



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

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

(11)



1-0036335

(51)⁷ A61K 31/337; G01N 33/15; G01N 30/36; G01N 30/72; G01N 1/42; G01N 24/08 (13) B

(21) 1-2016-03237

(22) 28/07/2016

(86) PCT/KR2016/008262 28/07/2016

(87) WO2017018814 02/02/2017

(30) 10-2015-0106624 28/07/2015 KR

(45) 25/07/2023 424

(43) 25/05/2017 350A

(73) SAMYANG HOLDINGS CORPORATION (KR)

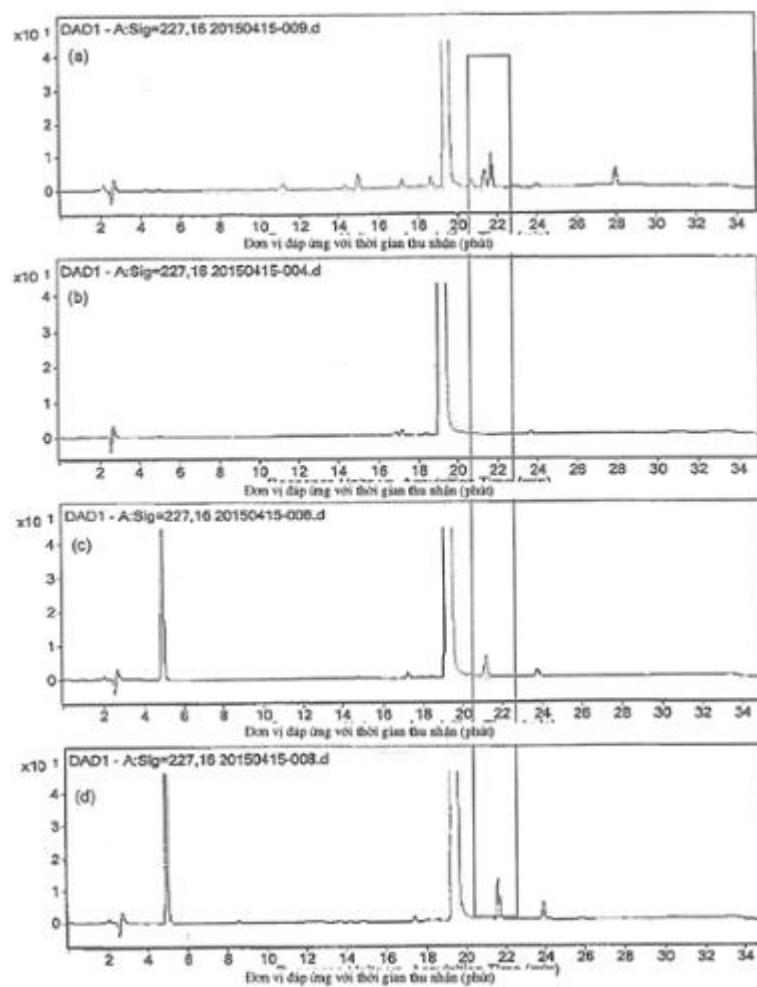
31, Jong-ro 33-gil, Jongno-gu, Seoul 03129, Republic of Korea

(72) KIM, Hye Rim (KR); KIM, Ji Yeong (KR); MIN, Bum Chan (KR); SEO, Min Hyo (KR); CHOI, Ho Joon (KR).

(74) Công ty Luật TNHH Phạm và Liên danh (PHAM & ASSOCIATES)

(54) PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH CÁC CHẤT CÓ LIÊN QUAN CỦA DƯỢC PHẨM CHỨA CHẤT MANG POLYME

(57) Sáng chế đề cập đến phương pháp phân tích các chất có liên quan trong dược phẩm chứa copolyme khối lượng tính chứa chất mang dược chất dạng polyme là khối ưa nước và khối kỵ nước, các chất có liên quan được xác định nhờ đó, và phương pháp đánh giá dược phẩm bằng cách sử dụng các chất này.



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp phân tích các chất có liên quan của dược phẩm chứa chất mang dược chất dạng polyme, và đặc biệt hơn là, phương pháp phân tích các chất có liên quan trong dược phẩm chứa copolyme khối lượng tính bao gồm chất mang dược chất dạng polyme là khối ưa nước và khối kỵ nước, các chất có liên quan được xác định nhờ đó, và phương pháp đánh giá dược phẩm bằng cách sử dụng chúng. Theo một phương án của sáng chế, có thể phân tích được các tạp chất đã được tạo ra trong thuốc thành phẩm, v.v. một cách chuẩn xác và chính xác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Quá trình hoà tan dược chất ít hòa tan trong nước là kỹ thuật quan trọng để phân phối dược chất vào cơ thể bằng cách dùng qua đường miệng hoặc dùng ngoài đường tiêu hóa. Các phương pháp hòa tan như vậy bao gồm phương pháp bổ sung chất hoạt động bề mặt vào dung dịch nước để tạo ra các mixen và sau đó bẫy dược chất ít hòa tan trong nước này vào trong đó.

Copolyme khối lượng tính dùng làm chất hoạt động bề mặt bao gồm khối polyme ưa nước và khối polyme kỵ nước. Do khối polyme ưa nước này tiếp xúc trực tiếp với các protein trong máu và màng tế bào *in vivo*, nên polyetylen glycol hoặc monometoxypolyetylen glycol, v.v. có tính tương hợp sinh học được sử dụng. Khối

polyme kỵ nước này cải thiện được ái lực cho dược chất kỵ nước, và polylactit, polyglycolit, poly(lactic-glycolit), polycaprolacton, axit polyamin hoặc polyorthoeste, v.v. có đặc tính dễ bị vi sinh vật phá hủy được sử dụng. Cụ thể, các dẫn xuất polylactit đã và đang được dùng cho chất mang dược chất ở các dạng khác nhau do chúng có độ tương hợp sinh học mỹ mãn và được thủy phân thành axit lactic không độc *in vivo*. Các dẫn xuất polylactit có các đặc tính vật lý khác nhau tùy thuộc vào phân tử lượng của chúng, và được phát triển ở các dạng khác nhau như vi cầu, hạt nano, gel polyme và tác nhân cấy ghép.

Patent Mỹ số 6,322,805 bộc lộ dược phẩm dùng để phân phối dược chất ít hòa tan trong nước chứa chất mang dược chất loại mixen polyme và dược chất ít hòa tan trong nước, trong đó chất mang dược chất loại mixen polyme này được tạo ra từ copolyme hai khối hoặc ba khối mà không được liên kết ngang bởi tác nhân tạo liên kết ngang và chứa ít nhất một polyme kỵ nước dễ bị vi sinh vật phá hủy được chọn từ nhóm bao gồm polylactit, polyglycolit, poly(lactit-glycolit), polycaprolacton và các dẫn xuất của chúng và poly(alkylen oxit) làm polyme ưa nước, trong đó dược chất ít hòa tan trong nước này được bẫy vật lý trong chất mang dược chất và được hòa tan, và trong đó chất mang dược chất loại mixen polyme này tạo ra dung dịch nước trong suốt trong nước và phân phối một cách có hiệu quả dược chất ít hòa tan trong nước này vào cơ thể.

Tuy nhiên, dược phẩm nêu trên có xu hướng làm tăng lượng các chất có liên quan mà thời gian bảo quản chúng lại bị giảm. Để phân tích các chất có liên quan trong dược phẩm này, phương pháp phân tích sử dụng cột C18 được sử dụng, nhưng nó không đủ khả năng phân giải để tách một số chất có liên quan. Cụ thể, do độ phân giải của 10-deaxetyl-

7-epipaclitaxel (tạp chất B) — là một trong số các chất có liên quan đại diện của paclitaxel—và paclitaxel bằng 0,95 hoặc nhỏ hơn, nên chúng không được tách một cách hoàn toàn và cần phải cải thiện được độ phân giải của chúng. Ngoài ra, hai tạp chất chưa biết được thể hiện ở RRT 1,14 là các chất có liên quan quan sát được trong thử nghiệm bảo quản trong thời gian dài sáu tháng hoặc dài hơn hoặc thử nghiệm trong điều kiện khắc khe đã phát hiện được một pic, mà không được tách ra khỏi nhau. Hơn thế nữa, để phân tích lượng rất nhỏ chất có liên quan bằng phương pháp tương tự, lượng tiêm mẫu cần phải tăng lên với lượng lớn hơn so với lượng dùng cho thử nghiệm về hàm lượng.

Do đó, cần phải phát triển phương pháp phân tích mà có thể tách được các tạp chất trong quá trình sản xuất và đưa được phẩm ra thị trường, và đủ nhạy sao cho lượng rất nhỏ của từng chất có liên quan có thể được xác định một cách chính xác mà không cần tăng lượng tiêm mẫu.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp phân tích các chất có liên quan của dược phẩm chứa chất mang dược chất dạng polyme, có độ phân giải và độ nhạy cải thiện và dễ sử dụng.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất chất có liên quan đã được phân tích và xác định được bằng phương pháp nêu trên.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp đánh giá dược phẩm chứa chất mang dược chất dạng polyme bằng cách sử dụng chất có liên quan nêu trên làm chất chuẩn.

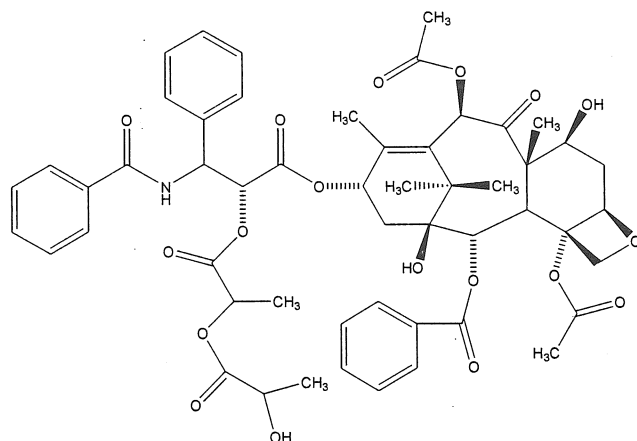
Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme, bao gồm các bước: (1) chuẩn bị mẫu để phân tích là dược phẩm dạng mixen polyme bao gồm copolyme khối lượng tính bao gồm khối ưa nước (A) và khối kỵ nước (B), và dược chất ít hòa tan trong nước; và (2) phân tích mẫu đã được chuẩn bị này bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo các điều kiện (a) và (b) sau:

(a) pha tĩnh gồm các hạt xốp có cỡ hạt là 4 μm hoặc nhỏ hơn; và

(b) cột có đường kính trong là 5 mm hoặc nhỏ hơn và chiều dài là 50 mm hoặc dài hơn.

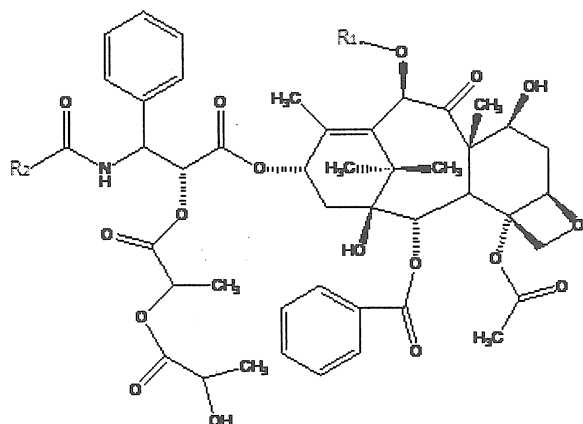
Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất hợp chất có công thức 1c sau:

Công thức 1c

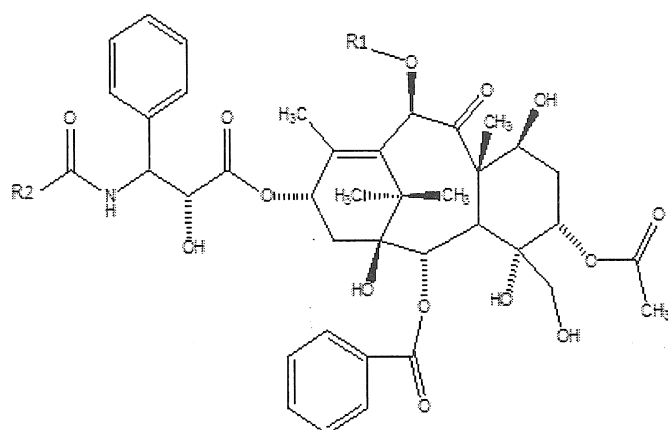


Vẫn theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme bao gồm bước đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme bao gồm copolyme khối lượng tính bao gồm khối ưa nước (A) và khối kỵ nước (B), và dược chất ít hòa tan trong nước là paclitaxel hoặc docetaxel, bằng cách sử dụng chất chuẩn là hợp chất có công thức 1 sau hoặc hợp chất có công thức 2 sau:

Công thức 1



Công thức 2



trong đó

R_1 là H hoặc COCH_3 , và R_2 là phenyl hoặc $\text{O}(\text{CH}_3)_3$.

Theo một phương án của sáng chế, các tạp chất đã được tạo ra trong thuốc thành phẩm, v.v. có thể được phân tích một cách chính xác bằng cách sử dụng các chất có liên quan của dược phẩm chứa chất chuẩn là chất mang polyme và dược chất ít hòa tan trong

nước. Ngoài ra, quá trình tạo ra các chất có liên quan về cơ bản có thể ngăn cản được, nhờ đó cuối cùng là làm giảm được lượng các chất có liên quan.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là sắc ký đồ thu được khi phân tích HPLC đối với dược phẩm dạng mixen polyme chứa paclitaxel dùng trong Ví dụ thử nghiệm 1-1, đã được dùng trong thử nghiệm tăng tốc trong thời gian 6 tháng.

