



(12) **BẢN MÔ TẢ GIẢI PHÁP HỮU ÍCH THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN
GIẢI PHÁP HỮU ÍCH**

(19) **Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ**

(11)



2-0003058

(51) **G01N 30/02**
2020.01

(13) **Y**

(21) 2-2021-00585

(22) 12/02/2020

(67) 1-2020-00777

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/06/2020 387ASC

(76) Nguyễn Lâm Hồng (VN)

Số 318 đường Xuân Đình, quận Bắc Từ Liêm, Thành Phố Hà Nội

(54) **PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG CLEISTANTOXIN TRONG CHẤT TINH KHIẾT
CLEISTANTOXIN VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CLEISTANTOXIN BẰNG HPLC/DAD**

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp định lượng cleistantoxin trong chất tinh khiết cleistantoxin và dược phẩm chứa cleistantoxin bằng HPLC/DAD bao gồm các bước: chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch chuẩn, tiến hành sắc kí HPLC/DAD và tính hàm lượng phần trăm của cleistantoxin.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực dược phẩm, cụ thể là giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp định lượng cleistantoxin trong chất tinh khiết cleistantoxin và dược phẩm chứa cleistantoxin bằng HPLC/DAD.

Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cleistantoxin được các nhà khoa học Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam phân lập từ quả loài *C. indochinensis*, cleistantoxin có tên khoa học là (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-7-hydroxy-6-methoxy-3',4':4,5-bis(metylendioxy)-2,7'-xycloignan-9',9-olit. Hợp chất này đã được cấp bằng độc quyền sáng chế số 12278.

Cleistantoxin cũng được phân lập từ quả của cây Cách hoa Đông Dương (*Cleistanthus indochinensis*), xem tài liệu “Cytotoxic lignans from fruits of *Cleistanthus indochinensis*: synthesis of cleistantoxin derivatives”, Journal of Natural Product, 2012 Sep 28;75(9):1578-83”. Tuy nhiên, quy trình phân lập cleistantoxin bộc lộ trong tài liệu này mới phân lập được một lượng nhỏ cleistantoxin từ lượng 0,5 kg quả khô của cây Cách hoa Đông Dương bằng phương pháp chiết phân bố thu được cleistantoxin trong phân đoạn diclometan. Công bố mới ở mức độ nghiên cứu thành phần hoá học quả của cây Cách hoa Đông Dương, cleistantoxin phân lập được với lượng nhỏ và chưa được tinh chế có độ tinh khiết cao để làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleistantoxin.

Ngoài ra, cũng có một số nghiên cứu liên quan đến quy trình tinh chế và thiết lập chất chuẩn đã công bố, bao gồm: Nguyễn Lâm Hồng và cộng sự, Tạp chí Dược học, Số 512, năm 58, số 12/2018, 21-24, “Nghiên cứu phân lập và nhận dạng cleistantoxin từ quả cây Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis* Jabl. Euphorbiaceae) làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn”; Nguyễn Lâm Hồng và cộng sự, Tạp chí Dược học, Số 514, năm 59, Số 2/2019, 69-74 “Xác định độ tinh khiết của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn cleistantoxin được phân lập từ quả cây Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis* Jabl. Euphorbiaceae)”; Đào Tú Anh, “Tinh chế và xác định độ tinh khiết của cleistantoxin phân lập từ quả của cây Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis*) làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn. Nguyễn Lâm Hồng, “Nghiên cứu phân

lập, tinh chế, thiết lập chất chuẩn để định tính, định lượng một số lignan trong quả của chi *Cleistanthus*, họ Thầu dầu (Euphorbiaceae)”, Luận án tiến sĩ dược học, 11/2019. Tuy nhiên, các tài liệu này không đề cập cụ thể đến phương pháp định lượng cleistantoxin trong chất tinh khiết cleistantoxin và dược phẩm chứa cleistantoxin bằng HPLC/DAD với các bước cụ thể như nêu trong giải pháp hữu ích.

