



(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)



2-0003069

(51) **G01N 30/02**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00447

(22) 04/12/2020

(67) 1-2020-07055

(45) 27/03/2023 420

(43) 25/02/2021 395

(76) Nguyễn Lâm Hồng (VN)

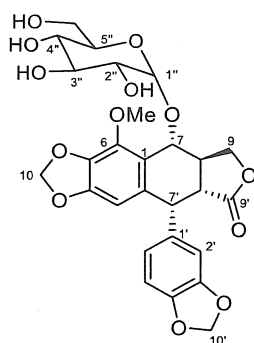
Số 318 đường Xuân Đình, quận Bắc Từ Liêm, thành phố Hà Nội

(54) QUY TRÌNH TÍNH CHẾ VÀ THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN GỐC CLEISINDOSID D

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tính chế và thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ chất tinh khiết cleisindosid D.

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 quy trình tinh chế và thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ nguyên liệu là chất tinh khiết cleisindosid D có tên khoa học (6-metoxi-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-3',4':4,5-bis(metylendioxy)-2,7'-cyclo lignan-9',9'-olit), công thức phân tử là $C_{27}H_{28}O_{13}$, cấu trúc hoá học được mô tả như hình dưới đây:



Tình trạng kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Cleisindosid D, (còn có tên là cleisindoside D) là hợp chất (6-metoxi-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-3',4':4,5-bis(metylendioxy)-2,7'-cyclo lignan-9',9'-olit) được các nhà khoa học Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam lần đầu tiên phân lập được từ quả của cây Cách hoa Đông dương (*Cleistanthus indochinensis*). Trịnh Thị Thanh Vân và cộng sự đề cập trong bài báo “Cytotoxic Aryltetralin lignans from fruits of *Cleistanthus indochinensis*”, *Planta medica*, 80(08/09), pp. 695-702. Tuy nhiên, quy trình trên mới phân lập một lượng nhỏ cleisindosid D từ lượng 0,1 kg quả khô cây Cách hoa Đông dương bằng phương pháp chiết phân bố thu được cleisindosid D trong phân đoạn diclometan và metanol. Công bố mới ở mức độ nghiên cứu thành phần hoá học trong quả của cây Cách hoa Đông dương, cleisindosid D phân lập được với lượng nhỏ và chưa được tinh chế và xác định độ tinh khiết để làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn cleisindosid D;

Nguyễn Văn Hoàng, “Xây dựng phương pháp xác định hàm lượng tạp chất liên quan trong nguyên liệu thiết lập chất chuẩn cleisindoside D được phân lập từ quả *Chà chôi*”. Khoá luận tốt nghiệp được sĩ đại học năm 2018. Đây là nghiên cứu

bước đầu về phương pháp xác định tạp chất liên quan trong nguyên liệu thiết lập chất chuẩn bằng kỹ thuật chuẩn hoá diện tích. Tuy nhiên, kỹ thuật này có hạn chế là chưa xác định được tối đa hàm lượng tạp chất có trong nguyên liệu thiết lập chất chuẩn cleisindosid D vì dung dịch thử tiến hành sắc ký ở khoảng nồng độ từ 500 µg/ml đến 1500 µg/ml, nên ở nồng độ tối đa thì chưa thể phát hiện hết các tạp chất liên quan, dẫn đến xác định hàm lượng tổng tạp chất liên quan thấp và sẽ xác định hàm lượng của chất chuẩn gốc chưa chính xác. Hơn thế nữa, nguyên liệu thiết lập chất chuẩn cleisindosid D này được phân lập từ quả của cây Chà chôi, mà chưa được nghiên cứu phân lập từ các quả cây khác thuộc chi Cách hoa (*Cleistanthus*). Công trình này mới chỉ bước đầu nghiên cứu chỉ tiêu thử tạp chất liên quan bằng kỹ thuật chuẩn hoá diện tích của nguyên liệu cleisindosid D mà chưa nghiên cứu đầy đủ các chỉ tiêu của nguyên liệu và chưa thiết lập được chất chuẩn gốc cleisindosid D.

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, 2019. Đây là công trình đầu tiên công bố thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D.

Hoạt chất cleisindosid D và cao khô chiết xuất từ quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*) đang được nghiên cứu phát triển thành nguyên liệu thuốc điều trị ung thư. Vì vậy, rất cần thiết phải có chất chuẩn cleisindosid D để xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho các nguyên liệu, bán thành phẩm và thành phẩm thuốc này. Hoạt chất cleisindosid D đang được nghiên cứu phát triển thuốc trên thế giới chưa có chất chuẩn cleisindosid D, nên cần phải thiết lập cleisindosid D thành chất chuẩn gốc có độ tinh khiết của chất chuẩn (hay còn gọi là hàm lượng chất chuẩn) cao.

Từ chất chuẩn gốc cleisindosid D đã được thiết lập và đăng ký giải pháp hữu ích, mục đích của giải pháp hữu ích này là xây dựng quy trình tinh chế và thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D với quy mô lớn để có thể phục vụ công tác thường quy kiểm tra, giám sát hàm lượng cleisindosid D trong các nguyên liệu, bán thành phẩm và thành phẩm thuốc.

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 cập đến quy trình tinh chế và thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ chất tinh khiết cleisindosid D, trong đó quy trình này bao gồm các bước sau:

a) tinh chế chất tinh khiết cleisindosid D bằng cách kết tinh chất tinh khiết cleisindosid D từ 1 đến 3 lần bằng hệ dung môi cloroform:*n*-hexan theo tỷ lệ cloroform/*n*-hexan là 4/6 hoặc hệ dung môi *n*-butanol:*n*-hexan theo tỷ lệ *n*-butanol/*n*-hexan là 3/7 hoặc hệ dung môi etanol:*n*-hexan theo tỷ lệ etanol/*n*-hexan là 2/8; và

b) thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ chất tinh khiết cleisindosid D bao gồm các công đoạn: xác định tính chất của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D, định tính nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D, xác định nhiệt độ nóng chảy của chất chuẩn gốc cleisindosid D, đo góc quay cực riêng của chất chuẩn gốc cleisindosid D, xác định tạp chất liên quan, xác định tổng tạp chất bay hơi và tạp chất vô cơ trong chất chuẩn gốc cleisindosid D, và định lượng hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc cleisindosid D; trong đó bước b) khác biệt ở các công đoạn:

- xác định tạp chất liên quan trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng HPLC/DAD sử dụng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử thành dung dịch đối chiếu và được thực hiện như sau:

+ chuẩn bị dung dịch thử bằng cách pha chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi axetonitril hoặc metanol để thu được nồng độ cleisindosid D nằm trong khoảng từ 500µg/mL đến 5000µg/mL; và chuẩn bị dung dịch đối chiếu bằng cách pha loãng dung dịch thử từ 50 đến 1000 lần trong dung môi axetonitril hoặc metanol;

