



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

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

(11)



1-0024609

(51)⁷ C07F 9/10

(13) B

(21) 1-2017-00034

(22) 09/06/2015

(86) PCT/IB2015/054346 09/06/2015

(87) WO2015/189766 17/12/2015

(30) MI2014A001053 10/06/2014 IT

(45) 27/07/2020 388

(43) 25/04/2017 349A

(73) CHEMI SPA (IT)

Via dei Lavoratori, 54, I-20092 Cinisello Balsamo, Milano, Italy

(72) DE FERRA, Lorenzo (IT); ANIBALDI, Mauro (IT); ZENONI, Maurizio (IT);
COCCHI, Fabrizio (IT).

(74) Công ty Luật TNHH WINCO (WINCO LAW FIRM)

(54) HỢP CHẤT L-ALPHA-GLYXEROPHOSPHORYLCHOLIN, QUY TRÌNH TINH CHẾ VÀ PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT CỦA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến quy trình tinh chế L- α -glyxerophosphorylcholin, trong đó hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin được kết tinh ra khỏi DMSO hoặc ra khỏi hỗn hợp của DMSO với ít nhất một dung môi khác, tốt hơn là dung môi này được chọn từ nước, rượu, dung môi halogen hóa, ete, este và/hoặc amit. Quy trình này cho phép thu được hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin có độ tinh khiết lớn hơn 99,5%, tốt hơn là lớn hơn 99,7%, đặc biệt tốt hơn nữa là lớn hơn hoặc bằng 99,9%.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp xác định độ tinh khiết của hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin, bao gồm bước rửa giải hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin bằng cột HPLC có pha tĩnh là amin, và sau đó phát hiện chính hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin, và tạp chất bất kỳ của nó, bằng cách sử dụng thiết bị phát hiện sự tán xạ ánh sáng bay hơi.

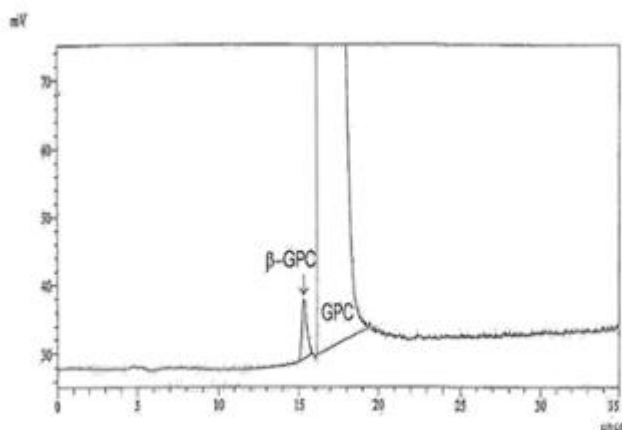


Fig 2

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin, quy trình tinh chế hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin này cho phép thu được hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin có độ tinh khiết cao và phương pháp xác định độ tinh khiết của hợp chất này.

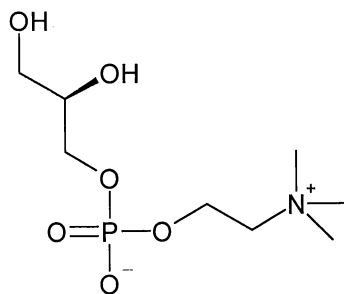
Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các xu hướng kinh tế và nhân khẩu học hiện nay dẫn đến sự lão hóa chung ở người và hiện tượng này rất phổ biến ở các nước giàu trên thế giới.

Do đó, sự suy giảm khả năng chống lão hóa ở người đã trở thành vấn đề rất quan trọng, và nhu cầu về phương pháp nhận biết giúp làm chậm sự suy giảm này ngày càng gia tăng.

Cụ thể, sự suy giảm khả năng về mặt tinh thần là một trong số các hậu quả tiêu cực nhất của sự lão hóa, và đã có nhiều nỗ lực nghiên cứu nhằm tìm ra các liệu pháp hữu hiệu để chống lại sự lão hóa.

Trong lĩnh vực này, một trong số các sản phẩm quan tâm nhất là L- α -glyxerophosphorylcholin (L- α -glycerophosphorylcholine: GPC) có cấu trúc được thể hiện dưới đây.

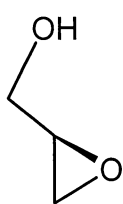


GPC có ứng dụng đã được biết rõ là dùng làm chất điều trị trong lĩnh vực rối loạn nhận thức, và hợp chất này được sử dụng trên khắp thế giới do hiệu quả của nó đã được khẳng định rộng rãi trong thực hành y học và trong nhiều thử nghiệm lâm sàng.

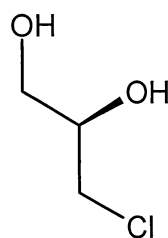
Các phương pháp điều chế GPC có thể được chia thành hai nhóm chính: nhóm thứ nhất là các phương pháp dựa trên phản ứng loại nhóm axetyl của phosphatidylcholin có nguồn gốc tự nhiên, và nhóm thứ hai là các phương pháp trong đó GPC được tổng hợp từ nguyên liệu là các hợp chất trung gian có bán trên thị trường.

Các phương pháp thuộc loại thứ nhất có ưu điểm là sử dụng các sản phẩm như lexitin đậu tương làm nguyên liệu, đã được sử dụng rộng rãi trong ngành thực phẩm và khác biệt ở chỗ, việc xử lý chúng không tạo ra nguy cơ cụ thể bất kỳ về độ an toàn.

Thay vào đó, các quy trình dựa trên phương pháp tổng hợp GPC có thể làm nảy sinh mối lo ngại về việc kiểm soát các chất được sử dụng và cụ thể là các tiền chất tổng hợp không đối xứng. Các chất này chủ yếu là R-glycidol và R-clopropandiol (có cấu trúc I và II tương ứng được thể hiện dưới đây) và trong cả hai trường hợp, chúng là các phân tử alkyl hóa có độc tính đáng kể. Do đó, rõ ràng là việc sử dụng chúng có thể gây ra mối nguy hiểm trong khi sử dụng và xử lý, và nguy hiểm hơn nữa khi sử dụng GPC thu được từ các phương pháp này trong trường hợp có mặt dư lượng của nó hoặc các chất khác (ví dụ, các hợp chất trung gian hoặc sản phẩm phụ) vẫn duy trì độc tính của chúng.



I



II

Bất kể phương pháp điều chế GPC nào được sử dụng, phần liên quan đến việc tinh chế và tách nó sẽ có ảnh hưởng đáng kể đến chất lượng sản phẩm, cụ thể là độ tinh khiết hóa học của nó có thể ảnh hưởng đến độc tính và profin điều trị của nó. Độ tinh khiết này đã được xác định theo cách truyền thống bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (Thin Layer Chromatography: TLC). Phương pháp phân tích này có đặc tính linh hoạt tốt và cho phép đánh giá mẫu một cách tổng thể, do tất cả các thành phần từ thành phần có tính phân cực lớn nhất đến thành phần có tính phân cực nhỏ nhất đều

có thể quan sát được đồng thời. Tuy nhiên, kỹ thuật phân tích này không hoàn toàn thỏa đáng về việc xác định định lượng của tạp chất bất kỳ và sự tách các chất có dấu hiệu cấu trúc tương tự nhau, ví dụ như các chất đồng phân có độ phân cực tương đương.

HPLC là kỹ thuật phân tích thường được chọn nhiều nhất để khắc phục các nhược điểm của phương pháp TLC này; tuy nhiên, trong trường hợp GPC, việc sử dụng HPLC khó khăn hơn phương pháp thông thường do chất phân tích có tính phân cực cao, điều này làm hạn chế sự tương tác với các pha tĩnh và sự không có mặt của các nhóm mang màu để có thể sử dụng thiết bị phát hiện tia tử ngoại, nghĩa là thiết bị phổ biến trong các phòng thí nghiệm kiểm soát chất lượng. Các phương pháp đã công bố không thỏa đáng về độ nhạy và hình dạng của các tín hiệu sắc ký có đỉnh rộng hoặc đỉnh không đối xứng; trong các điều kiện này, có sự giảm khả năng tách và có nguy cơ xuất hiện các tín hiệu tương ứng với một số chất bị lẫn trong các tín hiệu sắc ký khác, điều này dẫn đến làm mất khả năng biểu hiện sự có mặt của tạp chất bất kỳ. Ví dụ, xem các tài liệu: J.Am.Oil Chem.Soc (2012) 89:1155-1163; Talanta (2012) 94:22-29; Journal of Chromatography A (2012) 1220:108-114. Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2012/244583 bộc lộ phương pháp điều chế hợp chất L-[alpha]-glyxerylphosphorylcholin với hiệu suất cao và độ tinh khiết đến 99,8%. Tình trạng này có liên quan chặt chẽ với các hướng dẫn hiện hành trong lĩnh vực dược phẩm cung cấp phần mô tả chi tiết của các protein tạp chất trong quá trình sản xuất hoạt chất được dự định dùng cho người.

Do đó, sự phát triển các kỹ thuật phân tích mới để xác định chất lượng của các chế phẩm khác nhau chứa GPC là vấn đề quan trọng hàng đầu và trong trường hợp các kỹ thuật phân tích này được quan tâm về sự có mặt các tạp chất trong chế phẩm chứa GPC, việc xác định tiêu chuẩn mới về độ tinh khiết của GPC và các phương pháp tinh chế mới để có thể sản xuất GPC theo các tiêu chuẩn chất lượng hiện hành.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một mục đích của sáng chế là đề xuất quy trình tinh chế hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin, trong đó hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin được kết

tính ra khỏi DMSO hoặc ra khỏi hỗn hợp của DMSO với ít nhất một dung môi khác, tốt hơn là dung môi này được chọn từ nước, rượu, dung môi halogen hóa, ete, este và/hoặc amit.

Quy trình trên đây cho phép thu được hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin, cũng là một mục đích của sáng chế, có độ tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 99,9%; cụ thể, quy trình này cho phép thu được GPC có tỷ lệ lẫn tạp chất là chất đồng phân β -GPC của nó với tỷ lệ nhỏ hơn 0,1% và/hoặc lẫn tạp chất là các hợp chất cGP vòng với tỷ lệ nhỏ hơn 0,1%.

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất phương pháp xác định độ tinh khiết của hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin bao gồm bước rửa giải hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin bằng cột HPLC có pha tĩnh là amin, và sau đó phát hiện chính hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin và tạp chất bất kỳ của nó, bằng thiết bị phát hiện sự tán xạ ánh sáng bay hơi (Evaporative Light Scattering Detector: ELSD).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 là phổ sắc ký HPLC của GPC thu được bằng quy trình 1 được phát hiện bằng thiết bị ELSD.

Fig.2 là phổ sắc ký HPLC của GPC thu được từ ví dụ 2 được phát hiện bằng thiết bị ELSD.

Fig.3 là phổ sắc ký HPLC của GPC thu được từ ví dụ 1 (ví dụ so sánh) được phát hiện bằng thiết bị ELSD.

Fig.4 là phổ ^{31}P -NMR của GPC thu được bằng quy trình 2.

Fig.5 là phổ ^{31}P -NMR của GPC thu được từ ví dụ 3.

Fig.6 là phổ sắc ký HPLC của GPC thu được bằng quy trình 1 được phát hiện bằng thiết bị ELSD.

Fig.7 là phổ sắc ký HPLC của GPC thu được từ ví dụ 3 được phát hiện bằng thiết bị ELSD.

Fig.8 là phổ sắc ký HPLC của GPC thu được bằng quy trình 3 được phát hiện bằng thiết bị ELSD.

Fig.9 là phổ sắc ký HPLC của GPC thu được từ ví dụ 4 được phát hiện bằng thiết bị ELSD.

Fig.10 là phổ sắc ký HPLC của GPC thu được từ ví dụ 5 (ví dụ so sánh) được phát hiện bằng thiết bị ELSD.

Fig.11 là phổ sắc ký HPLC của GPC thu được bằng quy trình 4 được phát hiện bằng thiết bị ELSD.

Fig.12 là phổ sắc ký HPLC của GPC thu được từ ví dụ 6 được phát hiện bằng thiết bị ELSD.

Fig.13 là phổ sắc ký HPLC của GPC thu được từ ví dụ 7 (ví dụ so sánh) được phát hiện bằng thiết bị ELSD.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các tác giả sáng chế đã bất ngờ phát hiện được rằng phương pháp phân tích GPC bằng HPLC có thể khắc phục được các vấn đề đã mô tả trên đây bằng cách sử dụng loại cột sắc ký HPLC trên amin thích hợp, nghĩa là loại cột trong đó nhóm chức amin được liên kết với bề mặt của pha tĩnh. Một số cột thuộc loại này có bán trên thị trường bao gồm: ví dụ, Supelcosil™ LC-NH₂, Hypersil Gold™ amino, Zorbax® NH₂, YMC™ Polyamin II, Nucleosil® NH₂, Luna® NH₂. Pha tĩnh có thể bao gồm các hạt chất mang, ví dụ như, silic oxit, có lớp phủ gồm lớp phủ polyme chứa các nhóm amin, tốt hơn nếu là các nhóm amin bậc hai và amin bậc ba. Phần mô tả pha tĩnh của loại này đã được thông báo ở trang 22 và 23 của tài liệu “HPLC Columns YMC Classics”, của YMC Europe GmbH. Đồng thời, loại thiết bị phát hiện sự tán xạ ánh sáng bay hơi (ELSD) sẽ cần được sử dụng.