Phương pháp định lượng cleistantoxin theo giải pháp nhằm xây dựng phương pháp xác định hàm lượng cleistantoxin trong chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin khi thiết lập chất chuẩn thứ cấp từ chất chuẩn gốc cleistantoxin. Bên cạnh đó, phương pháp theo giải pháp hữu ích có thể áp dụng để định lượng cleistantoxin trong nguyên liệu hoá dược cleistantoxin, bán thành phẩm và các dạng thành phẩm thuốc chứa cleistantoxin.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên, cụ thể là giải pháp hữu ích đề xuất phương pháp định lượng cleistantoxin trong chất tinh khiết cleistantoxin và dược phẩm chứa cleistantoxin bằng HPLC/DAD bao gồm các bước:

a) chuẩn bị dung dịch thử bằng cách hòa tan mẫu thử trong axetonitril đến nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 500 µg/ml và chuẩn bị dung dịch chuẩn bằng cách pha chất chuẩn gốc cleistantoxin trong axetonitril có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 500 µg/ml thu được dung dịch thử và dung dịch chuẩn, tương ứng;

b) tiến hành sắc ký HPLC/DAD bằng cách:

- tiêm độc lập 20 µL dung dịch thử và dung dịch chuẩn vào cột ODS C18 có đường kính từ 2 đến 4,6mm, chiều dài từ 50 đến 300 mm được nhồi hạt kích thước 5 µm hoặc cột C8 có đường kính từ 2 đến 4,6mm, chiều dài từ 50 đến 300 mm được nhồi hạt kích thước từ 1 đến 10µm, duy trì nhiệt độ cột ở 60°C;

- rửa giải dung dịch thử và dung dịch chuẩn trong thời gian 30 phút với, tốc độ dòng 1 mL/phút bằng hệ pha động kết hợp bao gồm pha động kênh A là dung dịch axetonitril:diethylamin tỷ lệ 95:5 (w/w) và pha động kênh B là nước tinh khiết bổ sung diethylamin tỷ lệ 95/5 (w/w) theo chương trình rửa giải đẳng dòng để thu các sắc ký đồ và phát hiện chất phân tích trên sắc ký đồ tại bước sóng từ 200 đến 360 nm; và

c) tính hàm lượng phần trăm của cleistantoxin bằng công thức sau:

$$(r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

trong đó:

r_U là diện tích của pic cleistantoxin trên sắc kí đồ của dung dịch thử.

r_S là diện tích của pic cleistantoxin trên sắc kí đồ của dung dịch chuẩn.

C_S là nồng độ của cleistantoxin trên sắc kí đồ của dung dịch chuẩn.

C_U là nồng độ của cleistantoxin trên sắc kí đồ của dung dịch thử.

Theo một phương án ưu tiên của giải pháp hữu ích, ở bước b) pha động kênh A có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ vào axetonitril với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 99,9%, và pha động kênh B có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ vào nước với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 100,0% để pha động có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 7,0.

Theo một phương án ưu tiên khác của giải pháp hữu ích, ở bước b) pha động kênh A có thể được bổ sung thêm các bazơ hữu cơ và bazơ vô cơ vào axetonitril với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 99,9%, và pha động kênh B có thể được bổ sung thêm các bazơ hữu cơ và bazơ vô cơ vào nước với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 100,0% để pha động có pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0.

Theo một phương án ưu tiên khác nữa của giải pháp hữu ích, ở bước b) pha động kênh A có thể được bổ sung thêm các hệ đệm hữu cơ và hệ đệm vô cơ vào axetonitril với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 99,9%, và pha động kênh B có thể được bổ sung thêm các hệ đệm hữu cơ và hệ đệm vô cơ vào nước với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 100,0% để pha động có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 10,0.

Theo một phương án ưu tiên khác nữa của giải pháp hữu ích, ở bước b) pha động kênh A có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 99,9%, và dung môi nhóm trietylamin hoặc dietylamin với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 1,0% vào axetonitril, và pha động kênh B có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 99,9% và dung môi nhóm trietylamin hoặc dietylamin với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 1,0% vào nước để pha động có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 10,0.

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả một cách chi tiết với các phương án thực hiện và các ví dụ minh họa cụ thể, tuy nhiên các phương án thực hiện và các ví dụ minh họa cụ thể này chỉ nhằm làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không nhằm hạn chế phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Cleistantoxin được phân lập từ quả của loài *C. indochinensis*, cleistantoxin có tên khoa học là (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-7-hydroxy-6-methoxy-3',4':4,5-bis(metylendioxy)-2,7'-xycloignan-9',9-olít.

Mẫu thử là chất tinh khiết cleistantoxin hoặc dược phẩm chứa cleistantoxin.

Mẫu chuẩn là chất chuẩn gốc cleistantoxin được dùng để pha dung dịch chuẩn theo quy định tại Dược điển Mỹ (USP 40) phụ lục <11>.

Theo một khía cạnh, giải pháp hữu ích đề cập đến phương pháp định lượng cleistantoxin trong chất tinh khiết cleistantoxin và dược phẩm chứa cleistantoxin bằng HPLC/DAD bao gồm các bước: a) chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch chuẩn, b) tiến hành sắc kí HPLC/DAD, và c) tính hàm lượng phần trăm của cleistantoxin.

