

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



HOÀNG THỊ TUYẾT NHUNG

**NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT VÀ TINH CHẾ
CONESSIN, KAEMPFEROL, NUCIFERIN TỪ
DƯỢC LIỆU LÀM CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU
TRONG KIỂM NGHIỆM THUỐC**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI 2012

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



HOÀNG THỊ TUYẾT NHUNG

**NGHIÊN CỨU CHIẾT XUẤT VÀ TÍNH CHẾ
CONESSIN, KAEMPFEROL, NUCIFERIN TỪ
DƯỢC LIỆU LÀM CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU
TRONG KIỂM NGHIỆM THUỐC**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

**CHUYÊN NGÀNH KIỂM NGHIỆM THUỐC
MÃ SỐ: 62. 73. 15. 01**

**Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu
PGS.TS. Trịnh Văn Lầu**

HÀ NỘI 2012

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được công bố trong bất kì công trình nào khác.

Hoàng Thị Tuyết Nhung

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới:

PGS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu

PGS.TS. Trịnh Văn Lầu

những người thầy đã tận tình hướng dẫn và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn sự giúp đỡ quý báu của **PGS.TS. Nguyễn Viết Thân, PGS.TS Nguyễn Thái An**, Bộ môn Dược liệu, Trường Đại học Dược Hà Nội, đã giúp đỡ tôi trong quá trình nghiên cứu tìm hiểu và khảo sát các phương pháp chiết xuất, phân lập và tinh chế các hợp chất tự nhiên từ dược liệu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn sự giúp đỡ quý báu của **TS. Trần Việt Hùng, ThS. Nguyễn Thị Kim Thanh, TS. Trần Thị Hồng Anh, ThS. Vũ Thị Nguyệt Minh** và các bạn đồng nghiệp tại Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương, đã tạo mọi điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi trong quá trình xây dựng bộ dữ liệu chuẩn, xây dựng phương pháp phân tích và đánh giá liên phòng thí nghiệm.

Tôi xin trân trọng cảm ơn **PGS.TS Trần Từ An**, đã giới thiệu đề tài nghiên cứu và dành cho tôi nhiều ý kiến trao đổi khoa học thú vị trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn **PGS.TS Trần Đức Hậu, PGS.TSKH Lê Thành Phước**, đã đóng góp cho tôi nhiều nhận xét bổ ích trong quá trình hoàn thành bản luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn **DS. Dương Văn Tú**, Bộ môn Bào chế, Trường Đại học Dược Hà Nội đã giúp tôi tìm được nhiều tài liệu tham khảo có giá trị.

Tôi xin trân trọng cảm ơn **Ban Giám hiệu Trường Đại học Dược Hà Nội, Phòng Sau đại học, Bộ môn Hóa phân tích** đã tạo điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn tập thể cán bộ **Bộ môn Hóa đại cương - vô cơ** đã giúp đỡ tôi trong quá trình vừa công tác vừa thực hiện luận án.

Tôi xin cảm ơn gia đình và bạn bè đã động viên tôi trong suốt thời gian qua.

Một lần nữa, tôi muốn bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới tất cả sự giúp đỡ quý báu trên.

Hà Nội, 12/2011

Hoàng Thị Tuyết Nhung

MỤC LỤC

Trang

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC BẢNG

DANH MỤC HÌNH

ĐẶT VẤN ĐỀ 1

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN 3

1.1. Xu thế phát triển thuốc có nguồn gốc thiên nhiên 3

1.2. Tổng quan về các đối tượng nghiên cứu 7

1.2.1. Về hợp chất Conessin và cây Múc hoa trắng 7

1.2.2. Về hợp chất Kaempferol và cây Đơn lá đỏ 12

1.2.3. Về hợp chất Nuciferin và cây Sen 16

1.3. Phương pháp thiết lập chất chuẩn đối chiếu từ dược liệu 22

1.3.1. Phương pháp thiết lập chất chuẩn đối chiếu 22

1.3.2. Hoạt động thiết lập chất chuẩn đối chiếu của các Hội đồng Dược điển, của khu vực ASEAN và Việt Nam 29

CHƯƠNG 2. NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU 33

2.1. Nguyên liệu nghiên cứu 33

2.1.1. Nguyên liệu 33

2.1.2. Hóa chất, thuốc thử 34

2.1.3. Thiết bị, dụng cụ 34

2.2. Phương pháp nghiên cứu 35

2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu 36

2.2.2. Thiết kế thí nghiệm 37

2.2.3. Chiết xuất, phân lập, tinh chế 37

2.2.4. Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất 40

2.2.5. Đánh giá độ tinh khiết và phân tích tạp chất 40

2.2.6. Thiết lập chất chuẩn và xây dựng tiêu chuẩn đánh giá chất chuẩn 41

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	49
3.1. Chiết xuất, phân lập và tinh chế các hợp chất tự nhiên từ dược liệu	49
3.1.1. Chiết xuất, phân lập và tinh chế Conessin từ Múc hoa trắng	49
3.1.2. Chiết xuất, phân lập và tinh chế Kaempferol từ Đơn lá đỏ	56
3.1.3. Chiết xuất, phân lập và tinh chế Nuciferin từ lá Sen	65
3.2. Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng và xác định độ tinh khiết của các chất	69
3.2.1. Đặc điểm cảm quan	69
3.2.2. Điểm chảy	70
3.2.3. Kết quả đo phổ	70
3.2.4. Xác định độ tinh khiết bằng quét nhiệt vi sai	76
3.3. Nghiên cứu thiết lập chất chuẩn đối chiếu	78
3.3.1. Xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích	78
3.3.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng đánh giá chất chuẩn	87
3.3.3. Áp dụng tiêu chuẩn chất lượng và phương pháp phân tích đã được thẩm định để xác định chất lượng nguyên liệu thiết lập chuẩn	88
3.3.4. Đóng gói và đánh giá đồng nhất lô	96
3.3.5. Đánh giá liên phòng thí nghiệm và xác định giá trị ấn định	97
3.4. Kết quả nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn đối chiếu	100
3.4.1. Đề cương nghiên cứu độ ổn định	100
3.4.2. Kết quả đánh giá độ ổn định của các chất chuẩn đối chiếu sau 9 tháng	102
3.4.3. Kết quả đánh giá độ ổn định của các chất chuẩn đối chiếu sau 15 tháng	106
3.5. Kết quả ứng dụng chất chuẩn đối chiếu	107
3.5.1. Định lượng Kaempferol trong dược liệu	108
3.5.2. Định lượng Conessin trong chế phẩm đông dược	115
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	
4.1. Về việc lựa chọn đối tượng nghiên cứu	124
4.2. Về các phương pháp nghiên cứu đã sử dụng	124
4.2.1. Nhóm các phương pháp chiết xuất, phân lập, tinh chế	124
4.2.2. Nhóm các phương pháp nhận dạng, xác định độ tinh khiết	126

4.2.3.	Phương pháp định lượng và xác định tạp chất liên quan	127
4.3.	Về qui trình chiết xuất, phân lập và tinh chế	128
4.3.1.	Chiết xuất, phân lập, tinh chế Conessin	128
4.3.2.	Chiết xuất, phân lập, tinh chế Kaempferol	130
4.3.3.	Chiết xuất, phân lập, tinh chế Nuciferin	131
4.4.	Về bộ dữ liệu nhận dạng và độ tinh khiết của các hợp chất	133
4.4.1.	Về bộ dữ liệu đo phổ	133
4.4.2.	Về độ tinh khiết xác định bằng kĩ thuật quét nhiệt vi sai	133
4.5.	Về kết quả nghiên cứu thiết lập chất chuẩn đối chiếu	133
4.5.1.	Về tiêu chuẩn chất lượng của chất chuẩn đối chiếu	133
4.5.2.	Về qui trình đánh giá chất lượng của chất chuẩn đối chiếu	135
4.5.3.	Về qui trình đóng gói và đánh giá độ đồng nhất lô	136
4.6.	Về độ ổn định của chất chuẩn đối chiếu	136
4.6.1.	Về độ ổn định ở thời điểm 9 tháng	137
4.6.2.	Về độ ổn định ở thời điểm 15 tháng	138
4.7.	Về việc ứng dụng các chất chuẩn đối chiếu	139
4.7.1.	Định lượng Kaempferol trong dược liệu	139
4.7.2.	Định lượng Conessin trong chế phẩm đông dược	140
	KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT	141
	Kết luận	141
	Đề xuất	142
	DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ	
	TÀI LIỆU THAM KHẢO	
	PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

ACN	Acetonitril
ACRS	Chất chuẩn đối chiếu hóa học của ASEAN (Asean Chemical Reference Substance)
ASEAN	Hiệp Hội Các Nước Đông Nam Á (Association of Southeast Asian Nations)
CCĐC	Chất chuẩn đối chiếu
CE	Điện di mao quản (Capillary Electrophoresis)
CTCL	Chỉ tiêu chất lượng
DSC	Đo nhiệt vi sai (Differential Scanning Calorimetry)
EDQM	Ủy ban Châu Âu về chất lượng thuốc và chăm sóc y tế (European Directorate for the Quality of Medicine & HealthCare)
EP	Dược điển Châu Âu (European Pharmacopoeia)
EPCRS	Chất chuẩn đối chiếu Dược điển Châu Âu (European Pharmacopoeial Chemical Reference Substance)
ESI-MS	Khối phổ - ion hóa phun mù electron (Electron Spray Ionisation – Mass Spectrometry)
EtOAc	Ethyl acetat
EtOH	Ethanol
GC	Sắc kí khí (Gas Chromatography)
GLP	Thực hành phòng thí nghiệm tốt (Good Laboratory Practice)
HCTP	Hợp chất toàn phần
HĐDD	Hội đồng Dược điển
HPLC	Sắc kí lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography)
HPLC-MS	Sắc kí lỏng - khối phổ (High Performance Liquid Chromatography– Mass Spectrometry)

HPTLC	Sắc kí lớp mỏng hiệu năng cao (High Performance Thin Layer Chromatography)
ICRS	Chất chuẩn đối chiếu Dược điển Quốc tế (International Pharmacopoeial Chemical Reference Substance)
IP	Dược điển Quốc tế (International Pharmacopoeia)
IR	Hồng ngoại (Infrared)
ISO	Tổ chức Quốc tế về Tiêu chuẩn hóa (International Organization for Standardization)
JPMA	Hiệp hội các nhà sản xuất dược Nhật Bản (Japan Pharmaceutical Manufacturers Association)
LOD	Giới hạn phát hiện (Limit of Detection)
LOQ	Giới hạn định lượng (Limit of Quantitation)
MeOH	Methanol
NLĐC	Nguyên liệu đối chiếu
NMR	Cộng hưởng từ hạt nhân (Nuclear Magnetic Resonance)
NSX	Nhà sản xuất
PCRS	Chất chuẩn đối chiếu hóa học sơ cấp (Primary Chemical Reference Substance)
PPPT	Phương pháp phân tích
PTN	Phòng thí nghiệm
RSD	Độ lệch chuẩn tương đối (Relative Standard Deviation)
SCRS	Chất chuẩn đối chiếu hóa học thứ cấp (Secondary Chemical Reference Substance)
SKĐ	Sắc kí đồ
TCCL	Tiêu chuẩn chất lượng
TLC	Sắc kí lớp mỏng (Thin Layer Chromatography)

UNDP	Chương Trình Phát Triển Liên Hợp Quốc (United Nations Development Programme)
USPRS	Chất chuẩn đối chiếu Dược điển Mỹ (United State Pharmacopoeial Reference Standard)
UV	Tử ngoại (Ultraviolet)
UV-VIS	Tử ngoại – khả kiến (Ultraviolet – Visible)
VKNTTU'	Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương
kl/tt	Khối lượng/thể tích
tt/tt	Thể tích/thể tích
tt/tt/tt	Thể tích/thể tích/thể tích

DANH MỤC CÁC BẢNG

	Trang
Bảng 3.1. Hiệu suất chiết alkaloid toàn phần từ vỏ thân Múc hoa trắng.	50
Bảng 3.2. Kết quả khảo sát hàm lượng cặn flavonoid toàn phần từ đơn lá đỏ	57
Bảng 3.3. Hàm lượng Kaempferol trung bình trong cặn EtOAc	59
Bảng 3.4. Hàm lượng Kaempferol có thể chiết xuất được từ Đơn lá đỏ	60
Bảng 3.5. Thành phần và thể tích các hệ dung môi giải hấp phụ cột silicagel	62
Bảng 3.6. Giá trị R_f và màu sắc các vết sắc kí của Kaempferol tinh chế được với các hệ dung môi I, II, III	65
Bảng 3.7. Hàm lượng alkaloid toàn phần trong lá Sen thu được bằng hai phương pháp chiết	66
Bảng 3.8. Đặc điểm cảm quan của các chất	69
Bảng 3.9. Kết quả đo điểm chảy	70
Bảng 3.10. Kết quả đo phổ tử ngoại khả kiến	71
Bảng 3.11. Kết quả đo phổ hồng ngoại	71
Bảng 3.12. Kết quả đo phổ khối lượng (ESI-MS)	72
Bảng 3.13. Kết quả phân tích phổ NMR của Conessin	73
Bảng 3.14. Kết quả phân tích phổ NMR của Kaempferol	74
Bảng 3.15. Kết quả phân tích phổ NMR của Nuciferin	75
Bảng 3.16. Kết quả xác định độ tinh khiết bằng quét nhiệt vi sai	76
Bảng 3.17. Loại cột HPLC đã khảo sát xây dựng phương pháp phân tích	78
Bảng 3.18. Khảo sát pha động và thành phần pha động	78
Bảng 3.19. Kết quả khảo sát bước sóng phát hiện	80
Bảng 3.20. Một số thông số thể hiện sự phù hợp của hệ HPLC đã lựa chọn	80
Bảng 3.21. Kết quả khảo sát độ chính xác của 3 chất	83
Bảng 3.22. Kết quả khảo sát tính tuyến tính với Conessin	84
Bảng 3.23. Kết quả khảo sát tính tuyến tính với Kaempferol	84
Bảng 3.24. Kết quả khảo sát tính tuyến tính với Nuciferin	84
Bảng 3.25. Kết quả khảo sát độ đúng của 3 chất	85
Bảng 3.26. Kết quả khảo sát LOD và LOQ ($\mu\text{g/ml}$)	86
Bảng 3.27. Chương trình sắc kí để định lượng và xác định tạp chất trong nguyên liệu thiết lập chuẩn	87