Các thiết bị phát hiện này được mô tả, ví dụ trong tài liệu Anal.Chem (1997) 69:561A-563A và Bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US6229605. Đây là các công cụ trong đó chất rửa giải được chuyển vào buồng làm bay hơi mà ở đó dung môi được làm bay hơi để còn lại các hạt mẫu nhỏ dạng sương mù tán xạ chùm ánh sáng. Mức độ đáp ứng với thiết bị phát hiện này tỷ lệ với mức độ khuếch tán, mức độ khuếch tán lại phụ thuộc vào lượng mẫu có mặt; hệ thống này làm cho có thể phát hiện các hợp chất không có nhóm mang màu như GPC, trong khi cũng không sử dụng các phương pháp giải hấp bằng dung môi có thành phần không đổi.

Với sự kết hợp pha tĩnh và thiết bị phát hiện này, nhiều dung môi rửa giải khác nhau có thể được sử dụng, cụ thể là các hệ thích hợp gồm các hệ dung dịch đậm trong nước, ví dụ như dung dịch đậm amoni axetat, có thể trong hỗn hợp với các

dung môi hữu cơ, ví dụ như metanol và/hoặc axetonitril. Các hệ dung môi rửa giải này có thể được sử dụng theo chế độ có thành phần không đổi, nghĩa là bằng cách duy trì cùng dung môi rửa giải trong toàn bộ khoảng thời gian tiến hành sắc ký, hoặc chế độ gradien trong đó thành phần của dung môi rửa giải thay đổi trong quá trình sắc ký theo chương trình định trước. Việc tối ưu hóa phương pháp phân tích sẽ được thực hiện theo phần bộc lộ của các giải pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Do đó, mục đích của sáng chế là đề xuất phương pháp xác định độ tinh khiết của hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin bao gồm bước rửa giải hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin bằng cột HPLC có pha tĩnh là amin, và sau đó phát hiện chính hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin và tạp chất bất kỳ của nó, bằng thiết bị phát hiện sự tán xạ ánh sáng bay hơi.

Một hoặc nhiều pha rửa giải có thể bao gồm dung dịch nước, dung môi hữu cơ phân cực, hoặc hỗn hợp của chúng; tốt hơn nếu dung dịch nước có độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 6, đặc biệt tốt hơn là độ pH nằm trong khoảng từ 4 đến 5. Dung môi hữu cơ phân cực có thể là rượu có từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon, axetonitril, hoặc hỗn hợp của chúng; tốt hơn nếu rượu có từ 1 đến 4 nguyên tử là metanol.

Sự kết hợp này cho phép khắc phục nhược điểm của sự mở rộng đỉnh sắc ký tương ứng với GPC, và đồng thời cho phép tiến hành xác định nồng độ GPC với độ nhạy cao.

Đồng thời, đã phát hiện được rằng có thể phát hiện sự có mặt các hợp chất khác, thu được từ quá trình điều chế GPC từ lexitin đậu tương, trong chế phẩm GPC.

Trong số các hợp chất này, các hợp chất L- α -glyxerophosphoethanolamin (glycerophosphoethanolamine: GPE), đường và các chất tương tự của chúng, thu được từ sự có mặt của chúng, hoặc sự có mặt của một trong số các tiền chất của chúng, trong lexitin đậu tương được dùng làm nguyên liệu trong quá trình sản xuất GPC.

Nhờ việc thu được kết quả quan trọng này, mối quan tâm nhất là xác định phương pháp chọn lọc và có độ nhạy hơn so với các phương pháp đã biết, profin tạp chất, nếu có, trong các mẫu GPC thu được bằng các phương pháp sản xuất được phẩm thích hợp nhất dùng cho người.

Nhằm mục đích này, các quy trình bán tổng hợp dựa trên việc loại nhóm axyl

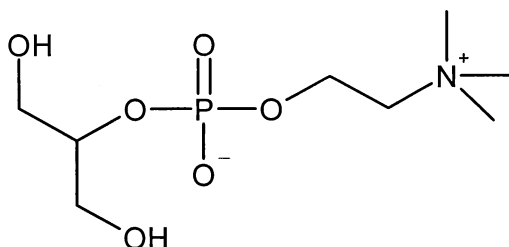
trong lexitin đậu tương được quan tâm đáng kể, là quy trình tổng hợp toàn phần được đánh giá là không thích hợp để sản xuất GPC dùng cho người, theo quan điểm về nguy cơ lẫn tạp chất là các nguyên liệu có độ độc cao như glycidol hoặc clopropandiol, là các chất được sử dụng trong quá trình này. Khi tính đến các chống chỉ định liên quan đến việc sản xuất GPC bằng con đường tổng hợp toàn phần nêu trên, mẫu GPC có nguồn gốc từ Trung Quốc, được sản xuất theo phương pháp này, được xem xét là phương pháp phân tích mới để đánh giá đầy đủ.

Các mẫu thu được từ quá trình bán tổng hợp được tạo ra theo các quy trình được thông báo trong Công bố đơn quốc tế số WO9013552 (cụ thể là trong phần Ví dụ 2) và Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP575717 (cụ thể là trong ví dụ 1) sau đây. Trong các tài liệu này, các quy trình dựa trên việc tinh chế GPC bằng nhựa trao đổi ion được thông báo, và chúng không liên quan đến sự kết tủa GPC dưới dạng sản phẩm cộng với cadimi clorua ($\text{GPC} \cdot \text{CdCl}_2$) và phương pháp sắc ký trên silic oxit; do đó, các phương pháp này tránh được việc sử dụng các muối cadimi độc và quy trình có năng suất thấp, có thể sử dụng trên thực tế để sản xuất GPC với quy mô lớn.

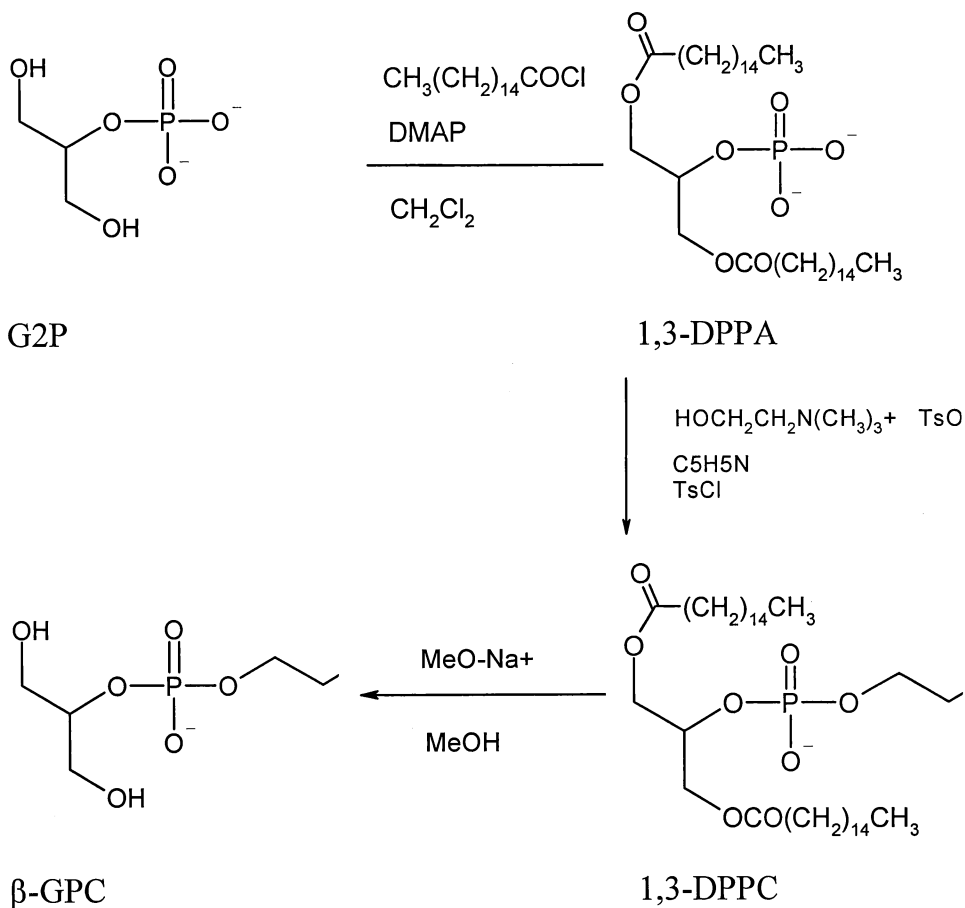
Các kết quả phân tích cho thấy sự có mặt của đỉnh trước khi rửa giải trong tất cả các mẫu và có thời gian lưu gần bằng thời gian lưu của GPC, có thời gian lưu tương đối (Relative Retention Time: RRT) bằng khoảng 0,94. Tín hiệu của cường độ đáng kể này không tương ứng với các chất được dự đoán hợp lý trong quá trình điều chế như glyxerol, GPE, axit glyxerophosphoric, hoặc sucroza.

Do đặc tính sắc ký của các chất mới phát hiện được rất giống với đặc tính của GPC, cho đến nay, các chất này vẫn không được chú ý và thậm chí mục đích của phương pháp HPLC mới theo sáng chế khác biệt rất ít với GPC, các tác giả sáng chế vẫn cho rằng nó tương ứng với chất đồng phân vị trí của chúng.

Cấu trúc hóa học của chất đồng phân beta của GPC (β -GPC) được thể hiện dưới đây.

 β -GPC

β -GPC không có bán trên thị trường và để kiểm tra xem β -GPC có thể là chất có thể phát hiện được bằng phương pháp mới hay không, quá trình tổng hợp nó được tiến hành theo sơ đồ được thể hiện dưới đây.



β -GPC thu được được phân tích bằng phương pháp NMR để khẳng định cấu trúc, và phân tích bằng phương pháp HPLC cho thấy rằng độ tinh khiết của nó không chỉ cao mà thời gian lưu nó còn tương đương với thời gian lưu của các hợp chất chưa biết được bộc lộ bằng cách phân tích các mẫu GPC khác nhau. Do đó, tín hiệu chưa biết có thể được cho là tương ứng với cấu trúc của β -GPC, và sự đánh giá này được khẳng định bằng các thử nghiệm HPLC “thêm chuẩn”, trong đó mẫu GPC cho thấy

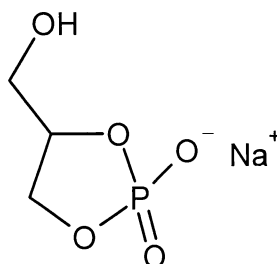
sự có mặt của các chất có RRT ở khoảng 0,94 trong HPLC, lượng hiệu chỉnh của β -GPC được thêm vào, quan sát được sự gia tăng tín hiệu tương ứng với RRT ở mức khoảng 0,94 mà không có sự phân tách của chúng.

Để khẳng định thêm thuộc tính cấu trúc, các thử nghiệm ^{31}P -NMR được thực hiện để cho phép xác định tín hiệu ở khoảng 0,6 ppm trong mẫu mà trong đó sự có mặt của các chất có RRT ở mức khoảng 0,94 là cao hơn.

Tín hiệu của β -GPC tổng hợp được theo sơ đồ đã thể hiện trên đây cho thấy mức giá trị tương đương.

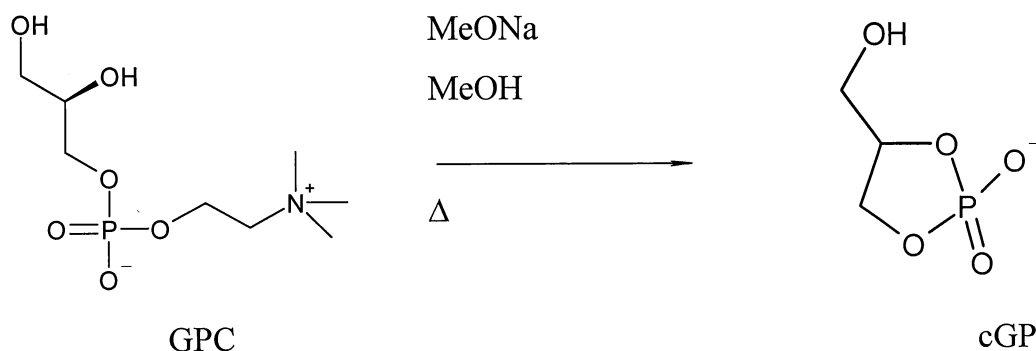
Do đó, phương pháp ^{31}P -NMR có thể là phương pháp thay thế cho phương pháp HPLC, tuy nhiên, do phương pháp này có độ nhạy thấp hơn và khả năng sử dụng trang thiết bị HPLC rộng hơn trong các phòng thí nghiệm kiểm soát chất lượng, mục đích của phương pháp HPLC theo sáng chế vẫn được ưu tiên để xác định các chất có RRT ở mức khoảng 0,94 (β -GPC).