+ tiến hành sắc ký HPLC/DAD bằng cách tiêm cùng một thể tích từ 1µL đến 100 µL các dung dịch thử và dung dịch đối chiếu vào cột Phenyl C₆H₅ (50-300 mm × 2-4,6 mm; 1-10µm) hoặc cột ODS C₁₈ (50-300 mm × 2-4,6 mm; 1-10µm) hoặc cột C₈ (50-300 mm × 2-4,6 mm; 1-10µm), duy trì nhiệt độ cột nằm trong khoảng từ 20°C đến 60°C;

rửa giải dung dịch thử và dung dịch đối chiếu qua cột sắc ký trong khoảng thời gian từ 5 đến 60 phút với hệ pha động kết hợp bao gồm:

pha động kênh A là axetonitril hoặc metanol có thể được bổ sung thêm axit, bazơ hoặc đệm với tỷ lệ thể tích từ 0% đến 5,0%;

pha động kênh B là nước có thể được bổ sung thêm axit, bazơ hoặc đệm với tỷ lệ thể tích từ 0% đến 5,0%;

các pha động này được triển khai theo chương trình dung môi đẳng dòng hoặc chương trình rửa giải gradient với tốc độ dòng pha động từ 0,4mL/phút đến 2,0mL/phút;

phát hiện chất cleisindosid D và các tạp chất liên quan bằng detector DAD tại bước sóng từ 200nm đến 360nm thu được sắc ký đồ của dung dịch trên;

+ tính hàm lượng tạp chất đơn 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 từng pic tạp chất trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

r_S là diện tích pic cleisindosid D trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu;

C_S là nồng độ của cleisindosid D trong dung dịch đối chiếu;

C_U là nồng độ của cleisindosid D trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

+ tính hàm lượng phần trăm tổng tạp chất liên quan (%) tính bằng công thức sau:

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

trong đó;

$\sum r_U$ là tổng diện tích của tất cả các pic tạp chất trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

r_S là diện tích pic cleisindosid D trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu;

C_S là nồng độ của cleisindosid D trong dung dịch đối chiếu;

C_U là nồng độ của cleisindosid D trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

- định lượng hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc bằng kỹ thuật chuẩn độ đo thể hoặc phổ cộng hưởng từ hạt nhân được thực hiện như sau:

+ pha chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi hoà tan metanol hoặc axetonitril dùng trong NMR để được nồng độ dung dịch 100 ppm;

- + pha chất chuẩn nội là 1,3,5- trimetoxybenzen trong dung môi metanol hoặc 1,2,4,5-tetrametoxybenzen trong dung môi hoà tan axetonitril dùng trong NMR để được nồng độ dung dịch 100 ppm;
- + phối trộn chất chuẩn gốc và chất chuẩn nội theo tỷ lệ 1:1; và
- + đo phổ cộng hưởng từ ^1H -NMR và tính hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc cleisindosid D.

Mô tả vắn tắt hình vẽ

Hình 1 là Quả cây thuộc chi Cách hoa (*Cleistanthus*).

Mô tả chi tiết giải pháp hữu ích

Sau đây, giải pháp hữu ích được mô tả chi tiết với các phương án và những ví dụ thực hiện cụ thể, nhưng các phương án và ví dụ này chỉ nhằm mục đích 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.

Chất tinh khiết cleisindosid D được phân lập từ quả của cây thuộc chi Cách hoa (*Cleistanthus*) được lựa chọn từ nhóm gồm: Cách hoa nhiều hoa (*C. myrianthus* Kurz); Chà chôi, cọc rào (*C. tonkinensis* Jabl); Cách hoa Peteloti (*C. peteloti* Merr. Ex Croiz); Cách hoa đầy lông (*C. tomentosus* Hana); Cách hoa dạng Chanh châu (*C. sageretoides* Merr); Cách hoa cộng dài (*C. longipedicellatus*); Cách hoa Sumatra (*C. sumatranus* (Miq.). Muell. Arg); Cách hoa đông dương (*C. indochinensis* Merr.ex Croiz); Cách hoa ganep (*C. annamensis* Gagn); Cách hoa eberhardt (*C. eberhardtii* (Gagn) Croiz); Cách hoa ca (*C. concinnus* Croiz); Cách hoa Pierre (*C. pierrei* (Gagnep.) Croiz); Cách hoa nhọn (*C. acuminatus*) và Cách hoa nhọn (*C. acuminatus*).

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tinh chế và thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ chất tinh khiết cleisindosid D bao gồm các bước sau:

a) Tinh chế chất tinh khiết cleisindosid D thành nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc:

Chất tinh khiết cleisindosid D được tinh chế bằng cột sắc kí cỡ điển hoặc sắc kí lỏng điều chế hoặc bằng cách kết tinh nhiều lần bằng hệ dung môi cloroform:*n*-hexan theo tỷ lệ cloroform/*n*-hexan là 4/6 hoặc hệ dung môi *n*-butanol:*n*-hexan theo

tỷ lệ *n*-butanol/*n*-hexan là 3/7 hoặc hệ dung môi etanol:*n*-hexan theo tỷ lệ etanol/*n*-hexan là 2/8.

b) Thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ chất tinh khiết cleisindosid D bao gồm các công đoạn sau:

- xác định tính chất của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng cách kiểm tra cảm quan chất chuẩn gốc cleisindosid D là bột kết tinh màu trắng, không mùi, vị đắng; xác định độ tan của chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng cách cho một thể tích dung môi vào 1 g chất chuẩn gốc cleisindosid D để ở nhiệt độ từ 22°C đến 27°C trong khoảng 30 phút, cứ 5 phút lại lắc 30 giây, chất chuẩn gốc cleisindosid D tan thành một dung dịch trong, đồng nhất, không còn những phần tử nào của chất cleisindosid D; trong đó, chất chuẩn gốc cleisindosid D được xác định là tan trong diclometan, cloroform, axeton, metanol, axetonitril; hơi tan trong etyl axetat; khó tan trong *n*-hexan, *n*-butanol, etanol và nước.

- định tính nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-NMR và ¹³C-NMR) kết hợp với phổ khối HRESI-MS, hồng ngoại (IR) và quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến (UV-VIS);

- xác định nhiệt độ nóng chảy của chất chuẩn gốc cleisindosid D từ 220°C đến 230°C bằng phương pháp đo mao quản theo dược điển Việt Nam hoặc bằng kỹ thuật quét nhiệt vi sai, trong đó kỹ thuật quét nhiệt vi sai được thực hiện như sau:

- + cân lượng mẫu chất chuẩn gốc cleisindosid D nằm trong khoảng từ 3 mg đến 20 mg;

- + cài đặt nhiệt độ với tốc độ gia nhiệt từ 5°C/phút đến 10°C/phút từ nhiệt độ phòng thí nghiệm đến nhiệt độ khoảng 210°C và duy trì tốc độ gia nhiệt từ 2°C/phút đến 5°C/phút đến nhiệt độ khoảng 240°C;

- + cài đặt lưu lượng dòng khí nitơ từ 30 mL/phút đến 60 mL/phút;

- + tiến hành đo mẫu trong khoảng thời gian từ 20 phút đến 60 phút;

- đo góc quay cực riêng của chất chuẩn gốc cleisindosid D theo dược điển Việt Nam bằng cách pha chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi cloroform hoặc metanol có nồng độ cleisindosid D từ 0,3% đến 1,0%, dung dịch cleisindosid D thu được có góc quay cực riêng ($[\alpha]_D^{20}$) nằm trong khoảng từ -140,0° đến -160,0°.

