lên máy khuấy từ. Định lượng hàm lượng được chất trong 1 ml hỗn dịch bằng phương pháp HPLC như mô tả ở mục 2.2.3. Sau đó, hút thể tích vi cầu tương ứng 3,75 mg được chất LA cho vào lọ thủy tinh. Đậy lọ bằng nút cao su. Đem đông lạnh ở -70 °C trong 7 giờ, sau đó chuyển vào thiết bị đông khô (Alpha 1-2 LD Plus, Đức) để thăng hoa dung môi ở nhiệt độ -50 °C, áp suất 0,04 mbar trong 24 giờ và sấy ở nhiệt độ 25 °C trong 4 giờ.

2.2.3. Phương pháp định lượng được chất

Hàm lượng được chất được định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) trên hệ thống Shimadzu (Nhật). Dựa trên tài liệu tham khảo [3] và điều kiện thực tiễn lựa chọn điều kiện sắc ký như sau: cột InertSustain C18 5µm – 4,6 x 250 mm (Nhật); pha động là hỗn hợp dung dịch amoni dihydrophosphat 0,03M (pH 4) và acetonitril với tỉ lệ 80:20 (tt/tt); nhiệt độ cột ở 25 °C; tốc độ dòng là 0,8 ml/phút; thể tích tiêm mẫu: 50 µL; detector UV ở bước sóng 245 nm; dung dịch pha mẫu là amoni dihydrophosphat 0,03M (pH 4,0). Mẫu chuẩn và mẫu thử được pha đến nồng độ thích hợp bằng DMSO và dung dịch pha mẫu.

Khối lượng LA trong vi cầu khô (m_{LA}) được tính theo công thức:

$$m_{LA} = \frac{A_t \times D_t \times m_c \times f_c}{A_c \times D_c} \times 100\%$$

Trong đó:

m_{LA} : khối lượng LA trong vi cầu khô đã định lượng (mg);

m_c : khối lượng LA đã cân để làm mẫu chuẩn (mg);

f_c : độ tinh khiết của chuẩn;

A_c : diện tích pic mẫu chuẩn (mAU.s);

A_t : diện tích pic mẫu thử (mAU.s);

D_c : hệ số pha loãng của mẫu chuẩn;

D_t : hệ số pha loãng của mẫu thử.

Hiệu suất vi cầu hóa (EE%) được đánh giá bằng cách so sánh hàm lượng phần trăm được chất trong vi cầu thực tế (LC_{tt}) với hàm lượng phần trăm được chất trong vi cầu lý thuyết (LC_{lt}). Hiệu suất vi cầu hóa được tính theo công thức:

$$EE\% = \frac{LC_{tt}}{LC_{lt}} \times 100\%$$

Hàm lượng phần trăm được chất trong vi cầu lý thuyết (LC_{lt}) được tính theo công thức:

$$LC_{lt} = \frac{m_{LA \text{ ban đầu}}}{m_{LA \text{ ban đầu}} + m_{gelatin} + m_{PLGA} + m_{manitol}} \times 100\%$$

Hàm lượng phần trăm được chất trong vi cầu thực tế (LC_{tt}) được tính theo công thức:

$$LC_{tt} = \frac{m_{LA}}{m_{vi \text{ cầu}}} \times 100\%$$

Trong đó:

$m_{LA \text{ ban đầu}}$: khối lượng LA dùng khi bào chế (mg);

$m_{gelatin}$: khối lượng gelatin dùng khi bào chế (mg);

m_{PLGA} : khối lượng PLGA dùng khi bào chế (mg);

$m_{vi \text{ cầu}}$: khối lượng vi cầu khô đã cân để định lượng (mg);

2.2.4. Phương pháp phân tích nhiệt quét vi sai (DSC)

Cân chính xác khoảng 5-10 mg mẫu phân tích cho vào đĩa nhôm, hàn kín, đưa vào buồng máy quét nhiệt vi sai Mettler - Toledo DSC1 (Thụy sĩ). Tiến hành gia nhiệt lần 1 trong khoảng 20-120 °C. Kết thúc lần chạy đầu tiên, lò được làm lạnh về nhiệt độ 25 °C. Sau đó, tiến hành gia nhiệt lần 2 với khoảng nhiệt độ từ 0 °C đến 250 °C. Trong 2 lần gia nhiệt, vận tốc gia nhiệt được giữ không đổi ở tốc độ 10 °C/phút và sử dụng lưu lượng khí nitrogen là 50 ml/phút. Ghi lại phổ phân tích nhiệt quét vi sai của mẫu phân tích ở lần gia nhiệt thứ 2.

2.2.5. Phương pháp quét phổ hồng ngoại (FTIR)

Cân khoảng 2-5 mg mẫu phân tích, trộn đều và nghiền mịn với KBr theo tỉ lệ 1:100, ép bằng máy ép thủy lực thành viên mỏng gần như trong suốt. Quét phổ của mẫu đã chuẩn bị trên máy đo phổ hồng ngoại FTIR -1S (Nhật Bản) trong phạm vi số sóng từ 400 đến 4000 cm^{-1} (độ phân giải 4 cm^{-1}), lấy tín hiệu trung bình trên 20 lần quét.

2.2.6. Phương pháp đánh giá một số đặc tính của vi cầu PLGA-LA

Tính chất bánh đông khô

Sản phẩm thu được sau đông khô phải có màu trắng đục, cấu trúc bánh xốp, mịn. Vi cầu đông khô khi phân tán lại trong nước là hỗn dịch màu trắng đục đồng nhất, không có lắng cặn tinh thể, không có các tiểu phân có kích thước lớn có thể quan sát được bằng mắt thường, có thể sa lắng khi để yên nhưng khi lắc nhẹ sẽ phân tán đồng nhất trở lại.

Kích thước tiểu phân (KTTP) của vi cầu được xác định trên thiết bị đo KTTP Mastersizer 3000E (Anh).

Tiến hành: cho khoảng 400 ml nước tinh khiết vào cốc có mỏ 500 ml. Đặt cốc vào máy đo Mastersizer 3000E. Nhỏ hỗn dịch vi cầu vào cốc cho đến khi độ đục đạt khoảng 1-6%. Đo và đọc kết quả.