Bằng phương pháp phân tích ^{31}P -NMR, có thể xác định phổ của sản phẩm thu được theo Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP575717 với tín hiệu bổ sung ở khoảng 18,4 ppm. Các giá trị này là tương đương với giá trị của hợp chất phosphat vòng cGP, được thể hiện dưới đây dưới dạng muối natri.



cGP (muối natri)

Có thể dự đoán được sự tạo ra hợp chất phosphat vòng này trong điều kiện tách GPC theo phương pháp của Bằng độc quyền sáng chế châu Âu số EP575717. Để chứng minh cho giả thuyết này, mẫu xác thực của cGP được điều chế theo sơ đồ được thể hiện dưới đây.



Tiến hành phân tích sản phẩm này bằng phương pháp ^{31}P -NMR để khẳng định sự phân định, cho thấy tín hiệu tương tự ở khoảng 18,4 ppm và không có sự phân tách tín hiệu trong các thử nghiệm thêm chuẩn thích hợp.

Dựa vào sự phát hiện được với các phương pháp phân tích mới là một phương án của sáng chế, các tác giả sáng chế đã khẳng định được bằng thử nghiệm việc các phương pháp tinh chế bằng GPC đã biết có loại bỏ thích hợp các tạp chất đáng kể hay không.

Với các lý do đã thể hiện trên đây, loại trừ phương pháp tinh chế bằng cách tạo phức với cadimi clorua và sắc ký trên silic oxit, các tác giả sáng chế đã xác định được phương pháp kết tinh ra khỏi etanol là phương pháp tốt nhất về khả năng áp dụng công nghiệp, trong số các phương pháp đã được thông báo trong các tài liệu đã biết (ví dụ, xem Công bố đơn quốc tế số WO9013552).

Mẫu thu được theo phương pháp của Công bố đơn quốc tế số WO9013552 được kết tinh ra khỏi etanol, nhưng phương pháp phân tích HPLC cho thấy rằng việc tinh chế này chỉ có hiệu quả một phần, với lượng đáng kể của chất đồng phân beta vẫn có mặt trong sản phẩm (0,48%).

Bảng 1 dưới đây thể hiện tóm tắt kết quả phân tích các mẫu GPC thu được bằng các phương pháp điều chế khác nhau.

Bảng 1

Mẫu	Quy trình điều chế	β -GPC (tỷ lệ % diện tích theo HPLC)	cGP (tỷ lệ % diện tích theo ^{31}P -NMR)	Ghi chú
Quy trình 1	WO9013552	0,8%		
Quy trình 2	EP575717	0,1%	0,2%	
Ví dụ 1 (Ví dụ so sánh)		0,48%		Kết tinh mẫu thu được từ quy trình 1 ra khỏi etanol
GPC có bán trên thị trường	Tổng hợp	1,8%		GPC có bán trên thị trường được sản xuất ở Trung Quốc. Một số tạp chất khác có mặt với tổng lượng 3% theo tỷ lệ % diện tích xác định được bằng phương pháp HPLC

Hệ mới để tinh chế GPC đã được xác định và việc tìm ra hệ này cũng là một phương án của sáng chế.

Phương pháp tinh chế mới dựa trên việc sử dụng dimetyl sulfoxit (dimethyl sulfoxide: DMSO). Để thực hiện sáng chế, dung môi này có thể được sử dụng trong các điều kiện khác nhau và với tỷ lệ định lượng với GPC cần được tinh chế khác nhau.

Theo phương án này của sáng chế, ngoài DMSO, các dung môi khác có thể có mặt như dung môi phân cực, dung môi có tính phân cực trung bình hoặc dung môi không phân cực. Các dung môi bổ sung này có thể thuộc về nhóm các dung môi khác, ví dụ như, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung môi halogen hóa, rượu, ete, este và amit.

Ví dụ về các dung môi có thể được sử dụng để thực hiện sáng chế bao gồm,

nhưng không chỉ giới hạn ở, nước, metanol, etanol, isopropanol, n-butanol, metylen clorua, tetrahydrofuran, etyl axetat, và DMF.

Theo sáng chế, DMSO được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 100 phần thể tích cho một phần trọng lượng của hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 3 đến 70, tốt hơn nữa nếu tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 4 đến 30, tốt hơn nữa nếu tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 5 đến 15 phần thể tích cho một phần trọng lượng của hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, dung môi bất kỳ hoặc các dung môi bổ sung bất kỳ được sử dụng với lượng sao cho tỷ lệ theo thể tích của nó so với DMSO nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10, tốt hơn là tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 0,05 đến 5, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1.

Tùy thuộc vào các thông số của quy trình, có thể thu được sự kết tinh thích hợp của GPC, hoặc sự tinh chế các tinh thể GPC chứa tạp chất cũng có thể được thực hiện bằng cách tạo huyền phù chúng trong DMSO, bằng cách sử dụng tổ hợp thích hợp của thời gian và nhiệt độ, và sau đó tách các tinh thể ra khỏi pha lỏng; trong trường hợp này, các dung môi khác cũng có thể có mặt kết hợp với DMSO.

Quá trình tinh chế có thể được thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau; như thường lệ, có thể thuận tiện nếu chọn các nhiệt độ khác nhau trong các giai đoạn khác nhau của quá trình tinh chế, có nhiệt độ thấp hơn trong pha tách cuối của GPC.

Các nhiệt độ thích hợp để tiến hành việc tinh chế có thể nằm trong khoảng từ 100°C đến 0°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 70°C đến 5°C, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 50°C đến 15°C.

Khi chọn nhiệt độ, sẽ tốt hơn nếu tính đến nhiệt độ đông đặc của DMSO, nhiệt độ này có thể thay đổi, chủ yếu phụ thuộc vào sự có mặt của các dung môi bổ sung, và nồng độ của GPC và các hợp chất khác có mặt.

Để tách GPC, thiết bị đã biết với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể được sử dụng như các hệ thống ly tâm hoặc lọc, kín hoặc hở. Các tinh thể có thể được rửa trực tiếp bằng cách sử dụng chính dung môi hoặc chính hỗn hợp của các dung môi, được dùng để tinh chế; theo cách khác, để rửa sản phẩm, các dung môi hoặc hỗn hợp dung môi không phải các dung môi được sử dụng trong bước kết tinh hoặc bước tạo huyền phù có thể được sử dụng.

Tỷ lệ của DMSO cần được sử dụng so với lượng GPC được sử dụng trong quá trình tinh chế theo mục đích của sáng chế có thể thay đổi đáng kể, và có thể được lựa chọn thuận tiện theo phân bố lộ của các giải pháp đã biết. Trên thực tế, để không làm giảm thêm hiệu suất cần thiết của quy trình, có lợi nếu không sử dụng quá nhiều DMSO và mặt khác, lượng này cần không bị giảm quá mức để tránh gây khó khăn trong việc tách sản phẩm đã kết tinh. Tỷ lệ của DMSO với GPC nằm trong khoảng từ 2 đến 100 phần thể tích (lít)/phần trọng lượng (kg) được cho là thuận tiện cho phương án này, tốt hơn nữa nếu tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 3 đến 70, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 4 đến 30, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng từ 5 đến 15 phần thể tích theo phần trọng lượng của GPC.

Cách đặc biệt có lợi để tiến hành sáng chế là kết tinh GPC ra khỏi các dung dịch của nó trong nước hoặc hỗn hợp dung môi. Bằng cách cho thêm DMSO vào các dung dịch này, đã phát hiện được rằng các dung dịch ổn định trong khoảng thời gian đủ để tiến hành các bước chưng cất mà GPC không bị kết tủa đồng thời. Việc tận dụng điểm sôi của DMSO cao hơn so với các dung môi khác thường được sử dụng, do đó có thể cải biến, mà không bị ảnh hưởng do sự kết tủa đồng thời sản phẩm gây ra, chế phẩm chứa hỗn hợp các dung môi được sử dụng để tiến hành kết tinh.

Khi chế phẩm chứa hỗn hợp các dung môi được tạo ra, có thể làm kết tinh GPC bằng cách cho thêm phần phân ước của GPC kết tinh, là chất sẽ có tác dụng làm chất khơi mào. Lựa chọn này dường như là không cần thiết; khi cần sử dụng nó, mẫu chứa các tinh thể GPC có thể được sử dụng làm chất khơi mào sẽ không cần có độ tinh khiết đặc biệt cao, do không quan sát được mối liên quan chặt chẽ giữa loại chất khơi mào được sử dụng và loại tinh thể GPC được tách khi kết thúc quá trình tinh chế.

Đã bất ngờ quan sát được các quá trình tinh chế bằng cách sử dụng DMSO cho phép thu được GPC với độ tinh khiết cao, ngay cả khi các chế phẩm chứa lượng đáng kể của các hợp chất phân tử khác, kể cả các loại đã được mô tả trước đây.

Cụ thể, khả năng của hệ tinh chế của sáng chế loại bỏ chất đồng phân beta của GPC dường như là đáng kể và không đoán trước được, do nó có các đặc tính lý-hóa học rất giống với đặc tính này của các sản phẩm mà quá trình tách chúng mong muốn có độ tinh khiết ở mức cao.

Khác với quá trình kết tinh ra khỏi etanol, cũng đã phát hiện được rằng

phương pháp tinh chế theo sáng chế cho phép tinh chế GPC ra khỏi một số hợp chất thường phát hiện được trong chế phẩm GPC thu được từ lexitin.

Cụ thể, đã phát hiện được trong các phương án của sáng chế là có thể loại bỏ hữu hiệu các tạp chất của GPC như sucroza và GPE.

Bảng 2 dưới đây thể hiện tóm tắt các kết quả chính đạt được trong các thử nghiệm này so với các kết quả thu được liên quan đến các thử nghiệm so sánh được thực hiện bằng cách sử dụng etanol làm dung môi kết tinh.

Bảng 2

Ví dụ	Dung môi kết tinh	Các tạp chất có mặt trong GPC được sử dụng làm mẫu thử nghiệm		Hàm lượng tạp chất còn dư trong GPC kết tinh (tỷ lệ % diện tích theo HPLC)	Ghi chú
		Tạp chất	Hàm lượng (tỷ lệ % diện tích theo HPLC)		
1 (so sánh)	Etanol	β -GPC	0,8%	0,48%	Kết tinh GPC thu được bằng quy trình 1
2	DMSO	β -GPC	0,8%	0,16%	Kết tinh GPC thu được bằng quy trình 1
3	DMSO	β -GPC	0,1%	<0,01%	Kết tinh GPC thu được bằng quy trình 2
		cGP	0,2%*	<0,01%*	
4	DMSO	GPE	0,2%	<0,01%	Kết tinh GPC thu được bằng quy trình 3
5 (so	Etanol	GPE	0,2%	0,02%	Kết tinh GPC thu

sánh)					được bằng quy trình 3. Hiệu suất thấp.
6	DMSO	Sucroza	2%	<0,01%	Kết tinh GPC thu được bằng quy trình 4.
7 (so sánh)	Etanol	Sucroza	2%	0,14%	Kết tinh GPC thu được bằng quy trình 4. Hiệu suất thấp
*Phương pháp ^{31}P -NMR					

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 2 cho thấy rõ tính hữu dụng của các phương án của sáng chế trong việc tinh chế GPC. Về mặt này, cần lưu ý rằng việc thực hiện sáng chế chứng minh, như được thể hiện trong Ví dụ 6, khả năng kết tinh GPC cùng với sự có mặt của đường, trong trường hợp này là sucroza, và có thể đạt được hiệu suất tinh chế cao ngay cả trong các trường hợp này. Trái lại, việc kết tinh GPC ra khỏi etanol thường không cho phép loại bỏ thỏa đáng sucroza.

Ngoài ra, GPC, và ngay cả trong trường hợp sử dụng đường như sucroza có hoạt tính lớn hơn, có tác dụng làm chất ức chế sự kết tinh khi etanol được dùng làm dung môi kết tinh; do đó, trong các trường hợp này, hiệu suất kết tinh thấp tới mức làm cho quy trình này không thực tế khi áp dụng để sản xuất GPC trong công nghiệp.

Phương án khác của sáng chế là GPC có độ tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 99,9%.

Dấu hiệu cụ thể được thể hiện bằng tỷ lệ lẫn tạp chất là chất đồng phân β -GPC của nó ở mức nhỏ hơn 0,1%, và tỷ lệ lẫn tạp chất của GPC là các hợp chất cGP vòng ở mức nhỏ hơn 0,1%.

Theo các mục đích của sáng chế, độ tinh khiết đã nêu trên đây được tính theo tỷ lệ % diện tích với phương pháp HPLC và/hoặc ^{31}P -NMR và tốt hơn là với các

phương pháp HPLC và/hoặc ^{31}P -NMR được mô tả và ví dụ tương ứng trong các ví dụ 8 và 9.

Các ví dụ sau đây được đưa ra nhằm minh họa một số phương án của sáng chế mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế theo cách bất kỳ.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Quy trình 1

Điều chế GPC theo Ví dụ 2 của Công bố đơn quốc tế số WO9013552

Cho 500ml metanol vào 125g lexitin đậu tương và tiếp tục khuấy cho đến khi hòa tan hoàn toàn. Cho thêm 20ml natri metylat 30% trong metanol.