- xác định tạp chất liên quan theo một trong các phương án sau:
 - + xác định hàm lượng tổng tạp chất liên quan và từng tạp chất liên quan trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp HPLC/DAD sử dụng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử thành dung dịch đối chiếu.
 - + xác định hàm lượng tổng tạp chất liên quan và từng tạp chất liên quan trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp HPLC/DAD sử dụng kỹ thuật chuẩn hóa diện tích.
- xác định hàm lượng tổng tạp chất bay hơi trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp mất khối lượng do làm khô (Loss on drying) theo phụ lục 9.6 của Dược điển Việt Nam hoặc phương pháp phân tích nhiệt lượng (Thermo gravimetric analysis-TGA), trong đó phương pháp phân tích nhiệt lượng được thực hiện như sau:
 - + cân lượng chất chuẩn gốc cleisindosid D khoảng từ 3 mg đến 30 mg đưa vào cốc đo.
 - + cài đặt chương trình nhiệt độ với tốc độ gia nhiệt từ 5°C/phút đến 10°C/phút đến nhiệt độ 105°C, duy trì nhiệt độ 105°C trong khoảng thời gian từ 2 giờ 30 phút đến 5 giờ.
 - + cài đặt lưu lượng dòng khí nitơ từ 20 mL/phút đến 50 mL/phút;
 - + tính hàm lượng phần trăm tạp chất bay hơi (%) có trong nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng khối lượng chất giảm đi so với lượng chất chuẩn gốc cleisindosid D ban đầu x 100%;
- xác định tạp chất vô cơ bằng phép thử tro sulfat theo phụ lục 9.6 Dược điển Việt Nam hoặc bằng kỹ thuật phân tích nhiệt lượng (Thermo gravimetric analysis-TGA), trong đó phương pháp phân tích nhiệt lượng được thực hiện như sau:
 - + nung chén platin ở nhiệt độ khoảng 600°C±50°C trong thời gian 30 phút, để trong bình hút ẩm về nhiệt độ phòng, rồi cân chén nung.
 - + cân khoảng từ 5mg đến 25mg chất chuẩn gốc cleisindosid D vào chén nung;
 - + đưa nhiệt độ thiết bị từ 550°C đến 1000°C trong khoảng thời gian từ 3 giờ đến 6 giờ đến khi cán hoá tro hoàn toàn đến khối lượng không đổi.
 - + xác định tạp chất vô cơ được tính bằng lượng cân còn lại sau khi nung/lượng cân chất chuẩn gốc clesindosid D x 100%.

- định lượng hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc bằng kỹ thuật chuẩn độ đo thể hoặc phổ cộng hưởng từ hạt nhân định lượng, trong đó phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân được thực hiện như sau:

- + Pha chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi hoà tan metanol hoặc axetonitril dùng trong NMR để được nồng độ dung dịch 100 ppm.
- + Pha chất chuẩn nội là 1,3,5- trimetoxybenzen trong dung môi metanol hoặc 1,2,4,5-tetrametoxybenzen trong dung môi hoà tan axetonitril dùng trong NMR để được nồng độ dung dịch 100 ppm;
- + Phối trộn chất chuẩn gốc và chất chuẩn nội theo tỷ lệ 1:1; và
- + Đo phổ cộng hưởng từ ^1H -NMR và tính hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc cleisindosid D.

Chất chuẩn gốc cleisindosid D sau khi được thiết lập được đóng ống trong buồng chuyên dụng Glove-box Labconco, sử dụng ống thủy tinh trung tính, màu nâu, hình tròn, khối lượng chất chuẩn gốc cleisindosid D trong ống từ 5 mg đến 200 mg.

Đánh giá độ đồng nhất của ống chất chuẩn gốc cleisindosid D bao gồm đánh giá độ đồng nhất trong ống là mỗi ống chuẩn có cùng một giá trị ở các vị trí khác nhau và đánh giá độ đồng nhất giữa các ống là đảm bảo đồng nhất giữa các ống khi mà người sử dụng chất chuẩn lấy các mẫu phụ đem đo.

Xác định giá trị công bố trên nhãn ống chuẩn gốc cleisindosid D và trên phiếu kiểm nghiệm-COA được thực hiện như sau:

- xác định hàm lượng tổng tạp chất liên quan bằng HPLC/DAD và độ tinh khiết sắc kí của cleisindosid D được tính bằng 100% - hàm lượng tổng tạp chất liên quan trong chất chuẩn gốc cleisindosid D.
- xác định hàm lượng tổng tạp chất bay hơi trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp phân tích nhiệt lượng (Thermo gravimetric analysis-TGA).
- xác định hàm lượng tạp chất vô cơ theo phép thử tro sulfat hoặc phương pháp phân tích nhiệt lượng (Thermo gravimetric analysis-TGA);

trong đó, mỗi phương pháp được so sánh liên phòng tại ít nhất 3 phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn GMP và ISO-17025; đánh giá kết quả giữa các phòng thí nghiệm

bằng test Anova 1 yếu tố để xác định được giá trị trung bình giữa các phòng thí nghiệm khác nhau không có ý nghĩa thống kê.

- tính giá trị trung bình của các kết quả phân tích hàm lượng tổng tạp chất liên quan bằng HPLC/DAD, hàm lượng tổng tạp chất bay hơi và hàm lượng tạp chất vô cơ của các phòng thí nghiệm.
- xác định độ tinh khiết (hay hàm lượng) của chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp cân bằng khối lượng theo công thức sau:

độ tinh khiết = độ tinh khiết sắc kí $\times (100 - \% \text{ tạp bay hơi} - \% \text{ tạp vô cơ})/100$;
hoặc

độ tinh khiết = $(100\% - \% \text{ tạp chất hữu cơ} - \% \text{ tạp chất vô cơ} - \% \text{ tạp chất bay hơi})$; hoặc

độ tinh khiết = $(100\% - \% \text{ tạp chất hữu cơ} - \% \text{ tạp chất vô cơ} - \% \text{ nước} - \% \text{ dung môi tồn dư})$.