Fig.2 là sắc ký đồ thu được và phổ của phân tích LC/MS/MS được thực hiện trong Ví dụ thử nghiệm 1-2 của các chất có liên quan tách được trong Ví dụ thử nghiệm 1-1:

(a) RRT $1,10 \pm 0,02$ (1,08~1,12) (sau, RRT 1,10 được sử dụng thay thế cho RRT $1,10 \pm 0,02$)

(b) RRT $1,12 \pm 0,02$ (1,10~1,14) (sau, RRT 1,12 được sử dụng thay thế cho RRT $1,12 \pm 0,02$)

Fig.3 là sắc ký đồ thu được khi phân tích HPLC đối với sản phẩm phản ứng đã được tạo ra thu được trong Ví dụ thử nghiệm 2:

(a) Dược phẩm dạng mixen polyme chứa paclitaxel

(b) Paclitaxel

(c) Sản phẩm phản ứng của paclitaxel và L-lactit

(d) Sản phẩm phản ứng của paclitaxel và D-lactit

Fig.4 là sắc ký đồ thu được của phân tích LC/MS/MS đối với sản phẩm phản ứng đã được tạo ra thu được trong Ví dụ thử nghiệm 3:

(a) Paclitaxel

(b) Sản phẩm phản ứng của paclitaxel và L-lactit

(c) Sản phẩm phản ứng của paclitaxel và D-lactit

Fig.5 thể hiện các kết quả của phân tích LC/MS/MS đối với chất có liên quan thu được ở vị trí RRT $0,87 \pm 0,02$ (sau, RRT 0,87 được sử dụng thay thế cho RRT $0,87 \pm 0,02$) trong Ví dụ thử nghiệm 1-1.

Fig.6 thể hiện các kết quả của phân tích LC/MS/MS đối với nguyên liệu thu được ở RRT 0,87 bằng cách cho paclitaxel phản ứng với axit và sử dụng phương pháp phân tích tương tự như phương pháp nêu trong Ví dụ thử nghiệm 5.

Fig.7 thể hiện các kết quả của việc quét ion của sản phẩm trong phân tích LC/MS/MS đối với nguyên liệu thu được ở RRT 0,87 bằng cách cho paclitaxel phản ứng với axit và sử dụng phương pháp phân tích tương tự như phương pháp nêu trong Ví dụ thử nghiệm 5, cùng với kết quả phân tích của chất có liên quan ở vị trí RRT 0,87 trong được phẩm dạng mixen polyme chứa paclitaxel:

(a) Kết quả phân tích dược phẩm dạng mixen polyme chứa paclitaxel sau khi thử nghiệm tăng tốc trong thời gian sáu tháng

(b) Kết quả phân tích nguyên liệu thu được ở RRT 0,87 bằng cách cho paclitaxel phản ứng với axit và sử dụng phương pháp phân tích tương tự

Fig.8 thể hiện các kết quả của phân tích ^1H NMR trong phân tích NMR đối với nguyên liệu thu được ở RRT 0,87 bằng cách cho paclitaxel phản ứng với axit và sử dụng phương pháp phân tích tương tự như phương pháp nêu trong Ví dụ thử nghiệm 5.

Fig.9 thể hiện các kết quả của phân tích ^{13}C NMR trong phân tích NMR đối với nguyên liệu thu được ở RRT 0,87 bằng cách cho paclitaxel phản ứng với axit và sử dụng phương pháp phân tích tương tự như phương pháp nêu trong Ví dụ thử nghiệm 5.

Fig.10 thể hiện các kết quả của phân tích COSY (Quang phổ tương quan) trong phân tích NMR đối với nguyên liệu thu được ở RRT 0,87 bằng cách cho paclitaxel phản ứng với axit và sử dụng phương pháp phân tích tương tự như phương pháp nêu trong Ví dụ thử nghiệm 5.

Fig.11 thể hiện các kết quả của phân tích HMBC (Quang phổ tương quan liên kết đa dị vòng) trong phân tích NMR đối với nguyên liệu thu được ở RRT 0,87 bằng cách cho paclitaxel phản ứng với axit và sử dụng phương pháp phân tích tương tự như phương pháp nêu trong Ví dụ thử nghiệm 5.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế được giải thích một cách chi tiết hơn sau.

Trong bản mô tả này, thuật ngữ “chất có liên quan” được dùng để chỉ loại tạp chất của hoạt chất chính, có thể có trong quy trình tổng hợp nguyên liệu thô hoặc trong thuốc thành phẩm và được sử dụng để đánh giá chất lượng, v.v. của thuốc thành phẩm này.

Phương pháp phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo một phương án của sáng chế bao gồm các bước: (1) chuẩn bị mẫu để phân tích là dược phẩm dạng mixen polyme bao gồm copolyme khối lượng tính bao gồm khối ưa nước (A) và khối kỵ nước (B), và dược chất ít hòa tan trong nước; và (2) phân tích mẫu đã được chuẩn bị này bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) theo các điều kiện (a) và (b) sau:

(a) pha tĩnh gồm các hạt xốp có cỡ hạt là 4 μm hoặc nhỏ hơn; và

(b) cột có đường kính trong là 5 mm hoặc nhỏ hơn và chiều dài là 50 mm hoặc dài hơn.

Theo một phương án của sáng chế, pha tĩnh gồm các hạt xốp có thể là pha tĩnh pentafluorophenyl.

Theo một phương án của sáng chế, có thể sử dụng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) bằng cách dùng (a) pha tĩnh gồm các hạt xốp có cỡ hạt nằm trong khoảng từ 1,5 đến 4 μm ; và (b) cột có đường kính trong nằm trong khoảng từ 2 đến 5 mm và chiều dài nằm trong khoảng từ 50 đến 250 mm.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp phân tích các chất có liên quan theo sáng chế có thể còn bao gồm (3) phân tích định tính các chất có liên quan đã được tách ra trong bước (2) nêu trên bằng LC/MS (Sắc ký lỏng/Phổ khối), LC/MS/MS (Sắc ký lỏng/Phổ khối liên tiếp), NMR hoặc tổ hợp của chúng.

Trong bước phân tích định tính nêu trên khác, LC/MS hoặc LC/MS/MS có thể là phương pháp sử dụng (c) pha tĩnh ODS lai (octadecyl-silic oxit) và (d) cột có đường kính trong là 10 mm hoặc nhỏ hơn và chiều dài là 500 mm hoặc ngắn hơn. Theo một ví dụ, cột có đường kính trong nằm trong khoảng từ 1 đến 10 mm và chiều dài nằm trong khoảng từ 10 đến 150 mm có thể được sử dụng.

Theo một phương án của sáng chế, phương pháp phân tích các chất có liên quan có thể sử dụng bộ dò UV để phát hiện các chất có liên quan.

Dược phẩm dùng trong phương án của sáng chế bao gồm, các hợp phần cần thiết, chất mang polyme là copolyme khối lượng tính bao gồm khối ưa nước (A) và khối kỵ nước (B), và dược chất ít hòa tan trong nước được bẫy trong chất mang này.

Theo một phương án của sáng chế, copolyme khối lượng tính bao gồm copolyme hai khối kiểu A-B gồm khối ưa nước (A) và khối kỵ nước (B), hoặc copolyme ba khối kiểu B-A-B.

Theo một phương án của sáng chế, copolyme khối lượng tính có thể chứa khối ưa nước với lượng nằm trong khoảng từ 20% đến 95% khối lượng, và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 40% đến 95% khối lượng, tính theo tổng khối lượng copolyme. Ngoài ra, copolyme khối lượng tính có thể chứa khối kỵ nước với lượng nằm trong khoảng từ 5% đến 80% khối lượng, và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 5% đến 60% khối lượng, tính theo tổng khối lượng copolyme.

Theo một phương án của sáng chế, copolyme khối lượng tính có thể có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 1000 đến 50000 Dalton, và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 1500 đến 20000 Dalton.

Theo một phương án của sáng chế, khối ưa nước là polyme có độ tương hợp sinh học và có thể bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol hoặc các dẫn xuất của chúng, polyvinylpyrrolidon, rượu polyvinyllic, polyacrylamit và tổ hợp của chúng, và cụ thể hơn, nó có thể chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol, monometoxypolyetylen glycol và tổ hợp của chúng. Khối ưa nước có thể có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 200 đến 20000 Dalton, và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 200 đến 10000 Dalton.

Theo một phương án của sáng chế, khối kỵ nước là polyme có đặc tính dễ bị vi sinh vật phá hủy và có thể là polyme gồm các monome có nguồn gốc từ axit alpha (α)-hydroxy. Cụ thể, nó có thể chứa một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm

polylactit, polyglycolit, axit polymandelic, polycaprolacton, polyđioxan-2-on, axit polyamin, polyorthoeste, polyanhydrit, polycacbonat và tổ hợp của chúng, và cụ thể hơn, nó có thể bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm polylactit, polyglycolit, polycaprolacton, polyđioxan-2-on và tổ hợp của chúng. Khối kỵ nước có thể có phân tử lượng trung bình nằm trong khoảng từ 200 đến 20000 Dalton, và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 200 đến 10000 Dalton.

Theo một phương án của sáng chế, copolyme khối lưỡng tính bao gồm khối polyme kỵ nước là poly(axit alpha (α)-hydroxy) có thể được tổng hợp bằng phương pháp polyme hóa mở vòng đã biết nhờ sử dụng polyme ưa nước có nhóm hydroxyl làm chất khơi mào, và lacton monome là axit alpha (α)-hydroxy. Ví dụ, L-lactit hoặc D,L-lactit có thể được polyme hóa bằng cách mở vòng trong đó polyetylen glycol hoặc monometoxypolyetylen glycol ưa nước có nhóm hydroxyl làm chất khơi mào. Việc tổng hợp copolyme hai khối hoặc ba khối có thể được thực hiện theo số lượng nhóm hydroxyl tồn tại trong khối ưa nước là chất khơi mào. Trong quá trình polyme hoá mở vòng, chất xúc tác hữu cơ kim loại như thiếc oxit, chì oxit, thiếc octoat, antimon octoat, v.v. có thể được sử dụng, và tốt hơn nếu thiếc octoat có tính tương hợp sinh học được sử dụng trong quy trình điều chế polyme để dùng trong y khoa.

Theo một phương án của sáng chế, dược chất ít hòa tan trong nước đã được bẫy trong chất mang polyme có thể là tác nhân trị ung thư, cụ thể hơn là tác nhân trị ung thư taxan. Theo một phương án của sáng chế, taxan có thể ở dạng khan hoặc dạng hydrat hoá, và dạng vô định hình hoặc dạng kết tinh. Ngoài ra, taxan có thể được chiết từ thực vật

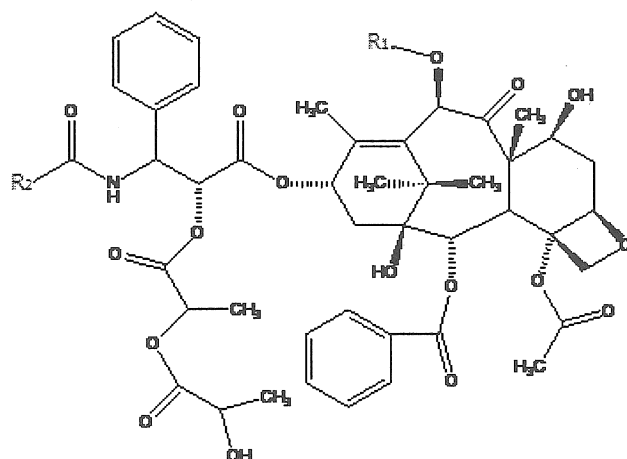
trong tự nhiên, hoặc thu được bằng quy trình bán tổng hợp hoặc phương pháp nuôi cấy tế bào thực vật, v.v.

Tác nhân trị ung thư taxan có thể là một hoặc nhiều tác nhân được chọn từ nhóm bao gồm paclitaxel, docetaxel, 7-epipaclitaxel, t-axetylpaclitaxel, 10-desaxetylpaclitaxel, 10-desaxetyl-7-epipaclitaxel, 7-xylosylpaclitaxel, 10-desaxetyl-7-glutarylpaclitaxel, 7-N,N-dimethylglyxylpaclitaxel, 7-L-alanylpaclitaxel và cabazitaxel, và cụ thể hơn, nó có thể là paclitaxel, docetaxel hoặc tổ hợp của chúng.

Dược phẩm theo một phương án của sáng chế có thể bao gồm dược chất ít hòa tan trong nước với lượng nằm trong khoảng từ 0,1 đến 50 phần khối lượng, và cụ thể hơn là nằm trong khoảng từ 0,5 đến 30 phần khối lượng, tính theo 100 phần khối lượng copolyme khối lượng tính. Nếu lượng dược chất ít hòa tan trong nước là quá nhỏ so với khối lượng của copolyme khối lượng tính, thì tỷ lệ khối lượng giữa copolyme lượng tính đã được dùng và dược chất là cao và do đó thời gian để hoàn nguyên có thể tăng lên. Mặt khác, nếu lượng dược chất ít hòa tan trong nước là quá lớn, thì một vấn đề có thể gặp phải là dược chất ít hòa tan trong nước bị kết tủa nhanh.