Bảng 3.28.	Tóm tắt các chỉ tiêu và phương pháp thử của các chất đối chiếu	88
Bảng 3.29.	Điểm chảy của các hợp chất dùng làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn	89
Bảng 3.30.	Kết quả phân tích tạp chất trong nguyên liệu Conessin	90
Bảng 3.31.	Kết quả phân tích tạp chất trong nguyên liệu Kaempferol	90
Bảng 3.32.	Kết quả phân tích tạp chất trong nguyên liệu Nuciferin	91
Bảng 3.33.	Kết quả định lượng Conessin nguyên liệu thiết lập chuẩn	95
Bảng 3.34.	Kết quả định lượng Kaempferol nguyên liệu thiết lập chuẩn	95
Bảng 3.35.	Kết quả định lượng Nuciferin nguyên liệu thiết lập chuẩn	96
Bảng 3.36.	Kết quả đánh giá độ đồng nhất lô	97
Bảng 3.37.	Kết quả hàm lượng công bố và số lượng của các chất chuẩn đã thiết lập được	98
Bảng 3.38.	Các chỉ tiêu chất lượng đánh giá và giới hạn chấp nhận	100
Bảng 3.39.	Các giá trị tại thời điểm ban đầu	102
Bảng 3.40.	Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Conessin sau 9 tháng	102
Bảng 3.41.	Kết quả bán định lượng Conessin sau 9 tháng	103
Bảng 3.42.	Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Kaempferol sau 9 tháng	104
Bảng 3.43.	Kết quả định lượng Kaempferol sau 9 tháng	104
Bảng 3.44.	Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Nuciferin sau 9 tháng	105
Bảng 3.45.	Kết quả định lượng Nuciferin sau 9 tháng	105
Bảng 3.46.	Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Conessin sau 15 tháng	106
Bảng 3.47.	Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Kaempferol sau 15 tháng	106
Bảng 3.48.	Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Nuciferin sau 15 tháng	107
Bảng 3.49.	Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc kí định lượng Kaempferol trong lá Đơn lá đỏ	109
Bảng 3.50.	Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ	111
Bảng 3.51.	Kết quả xác định khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ	111
Bảng 3.52.	Kết quả thẩm định độ đúng của phương pháp định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ	112

Bảng 3.53.	Kết quả định lượng Kaempferol trong dược liệu Chè vằng	114
Bảng 3.54.	Chương trình gradient dung môi định lượng Conessin trong viên nén Mộc hoa trắng HT	116
Bảng 3.55.	Khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc kí định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT	117
Bảng 3.56.	Khảo sát độ chính xác của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT	120
Bảng 3.57.	Khảo sát độ chính xác trung gian (khác ngày) của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT	121
Bảng 3.58.	Khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT	121
Bảng 3.59.	Khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT	122
Bảng 3.60.	Kết quả khảo sát LOD của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT	123
Bảng 4.1.	Kết quả đạt được của nghiên cứu chiết xuất, phân lập và tinh chế	132
Bảng 4.2.	Số liệu thẩm định phương pháp HPLC	135
Bảng 4.3.	Tóm tắt kết quả nghiên cứu độ ổn định sau 9 tháng	138
Bảng 4.4.	Tóm tắt kết quả nghiên cứu độ ổn định sau 9 tháng và 15 tháng	138

DANH MỤC CÁC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Số nước thành viên của WHO đã có qui chế quản lý thuốc từ dược liệu	5
Hình 1.2. Công thức cấu tạo của Conessin	7
Hình 1.3. Ảnh cây Múc hoa trắng	11
Hình 1.4. Công thức cấu tạo của Kaempferol	13
Hình 1.5. Ảnh cây Đơn lá đỏ	15
Hình 1.6. Công thức cấu tạo của Nuciferin	17
Hình 1.7. Ảnh cây Sen	19
Hình 1.8. Sự phát triển số lượng EPCRS	30
Hình 1.9. Phân bố nhu cầu sử dụng EPCRS theo khu vực địa lý	30
Hình 1.10. Hình ảnh USPRS	30
Hình 1.11. Hình ảnh ACRS	31
Hình 1.12. Chất chuẩn đối chiếu hóa học Cefuroxim acetyl	31
Hình 1.13. Chất chuẩn đối chiếu hóa học Acid Chlorogenic	31
Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu	36
Hình 3.1. Kiểm tra khối lượng phân tử của Conessin bằng phổ khối (ESI-MS)	56
Hình 3.2. SKĐ các dịch chiết Kaempferol từ Đơn lá đỏ	58
Hình 3.3. SKĐ các phân đoạn phân lập Kaempferol	62
Hình 3.4. SKĐ của Kaempferol tinh chế được với các hệ dung môi	64
Hình 3.5. Kiểm tra khối lượng phân tử của Nuciferin bằng phổ khối (ESI-MS)	69
Hình 3.6. Nhiệt độ của mẫu Conessin	77
Hình 3.7. Nhiệt độ của mẫu Kaempferol	77
Hình 3.8. Nhiệt độ của mẫu Nuciferin	77
Hình 3.9. SKĐ và phổ UV của dung dịch đối chiếu Conessin	79
Hình 3.10. SKĐ và phổ UV của dung dịch đối chiếu Kaempferol	79
Hình 3.11. SKĐ và phổ UV của dung dịch đối chiếu Nuciferin	80
Hình 3.12. Dữ liệu độ tinh khiết pic Conessin	81
Hình 3.13. Dữ liệu độ tinh khiết pic Kaempferol	82
Hình 3.14. Dữ liệu độ tinh khiết pic Nuciferin	82
Hình 3.15. SKĐ xác định tạp chất của mẫu Conessin	92

Hình 3.16.	SKĐ mẫu trắng trong xác định tạp chất của mẫu Conessin	92
Hình 3.17.	SKĐ xác định tạp chất của mẫu Kaempferol	93
Hình 3.18.	SKĐ mẫu trắng trong xác định tạp chất của mẫu Kaempferol	93
Hình 3.19.	SKĐ xác định tạp chất của mẫu Nuciferin	94
Hình 3.20.	SKĐ mẫu trắng trong xác định tạp chất của mẫu Nuciferin	94
Hình 3.21.	Ảnh chất chuẩn đối chiếu Conessin	99
Hình 3.22.	Ảnh chất chuẩn đối chiếu Kaempferol	99
Hình 3.23.	Ảnh chất chuẩn đối chiếu Nuciferin	99
Hình 3.24.	SKĐ dung dịch chuẩn Kaempferol 0,025 mg/ml	110
Hình 3.25.	SKĐ dịch chiết đơn lá đỏ	110
Hình 3.26.	Đồ thị khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ	112
Hình 3.27.	SKĐ tại giới hạn định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ	113
Hình 3.28.	SKĐ định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ.	113
Hình 3.29.	SKĐ định lượng Kaempferol trong dược liệu Chè vằng	115
Hình 3.30.	SKĐ khảo sát tính đặc hiệu của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT	118
Hình 3.31.	Phổ UV và độ tinh khiết pic hoạt chất trong dung dịch mẫu thử viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT	119
Hình 3.32.	SKĐ định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT	120
Hình 3.33.	Khảo sát tính tuyến tính của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT	121

ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong vòng hai thập kỉ gần đây, xu hướng quay lại sử dụng các sản phẩm thuốc có nguồn gốc thảo dược để phòng và trị bệnh trở nên phổ biến. Dược điển các nước khu vực châu Á như Việt Nam, Hàn Quốc, Trung Quốc, Nhật Bản đều có các chuyên luận về dược liệu. Một số chuyên luận dược liệu cũng đã được đưa vào Dược điển Mỹ, châu Âu... Theo ước tính, 70% dân số toàn cầu vẫn sử dụng thuốc từ dược liệu trong chăm sóc sức khỏe ban đầu tại cộng đồng. Vì vậy, tổ chức y tế thế giới đã nhấn mạnh việc đảm bảo chất lượng của các thuốc này phải dựa trên các kĩ thuật phân tích hiện đại, với việc sử dụng các chất chuẩn đối chiếu phù hợp.

Dược điển Việt Nam lần 3 (năm 2002) có 312 chuyên luận dược liệu và thuốc từ dược liệu. Trong số 275 chuyên luận dược liệu có 48 chuyên luận sử dụng chất chuẩn đối chiếu chiết ra từ dược liệu. Dược điển Việt Nam lần 4 (năm 2009) có 314 chuyên luận dược liệu và thuốc từ dược liệu. Hiện nay, tiêu chuẩn cơ sở của nhiều thành phẩm được xây dựng dựa trên việc định lượng hỗn hợp toàn phần bằng các phương pháp không đặc hiệu mà không định lượng được các hợp chất chính, đặc trưng, được coi là các hợp chất có hoạt tính sinh học do thiếu chất chuẩn đối chiếu. Do đó, việc thiết lập chất chuẩn đối chiếu từ dược liệu ngày càng trở nên cần thiết đối với công tác đảm bảo chất lượng thuốc, từ giai đoạn lựa chọn nguyên liệu đầu vào, đến việc xây dựng tiêu chuẩn cơ sở, cũng như giám sát chất lượng thuốc lưu hành của cơ quan quản lí. Xuất phát từ thực tế này, luận án **“Nghiên cứu chiết xuất và tinh chế Conessin, Kaempferol, Nuciferin từ dược liệu làm chất chuẩn đối chiếu trong kiểm nghiệm thuốc”** được thực hiện với ba mục tiêu sau:

1. Xây dựng qui trình chiết xuất, phân lập, tinh chế 03 hợp chất tự nhiên đặc trưng từ dược liệu là Conessin, Kaempferol và Nuciferin đạt độ tinh khiết trên 95% để sử dụng làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn đối chiếu.
2. Thiết lập 03 chất chuẩn đối chiếu có nguồn gốc dược liệu trên.
3. Ứng dụng các chất chuẩn đối chiếu thiết lập được để đánh giá chất lượng một số dược liệu và chế phẩm đông dược.

Để đạt được 3 mục tiêu trên, luận án đã tiến hành 5 nội dung chính sau đây:

1. Xây dựng qui trình chiết xuất, phân lập, tinh chế Conessin từ vỏ thân cây Múc hoa trắng, Nuciferin từ lá cây Sen, Kaempferol từ lá cây Đơn lá đỏ đạt độ tinh khiết trên 95%, với khối lượng mỗi hợp chất tinh khiết là 02 gam.
2. Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất.
3. Xây dựng các chỉ tiêu chất lượng của chất chuẩn đối chiếu và phương pháp phân tích để đánh giá chất lượng của chất chuẩn đối chiếu.
4. Nghiên cứu độ ổn định của 03 chất chuẩn đối chiếu trong điều kiện bảo quản 2 – 8⁰C.
5. Ứng dụng chất chuẩn đối chiếu thiết lập được để xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Kaempferol trong dược liệu lá cây Đơn lá đỏ, lá cây Chè vằng, Conessin trong viên nén bao phim *Múc hoa trắng HT*.

Chương 1

TỔNG QUAN

1.1. XU THẾ PHÁT TRIỂN THUỐC CÓ NGUỒN GỐC THIÊN NHIÊN

Trên thế giới, đã phát hiện được 265.000 loài thực vật. Trong đó có 150.000 loài được phân bố ở các vùng nhiệt đới, 35.000 loài có ở các nước ASEAN. Trong số này có ít nhất 6.000 loài được dùng làm thuốc. Các loài thực vật có chứa khoảng 5 triệu hợp chất hóa học. Cho tới nay, đã có 0,5%, nghĩa là 1.300 cây được nghiên cứu một cách có hệ thống về thành phần hóa học và giá trị chữa bệnh [45]. Thuốc từ dược liệu được sử dụng không chỉ các nước Á Đông mà còn được tiêu thụ một lượng khá lớn ở các nước Phương Tây. Ở các nước có nền công nghiệp phát triển thì một phần tư số thuốc kê trong các đơn có chứa hoạt chất từ dược liệu. Tại Mỹ năm 1980 giá trị số thuốc đó lên tới 8 tỉ đô la, tại thị trường Châu Âu lượng thuốc đông dược tiêu thụ cũng lên tới 2,3 tỉ đô la. Nhiều biệt dược đông dược của Trung Quốc được tiêu thụ mạnh ở các nước phát triển. Việt Nam cũng có một số mặt hàng đông dược xuất khẩu có uy tín ở thị trường nước ngoài như hoa hòe, quế, sa nhân, dừa cạn, các loại tinh dầu hồi, quế, trầm... [46].

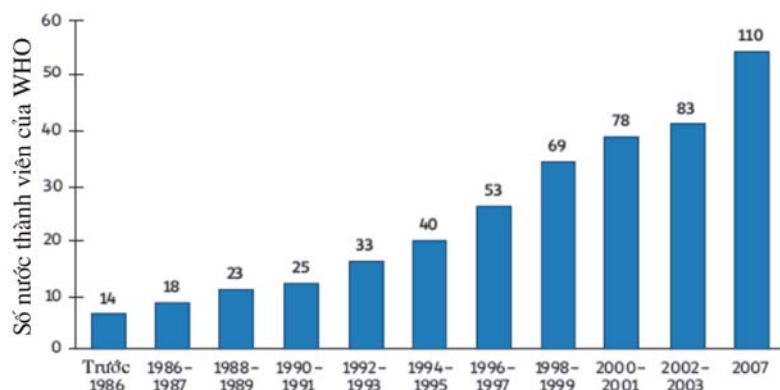
Về sử dụng thuốc, ở khu vực Đông Á, Trung Quốc, Nhật Bản, cùng với Ấn Độ, là các nước tiêu thụ đông dược nhiều nhất. Tại Trung Quốc, đông dược chiếm khoảng 30% lượng dược phẩm tiêu thụ, doanh số đông dược sản xuất tại Trung Quốc để tiêu thụ nội địa và xuất khẩu năm 2003 ước đạt 20 tỉ đô la. Tại Nhật Bản, đông dược được gọi với tên “Kampo”, cũng được chấp nhận và sử dụng rộng rãi, với doanh số khoảng 1 tỉ đô la mỗi năm. Ở khu vực Đông Nam Á, Indonesia là nước đứng thứ hai trên thế giới sau Brazil về đa dạng sinh học cây thuốc, có tới 90% số lượng cây thuốc trên thế giới được tìm thấy ở đây. Theo số liệu năm 1995, có 40% dân số Indonesia sử dụng đông dược, trong đó có 70% sinh sống ở vùng nông thôn. Các nước Đông Nam Á khác đều có tỉ lệ sử dụng đông dược đáng kể trong cộng đồng và hệ thống y tế [132]. Ở Việt Nam, nhu cầu sử dụng đông dược cũng rất lớn. Theo đánh giá của Viện Dược liệu năm 1995, nhu cầu dược liệu toàn

quốc khoảng 30 000 tấn, cung cấp cho 145 bệnh viện y học cổ truyền, 242 khoa y học cổ truyền trong bệnh viện đa khoa và khoảng 30 000 lương y đang hành nghề, ngoài ra còn cần khoảng 20 000 tấn cho nhu cầu xuất khẩu [16], [17], [20], [28]. Nhiều chế phẩm đông dược đã được nghiên cứu tại các viện nghiên cứu và chuyển giao kỹ thuật cho các xí nghiệp sản xuất trong nước, như thuốc viêm gan *Haina*, thuốc hạ cholesterol máu và hạ huyết áp *Ruventat*, thuốc chống đái tháo đường *Morantin*, thuốc nhỏ mũi *Ngũ sắc*, thuốc hòa tan sỏi thận *Somatan*, *Sotinin*, thuốc tăng tuần hoàn máu *Angelin*, thuốc viêm gan *Phyllantin* [19], [27].