Tiếp tục khuấy ở nhiệt độ trong phòng trong 3 giờ. Sau khi lọc, rửa phần cặn bằng metanol (3 x 10ml). Trung hòa phần nước lọc (độ pH = khoảng 6) bằng axit axetic băng, sau đó cô dung dịch này đến thể tích cuối bằng khoảng 125ml, pha dầu phía trên được tách ra. Pha phía dưới đã làm giàu được rửa giải trên cột chứa 140ml nhựa Amberlyst 15 (ở dạng axit) được cho vào metanol.

Việc rửa giải được tiếp tục với 375ml metanol, sau đó là 300ml nước.

Dung dịch nước rửa giải được rửa giải lần lượt trên ba cột sắc ký được chuẩn bị: cột thứ nhất chứa 30ml nhựa IR 93 ở dạng OH⁻ trong nước, cột thứ hai chứa 30ml nhựa IR 401 ở dạng OH⁻ trong nước, cột thứ ba chứa 12ml nhựa IRC 50 ở dạng axit trong nước.

Nước rửa giải cuối được cô đến khi tạo thành chất lỏng nhớt với hàm lượng nước bằng 15%.

Phương pháp phân tích HPLC bằng thiết bị ELSD cho thấy hàm lượng của β -GPC bằng 0,8% (tỷ lệ % diện tích).

Quy trình 2

Điều chế GPC theo Ví dụ 1 của Bằng độc quyền sáng chế châu Âu EP575717

Hòa tan 200g phân đoạn giàu phosphatidylcholin được mua trên thị trường bằng cách chiết lexitin đậu tương được hòa tan trong 600ml metanol. Dung dịch thu được được rửa giải trên cột sắc ký chứa nhựa Duolite A 147 ở dạng bazơ, trong metanol. Sau khi nạp dung dịch đã làm giàu, việc giải hấp GPC được kết thúc bằng metanol. Nước giải hấp được làm trung hòa bằng axit axetic và cô đến thể tích còn

lại bằng 300ml để thu được sự tạo lớp rõ ràng của hai pha. Pha phía dưới đã làm giàu được tách ra, pha loãng bằng metanol, và chiết hai lần bằng 200ml n-heptan.

Cho thêm 800ml n-butanol vào pha phía dưới đã làm giàu, và dung dịch này được cô đến thể tích cuối bằng khoảng 300ml, làm lạnh đến nhiệt độ $\sim 5^{\circ}\text{C}$, và lọc. Các tinh thể GPC được hòa tan trong 30ml nước đã loại khoáng, và dung dịch này được cô đến khi tạo thành chất lỏng nhớt có hàm lượng nước cuối bằng 15%.

Phân tích HPLC bằng thiết bị ELSD cho thấy hàm lượng β -GPC bằng 0,1% (tỷ lệ % diện tích).

Phân tích bằng phổ ^{31}P -NMR cho thấy hàm lượng cGP bằng 0,2% (tỷ lệ % diện tích).

Quy trình 3

Điều chế GPC có lẫn tạp chất GPE

Cho thêm GPE ở dạng tinh thể vào dung dịch chứa GPC trong nước, dung dịch này được cô đến khi thành chất lỏng nhớt có hàm lượng nước còn lại bằng 15%.

Phân tích HPLC bằng thiết bị ELSD cho thấy hàm lượng GPE bằng 0,2% (theo tỷ lệ % diện tích).

Quy trình 4

Điều chế GPC có lẫn tạp chất sucroza

Cho thêm sucroza ở dạng tinh thể vào dung dịch chứa GPC trong nước, dung dịch này được cô đến khi thành chất lỏng nhớt có hàm lượng nước còn lại bằng 15%.

Phân tích HPLC bằng thiết bị ELSD cho thấy hàm lượng sucroza bằng 2% (theo tỷ lệ % diện tích).

Ví dụ 1 (so sánh)

Tinh chế GPC thu được bằng quy trình 1 bằng cách kết tinh ra khỏi etanol

Hòa tan 2,5g GPC ở dạng chất lỏng nhớt (thu được bằng quy trình 1) trong 5ml etanol trong khi khuấy ở nhiệt độ $\sim 50^{\circ}\text{C}$. Làm lạnh dung dịch này xuống nhiệt độ $\sim 10^{\circ}\text{C}$ và khơi mào bằng vài tinh thể GPC, trong vài phút, quan sát thấy sự tạo ra chất kết tủa. Dung dịch này được làm lạnh xuống nhiệt độ $\sim 5^{\circ}\text{C}$ và duy trì hỗn hợp này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong khi khuấy trong 1,5 giờ, các tinh thể được lọc qua phễu Büchner, rửa bằng etanol. Sau khi làm khô trong chân không, thu được 1,4g GPC.

Phân tích HPLC bằng thiết bị ELSD cho thấy hàm lượng β -GPC bằng 0,48% (theo tỷ lệ % diện tích).

Ví dụ 2

Tinh chế GPC thu được bằng quy trình 1 bằng cách kết tinh ra khỏi DMSO

Cho 14ml DMSO vào 2,5g GPC ở dạng chất lỏng nhớt (thu được bằng quy trình 1), làm ấm hỗn hợp này đến nhiệt độ $\sim 50^{\circ}\text{C}$ kèm theo khuấy, tiếp đó làm nguội hỗn hợp xuống nhiệt độ $\sim 25^{\circ}\text{C}$ và khơi mào bằng vài tinh thể GPC. Duy trì hỗn hợp này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 25°C trong khi khuấy trong 16 giờ; trong thời gian này, quan sát thấy sự tạo thành chất kết tủa, các tinh thể được lọc qua phễu Büchner, rửa bằng etanol. Sau khi làm khô trong chân không, thu được 1,9g GPC.

Phân tích HPLC bằng thiết bị ELSD cho thấy hàm lượng β -GPC bằng 0,16% (tỷ lệ % diện tích).

Ví dụ 3

Tinh chế GPC thu được bằng quy trình 2 bằng cách kết tinh ra khỏi DMSO

Cho 60ml DMSO vào 11,2g GPC ở dạng chất lỏng nhớt (thu được bằng quy trình 2), làm ấm hỗn hợp này đến nhiệt độ $\sim 50^{\circ}\text{C}$ trong khi khuấy, tiếp đó làm nguội hỗn hợp xuống nhiệt độ $\sim 25^{\circ}\text{C}$ và khơi mào bằng vài tinh thể GPC. Duy trì hỗn hợp này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 25°C trong khi khuấy trong 16 giờ; trong thời gian này, quan sát được sự tạo thành chất kết tủa, các tinh thể được lọc qua phễu Büchner, rửa bằng etanol. Sau khi làm khô trong chân không, thu được 8,2g GPC.

Phân tích HPLC bằng thiết bị ELSD cho thấy không có mặt β -GPC

Phân tích bằng phổ ^{31}P -NMR cho thấy không có mặt cGP

Ví dụ 4

Tinh chế GPC (có lẫn tạp chất GPE) bằng cách kết tinh ra khỏi DMSO.

Cho 20ml DMSO vào 10,7g GPC ở dạng chất lỏng nhớt (thu được bằng quy trình 3), làm ấm hỗn hợp này đến nhiệt độ $\sim 70^{\circ}\text{C}$ trong khi khuấy, cho thêm 80ml DMSO vào, làm nguội hỗn hợp này xuống $\sim 25^{\circ}\text{C}$ và khơi mào bằng vài tinh thể GPC. Duy trì hỗn hợp này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 25°C kèm theo khuấy trong 16 giờ; trong thời gian này, quan sát thấy sự tạo ra chất kết tủa, các tinh

thể được lọc qua phễu Büchner, rửa bằng etanol. Sau khi làm khô trong chân không, thu được 8,7g GPC.

Phân tích HPLC bằng thiết bị bằng ELSD cho thấy không có mặt GPE

Ví dụ 5 (ví dụ so sánh)

Tinh chế GPC (có lẫn tạp chất GPE) bằng cách kết tinh ra khỏi etanol

Hòa tan 11,2g GPC ở dạng chất lỏng nhớt (thu được bằng quy trình 3) trong 20ml etanol trong khi khuấy ở nhiệt độ $\sim 45^{\circ}\text{C}$. Làm nguội dung dịch xuống nhiệt độ $\sim 5^{\circ}\text{C}$ và khơi mào bằng vài tinh thể GPC. Duy trì hỗn hợp này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong 3 giờ; trong thời gian này, quan sát được sự tạo thành chất kết tủa, các tinh thể được lọc qua phễu Büchner, rửa bằng etanol. Sau khi làm khô trong chân không, thu được 3,4g GPC.

Phân tích HPLC bằng thiết bị ELSD cho thấy hàm lượng GPE bằng 0,02% (theo tỷ lệ % diện tích).

Ví dụ 6

Tinh chế GPC (có lẫn tạp chất sucroza) bằng cách kết tinh ra khỏi DMSO

Cho 20ml vào 11g GPC ở dạng chất lỏng nhớt (thu được bằng quy trình 4), làm ấm hỗn hợp này đến nhiệt độ $\sim 70^{\circ}\text{C}$ trong khi khuấy, cho thêm 80ml DMSO vào, làm nguội hỗn hợp này xuống nhiệt độ $\sim 25^{\circ}\text{C}$; trong thời gian này, quan sát được sự tạo ra chất kết tủa. Duy trì hỗn hợp này ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 20°C đến 25°C kèm theo khuấy trong 16 giờ, các tinh thể được lọc qua phễu Büchner, rửa bằng etanol. Sau khi làm khô trong chân không, thu được 7,8g GPC.

Phân tích HPLC bằng thiết bị ELSD cho thấy không có mặt sucroza

Ví dụ 7 (ví dụ so sánh)

Tinh chế GPC (có lẫn tạp chất sucroza) bằng cách kết tinh ra khỏi etanol

Hòa tan 11,0g GPC ở dạng chất lỏng nhớt (thu được bằng quy trình 4) trong 20ml etanol trong khi khuấy ở nhiệt độ $\sim 45^{\circ}\text{C}$. Làm lạnh dung dịch này xuống nhiệt độ $\sim 5^{\circ}\text{C}$ và khơi mào bằng vài tinh thể GPC. Làm lạnh dung dịch xuống nhiệt độ $\sim 5^{\circ}\text{C}$ và duy trì ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 5°C trong khi khuấy trong 2,5 giờ; trong thời gian này, quan sát thấy sự tạo thành chất kết tủa. Các tinh thể được lọc qua phễu Büchner, rửa bằng etanol. Sau khi làm khô trong chân không, thu được 1,1g GPC.

Phân tích HPLC bằng thiết bị ELSD cho thấy hàm lượng sucroza bằng 0,14% (theo tỷ lệ % diện tích).

Ví dụ 8

Phân tích GPC bằng phương pháp HPLC sử dụng thiết bị ELSD.

Các thông số tiến hành:

Cột HPLC: YMC™ Polyamin II 250 x 4,6mm (5μm)

Nhiệt độ lò: 35°C

Tốc độ dòng: 0,7 ml/phút

Các pha rửa giải: Pha A: 85% (axetonitril 75%, metanol 25%)

15% (dung dịch đệm amoni axetat 50mM có độ pH =4,5)

Pha B: 65% (axetonitril 75%, metanol 25%)

35% (dung dịch đệm amoni axetat 50mM có độ pH =4,5)

Chương trình gradien

Số phút	Pha A %	Pha B %
0	98	2
5	98	2
27	2	98
32	2	98
33	98	2
45	98	2

Thiết bị phát hiện ELSD

Các thông số của thiết bị phát hiện: dòng nitơ =1,4 ml/phút; nhiệt độ =90°C; hệ số khuếch đại =1

Chuẩn bị mẫu: pha loãng các mẫu GPC đến nồng độ khoảng 20mg/ml trong metanol.

Thể tích bơm: 20-40μl

Ghi chú: quan sát được sự thay đổi giá trị ban đầu ở nhiệt độ trong phòng trong thời gian ~5 phút được thể hiện trong mẫu trống (không phải do các chất có mặt trong mẫu).

Trong bảng sau đây, các giá trị tham chiếu để giải hấp các chất quan tâm được

thể hiện.

Chất hóa học	Thời gian lưu (Retention Time: RT)	Thời gian lưu tương đối (Relative Retention Time: RRT) đối với GPC
GPC	~16,2 phút	1
β -GPC	~15,3 phút	~0,94
GPE	~31,5 phút	~1,94
sucroza	~22,0 phút	~1,36

Giới hạn phát hiện (limit of detection: LOD) của các tạp chất được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp này là nhỏ hơn 0,01% so với GPC

Ví dụ 9

Phân tích GPC bằng ^{31}P -NMR

Thiết bị: NMR Varian VXR-200 hoặc các thiết bị ít nhất là tương đương

Chuẩn bị mẫu: hòa tan 0,8g GPC cần được phân tích trong 0,8ml D_2O và nạp dung dịch này vào ống NMR

Nhiệt độ: nhiệt độ môi trường

Số lượng kết quả thu được: không nhỏ hơn 400

Trong bảng sau đây, các giá trị tham chiếu về sự dịch chuyển hóa học của các chất quan tâm được thể hiện.