Theo một phương án của sáng chế, chất có liên quan phát hiện được trong phương pháp phân tích chất có liên quan theo sáng chế có thể bao gồm hợp chất có công thức 1 sau:

Công thức 1

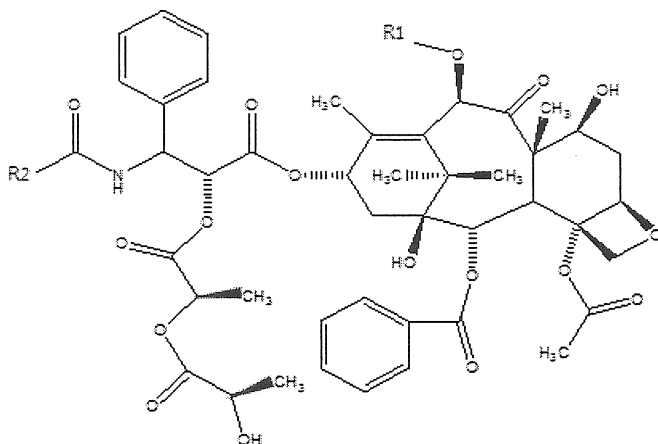


trong đó

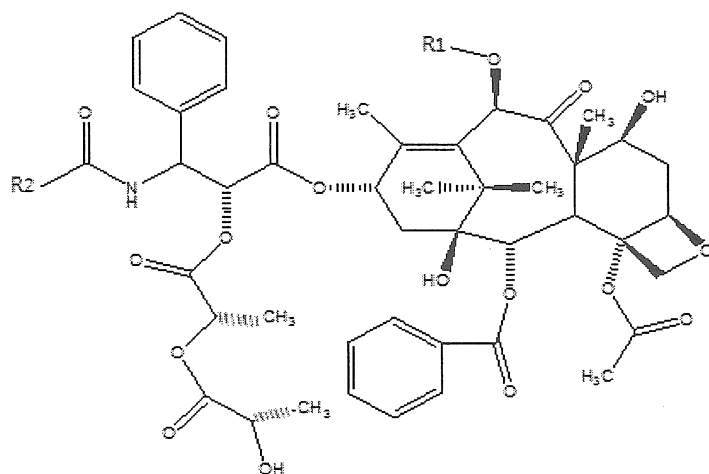
R_1 là H hoặc COCH_3 , và R_2 là phenyl hoặc $\text{O}(\text{CH}_3)_3$.

Hợp chất có công thức 1 nêu trên có thể bao gồm hợp chất có công thức 1a sau, hợp chất có công thức 1b sau, hoặc cả hai hợp chất này:

Công thức 1a

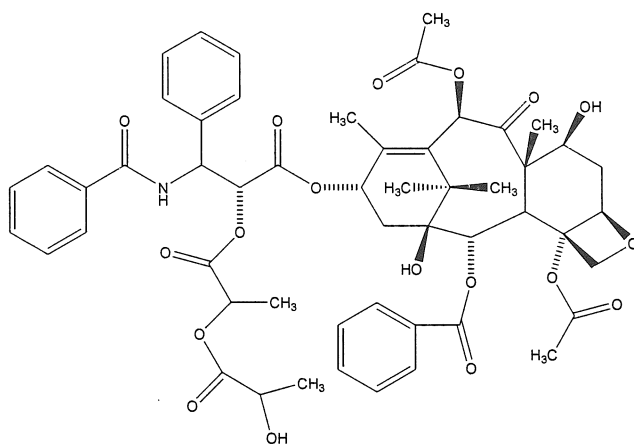


Công thức 1b



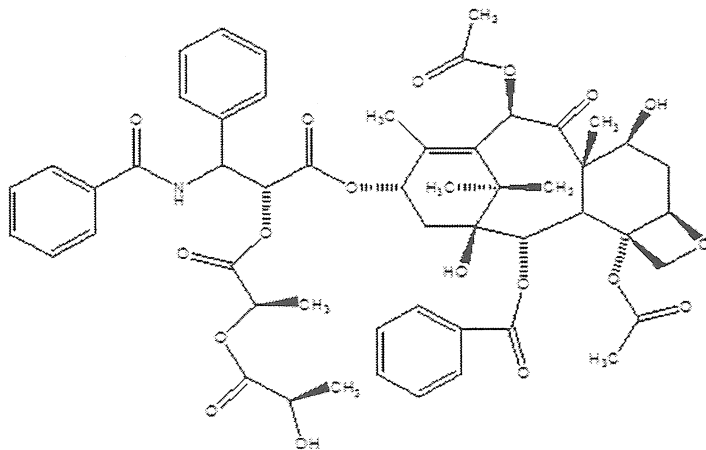
Theo một phương án của sáng chế, dược chất ít hòa tan trong nước là paclitaxel, và chất có liên quan có thể bao gồm hợp chất có công thức 1c sau:

Công thức 1c

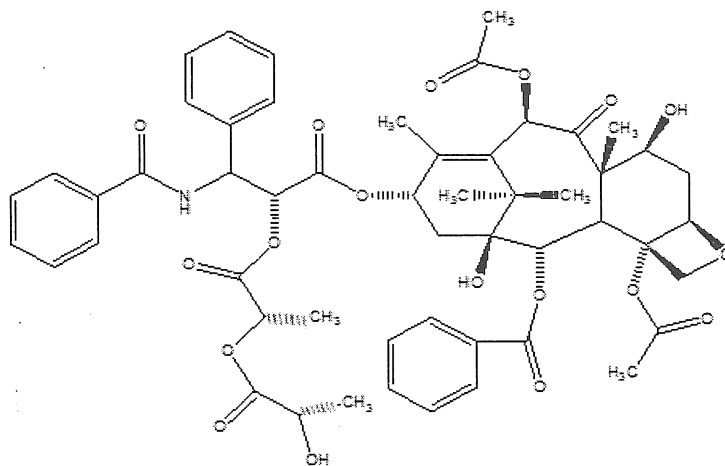


Hợp chất có công thức 1c có thể bao gồm hợp chất có công thức 1d sau, hợp chất có công thức 1e sau, hoặc cả hai hợp chất này:

Công thức 1d

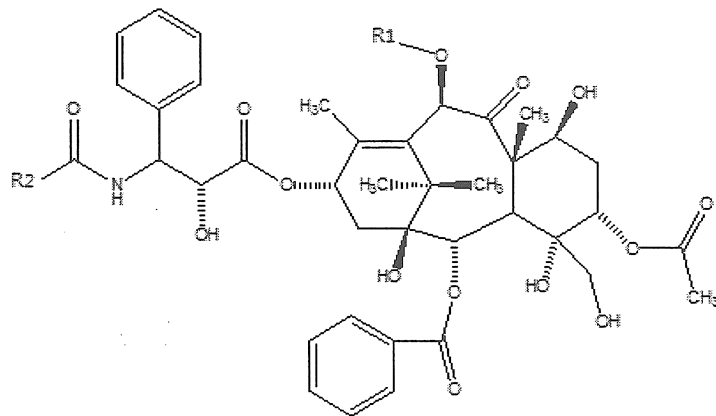


Công thức 1e



Theo một phương án của sáng chế, chất có liên quan phát hiện được theo một phương án của sáng chế có thể bao gồm hợp chất có công thức 2 sau:

Công thức 2

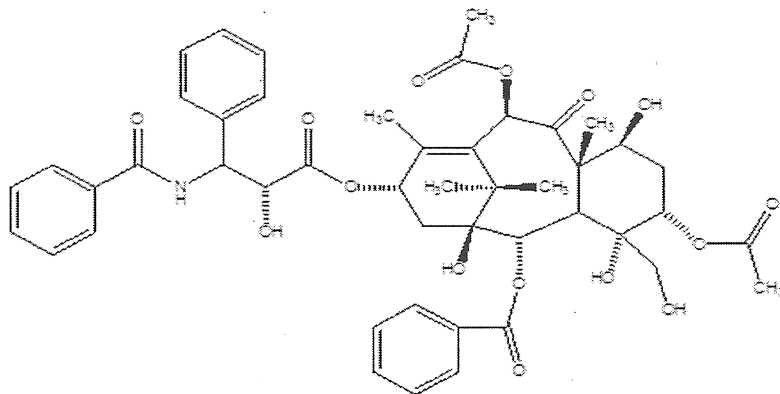


trong đó

R_1 là H hoặc COCH_3 , và R_2 là phenyl hoặc $\text{O}(\text{CH}_3)_3$.

Theo một phương án của sáng chế, dược chất ít hòa tan trong nước là paclitaxel, và chất có liên quan có thể bao gồm hợp chất có công thức 2a sau:

Công thức 2a



Theo khía cạnh khác của sáng chế, phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme bao gồm bước đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme chứa copolyme khối lượng tính bao gồm khối ưa nước (A) và khối kỵ nước (B), và dược chất ít hòa tan trong nước là paclitaxel hoặc docetaxel, bằng cách sử dụng chất chuẩn là hợp chất được thể hiện ở công thức 1 nêu trên hoặc hợp chất được thể hiện ở công thức 2 nêu trên.

Hợp chất có công thức 1 nêu trên có thể bao gồm hợp chất có công thức 1a, hợp chất có công thức 1b, hoặc cả hai hợp chất này.

Theo một phương án của sáng chế, trong phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme nêu trên, dược chất ít hòa tan trong nước là paclitaxel, và chất chuẩn có thể là hợp chất được thể hiện ở công thức 1c hoặc công thức 2a nêu trên.

Hợp chất có công thức 1c nêu trên có thể bao gồm hợp chất có công thức 1d, hợp chất có công thức 1e, hoặc cả hai hợp chất này.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, lượng “ban đầu” của dược chất ít hòa tan trong nước có nghĩa là khối lượng của dược chất ít hòa tan trong nước được đưa vào khi dược phẩm này được bào chế.

Trong phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme theo một phương án của sáng chế, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu dược phẩm này chứa chất có liên quan có công thức 1 (đặc biệt là, công thức 1c) có mặt với lượng bằng 0,8 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 0,65 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,5 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 0,35 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất là 0,2 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tính theo 100 phần khối lượng của lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước khi nó được bảo quản ở điều kiện tăng tốc (40°C) trong 6 tháng.

Trong phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme theo một phương án của sáng chế, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu dược phẩm chứa chất có liên quan có công thức 1a (đặc biệt là, công thức 1d) có mặt với lượng bằng 0,3 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 0,25 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn

nữa là 0,2 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 0,15 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất là 0,1 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tính theo 100 phần khối lượng của lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi nó được bảo quản ở điều kiện tăng tốc (40°C) trong 6 tháng,.

Trong phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme theo một phương án của sáng chế, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu dược phẩm chứa chất có liên quan có công thức 1b (đặc biệt là, công thức 1e) có mặt với lượng bằng 0,5 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 0,4 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,3 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 0,2 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất là 0,1 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tính theo 100 phần khối lượng của lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi nó được bảo quản ở điều kiện tăng tốc (40°C) trong 6 tháng.

Theo phương án được ưu tiên về phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme theo một phương án của sáng chế, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu dược phẩm chứa chất có liên quan có công thức 1 (đặc biệt là, công thức 1c) có mặt với lượng nhỏ hơn 0,8 phần khối lượng, đặc biệt là nhỏ hơn 0,7 phần khối lượng, tính theo 100 phần khối lượng của lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước khi nó được bảo quản ở điều kiện tăng tốc (40°C) trong 6 tháng.

Theo phương án được ưu tiên, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu dược phẩm chứa chất có liên quan có công thức 1a (đặc biệt là, công thức 1d) có mặt với lượng nhỏ hơn 0,25 phần khối lượng, đặc biệt là nhỏ hơn 0,22 phần khối

lượng, tính theo 100 phần khối lượng của lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước khi nó được bảo quản ở điều kiện tăng tốc (40°C) trong 6 tháng.

Theo phương án được ưu tiên, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu dược phẩm chứa chất có liên quan có công thức 1b (đặc biệt là, công thức 1e) có mặt với lượng nhỏ hơn 0,55 phần khối lượng, đặc biệt là nhỏ hơn 0,48 phần khối lượng, tính theo 100 phần khối lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi được bảo quản ở điều kiện tăng tốc (40°C) trong 6 tháng.

Có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu dược phẩm theo một phương án của sáng chế chứa chất có liên quan có công thức 1 (đặc biệt là, công thức 1c) có mặt với lượng bằng 1,0 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 0,6 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,4 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 0,2 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất là 0,16 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tính theo 100 phần khối lượng của lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi được bảo quản ở điều kiện nghiêm ngặt (80°C) trong 3 tuần.

Theo phương án được ưu tiên, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu dược phẩm chứa chất có liên quan có công thức 1a (đặc biệt là, công thức 1d) có mặt với lượng bằng 0,5 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 0,3 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,2 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 0,1 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất là 0,08 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tính theo 100 phần khối lượng của lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi nó được bảo quản ở điều kiện nghiêm ngặt (80°C) trong 3 tuần.

Theo phương án được ưu tiên, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu được phẩm chứa chất có liên quan có công thức 1b (đặc biệt là, công thức 1e) có mặt với lượng bằng 0,5 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 0,3 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,2 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 0,1 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất là 0,08 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tính theo 100 phần khối lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước khi nó được bảo quản ở điều kiện nghiêm ngặt (80°C) trong 3 tuần.

Theo phương án được ưu tiên, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu được phẩm theo một phương án của sáng chế chứa chất có liên quan có công thức 1 (đặc biệt là, công thức 1c) có mặt với lượng nhỏ hơn 0,45 phần khối lượng, tính theo 100 phần khối lượng của lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi nó được bảo quản ở điều kiện nghiêm ngặt (80°C) trong 3 tuần.

Theo phương án được ưu tiên, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu được phẩm theo một phương án của sáng chế chứa chất có liên quan có công thức 1a (đặc biệt là, công thức 1d) có mặt với lượng nhỏ hơn 0,18 phần khối lượng, tính theo 100 phần khối lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi nó được bảo quản ở điều kiện nghiêm ngặt (80°C) trong 3 tuần.

Theo phương án được ưu tiên, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu được phẩm theo một phương án của sáng chế chứa chất có liên quan có công thức 1b (đặc biệt là, công thức 1e) có mặt với lượng nhỏ hơn 0,27 phần khối lượng, tính theo 100 phần khối lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi nó được bảo quản ở điều kiện nghiêm ngặt (80°C) trong 3 tuần.