Về nghiên cứu phát triển, hiện nay các công ty đa quốc gia đang có xu hướng phát triển các dược phẩm có chứa một hoạt chất từ cây thuốc (tinh chất dược liệu) do các chế phẩm này có giá trị kinh tế lớn hơn nhiều so với các sản phẩm chứa cao thuốc (extracts) hoặc hợp chất toàn phần chưa xác định được trong các công thức cổ truyền, kinh điển [45]. Ở Trung Quốc giai đoạn 1979 - 1990 có 42 chế phẩm thuốc mới từ cây thuốc được đưa ra thị trường, trong đó có 11 chế phẩm chữa bệnh tim mạch, 5 chế phẩm chữa ung thư, 6 chế phẩm chữa tiêu hóa [122]. Cho đến nay đã có trên 4.000 bằng sáng chế về thuốc đông dược của Trung Quốc được đăng kí, với 40 dạng bào chế khác nhau, được sản xuất ở 684 nhà máy chuyên về đông dược [132]. Từ năm 1990 đến nay là giai đoạn phát triển rất mạnh đối với lĩnh vực sản xuất thuốc từ dược liệu với hàng trăm chế phẩm mới ra đời. Nhật Bản là nước dẫn đầu thế giới về nghiên cứu các hợp chất có tác dụng sinh học từ cây thuốc, chiếm 60% bằng phát minh trên thế giới về lĩnh vực này trong 5 năm (1990 - 1995). Trong giai đoạn 2000 – 2005 các công ty dược phẩm đa quốc gia đã có 23 thuốc mới từ nguồn gốc tự nhiên được phép đưa ra thị trường để điều trị bệnh ung thư, bệnh thần kinh, bệnh nhiễm trùng, bệnh tim mạch, các bệnh liên quan đến hệ miễn dịch, chống viêm... Điển hình là các thuốc *Bivalirudin* (MDCO, 2000), *Ozogamicin* (Wyeth – Ayerst, 2000), *Pimecrolimus* (Novatis, 2001), *Nitisinone* (Swedish Orphan, 2002), *Ziconotide* (Elan, 2004), *Exenatide* (Eli Lilly, 2005), *Micafungin* (Fujisawa, 2005)... [18], [45]. Ở Việt Nam, một số thuốc đang được nghiên cứu lâm sàng giai đoạn I, II, III như thuốc viêm lợi *Dentonin*, thuốc trị lý và

thương hàn *Geranin*, thuốc hỗ trợ và điều trị ung thư *Panacrin*, thuốc điều hòa miễn dịch *Angala*...[19].

Về pháp chế dược và đăng kí thuốc, theo báo cáo của WHO năm 2011 [25], [26], [149], tốc độ xây dựng và ban hành qui chế quản lí thuốc từ dược liệu phát triển khá nhanh trong khoảng thời gian từ năm 1986 đến 2007 (Hình 1.1).



Hình 1.1. Số nước thành viên của WHO đã có qui chế quản lí thuốc từ dược liệu*

* (Nguồn: The World Medicines Situation 2011: Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges [149])

Ở Việt Nam, riêng trong năm 2010, Cục quản lí Dược, Bộ Y tế đã cấp phép nhập khẩu cho 106 chế phẩm từ dược liệu thuộc 15 quốc gia và vùng lãnh thổ trên thế giới [11], [12], [13], [14], số lượng cụ thể như sau: Hàn Quốc: 44, Ấn Độ: 20, Trung Quốc: 15, Hồng Kông: 1, Đài Loan: 1, Nhật Bản: 1, Thái Lan: 3, Malaysia: 2, Pakistan: 1, Argentina: 2, Thụy Sĩ: 1, Australia: 1, Đức: 2, Pháp: 1, Mĩ: 7.

Sự phát triển nhanh chóng các thuốc từ cây cỏ là do xu hướng của các nước phương Tây nhằm tăng cường tự điều trị, và do lo lắng về tác dụng bất lợi của chế phẩm hóa dược và sự nâng cao nhận thức của cộng đồng về vai trò của thuốc từ dược liệu trong điều trị các bệnh mạn tính, bệnh thông thường [45].

Với sự phát triển của các kĩ thuật phân tích hiện đại, nhiều hoạt chất được tách chiết từ dược liệu, nghiên cứu xác định cấu trúc và tác dụng dược lí. Kết hợp với công nghệ bào chế, các nhà sản xuất đã cho ra đời những dạng thuốc thuận tiện cho người sử dụng như viên nén, viên nang, cốm thuốc, trong đó nguyên liệu đầu vào là tinh chất hoặc cao dược liệu chuẩn hóa có hàm lượng hoạt chất chính xác.

Điển hình trong nhóm này là các chế phẩm viên nén, viên nang cao Bạch quả (*Ginkgo biloba*), chứa các hoạt chất ginkgo flavanol glycosides, terpene lactones, bilobalide, ginkgolide A, ginkgolide B, ginkgolide C; viên tỏi chứa dịch chiết tỏi có hoạt chất chính là allicin, viên nén cao *Cúc gai dài* (*Cardus marianus*) chứa hoạt chất chính là silymarin... [11], [12], [13], [14]. Nhiều hoạt chất chiết xuất từ dược liệu được tinh chế đạt đến độ tinh khiết có thể sử dụng làm nguyên liệu bào chế thuốc tiêm. Điển hình trong nhóm này là các chế phẩm thuốc tiêm chứa flavonoid của *Ginkgo biloba* (biệt dược *Tanakan*[®], Pháp) [136]; thuốc tiêm chứa paclitaxel phân lập từ cây *Taxus Brevifolia* (biệt dược *Taxol*[®], Mỹ); thuốc tiêm chứa vinblastin phân lập từ cây *Vinca rosea* (biệt dược *Velbe*[®], Pháp)... [46]. Do sự phức tạp về cấu trúc hóa học nhiều chất trong nhóm này cho đến nay vẫn chưa tổng hợp được [130].

Hiện nay, nguồn tài nguyên cây cỏ và tri thức sử dụng cây cỏ làm thuốc là cơ sở quan trọng để sàng lọc và tìm ra thuốc mới. Hướng nghiên cứu này đang rất được coi trọng ở các nước có nền y học tiên tiến như Mỹ, Pháp, Nhật Bản, Trung Quốc [18], [69], [75], [87].

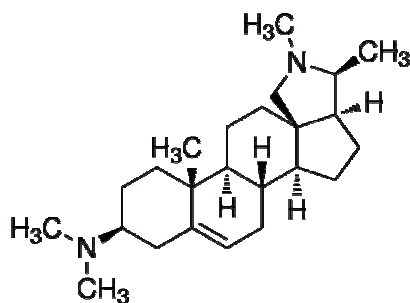
Bên cạnh những ưu điểm đã được thừa nhận, việc sử dụng thuốc từ dược liệu cũng nảy sinh một số vấn đề liên quan đến hiệu lực điều trị, độ an toàn và đảm bảo chất lượng thuốc. Ở một số nước đang phát triển, nhiều thuốc có nguồn gốc dược liệu vẫn được sử dụng rộng rãi mà không có sự kiểm soát về chất lượng của cơ quan có thẩm quyền về dược phẩm [142], [146]. Nguyên nhân của tình trạng trên một phần do thiếu những “thước đo” chính xác để đánh giá chất lượng thuốc. Để hỗ trợ các nước đang phát triển trong lĩnh vực đảm bảo chất lượng thuốc, tổ chức y tế thế giới đã triển khai nhiều biện pháp, bao gồm việc ban hành các chuyên luận về dược liệu và thuốc từ dược liệu [35], [144], [145], thúc đẩy việc ban hành các chính sách thuốc quốc gia, Dược điển quốc gia [140], [141], [143], [147], hỗ trợ trang thiết bị, đào tạo nhân lực cho công tác kiểm nghiệm thuốc. Chương trình thiết lập chất chuẩn đối chiếu hóa học cũng là một phần trong nhóm các giải pháp trên [148], [149], [150].

1.2. TỔNG QUAN VỀ CÁC ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

1.2.1. Về hợp chất Conessin và cây Múc hoa trắng

1.2.1.1. Hợp chất Conessin

❖ Conessin được phân bố trong một số loài thuộc chi *Holarrhena*, họ Trúc đào [48]. Trong nghiên cứu này vỏ thân cây Múc hoa trắng (còn được gọi là cây Mộc hoa trắng, Sừng trâu, Thừng mực lá to [4]) được lựa chọn để chiết xuất Conessin vì Múc hoa trắng là một cây phân bố rộng rãi ở Việt Nam, vỏ thân cây chứa nhiều alkaloid trong đó Conessin là thành phần chính. Thành phần hóa học của vỏ thân cây, phương pháp chiết xuất, phân lập hợp chất từ vỏ thân cây cũng như phương pháp định tính, định lượng hợp chất Conessin trong dịch chiết được liệu bằng sắc kí đã được các tác giả trong nước [29], [30], [39], [40] và nước ngoài [61], [88], [100], [102], [103], [154] nghiên cứu sơ bộ. Từ cây Múc hoa trắng một số xí nghiệp dược phẩm trong nước đã sản xuất các chế phẩm viên nén, viên nang chứa cao vỏ thân cây Múc hoa trắng làm thuốc chữa lị, được lưu hành rộng rãi trên thị trường. Do chưa có CCĐC nên tiêu chuẩn thành phẩm của thuốc chưa đưa ra được phương pháp định lượng đặc hiệu cho hoạt chất trong chế phẩm.



Hình 1.2. Công thức cấu tạo của Conessin [48]

- Công thức phân tử: $C_{24}H_{40}N_2$.
- Trọng lượng phân tử: 356,59
- Danh pháp (IUPAC): (3 β)-N,N-dimethylcon-5-enin-3-amine.
- Tính chất lí – hóa: Conessin là tinh thể hình lăng trụ (kết tinh trong acetone) điểm chảy 125 °C,

$[\alpha]_D = 1,9^\circ$ (trong $CHCl_3$) và $+ 21^\circ 6'$ (trong C_2H_5OH), muối hydroclorid, hydrobromid và oxalat của Conessin tồn tại dưới dạng tinh thể. Độ tan trong nước của Conessin base là 1/5, độ tan trong ethanol 90° là 1/11, ít tan trong ether [29], [30], [32].

❖ *Tác dụng dược lí:* Conessin có tác dụng diệt lị amíp, thí nghiệm ngoài cơ thể nồng độ có hiệu quả đối với *Entamoeba histolytica* của Conessin là 1 : 71 000 – 45 000, còn của emetin là 1 : 300 000 – 1 : 2 000 000. Kết quả cho thấy tác dụng diệt amíp của Conessin kém hơn emetin. Conessin còn có tác dụng diệt *Trichomonas vaginalis* và *Trichomonas intestinalis* [48]. Một số tài liệu báo cáo về tác dụng đối kháng thụ thể H₃ histamin của Conessin [154]. Ở liều cao, tác dụng của Conessin gần giống như morphin, gây liệt trung tâm hô hấp. Nếu tiêm, Conessin gây tê tại chỗ nhưng lại kèm theo hoại tử nên không dùng để gây tê được [32].

1.2.1.2. Phương pháp chiết xuất, phân lập, tinh chế Conessin từ dược liệu

❖ Chiết xuất alcaloid toàn phần từ vỏ thân cây Múc hoa trắng

Conessin là một alcaloid, về nguyên tắc có thể được chiết xuất bằng một trong các phương pháp sau: i) Chiết bằng dung môi hữu cơ trong môi trường kiềm [8], [120], ii) chiết bằng dung dịch acid loãng trong cồn hoặc trong nước [8].

▪ Phí Tùng Lâm [30] đã chiết xuất alcaloid toàn phần trong vỏ thân cây Múc hoa trắng thu hái ở Hải Dương theo qui trình như sau: Cân khoảng 50 g bột dược liệu đã thấm ẩm bằng NH₄OH trong 12 giờ, sau đó chiết bằng cloroform trong Soxhlet đến kiệt alcaloid. Cất thu hồi alcaloid, cô cách thủy thu được căn alcaloid base.

▪ Chakraborty A. và cộng sự [61] chiết alcaloid toàn phần trong vỏ thân cây *Holarrhena pubescens* bằng MeOH, qui trình không được nêu cụ thể.

▪ Kumar N. và cộng sự [102] đã chiết xuất alcaloid toàn phần từ vỏ thân cây *Holarrhena antidysenterica* thu hái ở vùng Pragpur, Ấn Độ theo qui trình như sau: 1 kg vỏ thân cây đã được nghiền thành bột, sấy khô được chiết bằng MeOH 5 lần, mỗi lần 2 500 ml ở nhiệt độ phòng. Gộp dịch chiết, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 307,8 g dịch chiết thô MeOH. Dịch chiết thô MeOH được chiết tiếp với HCl 2M 3 lần, mỗi lần 200 ml bằng phương pháp ngâm lạnh trong 24

giờ. Gộp dịch chiết acid, chiết tiếp bằng CHCl_3 4 lần, mỗi lần 400 ml để loại tạp. Kiểm hóa dịch chiết acid bằng NH_4OH 30% đến pH 8.5. Dịch chiết đã kiểm hóa được chiết tiếp bằng CHCl_3 5 lần, mỗi lần 400 ml. Gộp dịch chiết, rửa lại bằng nước. Làm bay hơi dịch chiết ở áp suất giảm thu được dịch 11,9 g căn alcaloid toàn phần (hiệu suất chiết đạt 1,19%).