Chất tinh khiết cleistantoxin được xác định hàm lượng bằng HPLC/DAD như sau:

a) Chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch chuẩn

Chuẩn bị dung dịch thử có nồng độ cleistantoxin nằm trong khoảng 0,5 đến 500 µg/ml và dung dịch chuẩn có nồng độ cleistantoxin nằm trong khoảng 0,5 đến 500 µg/ml trong axetonitril.

b) tiến hành sắc kí HPLC/DAD:

- Tiêm cùng một thể tích từ 1 đến 100 µl dung dịch thử và dung dịch chuẩn vào cột Phenyl C₆H₅ (50-300 x 2-4,6 mm; 1-10 µm) hoặc cột ODS C18 (50-300 x 2-4,6 mm; 1-10 µm) hoặc cột C8 (50-300 x 2-4,6 mm; 1-10 µm) hoặc cột tương tự, duy trì nhiệt độ cột nằm trong khoảng từ 20°C đến 60°C.

- Rửa giải dung dịch thử và dung dịch chuẩn trong thời gian 30 phút với hệ pha động kết hợp pha động kênh A: axetonitril hoặc axetonitril có bổ sung thêm axit, bazơ hoặc đệm và pha động kênh B là nước tinh khiết hoặc nước có bổ sung thêm axit, bazơ hoặc đệm với tốc độ dòng từ 0,6 đến 2,0 ml/phút theo chương trình rửa giải gradient, và phát hiện chất phân tích tại bước sóng nằm trong khoảng từ 200 đến 360 nm.

c) tính hàm lượng phần trăm của cleistantoxin bằng công thức sau:

$$(r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

trong đó:

r_U là diện tích của pic cleistantoxin trên sắc kí đồ của dung dịch thử;

r_S là diện tích của pic cleistantoxin trên sắc kí đồ của dung dịch chuẩn;

C_S là nồng độ của cleistantoxin trên sắc kí đồ của dung dịch chuẩn;

C_U là nồng độ của cleistantoxin trên sắc kí đồ của dung dịch thử;

Theo một khía cạnh khác của giải pháp hữu ích, ở bước b) pha động kênh A có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ vào axetonitril với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 99,9%, và pha động kênh B có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ vào nước với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 100,0% để pha động có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 7,0;

Trong trường hợp pha động kênh A là axetonitril và pha động kênh B là nước bổ sung thêm axit axetic hoặc axit phosphoric hoặc axit formic với tỷ lệ 90:10 thì hàm lượng phần trăm của cleistantoxin được tính bằng 97,8%.

Theo một khía cạnh khác nữa của giải pháp hữu ích, ở bước b) pha động kênh A có thể được bổ sung thêm các bazơ hữu cơ và bazơ vô cơ vào axetonitril với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 99,9%, và pha động kênh B có thể được bổ sung thêm các bazơ hữu cơ và bazơ vô cơ vào nước với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 100,0% để pha động có pH nằm trong khoảng từ 7,0 đến 10,0.

Trong trường hợp pha động kênh A là axetonitril bổ sung thêm triethylamin hoặc diethylamin với tỷ lệ 95:5 và pha động kênh B là nước bổ sung thêm triethylamin hoặc diethylamin với tỷ lệ 95:5 thì hàm lượng phần trăm của cleistantoxin được tính bằng 97,2%.

Theo một khía cạnh khác của giải pháp hữu ích, ở bước b) pha động kênh A có thể được bổ sung thêm các hệ đệm hữu cơ và hệ đệm vô cơ vào axetonitril với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 99,9%, và pha động kênh B có thể được bổ sung thêm các hệ đệm hữu cơ và hệ đệm vô cơ vào nước với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 100,0% để pha động có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 10,0.

Trong trường hợp pha động kênh A là axetonitril và pha động kênh B là đệm axetat pH=4, đệm phosphat pH=2 và đệm phosphat pH=7 với tỷ lệ 30:70 thì hàm lượng phần trăm của cleistantoxin được tính bằng 97,6%.

Theo một khía cạnh khác của giải pháp hữu ích, ở bước b) pha động kênh A có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 99,9% và dung môi nhóm triethylamin hoặc diethylamin với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 1,0% vào axetonitril, và pha động kênh B có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 99,9% và dung môi nhóm triethylamin hoặc diethylamin với tỷ lệ nằm trong khoảng từ 0% đến 1,0% vào nước để pha động có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 10,0.

