



(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)



2-0003217

(51) **C08B 37/00**
2021.01

(13) **Y**

(21) 2-2022-00446

(22) 12/02/2020

(67) 1-2020-00776

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/06/2020 387ASC

(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 THỨ CẤP CLEISTANTOXIN

(57) Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tính chế và thiết lập chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin từ hợp chất cleistantoxin tinh sạch, trong đó quy trình này tính chế hợp chất tinh sạch thành chất chuẩn thứ cấp, từ chất chuẩn thứ cấp này xác định tổng hàm lượng tạp chất, hàm lượng cleistantoxin, hàm lượng phần trăm cleistantoxin so với chất chuẩn gốc và giới hạn tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp. Dựa trên các kết quả thu được cho phép chọn được chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin đáp ứng tiêu chuẩn thay thế cho chất chuẩn gốc.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Giải pháp hữu ích thuộc lĩnh vực dược phẩm, cụ thể là đề cập đến quy trình tinh chế và thiết lập chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin từ chất tinh sạch cleistantoxin.

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 lần đầu tiên được phân lập từ quả loài *Cleistanthus indochinensis*, là hợp chất (7R,8R,7'R,8'R)-7-hydroxy-6-metoxi-3',4':4,5-bis(metylenedioxy)-2,7'-cyclolignan-9',9-olít. Hợp chất này đã được cấp bằng độc quyền sáng chế số 12278.

Cleistantoxin được phân lập từ quả cây Cách hoa Đông dương (*Cleistanthus indochinensis*) cũng được Trịnh Thị Thanh Vân và cộng sự đề cập trong bài báo “*Cytotoxic lignans from fruits of Cleistanthus indochinensis: synthesis of cleistantoxin derivatives*”, Journal of Natural Product, năm 2012, tập 75, trang 1578-1583.

Tuy nhiên, quy trình trên mới phân lập một lượng nhỏ cleistantoxin từ lượng 0,5 kg quả khô 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 đủ độ tinh khiết 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*”. Trường

Đại học Dược Hà Nội, Luận văn thạc sĩ dược học (2018); 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 công bố này mới chỉ khảo sát sơ bộ và chưa đưa ra được quy trình thiết lập chất chuẩn gốc cleistantoxin cũng như các phương pháp xác định tạp chất có trong đó.

Hoạt chất cleistantoxin và cao khô chiết xuất từ quả của chi Cánh hoa (*Cleistanthus*) đang được nghiên cứu phát triển thành nguyên liệu thuốc điều trị ung thư. Do hoạt chất phân lập này thường không đủ tinh sạch nên chất lượng hoạt chất không được kiểm soát và bị phụ thuộc vào quy trình phân lập. Vì vậy, rất cần thiết phải có chất chuẩn cleistantoxin để xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho các nguyên liệu, bán thành phẩm cũng như thành phẩm thuốc này để có thể kiểm soát chất lượng dược phẩm thu được. Tuy nhiên, hoạt chất cleistantoxin đang được nghiên cứu phát triển thuốc, thường các chất chuẩn gốc tinh khiết có giá thành rất cao chỉ phù hợp cho nghiên cứu trong phòng thí nghiệm và trên thế giới chưa có chất chuẩn cleistantoxin phổ cập, nên cần phải thiết lập cleistantoxin thành chất chuẩn thứ cấp với độ tinh khiết đáp ứng tiêu chuẩn cho phép ứng dụng rộng rãi trong phân tích, kiểm soát ngoài thực tế.

Do đó cần quy trình thiết lập chất chuẩn cleistantoxin hữu ích để chuẩn hóa chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin trên cơ sở chất chuẩn gốc cho phép thay thế chất chuẩn gốc để phục vụ công tác thường quy trong việc kiểm tra, giám sát hàm lượng cleistantoxin trong các nguyên liệu, bán thành phẩm cũng như trong dược phẩm.

Bản chất kỹ thuật của giải pháp hữu ích

Mục đích của giải pháp hữu ích nhằm giải quyết các vấn đề nêu trên. Để đạt được mục đích này, giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tinh chế và thiết lập chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tinh chế hợp chất cleistantoxin tinh sạch thành nguyên liệu thiết lập chất chuẩn thứ cấp bằng cách hòa tan và kết tinh 3 lần hợp chất cleistantoxin tinh sạch trong hệ kết hợp bao gồm dung môi hòa tan là diclometan và dung môi không hòa tan là metanol thu được chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin;

b) xác định tổng hàm lượng tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin:

- chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch đối chiếu bằng cách hòa tan chất chuẩn thứ cấp trong dung môi axetonitril đến nồng độ cleistantoxin nằm trong khoảng từ 500 đến 5000 $\mu\text{g/ml}$, tiếp đó pha loãng tiếp một lượng dung dịch thử này với axetonitril theo tỷ lệ pha loãng từ 10 đến 10.000 lần thu được dung dịch thử và dung dịch đối chiếu;

- tiến hành sắc ký HPLC/DAD:

+ tiêm cùng một thể tích từ 1 đến 100 μL dung dịch thử và dung dịch đối chiếu độc lập vào cột sắc ký Phenyl C_6H_5 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , cột ODS C_{18} kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , hoặc cột C_8 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , duy trì nhiệt độ cột trong khoảng từ 20°C đến 60°C;

+ rửa giải cột chứa dung dịch thử và dung dịch đối chiếu trong thời gian 60 phút với pha động kênh A là 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; và

+ xác định các pic và tính diện tích pic của các chất phân tích tại bước sóng từ 200 đến 360 nm;

- tính hàm lượng phần trăm từng tạp chất đơn và tổng lượng tạp chất có trong chất chuẩn thứ cấp theo diện tích pic trên sắc ký đồ để đưa ra hàm lượng tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp:

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 ký đồ của dung dịch thử;

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

C_S là nồng độ của cleistantoxin trong dung dịch đối chiếu;

C_U là nồng độ của cleistantoxin trong 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 ký đồ của dung dịch thử;

r_s là diện tích pic cleistantoxin trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu;

C_s là nồng độ của cleistantoxin trong dung dịch đối chiếu;

C_U là nồng độ của cleistantoxin trong dung dịch thử;

c) xác định hàm lượng cleistantoxin trong chất chuẩn thứ cấp và so sánh với hàm lượng chất chuẩn gốc bằng cách:

- chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch chuẩn gốc bằng cách pha lần lượt chất chuẩn thứ cấp với dung môi axetonitril đến khoảng nồng độ cleistantoxin từ 0,5 đến 500 $\mu\text{g/ml}$, pha chất chuẩn gốc với axetonitril đến khoảng nồng độ cleistantoxin từ 0,5 đến 500 $\mu\text{g/ml}$ thu được dung dịch thử và dung dịch chuẩn gốc;

- tiến hành sắc ký HPLC/DAD:

+ tiêm cùng một thể tích từ 1 đến 100 μL dung dịch thử và dung dịch chuẩn gốc vào cột sắc ký Phenyl C_6H_5 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , hoặc cột ODS C_{18} kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , hoặc cột C_8 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt 1-10 μm , duy trì nhiệt độ cột trong khoảng từ 20°C đến 60°C;

+ rửa giải cột chứa dung dịch thử và dung dịch chuẩn gốc trong thời gian 30 phút với hệ pha động kết hợp bao gồm 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; và

+ xác định các pic và tính diện tích pic của các chất phân tích tại bước sóng từ 200 đến 360 nm;

- tính hàm lượng phần trăm của cleistantoxin theo diện tích pic trên sắc ký đồ để đưa ra kết luận về tỷ lệ hàm lượng cleistantoxin trong chất chuẩn thứ cấp:

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 gốc;

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

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

d) xác định giới hạn tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin:

- chuẩn bị các dung dịch thử và dung dịch đối chiếu:

+ hòa tan chất chuẩn thứ cấp với dung môi hòa tan cleistantoxin đến nồng độ nằm trong khoảng từ 100 đến 50.000 $\mu\text{g/ml}$ thu được dung dịch thử (1); sau đó pha loãng một phần dung dịch thử (1) này với dung môi hòa tan cleistantoxin theo tỷ lệ pha loãng từ 5 đến 1000 lần thu được dung dịch thử (2);

+ pha loãng dung dịch thử (1) với dung môi hòa tan cleistantoxin theo tỷ lệ pha loãng từ 10 đến 10.000 lần thu được dung dịch đối chiếu (1), pha loãng dung dịch chuẩn gốc với dung môi hòa tan cleistantoxin đến nồng độ bằng nồng độ của dung dịch thử (2) thu được dung dịch đối chiếu (2);

trong đó dung môi hòa tan cleistantoxin được sử dụng là dung môi được chọn từ nhóm bao gồm axeton, diclometan, etylaxetat;

- tiến hành sắc kí HPLC/DAD:

+ chấm cùng một thể tích từ 1 đến 100 μL dung dịch thử và dung dịch đối chiếu lên bản mỏng TLC silica gel G, H, GF₂₅₄ hoặc GF₃₆₆;