- xác định giá trị công bố trên nhãn ống chuẩn gốc cleisindosid D là $X \pm 2 \times \text{Umr}$; trong đó X là độ tinh khiết (hay hàm lượng cleisindosid D) của chất chuẩn gốc được tính bằng phương pháp cân bằng khối lượng ở trên, Umr là độ không đảm bảo đo mở rộng.

Theo một phương án, bước tinh chế chất tinh khiết cleisindosid D còn được thực hiện bằng cột sắc kí cổ điển hoặc sắc kí lỏng điều chế và được thực hiện như sau:

- lựa chọn cột sắc kí nhồi hạt silica gel pha đảo là một trong nhóm gồm: RP-C30; RP-C18; RP-C8, RP-C6; RP-C₆H₅ (Phenyl);
- lựa chọn pha động bao gồm: axeton hoặc metanol hoặc axetonitril hoặc isopropanol với tỉ lệ thể tích từ 10% đến 50% phối hợp với nước vừa đủ 100%, hứng các phân đoạn có chứa cleisindosid D;
- kiểm tra sự có mặt của chất cleisindosid D trong các phân đoạn thu được bằng một trong các cách sau:

+ sắc kí lớp mỏng (TLC) chứa hạt pha tĩnh pha đảo là: RP-C18 hoặc RP-C8 hoặc RP-C₆H₅ (Phenyl) với hệ pha động axeton:nước hoặc metanol:nước hoặc axetonitril:nước hoặc isopropanol:nước với tỉ lệ từ (10:90) đến (50:50), phát hiện

bằng cách soi đèn UV 254 nm và 366 nm hoặc phun thuốc thử hiện màu như vanilin hay Ceri sulfat được pha theo hướng dẫn của Dược Điển Việt Nam; hoặc

+ sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC/DAD) nhồi hạt pha tĩnh pha đảo là: RP-C30 hoặc RP-C18 hoặc RP-C8 hoặc RP-C6 hoặc RP-C₆H₅ (Phenyl) với hệ pha động axeton:nước hoặc metanol:nước hoặc axetonitril:nước hoặc isopropanol:nước với tỉ lệ từ 10:90 đến 50:50, phát hiện bằng detector DAD có bước sóng từ 200 nm và 360 nm.

Theo một phương án khác nữa, bước định tính nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D được thực hiện bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-NMR và ¹³C-NMR) kết hợp với phổ khối HRESI-MS, hồng ngoại (IR) và quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến (UV-VIS) như sau:

- phổ ¹H-NMR của chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi CDCl₃, 500 MHz có các độ dịch chuyển hoá học (δ_H) đặc trưng nằm trong khoảng sau: 2,70; 3,04; 3,18; 3,28; 3,39; 3,41; 3,67; 3,99; 4,07; 4,34; 4,45; 4,64; 5,28 5,83; 5,84; 5,89; 5,93; 6,26; 6,65; 6,69 ($\pm 0,5$ ppm);
- phổ ¹³C-NMR của chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi CDCl₃, 125 MHz có các độ dịch chuyển hoá học đặc trưng (δ_C) nằm trong khoảng sau: 38,4; 44,0; 45,5; 59,9; 61,5; 69,8; 72; 73,5; 75,2; 76,0; 76,3; 99,4; 100,9; 101,5; 104,8; 107,6; 110,7; 122; 123,8; 132,8; 135,3; 136,8; 142,1; 146,6; 147,3; 149,9; 174,2 ppm ($\pm 0,5$ ppm);
- phổ khối HRESI-MS của chất chuẩn gốc cleisindosid D có mảnh m/z 583,1409 [M+Na]⁺ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử C₂₇H₂₈O₁₃Na, 583,1428);
- phổ hồng ngoại (IR) của chất chuẩn gốc cleisindosid D trong KBr, trong đó các đỉnh hấp thụ đặc trưng ($\nu_{\max}$) của cleisindosid D bao gồm: từ 3400 cm⁻¹ đến 3440 cm⁻¹, từ 2910 cm⁻¹ đến 2950 cm⁻¹, từ 1750 cm⁻¹ đến 1790 cm⁻¹, từ 1600 cm⁻¹ đến 1640 cm⁻¹, từ 1455 cm⁻¹ đến 1495 cm⁻¹, từ 1210 cm⁻¹ đến 1250 cm⁻¹, từ 1050 cm⁻¹ đến 1090 cm⁻¹ và từ 1015 cm⁻¹ đến 1055 cm⁻¹;
- quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến (UV-VIS) của chất chuẩn gốc cleisindosid trong dung môi được lựa chọn là axetonitril hoặc axetonitril:H₂O có tỉ lệ từ 3/7 đến 7/3 hoặc metanol hoặc metanol: H₂O có tỉ lệ từ 3/7 đến 7/3 và phổ UV có 2 bước sóng cực đại ($\lambda_{\max}$ nm) nằm trong khoảng từ 200 nm đến 210 nm và trong khoảng từ 280 nm đến 290 nm;

Theo một phương án khác, bước xác định tạp chất liên quan trong chất chuẩn gốc cleisindosid D được thực hiện bằng cách xác định hàm lượng tổng tạp chất liên quan và từng tạp chất liên quan trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp HPLC/DAD sử dụng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử thành dung dịch đối chiếu, bao gồm các công đoạn:

i) chuẩn bị dung dịch:

- dung dịch thử được pha từ chất chuẩn gốc cleisindosid D có nồng độ cleisindosid D nằm trong khoảng 500 µg/ml đến 5000 µg/ml;
- dung dịch đối chiếu được pha loãng từ dung dịch thử trên từ 50 lần đến 1000 lần; trong đó, các dung dịch trên được pha trong dung môi axetonitril hoặc metanol hoặc pha động;

ii) tiến hành sắc kí HPLC/DAD:

- tiêm cùng một thể tích từ 1 µL đến 100 µL các dung dịch thử và dung dịch đối chiếu được chuẩn bị ở trên vào cột Phenyl C₆H₅ (50-300 mm x 2-4,6 mm; 1-10 µm) hoặc cột ODS C18 (50-300 mm x 2-4,6 mm; 1-10 µm) hoặc cột C8 (50-300 mm x 2-4,6 mm; 1-10 µm), duy trì nhiệt độ cột trong khoảng từ 20°C đến 60°C;
- rửa giải dung dịch thử và dung dịch đối chiếu trên qua cột sắc kí nêu trên trong khoảng thời gian từ 5 phút đến 60 phút với hệ pha động kết hợp bao gồm:

Pha động kênh A là axetonitril hoặc metanol có thể được bổ sung thêm chất thuộc nhóm gồm: axit, bazơ, đệm với tỉ lệ thể tích từ 0% đến 5,0%, trong đó axit hữu cơ được lựa chọn từ nhóm bao gồm axit formic, axit axetic, axit oxalic, axit trifloaxetic (TEA), axit tricloaxetic (TCA) hoặc axit vô cơ được lựa chọn từ nhóm bao gồm axit clohydric, axit phosphoric; bazơ hữu cơ được lựa chọn từ nhóm bao gồm diethylamin, triethylamin, trietanolamin hoặc bazơ vô cơ như amoniac; và đệm hữu cơ được lựa chọn từ nhóm bao gồm đệm format, đệm axetat, đệm amoni format, đệm amoni axetat, đệm Tris (tên khoa học là: Tris(hydroxymetyl)aminometan) còn có tên khác là THAM, đệm His, đệm HEPES (tên khoa học là: axit -(2-hydroxyetyl)piperazin-1-etanesulfonic, axit N-(2-hydroxyetyl)piperazin-N'-(2-etanesulfonic)), đệm MES, đệm MOPS hoặc hệ đệm vô cơ được lựa chọn từ nhóm bao gồm đệm amoni và đệm phosphat.