Chất hóa học	Sự dịch chuyển hóa học ^{31}P -NMR (ppm)
GPC	-0,1
β -GPC	-0,6
GPE	0,4
cGP	18,4

Giới hạn phát hiện (limit of detection: LOD) của các tạp chất được phân tích bằng cách sử dụng phương pháp này là nhỏ hơn 0,01% so với GPC

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Quy trình tinh chế hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin, khác biệt ở chỗ, hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin được kết tinh ra khỏi DMSO hoặc hỗn hợp của DMSO với ít nhất một dung môi khác, và khác biệt ở chỗ, DMSO được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 2 đến 100 phần thể tích cho một phần trọng lượng của hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin.
2. Quy trình theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, ít nhất một dung môi khác nêu trên được chọn từ nước, rượu, dung môi halogen hóa, ete, este và/hoặc amit.
3. Quy trình theo điểm 2, khác biệt ở chỗ, rượu nêu trên là metanol, etanol, isopropanol và/hoặc n-butanol; dung môi halogen hóa nêu trên là metylen clorua; ete nêu trên là tetrahydrofuran; este nêu trên là etyl axetat; amit nêu trên là DMF.
4. Quy trình theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, DMSO được sử dụng với lượng nằm trong khoảng từ 5 đến 15 phần thể tích cho một phần trọng lượng của hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin.
5. Quy trình theo điểm 4, khác biệt ở chỗ, ít nhất một dung môi khác nêu trên được sử dụng với lượng sao cho tỷ lệ thể tích của nó với thể tích của DMSO nằm trong khoảng từ 0,01 đến 10, tốt hơn là tỷ lệ này nằm trong khoảng từ 0,1 đến 1.
6. Quy trình theo điểm 1, khác biệt ở chỗ, quá trình kết tinh nêu trên được tiến hành ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 0°C đến 100°C, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 15°C đến 50°C.
7. Hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin có độ tinh khiết lớn hơn hoặc bằng 99,9%.
8. Hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin có hàm lượng chất đồng phân β của nó và/hoặc hàm lượng của cGP thấp hơn 0,1%.

9. Phương pháp xác định độ tinh khiết của hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin bao gồm bước rửa giải hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin bằng cột HPLC có pha tĩnh là amin, và sau đó phát hiện chính hợp chất L- α -glyxerophosphorylcholin, và tạp chất có thể có bất kỳ của nó, bằng thiết bị phát hiện sự tán xạ ánh sáng bay hơi.
10. Phương pháp theo điểm 9, khác biệt ở chỗ, pha tĩnh nêu trên có các nhóm amin bậc hai và bậc ba.
11. Phương pháp theo điểm 9, khác biệt ở chỗ, pha tĩnh nêu trên gồm các hạt chất mang, tốt hơn nếu là silic oxit, có lớp phủ polyme chứa các nhóm amin, tốt hơn nếu là amin bậc hai và amin bậc ba.
12. Phương pháp theo điểm 9, khác biệt ở chỗ, các pha rửa giải gồm dung dịch nước, dung môi hữu cơ phân cực, hoặc hỗn hợp của chúng.
13. Phương pháp theo điểm 12, khác biệt ở chỗ, dung dịch nước nêu trên có độ pH nằm trong khoảng từ 3 đến 6, tốt hơn là nằm trong khoảng từ 4 đến 5.
14. Phương pháp theo điểm 12, khác biệt ở chỗ, dung môi hữu cơ phân cực nêu trên là rượu có từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon, axetonitril, hoặc hỗn hợp của chúng.
15. Phương pháp theo điểm 14, khác biệt ở chỗ, rượu có từ 1 đến 4 nguyên tử cacbon nêu trên là metanol.