Các thông số của phép đo bao gồm $D[4,3]$ (μm): KTTP trung bình theo thể tích; $Dv(90)$ (μm): Phân vị 90% vi cầu có kích thước dưới $Dv(90)$; Span: đánh giá phân bố KTTP, Span càng nhỏ thì khoảng phân bố càng hẹp, $\text{Span} < 5$ là giá trị có thể chấp nhận được.

Hàm ẩm: được xác định trên thiết bị máy chuẩn độ METTLER TOLEDO DL31/DL38 (Nhật) bằng phương pháp chuẩn độ Karl Fisher.

Hàm lượng dược chất: tiến hành định lượng như phương pháp mô tả ở mục 2.2.3.

Hình thái vi cầu PLGA - LA: được thực hiện trên kính hiển vi điện tử quét SEM máy Regulus8100- HITACHI (Nhật Bản). Hỗn dịch vi cầu được ly tâm ở 5000 vòng/phút trong 5 phút để thu lấy tủa, rửa tủa bằng nước tinh khiết và ly tâm để loại dịch rửa, sau đó mẫu được sấy trong tủ sấy chân không ở 40 °C trong 24 giờ, cố định trên đế carbon, sau đó phủ Platin để tăng tính dẫn điện và tiến hành chụp SEM. Vi cầu đông khô được xử lý như sau: lấy một lượng vừa đủ mẫu vi cầu cho lên một đế cacbon, sau đó phủ một lớp Platin mỏng trong 35 giây lên mẫu để tăng độ dẫn điện rồi đưa vào buồng chứa mẫu, điện thế đo ở mức 1 hoặc 1,5 kV, độ phóng đại từ 3000 đến 10 000 lần.

2.2.7. Phương pháp thử giải phóng dược chất in vitro điều kiện cấp tốc

Sử dụng phương pháp lấy mẫu và phân tách [4]: 1 lọ vi cầu đông khô được hoàn nguyên bằng

2 ml nước, sau đó được chuyển vào lọ thủy tinh dung tích 100 ml chứa sẵn 78 ml môi trường đệm phosphate saline pH 7,4 chứa polysorbate 80 0,02% ở 50 °C $\pm$ 0,5.

Một lượng hỗn dịch vi cầu tương đương với 3,75 mg dược chất LA được chuyển vào bình định mức 5 ml, thêm môi trường đệm phosphate saline pH 7,4 vừa đủ đến vạch. Sau đó chuyển vào lọ thủy tinh có chứa sẵn 75 ml môi trường đệm phosphate saline pH 7,4 chứa polysorbate 80 0,02% ở 50 °C $\pm$ 0,5.

Tại mỗi thời điểm nhất định, lấy 2 ml môi trường giải phóng, lọc qua màng 0,45 μm để định lượng phần dược chất đã giải phóng (pha loãng nếu cần), rồi bổ sung lại một thể tích môi trường tương ứng. Mẫu thử được đo trên thiết bị hấp thụ huỳnh quang Cary Eclipse Agilent (Mỹ).

Lượng dược chất giải phóng từ vi cầu theo thời gian được tính toán như sau:

Nồng độ dược chất trong mẫu thử giải phóng tại thời điểm thứ i:

$$C_i = \frac{F_i - F_b}{F_s - F_b} \times \frac{m_c \times f_c}{D_c} \times D_i$$

Lượng dược chất giải phóng từ vi cầu tại các thời điểm thứ i:

$$\% \text{ giải phóng}_i = \frac{C_i \times V_m + 2 \times \sum_{j=1}^{i-1} C_j}{m_t \times C_0} \times 100\%$$

Trong đó:

C_0 : hàm lượng LA có trong vi cầu thử giải phóng;

C_i : nồng độ dược chất trong mẫu thử giải phóng tại thời điểm thứ i (mg/ml);

F_i : cường độ huỳnh quang của mẫu thử giải phóng tại thời điểm thứ i (A.U);

F_b : cường độ huỳnh quang của mẫu trắng (A.U);

F_s : cường độ huỳnh quang của mẫu LA chuẩn so sánh (A.U);

D_i : độ pha loãng của mẫu thử giải phóng tại thời điểm thứ i;

D_c : độ pha loãng của mẫu chuẩn;

m_c : khối lượng LA chuẩn (mg);

f_c : độ tinh khiết của LA;

m_t : khối lượng vi cầu thử giải phóng (mg);

V_m : thể tích môi trường thử giải phóng (ml).

3. Kết quả

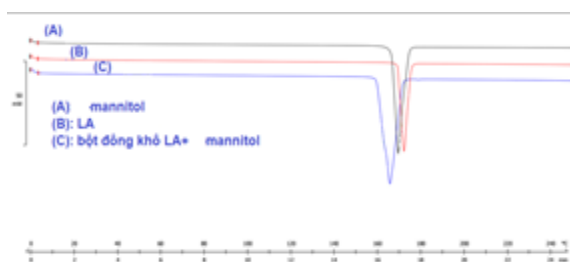
3.1. Khảo sát tính tương hợp của dược chất và tá dược đông khô

3.1.1. Hàm lượng dược chất

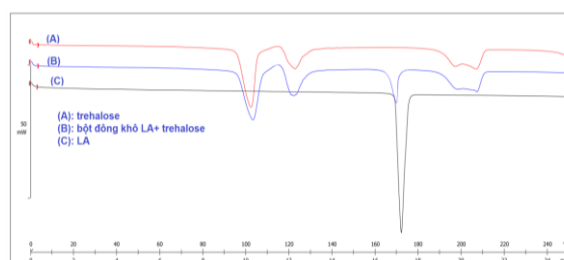
Kết quả định lượng dược chất trong các hỗn hợp bột đông khô của dược chất và từng tá dược đông khô được trình bày trong Bảng 1.