Pha động kênh B là nước có thể được bổ sung thêm chất thuộc nhóm gồm: axit, bazơ, đệm với tỉ lệ thể tích từ 0% đến 5,0%, trong đó axit hữu cơ được lựa chọn từ nhóm bao gồm axit formic, axit axetic, axit oxalic, axit trifloaxetic (TEA), axit tricloaxetic (TCA) hoặc axit vô cơ được lựa chọn từ nhóm bao gồm axit clohydric, axit phosphoric; bazơ hữu cơ được lựa chọn từ nhóm bao gồm dietylamin, trietylamin, trietanolamin hoặc bazơ vô cơ như amoniac; và đệm hữu cơ được lựa chọn từ nhóm bao gồm đệm format, đệm axetat, đệm amoni format, đệm amoni axetat, đệm Tris, đệm His, đệm HEPES, đệm MES, đệm MOPS hoặc hệ đệm vô cơ được lựa chọn từ nhóm bao gồm đệm amoni và đệm phosphat.

Pha động trên được triển khai theo chương trình dung môi đẳng dòng hoặc chương trình rửa giải gradient với tốc độ dòng pha động từ 0,4 mL/phút đến 2,0 mL/phút;

- phát hiện chất cleisindosid D và các tạp chất liên quan bằng detector DAD tại bước sóng từ 200 nm đến 360 nm thu được các sắc kí đồ của các dung dịch trên.

iii) tính hàm lượng tạp chất đơn và tổng tạp chất liên quan như sau:

- hàm lượng phần trăm tạp chất đơn (%) tính bằng công thức sau:

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

trong đó:

r_U là diện tích của từng pic tạp chất trên sắc kí đồ của dung dịch thử;

r_S là diện tích pic cleisindosid D trên sắc kí đồ của dung dịch đối chiếu;

C_S là nồng độ của cleisindosid D trong dung dịch đối chiếu;

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

- hàm lượng phần trăm tổng tạp chất liên quan (%) tính bằng công thức sau:

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

trong đó;

$\sum r_U$ là tổng diện tích của tất cả các pic tạp chất trên sắc kí đồ của dung dịch thử;

r_S là diện tích pic cleisindosid D trên sắc kí đồ của dung dịch đối chiếu;

C_S là nồng độ của cleisindosid D trong dung dịch đối chiếu;

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

Theo một phương án khác nữa, bước xác định hàm lượng tổng tạp chất bay hơi trong chất chuẩn gốc cleisindosid D được xác định bằng tổng lượng tồn dư dung môi hoặc tổng lượng nước và được thực hiện như sau:

- xác định tổng lượng dung môi tồn dư bằng GC/MS hoặc GC/FID.
- xác định tổng lượng nước bằng Karl-Fisher hoặc chuẩn độ đo điện tích theo được điển Việt Nam V.

Ví dụ thực hiện giải pháp hữu ích

Ví dụ 1: Tinh chế và thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ 12g chất tinh khiết cleisindosid D được phân lập từ quả của cây Cách hoa Peteloti (*C. peteloti* Merr. Ex Croiz).

Chất tinh khiết cleisindosid D được tinh chế bằng cách kết tinh 3 lần với hệ dung môi cloroform: *n*-hexan với tỉ lệ thể tích là 4/6 thu được 12 g nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc có độ tinh khiết khoảng 97%. Sau đó, chất tinh khiết cleisindosid D đã tinh chế được kiểm tra cảm quan là bột kết tinh màu trắng, không mùi, vị đắng và độ tan của chất chuẩn gốc cleisindosid D được xác định là tan trong diclometan, cloroform, axeton, metanol, axetonitril, hơi tan trong etyl axetat và khó tan trong *n*-hexan, *n*-butanol, etanol và nước.

Nhiệt độ nóng chảy của chất chuẩn gốc cleisindosid D là 223,5°C được đo bằng phương pháp quét nhiệt vi sai bao gồm các bước sau: cân lượng mẫu chất chuẩn gốc cleisindosid D là 4,3 mg; cài đặt nhiệt độ với tốc độ gia nhiệt từ 5°C/phút từ nhiệt độ phòng thí nghiệm đến nhiệt độ khoảng 210°C và duy trì tốc độ gia nhiệt 2°C/phút đến nhiệt độ khoảng 240°C; cài đặt lưu lượng dòng khí nitơ từ 33 mL/phút và đo mẫu trong khoảng thời gian là 55 phút. Đo góc quay cực riêng của cleisindosid D ($[\alpha]_D^{20}$) nằm trong khoảng là -147,2° bằng cách pha chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi cloroform có nồng độ là 0,3%.

Xác định hàm lượng tổng tạp chất liên quan và từng tạp chất liên quan trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp HPLC/DAD sử dụng kĩ thuật pha loãng dung dịch thử thành dung dịch đối chiếu được thực hiện như sau:

- chuẩn bị dung dịch thử được pha từ chất chuẩn gốc cleisindosid D có nồng độ cleisindosid D 500 µg/ml trong metanol và dung dịch đối chiếu được pha loãng từ dung dịch thử trên 100 lần bằng metanol.
- tiêm cùng một thể tích 10µL các dung dịch thử và dung dịch đối chiếu ở trên vào cột Phenyl C₆H₅ (150 mm x 4,6 mm; 10 µm), duy trì nhiệt độ cột ở nhiệt độ phòng.
- rửa giải dung dịch thử và dung dịch đối chiếu trên với hệ pha động kênh A là metanol kết hợp với pha động kênh B là nước bổ sung thêm axit axetic 3,0% theo chương trình rửa giải gradient như sau:

Thời gian (phút)	Kênh A	Kênh B
0	30	70
20	50	50
50	70	30
55	30	70
Thời gian phân tích 60 phút		
Tốc độ dòng 1,2 ml/phút		
Thể tích tiêm: 30 µL		
Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng		

- phát hiện chất cleisindosid D và các tạp chất liên quan tại bước sóng 202 nm, xác định được hàm lượng phần trăm tổng tạp chất liên quan là 1,7% và hàm lượng phần trăm tạp đơn là 0,9%.

Xác định hàm lượng tổng tạp chất bay hơi trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp mất khối lượng do làm khô là 1,0%.