+ triển khai sắc ký các dung dịch thử (1), dung dịch thử (2), dung dịch đối chiếu (1) và dung dịch đối chiếu (2) với pha động là hệ dung môi gồm: dung môi hòa tan cleistantoxin được chọn từ nhóm gồm axeton, diclometan và etylaxetat với tỉ lệ từ 1 đến 99% và dung môi không hòa tan cleistantoxin được chọn từ nhóm gồm diclometan, metanol, etanol và nước có bổ sung thêm axit hoặc bazơ hoặc dung dịch đệm từ 0 đến 50,0%;

+ phát hiện vết chất phân tích tại bước sóng từ 254 hoặc 366 nm hoặc bằng thuốc thử hiện màu vanilin hoặc Ceri sulfat phat;

+ xác định giới hạn tạp chất trong chất chuẩn bằng cách dựa trên vết phụ trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu, ngoại trừ các vết cleistantoxin, vết dung môi và vết có tỷ số tín hiệu nhiễu $S/N < 2$, so và chọn ra mẫu giới hạn của dung dịch thử mà có vết tạp chất không đậm hơn vết cleistantoxin trên sắc ký đồ dung dịch đối chiếu với nồng độ tương ứng để đưa ra giới hạn tạp chất trong chất chuẩn; và

e) thiết lập thông số của chất chuẩn thứ cấp dựa trên kết quả tổng hàm lượng tạp chất, hàm lượng cleistantoxin, tỷ lệ hàm lượng cleistantoxin với chất chuẩn gốc và giới hạn tạp chất theo kết quả xác định thu được ở trên.

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, tuy nhiên các phương án và những ví dụ thực hiện này chỉ nhằm mục đích làm rõ bản chất của giải pháp hữu ích chứ không giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của giải pháp hữu ích.

Giải pháp hữu ích đề cập đến quy trình tinh chế và thiết lập chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin, trong đó quy trình này bao gồm các bước: a) tinh chế hợp chất cleistantoxin tinh sạch; b) xác định tổng hàm lượng tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin; c) xác định hàm lượng cleistantoxin trong chất chuẩn thứ cấp và so sánh với hàm lượng chất chuẩn gốc; d) xác định giới hạn tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin; và e) thiết lập thông số của chất chuẩn thứ cấp.

Hợp chất cleistantoxin tinh sạch được sử dụng để tinh chế và thiết lập chất chuẩn thứ cấp được sử dụng là hợp chất thu được từ các quy trình phân lập, chiết tách đã biết trong phần tình trạng kỹ thuật, đảm bảo độ tinh sạch về mặt kỹ thuật để phát triển thành chất chuẩn thứ cấp.

Trong bước tinh chế hợp chất cleistantoxin tinh sạch thành nguyên liệu thiết lập chất chuẩn thứ cấp bằng cách hòa tan và kết tinh 3 lần hợp chất cleistantoxin tinh sạch trong hệ kết hợp bao gồm dung môi hòa tan và hệ dung môi không hòa tan cleistantoxin. Dung môi hòa tan cleistantoxin bao gồm axeton, diclorometan, etylaxetat, theo phương án cụ thể, dung môi hòa tan được sử dụng là diclometan. Dung môi không hòa tan cleistantoxin bao gồm diclorometan, metanol, etanol và nước, theo phương án cụ thể, dung môi không hòa tan được sử dụng là metanol. Các kỹ thuật tinh chế hợp chất bằng phương pháp hòa tan, kết tủa là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cụ thể là hợp chất cleistantoxin tinh sạch được hòa tan trong dung môi hòa tan, sau đó bổ sung dung môi không hòa tan để kết tủa, phần kết tủa thu được này tiếp tục được hòa tan và kết tủa. Lặp lại quá trình này để thu được hợp chất cleistantoxin tinh sạch đủ tiêu chuẩn làm nguyên liệu phát triển chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin.

Để đạt được là chất chuẩn thứ cấp, cần xác định tổng hàm lượng tạp chất trong nguyên liệu phát triển chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin. Quá trình này được thực hiện bằng cách áp dụng phương pháp HPLC/DAD với kỹ thuật pha loãng dung dịch thử thành dung dịch đối chiếu như sau:

Chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch đối chiếu bằng cách hòa tan chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin thu được ở trên trong dung môi axetonitril đến nồng độ cleistantoxin nằm trong khoảng từ 500 đến 5000 $\mu\text{g/ml}$. Tiếp đó pha loãng tiếp một lượng dung dịch thử này với axetonitril theo tỷ lệ pha loãng từ 10 đến 10.000 lần thu được dung dịch thử và dung dịch đối chiếu.