Bảng 1. Tỷ lệ LA còn lại (%) trong bột đông khô của dược chất và từng tá dược đông khô (TB $\pm$ SD, n=3)

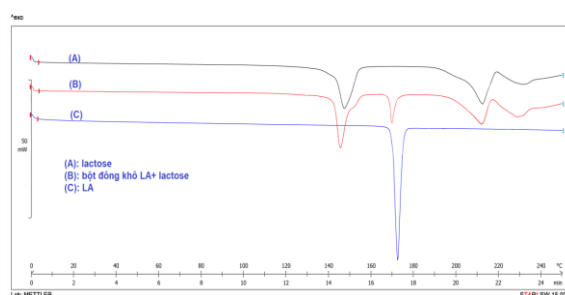
Ngày	Tỷ lệ LA còn lại (%)			
	Mannitol	Trehalose	Lactose	Saccharose
0	100,00	100,00	100,00	100,00
4	101,12 $\pm$ 2,11	100,87 $\pm$ 0,12	101,23 $\pm$ 1,22	101,31 $\pm$ 2,19
8	101,46 $\pm$ 0,46	101,74 $\pm$ 0,02	100,62 $\pm$ 1,27	102,37 $\pm$ 1,59
15	100,02 $\pm$ 2,48	100,27 $\pm$ 0,58	100,21 $\pm$ 1,83	101,4 $\pm$ 0,43
21	101,76 $\pm$ 1,89	100,42 $\pm$ 0,34	101,27 $\pm$ 1,25	102,07 $\pm$ 1,02
28	100,42 $\pm$ 1,08	100,51 $\pm$ 0,44	100,78 $\pm$ 0,28	101,32 $\pm$ 1,73



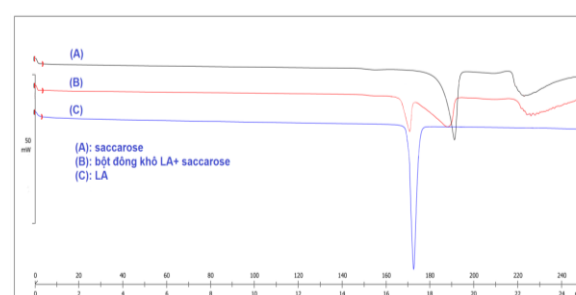
Hình 1. Phổ DSC của mannitol (A), LA (B), bột đông khô LA+ mannitol (C).



Hình 2. Phổ DSC của trehalose (A), LA (C), bột đông khô của LA+ trehalose (B).



Hình 3. Phổ DSC của lactose (A), bột đông khô LA+ lactose (B), LA (C).



Hình 4. Phổ DSC của saccharose (A), bột đông khô LA+ saccharose (B), LA (C).

Sau 28 ngày, tỷ lệ LA trong các mẫu đông khô với các tá dược đông khô mannitol, trehalose, lactose, saccharose gần như không thay đổi so với ban đầu. Các loại tá dược trên không làm giảm hàm lượng của LA trong và sau quá trình đông khô, bảo quản.

3.1.2. Giảm đồ nhiệt quét vi sai (DSC)

Phổ phân tích nhiệt quét vi sai của dược chất LA, các tá dược (mannitol, trehalose, lactose, saccharose), hỗn hợp bột đông khô của dược chất - tá dược được trình bày trong Hình 1 đến Hình 4.

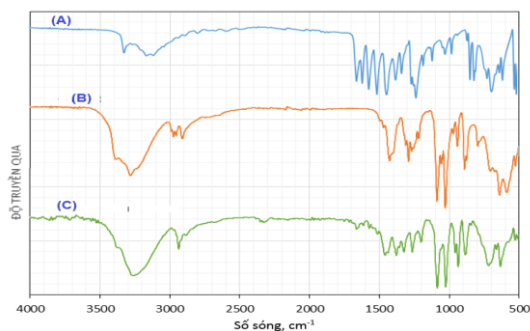
Giảm đồ DSC trên Hình 1 cho thấy LA có một cực đại thu nhiệt ở khoảng 170 °C tương ứng với nhiệt độ nóng chảy của leuprolid acetat; mannitol có một cực đại thu nhiệt ở khoảng 166 °C tương ứng với điểm nóng chảy của tá dược này; hỗn hợp đông khô LA + mannitol có nhiệt độ nóng chảy tại 162 °C. Theo một số tài liệu tham khảo, dạng thù hình β và α manitol có peak thu nhiệt gần nhau và ở khoảng 166 °C, trong khi dạng thù hình γ manitol có peak thu nhiệt ở khoảng 155-158 °C [8]. Như vậy manitol nguyên liệu tồn tại ở dạng thù hình β hoặc α . Nhưng khi đông khô, manitol chuyển dạng một phần sang dạng thù hình γ , do đó, hỗn hợp các dạng thù hình này có peak thu nhiệt ở 162 °C. Ngoài ra, peak thu nhiệt của mannitol và che phủ peak thu nhiệt của dược chất do tỉ lệ dược chất trong mẫu khá thấp và có peak thu nhiệt gần với peak thu nhiệt của manitol. Trên Hình 2 cho thấy, tại nhiệt độ khoảng 100 °C trên phổ DSC của trehalose xuất hiện điểm biến thiên về nhiệt tương ứng với sự mất nước và nóng chảy của trehalose ngậm nước; tại nhiệt độ khoảng 125 °C và 200-210 °C có các cực đại thu nhiệt tương ứng với nhiệt độ nóng chảy của 2 dạng thù hình α và β - trehalose [5]. Hỗn hợp LA + trehalose đông khô có các pic thu nhiệt tương ứng ở các nhiệt độ tương ứng với các pic thu nhiệt của từng

thành phần LA và trehalose. Phổ nhiệt quét vi sai trên Hình 3 cho thấy lactose có 3 cực đại thu nhiệt tại khoảng 145 °C, 210 °C và 230 °C tương ứng với sự mất nước cũng như nhiệt độ nóng chảy của các dạng thù hình α và β của tá dược này [6]. Hỗn hợp LA+lactose đông khô có các pic thu nhiệt tương ứng với từng thành phần LA và lactose (Hình 4B). Trên phổ DSC ở Hình 4 cho thấy saccharose xuất hiện một cực đại thu nhiệt ở khoảng 190 °C ứng với nhiệt độ nóng chảy và một quá trình biến đổi về nhiệt ở khoảng 220 °C liên quan đến sự phân hủy của saccharose. Hỗn hợp LA+saccharose đông khô có các pic thu nhiệt tương ứng với từng thành phần LA và saccharose. Do vậy, không có tương tác hóa học xảy ra giữa dược chất và các tá dược.