Trong phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme theo một phương án của sáng chế, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu dược phẩm chứa chất có liên quan có công thức 2 (đặc biệt là, công thức 2a) có mặt với lượng bằng 0,3 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 0,25 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,2 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 0,15 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất là 0,1 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tính theo 100 phần khối lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi nó được bảo quản ở điều kiện tăng tốc (40°C) trong 6 tháng.

Theo phương án được ưu tiên, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu dược phẩm theo một phương án của sáng chế chứa chất có liên quan có công thức 2 (đặc biệt là, công thức 2a) có mặt với lượng nhỏ hơn 0,27 phần khối lượng, đặc biệt là nhỏ hơn 0,19 phần khối lượng, tính theo 100 phần khối lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi nó được bảo quản ở điều kiện tăng tốc (40°C) trong 6 tháng.

Có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu dược phẩm theo một phương án của sáng chế chứa chất có liên quan có công thức 2 (đặc biệt là, công thức 2a) có mặt với lượng bằng 1,0 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn là 0,8 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tốt hơn nữa là 0,6 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, còn tốt hơn nữa là 0,4 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, và tốt nhất là 0,2 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, tính theo 100 phần khối lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi nó được bảo quản ở điều kiện nghiêm ngặt (80°C) trong 3 tuần.

Theo phương án được ưu tiên, có thể nhận thấy rằng tiêu chuẩn chất lượng được thỏa mãn nếu được phẩm theo một phương án của sáng chế chứa chất có liên quan có công thức 2 (đặc biệt là, công thức 2a) có mặt với lượng nhỏ hơn 0,76 phần khối lượng, tính theo 100 phần khối lượng ban đầu của dược chất ít hòa tan trong nước, khi nó được bảo quản ở điều kiện nghiêm ngặt (80°C) trong 3 tuần.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được giải thích chi tiết hơn bằng các ví dụ sau đây. Tuy nhiên, các ví dụ này chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế, và phạm vi của sáng chế không chỉ giới hạn ở các ví dụ này theo cách bất kỳ.

Ví dụ thử nghiệm 1-1: Tách các chất có liên quan bằng phương pháp sắc ký lỏng

16,7mL nước khử ion (DW) được nạp vào lọ nhỏ chứa 100mg chế phẩm dạng mixen polyme chứa paclitaxel, được dùng để thử nghiệm tăng tốc trong sáu tháng (nhiệt độ: 40°C), và các thành phần được hòa tan hoàn toàn, và tổng lượng chất lỏng được lấy ra và được chuyển vào bình cầu dung tích 20ml, và đạt tới dòng đã được đánh dấu là thu được tổng thể tích 20mL (5,0 mg/ml). 2mL chất lỏng này được lấy ra và được chuyển đến bình cầu dung tích 10ml, và đổ axetonitril để đạt tới dòng đã được đánh dấu để thu được tổng thể tích 10mL (1 mg/ml). Đối với chế phẩm nêu trên, chất có liên quan được tách và thu gom theo phân đoạn bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký lỏng sau.

Các điều kiện để tiến hành sắc ký lỏng

- 1) Cột: Poroshell 120 PFP (4,6 × 150 mm, 2,7 µm, Agilent)
- 2) Pha động: A: DW / B: Axetonitril

Thời gian (phút)	%A	%B
0,00	65	35

25,00	45	55
28,00	45	55
30,00	65	35
35,00	65	35

3) Tốc độ chảy: 0,6mL/phút

4) Thể tích tiêm: 10 µl

5) Bộ dò: Quang phổ kế hấp thụ UV (Bước sóng xác định: 227 nm)

Sắc ký đồ thu được khi phân tích HPLC được thể hiện trên Fig.1.

Ví dụ thử nghiệm 1-2: Phân tích định tính các chất có liên quan ở RRT 1,10 và 1,12 bằng cách sử dụng LC/MS/MS

Các chất có liên quan đã được tách trong Ví dụ thử nghiệm 1-1 (RRT: 1,10±0,02 (1,08~1,12) và 1,12±0,02 (1,10~1,14)) được phân tích định tính bằng cách quét MS của quang phổ kế sắc ký lỏng-khối (LC/MS/MS). Đối với LC/MS/MS, sắc ký lỏng 1200 dãy và quang phổ ion hóa phun điện tử 6400 dãy (Agilent, US) được sử dụng. Các điều kiện để phân tích là như sau.

Các điều kiện để tiến hành sắc ký lỏng

1) Cột: Cadenza HS-C18 (3,0 × 150 mm, 3 µm, Imtakt)

2) Pha động: A: amoni axetat 0,5mM với axit axetic 0,03% / B: Axetonitril

Thời gian (phút)	%A	%B
0,00	80	20
4,00	55	45
9,00	55	45
9,10	80	20
15,00	80	20

3) Tốc độ chảy: 0,4mL/phút

4) Thể tích tiêm: 2 µl

5) Bộ dò: Quang phổ kế hấp thụ UV (Bước sóng xác định: 227 nm)

Các điều kiện để phân tích quang phổ ion hóa phun điện tử

- 1) Ion hoá: Ion hóa phun điện tử, Dương tính (ESI+)
- 2) Phương pháp MS: Quét MS2 / Qét ion của sản phẩm
- 3) Nguồn ion: Dòng tia Agilent ESI
- 4) Khí phun mù (áp suất): Nitơ (35 psi)
- 5) Điện áp phun ion: 3500 V
- 6) Nhiệt độ khi sấy khô (tốc độ chảy): 350°C (7 L/phút)
- 7) Nhiệt độ khí bao (tốc độ chảy): 400°C (10 L/phút)
- 8) Điện thế phân mảnh: 135 V
- 9) Điện thế vò: 500 V
- 10) Điện thế tăng tốc tế bào: 7 V
- 11) EMV: 0 V
- 12) Năng lượng va chạm: 22 V
- 13) Ion tiền thân: m/z 1020,2
- 14) Khoảng quét khối: m/z 100~1500

Chất để phân tích, mà được tách và đưa vào giai đoạn phát hiện, được thiết lập cho chảy trong quang phổ kế khối, và ở thời điểm này ion đã được phát hiện của chất có liên quan được phân tích định tính bằng cách lựa chọn ion đặc trưng của phổ khối [M+Na].

Sắc ký đồ thu được và phổ của việc phân tích LC/MS/MS được thể hiện trên Fig.2.

Ví dụ thử nghiệm 2: Tạo ra phản ứng của paclitaxel và lactit và phân tích

HPLC sản phẩm phản ứng

Trong các chất có liên quan mà được thu gom theo phân đoạn từ chế phẩm dạng mixen polyme chứa paclitaxel trong Ví dụ thử nghiệm 1-1, nhiều polyme cùng có mặt và do đó phân tích định tính chúng gặp rất nhiều khó khăn. Do việc phân tích định tính trong các ví dụ thử nghiệm 1-2 được thực hiện sau đó, các chất có liên quan được giả định là các hợp chất được sản xuất bằng cách kết hợp paclitaxel và lactit. Do đó, thử nghiệm tạo ra phản ứng bằng cách bổ sung trực tiếp lactit vào paclitaxel và phân tích sản phẩm phản ứng được thực hiện để khẳng định xem các chất có liên quan giả định được sản xuất.

Trước tiên, mỗi 5mg paclitaxel và 3mg L-lactit/D-lactit được hoà tan trong 1mL dung dịch axetonitril (ACN):DW=70:30 (thể tích/thể tích), và sau đó các dung dịch này được trộn với nhau. Dung dịch này được chuyển vào lọ LC và được phân tích bằng HPLC. Sắc ký đồ thu được khi phân tích HPLC được thể hiện trên Fig.3.

Bằng cách phân tích, có thể khẳng định rằng đó là hợp chất của tổ hợp paclitaxel và L-lactit đã được rửa giải trước tiên trên sắc ký đồ và hợp chất của tổ hợp paclitaxel và D-lactit được rửa giải sau đó. Hơn thế nữa, trong trường hợp thử nghiệm sử dụng cùng một lượng như vậy, có thể khẳng định rằng tổ hợp paclitaxel và D-lactit được tạo ra nhiều hơn so với tổ hợp paclitaxel và L-lactit. Từ đó, mẫu sắc ký đồ tương tự có thể được khẳng định là chế phẩm dạng mixen polyme chứa paclitaxel, mà được dùng để thử nghiệm tăng tốc trong sáu tháng.

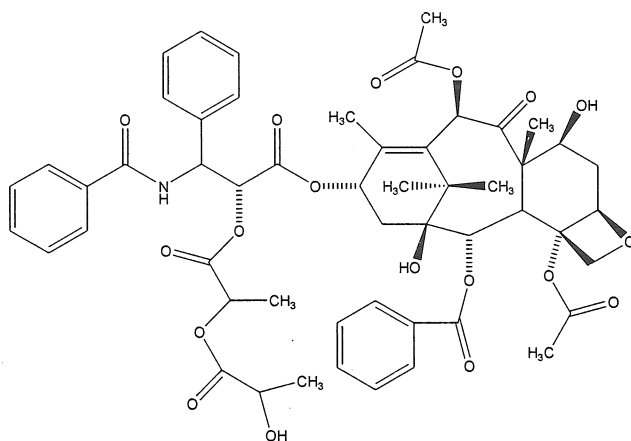
Ví dụ thử nghiệm 3: Phân tích định tính sản phẩm phản ứng của paclitaxel và lactit bằng cách sử dụng LC/MS/MS

Bằng cách sử dụng LC/MS/MS, mẫu chỉ chứa paclitaxel được quét MS trước

tiên, và do đó, m/z 854,2 amu (đơn vị khối nguyên tử) là $[M+H]^+$ và m/z 876,2 amu là $[M+Na]^+$ có mặt. Sau đó, khi L-lactit và D-lactit được bổ sung vào paclitaxel, m/z 1020,0 amu, không thể hiện trong mẫu chỉ chứa paclitaxel, xuất hiện và đã khẳng định được rằng cường độ của nó được tăng lên một cách liên tục không theo thời gian. Phổ thu được khi phân tích LC/MS/MS được thể hiện trên Fig.4.

Từ đó, có thể khẳng định lại rằng cấu trúc của chất có liên quan thu được trong Ví dụ thử nghiệm 1-1 là hợp chất có 1020,0 amu là $[M+Na]^+$ được sản xuất bởi tổ hợp paclitaxel và chất đồng phân lactit.

Từ các kết quả của Ví dụ thử nghiệm 2 và 3 và hiểu biết thông thường về phản ứng trong lĩnh vực hoá hữu cơ, có thể nhận thấy rằng chất có liên quan của chế phẩm dạng mixen polyme là hợp chất sau được sản xuất bởi tổ hợp paclitaxel và lactit.



Dạng tổ hợp của paclitaxel và lactit: $C_{53}H_{59}NO_{18}$ (998,03 g/mol)

Ví dụ thử nghiệm 4: Phân tích định tính của chất có liên quan ở RRT 0,87 bằng cách sử dụng LC/MS/MS

Chất có liên quan đã được tách trong Ví dụ thử nghiệm 1-1 (RRT: $0,87 \pm 0,02$ (0,85~0,89)) được phân tích định tính bằng cách quét MS và quét ion của sản phẩm bằng

quang phổ kế sắc ký lỏng-khối (LC/MS/MS). Trong thiết bị sau, đối với LC/MS/MS, sắc ký lỏng 1200 dãy và quang phổ ion hóa phun điện tử 6400 dãy (Agilent, US) được sử dụng. Các điều kiện để phân tích là như sau.

Các điều kiện để tiến hành sắc ký lỏng

1) Cột: Poroshell 120 PFP (4,6 × 150 mm, 2,7 µm, Agilent)

2) Pha động: A: DW / B: Axetonitril

Thời gian (phút)	%A	%B
0,00	65	35
25,00	45	55
28,00	45	55
30,00	65	35
35,00	65	35

3) Tốc độ chảy: 0,6mL/phút

4) Thể tích tiêm: 10 µl

5) Bộ dò: Quang phổ kế hấp thụ UV (Bước sóng xác định: 227 nm)

Các điều kiện để quang phổ ion hóa phun điện tử

1) Ion hoá: Ion hóa phun điện tử, Dương tính (ESI+)

2) Phương pháp MS: Quét MS2 / Việc quét ion của sản phẩm

3) Nguồn ion: Dòng tia Agilent ESI

4) Khí phun mù (áp suất): Nitơ (35 psi)

5) Điện áp phun ion: 3500 V

6) Nhiệt độ khi sấy khô (tốc độ chảy): 350°C (7 L/phút)

7) Nhiệt độ khí bao (tốc độ chảy): 400°C (10 L/phút)

8) Điện thế phân mảnh: 135 V

9) Điện thế vò: 500 V

10) Điện thế tăng tốc tế bào: 7 V

11) EMV: 0 V

12) Năng lượng va chạm: 22 V

13) Ion tiền thân: m/z 894,2

14) Khoảng quét khối: m/z 100~1500

Chất để phân tích, mà đã được tách và đi ra từ giai đoạn phân tích, được thiết lập để chảy vào quang phổ kế, và ở thời điểm đó ion đã được phát hiện của chất có liên quan được phân tích định tính bằng cách lựa chọn ion đặc trưng của phổ khối $[M+Na]$.

Ví dụ thử nghiệm 5: Phân tích LC/MS/MS chất có liên quan ở RRT 0,87 trong hỗn hợp chứa paclitaxel đã được xử lý bằng axit

Từ việc phân tích định tính chế phẩm dạng mixen polyme chứa paclitaxel trong Ví dụ thử nghiệm 4, chất có liên quan được giả định là nguyên liệu tạo ra khi paclitaxel được xử lý bằng axit. Để khẳng định điều này, hợp chất được điều chế bằng cách bổ sung HCl 1N vào paclitaxel và được phân tích bằng LC/MS/MS. Các kết quả phân tích LC/MS/MS được thể hiện trên Fig.6, và kết quả của việc quét ion của sản phẩm khi phân tích LC/MS/MS được thể hiện trên Fig.7 cùng với các kết quả của paclitaxel.