❖ Phân lập Conessin từ alcaloid toàn phần

▪ Phạm Thanh Kỳ và cộng sự [29] phân lập Conessin và Norconessin trong alcaloid toàn phần chiết xuất từ vỏ thân cây Múc hoa trắng bằng sắc kí cột theo qui trình sau: Cột sắc kí kích thước 2 cm x 50 cm được lắp thẳng đứng trên giá. Vặn chặt khóa cột. Lót một lớp bông mỏng ở đáy cột. Cho từ từ silica gel trong cloroform vào cột. Lót một miếng giấy lọc có đường kính bằng đường kính cột trên bề mặt silica gel. Cuối cùng đặt một lớp bông mỏng trên miếng giấy lọc. Mở khóa cho dung môi chảy từ từ đến khi lớp cloroform trong cột vừa đến bề mặt của bông. Vặn khóa cột lại. Hòa 0,471 g căn alcaloid toàn phần trong một lượng tối thiểu cloroform vào cốc có mỏ. Đổ từ từ dịch cloroform vào cột. Rửa giải alcaloid trong cột bằng cloroform và methanol, tăng dần độ phân cực như sau: i) CHCl_3 (99,5 ml) : MeOH (0,5 ml), ii) CHCl_3 (99 ml) : MeOH (1 ml), iii) CHCl_3 (98,5 ml) : MeOH (1,5 ml), iiiii) CHCl_3 (98 ml) : MeOH (2,0 ml). Hứng dịch rửa giải vào các ống nghiệm, mỗi ống 2 ml. Kiểm tra dịch rửa giải bằng TLC, thu được các phân đoạn tinh khiết chỉ cho 1 vết trên SKĐ, từ ống 33 – 36 được xác định là Conessin, từ ống 85 – 98 được xác định là Norconessin.

▪ Kumar N. [102] phân lập Conessin từ căn alcaloid toàn phần ở trên bằng sắc kí cột theo qui trình sau: 11,9 g căn alcaloid được nạp vào cột, pha tĩnh là alumina, pha động là benzen dầu hỏa (60 - 80 °C) : EtOAc với tỉ lệ EtOAc tăng dần. Kiểm tra các phân đoạn bằng TLC. Phân đoạn từ ống 19 – 23, có tỉ lệ dung môi là benzen dầu hỏa : EtOAc (95 : 5) cho 1 vết trên SKĐ, được xác định là Conessin.

1.2.1.3. Một số phương pháp định tính, định lượng Conessin

▫ Định tính và định lượng Conessin trong dịch chiết dược liệu bằng GC [88]: Máy sắc kí Shimadzu GC-8A, detector FID, cột nhồi silica gel WHP 100-120 mesh, pha động là khí N₂ 30 mL/phút, phân tách ở 250 °C, thời gian lưu R_t = 11,5 phút, khoảng tuyến tính 0,08 – 0,2% kl/tt (trong MeOH).

▫ Định tính và định lượng Conessin trong dịch chiết dược liệu bằng HPTLC [88]: Máy sắc kí Chromoscan 200, pha động ethyl acetat : hexan : diethylamin (75: 25: 5), phát hiện vết bằng thuốc thử *Dragendorff*, sau đó phun dung dịch NaNO₂ 10% kl/tt để cho độ nhạy tốt nhất, R_f = 0,66, khoảng tuyến tính 0,01 – 0,1% kl/tt (pha trong dung dịch chuẩn nội), đo độ hấp thụ ở bước sóng 520 nm.

▫ Định tính và định lượng Conessin trong dịch chiết dược liệu và chế phẩm bằng HPTLC [100]: Máy sắc kí Camag TLC Scanner III, pha động Toluen : ethyl acetat : diethylamine (6,5 : 2,5 : 1, tt/tt/tt), nhiệt độ phòng (25 ± 2 °C), phát hiện vết bằng thuốc thử *Dragendorff*, R_f = 0,82, khoảng tuyến tính 1 – 10 µg/vết, đo độ hấp thụ ở bước sóng 520 nm.

▫ Định tính và định lượng Conessin trong dịch chiết dược liệu bằng HPTLC [103]: Máy sắc kí Camag Linomat IV, pha động benzen : ethyl acetat : diethylamin (6 : 3 : 1), khoảng cách khai triển 90 mm, thời gian khai triển 20 phút, nhiệt độ phòng (25 ± 2 °C), phát hiện vết bằng thuốc thử *Dragendorff*, phát hiện vết ở bước sóng 254 nm.

▫ Định lượng Conessin trong chế phẩm bằng HPLC [81]: Máy sắc kí Waters (Milford, MA, USA), cột C₁₈ (kích thước 250 x 4,6 mm x 5 µm), pha động Methanol : nước (95 : 5), tốc độ dòng 0,8 ml/phút, detector chỉ số khúc xạ.

▫ Định lượng Conessin trong chế phẩm bằng HPLC-MS [81]: Máy sắc kí Waters HPLC-MS, pha động Acetonitril : nước (cả hai dung môi đều chứa acid acetic 0,1%), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, detector ZQ, máy khối phổ LCQ.

1.2.1.4. Cây Múc hoa trắng và một số chế phẩm từ vỏ thân cây

- *Tên khoa học:* *Holarrhena antidysenterica* Wall., họ Trúc đào (*Apocynaceae*).
- *Tên khác:* Múc lông, Sừng trâu, Thừng mực lá to, Múc hoa trắng.
- *Phân bố:* Trên thế giới, Múc hoa trắng được phân bố ở Ấn Độ, Myanma, Thái Lan, Malaysia. Ở Việt Nam, cây phân bố chủ yếu ở Bắc Giang, Yên Bái, Cao Bằng, Lạng Sơn.... nhiều nhất ở Đắk Lắk và Nghệ An [5], [32], [40], [48].



Hình 1.3. Ảnh cây Múc hoa trắng [3]

- *Đặc điểm thực vật:* Cây nhỡ hay cây to, cao 10 – 15 m, đường kính thân có thể đến 40 cm. Cành non hơi dẹt nhẵn hoặc mang lông màu nâu đỏ. Cành già tròn nhẵn, màu nâu nhạt, có những nốt sần nhỏ màu trắng và sẹo lá còn sót lại. Toàn cây có nhựa mủ. Lá mọc đối, có cuống rất ngắn hoặc gần như không cuống, nguyên, hình

bầu dục đầu tù hay nhọn, dài 10 – 15 cm, rộng 4 – 8 cm, mặt lá bóng, màu xanh lục nhạt. Hoa màu trắng, mọc thành xim hình ngù ở đầu cành hoặc kẽ lá, dài 5 – 10 cm, mẫu 5, đài 5 răng rất hẹp, có lông ở lưng, đầu tràng tròn, ống tràng hơi thắt ở họng, nhị dính gần phía ống tràng, chỉ nhị có lông, bao phấn hẹp, vòi nhụy dày. Hoa nở vào tháng 4 – 5 [48].

- *Thành phần hóa học:* Vỏ Múc hoa trắng chứa 0,22 - 4,2% alkaloid toàn phần; 9,56% gôm; 6,2% chất nhựa; 1,14% tanin. Hạt chứa 36 - 40% dầu béo, tanin, chất nhựa và alkaloid. Từ vỏ thân và hạt, chiết xuất được các alkaloid: Conessin ($C_{24}H_{40}N_2$), Norconessin ($C_{23}H_{38}N_2$), Conessidin ($C_{22}H_{34}N_2$), Conarimin ($C_{21}H_{34}N_2$)... Trong đó alkaloid chủ yếu là Conessin, Conessin hydrobromid [39], [48], [102].

- *Công dụng:* Vỏ thân và hạt được dùng làm thuốc chữa lỵ amip và tiêu

chảy, viêm gan. Dầu béo chiết từ hạt có tác dụng chữa giun, sán. Cao chiết bằng cloroform và methanol từ hạt có tác dụng kháng khuẩn đối với *Bacillus subtilis*, *Escherichia Coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*. Cao còn chiết từ quả có tác dụng chống ung thư và ức chế tế bào Carcinom epidermoid từ hòng hầu trên môi trường nuôi cấy. Vỏ thân dùng làm nguyên liệu chiết xuất alcaloid. Cây là một nguyên liệu quý để chiết lấy các bán thành phẩm tổng hợp các nội tiết tố như cortison [61]. Năm 2011, Akhtar P. [55] đã nghiên cứu tiêu chuẩn hóa chất lượng vỏ thân sử dụng làm nguyên liệu chiết xuất.

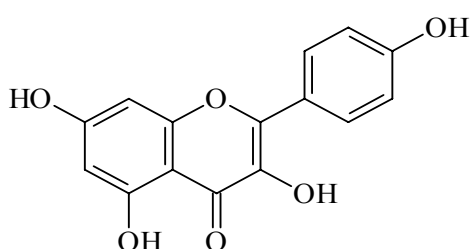
▪ *Một số sản phẩm chứa cao vỏ thân Múc hoa trắng*: Viên nén *Holanin* do Viện Dược liệu sản xuất là hỗn hợp nhiều alcaloid chiết từ vỏ cây Múc hoa trắng, viên *Hipolten* của công ty cổ phần dược vật tư y tế Hải Dương, viên nang *Mộc Hoa Trắng* của công ty cổ phần dược phẩm Hà Nội, viên nén bao phim *Mộc Hoa Trắng HT* của công ty dược phẩm và thiết bị Y tế Hà Tĩnh.... Trong các chế phẩm này, do chưa có CCĐC nên các NSX xây dựng tiêu chuẩn chất lượng thành phẩm dựa trên việc định lượng alcaloid toàn phần.

1.2.2. Về hợp chất Kaempferol và cây Đơn lá đỏ

1.2.2.4. Hợp chất Kaempferol

❖ Kaempferol phân bố rộng rãi trong nhiều loài thực vật, như *Bạch quả*, *Bạch thược*, *Bát giác liên*, *Bòng bong*, *Bóng nước*, *Bông*, *Cây cút lợn*, *Chàm lá nhỏ*, *Chè*, *Cỏ lào*, *Dầu giun*, *Đại táo*, *Đào*, *Đậu tây*, *Đơn lá đỏ*, *Địa liên*, *Gai chống*, *Hành tây*, *Hoa ban*, *Hòe* [47], *Khoai lang*, *Khoai tây*, *Lão quan thảo*, *Mạch ba góc*, *Màn màn trắng*, *Màn màn vàng*, *Măng tây*, *Me rừng*, *Mỏ quạ*, *Móng rồng*, *Mơ*, *Muồng hôi*, *Muồng trâu*, *Nghê rằm*, *Nhân*, *Nho*, *Phan tả diệp*, *Phù dung*, *Rau đắng*, *Rau má*, *Riềng*, *Riềng nếp*, *Sài hồ bắc*, *Sắn*, *Sắn thuyền*, *Sen cạn*, *Thanh cao hoa vàng*, *Thảo quyết minh*, *Thầu dầu*, *Thiên môn*, *Thổ phục linh*, *Thông nước*, *Thông thiên*, *Thục quỳ*, *Thuốc lá*, *Trà tiên*, *Tràm*, *Vối rừng*, *Xoan*, *Xoan trà* [48]. Nhiều loài trong số này là những dược liệu có giá trị sử dụng cao, được sử dụng trực tiếp, dưới dạng thuốc thang, hoặc đã được nghiên cứu để chiết xuất cao dược liệu và đưa vào

các dạng bào chế hiện đại [5], [11], [12], [13], [14], [46]. Trong nghiên cứu này là cây Đơn lá đỏ được lựa chọn để chiết xuất Kaempferol vì Đơn lá đỏ là một cây phân bố rộng rãi ở Việt Nam, đã được các tác giả trong nước [1], [22], [23] nghiên cứu về hình thái thực vật, thành phần hóa học, sơ bộ nghiên cứu về phương pháp chiết xuất và phân lập. Một số công trình nghiên cứu của các tác giả nước ngoài [71], [111] cũng đề cập đến các phương pháp chiết xuất, phân lập Kaempferol từ một số dược liệu khác nhau, hoặc về các phương pháp định tính, định lượng Kaempferol trong dịch chiết dược liệu và chế phẩm [82], [117], [125], [131].



- Công thức phân tử: $C_{15}H_{10}O_6$
- Trọng lượng phân tử: 286,2
- Danh pháp (IUPAC): 3,5,7-trihydroxy -2-(4-hydroxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-on

Hình 1.4. Công thức cấu tạo của Kaempferol [1]

▪ Tính chất lý – hóa: Kaempferol có dạng tinh thể hình kim hoặc vi tinh thể, màu vàng rất nhạt. Tan tốt trong MeOH, EtOH, diethylether, tan trong dung dịch kiềm. Hầu như không tan trong nước lạnh. Không tan trong benzen, cloroform. Ở dạng tinh thể hình kim, Kaempferol có nhiệt độ nóng chảy trong khoảng 276 – 278 °C. Ở dạng vi tinh thể, Kaempferol có nhiệt độ nóng chảy trong khoảng 278 – 280 °C. Kaempferol có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 266 nm và 362 nm trong methanol; ở bước sóng 265 nm và 365 nm trong ethanol [1].

❖ *Tác dụng dược lý:* Kaempferol có khả năng dập tắt các gốc tự do như $HO^{\cdot}$, $ROO^{\cdot}$, tăng tuần hoàn máu trong động mạch, tĩnh mạch và mao mạch, chống viêm, chống dị ứng, ức chế sự hình thành và phát triển khối u trên da chuột nhắt trắng gây ra bởi benzo- α -pyren và dầu ba đậu, ức chế enzyme cyclooxygenase (COX-1 và COX-2) và quá trình peroxyd hóa lipid [62], [107], [119], [123], [125].