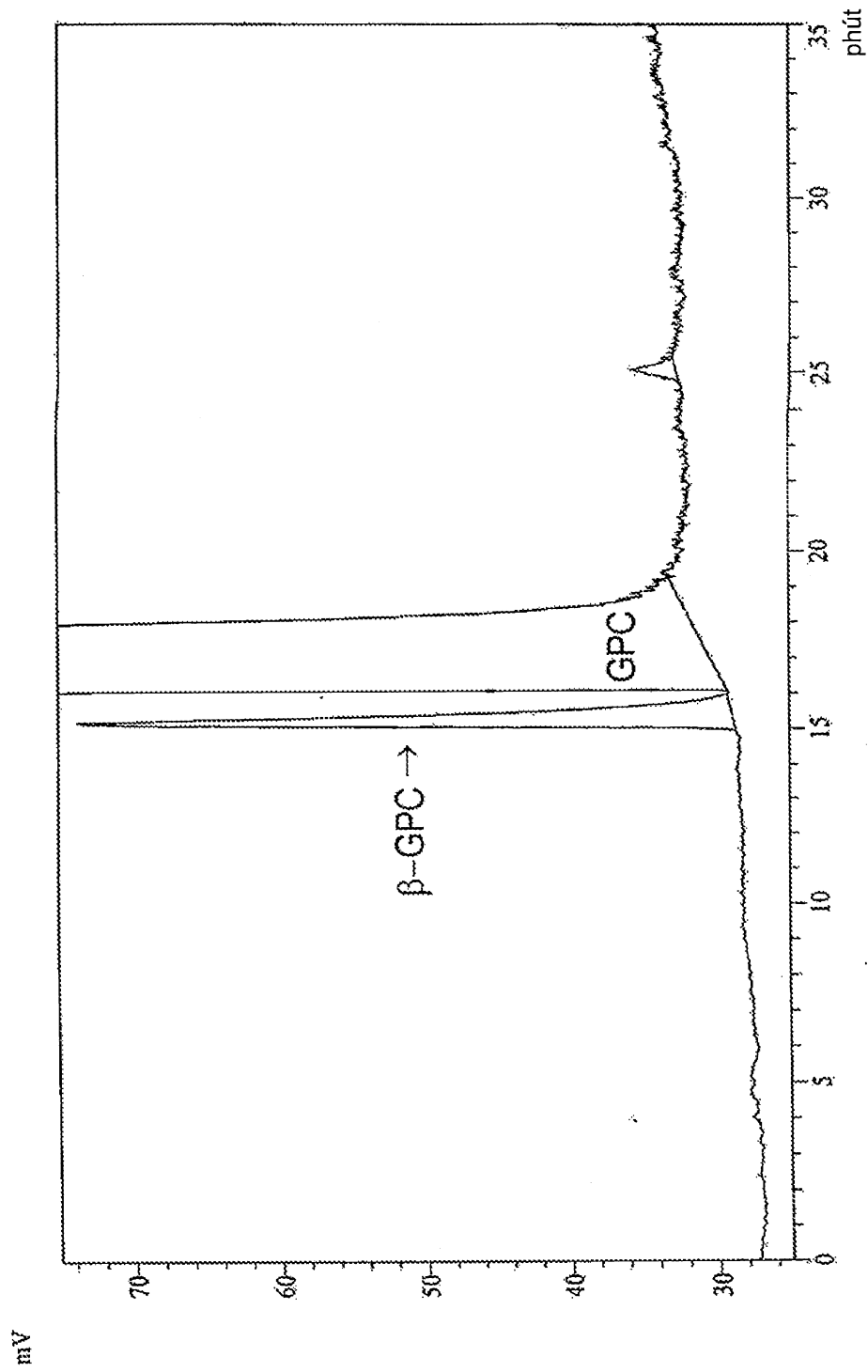


Fig.1

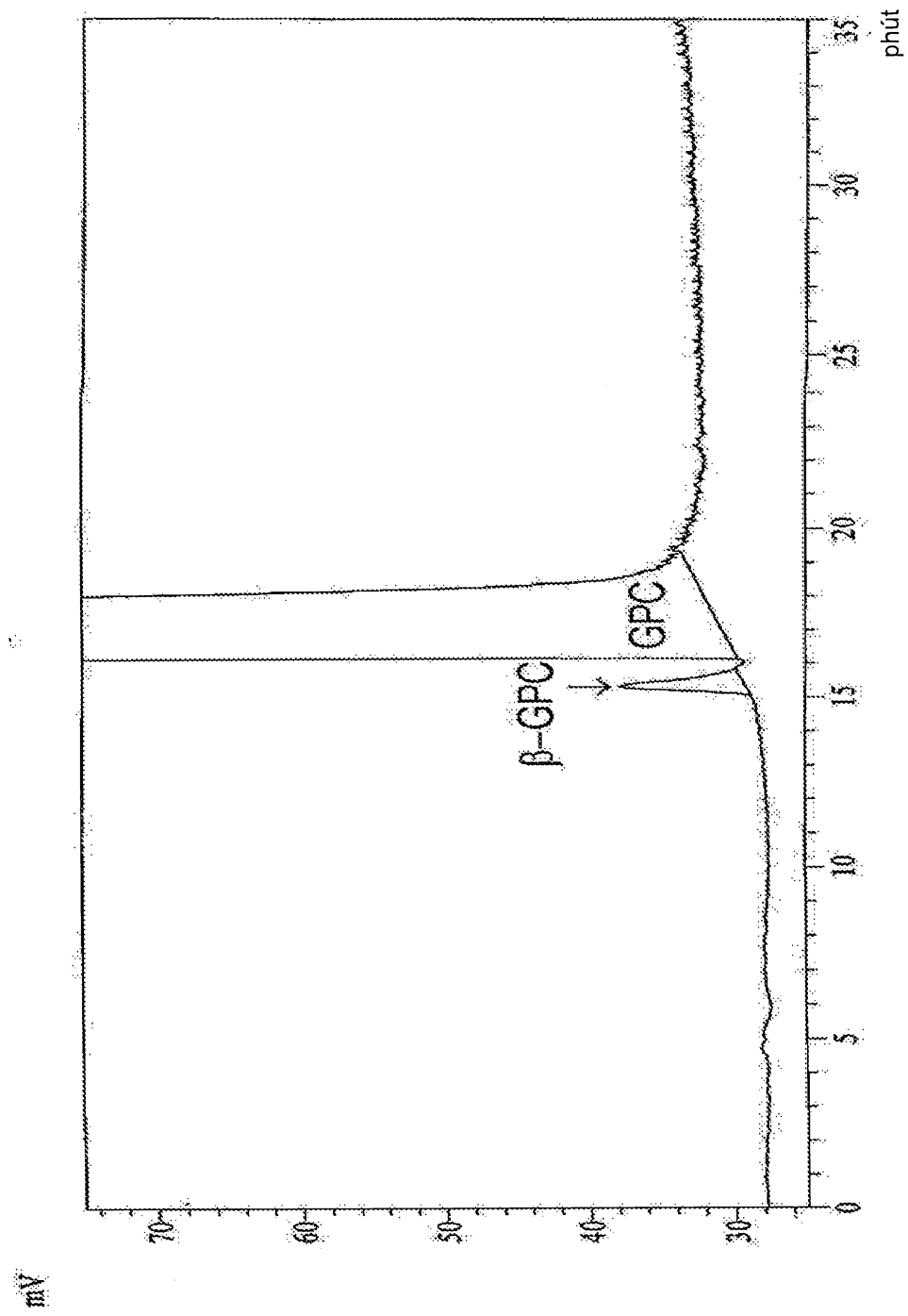


Fig.2

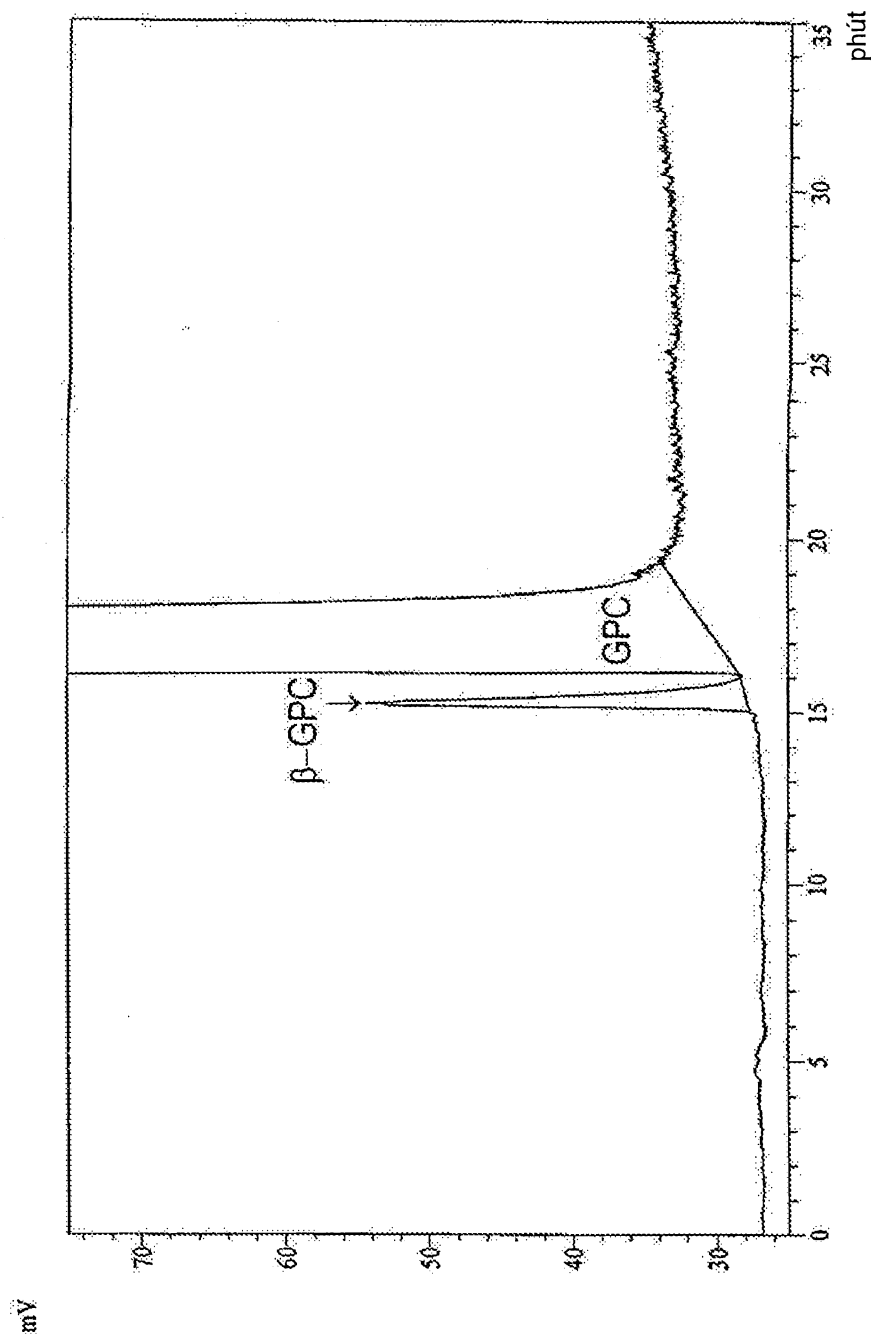


Fig.3

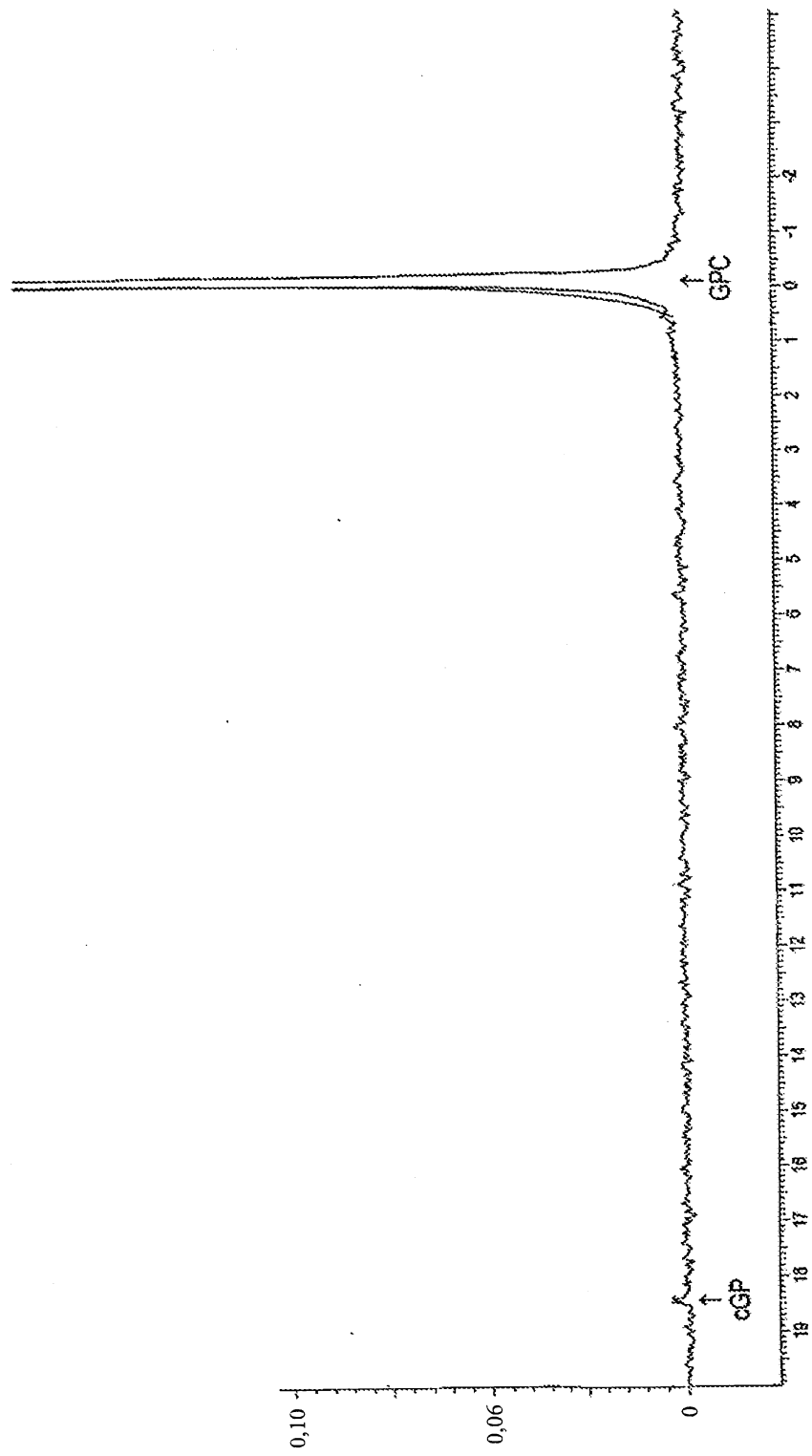


Fig.4