Xác định tạp chất vô cơ bằng phép thử tro sulfat theo phụ lục 9.6 được điển Việt Nam là 0,006%.

Chất chuẩn gốc cleisindosid D được xác định hàm lượng cleisindosid D bằng kỹ thuật chuẩn độ đo thể hoặc phổ cộng hưởng từ hạt nhân định lượng và được thực hiện như sau: pha 1 mg chất chuẩn gốc cleisindosid D trong 10 ml dung môi hoà tan metanol dùng trong NMR thu được nồng độ dung dịch 100 ppm; pha 1 mg chất chuẩn nội là 1,3,5- trimetoxibenzen trong 10 ml dung môi metanol dùng trong NMR thu được nồng độ dung dịch 100 ppm; sau đó phối trộn chất chuẩn gốc và

chất chuẩn nội theo tỷ lệ 1:1; và đo phổ cộng hưởng từ $^1\text{H-NMR}$ và tính hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc cleisindosid D là 96,7%.

Ví dụ 2: Tinh chế và thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ 17g chất tinh khiết cleisindosid D được phân lập từ quả của cây Cách hoa cọng dài (*C. longipedicellatus*).

Chất tinh khiết cleisindosid D được tinh chế bằng cách kết tinh 2 lần với hệ dung môi *n*-butanol/*n*-hexan với tỉ lệ thể tích là 3/7 thu được 17g nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc có độ tinh khiết khoảng 96%. Sau đó, chất tinh khiết cleisindosid D đã tinh chế được kiểm tra cảm quan là bột kết tinh màu trắng, không mùi, vị đắng và độ tan của chất chuẩn gốc cleisindosid D được xác định là tan trong diclometan, cloroform, axeton, metanol, axetonitril, hơi tan trong ethyl axetat và khó tan trong *n*-hexan, *n*-butanol, etanol và nước.

Nhiệt độ nóng chảy của chất chuẩn gốc cleisindosid D là 226,9°C được đo bằng phương pháp quét nhiệt vi sai bao gồm các bước sau: cân lượng mẫu chất chuẩn gốc cleisindosid D là 14,3 mg; cài đặt nhiệt độ với tốc độ gia nhiệt từ 10°C/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm đến nhiệt độ khoảng 210°C và duy trì tốc độ gia nhiệt 5°C/phút đến nhiệt độ khoảng 240°C; cài đặt lưu lượng dòng khí nitơ 40 mL/phút và đo mẫu trong khoảng thời gian là 30 phút. Đo góc quay cực riêng của cleisindosid D ($[\alpha]_D^{20}$) nằm trong khoảng là -156,2° bằng cách pha chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi cloroform có nồng độ là 0,6%.

Xác định hàm lượng tổng tạp chất liên quan và từng tạp chất liên quan trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp HPLC/DAD sử dụng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử thành dung dịch đối chiếu được thực hiện như sau:

- chuẩn bị dung dịch thử được pha từ chất chuẩn gốc cleisindosid D có nồng độ cleisindosid D 5000 µg/ml trong metanol và dung dịch đối chiếu được pha loãng từ dung dịch thử trên 100 lần bằng metanol.
- tiêm cùng một thể tích 10µL các dung dịch thử và dung dịch đối chiếu ở trên vào cột C8 (250 mm x 4,6 mm; 10 µm), duy trì nhiệt độ cột ở nhiệt độ phòng.
- rửa giải dung dịch thử và dung dịch đối chiếu trên với hệ pha động kênh A là metanol kết hợp với pha động kênh B là nước bổ sung thêm diethylamin 2,0% theo chương trình rửa giải gradient như sau:

Thời gian (phút)	Kênh A	Kênh B
0	20	80
20	60	40
55	80	20
60	20	80
Thời gian phân tích 65 phút		
Tốc độ dòng 1,2 ml/phút		
Thể tích tiêm: 20 μ L		
Nhiệt độ cột: 40°C		

- phát hiện chất cleisindosid D và các tạp chất liên quan tại bước sóng 208 nm, xác định được hàm lượng phần trăm tổng tạp chất liên quan là 1,6% và hàm lượng phần trăm tạp đơn là 0,8%.

Xác định hàm lượng tổng tạp chất bay hơi trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp mất khối lượng do làm khô là 0,9%.

Xác định tạp chất vô cơ bằng phép thử tro sulfat theo phụ lục 9.6 được điển Việt Nam là 0,007%.

Chất chuẩn gốc cleisindosid D được xác định hàm lượng cleisindosid D bằng kỹ thuật chuẩn độ đo thể hoặc phổ cộng hưởng từ hạt nhân định lượng và được thực hiện như sau: pha 2 mg chất chuẩn gốc cleisindosid D trong 20 ml dung môi hoà tan metanol dùng trong NMR thu được nồng độ dung dịch 100 ppm; pha 2mg chất chuẩn nội là 1,3,5- trimetoxibenzen trong 20 ml dung môi metanol dùng trong NMR thu được nồng độ dung dịch 100 ppm; sau đó phối trộn chất chuẩn gốc và chất chuẩn nội theo tỷ lệ 1:1; và đo phổ cộng hưởng từ ^1H -NMR và tính hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc cleisindosid D là 95,7%.

Ví dụ 3: Tinh chế và thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ 12g chất tinh khiết cleisindosid D được phân lập từ quả của cây Cách hoa eberhardt (*C. eberhardtii* (Gagn) Croiz).

Chất tinh khiết cleisindosid D được tinh chế bằng cách kết tinh 3 lần với hệ dung môi ethanol/*n*-hexan với tỉ lệ thể tích là 2/8 thu được 12g nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc có độ tinh khiết khoảng 96%. Sau đó, chất tinh khiết cleisindosid D đã tinh chế được kiểm tra cảm quan là bột kết tinh màu trắng, không mùi, vị đắng và độ

tan của chất chuẩn gốc cleisindosid D được xác định là tan trong diclometan, cloroform, axeton, metanol, axetonitril, hơi tan trong etyl axetat và khó tan trong *n*-hexan, *n*-butanol, etanol và nước.

Nhiệt độ nóng chảy của chất chuẩn gốc cleisindosid D là 224,8°C được đo bằng phương pháp quét nhiệt vi sai bao gồm các bước sau: cân lượng mẫu chất chuẩn gốc cleisindosid D là 12,3 mg; cài đặt nhiệt độ với tốc độ gia nhiệt từ 5°C/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm đến nhiệt độ khoảng 210°C và duy trì tốc độ gia nhiệt 10°C/phút đến nhiệt độ khoảng 240°C; cài đặt lưu lượng dòng khí nitơ 50 mL/phút và đo mẫu trong khoảng thời gian là 45 phút. Đo góc quay cực riêng của cleisindosid D ($[\alpha]_D^{20}$) nằm trong khoảng là -152,2° bằng cách pha chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi cloroform có nồng độ là 1,0%.