1.2.2.2. Phương pháp chiết xuất, phân lập, tinh chế Kaempferol từ dược liệu

❖ Chiết xuất flavonoid toàn phần:

▪ Nguyễn Thái An [1] chiết xuất flavonoid toàn phần từ lá cây Đơn lá đỏ theo qui trình sau: Bột dược liệu Đơn lá đỏ (500 g) được chiết bằng MeOH ở nhiệt độ phòng. Dịch chiết MeOH được bay hơi dưới áp suất giảm cho đến khô. Hòa cồn (120 g) vào 250 ml nước và đem lọc lần lượt với cloroform, ethyl acetat (EtOAc), acetone : nước (6 : 1). Cất loại dung môi thu được các phân đoạn cloroform, ethyl acetat và acetone : nước.

▪ Ding Z. [71] chiết xuất flavonoid toàn phần từ lá cây *Ginkgo* theo qui trình sau: dược liệu được rửa sạch, phơi khô, nghiền mịn rồi ngâm với dung môi ethanol 50% hoặc 70% ở nhiệt độ 50°C trong 6 giờ, thỉnh thoảng khuấy trộn. Thu dịch chiết lần 1. Bã dược liệu được chiết tiếp 2 lần nữa. Gộp dịch chiết, làm bay hơi dưới áp suất giảm trước khi li tâm để thu được dịch chiết đậm đặc. Dịch chiết đậm đặc có chứa flavonoid và terpenoid.

❖ Phân lập Kaempferol từ dịch chiết flavonoid toàn phần

▪ Nguyễn Thái An [1] phân lập Kaempferol từ dịch chiết toàn phần lá cây Đơn lá đỏ theo qui trình sau: Phân đoạn ethyl acetat thu được từ quá trình chiết xuất được cất loại dung môi, thu được 12 g cặn màu vàng nâu. 5 g cặn được đưa lên cột silica gel G60, cỡ hạt 100 – 160 µm (Merck) để phân lập, rửa giải bằng hệ dung môi CHCl₃ : MeOH với tỉ lệ giảm dần. Làm bay hơi dung môi các phân đoạn (5 phân đoạn) thu được. Tiếp tục phân lập và tinh chế lại trên sắc ký cột Sephadex LH-20, rửa giải bằng MeOH ở các tỉ lệ khác nhau. Phân đoạn II', III' cho cặn màu vàng đậm sau khi tinh chế lại trên cột Sephadex LH-20 rửa giải bằng MeOH 60% lần lượt thu được hai chất là FAD8 và FAD7 (FAD7 được nhận dạng là Kaempferol).

▪ Ding Z. [71] phân lập flavonoid từ dịch chiết đậm đặc lá cây *Ginkgo* bằng sắc ký cột ái lực theo qui trình sau: dịch chiết đậm đặc được đưa lên cột sắc ký, sử dụng dung môi ethanol với độ cồn thay đổi (chương trình gradient). Lượng flavonoid phân lập được nhiều nhất khi sử dụng ethanol 20% và 40% làm dung môi rửa giải.

1.2.2.3. Một số phương pháp định tính, định lượng Kaempferol

Kaempferol có thể tạo thành hợp chất có màu với cyanidin, AlCl_3 nên có thể định lượng bằng phương pháp đo màu. Kaempferol có cực đại hấp thụ trong vùng tử ngoại nên có thể định lượng bằng đo phổ tử ngoại [2], [7]. Hiện nay, việc định tính và định lượng Kaempferol cũng đã được thực hiện bằng các thiết bị hiện đại như HPLC, GC-MS, CE... [82], [112], [117], [131], [156]. Một số chương trình sắc kí dùng để xác định Kaempferol:

- Định lượng đồng thời Kaempferol, Quercetin, Myricetin trong bột khoai tây và các chế phẩm chứa khoai tây bằng HPLC-UV [131]: Cột sắc kí Hypersil-ODS (4,6 mm x 250 mm, 5 μm), pha động ACN : Đệm phosphat pH 2,4 (25 : 75, tt/tt) (25% ACN trong dung dịch NaH_2PO_4 0,025 M), tốc độ dòng 1,2 mL/phút, nhiệt độ cột 30 °C, bước sóng phát hiện 266 nm.

- Định lượng Kaempferol đồng thời với catechin, rutin, quercetin, và isorhamnetin trong dịch chiết lá cây *Hippophae rhamnoides* L. bằng RP-HPLC [156]: Cột sắc kí HIQ SIL C18V (4,6 mm x 250 mm, 5 μm), pha động gồm MeOH : ACN : H_2O (40 : 15 : 45, tt/tt/tt) chứa 1% acid acetic, pha động được lọc qua màng Millipore 0,45 μm và loại khí trước khi sử dụng, tốc độ dòng 1 mL/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μL , detector DAD. Sau khi tách, định lượng Catechin ở bước sóng 279 nm, định lượng Rutin ở bước sóng 257 nm, định lượng Quercetin, Kaempferol và Isorhamnetin ở bước sóng 368 nm.

1.2.2.4. Cây Đơn lá đỏ



Hình 1.5. Ảnh cây Đơn lá đỏ [3]

- Tên khoa học: *Excoecaria cochinchinensis* Lour. , họ thầu dầu – Euphorbiaceae.
- Phân bố: Cây mọc hoang hay được trồng ở nhiều nơi như Long An, Tiền Giang, Hậu Giang, Đồng Tháp, An Giang, Thái Bình, Nam Định. Cây được trồng nhiều ở làng hoa Ngọc Hà,

Hà Nội để làm thuốc. Ngoài ra, cây còn được trồng nhiều ở Quảng Tây, Vân Nam (Trung Quốc.) [1]

- *Đặc điểm thực vật:* Cây nhỏ, cao 0,4 - 1 m, cành nhỏ, gầy dài. Lá hình bầu dục hai đầu thuôn nhọn, dài 6 – 12 cm, rộng 2 – 4 cm. Cuống lá dài 0,5 – 1 cm. Phiến lá nguyên, mép lá có răng cưa nhỏ, mặt trên lá màu lục sẫm, mặt dưới màu đỏ tía. Có 10 đến 12 cặp gân lông chim nổi rõ ở mặt dưới lá, lõm ở mặt trên lá [3]. Cây có nhựa mủ trắng. Hoa mọc thành bông ở kẽ lá hay đầu cành, không có tràng hoa, hoa có 3 lá bắc gần giong với cánh dài. Hoa đơn tính cùng gốc hay khác gốc. Hoa có 3 lá đài màu xanh, hoa đực có 3 tiền nhị, hoa cái có 3 vòi nhị nguyên. Cây ra hoa vào các tháng 4, 5, 6. Quả nang 3 mảnh, đường kính 1 cm, hạt hình cầu màu nâu nhạt, đường 4 mm. Nội nhũ dầu [1].

- *Thành phần hóa học:* Lá Đơn lá đỏ chứa flavonoid, tanin, saponin, coumarin, phytosterol, đường tự do. Từ lá khô của cây Đơn lá đỏ, Nguyễn Thái An đã chiết và phân lập được 2 acid polyphenol là acid gallic và acid ellagic, 2 flavonol là kaempferol 7-O-glucosid và kaempferol [1], Nguyễn Minh Đức và cộng sự cũng phân tách được acid gallic, ethyl gallat và liquiritigenin [22], [23].

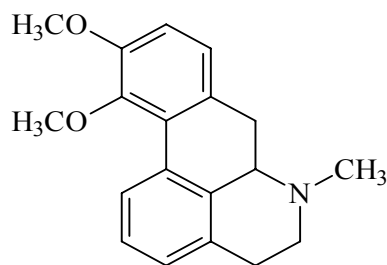
- *Công dụng:* Đơn lá đỏ thường được dùng trong phạm vi nhân dân làm thuốc chữa mẩn ngứa, mụn nhọt, tiêu chảy lâu ngày không khỏi, lì, đái ra máu. Liều dùng: ngày 10 - 20 gram sắc uống. Ở Trung Quốc, Đơn lá đỏ được dùng chữa sỏi, quai bị, viêm amidan, đau thắt ngực, đau nửa đầu [47].

1.2.3. Về hợp chất Nuciferin và cây Sen

1.2.3.1 Hợp chất Nuciferin

❖ Nuciferin được phân bố trong một số loài thuộc chi *Nelumbo*, họ Sen [48]. Trong nghiên cứu này lá cây Sen được lựa chọn để chiết xuất Nuciferin vì Sen là một cây phân bố rộng rãi ở Việt Nam, lá cây chứa nhiều alkaloid trong đó Nuciferin là thành phần chính. Thành phần hóa học của lá Sen, phương pháp chiết xuất, phân lập hợp chất từ lá Sen cũng như phương pháp định tính, định lượng hợp chất Nuciferin trong dịch chiết được liệu bằng sắc ký đã được các tác giả trong nước

[21], [33], [34] và nước ngoài [108] nghiên cứu.



- Công thức phân tử: $C_{19}H_{21}NO_2$.
- Trọng lượng phân tử: 295,2
- Danh pháp (IUPAC): 5,5a,7,8 tetrahydro-1,2-dimethoxy-6-methyl-Diabenzosquinolin.

Hình 1.6. Công thức cấu tạo của Nuciferin [5]

▪ Tính chất lí – hóa: Nuciferin là chất kết tinh, tinh thể hình khối, màu vàng nhạt, không mùi, không vị, tan tốt trong $CHCl_3$, MeOH, EtOH nóng, hầu như không tan trong nước, nhiệt độ nóng chảy $164 - 165^\circ C$, Phổ UV (đo trong MeOH) cho λ_{max} tại bước sóng 210 nm, 228 nm, 270 nm [32], [34].

❖ Tác dụng dược lí: Nuciferin chiết từ lá Sen có tác dụng giải thắt cơ trơn, ức chế thần kinh trung ương, chống viêm yếu, giảm đau, chống ho, kháng serotonin và có hoạt tính phong bế thụ thể adrenergic [21], [32], [34], [48]. Nuciferin ít độc, liều LD_{50} là 330 mg/kg thể trọng chuột. Nuciferin có tác dụng tăng cường quá trình ức chế các tế bào thần kinh vùng vỏ não cảm giác – vận động và thể dưới thân não trên thử nghiệm, có tác dụng an thần và kéo dài giấc ngủ của pentobarbital trên chuột thí nghiệm [64].

1.2.3.2. Phương pháp chiết xuất, phân lập, tinh chế Nuciferin từ dược liệu

❖ Nguyễn Thị Nhung [34] chiết xuất alkaloid toàn phần từ lá Sen, tâm Sen, gương Sen theo cùng qui trình sau: Bột dược liệu được làm ẩm bằng NH_4OH 10% sau đó chiết bằng cồn 70° . Dịch chiết cồn được cất dưới áp suất giảm để thu hồi cồn. Hòa tan cặn vào nước, acid hóa bằng HCl 5% đến pH = 2. Lọc loại bỏ cặn. Dịch lọc acid được chiết bằng ether dầu hỏa để loại tạp. Dịch chiết acid được thêm NH_4OH 10% đến pH = 10 – 11 rồi chiết bằng $CHCl_3$. Dịch chiết $CHCl_3$ được cất thu hồi dung môi, còn lại cặn alkaloid toàn phần.

❖ Phân lập Nuciferin từ cặn alkaloid toàn phần ở trên theo qui trình sau:

- Phân lập alkaloid bằng sắc kí cột sử dụng silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck): Hoạt hóa silica gel ở nhiệt độ 110 °C trong 1 giờ. Lắc silica gel với hệ dung môi đã chọn thành hỗn dịch, rót từ từ vào cột, sau đó cho dung môi chảy qua liên tục với thời gian là 5 giờ để ổn định cột. Cẩn alkaloid toàn phần ở trên được hòa vào một lượng nhỏ với hệ dung môi đã chọn tạo thành dịch alkaloid đậm đặc rồi trộn với một lượng silica gel vừa đủ đưa vào cột sắc kí đã chuẩn bị ở trên. Rửa giải bằng hệ dung môi đã chọn theo tỉ lệ độ phân cực tăng dần. Tốc độ chảy khoảng 30 giọt/phút, hứng mỗi phân đoạn khoảng 5 ml vào các ống nghiệm riêng và kiểm tra bằng sắc kí lớp mỏng. Chọn riêng các phân đoạn chỉ có một vết trên sắc kí đồ, bốc hơi dung môi thu được cẩn alkaloid. Kết tinh lại nhiều lần sẽ thu được alkaloid tinh khiết. Riêng các phân đoạn có 2 hoặc 3 vết được tiến hành phân lập tiếp bằng sắc kí lớp mỏng điều chế.

- Phân lập alkaloid bằng sắc kí lớp mỏng điều chế: Chấm dung dịch chứa 2 hoặc 3 vết lên những bản mỏng có kích thước 20 x 20 cm được tráng chất hấp phụ là silica gel G (Merck), đã hoạt hóa ở 110⁰C trong 1 giờ. Hệ dung môi khai triển là CHCl₃ : MeOH : NH₄OH (50 : 9 : 1). Bản mỏng để khô ở nhiệt độ phòng, sau đó phun thuốc thử *Dragendorff* lên một góc để phát hiện và đánh dấu vết alkaloid. Cạo lấy silica gel chứa chất cần tách, phản hấp phụ bằng CHCl₃ và lọc. Để CHCl₃ bốc hơi tự nhiên, sau đó hòa tan lại bằng cồn ethanol rồi để tủ lạnh, cho kết tinh lại nhiều lần thu được 2 alkaloid tinh khiết là KN1 và KN2. Qua phân tích cấu trúc nhận dạng được KN1 là Nuciferin.

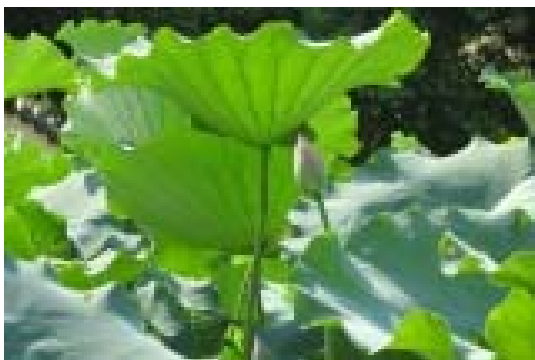
Qui trình trên chưa rõ dùng hệ dung môi nào trong giai đoạn phân lập bằng sắc kí cột, Nuciferin phân lập được từ sắc kí lớp mỏng điều chế chưa biết rõ độ tinh khiết. Chưa tìm được tài liệu tham khảo về qui trình tinh chế Nuciferin phân lập được từ dược liệu để đạt được độ tinh khiết trên 95%.