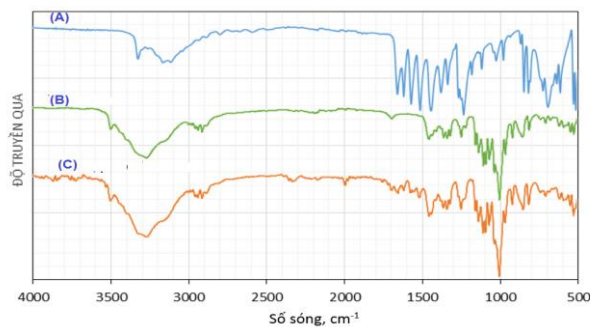
3.1.3. Phổ hồng ngoại FTIR

Phổ FTIR của dược chất, của các tá dược đông khô (mannitol, trehalose, lactose, saccharose), hỗn hợp đông khô của LA và từng tá dược trên được trình bày trong các Hình 5-8.

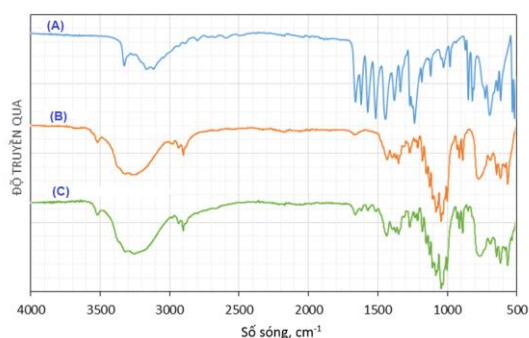
Dữ liệu phổ FTIR của LA+ mannitol ở Hình 5C cho thấy đây kết quả của sự chồng lẫn các dải phổ của LA và mannitol, điều này chứng minh không có tương tác hóa học phát sinh giữa LA và mannitol. Tương tự, dữ liệu phổ FTIR của hỗn hợp LA-trehalose ở Hình 6C, hỗn hợp LA-lactose ở Hình 7C và hỗn hợp LA-saccharose ở Hình 8C cho thấy đây kết quả của sự chồng lẫn các dải phổ của LA và các tá dược trehalose, lactose, saccharose tương ứng. Điều này chứng minh không có tương tác hóa học phát sinh giữa LA và các tá dược đông khô này.



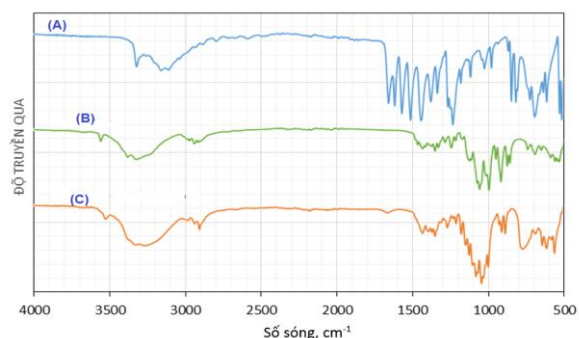
Hình 5. Phổ FTIR của LA (A), mannitol (B), bột đông khô LA+ mannitol (C).



Hình 6. Phổ FTIR của LA (A), trehalose (B), bột đông khô LA+trehalose (C).



Hình 7. Phổ FTIR của LA (A), lactose (B), bột đông khô LA+lactose (C).



Hình 8. Phổ FTIR của LA (A), saccharose (B), bột đông khô LA+saccharose (C).

Bảng 2. Kết quả thu được từ phổ FTIR của LA và tá dược

Dữ liệu phổ FTIR	Các nhóm chức O-H alcol, O-H phenol, N-H của amid, các amin bậc 1 và bậc 2 nằm trong dải có khoảng số sóng dao động	Dao động của các liên kết C-Hsp3	Dao động hóa trị của nhóm carbonyl C=O, dao động hóa trị C=N	Dao động hóa trị của nhóm C-O
LA	3400-3100 cm^{-1}	2950-2750 cm^{-1}	1700-1500 cm^{-1}	1150-1000 cm^{-1}
Mannitol	3560-3200 cm^{-1}	2950-2880 cm^{-1}		1100-1000 cm^{-1}
Trehalose	3500-3200 cm^{-1}	2990-2900 cm^{-1}		1100-990 cm^{-1}
Lactose	3522 cm^{-1} và 3320-3259 cm^{-1}	2899 cm^{-1}		1091-1030 cm^{-1}
Saccharose	3560-3400 cm^{-1} và 3400-3200 cm^{-1}	2950-2880 cm^{-1}		1100-1000 cm^{-1}
LA + mannitol	3560-3100 cm^{-1}	2950-2750 cm^{-1}	1700-1500 cm^{-1}	1150-1000 cm^{-1}
LA + trehalose	3500-3100 cm^{-1}	2990-2750 cm^{-1}	1700-1500 cm^{-1}	1150-990 cm^{-1}
LA + lactose	3522 cm^{-1} và 3317-3196 cm^{-1}	2931-2671 cm^{-1}	1700-1500 cm^{-1}	1150-1000 cm^{-1}
LA + saccharose	3560-3400 cm^{-1} và 3400-3200 cm^{-1}	2950-2750 cm^{-1}	1700-1500 cm^{-1}	1100-1000 cm^{-1}

3.2. Khảo sát ảnh hưởng của các loại tá dược đông khô đến đặc tính của vi cầu đông khô

Các tá dược tạo khung khác nhau đã được sử dụng bao gồm: mannitol, trehalose, lactose, saccharose với nồng độ cuối để đông khô là 10% (kl/kl). Vi cầu đông khô có hình thức bánh đẹp,

màu trắng đục, cấu trúc bánh xốp, mịn, không co ngót.

Các mẫu vi cầu đông khô 1.1, 1.2, 1.3, 1.4 sau khi phân tán lại với nước thu được hỗn dịch màu trắng đục, không có lắng cặn tinh thể, không có các tiểu phân có kích thước lớn có thể quan sát được bằng mắt thường, khi để yên có thể sa lắng, nhưng lắc nhẹ thì phân tán đều trở lại.



Hình 9. Ảnh hưởng của tá dược đông khô tới tính chất của bánh đông khô.