Tiến hành sắc ký HPLC/DAD để xác định hàm lượng tạp chất, các tạp chất có trong nguyên liệu thường là các tạp chất đi kèm có cấu trúc và thành phần tương tự với thành phần chính. Việc xác định các thành phần tạp chất này là yếu tố xác định đến khả năng sử dụng nguyên liệu thành chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin. Quá trình này được thực hiện như sau:

Tiến hành tiêm cùng một thể tích từ 1 đến 100 μL dung dịch thử và dung dịch đối chiếu độc lập vào cột sắc ký Phenyl C_6H_5 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , cột ODS C_{18} kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , hoặc cột C_8 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm . Theo các phương án ưu tiên, cột sắc ký được sử dụng là cột Phenyl C_6H_5 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm . Sau khi tiêm, duy trì nhiệt độ cột trong khoảng từ 20°C đến 60°C để ổn định cột.

Tiến hành rửa giải cột chứa dung dịch thử và dung dịch đối chiếu trong thời gian 60 phút. Rửa giải được thực hiện với pha động kênh A là axetonitril hoặc axetonitril có bổ sung thêm axit, bazơ hoặc đệm. 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 một phương án ưu tiên, trong đó pha động kênh A có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ vào axetonitril với tỉ lệ 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 tỉ lệ 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, trong đó 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 tỉ lệ (90:10); hàm lượng phần trăm của tổng tạp chất trong cleistantoxin là 2,5%.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó pha động kênh A có thể được bổ sung thêm các bazơ hữu cơ và bazơ vô cơ vào axetonitril với tỉ lệ 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 tỉ lệ 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 cụ thể, trong đó pha động kênh A là axetonitril được bổ sung thêm triethylamin hoặc diethylamin với tỉ lệ (95:5) và pha động kênh B là nước bổ sung thêm triethylamin hoặc diethylamin với tỉ lệ (95:5); hàm lượng phần trăm của tổng tạp chất trong cleistantoxin là 3,0%.

Theo một phương án ưu tiên khác, trong đó pha động kênh A có thể được bổ sung thêm các hệ đệm hữu cơ và hệ đệm vô cơ vào axetonitril với tỉ lệ 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 tỉ lệ từ 0% đến 100,0% để pha động có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 10,0.

Theo một phương án cụ thể, trong đó pha động kênh A là axetonitril và pha động kênh B là đệm axetat pH=4 hoặc đệm phosphat pH=2 hoặc đệm phosphat pH=7 với tỉ lệ (30:70); hàm lượng phần trăm của tổng tạp chất trong cleistantoxin là 2,5%.

Theo một phương án ưu tiên khác, trong đó pha động kênh A có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ với tỉ lệ từ 0% đến 99,9% và dung môi nhóm triethylamin hoặc diethylamin với tỉ lệ 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 tỉ lệ từ 0% đến 99,9% và dung môi nhóm triethylamin hoặc diethylamin với tỉ lệ từ 0% đến 1,0% vào nước để pha động có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 10,0.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó pha động kênh A là axetonitril: axit formic: triethylamin với tỉ lệ (85:10:5) và pha động kênh B là nước:axit formic:triethylamin với tỉ lệ (85:10:5) (v/v/v); hàm lượng phần trăm của cleistantoxin là 3,0%.

Sau khi rửa giải, tiến hành xác định các pic và tính diện tích pic của các chất phân tích tại bước sóng từ 200 đến 360 nm.

Căn cứ trên số liệu của các pic và diện tích các pic cũng như nồng độ của dung dịch thử, dung dịch đối chiếu để tính hàm lượng phần trăm từng tạp chất đơn và tổng lượng tạp chất có trong chất chuẩn thứ cấp. Dựa trên diện tích pic trên sắc ký đồ có thể xác định được hàm lượng tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp 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 ký đồ của dung dịch thử;

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

C_S là nồng độ của cleistantoxin trong dung dịch đối chiếu;

C_U là nồng độ của cleistantoxin trong 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 ký đồ của dung dịch thử;

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

C_S là nồng độ của cleistantoxin trong dung dịch đối chiếu;

C_U là nồng độ của cleistantoxin trong dung dịch thử.

Các đặc tính hóa lý khác được phân tích bao gồm tổng tạp chất bay hơi trong chất chuẩn gốc cleistantoxin được thực hiện bằng phương pháp phân tích nhiệt lượng (Thermo gravimetric analysis-TGA), lượng để xác định là khoảng 3-30 mg.