1.2.3.3. Phương pháp định tính, định lượng Nuciferin

- Nuciferin trong lá cây Sen được định lượng đồng thời với *N-nornuciferin*,

O-nornuciferin và roemerin bằng HPLC-DAD-ESI-MS [108], chương trình sắc kí như sau: máy sắc kí Waters-2695 Alliance, detector DAD, được ghép với máy khối phổ Micromass ZQ 2000, cột sắc kí Shimadzu VP-ODS (4,6 mm × 150 mm, 5 µm), đo độ hấp thụ ở bước sóng 280 nm, pha động gồm A (dung dịch triethylamin 0,1%) và B (CH₃CN), chương trình rửa giải gradient: 0 – 15 phút, 40 – 80% B; 15 – 20 phút, 80 – 95% B; 20 – 21 phút, 95 – 40% B; 21 – 25 phút, 40% B, tốc độ dòng 1 mL/phút, nhiệt độ cột 30 °C. 20% dịch rửa giải được dẫn qua máy khối phổ. Khối phổ +ESI-MS, chương trình HPLC-MS như sau: khí cân solvat hóa N₂ 300 L/giờ, nhiệt độ cân solvat hóa 250 °C, nhiệt độ nguồn 105 °C, điện áp mao quản 3500 V, khoảng quét 200 – 400 µm.

1.2.3.4. Cây Sen và một số chế phẩm từ lá cây



Hình 1.7. Ảnh cây Sen [3]

- *Tên khoa học:* *Nelumbo nucifera* Gaertn., họ Sen – *Nelumbonaceae*.
- *Phân bố:* Vùng nhiệt đới châu Á, Châu Mỹ và ở Việt Nam.
- *Đặc điểm thực vật:* Cây mọc dưới nước, sống nhiều năm. Thân rễ hình trụ mọc bò lan trong bùn, lá hình tròn

mọc lên khỏi mặt nước, cuống dài có gai, dính ở giữa phiến lá, mép lá uốn lượn tròn. Hoa to màu hồng hay trắng có mùi thơm. Nhiều lá non chứa trong một đế hoa chung hình nón ngược sau thành quả có vỏ cứng màu nâu đen. Cây Sen được trồng ở các ao hồ khắp nơi trong nước ta. Mùa thu hái: tháng 7 – 9 [48].

▪ *Thành phần hóa học:* Lá Sen có alkaloid (0,77 – 0,84%), trong đó có nuciferin, nor-nuciferin, roemerin, anonain, liriodenin, pronuciferin, O-norciferin, arnepavin, N-nor-armepavin, methyl-corlaurin, nepherin, dehydroemerin, dehydronuciferin, dehydroanonain, N-methylisocorlaurin. Trong đó nuciferin là alkaloid chính. Ngoài ra trong lá Sen còn có flavonoid, tanin, acid hữu cơ. Trong

tâm Sen có nhiều alcaloid (0,85 – 0,96%), trong đó có liensinin, isoliensinin, neferin, lotusin, nuciferin, pronuciferin, methylcorypallin, demetylcorylaurin [32], [48]. Hàm lượng alcaloid trong lá Sen thay đổi theo tuổi và thời vụ thu lá [15].

- *Công dụng:* Alcaloid toàn phần trong lá Sen có tác dụng an thần, hạ huyết áp nhẹ. Lá Sen được dùng để sắc uống chữa mất ngủ với liều 15 – 20 g/ngày. Lá Sen kết hợp với một số dược liệu khác làm thuốc an thần. Tâm Sen chữa mất ngủ, an thần, di mộng tinh. Ngày dùng 4 – 10 g dưới dạng thuốc hãm hay sắc uống [42].

- *Một số sản phẩm chứa cao lá Sen:* Chế phẩm *Sen vông* của xí nghiệp dược phẩm Trung ương 2 chứa cao lá Sen, cao lá Vông, lưu hành tại thị trường Việt Nam và xuất khẩu; chế phẩm *Sevona* của xí nghiệp dược phẩm Trung ương 25 chứa cao lá Sen và một số dược liệu khác, lưu hành tại Việt nam và xuất khẩu sang các thị trường Nhật, Cuba, một số nước Châu Âu; chế phẩm trà thuốc *Seivo* của trường Đại học Dược Hà Nội chứa cao tâm Sen, cao Củ bình vôi và Ích mẫu; chế phẩm thuốc an thần *Seroga* của xí nghiệp dược phẩm Trung ương 25 chứa cao tâm Sen, cao Củ bình vôi, cao Táo nhân và cao Thiên ma.

Từ các tài liệu tổng quan về đối tượng nghiên cứu, nhận thấy:

- Với cả 3 hợp chất nghiên cứu, chưa tìm thấy tài liệu tham khảo nào nói về qui trình chiết xuất, phân lập và tinh chế hợp chất để sử dụng làm nguyên liệu thiết lập CCĐC. Các tài liệu tham khảo đều mô tả các phương pháp chiết xuất và phân lập để thu được hợp chất tinh khiết dùng cho các nghiên cứu phân tích phổ IR, NMR. Nhiều tài liệu không xác định một cách định lượng độ tinh khiết của hợp chất sau khi phân lập để đo phổ, một số tài liệu kiểm tra độ tinh khiết bằng TLC. Không có tài liệu nào xác định các tạp chất liên qua sau khi phân lập. Các tạp chất liên quan ở hàm lượng vết có thể không ảnh hưởng đến các nghiên cứu tiếp theo về tác dụng dược lí của dịch chiết hoặc phân tích phổ của hợp chất, nhưng đối với nguyên liệu thiết lập chuẩn, tạp vết ảnh hưởng lớn đến chất lượng và độ ổn định của CCĐC. Vì vậy, luận án sẽ tiến hành khảo sát các phương pháp chiết xuất, phân

lập, tinh chế các hợp chất với yêu cầu độ tinh khiết trên 95% để sử dụng làm nguyên liệu thiết lập CCĐC, đồng thời nghiên cứu lựa chọn chương trình sắc kí thích hợp để phân tích tạp chất liên quan trong sản phẩm tinh chế, nghiên cứu độ ổn định của CCĐC thiết lập được trong thời gian 15 tháng ở điều kiện nhiệt độ 2 – 8°C, độ ẩm 40% để làm rõ ảnh hưởng của tạp chất liên quan đến chất lượng của CCĐC.

Ngoài ra, một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình chiết xuất cũng được xem xét để lựa chọn điều kiện chiết tối ưu [8], [49] như đặc điểm màng tế bào dược liệu, chất nguyên sinh, chất keo, nhiệt độ... Trong đó dung môi có vai trò đặc biệt quan trọng trong quá trình chiết xuất dược liệu. Để chiết xuất đạt hiệu suất cao và ít tạp phải lựa chọn được dung môi có độ phân cực phù hợp và có tính chọn lọc cao với chất cần chiết. Trong chiết xuất các chất alkaloid sử dụng dung môi hữu cơ thì pH dung môi là yếu tố quyết định đến hiệu suất chiết [49].

Một số phương pháp phân lập hợp chất tự nhiên sau [120] được nghiên cứu khảo sát để lựa chọn cho phù hợp với đối tượng và qui mô của hợp chất cần phân lập (qui mô pilot, để đạt được khối lượng hợp chất sau tinh chế tối thiểu là 2 gam): i) phân lập bằng sắc kí lớp mỏng điều chế; ii) phân lập bằng sắc kí cột cố định và cải tiến.

Sau giai đoạn phân lập, hợp chất thường đạt được độ tinh khiết trên 80% [120]. Đối với các hợp chất đã khá tinh khiết thì có thể tinh chế bằng cách kết tinh lại trong dung môi nhiều lần [8]. Đối với các hợp chất có độ tinh khiết chưa cao thì có thể tiến hành tinh chế bằng một trong hai cách sau đây: i) lặp lại giai đoạn phân lập bằng sắc kí cột để lấy phân đoạn tinh khiết hơn; thay đổi dung môi rửa giải hay thay đổi tỉ lệ dung môi (có thể sử dụng chương trình rửa giải gradient); thay đổi kiểu sắc kí [120]; ii) tinh chế trên hệ thống sắc kí lỏng điều chế [53].

- Các đặc điểm thuộc về bản chất của đối tượng nghiên cứu như công thức phân tử, công thức cấu tạo, nhiệt độ nóng chảy, độ tan trong các dung môi, các cực

đại hấp thụ tử ngoại... sẽ được sử dụng để lựa chọn dung môi và điều kiện chiết xuất, lựa chọn dung môi pha mẫu, thành phần pha động, bước sóng định lượng trong nghiên cứu xây dựng phương pháp định lượng hợp chất bằng HPLC.

1.3. PHƯƠNG PHÁP THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU

1.3.1 Phương pháp thiết lập chất chuẩn đối chiếu

1.3.1.1. Đại cương về nguyên liệu đối chiếu

❖ Khái niệm về nguyên liệu đối chiếu (NLĐC)

NLĐC là những nguyên liệu có sự đồng nhất và ổn định về một hoặc một số tính chất, được thiết lập để phù hợp với một quá trình sử dụng hoặc đo lường đã định sẵn [91], [118]. Một cách tổng quát, NLĐC được chia thành 3 nhóm: nguyên liệu đối chiếu về thành phần hóa học; nguyên liệu đối chiếu về tính chất vật lý; nguyên liệu đối chiếu về đặc điểm kỹ thuật [94]. Trong ngành phân tích học, NLĐC được chia thành 5 nhóm cơ bản như sau: các dung dịch chuẩn và hỗn hợp khí chuẩn; các nguyên liệu đối chiếu trong chất nền; các nguyên liệu đối chiếu hóa – lý; các vật đối chiếu hoặc mẫu tự tạo để đối chiếu; các chất tinh khiết. Các chất chuẩn đối chiếu (CCĐC), một số tài liệu còn gọi là chất đối chiếu hóa học hay chất chuẩn đối chiếu hóa học, là NLĐC thuộc nhóm các chất tinh khiết [77]. Theo WHO, CCĐC được định nghĩa như sau: “Chất chuẩn đối chiếu hóa học là nguyên liệu đồng nhất, xác thực, được sử dụng trong các phép thử vật lý và hóa học mà ở đó các tính chất của nó được so sánh với các tính chất của sản phẩm được kiểm tra, với độ tinh khiết phù hợp với mục đích sử dụng” [149]. Với định nghĩa này, CCĐC được phân loại theo các mức độ như sau:

- *Chất chuẩn đối chiếu hóa học sơ cấp (PCRS)*: PCRS là một chất được thừa nhận rộng rãi, có các chỉ tiêu chất lượng phù hợp với tài liệu công bố, có hàm lượng được chấp nhận sử dụng làm chuẩn định lượng mà không cần phải so sánh với một chất hóa học khác. Các PCRS có thể tìm được từ các nguồn sau: trung tâm hợp tác về CCĐC của WHO; HĐDD Châu Âu; các PTN trực thuộc của HĐDD Anh; HĐDD Mỹ.

Chất chuẩn đối chiếu hóa học quốc tế (ICRS) là một PCRS được thiết lập bởi ủy ban chuyên gia của WHO về tiêu chuẩn chất lượng của các chế phẩm dược. ICRS được sử dụng chủ yếu trong các phép thử vật lý, hóa học, định lượng của các chuyên luận dược phẩm được công bố trong IP [90].

▪ *Chất chuẩn đối chiếu hóa học thứ cấp (SCRS):* SCRS là một chất đối chiếu hóa học mà các tính chất hay chỉ tiêu chất lượng của nó được xác định bằng cách so sánh với một PCRS. SCRS lại được chia thành hai loại: i) SCRS “chính thức” là một SCRS khu vực hay quốc gia; ii) SCRS làm việc là một SCRS do một nhà sản xuất hoặc một PTN cung cấp. SCRS do ASEAN, do các PTN của các HĐDD, viện kiểm nghiệm quốc gia thiết lập được xếp vào nhóm SCRS “chính thức”, nếu trong quá trình thiết lập chuẩn có sử dụng PCRS để so sánh. Quá trình thiết lập, phân phối chất đối chiếu hóa học được diễn do các HĐDD thực hiện và tuân theo các hướng dẫn của ISO [96].

Việc phân loại trên không mang ý nghĩa tuyệt đối, chẳng hạn, một SCRS như chuẩn quốc gia hoặc chuẩn ASEAN có thể được coi như một PCRS để thiết lập các chuẩn PTN hoặc chuẩn NSX.

❖ Mục đích sử dụng của chất chuẩn đối chiếu

Theo ISO Guide 32, 33 [93], [94], CCĐC được sử dụng vào bốn mục đích chính như sau: i) thẩm định phương pháp và độ không chắc chắn của một phép đo; ii) xác minh khả năng áp dụng đúng đắn của một phương pháp; iii) hiệu chuẩn; iv) kiểm tra chất lượng và đảm bảo chất lượng. Trong lĩnh vực kiểm tra chất lượng của ngành Dược, các phương pháp phân tích trong các dược điển hiện hành có thể yêu cầu chất chuẩn đối chiếu trong các phép thử sau [3], [59], [97], [98], [101], [134]: đo phổ IR để định tính, đo phổ UV để định lượng, định lượng bằng phương pháp so màu, các phương pháp sắc ký để định tính và định lượng, các kỹ thuật tách để định lượng, các phương pháp chuẩn độ không hợp thức để định lượng, các phương pháp định lượng vi sinh, các thử nghiệm hóa học - miễn dịch, hiệu chuẩn thiết bị.

Ngoài ra, trong Dược điển cũng có những phương pháp phân tích không phải sử dụng đến các CCĐC như: thử nghiệm độ vô khuẩn, nội độc tố vi khuẩn.

PCRS còn dùng để đánh giá thử nghiệm thành thạo cho các kiểm nghiệm viên của các PTN muốn đăng kí tham gia làm PTN thành viên trong các chương trình hợp tác thiết lập chất chuẩn của Trung tâm hợp tác về các CCĐC của WHO hay Hội đồng Dược điển Mỹ, Ủy ban chất đối chiếu của ASEAN, Hội đồng Dược điển Châu Âu [77], [89].