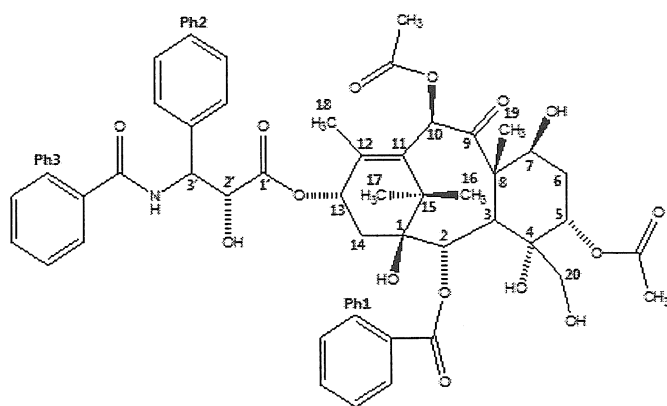
Theo kết quả phân tích này, trên sắc ký đồ, nguyên liệu thu được ở RRT 0,87 từ hỗn hợp thu được bằng cách cho paclitaxel phản ứng với axit có pic HPLC giống nhau một cách chuẩn xác như pic của chất có liên quan (RRT: $0,87 \pm 0,02$ (0,85~0,89)) trong chế phẩm dạng mixen polyme chứa paclitaxel theo một phương án của sáng chế mà được đưa vào thử nghiệm tăng tốc trong sáu tháng. Ngoài ra, do hai nguyên liệu này có phổ quét ion của sản phẩm như nhau ở RRT 0,87 (Fig.7), nên có thể khẳng định rằng hai

nguyên liệu này có cùng cấu trúc.

Ví dụ thử nghiệm 6: Phân tích NMR chất có liên quan ở RRT 0,87 theo cùng một phương pháp phân tích trong hỗn hợp chứa paclitaxel đã được xử lý bằng axit

Để kiểm tra cấu trúc hóa học của chất có liên quan ở RRT 0,87 theo cùng một phương pháp phân tích trong hỗn hợp chứa paclitaxel đã được xử lý bằng axit thu được bằng cách bổ sung HCl 1N vào paclitaxel, cùng một chất có liên quan được tách ra và thu gom theo phân đoạn, và được phân tích bằng quang phổ NMR. Trong phân tích NMR, kết quả của việc phân tích ^1H NMR được thể hiện trên Fig.8, kết quả của việc phân tích ^{13}C NMR được thể hiện trên Fig.9, kết quả của việc phân tích COSY (Quang phổ tương quan) được thể hiện trên Fig.10, và kết quả của việc phân tích HMBC (Quang phổ tương quan liên kết đa dị vòng) được thể hiện trên Fig.11.

Theo kết quả phân tích, có thể khẳng định rằng nguyên liệu này có mặt ở RRT 0,87 theo cùng một phương pháp phân tích bằng cách cho paclitaxel phản ứng với axit (tức là, chất có liên quan (RRT: $0,87 \pm 0,02$ (0,85~0,89)) trong chế phẩm dạng mixen polyme chứa paclitaxel theo một phương án của sáng chế mà được dùng cho thử nghiệm tăng tốc trong sáu tháng) là hợp chất có dạng tổ hợp của paclitaxel và nước sau.



Dạng tổ hợp của paclitaxel và một phân tử nước: $C_{47}H_{53}NO_{15}$ (871,94 g/mol)

Các điều kiện để tiến hành NMR (Quang phổ cộng hưởng từ hạt nhân)

1. 1H

1) Thiết bị NMR: Bruker DRX-300, AVANCE-400 được trang bị bộ phận kiểm soát nhiệt độ

2) Mẫu/Dung môi: 1~10 mg mẫu/0,6mL cloform-d trong ống NMR có mật độ quang 5 mm (Trong tất cả các thử nghiệm NMR, cùng một mẫu được sử dụng.)

3) Đầu dò: Bruker 5 mm QNP hoặc mẫu dò kép C-H

4) Bề rộng của xung proton 90° /góc kích thích/Thời gian thu nhận: 10,0~11,0 μ giây/ 30° /~5,0 giây

5) Làm chậm thời gian nghỉ/Số lần quét: 1,0~5,0 giây/4~64

2. ^{13}C

1) Đầu dò: Bruker 5 mm QNP hoặc mẫu dò kép C-H

2) Bề rộng của xung cacbon 90° /Góc kích thích/Thời gian thu nhận: 10,0 μ giây/ 30° /2,0~3,0 giây

3) Khoảng làm chậm thời gian nghỉ/Số lần quét: 2,0~5,0 giây/nhiều hơn 5000

3. COSY

1) Thiết bị NMR: Bruker AVANCE-400

2) Đầu dò: Bruker 5 mm QNP

3) Trình tự nhịp: cosygp trình tự nhịp

4) Bề rộng của xung proton 90° /Thời gian thu nhận: 11,0 μ giây/0,4~1,6 giây

5) Khoảng làm chậm thời gian nghỉ/Số lần quét/Số lần thử nghiệm đối với ω_1 :

0,5~2,0 giây/32~48/400~500

4. HMBC

1) Thiết bị NMR: Bruker AVANCE-400

2) Đầu dò: Bruker 5 mm inverse probe

3) Trình tự nhịp: trình tự nhịp inv4gptp (đối với HMQC)/ trình tự nhịp inv4gplprnd (đối với HMBC)

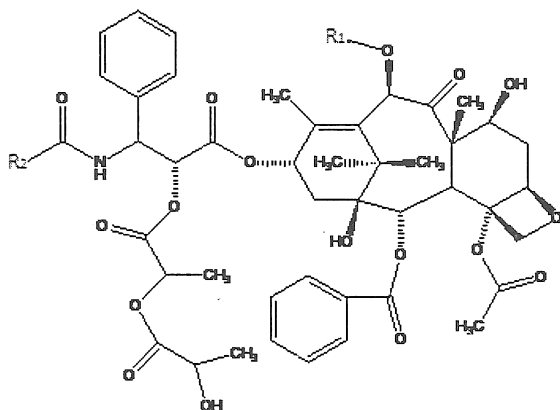
4) Bề rộng của xung proton 90° /Bề rộng của xung cacbon 90° /Thời gian thu nhận: 7,5 μ giây/17~18 μ giây/0,15~0,2 giây

5) Khoảng làm chậm thời gian nghỉ/Số lần quét đối với HMQC/Số lần quét vHMBC/ Số lần thử nghiệm đối với ω_1 : 1,0~2,0 giây/32~96/224/128~256

6) Nhiệt độ/ $1/2(JCH)$: 300K/ 3,5 mgiây

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme, trong đó chất có liên quan bao gồm hợp chất có công thức 1 sau đây:
[Công thức 1]



trong đó R_1 là H hoặc COCH_3 , và R_2 là phenyl hoặc $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$; và trong đó phương pháp để phân tích này bao gồm:

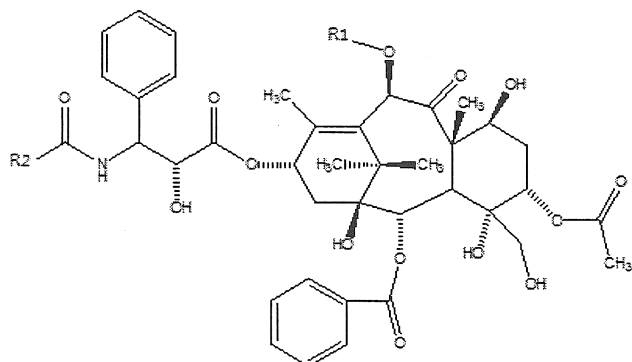
- (1) điều chế mẫu để phân tích dược phẩm dạng mixen polyme chứa copolyme khối lượng tính chứa khối ưa nước (A) và khối kỵ nước (B), và dược chất hòa tan ít trong nước; và
 - (2) phân tích mẫu đã được chuẩn bị bằng phép sắc ký lỏng tính tăng cao (*High Performance Liquid Chromatography*: HPLC) bằng cách sử dụng các điều kiện (a) và (b) sau đây:
 - (a) pha tĩnh pentafluorophenyl của các hạt xốp có cỡ hạt là $4\mu\text{m}$ hoặc nhỏ hơn; và
 - (b) cột có đường kính trong là 5mm hoặc nhỏ hơn và chiều dài là 50mm hoặc lớn hơn.
2. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 1, trong đó phép sắc ký lỏng tính năng cao là phương pháp sử dụng pha

tính của các hạt xốp có cỡ hạt là 1,5 đến 4 μ m; và cột có đường kính trong là 2 đến 5mm và chiều dài là 50 đến 250mm.

3. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 1, phương pháp này còn bao gồm bước phân tích định tính các chất có liên quan đã được phân tách trong bước (2) bằng các phương pháp LC/MS, LC/MS/MS, NMR hoặc hỗn hợp của chúng.
4. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 3, trong đó LC/MS hoặc LC/MS/MS là phương pháp sử dụng (c) pha tĩnh ODS lai hóa; và (d) cột có đường kính trong là 10mm hoặc nhỏ hơn và chiều dài là 500mm hoặc nhỏ hơn.
5. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 1, trong đó detector UV được sử dụng để phát hiện chất có liên quan.
6. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó khối ưa nước (A) bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm polyetylen glycol hoặc dẫn xuất của chúng, polyvinylpyrrolidon, rượu polyvinyllic, polyacrylamit và hỗn hợp của chúng; và khối kỵ nước (B) bao gồm một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm polylactit, polyglycolit, axit polymandelic, polycaprolacton, polydioxan-2-on, axit polyamino, polyorthoeste, polyanhydrit, polycarbonat và hỗn hợp của chúng.
7. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 6, trong đó khối ưa nước (A) là polyetylen glycol hoặc monometoxypolyetylen glycol; và khối kỵ nước (B) là polylactit.
8. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó khối ưa nước (A) có số

khối lượng phân tử trung bình là nằm trong khoảng từ 200 đến 20.000 Dalton; và khối kị nước (B) có số khối lượng phân tử trung bình là nằm trong khoảng từ 200 đến 20.000 Dalton.

9. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó dược phẩm hòa tan ít trong nước là tác nhân chống ung thư.
10. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 9, trong đó tác nhân chống ung thư là tác nhân chống u thư taxan.
11. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 10, trong đó tác nhân chống u thư taxan là một hoặc nhiều chất được chọn từ nhóm bao gồm paclitaxel, doxetaxel, 7-epipaclitaxel, t-axetylpacitaxel, 10-desaxetylpacitaxel, 10-desaxetyl-7-epipaclitaxel, 7-xylosylpacitaxel, 10-desaxetyl-7-glutarylpacitaxel, 7-N,N-dimetylglyxylpacitaxel, 7-L-alanylpacitaxel và cabazitaxel.
12. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 1, trong đó chất có liên quan còn bao gồm hợp chất có Công thức 2 sau đây đây:
[Công thức 2]

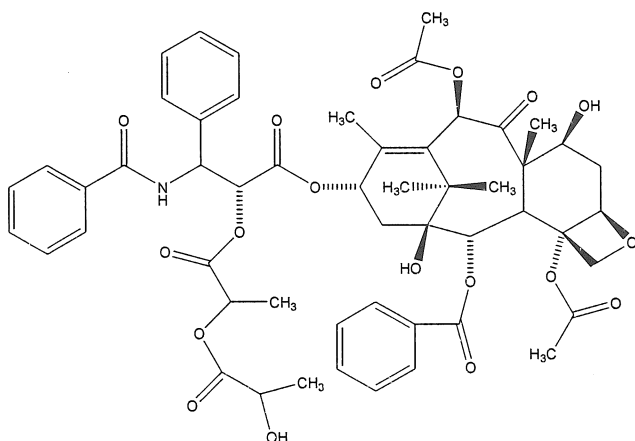


trong đó

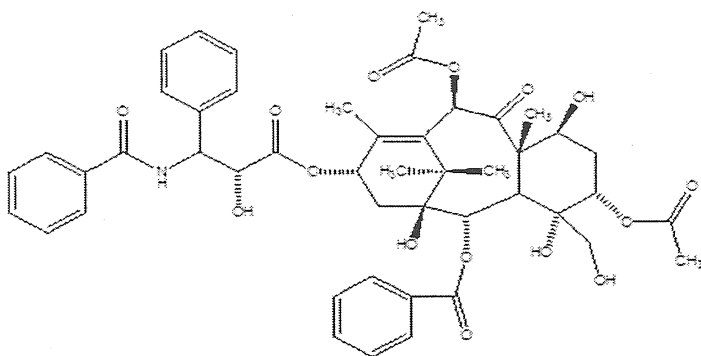
R_1 là H hoặc COCH_3 , và R_2 là phenyl hoặc $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$.

13. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 12, trong đó dược phẩm hòa tan ít trong nước là paclitaxel, hợp chất có Công thức 1 là Hợp chất có công thức 1c sau đây, và hợp chất có Công thức 2 là Hợp chất có Công thức 2a sau đây đây:

[Công thức 1c]



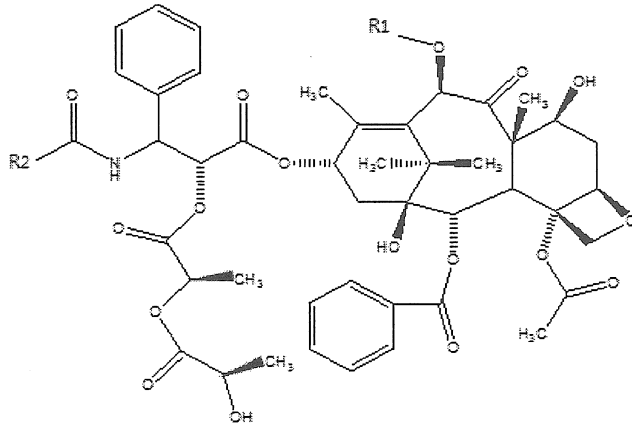
[Công thức 2a]



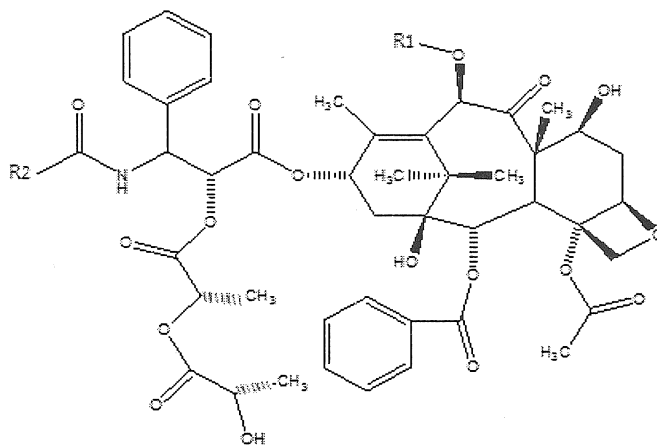
14. Phương pháp để phân tích các chất có liên quan của dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 1, trong đó hợp chất có Công thức 1 bao gồm hợp chất có Công

thức 1a sau đây đây, hợp chất có Công thức 1b sau đây đây, hoặc cả hai công thức này:

[Công thức 1a]



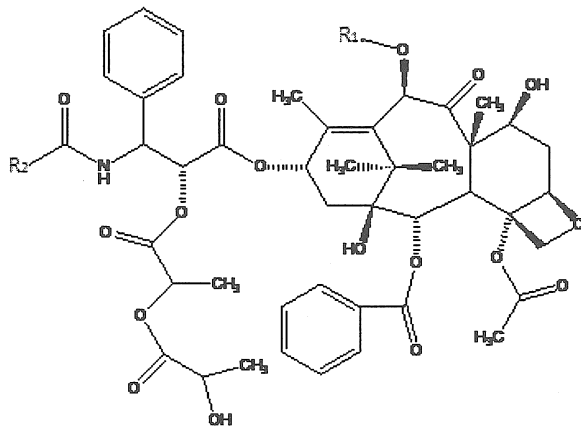
[Công thức 1b]



trong đó R_1 là H hoặc COCH_3 , và R_2 là phenyl hoặc $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$.

15. Phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme, bao gồm bước đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme, dược phẩm này chứa copolyme khối lượng tính chứa khối ưa nước (A) và khối kỵ nước (B), và paclitaxel hoặc doxetaxel làm dược chất hòa tan ít trong nước, bằng cách sử dụng hợp chất có công thức 1 sau đây làm chất ban đầu:

[Công thức 1]

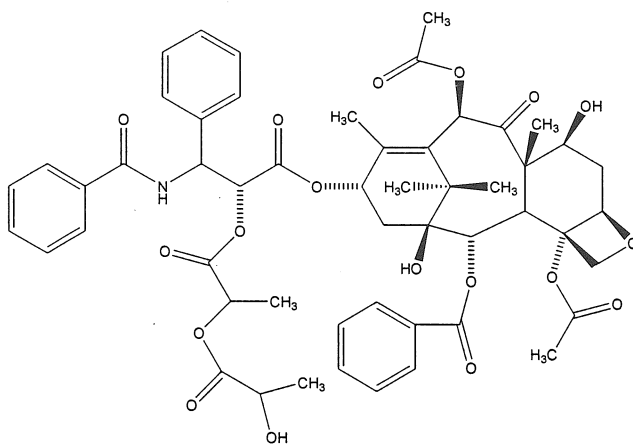


trong đó

R_1 là H hoặc COCH_3 , và R_2 là phenyl hoặc $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$.

16. Phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 15, trong đó dược phẩm hòa tan ít trong nước là paclitaxel, hợp chất có Công thức 1 là Hợp chất có công thức 1c sau đây:

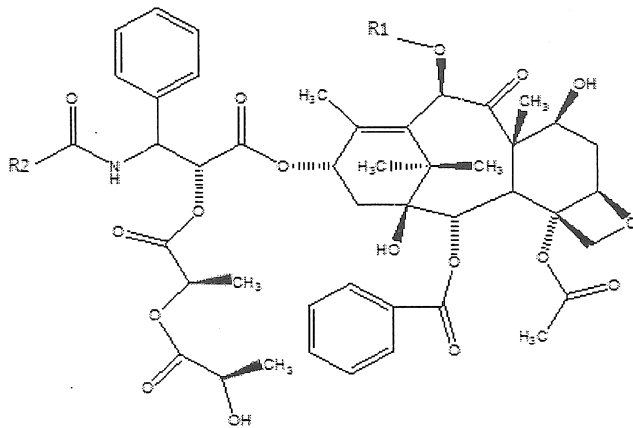
[Công thức 1c]



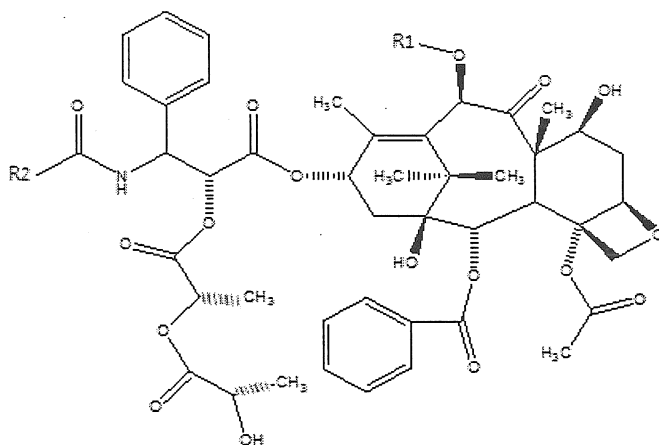
17. Phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 16, trong đó dược phẩm được công nhận là thỏa mãn tiêu chuẩn chất lượng nếu nó chứa, khi được bảo quản ở 40°C trong 6 tháng, hợp chất có Công thức 1 với lượng 0,8 phần

khối lượng hoặc nhỏ hơn, hoặc dựa trên 100 phần khối lượng của lượng ban đầu của dược phẩm hòa tan ít trong nước.

18. Phương pháp đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 17, trong đó dược phẩm được công nhận là thỏa mãn tiêu chuẩn chất lượng nếu nó chứa hợp chất có Công thức 1a với lượng 0,3 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn, và hợp chất có Công thức 1b với lượng 0,5 phần khối lượng hoặc nhỏ hơn:
[Công thức 1a]



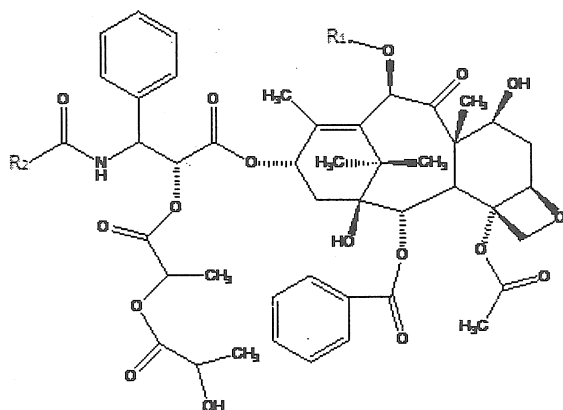
[Công thức 1b]



trong đó R_1 là H hoặc COCH_3 , và R_2 là phenyl hoặc $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$.

19. Chế phẩm để đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme chứa copolyme khối lượng tính chứa khối ưa nước (A) và khối kỵ nước (B), và paclitaxel hoặc doxorubicin as được chất hòa tan ít trong nước, chế phẩm này chứa hợp chất có công thức 1 sau đây:

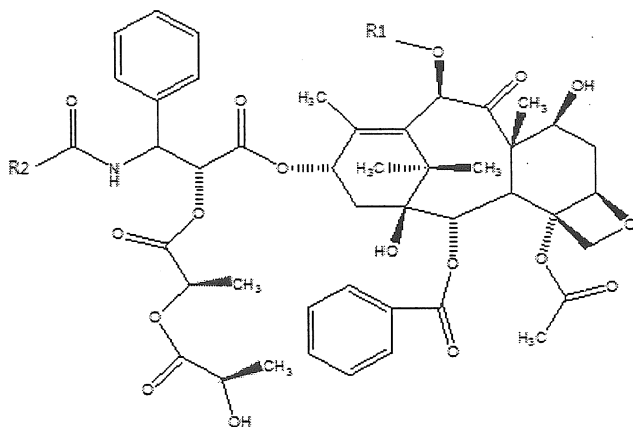
[Công thức 1]



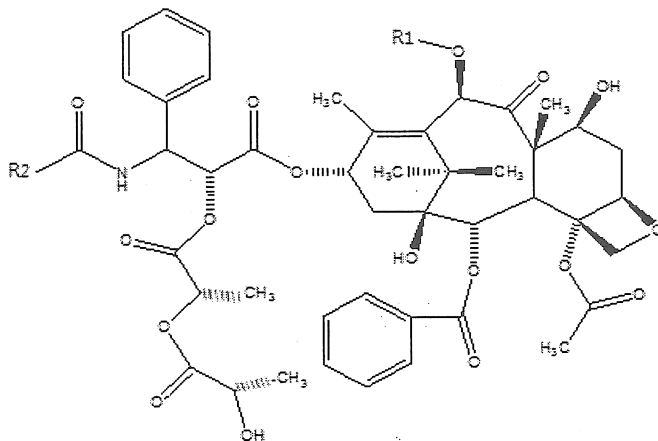
trong đó R_1 là H hoặc COCH_3 , và R_2 là phenyl hoặc $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$.

20. Chế phẩm để đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 19, trong đó hợp chất có Công thức 1 bao gồm hợp chất có Công thức 1a sau đây đây, hợp chất có Công thức 1b sau đây đây, hoặc cả hai công thức này:

[Công thức 1a]

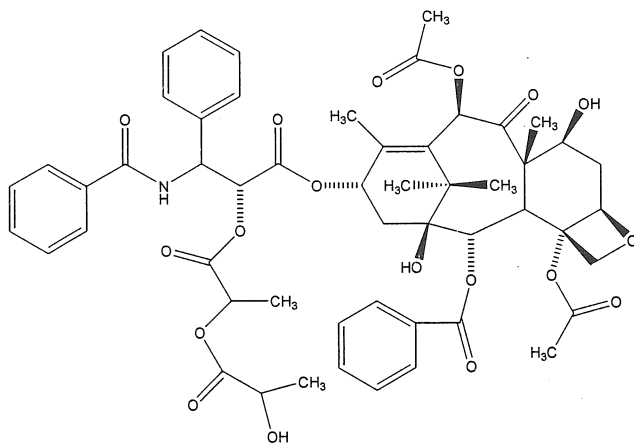


[Công thức 1b]

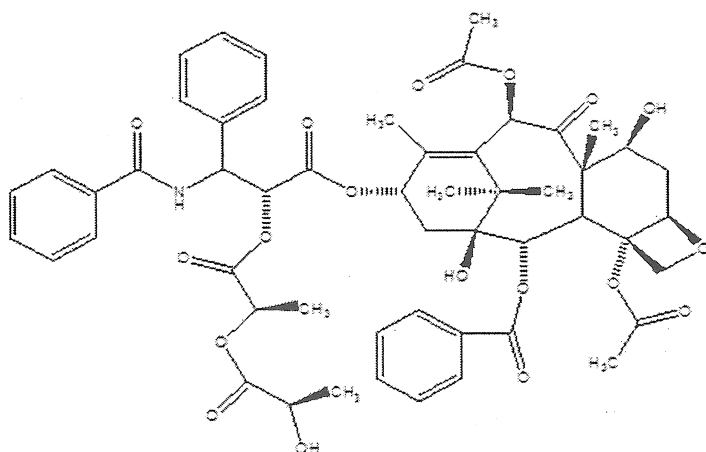


trong đó R_1 là H hoặc COCH_3 , và R_2 là phenyl hoặc $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$.