Trong trường hợp pha động kênh A là axetonitril: axit formic: triethylamin với tỷ lệ 85:10:5 và pha động kênh B là nước : axit formic : triethylamin với tỷ lệ là 85:10:5 (v/v/v) thì hàm lượng phần trăm của cleistantoxin được tính bằng 96,8%.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ cụ thể phương pháp định lượng cleistantoxin trong chất tinh khiết cleistantoxin và được phẩm chứa cleistantoxin bằng phương pháp HPLC/DAD được thực hiện như sau:

Chuẩn bị dung dịch dung dịch thử bằng cách pha mẫu thử trong axetonitril có nồng độ cleistantoxin là 10 µg/ml và dung dịch chuẩn bằng cách pha chất chuẩn gốc cleistantoxin (mẫu chuẩn) trong axetonitril có nồng độ là 10 µg/ml.

Tiêm 20 µl dung dịch thử và dung dịch chuẩn vào cột ODS C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), duy trì nhiệt độ cột ở nhiệt độ 60°C.

Rửa giải dung dịch thử và dung dịch chuẩn trong thời gian 20 phút với pha động kênh A là axetonitril bổ sung thêm triethylamin hoặc diethylamin theo tỷ lệ 95:5 và pha động kênh B là nước bổ sung thêm triethylamin hoặc diethylamin theo tỷ lệ 95:5, với tốc độ dòng 1,0 ml/phút theo chương trình rửa giải đẳng dòng hoặc gradient, và phát hiện tại bước sóng 254 nm.

Xác định hàm lượng phần trăm của cleistantoxin trong chất chuẩn thứ cấp bằng công thức: $r_u/r_s \times (C_s/C_u) \times 100$ thu được hàm lượng phần trăm của cleistantoxin là 97,2%.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Phương pháp định lượng cleistantoxin trong chất tinh khiết cleistantoxin và dược phẩm chứa cleistantoxin theo giải pháp hữu ích nhằm xây dựng phương pháp xác định hàm lượng cleistantoxin trong chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin khi thiết lập chất chuẩn thứ cấp từ chất chuẩn gốc cleistantoxin. Bên cạnh đó, phương pháp theo giải pháp hữu ích có thể áp dụng để định lượng cleistantoxin trong nguyên liệu hoá dược cleistantoxin, bán thành phẩm và các dạng thành phẩm thuốc chứa cleistantoxin.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp định lượng cleistantoxin trong chất tinh khiết cleistantoxin và dược phẩm chứa cleistantoxin bằng HPLC/DAD, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

a) chuẩn bị dung dịch thử bằng cách hòa tan mẫu thử trong axetonitril đến nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 500 µg/ml và hòa tan mẫu chuẩn là chất chuẩn gốc cleistantoxin trong axetonitril có nồng độ nằm trong khoảng từ 0,5 đến 500 µg/ml thu được dung dịch thử và dung dịch chuẩn, tương ứng;

b) tiến hành sắc ký HPLC/DAD:

- tiêm độc lập 20 µL dung dịch thử và dung dịch chuẩn vào cột ODS C18 có đường kính từ 2 đến 4,6mm, chiều dài từ 50 đến 300 mm được nhồi hạt kích thước 5 µm hoặc cột C8 có đường kính từ 2 đến 4,6mm, chiều dài từ 50 đến 300 m được nhồi hạt kích thước từ 1 đến 10µm, duy trì nhiệt độ cột ở 60°C;

- rửa giải dung dịch thử và dung dịch chuẩn trong thời gian 30 phút với, tốc độ dòng 1 mL/phút bằng hệ pha động kết hợp bao gồm pha động kênh A là dung dịch axetonitril:dietylamin tỷ lệ 95:5 (w/w) và pha động kênh B là nước tinh khiết bổ sung dietylamin tỷ lệ 95/5 (w/w) theo chương trình rửa giải đẳng dòng để thu các sắc ký đồ và phát hiện chất phân tích trên sắc ký đồ tại bước sóng từ 200 đến 360 nm; và

c) tính hàm lượng của cleistantoxin theo sắc ký đồ thu được như sau:

hàm lượng phần trăm của cleistantoxin được tính bằng công thức sau:

$$(r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

trong đó:

r_U là diện tích của pic cleistantoxin trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

r_S là diện tích của pic cleistantoxin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn;

C_S là nồng độ của cleistantoxin trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn;

C_U là nồng độ của cleistantoxin trên sắc ký đồ của dung dịch thử.