Bảng 3. Ảnh hưởng của tá dược đông khô tới đặc tính vi cầu PLGA- LA đông khô

Mẫu	Tá dược đông khô	Hình thức của bánh đông khô	Khả năng phân tán lại và hình thức của mẫu sau khi pha lại
M0	Không sử dụng tá dược đông khô	Bánh đông khô không hình thành, co ngót nhiều.	Khó phân tán lại, nhiều tiểu phân kích thước lớn lắng ở dưới đáy.
1.1	Mannitol 10%	Bánh đông khô đẹp, màu trắng đục, xốp, mịn, không co ngót.	Dễ dàng phân tán trở lại, hỗn dịch màu trắng đục, không lắng cặn, đồng nhất.
1.2	Trehalose 10%	Bánh đông khô co ngót, không mịn, xốp, bị nứt cạnh.	Khó phân tán hơn so với mannitol, hỗn dịch có màu trắng đục, có lắng cặn, KTTTP lớn bám trên thành lọ.
1.3	Lactose 10%	Bánh đông khô co ngót, không mịn, bị nứt cạnh nhiều.	Khó phân tán hơn so với các tá dược còn lại, KTTTP lớn lắng xuống đáy, kích thước lớn bám trên thành lọ.
1.4	Saccharose 10%	Bánh đông khô co ngót nhiều nhất, bề mặt sần không mịn.	Khó phân tán hơn so với mannitol, hỗn dịch có màu trắng đục, có lắng cặn, sa lắng nhanh, KTTTP lớn bám trên thành lọ.

Dựa vào kết quả thu được ở trên, vi cầu PLGA-LA đông khô sử dụng tá dược mannitol đảm bảo hình thức bánh đông khô đẹp, cấu trúc xốp, mịn, không co ngót, khả năng phân tán tốt. Vì vậy, mannitol được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.3. Ảnh hưởng của nồng độ mannitol tới đặc tính vi cầu PLGA- LA đông khô

Tiến hành khảo sát đông khô vi cầu với nồng độ mannitol 1,25%, 2,5%, 7,5%; 10,0%; 12,5% (kl/kl).

Bảng 4. Ảnh hưởng của nồng độ mannitol đến KTTTP vi cầu

Mẫu	Nồng độ dung dịch mannitol (%)	Trước đông khô		Sau đông khô	
		D [4,3] (μm)	Span	D [4,3] (μm)	Span
M1	1,25	12,14 $\pm$ 0,44	2,12 $\pm$ 0,18	13,27 $\pm$ 0,42	1,97 $\pm$ 0,05
M2	5,0	27,67 $\pm$ 3,43	2,31 $\pm$ 0,13	36,34 $\pm$ 3,23	2,50 $\pm$ 0,12
M3	7,5	27,57 $\pm$ 7,52	3,35 $\pm$ 0,05	35,76 $\pm$ 6,42	2,95 $\pm$ 0,05
M4	10,0	13,05 $\pm$ 2,35	2,75 $\pm$ 0,45	13,15 $\pm$ 1,35	2,85 $\pm$ 0,65
M5	12,5	31,62 $\pm$ 3,41	3,31 $\pm$ 0,13	32,3 $\pm$ 3,23	3,50 $\pm$ 0,12

Bảng 4 cho thấy: với nồng độ mannitol 1,25 %; 10% và 12,5%, KTTP và Span trước và sau đông khô của vi cầu thay đổi không nhiều, đảm bảo hình thức bánh xốp, mịn, không co ngót, dễ phân tán trở lại. Tuy nhiên, mẫu 12,5% và 10% có hiện tượng phân tán lại chậm hơn do có chứa nồng độ cao đường mannitol. Chính vì thế, nồng độ mannitol 1,25 % được lựa chọn cho các khảo sát tiếp theo.

3.4. Đánh giá một số đặc tính vi cầu đông khô PLGA- LA

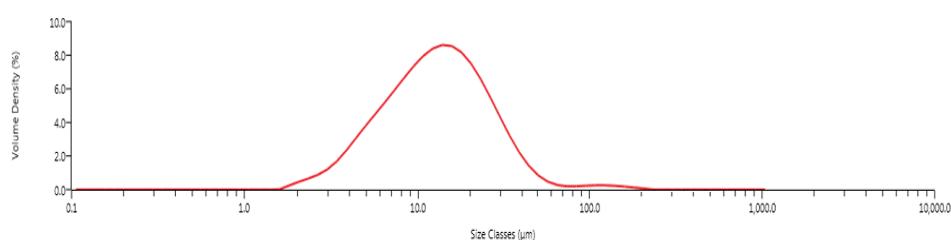
i) Hàm ẩm, KTTP, phân bố KTTP, hàm lượng LA trong vi cầu

Giá trị hàm ẩm của vi cầu đông khô đạt nhỏ hơn 2,0% để đảm bảo độ ổn định của chế phẩm trong quá trình bảo quản [7]. Các mẫu vi cầu

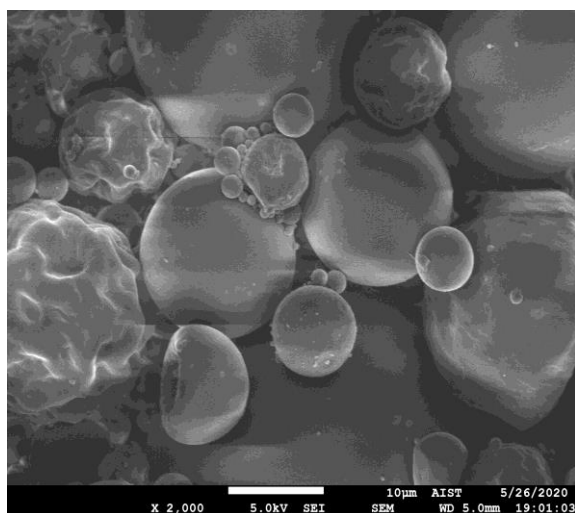
PLGA-LA đông khô có kích thước trung bình khoảng 30 μm , phân bố đồng đều ($\text{Span} < 5$), hiệu suất nạp được chất đạt 53%. So sánh mẫu vi cầu trước và sau đông khô (Bảng 5) cho thấy không có sự khác biệt nhiều về KTTP, phân bố KTTP;

Bảng 5. KTTP, phân bố KTTP, hàm lượng LA và hàm ẩm của vi cầu PLGA-LA trước và sau đông khô