Xác định hàm lượng tổng tạp chất liên quan và từng tạp chất liên quan trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp HPLC/DAD sử dụng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử thành dung dịch đối chiếu được thực hiện như sau:

- chuẩn bị dung dịch thử được pha từ chất chuẩn gốc cleisindosid D có nồng độ cleisindosid D 1500 µg/ml trong metanol và dung dịch đối chiếu được pha loãng từ dung dịch thử trên 200 lần bằng metanol.
- tiêm cùng một thể tích 10µL các dung dịch thử và dung dịch đối chiếu ở trên vào cột C8 (250 mm x 4,6 mm; 10 µm), duy trì nhiệt độ cột ở nhiệt độ phòng.
- rửa giải dung dịch thử và dung dịch đối chiếu trên với hệ pha động kênh A là metanol kết hợp với pha động kênh B là nước bổ sung thêm amoni axetat 0,5% theo chương trình rửa giải gradient như sau:

Thời gian (phút)	Kênh A	Kênh B
0	25	75
30	80	20
55	80	20
60	25	75
Thời gian phân tích 65 phút		

Tốc độ dòng 1,0 ml/phút
Thể tích tiêm: 60 μ L
Nhiệt độ cột: 30°C

- phát hiện chất cleisindosid D và các tạp chất liên quan tại bước sóng 210 nm, xác định được hàm lượng phần trăm tổng tạp chất liên quan là 2,9% và hàm lượng phần trăm tạp đơn là 1,5%.

Xác định hàm lượng tổng tạp chất bay hơi trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp mất khối lượng do làm khô là 3,7%.

Xác định tạp chất vô cơ bằng phép thử tro sulfat theo phụ lục 9.6 được điển Việt Nam là 0,006%.

Chất chuẩn gốc cleisindosid D được xác định hàm lượng cleisindosid D bằng kỹ thuật chuẩn độ đo thể hoặc phổ cộng hưởng từ hạt nhân định lượng và được thực hiện như sau: pha 2,5 mg chất chuẩn gốc cleisindosid D trong 25 mL dung môi hoà tan metanol dùng trong NMR thu được nồng độ dung dịch 100 ppm; pha 2,5 mg chất chuẩn nội là 1,3,5- trimetoxibenzen trong 25 ml dung môi metanol dùng trong NMR thu được nồng độ dung dịch 100 ppm; sau đó phối trộn chất chuẩn gốc và chất chuẩn nội theo tỷ lệ 1:1; và đo phổ cộng hưởng từ ^1H -NMR và tính hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc cleisindosid D là 93,4%.

Ví dụ 4: Tinh chế và thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ 5g chất tinh khiết cleisindosid D được phân lập từ quả của cây Cách hoa eberhardt (*C. eberhardtii* Gagn) Croiz).

Chất tinh khiết cleisindosid D được tinh chế bằng cách kết tinh 1 lần với hệ dung môi ethanol/*n*-hexan với tỉ lệ thể tích là 2/8 thu được 4g nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc có độ tinh khiết khoảng 96%. Sau đó, chất tinh khiết cleisindosid D đã tinh chế được kiểm tra cảm quan là bột kết tinh màu trắng, không mùi, vị đắng và độ tan của chất chuẩn gốc cleisindosid D được xác định là tan trong diclometan, cloroform, axeton, metanol, axetonitril, hơi tan trong etyl axetat và khó tan trong *n*-hexan, *n*-butanol, etanol và nước.

Nhiệt độ nóng chảy của chất chuẩn gốc cleisindosid D là 226,8°C được đo bằng phương pháp quét nhiệt vi sai bao gồm các bước sau: cân lượng mẫu chất

chuẩn gốc cleisindosid D là 10,3 mg; cài đặt nhiệt độ với tốc độ gia nhiệt từ 5°C/phút ở nhiệt độ phòng thí nghiệm đến nhiệt độ khoảng 210°C và duy trì tốc độ gia nhiệt 10°C/phút đến nhiệt độ khoảng 240°C; cài đặt lưu lượng dòng khí nitơ 50 mL/phút và đo mẫu trong khoảng thời gian là 45 phút. Đo góc quay cực riêng của cleisindosid D ($[\alpha]_D^{20}$) nằm trong khoảng là -154,2° bằng cách pha chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi cloroform có nồng độ là 0,4%.

Xác định hàm lượng tổng tạp chất liên quan và từng tạp chất liên quan trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp HPLC/DAD sử dụng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử thành dung dịch đối chiếu được thực hiện như sau:

- chuẩn bị dung dịch thử được pha từ chất chuẩn gốc cleisindosid D có nồng độ cleisindosid D 4000 µg/ml trong metanol và dung dịch đối chiếu được pha loãng từ dung dịch thử trên 200 lần bằng metanol.
- tiêm cùng một thể tích 50µL các dung dịch thử và dung dịch đối chiếu ở trên vào cột C8 (250 mm x 4,6 mm; 10 µm), duy trì nhiệt độ cột ở nhiệt độ phòng.
- rửa giải dung dịch thử và dung dịch đối chiếu trên với hệ pha động kênh A là axetonitril kết hợp với pha động kênh B là nước bổ sung thêm triethylamin 0,5% theo chương trình rửa giải gradient như sau:

Thời gian (phút)	Kênh A	Kênh B
0	27	73
40	50	50
45	73	27
50	27	73
Thời gian phân tích 55 phút		
Tốc độ dòng 1,0 ml/phút		
Thể tích tiêm: 50 µL		
Nhiệt độ cột: 40°C		

- phát hiện chất cleisindosid D và các tạp chất liên quan tại bước sóng 288 nm, xác định được hàm lượng phần trăm tổng tạp chất liên quan là 2,2% và hàm lượng phần trăm tạp đơn là 1,2%.

Xác định hàm lượng tổng tạp chất bay hơi trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng phương pháp mất khối lượng do làm khô là 1,2%.

Xác định tạp chất vô cơ bằng phép thử tro sulfat theo phụ lục 9.6 được điển Việt Nam là 0,005%.