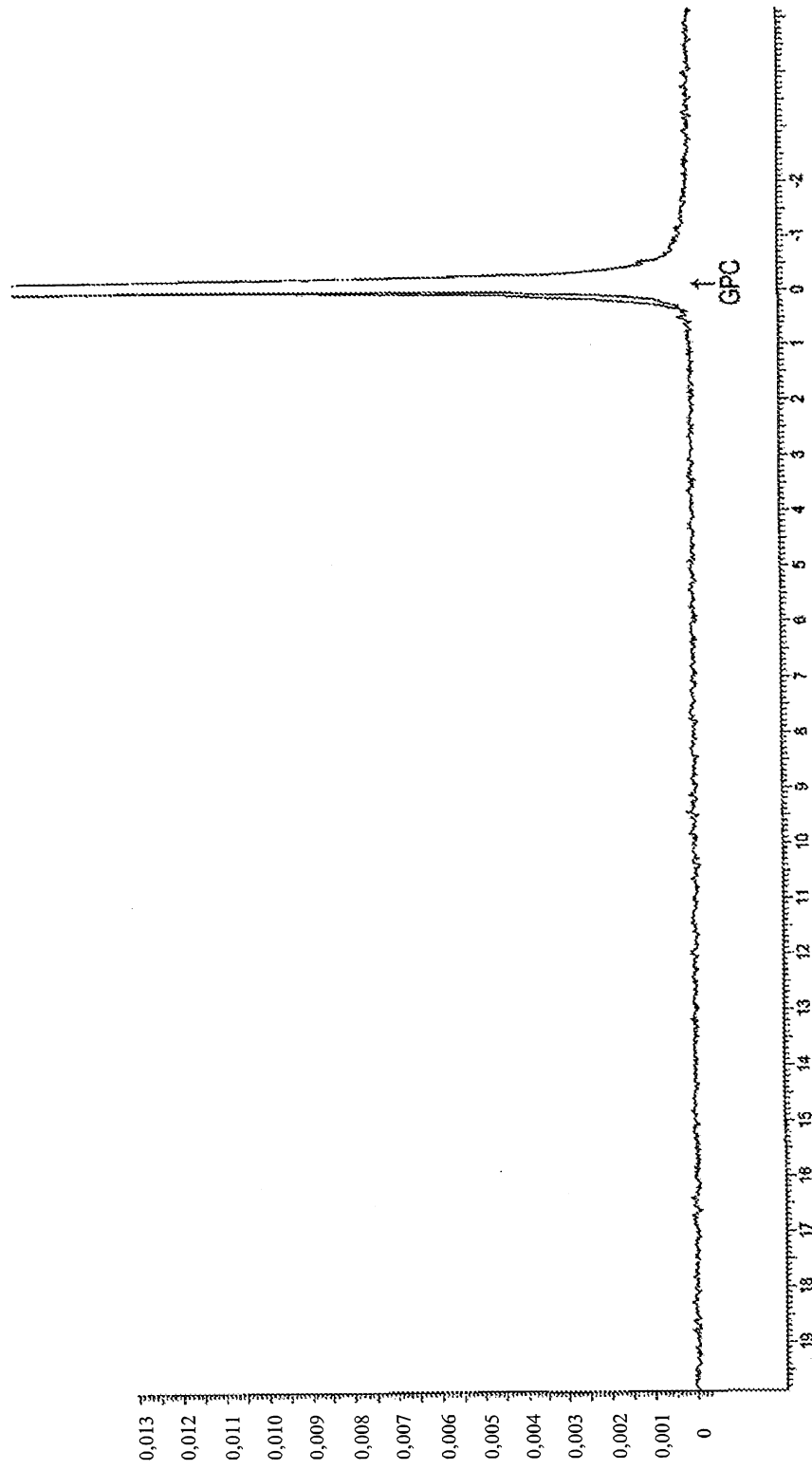


Fig.5

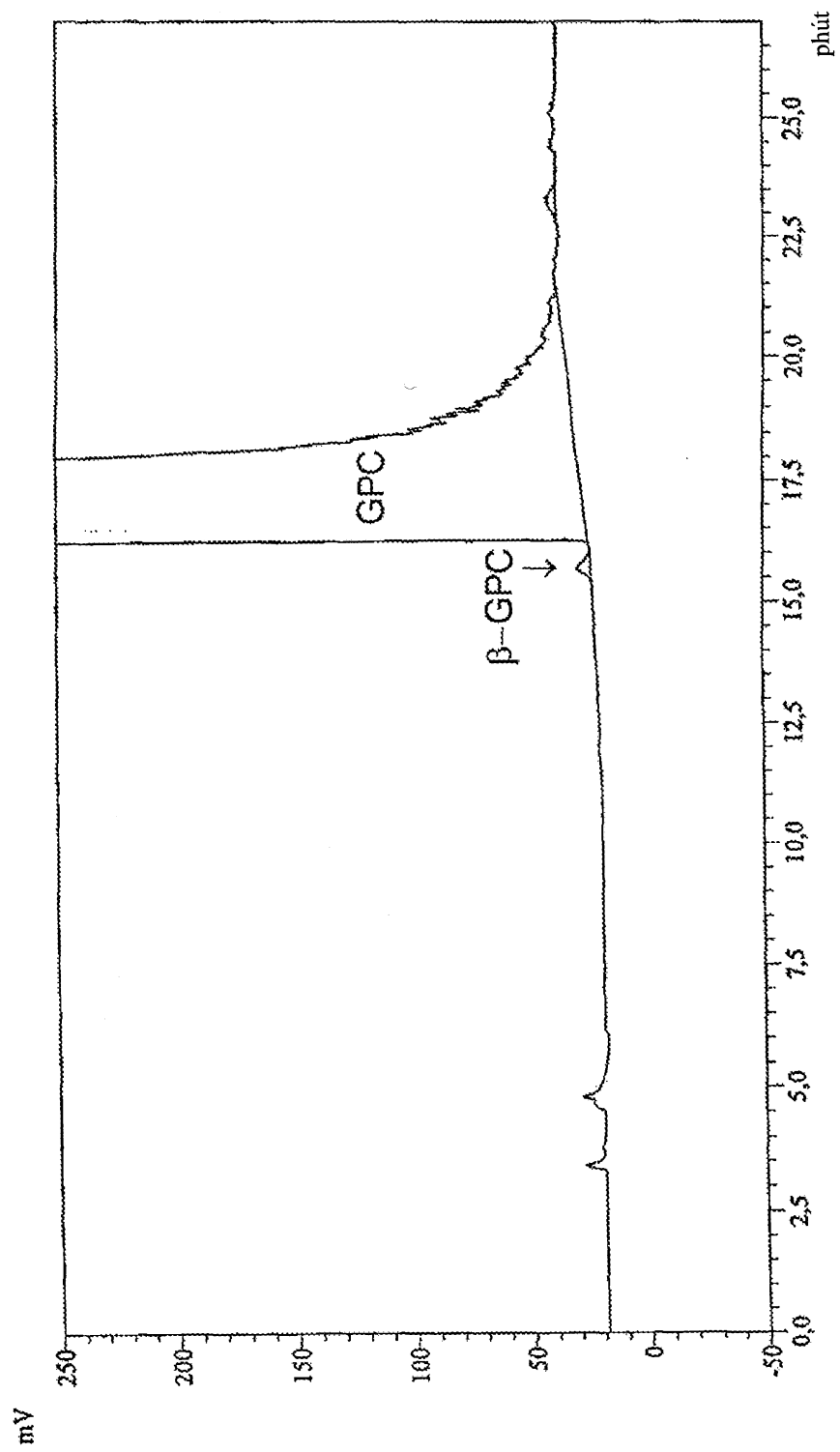


Fig.6

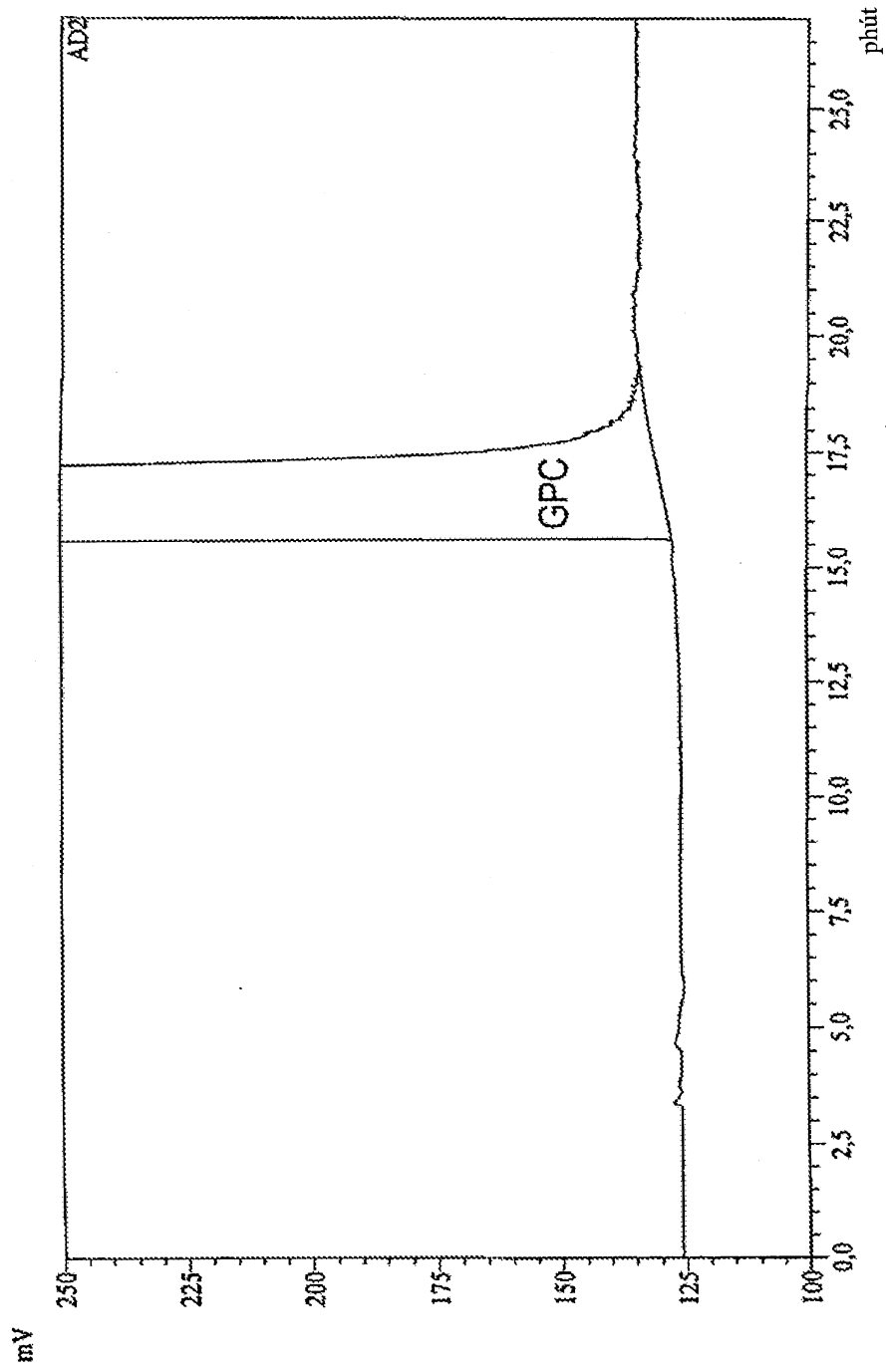


Fig.7

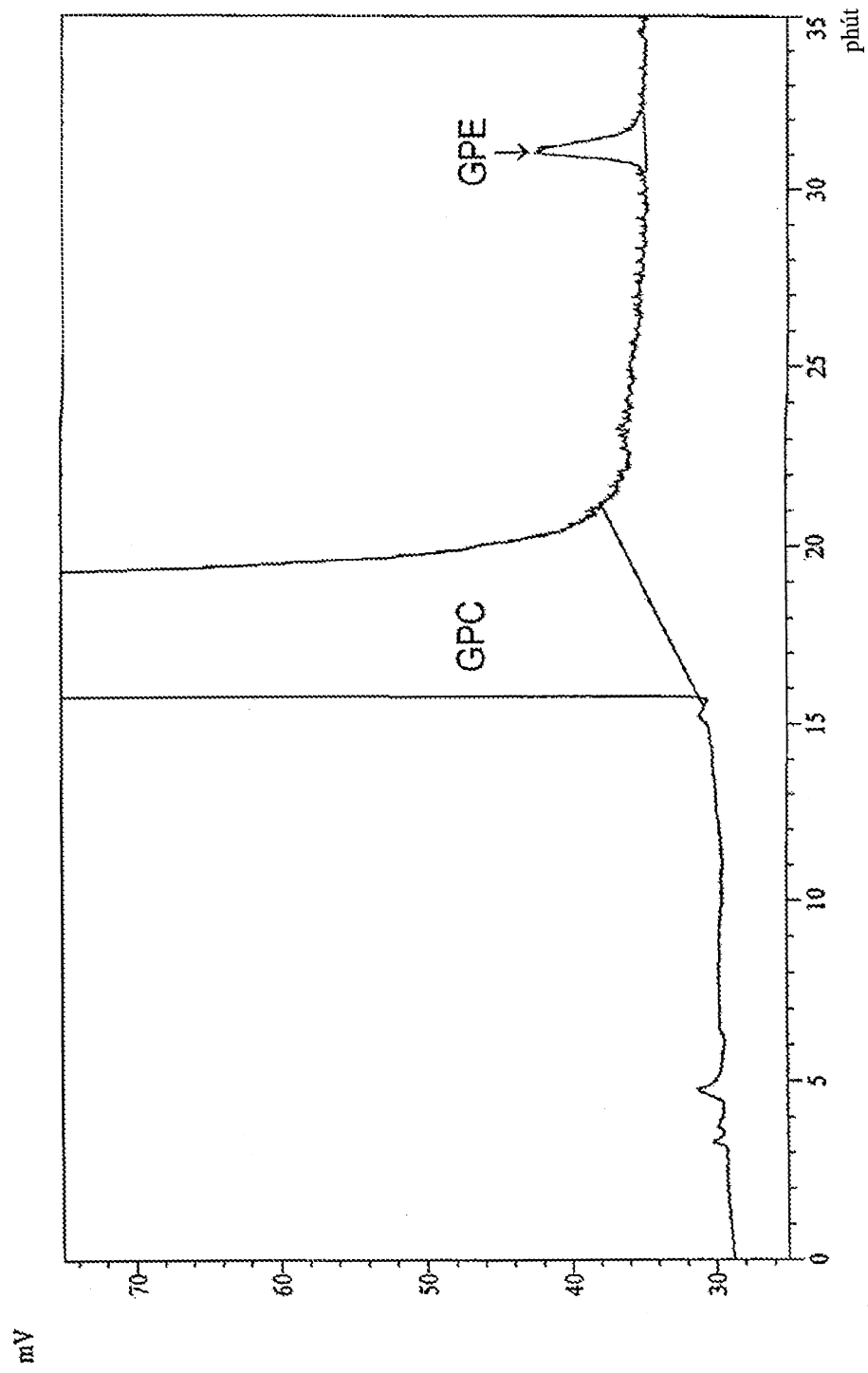


Fig.8

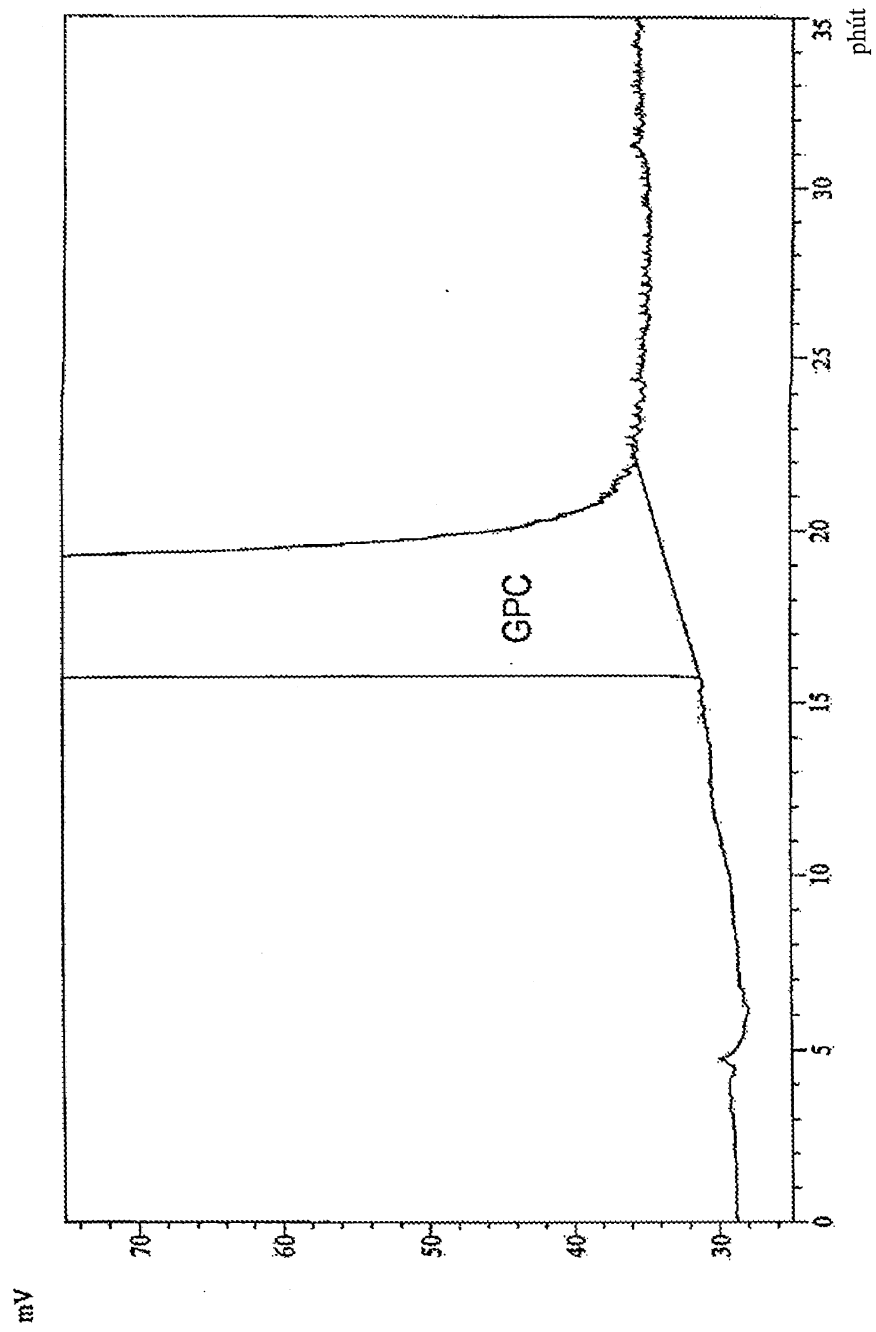