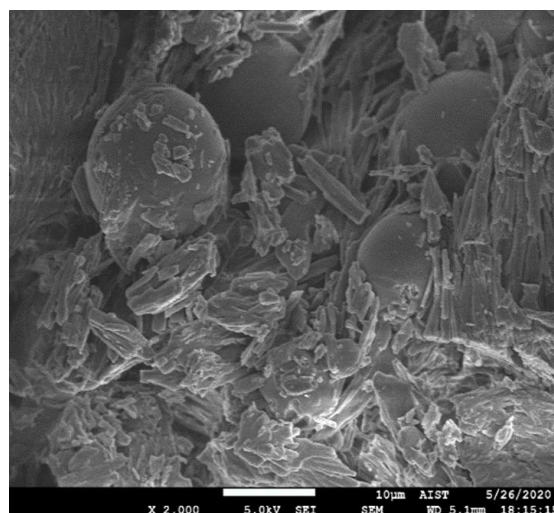
STT	Thông số	Giá trị	
		Trước đông khô	Sau đông khô
1	D[4.3] (μm)	27,24 $\pm$ 2,10	28,11
2	D(90) (μm)	44,29 $\pm$ 2,89	44,17
3	Span	1,67 $\pm$ 0,03	1,56
4	Hàm lượng (%)	100,00	99,00
5	Hàm ẩm (%)		1,32 $\pm$ 0,29



Hình 10. Đồ thị phân bố KTTP vi cầu PLGA-LA.



Hình 11. Hình thái vi cầu PLGA- LA trước đông khô.



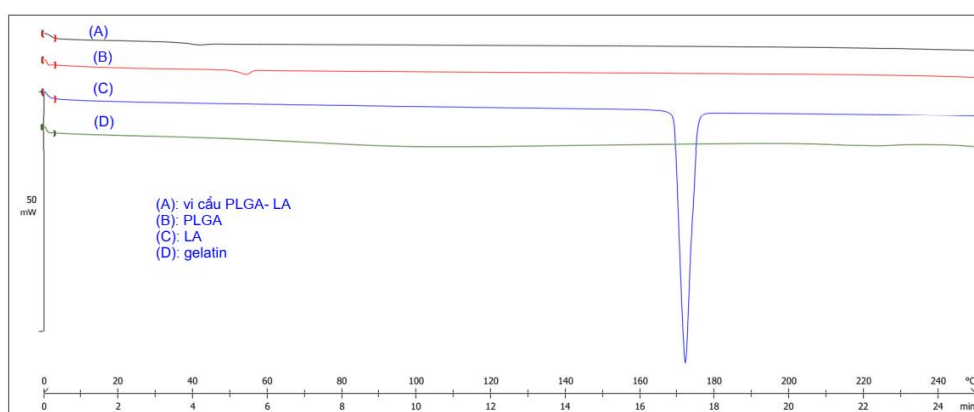
Hình 12. Hình thái vi cầu PLGA-LA sau đông khô.

ii) Hình thái vi cầu

Vi cầu PLGA-LA trước đông khô có hình cầu, kích thước phù hợp với kết quả đo KTTP bằng máy đo KTTP, đa số các tiểu phân trong vi trường có bề mặt nhẵn, không quan sát thấy lỗ xốp trên bề mặt những tiểu phân vi cầu này;

Vi cầu PLGA-LA đông khô có dạng hình cầu, bề mặt nhẵn, nằm xen kẽ với các tinh thể

đường. Tá dược tạo khung mannitol sau khi đông khô, có cấu trúc các tinh thể với nhiều hình dạng, kích cỡ khác nhau, nhiều mảnh tá dược tạo khung bám dính nhiều trên bề mặt các vi cầu, từ đó giúp nâng đỡ, ổn định cấu trúc vi cầu, hạn chế sự kết tụ các vi cầu lại với nhau, khi hoàn nguyên lại tạo hỗn dịch vi cầu cũng dễ dàng hơn;



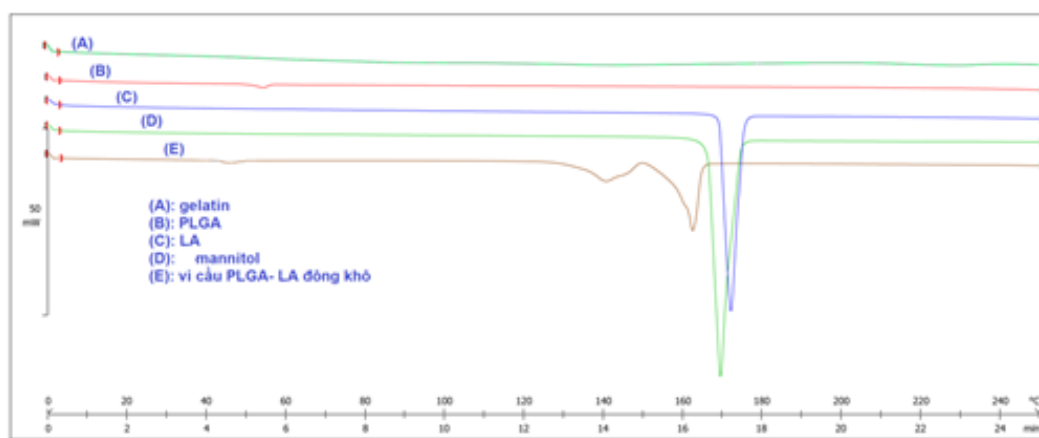
Hình 13. Phổ DSC của vi cầu PLGA-LA trước đông khô (A), PLGA (B), LA (C), gelatin (D).

iii) Phổ phân tích nhiệt quét vi sai

Phổ nhiệt quét vi sai của dược chất cho thấy leuprolid acetat tồn tại ở dạng kết tinh và nóng chảy ở nhiệt độ khoảng 170 °C (Hình 13C). Tuy nhiên trên phổ nhiệt quét vi sai của vi cầu PLGA-LA (Hình 13A) không xuất hiện đỉnh thu nhiệt tương ứng tại vị trí này, như vậy trong vi cầu

không tồn tại LA ở dạng kết tinh. Ngoài ra, tại nhiệt độ khoảng 40 °C có xuất hiện một điểm uốn liên quan đến nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh của tá dược PLGA. Nhưng T_g của PLGA trong mẫu vi cầu nhỏ hơn so với T_g của PLGA;