Đối với hàm lượng tổng tạp chất vô cơ trong chất chuẩn gốc cleistantoxin, thực hiện bằng phép thử tro sulfat (Sulfat Ash), lượng để xác định là từ 0,5-1,5 g chất chuẩn gốc cleistantoxin.

Dựa vào kết quả thu được, xác định được hàm lượng tạp chất đơn và hàm lượng tạp chất tổng trong mẫu nguyên liệu để phát triển thành chất chuẩn thứ cấp.

Đối với chất chuẩn gốc là chất chuẩn đạt về lý thuyết hoàn toàn tinh khiết. Chất chuẩn gốc là chất chuẩn đã được khảo sát về đặc tính, chức năng được sử dụng làm mẫu chuẩn trong phân tích. Xác định độ tinh khiết (hay hàm lượng) của chất chuẩn gốc cleistantoxin bằng phương pháp cân bằng khối lượng (mass-balance) theo công thức sau:

Độ tinh khiết = Độ tinh khiết sắc ký $\times$ (100- % tạp bay hơi - % tạp vô cơ)/100 hoặc

Độ tinh khiết = (100% - % tạp chất hữu cơ - % tạp chất vô cơ - % tạp chất bay hơi); hoặc
= (100% - % tạp chất hữu cơ - % tạp chất vô cơ - % nước - % dung môi tồn dư).

Để có thể sử dụng nguyên liệu như chất chuẩn thứ cấp, cần xác định hàm lượng cleistantoxin trong chất chuẩn thứ cấp. Kết quả xác định cần được so sánh với hàm lượng chất chuẩn gốc để từ đó có thể áp dụng được điều kiện phân tích của chất chuẩn gốc áp dụng cho chất chuẩn thứ cấp. Quá trình xác định hàm lượng cleistantoxin được thực hiện bằng cách:

Chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch chuẩn gốc từ chất chuẩn thứ cấp và chất chuẩn gốc với dung môi. Dung môi được sử dụng là axetonitril, tiến hành bằng cách pha lẫn lượt chất chuẩn thứ cấp với dung môi axetonitril đến khoảng nồng độ cleistantoxin từ 0,5 đến 500 µg/ml để thu được dung dịch thử. Từ chất chuẩn gốc, pha với axetonitril đến khoảng nồng độ cleistantoxin từ 0,5 đến 500 µg/ml thu được dung dịch chuẩn gốc. Mục đích nhằm xác định tỷ lệ sai lệch giữa chất chuẩn thứ cấp và chất chuẩn gốc để có thể điều chỉnh được tỷ lệ sai khác khi sử dụng chất chuẩn thứ cấp làm chất đối chiếu chuẩn đóng vai trò như chất chuẩn gốc trong phân tích thường quy.

Để xác định hàm lượng cleistantoxin trong chất chuẩn thứ cấp để so sánh với hàm lượng của cleistantoxin trong chất chuẩn gốc, tiến hành sắc ký HPLC/DAD. Quá trình này được thực hiện như sau:

Tiến hành tiêm cùng một thể tích từ 1 đến 100 µL dung dịch thử và dung dịch chuẩn gốc vào cột sắc ký Phenyl C₆H₅ kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 µm, hoặc cột ODS C18 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10µm, hoặc cột C8 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt 1-10 µm. Theo các phương án ưu tiên, cột sắc ký được sử dụng là cột Phenyl C₆H₅ kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 µm. Duy trì nhiệt độ cột trong khoảng từ 20°C đến 60°C để ổn định cột.

Tiến hành rửa giải cột chứa dung dịch thử và dung dịch chuẩn gốc trong thời gian 30 phút với hệ pha động kết hợp. Rửa giải được thực hiện với pha động kết hợp bao gồm pha động kênh A: axetonitril hoặc axetonitril có bổ sung thêm axit, bazơ hoặc đệm. 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 một phương án ưu tiên, trong đó pha động kênh A có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ vào axetonitril với tỉ lệ 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 tỉ lệ 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, trong đó 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 tỉ lệ (90:10); hàm lượng phần trăm của tổng tạp chất trong cleistantoxin là 2,5%.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó pha động kênh A có thể được bổ sung thêm các bazơ hữu cơ và bazơ vô cơ vào axetonitril với tỉ lệ 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 tỉ lệ 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 cụ thể, trong đó pha động kênh A là axetonitril được bổ sung thêm triethylamin hoặc diethylamin với tỉ lệ (95:5) và pha động kênh B là nước bổ sung thêm triethylamin hoặc diethylamin với tỉ lệ (95:5); hàm lượng phần trăm của tổng tạp chất trong cleistantoxin là 3,0%.