Chất chuẩn gốc cleisindosid D được xác định hàm lượng cleisindosid D bằng kỹ thuật chuẩn độ đo thể hoặc phổ cộng hưởng từ hạt nhân định lượng và được thực hiện như sau: pha 0,5 mg chất chuẩn gốc cleisindosid D trong 5 ml dung môi hoà tan metanol dùng trong NMR thu được nồng độ dung dịch 100 ppm; pha 0,5 mg chất chuẩn nội là 1,3,5- trimetoxibenzen trong 5 ml dung môi metanol dùng trong NMR thu được nồng độ dung dịch 100 ppm; sau đó phối trộn chất chuẩn gốc và chất chuẩn nội theo tỷ lệ 1:1; và đo phổ cộng hưởng từ ^1H -NMR và tính hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc cleisindosid D là 95,8%.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Hoạt chất cleisindosid D và cao khô chiết xuất từ quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*) đang được nghiên cứu phát triển thành nguyên liệu thuốc điều trị ung thư. Vì vậy, rất cần thiết phải có chất chuẩn gốc cleisindosid D để xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho các nguyên liệu, bán thành phẩm và thành phẩm thuốc này. Hoạt chất cleisindosid D đang được nghiên cứu phát triển thuốc trên thế giới nhưng chưa có chất chuẩn gốc cleisindosid D, nên cần phải thiết lập cleisindosid D thành chất chuẩn gốc có độ tinh khiết của chất chuẩn (hay còn gọi là hàm lượng chất chuẩn) cao. Từ sản phẩm chất chuẩn gốc cleisindosid D đã được đăng kí bảo hộ độc quyền sáng chế, giải pháp hữu ích này đề xuất thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D với lượng lớn để sử dụng trong thường quy kiểm tra, giám sát hàm lượng cleisindosid D trong nguyên liệu, bán thành phẩm và thành phẩm thuốc bao gồm nguyên liệu hoá dược cleisindosid D và các dạng bào chế của chất tinh khiết cleisindosid D (thuốc tiêm, viên nén, viên nang, v.v.), dược liệu, cao dược liệu và các dạng chế phẩm của cao dược liệu từ quả của chi Cách hoa (ví dụ, dạng viên hoàn, viên nang, thuốc tiêm, v.v.).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tinh chế và thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ chất tinh khiết cleisindosid D, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tinh chế chất tinh khiết cleisindosid D bằng cách kết tinh chất tinh khiết cleisindosid D từ 1 đến 3 lần bằng hệ dung môi cloroform:*n*-hexan theo tỷ lệ cloroform/*n*-hexan là 4/6 hoặc hệ dung môi *n*-butanol:*n*-hexan theo tỷ lệ *n*-butanol/*n*-hexan là 3/7 hoặc hệ dung môi etanol:*n*-hexan theo tỷ lệ etanol/*n*-hexan là 2/8; và

b) thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D từ chất tinh khiết cleisindosid D bao gồm các công đoạn: xác định tính chất của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D, định tính nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindosid D, xác định nhiệt độ nóng chảy của chất chuẩn gốc cleisindosid D, đo góc quay cực riêng của chất chuẩn gốc cleisindosid D, xác định tạp chất liên quan, xác định tổng tạp chất bay hơi và tạp chất vô cơ trong chất chuẩn gốc cleisindosid D, và định lượng hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc cleisindosid D; trong đó bước b) khác biệt ở các công đoạn:

- xác định tạp chất liên quan trong chất chuẩn gốc cleisindosid D bằng HPLC/DAD sử dụng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử thành dung dịch đối chiếu và được thực hiện như sau:

+ chuẩn bị dung dịch thử bằng cách pha chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi axetonitril hoặc metanol để thu được nồng độ cleisindosid D nằm trong khoảng từ 500µg/mL đến 5000µg/mL; và chuẩn bị dung dịch đối chiếu bằng cách pha loãng dung dịch thử từ 50 đến 1000 lần trong dung môi axetonitril hoặc metanol;

+ tiến hành sắc ký HPLC/DAD bằng cách tiêm cùng một thể tích từ 1µL đến 100 µL các dung dịch thử và dung dịch đối chiếu vào cột Phenyl C₆H₅ (50-300 mm × 2-4,6 mm; 1-10µm) hoặc cột ODS C18 (50-300 mm × 2-4,6 mm; 1-10µm) hoặc cột C8 (50-300 mm × 2-4,6 mm; 1-10µm), duy trì nhiệt độ cột nằm trong khoảng từ 20°C đến 60°C;

rửa giải dung dịch thử và dung dịch đối chiếu qua cột sắc ký trong khoảng thời gian từ 5 đến 60 phút với hệ pha động kết hợp bao gồm:

pha động kênh A là axetonitril hoặc metanol có thể được bổ sung thêm axit, bazơ hoặc đệm với tỷ lệ thể tích từ 0% đến 5,0%;

pha động kênh B là nước có thể được bổ sung thêm axit, bazơ hoặc đệm với tỷ lệ thể tích từ 0% đến 5,0%;

các pha động này được triển khai theo chương trình dung môi đẳng dòng hoặc chương trình rửa giải gradient với tốc độ dòng pha động từ 0,4mL/phút đến 2,0mL/phút;

phát hiện chất cleisindosid D và các tạp chất liên quan bằng detector DAD tại bước sóng từ 200nm đến 360nm thu được sắc ký đồ của dung dịch trên;

+ tính hàm lượng tạp chất đơn 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 từng pic tạp chất trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

r_S là diện tích pic cleisindosid D trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu;

C_S là nồng độ của cleisindosid D trong dung dịch đối chiếu;

C_U là nồng độ của cleisindosid D trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

+ tính hàm lượng phần trăm tổng tạp chất liên quan (%) tính bằng công thức sau:

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

trong đó;

$\sum r_U$ là tổng diện tích của tất cả các pic tạp chất trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

r_S là diện tích pic cleisindosid D trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu;

C_S là nồng độ của cleisindosid D trong dung dịch đối chiếu;

C_U là nồng độ của cleisindosid D trên sắc ký đồ của dung dịch thử;

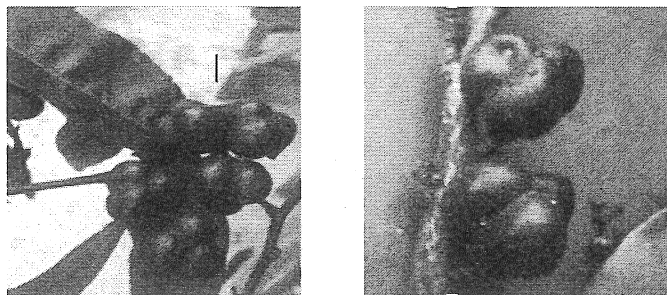
- định lượng hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc bằng kỹ thuật chuẩn độ đo thể hoặc phổ cộng hưởng từ hạt nhân được thực hiện như sau:

+ pha chất chuẩn gốc cleisindosid D trong dung môi hoà tan metanol hoặc axetonitril dùng trong NMR để được nồng độ dung dịch 100 ppm;

+ pha chất chuẩn nội là 1,3,5- trimetoxibenzen trong dung môi metanol hoặc 1,2,4,5-tetrametoxibenzen trong dung môi hoà tan axetonitril dùng trong NMR để được nồng độ dung dịch 100 ppm;

- + phối trộn chất chuẩn gốc và chất chuẩn nội theo tỷ lệ 1:1; và
- + đo phổ cộng hưởng từ ^1H -NMR và tính hàm lượng cleisindosid D trong chất chuẩn gốc cleisindosid D.

HÌNH VẼ



Hình 1. Quả cây thuộc chi Cách hoa (*Cleistanthus*)