1.3.1.2. Thiết lập, bảo quản và phân phối chất chuẩn đối chiếu sơ cấp

PCRS được thừa nhận rộng rãi vì vậy qui trình thiết lập PCRS phải được ban hành bởi các tổ chức có thẩm quyền và tuân thủ nghiêm ngặt. Qui trình thiết lập PCRS bao gồm các bước như sau [149]:

❖ Đánh giá nhu cầu PCRS

Trước khi tiến hành thiết lập một PCRS phải đánh giá xem việc phát triển một CCĐC có thực sự là cần thiết không, việc đó đòi hỏi ngay từ khi xây dựng tiêu chuẩn và phương pháp kiểm nghiệm cho một chất mới cần phải xem liệu một qui trình nào đó có thể thay thế bởi một qui trình khác thỏa mãn yêu cầu tương đương mà không cần phải dùng đến CCĐC hay không.

❖ Lựa chọn nguồn nguyên liệu dùng để thiết lập CCĐC từ nhà cung cấp

Nguyên liệu sử dụng để thiết lập CCĐC thường được lựa chọn từ các lô sản xuất nguyên liệu có chất lượng tốt nhất và được cung cấp bởi các nhà sản xuất dược phẩm. Một chất đối chiếu dự kiến sử dụng cho phép thử định tính bằng phương pháp IR hay phương pháp TLC không yêu cầu có độ tinh khiết quá cao, trong khi đó các nguyên liệu được sử dụng thiết lập chuẩn để dùng trong định lượng nên có độ tinh khiết ít nhất 99,5 % hoặc cao hơn nữa.

Để đáp ứng cho yêu cầu của một chất đối chiếu, cần xem xét ảnh hưởng của tạp chất đến phép đo trong khi định lượng. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các tạp chất có tính chất lí hóa học tương tự như chất chính có thể không làm ảnh hưởng đến giá trị sử dụng của các CCĐC, nhưng một lượng vết tạp chất có tính chất hóa học khác hẳn hợp chất chính có thể làm cho việc sử dụng các CCĐC đó trở nên không còn phù hợp nữa.

❖ **Đánh giá mục đích sử dụng của PCRS:**

▪ *CCĐC dùng cho phép thử định tính:* Thông thường chỉ cần kết quả đánh giá từ một PTN đủ tiêu chuẩn.

▪ *CCĐC dùng cho phép thử độ tinh khiết:* Yêu cầu mô tả đặc tính rộng hơn so với phép thử định tính, đặc biệt khi sử dụng trong các phép thử giới hạn. Nếu sử dụng kỹ thuật TLC, thường đề nghị độ tinh khiết tối thiểu ($\geq 90\%$), nhưng yêu cầu độ tinh khiết cao hơn ($\geq 95\%$) đối với kỹ thuật HPLC hoặc GC. Thông thường chỉ cần một PTN tham gia đánh giá CCĐC dùng cho phép thử độ tinh khiết. Nếu CCĐC được phân lập hoặc điều chế lần đầu tiên thì cần tiến hành một số phép thử hóa lý như phổ NMR, phổ MS và phân tích nguyên tố để mô tả đặc tính.

▪ *Các CCĐC dùng cho phép định lượng:* Phạm vi các phép thử rất rộng, sử dụng nhiều kỹ thuật đã được thiết lập và thẩm định, bao gồm các phương pháp đã được sử dụng để đánh giá TCCL trong dược điển. Khi định lượng các CCĐC bằng các phương pháp không đặc hiệu, như đo quang phổ UV hay so màu, cần phải xác định hàm lượng nước và lượng dung môi tồn dư. Khi định lượng bằng các phương pháp đặc hiệu, cần phải xác định hàm lượng tạp chất. Trong trường hợp này, khuyến khích sử dụng thêm các phương pháp tuyệt đối để định lượng chất chính.

▪ *Các CCĐC dùng để hiệu chuẩn thiết bị:* Yêu cầu phạm vi các test đánh giá như đối với định lượng.

❖ **Lựa chọn phương pháp phân tích để đánh giá PCRS**

Các phương pháp lựa chọn để đánh giá các CCĐC chia thành 2 nhóm: nhóm các phương pháp định tính và nhóm các phương pháp định lượng.

▪ *Nhóm các phương pháp định tính:* Thường dùng phổ IR. Trường hợp không có CCĐC liên kết hoặc thiếu các dữ liệu về các đặc tính của CCĐC, cần phải xác minh nhận dạng của chất đó bằng một số kỹ thuật dùng để mô tả đặc tính một chất mới, như nghiên cứu tinh thể học, phổ NMR, MS, phân tích nhóm chức, và các phương pháp khác có thể, để đảm bảo một CCĐC được mô tả đặc tính đầy đủ.

▪ *Nhóm các phương pháp định lượng:* Các phương pháp phân tích áp dụng phải có mối liên hệ với mục đích sử dụng dự kiến. Các phương pháp phân tích có thể chia thành ba nhóm sau: i) các phương pháp cần chất CCĐC ngoài như sắc kí, quang phổ; ii) các phương pháp chỉ phụ thuộc vào tính chất động học nội tại của chất như phương pháp phân tích độ hòa tan của các thành phần rắn trong dung môi, quét nhiệt vi sai; iii) các phương pháp khác.

❖ **Xác định giá trị ấn định**

GTAD được xác định dựa trên kết quả của chương trình hợp tác giữa các PTN sử dụng các phương pháp phân tích khác nhau. Các kết quả phân tích của các PTN tham gia được tập hợp lại để đánh giá theo phương pháp thống kê được qui định cụ thể trong qui trình phân tích. Thông thường các giá trị này được tập hợp từ 5 PTN độc lập tham gia thiết lập chuẩn.

❖ **Xác định thông tin cần cung cấp kèm theo PCRS.**

Nhãn của PCRS phải có đủ những thông tin sau đây [92], [149]: i) tên thích hợp của một chất, thông thường hay dùng tên không sở hữu quốc tế; ii) tên cơ sở thiết lập PCRS; iii) khối lượng xấp xỉ của nguyên liệu đựng trong bao bì; iv) số lô hoặc số kiểm soát.

❖ **Đóng gói, bảo quản, nghiên cứu độ ổn định**

▪ *Đóng gói:* Lượng nguyên liệu đóng cho một lọ nên đủ cho các phép thử có liên quan và chỉ nên đủ cho một lần sử dụng, yêu cầu này chặt chẽ hơn đối với các CCĐC dễ hút ẩm. Khi cần đóng gói một lượng các CCĐC rất nhỏ đối với các chất đắt tiền hay khó kiếm, để đảm bảo độ đồng đều, nên pha mẫu thành dạng dung dịch sau đó làm khô làm phương pháp bay hơi hoặc đông khô.

▪ *Bảo quản:* Điều kiện bảo quản ở nhiệt độ khoảng 2 – 8 °C với đồ bao gói ngăn được sự hấp thụ ẩm, tránh ánh sáng là phù hợp cho đa số các chất đối chiếu hóa học. Các lọ chất đối chiếu không được mở cho đến khi cân bằng về nhiệt độ phòng thí nghiệm để ngăn quá trình hấp thụ ẩm.

▪ *Nghiên cứu độ ổn định*: Độ ổn định của CCĐC được kiểm soát bằng cách đánh giá lại theo định kỳ. Nếu lô mẻ nào có sự thay đổi có ý nghĩa về độ tinh khiết được thay thế bằng lô mẻ mới. “Hạn sử dụng” của CCĐC không được đưa ra trên nhãn hay chứng chỉ phân tích để tránh lãng phí CCĐC.

1.3.1.3. Thiết lập, bảo quản và phân phối chất chuẩn đối chiếu thứ cấp

Trên cơ sở tham khảo qui trình thiết lập PCRS, các HĐDD quốc gia hay khu vực hoặc các PTN được ủy quyền của cơ quan quản lý dược quốc gia xây dựng qui trình thiết lập SCRS của cơ sở đó [50], [65], [66]. Việc thiết lập SCRS dựa trên PCRS thường được tiến hành do nhu cầu thực tế, khi nguồn PCRS không đủ cung cấp cho nhu cầu sử dụng trong công tác nghiên cứu và đảm bảo chất lượng thuốc. GTAD của SCRS thông thường được xử lý thống kê từ kết quả của 3 PTN độc lập tham gia thiết lập chuẩn.

Việc phân loại SCRS mang ý nghĩa tương đối. Một SCRS của khu vực hay quốc gia có thể được coi là chất chuẩn sơ cấp để thiết lập chất chuẩn PTN của các PTN hoặc các nhà sản xuất dược phẩm. Trong trường hợp này, các chất chuẩn khu vực hay quốc gia được gọi là chuẩn liên kết.

Theo qui định của ASEAN, chương trình đánh giá lại chất chuẩn đối chiếu ASEAN (ACRS) được thiết kế để phát hiện các dấu hiệu sớm của quá trình phân hủy bằng các kỹ thuật phân tích phù hợp. Các kỹ thuật này phải đáp ứng được các yêu cầu: sử dụng lượng mẫu ít, tiến hành nhanh, độ nhạy cao [65].

Tần suất và cỡ mẫu dùng cho đánh giá lại phụ thuộc một số yếu tố như độ ổn định của CCĐC, đồ bao gói, nút đóng của đồ bao gói, điều kiện bảo quản, độ ẩm, tính chất vật lý và mục đích sử dụng của CCĐC. Đối với ACRS tần suất đánh giá lại được qui định như sau: 3 năm đối với CCĐC dùng cho phép thử hóa học, 2 năm đối với CCĐC dùng cho phép thử vi sinh, 1 năm đối với các chất đặc biệt nhạy cảm [65]. Chương trình đánh giá lại thường bao gồm một số thử nghiệm sau:

- Xác định hàm lượng nước, mất khối lượng khi sấy khô.
- Xác định tạp chất bằng HPLT hoặc TLC.

- Xác định hàm lượng chất chính.
- Xác định độ tinh khiết bằng DSC, nếu thích hợp.

Chương trình đánh giá lại được tiến hành bởi các PTN tham gia thiết lập SCRS ban đầu. Khi kết quả xác định lại GTAD có sai khác từ 1% trở xuống so với giá trị ban đầu thì không phải điều chỉnh GTAD trên chứng chỉ phân tích, nếu việc xác định lại GTAD cho thấy sai khác trên 1% so với GTAD ban đầu thì phải công bố điều chỉnh lại GTAD trên chứng chỉ phân tích [66].

1.3.1.4. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng đánh giá chất chuẩn đối chiếu và yêu cầu về nội dung của qui trình phân tích

Tiêu chuẩn chất lượng của CCĐC bao gồm có các chỉ tiêu chất lượng (CTCL) và phương pháp phân tích (PPPT). TCCL của một CCĐC được xây dựng dựa trên các yếu tố như TCCL của các hợp chất được sử dụng làm CCĐC được công bố trong Dược điển hoặc TCCL của NSX, các đặc điểm thuộc về bản chất của vật lý, hóa học của chất nghiên cứu và mục đích sử dụng của CCĐC. PPPT sử dụng để đánh giá các CTCL của CCĐC phải là các phương pháp chính thống trong Dược điển, và là phương pháp dự kiến sẽ sử dụng để đánh giá mẫu bằng CCĐC đó. Chẳng hạn một CCĐC dự kiến thiết lập cho mục đích định lượng bằng vi sinh vật thì GTAD hay hàm lượng của CCĐC đó phải được xác định bằng chính phương pháp định lượng vi sinh sau khi hợp chất đó đã được sơ bộ đánh giá bằng các phép thử hóa học đạt yêu cầu [149].

- Các CTCL thông thường hay được công bố trên chứng chỉ phân tích của CCĐC: Mô tả, định tính, pH, kim loại nặng, hàm lượng nước, năng suất quay cực, cặn sau khi nung, điểm chảy, độ trong và màu sắc dung dịch, giảm khối lượng do sấy khô, tro sulfat, tạp hữu cơ bay hơi, tạp chất liên quan, định lượng.

- Một số PPPT chính thống trong Dược điển hay dùng để xác định các CTCL của hoạt chất hoặc thành phẩm thuốc [3], [59], [97], [98], [101], [134]:

- Định tính: IR; HPLC; TLC; UV-VIS; điểm chảy.
- Độ tinh khiết: Các kỹ thuật sắc ký như HPLC, TLC dùng để xác định tạp

chất liên quan, GC dùng để xác định dung môi hữu cơ bay hơi hoặc tồn dư dung môi; xác định góc quay cực riêng; đo pH; quét nhiệt vi sai; xác định kim loại nặng; xác định tro sulfat; độ ẩm; giảm khối lượng do sấy (sấy thường/sấy chân không); hàm lượng nước.

▫ Định lượng: HPLC; UV-VIS; chuẩn độ thể tích; định lượng bằng vi sinh.

Trong quá trình thiết lập CCĐC, khuyến cáo sử dụng phương pháp có độ đặc hiệu cao, nếu có thể nên sử dụng thêm các phương pháp tuyệt đối (không phải dùng chất đối chiếu) như chuẩn độ thể tích [66], [77].

Các CCĐC được thiết lập trong luận án là chất chuẩn PTN, tuân theo hướng dẫn của WHO [149], ASEAN [65], [66] và Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương [50] trong quá trình thiết lập chuẩn.

1.3.2. Hoạt động thiết lập chất chuẩn đối chiếu của các Hội đồng Dược điển, của khu vực ASEAN và Việt Nam

1.3.2.1. Hoạt động thiết lập chất chuẩn đối chiếu của Hội đồng Dược điển Anh

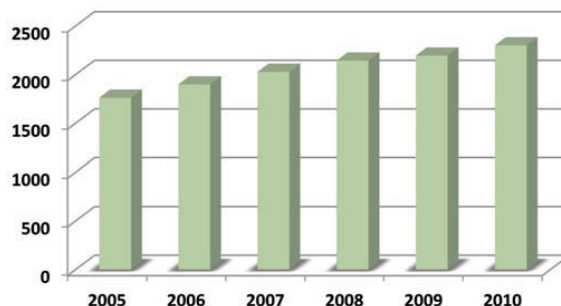
Hội đồng Dược điển Anh có các PTN trực thuộc có nhiệm vụ xây dựng các chuyên luận trong Dược điển Anh, đánh giá các phương pháp phân tích trước khi xem xét đưa vào Dược điển Anh, tư vấn cho nhóm chuyên gia của Hội đồng Dược điển và tham gia vào việc thiết lập CCĐC Dược điển Anh. Các PTN này được đặt tại Teddington, London [59]. Giá của CCĐC Dược điển Anh như sau: chuẩn định lượng £ 108-110, chuẩn tạp £ 94-97 [10].