Fig.9

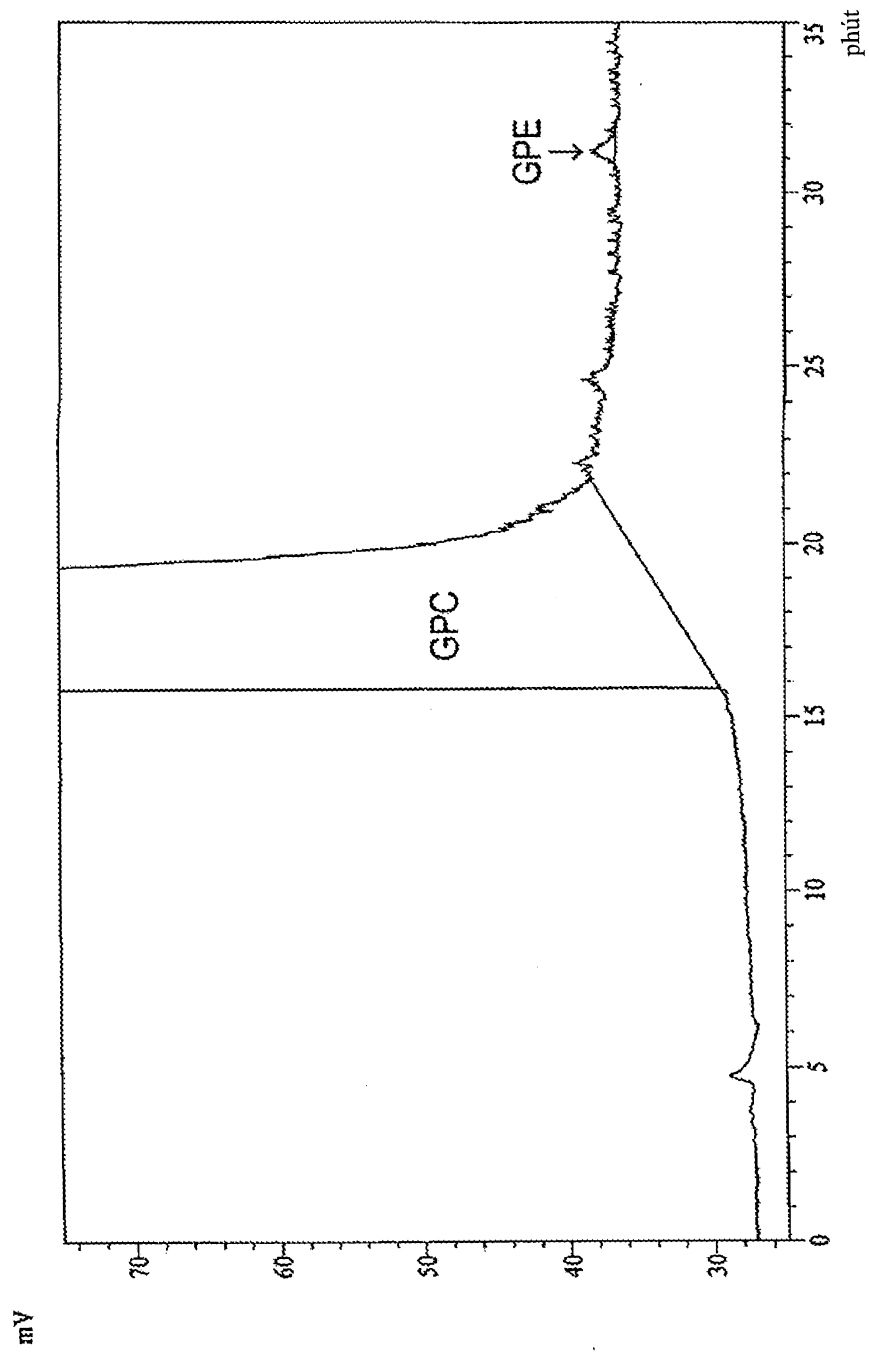


Fig.10

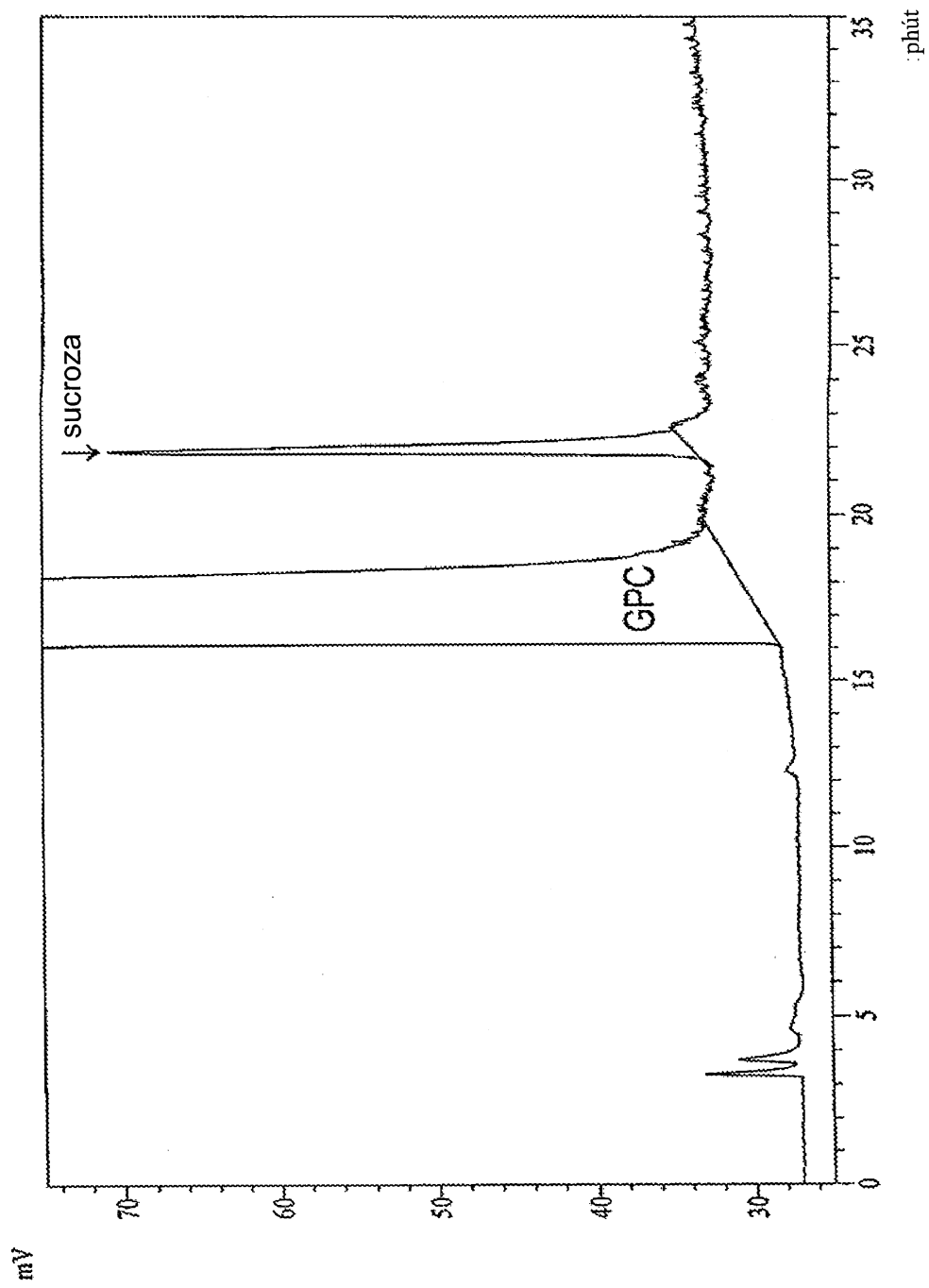


Fig.11

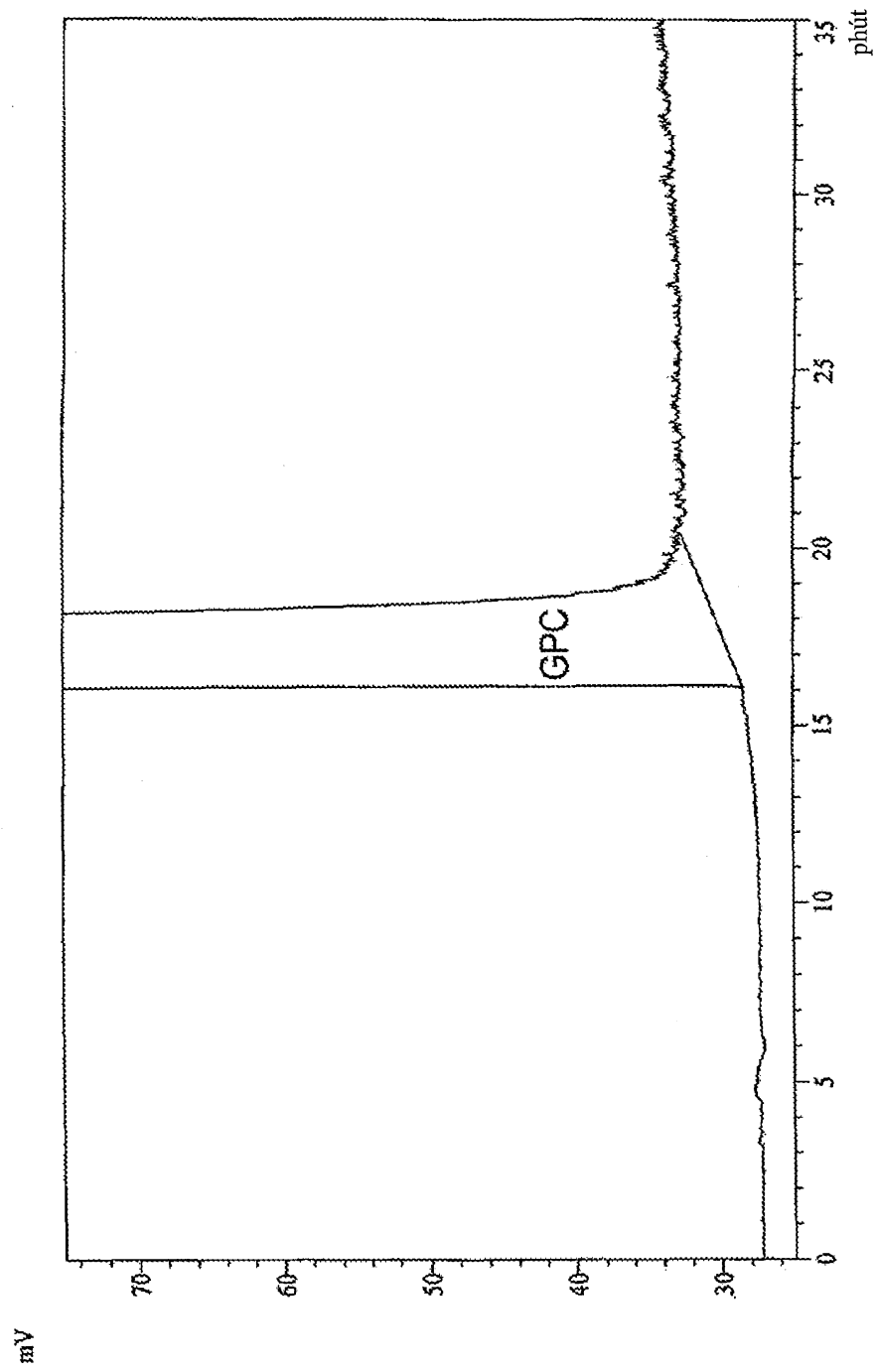


Fig.12

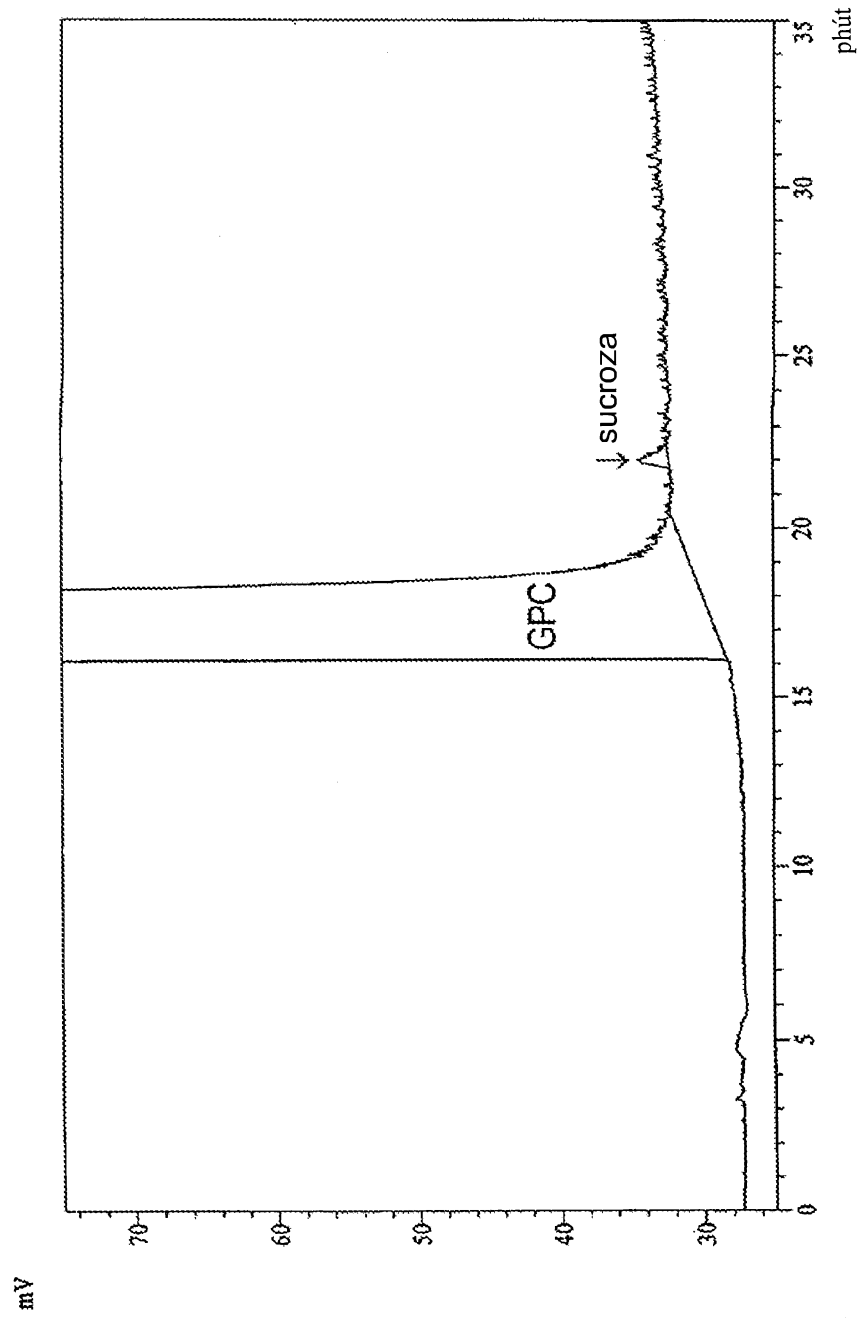


Fig.13