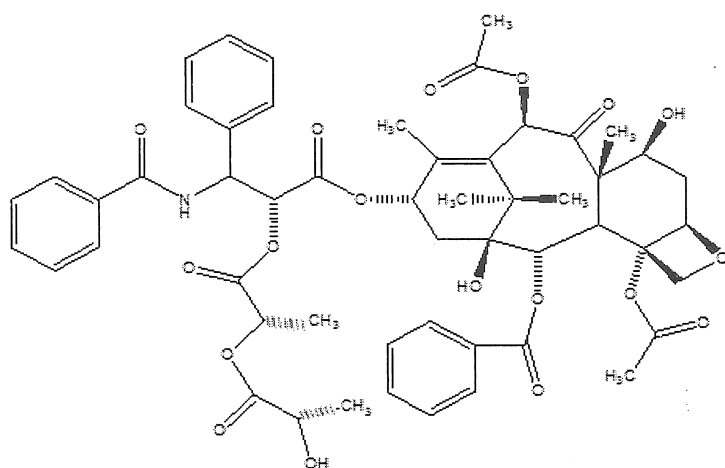
21. Chế phẩm để đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 19, trong đó hợp chất có Công thức 1 là Hợp chất có công thức 1c sau đây:
[Công thức 1c]



22. Chế phẩm để đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme theo điểm 21, trong đó hợp chất có Công thức 1c bao gồm hợp chất có Công thức 1d sau đây đây, hợp chất có Công thức 1e sau đây đây, hoặc cả hai công thức này:
[Công thức 1d]

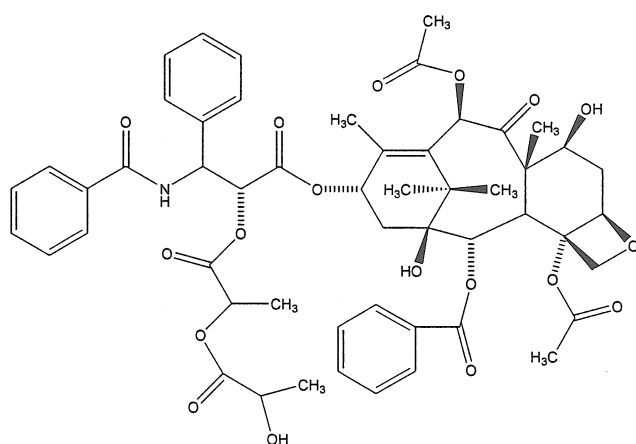


[Công thức 1e]



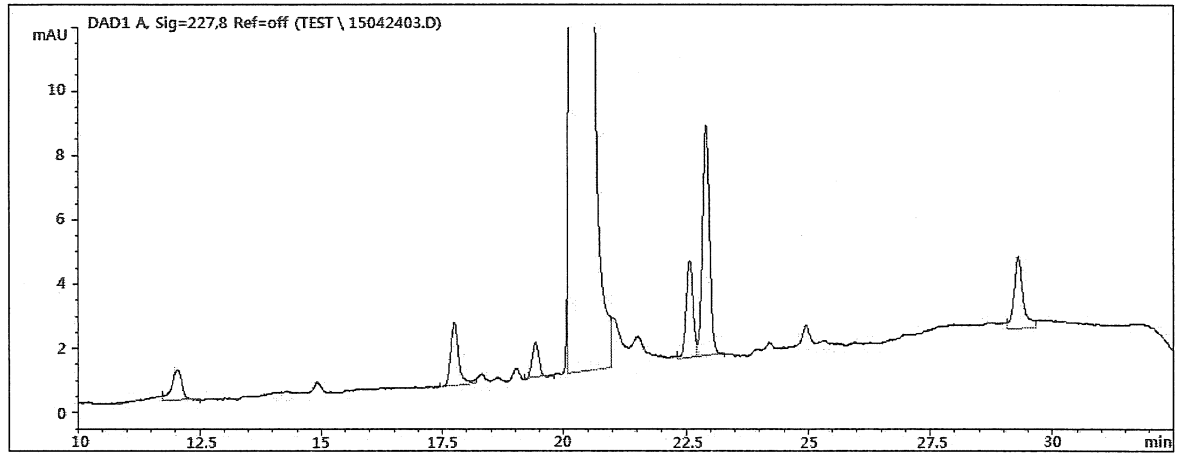
23. Hợp chất có công thức 1c sau đây để đánh giá dược phẩm dạng mixen polyme chứa copolyme khối lượng tính chứa khối ưa nước (A) và khối kỵ nước (B), và paclitaxel hoặc doxorubicin làm dược chất hòa tan ít trong nước:

[Công thức 1c]