Theo một phương án ưu tiên khác, trong đó pha động kênh A có thể được bổ sung thêm các hệ đệm hữu cơ và hệ đệm vô cơ vào axetonitril với tỉ lệ 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 tỉ lệ từ 0% đến 100,0% để pha động có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 10,0.

Theo một phương án cụ thể, trong đó pha động kênh A là axetonitril và pha động kênh B là đệm axetat pH=4 hoặc đệm phosphat pH=2 hoặc đệm phosphat pH=7 với tỉ lệ (30:70); hàm lượng phần trăm của tổng tạp chất trong cleistantoxin là 2,5%.

Theo một phương án ưu tiên khác, trong đó pha động kênh A có thể được bổ sung thêm axit hữu cơ và axit vô cơ với tỉ lệ từ 0% đến 99,9% và dung môi nhóm triethylamin hoặc diethylamin với tỉ lệ 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 tỉ lệ từ 0% đến 99,9% và dung môi nhóm triethylamin hoặc diethylamin với tỉ lệ từ 0% đến 1,0% vào nước để pha động có pH nằm trong khoảng từ 1,0 đến 10,0.

Theo một phương án ưu tiên, trong đó pha động kênh A là axetonitril: axit formic: triethylamin với tỉ lệ (85:10:5) và pha động kênh B là nước:axit formic:triethylamin với tỉ lệ (85:10:5) (v/v/v); hàm lượng phần trăm của cleistantoxin là 3,0%.

Sau khi rửa giải, tiến hành xác định các pic và tính diện tích pic của các chất phân tích tại bước sóng từ 200 đến 360 nm.

Căn cứ trên số liệu của các pic và diện tích các pic cũng như nồng độ của dung dịch thử, dung dịch đối chiếu để tính hàm lượng phần trăm của cleistantoxin theo diện tích pic trên sắc ký đồ để đưa ra kết luận về tỷ lệ hàm lượng cleistantoxin trong chất chuẩn thứ cấp.

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 gốc;

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

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

Dựa vào kết quả thu được, xác định được hàm lượng cleistantoxin mẫu nguyên liệu để phát triển thành chất chuẩn thứ cấp.

Một chỉ số cần phải xác định để xác định nguyên liệu cleistantoxin để phát triển thành chất chuẩn thứ cấp đó là đánh giá giới hạn tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin.

Để xác định giới hạn tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp, tiến hành thử nghiệm với dung dịch thử và dung dịch đối chiếu trên cơ sở pha loãng nồng độ. Tiến hành chuẩn bị các dung dịch thử và dung dịch đối chiếu.

Tiến hành hòa tan chất chuẩn thứ cấp với dung môi hòa tan cleistantoxin đến nồng độ nằm trong khoảng từ 100 đến 50.000 $\mu\text{g/ml}$ thu được dung dịch thử (1). Tiếp đó pha loãng một phần dung dịch thử (1) này với dung môi hòa tan cleistantoxin theo tỷ lệ pha loãng từ 5 đến 1000 lần thu được dung dịch thử (2).

Tiến hành pha loãng dung dịch thử (1) với dung môi hòa tan cleistantoxin theo tỷ lệ pha loãng từ 10 đến 10.000 lần thu được dung dịch đối chiếu (1). Tiến hành pha loãng dung dịch chuẩn gốc với dung môi hòa tan cleistantoxin đến nồng độ bằng nồng độ của dung dịch thử (2) thu được dung dịch đối chiếu (2).

Trong đó, dung môi hòa tan cleistatoxin được sử dụng là dung môi được chọn từ nhóm bao gồm axeton, diclometan, etylaxetat.

Để xác định được giới hạn tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp, tiến hành sắc kí HPLC/DAD như sau:

Chấm cùng một thể tích từ 1 đến 100 μ L dung dịch thử và dung dịch đối chiếu lên bản mỏng TLC silica gel G, H, GF₂₅₄ hoặc GF₃₆₆.

Triển khai sắc ký lần lượt các dung dịch thử (1), dung dịch thử (2), dung dịch đối chiếu (1) và dung dịch đối chiếu (2) với pha động là hệ dung môi gồm: dung môi hòa tan cleistatoxin được chọn từ nhóm gồm axeton, diclometan và etylaxetat với tỉ lệ từ 1 đến 99% và dung môi không hòa tan cleistatoxin được chọn từ nhóm gồm diclometan, metanol, etanol và nước có bổ sung thêm axit hoặc bazơ hoặc dung dịch đệm từ 0 đến 50,0%.