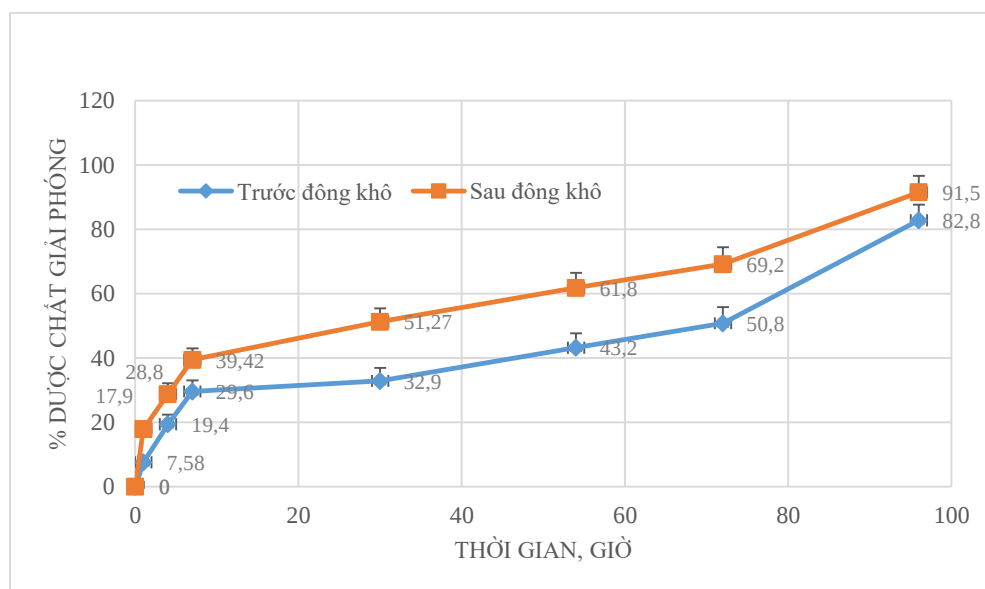
Phổ nhiệt quét vi sai của dược chất leuprolid acetat, các tá dược (PLGA, mannitol, gelatin), vi cầu sau đông khô được trình bày trong Hình 14;



Hình 14. Phổ nhiệt quét vi sai của gelatin (A), PLGA (B), LA (C), mannitol (D), vi cầu PLGA-LA đông khô (E).

Phổ DSC của vi cầu PLGA-LA sau đông khô cho thấy một sự biến thiên về nhiệt liên quan đến quá trình chuyển hóa thủy tinh của PLGA tại nhiệt độ $\sim 42^\circ\text{C}$, giá trị này nhỏ hơn so với T_g của PLGA; không quan sát thấy cực đại hấp thụ liên quan đến sự nóng chảy của dược chất leuprolid acetat;

Phổ nhiệt quét vi sai của vi cầu sau đông khô (Hình 14) có cực đại thu nhiệt tại 162°C . Điều này có thể giải thích do một phần manitol đã chuyển sang dạng gamma tạo ra hỗn hợp thù hình alpha hoặc beta và gamma manitol, có peak thu nhiệt tại 162°C tương ứng với nhiệt độ nóng chảy của hỗn hợp dạng thù hình này [8];



Hình 15. Ảnh hưởng của quá trình đông khô vi cầu lên khả năng giải phóng dược chất.

iv) Khả năng giải phóng dược chất từ vi cầu

Kết quả thử giải phóng ở điều kiện cấp tốc (Hình 15) của cùng một mẫu vi cầu cho thấy vi cầu sau đông khô giải phóng dược chất nhiều hơn tại thời điểm đầu (14,14% lúc 1 giờ) so với mẫu vi cầu chưa đông khô (2,23% lúc 1 giờ). Đồng thời, % tích lũy dược chất đã giải phóng tại các thời điểm sau 7 giờ của mẫu vi cầu đông khô đều lớn hơn mẫu vi cầu chưa đông khô. Sau 100 giờ ở điều kiện giải phóng, vi cầu đông khô đã giải phóng 91,5 % dược chất trong khi vi cầu chưa đông khô chỉ giải phóng được 82,8%. Như vậy, quá trình đông khô có ảnh hưởng nhất định đến tốc độ giải phóng dược chất từ vi cầu.

Bàn luận

LA là một peptid nên dễ bị thủy phân trong nước. Hơn nữa, polyme phân hủy sinh học

PLGA cũng tự do dễ dàng thủy phân trong môi trường nước. Chính vì vậy vi cầu LA có cấu tạo từ chất mang PLGA cần thiết được làm khô để đảm bảo độ ổn định của dược chất và chất mang. Trong số các phương pháp làm khô thì phương pháp đông khô phù hợp nhất để làm mất nước cho các chế phẩm chứa thành phần nhạy cảm với nhiệt do không bị tác động bởi nhiệt độ cao trong quá trình làm khô. Chính vì vậy vi cầu PLGA-LA cần thiết được làm mất nước bằng phương pháp đông khô để đảm bảo độ ổn định.

Nghiên cứu tính tương hợp của dược chất và các tá dược đông khô cho thấy, kết quả phân tích phổ DSC của hỗn hợp dược chất LA và các tá dược đông khô ở Hình 2 cho đỉnh thu nhiệt đặc trưng của dược chất cũng như các đỉnh thu nhiệt liên quan đến tá dược trehalose đều xuất hiện chứng tỏ hỗn hợp là sự trộn lẫn vật lý giữa dược chất và tá dược đông khô, không xuất hiện peak thu nhiệt mới chứng tỏ không có sự tương tác

giữa dược chất và tá dược. Kết quả tương tự cũng xảy ra với bột đông khô của hỗn hợp LA và saccharose (Hình 4) cũng như mẫu bột đông khô LA-lactose (Hình 3). Với bột đông khô LA và mannitol (Hình 1), trên phổ nhiệt quét vi sai có một cực đại thu nhiệt rộng hơn, xuất hiện sớm hơn (ở nhiệt độ khoảng 165 °C) so với đỉnh đặc trưng của LA, điều này có thể do dược chất và mannitol có cực đại thu nhiệt rất gần nhau. Ngoài ra, từ các dữ liệu phổ FTIR của bột đông khô của các hỗn hợp LA+ mannitol, LA+ trehalose, LA+ lactose, LA+ saccharose cho thấy rằng phổ FTIR của từng bột đông khô là kết quả của sự chồng lẫn các dải phổ của dược chất và tá dược. Như vậy, kết quả DSC và FTIR chứng minh rằng, không có tương tác hóa học phát sinh giữa LA và các tá dược đông khô.