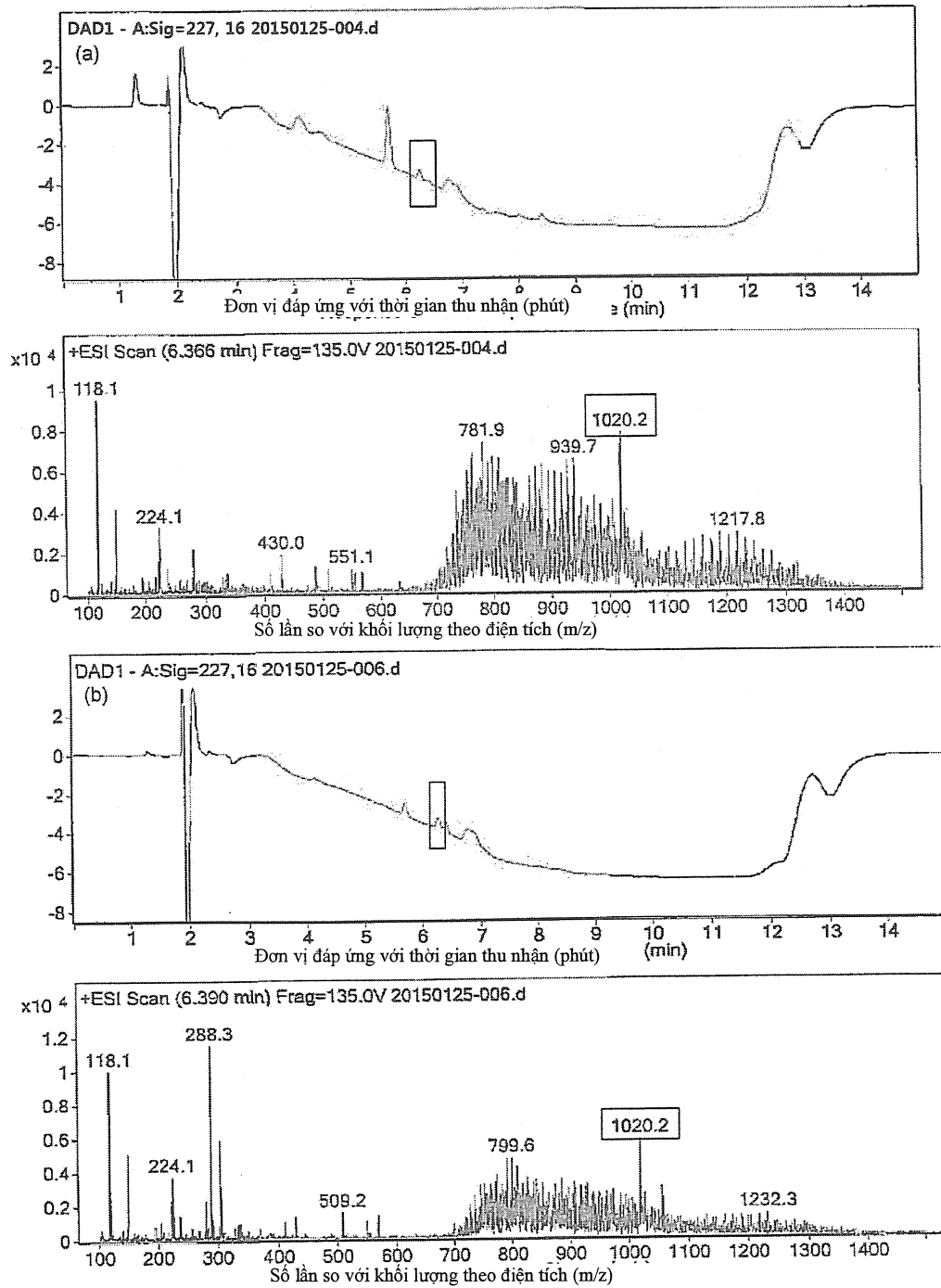
1/8

Fig.1



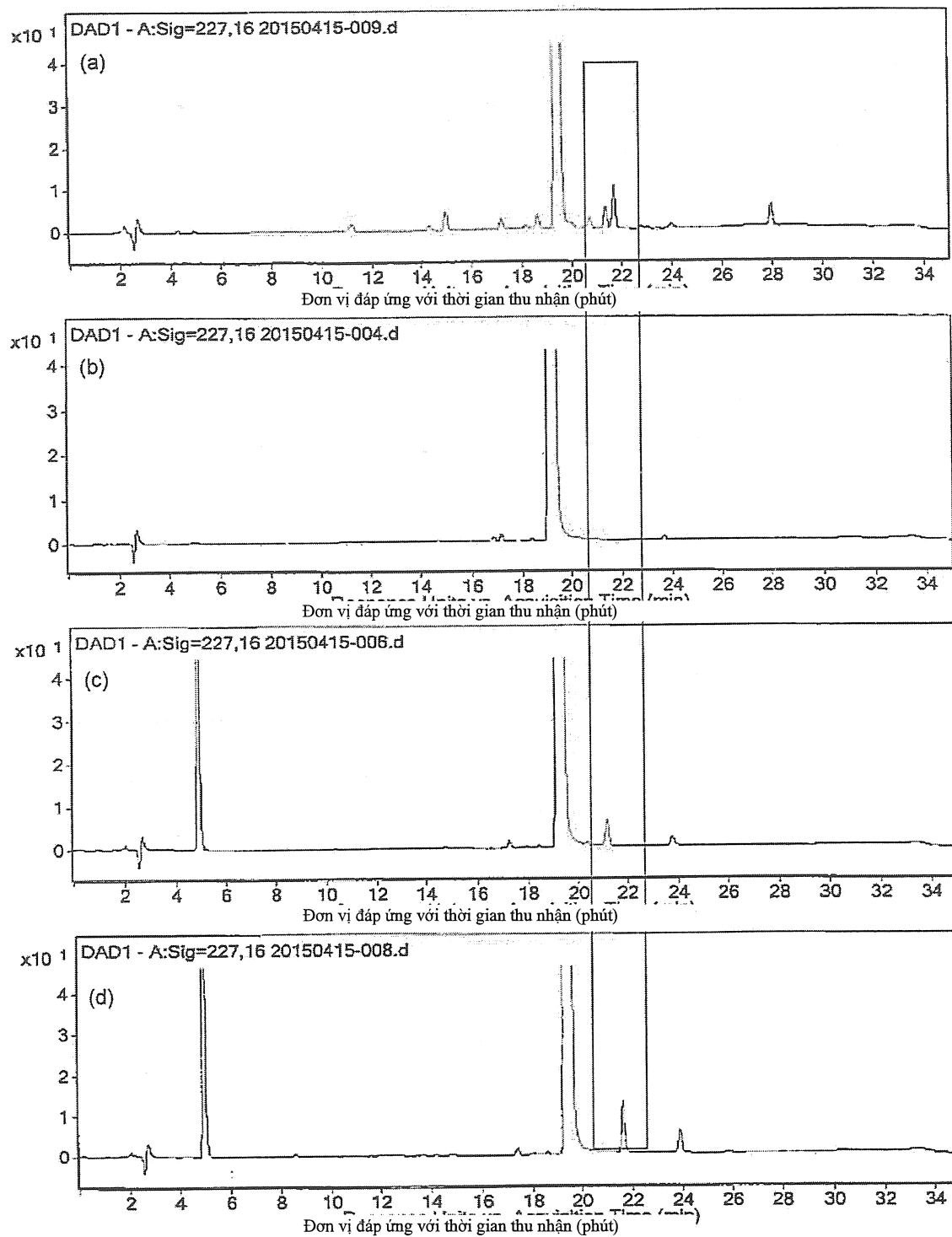
2/8

Fig.2



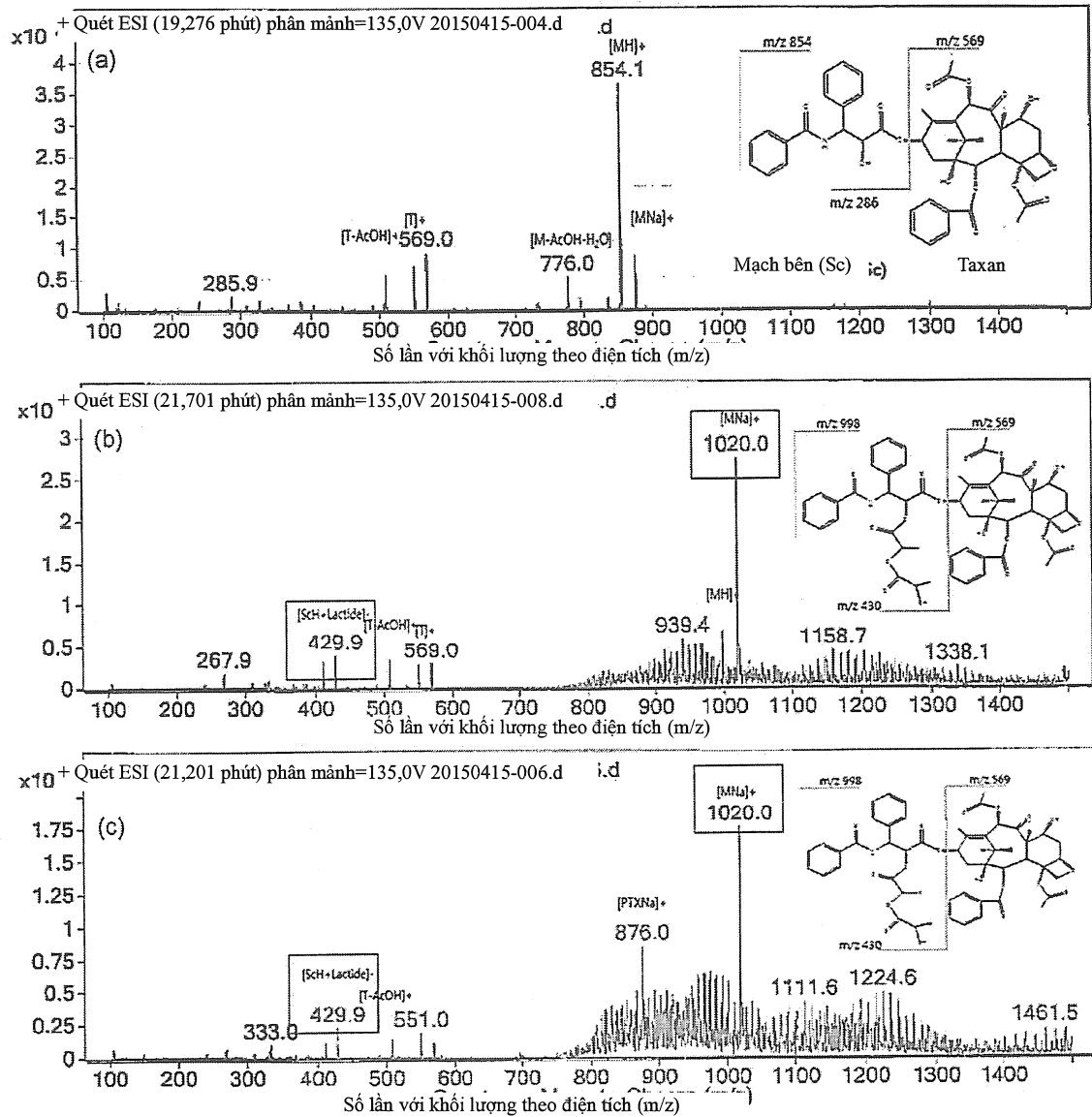
3/8

Fig.3



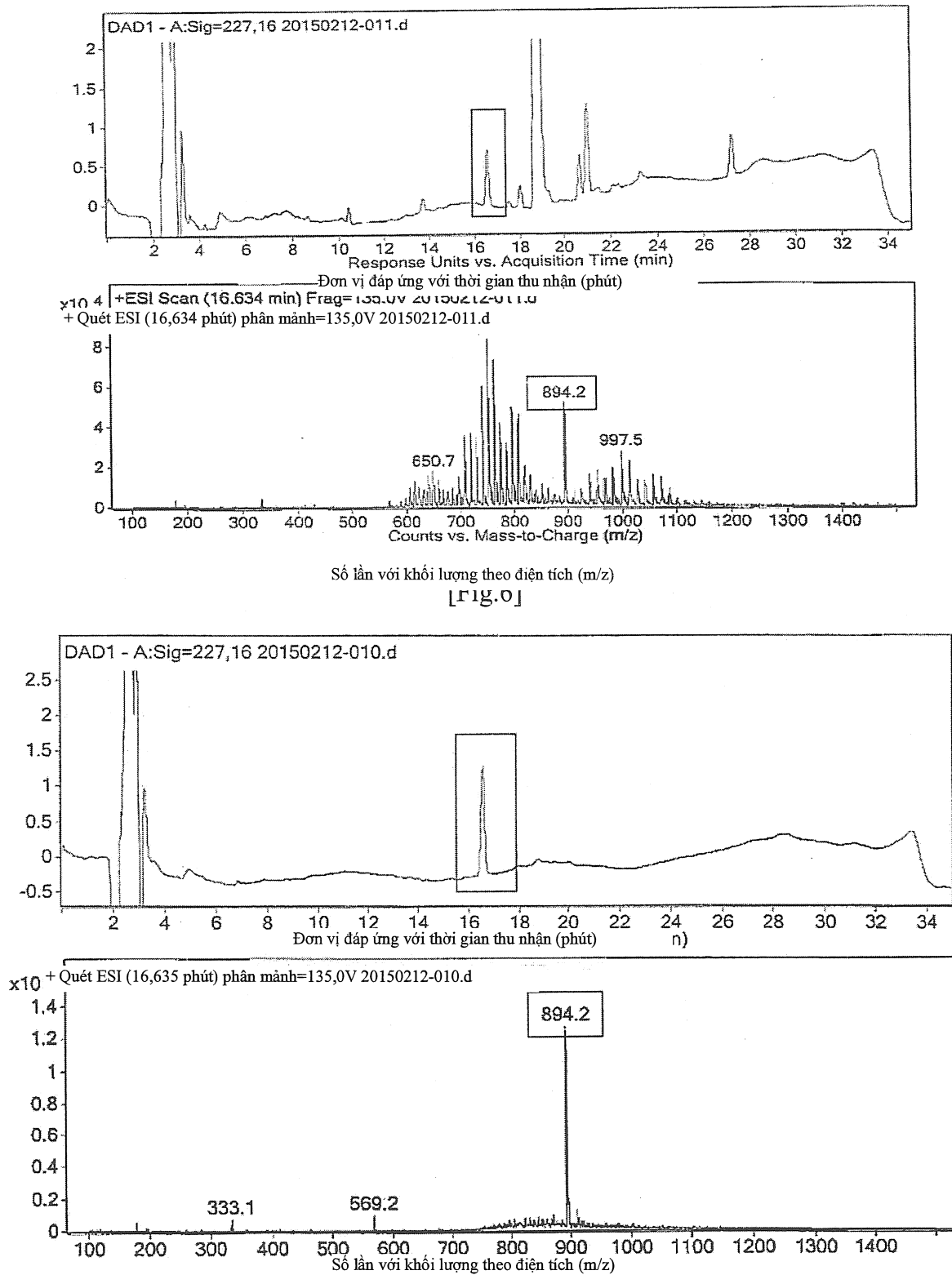
4/8

Fig.4



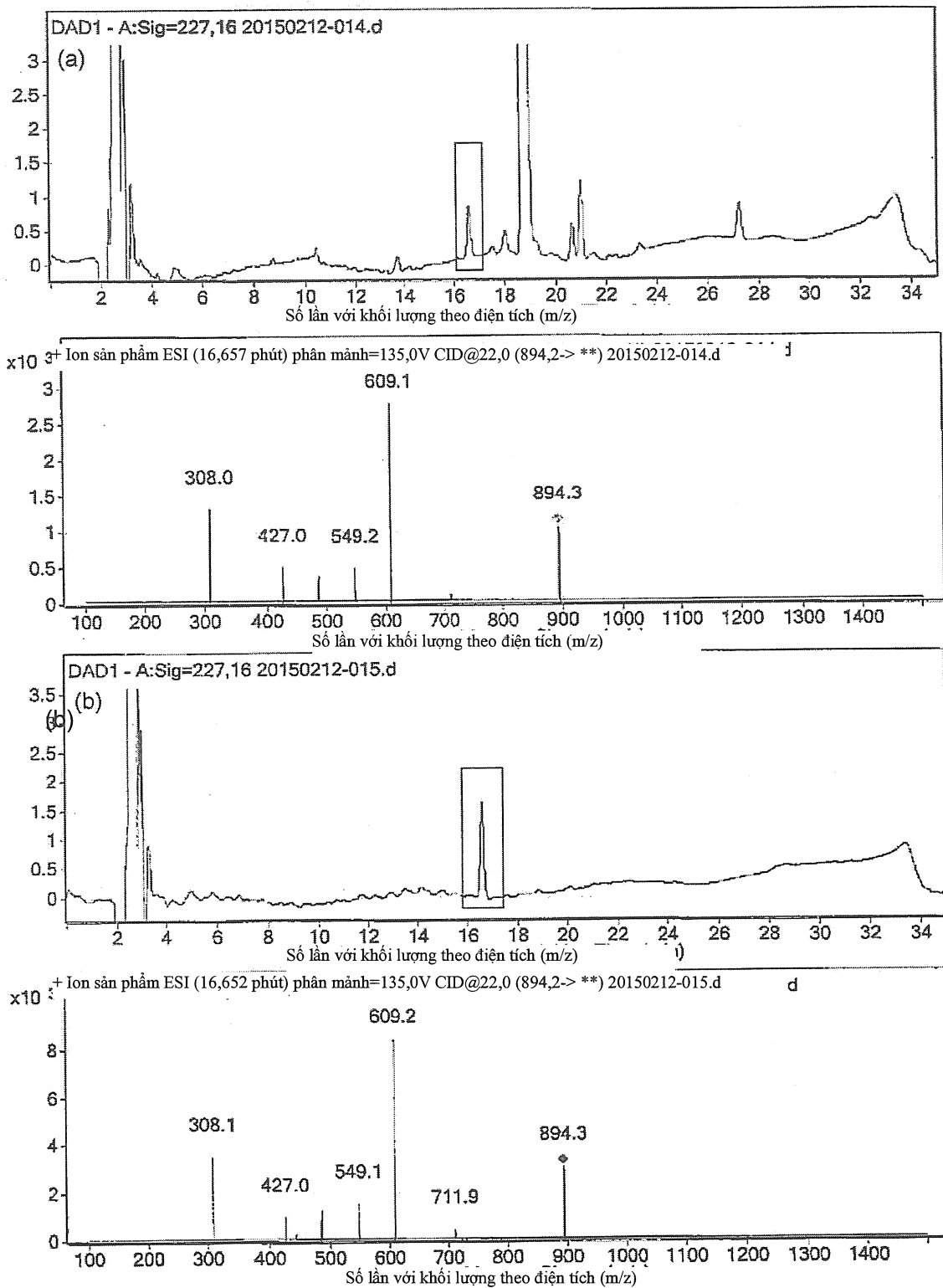
5/8

Fig.5



6/8

Fig.7



7/8

Fig.8

Paclitaxel-Hợp chất mở vòng oxetan (Hợp chất A)

(Compound A)

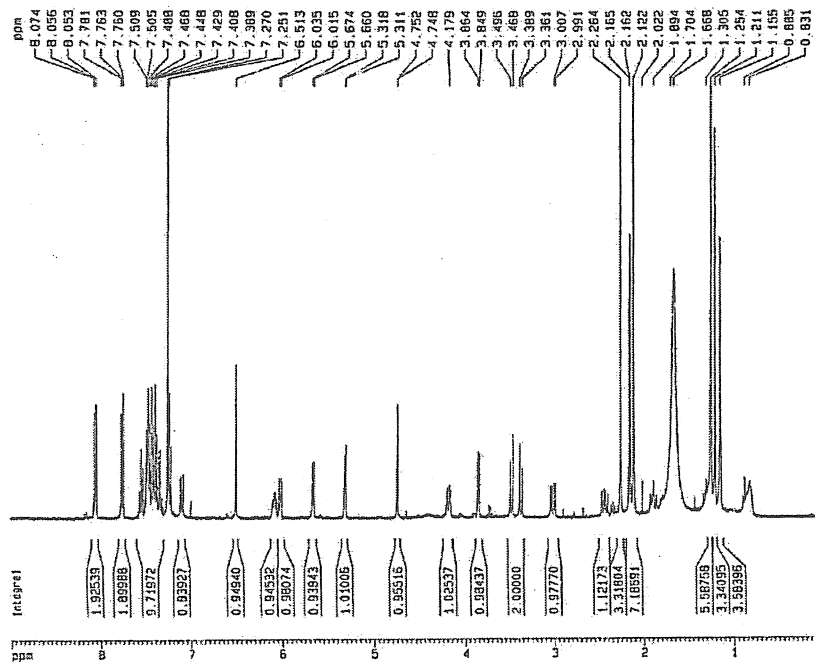
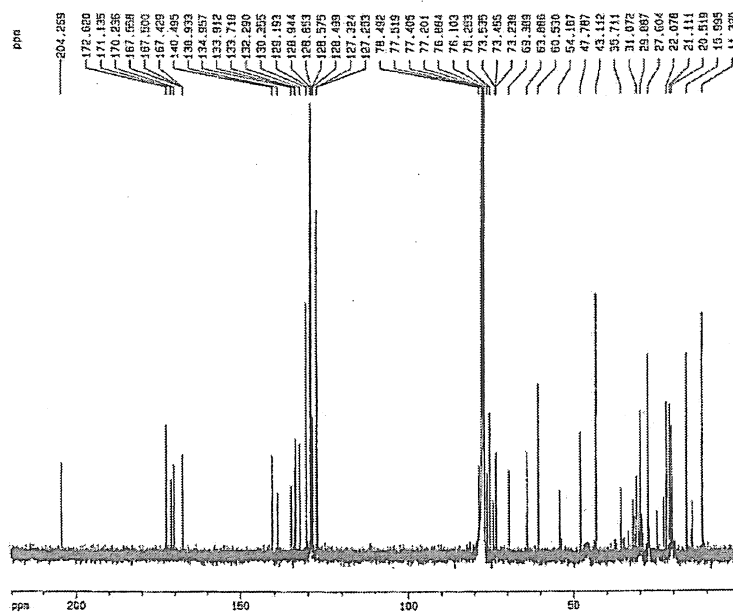


Fig.9

Paclitaxel-Hợp chất mở vòng oxetan (Hợp chất A)

(Compound A)



8/8

Fig.10

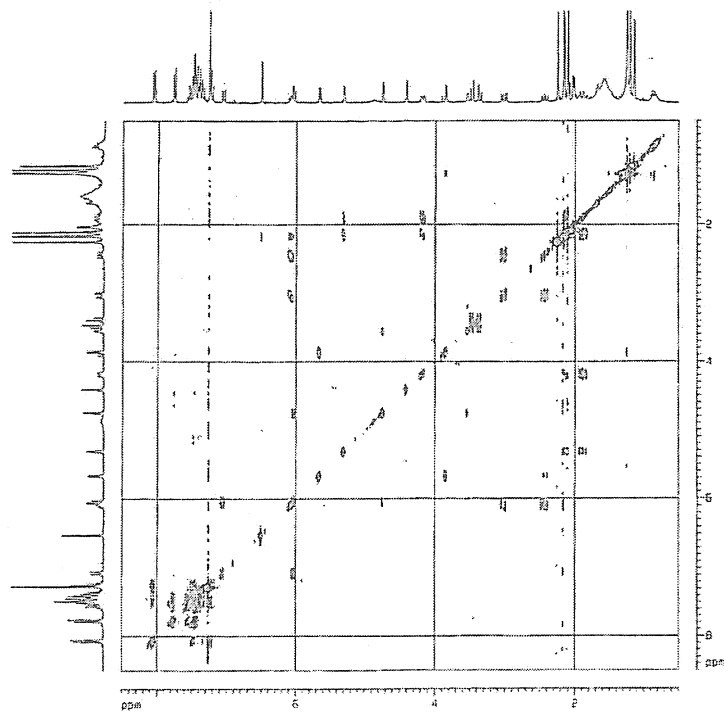


Fig.11

Paclitaxel-Hợp chất mở vòng oxetan (Hợp chất A) HMBC α Al₂O₃/H₂O