Phát hiện vết chất phân tích tại bước sóng từ 254 hoặc 366 nm hoặc bằng thuốc thử hiện màu vanilin hoặc Ceri sulfat phot.

Sau khi phát hiện vết chất phân tích, xác định giới hạn tạp chất trong chất chuẩn bằng cách dựa trên vết phụ trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu, ngoại trừ các vết cleistatoxin, vết dung môi và vết có tỷ số tín hiệu nhiễu S/N < 2, so và chọn ra mẫu giới hạn của dung dịch thử mà có vết tạp chất không đậm hơn vết cleistatoxin trên sắc ký đồ dung dịch đối chiếu với nồng độ tương ứng để đưa ra giới hạn tạp chất trong chất chuẩn.

Thiết lập thông số của chất chuẩn thứ cấp dựa trên kết quả tổng hàm lượng tạp chất, hàm lượng cleistatoxin, tỷ lệ hàm lượng cleistatoxin với chất chuẩn gốc và giới hạn tạp chất theo kết quả xác định thu được ở trên.

Hiệu quả đạt được của giải pháp hữu ích

Hoạt chất cleistatoxin 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. Do đó, quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép thiết lập nên chất chuẩn thứ cấp cleistatoxin để có thể để xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho các nguyên liệu, bán thành phẩm và thành phẩm thuốc trên cơ sở hoạt chất này thay thế cho chất chuẩn gốc.

Quy trình theo giải pháp hữu ích cho phép thiết lập chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin với nguyên liệu phù hợp cho nguồn nguyên liệu cần kiểm tra, đặc biệt là nguồn nguyên liệu từ nguồn gốc thực vật như từ cây Cách hoa, từ đây có thể thiết lập chất chuẩn với lượng lớn để sử dụng trong thường quy kiểm tra, giám sát hàm lượng cleistantoxin trong nguyên liệu, bán thành phẩm và thành phẩm thuốc bao gồm nguyên liệu hoá dược cleistantoxin và các dạng bào chế của chất tinh khiết cleistantoxin (thuốc tiêm, viên nén, viên nang.), dược liệu, cao dược liệu và các dạng chế phẩm của cao dược liệu như dạng hoàn, viên nang, thuốc tiêm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tinh chế và thiết lập chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin, trong đó quy trình này bao gồm các bước:

a) tinh chế hợp chất cleistantoxin tinh sạch thành nguyên liệu thiết lập chất chuẩn thứ cấp bằng cách hòa tan và kết tinh 3 lần hợp chất cleistantoxin tinh sạch trong hệ kết hợp bao gồm dung môi hòa tan là diclometan và dung môi không hòa tan là metanol thu được chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin;

b) xác định tổng hàm lượng tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin:

- chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch đối chiếu bằng cách hòa tan chất chuẩn thứ cấp trong dung môi axetonitril đến nồng độ cleistantoxin nằm trong khoảng từ 500 đến 5000 $\mu\text{g/ml}$, tiếp đó pha loãng tiếp một lượng dung dịch thử này với axetonitril theo tỷ lệ pha loãng từ 10 đến 10.000 lần thu được dung dịch thử và dung dịch đối chiếu;

- tiến hành sắc ký HPLC/DAD:

+ tiêm cùng một thể tích từ 1 đến 100 μL dung dịch thử và dung dịch đối chiếu độc lập vào cột sắc ký Phenyl C_6H_5 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , cột ODS C_{18} kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , hoặc cột C_8 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , duy trì nhiệt độ cột trong khoảng từ 20°C đến 60°C;

+ rửa giải cột chứa dung dịch thử và dung dịch đối chiếu trong thời gian 60 phút với pha động kênh A là 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; và

+ xác định các pic và tính diện tích pic của các chất phân tích tại bước sóng từ 200 đến 360 nm;

- tính hàm lượng phần trăm từng tạp chất đơn và tổng lượng tạp chất có trong chất chuẩn thứ cấp theo diện tích pic trên sắc ký đồ để đưa ra hàm lượng tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp:

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 ký đồ của dung dịch thử;

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

C_S là nồng độ của cleistantoxin trong dung dịch đối chiếu;

C_U là nồng độ của cleistantoxin trong 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 ký đồ của dung dịch thử;

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

C_S là nồng độ của cleistantoxin trong dung dịch đối chiếu;

C_U là nồng độ của cleistantoxin trong dung dịch thử;

c) xác định hàm lượng cleistantoxin trong chất chuẩn thứ cấp và so sánh với hàm lượng chất chuẩn gốc bằng cách:

- chuẩn bị dung dịch thử và dung dịch chuẩn gốc bằng cách pha lần lượt chất chuẩn thứ cấp với dung môi axetonitril đến khoảng nồng độ cleistantoxin từ 0,5 đến 500 $\mu\text{g/ml}$, pha chất chuẩn gốc với axetonitril đến khoảng nồng độ cleistantoxin từ 0,5 đến 500 $\mu\text{g/ml}$ thu được dung dịch thử và dung dịch chuẩn gốc;

- tiến hành sắc ký HPLC/DAD:

+ tiêm cùng một thể tích từ 1 đến 100 μL dung dịch thử và dung dịch chuẩn gốc vào cột sắc ký Phenyl C_6H_5 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , hoặc cột ODS C_{18} kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt từ 1 đến 10 μm , hoặc cột C_8 kích thước 50-300 x 2-4,6 mm, cỡ hạt 1-10 μm , duy trì nhiệt độ cột trong khoảng từ 20°C đến 60°C;

+ rửa giải cột chứa dung dịch thử và dung dịch chuẩn gốc trong thời gian 30 phút với hệ pha động kết hợp bao gồm 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; và

+ xác định các pic và tính diện tích pic của các chất phân tích tại bước sóng từ 200 đến 360 nm;

- tính hàm lượng phần trăm của cleistantoxin theo diện tích pic trên sắc ký đồ để đưa ra kết luận về tỷ lệ hàm lượng cleistantoxin trong chất chuẩn thứ cấp:

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 gốc;

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

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

d) xác định giới hạn tạp chất trong chất chuẩn thứ cấp cleistantoxin:

- chuẩn bị các dung dịch thử và dung dịch đối chiếu:

+ hòa tan chất chuẩn thứ cấp với dung môi hòa tan cleistantoxin đến nồng độ nằm trong khoảng từ 100 đến 50.000 $\mu\text{g/ml}$ thu được dung dịch thử (1); sau đó pha loãng một phần dung dịch thử (1) này với dung môi hòa tan cleistantoxin theo tỷ lệ pha loãng từ 5 đến 1000 lần thu được dung dịch thử (2);

+ pha loãng dung dịch thử (1) với dung môi hòa tan cleistantoxin theo tỷ lệ pha loãng từ 10 đến 10.000 lần thu được dung dịch đối chiếu (1), pha loãng dung dịch chuẩn gốc với dung môi hòa tan cleistantoxin đến nồng độ bằng nồng độ của dung dịch thử (2) thu được dung dịch đối chiếu (2);

trong đó dung môi hòa tan cleistantoxin được sử dụng là dung môi được chọn từ nhóm bao gồm axeton, diclometan, etylaxetat;

- tiến hành sắc ký HPLC/DAD:

+ chấm cùng một thể tích từ 1 đến 100 μL dung dịch thử và dung dịch đối chiếu lên bản mỏng TLC silica gel G, H, GF₂₅₄ hoặc GF₃₆₆;

+ triển khai sắc ký các dung dịch thử (1), dung dịch thử (2), dung dịch đối chiếu (1) và dung dịch đối chiếu (2) với pha động là hệ dung môi gồm: dung môi hòa tan cleistantoxin được chọn từ nhóm gồm axeton, diclometan và etylaxetat với tỉ lệ từ 1 đến 99% và dung môi không hòa tan cleistantoxin được chọn từ nhóm gồm diclometan, metanol, etanol và nước có bổ sung thêm axit hoặc bazơ hoặc dung dịch đệm từ 0 đến 50,0%;

- + phát hiện vết chất phân tích tại bước sóng từ 254 hoặc 366 nm hoặc bằng thuốc thử hiện màu vanilin hoặc Ceri sulfat phat;
 - + xác định giới hạn tạp chất trong chất chuẩn bằng cách dựa trên vết phụ trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu, ngoại trừ các vết cleistantoxin, vết dung môi và vết có tỷ số tín hiệu nhiễu $S/N < 2$, so và chọn ra mẫu giới hạn của dung dịch thử mà có vết tạp chất không đậm hơn vết cleistantoxin trên sắc ký đồ dung dịch đối chiếu với nồng độ tương ứng để đưa ra giới hạn tạp chất trong chất chuẩn; và
- e) thiết lập thông số của chất chuẩn thứ cấp dựa trên kết quả tổng hàm lượng tạp chất, hàm lượng cleistantoxin, tỷ lệ hàm lượng cleistantoxin với chất chuẩn gốc và giới hạn tạp chất theo kết quả xác định thu được ở trên.