Trong số các tá dược đông khô, mannitol có nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh của dao động từ -10,7 °C đến -18,4 °C, trehalose là -30 °C, của lactose là -33 °C, saccharose là -32 °C. Khi nhiệt độ của mẫu trong quá trình làm khô sơ cấp cao hơn nhiệt độ này sẽ gây ra hiện tượng phá vỡ cấu trúc. Do đó, mannitol có nhiệt độ chuyển hóa thủy tinh cao nhất nên khi làm tá dược đông khô cho hình thức bánh đông khô đẹp, không co ngót do không bị phá vỡ cấu trúc.

Kết quả đông khô vi cầu PLGA-LA cho thấy, quá trình đông khô sử dụng tá dược mannitol hầu như không ảnh hưởng đến đặc tính kích thước (sau khi phân tán lại), hàm lượng dược chất của vi cầu. Kết quả phân tích nhiệt quét vi sai cho thấy, vi cầu trước đông khô hoàn toàn không có peak thu nhiệt nào, không xuất hiện peak thu nhiệt của dược chất LA chứng tỏ dược chất đã phân tán dưới dạng phân tử vào vi cầu. Trong khi đó, ở mẫu vi cầu sau đông khô xuất hiện 1 peak thu nhiệt chính là peak thu nhiệt của tá dược đông khô mannitol có thể tồn tại ở dạng thù hình β và γ trong bột đông khô vi cầu.

Về đặc tính giải phóng dược chất, vi cầu chưa đông khô có tốc độ giải phóng chậm hơn so với vi cầu đông khô do vi cầu đông khô đã làm mất nước khỏi bề mặt cũng như bên trong lòng vi cầu. Do đó, trong quá trình mất nước từ trong lòng vi cầu có thể tạo ra các vi kênh để làm kênh giải phóng dược chất. Khi pha lại vi cầu đông

khô nước sẽ dễ dàng hòa tan dược chất ở bề mặt vi cầu, từ từ giải phóng dược chất trong lòng vi cầu đông khô và sau đó ăn mòn polymer để giải phóng dược chất. Hiện tượng này cũng được thấy tương tự trong các nghiên cứu khác [10].

Kết luận

Khảo sát tính tương hợp của dược chất và tá dược cho thấy không có sự tương kỵ giữa dược chất và tá dược đông khô khảo sát. Dung dịch mannitol 1,25% (kl/kl) được lựa chọn để đông khô vi cầu PLGA-LA do vi cầu đông khô thu được có hình thức bánh đẹp, xốp, không co ngót, hàm ẩm đạt 1,32%, dễ phân tán trở lại với nước. Đặc tính của vi cầu sau khi phân tán lại có hàm lượng, kích thước và khoảng phân bố kích thước (Span) thay đổi không có ý nghĩa so với trước khi đông khô. Quá trình đông khô có ảnh hưởng đến đặc tính giải phóng dược chất từ vi cầu, vi cầu đông khô giải phóng dược chất nhiều hơn so với vi cầu không được đông khô.

Lời cảm ơn

Nhóm tác giả cảm ơn Bộ Y tế Việt Nam đã tài trợ cho nghiên cứu này.

Tài liệu tham khảo

- [1] J. M. Leitner, F. B. Mayr et al., The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of A New Sustained-Release Leuprolide Acetate Depot Compared to Market References, *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 46, Iss. 8, 2008, pp. 407-414, <https://doi.org/10.5414/CPP46407>.
- [2] G. Wnek, G. Bowlin, Polylactic-co-glycolic Acid (PLGA), K. Avgoustakis, *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*, Taylor & Francis, 2005, pp.1-11.
- [3] L. C. Herrera, M. C. Defain et al., *In Vitro* Release Testing of PLGA Microspheres with Franz Diffusion Cells, *Dissolution Technologies*, Vol. 19, Iss. 2, 2012, <https://doi.org/10.14227/DT190212P6>.

- [4] M. Ochi, B. Wan et al., Influence of PLGA Molecular Weight Distribution on Leuprolide Release from Microspheres, *International Journal of Pharmaceutics*, Vol. 599, 2021, <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2021.120450>.
- [5] F. Sussich, S. Bortoluzzi et al., Trehalose Dehydration under Confined Conditions, *Thermochimica Acta*, Vol. 391, Iss. 1-2, 2002, pp. 137-150, [https://doi.org/10.1016/S0040-6031\(02\)00171-5](https://doi.org/10.1016/S0040-6031(02)00171-5).
- [6] A. Gombas, P. S. Révész et al., Quantitative Determination of Crystallinity of A-Lactose Monohydrate by DSC, *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, Vol. 68, Iss. 2, 2002, pp. 503-510, <https://doi.org/10.1023/a:1016039819247>.
- [7] T. T. H. Yen et al., the Preparation and Characterization of Freeze-Dried Liposomes Loaded with Amphotericin B, *Current Drug Therapy*, Vol. 14, Iss. 1, 2018, pp. 65-73, <https://doi.org/10.2174/1574885514666181217130259>.
- [8] J. Tao, L. Yu, Kinetics of Cross-nucleation Between Polymorphs, *The Journal of Physical Chemistry B*, Vol. 110, Iss. 14, 2006, pp. 7098-7101, <https://doi.org/10.1021/jp060694j>.
- [9] X. Liao, R. Krishnamurthy et al., Influence of Processing Conditions on the Physical State of Mannitol-implications in Freeze-drying, *Pharmaceutical Research*, Vol. 24, Iss. 2, 2007, pp. 370-376, <https://doi.org/10.1007/s11095-006-9158-3>.
- [10] X. Luan, R. Bodmeier, Modification of the Tri-Phasic Drug Release Pattern of Leuprolide Acetate-Loaded Poly(Lactide-Co-Glycolide) Microparticles, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, Vol. 63, Iss. 2, 2006, pp. 205-214, <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2005.12.010>.