1.3.2.2. Hoạt động thiết lập chất chuẩn đối chiếu của Hội đồng Dược điển Châu Âu

Hội đồng Dược điển Châu Âu (trực thuộc EDQM) cung cấp chất đối chiếu Dược điển Châu Âu cho tất cả các phép thử và phép định lượng trong các chuyên luận được đề cập trong EP, ngoài ra còn tham gia chương trình hợp tác phát triển CCĐC của Trung tâm hợp tác về CCĐC của WHO [78], [113].

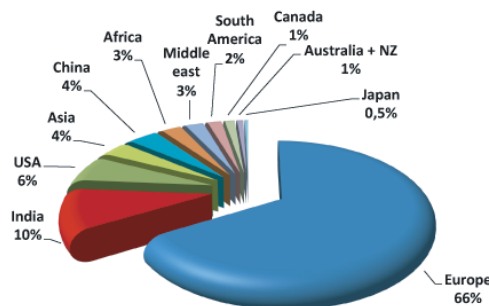
Năm 2010, EDQM thiết lập được 223 CCĐC hóa dược và 3 CCĐC dược liệu, trong đó có 36 CCĐC dùng cho định lượng, 3 CCĐC dược liệu và 48 hỗn hợp.

112 CCĐC được thiết lập mới và 96 lô được thay thế, 461 mẻ được sản xuất. Tổng cộng danh mục CCĐC của EDQM hiện nay gồm 2.300 chất.



Hình 1.8. Sự phát triển số lượng EPCRS [78]

Sự phát triển qua mấy năm gần đây được tóm tắt bởi Hình 1.8 [78]. EPCRS ngày càng được sử dụng nhiều ngoài phạm vi Châu Âu. Phân bố nhu cầu sử dụng theo khu vực địa lí được trình bày ở Hình 1.9. Giá của một lọ EPCRS là 94 EUR [10].



Hình 1.9. Phân bố nhu cầu sử dụng EPCRS theo khu vực địa lí [78]

1.3.2.3. Hoạt động thiết lập chất chuẩn đối chiếu của Hội đồng Dược điển Mỹ

Hội đồng Dược điển Mỹ cung cấp chất chuẩn đối chiếu Dược điển Mỹ (USPRS) cho tất cả các dược chất, tá dược, tạp chất, sản phẩm phân hủy và thực phẩm bổ sung có đề cập đến trong các chuyên luận của USP, bao gồm cả các chất đối chiếu dùng trong Food Chemical Codex.



Hình 1.10. Hình ảnh USPRS [10]

USPRS được sử dụng ở trên 130 quốc gia trên toàn thế giới. Việc thiết lập USPRS được thực hiện bởi ít nhất 3 PTN thành viên đáp ứng tiêu chuẩn.

1.3.2.4. Hoạt động thiết lập chất chuẩn đối chiếu của khu vực ASEAN

Dự án Chất chuẩn đối chiếu hóa học của ASEAN được hỗ trợ kĩ thuật bởi

WHO, được tài trợ bởi UNDP và JPMA, với Thái Lan là nước điều phối viên.

ACRS được thiết lập bởi các PTN quốc gia của một số nước thành viên là Thái Lan, Singapore, Indonexia, Malaysia, Philippin và Việt Nam [65]. ACRS được đóng gói 200 mg/lọ đối với chất đối chiếu hóa học, 100 mg/lọ đối với chất đối chiếu sinh học. Giá 1 lọ chất đối chiếu là 2,000 Bath (~ \$ 50/lọ) [10].



Hình 1.11. Hình ảnh ACRS [10]

1.3.2.5. Hoạt động thiết lập chất chuẩn đối chiếu của Việt Nam

Năm 2004 - 2006, VKNTTU' đã thực hiện đề tài cấp bộ thiết lập được 14 CCĐC quốc gia đáp ứng một phần nhu cầu về CCĐC ngày càng tăng của hệ thống kiểm nghiệm ở Việt Nam, đưa số lượng CCĐC của Quỹ chuẩn Quốc gia tại Viện lên 93 hoạt chất (trong thời điểm đó Quỹ chất chuẩn ASEAN có 125 hoạt chất) [9]. Năm 2006 - 2008, Viện đã thực hiện tiếp đề tài cấp bộ thiết lập được 8 CCĐC là các kháng sinh thế hệ mới, trong đó có 2 chất được cung cấp cho 8 nước trong khu vực ASEAN. Qui trình thiết lập CCĐC của Viện và các CCĐC do Viện thiết lập là cơ sở để các trung tâm kiểm nghiệm khu vực và các nhà sản xuất áp dụng để tiến hành



Hình 1.12. Chất chuẩn đối chiếu hóa học Cefuroxim acetyl [9]



Hình 1.13. Chất chuẩn đối chiếu hóa học Acid Chlorogenic [3]

thiết lập CCĐC của đơn vị mình. Năm 2008-2010, VKNTTU' đã phối hợp với các cơ sở nghiên cứu trong nước như Trường Đại học Dược Hà Nội, Viện Dược liệu,

Viện Hóa học các hợp chất tự nhiên... thực hiện đề tài nghiên cứu cấp Nhà nước thiết lập 10 CCĐC có nguồn dược liệu và thành phẩm thuốc có nguồn gốc dược liệu [3]. Trong số 10 CCĐC này, có một số CCĐC đã có trong danh mục CCĐC Dược điển Mỹ, có một số CCĐC khác chưa có trong bất kì danh mục CCĐC của các Dược điển quốc tế thông dụng nào.

Chương 2

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu

❖ Nguyên liệu dùng để chiết xuất các đối tượng nghiên cứu của đề tài: Vỏ thân cây Múc hoa trắng dùng để chiết xuất Conessin, lá cây Đơn lá đỏ dùng để chiết xuất Kaempferol, lá cây Sen dùng để chiết xuất Nuciferin.

- **Vỏ thân cây Múc hoa trắng** (*Cortex Hollarenae antidysentericae*): Vỏ thân của cây Múc hoa trắng, *Hollarena antidysenterica* Wall., họ Trúc đào (Apocynaceae), được thu mua qua Công ty dược phẩm và thiết bị y tế Hà Tĩnh, đạt tiêu chuẩn cơ sở về nguyên liệu dùng cho sản xuất dược phẩm (nguyên liệu sản xuất viên nén bao phim *Mộc Hoa Trắng HT*). Nguyên liệu nghiên cứu sau khi thu mua được thái lát, sấy khô ở nhiệt độ dưới 60 °C.

- **Lá cây Đơn lá đỏ** (*Folium Excoecariae cochinchinesis*): Lá của cây Đơn lá đỏ, *Excoecaria cochinchinesis* Lour., họ Thầu Dầu (Euphorbiaceae), được thu hái tại Thái Bình vào tháng 5/2008. Nguyên liệu nghiên cứu sau khi thu mua được sấy ở 65 °C trong 24 giờ.

- **Lá Sen** (*Folium Nelumbinis nuciferae*): Lá của cây Sen, *Nelumbo nucifera* Gaert, họ Sen (Nelumbonaceae), thu mua tại Hưng Yên và Hải Dương (tháng 2, 3 và tháng 4/2008). Nguyên liệu nghiên cứu sau khi thu mua được phơi khô.

Các dược liệu được bảo quản nơi khô ráo và được định tính về hóa học và kiểm nghiệm theo tiêu chuẩn dược điển. Dược liệu trước khi chiết được làm thành bột thô hoặc bột nửa mịn (theo qui định của ĐĐVN III).

❖ Nguyên liệu dùng để nghiên cứu ứng dụng chất chuẩn đối chiếu:

- **Lá cây Chè vằng**: Cây Chè vằng có tên khoa học là *Jasminum subtripplinerve* Blume, họ Nhài (Oleaceae). Lá Chè vằng được thu mua ở phố Lãn ông. Nguyên liệu sau khi thu mua được phơi khô.

- **Viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT** của Công ty dược phẩm và thiết bị y tế Hà Tĩnh, số kiểm soát: 270611, hạn dùng: 26/6/2013, mỗi viên chứa:

<i>Cao đặc Mộc hoa trắng (Tiêu chuẩn cơ sở):</i>	<i>136 mg</i>
<i>Berberin clorid (ĐĐVN III):</i>	<i>5 mg</i>
<i>Cao mộc hương (Tiêu chuẩn cơ sở):</i>	<i>10 mg</i>
<i>Tá dược vừa đủ</i>	<i>1 viên</i>

2.1.2. Hóa chất, thuốc thử

❖ Các hóa chất thuốc thử tinh khiết phân tích (PA):

- Amoniac 10% (NH₄OH);
- Ethanol 96%;
- Dung dịch HCl 10%;
- Dung dịch NaOH 10%;
- Dung môi hữu cơ: ether dầu hoả (nhiệt độ sôi 30 – 60 °C), n-hexan, cloroform, ethyl acetat, methanol, toluen, aceton;
- Bản mỏng silica gel G và GF₂₅₄, silica gel dùng cho sắc kí cột (0,02 – 0,06 mm);
- Các thuốc thử Mayer, Dragendorff, Bouchardat, acid picric 1%;
- Dung dịch đệm phosphat pH 7,4: Hòa tan 5,44 g KH₂PO₄ trong 800 ml nước cất. Điều chỉnh đến pH 7,4 bằng NaOH 1M, thêm nước vừa đủ 1000 ml.

❖ Các chất chuẩn liên kết:

- *Conessin*: Chuẩn PTN, nguồn gốc: Viện Kiểm nghiệm dược và sinh phẩm Trung Quốc, số kiểm soát: 110853 - 200605. Hàm lượng 100,0% (nguyên trạng).
- *Kaempferol*: Chuẩn PTN, nguồn gốc: Sigma - Aldrich Chem. Company, số kiểm soát: 018K1225. Hàm lượng 94,4% (nguyên trạng).
- *Nuciferin*: Chuẩn PTN, nguồn gốc: Viện Kiểm nghiệm dược và sinh phẩm Trung Quốc, số kiểm soát: 111566 - 200402. Hàm lượng 99,7% (nguyên trạng).

2.1.3. Thiết bị, dụng cụ

Các thiết bị dụng cụ tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương (được hiệu chuẩn theo ISO/IEC 17025 và GLP), Viện Hóa học, Viện Hóa học các hợp chất

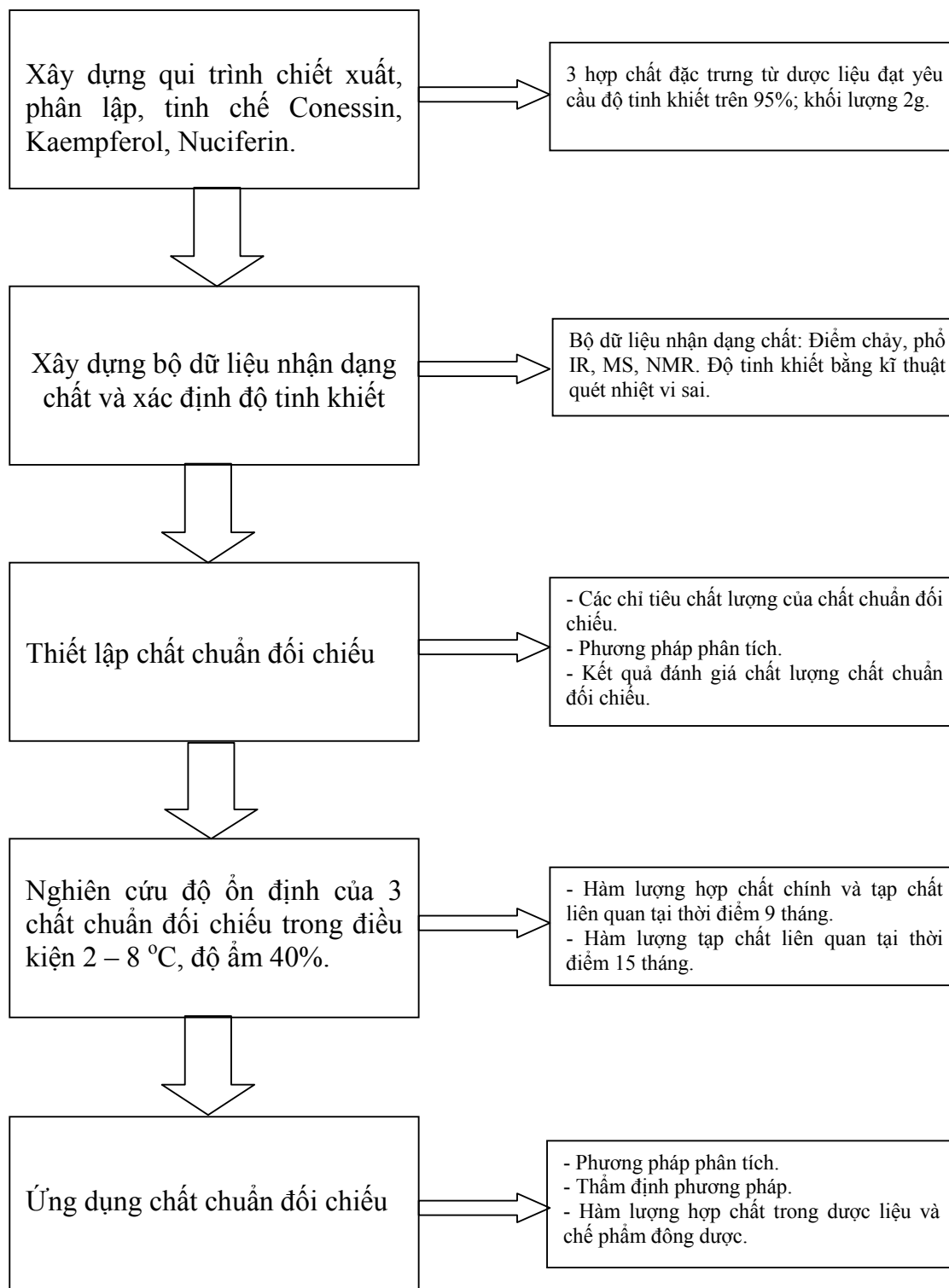
thiên thiên, Trường Đại học Dược Hà Nội, gồm có:

- Dụng cụ thủy tinh các loại; sinh hàn các cỡ; cột thủy tinh các cỡ;
- Bình inox, bình thủy tinh (để ngâm dược liệu);
- Dụng cụ chiết Soxhlet;
- Máy cất thu hồi dung môi Rotavapor Buchi;
- Máy đo điểm nóng chảy BUCHI 535;
- Máy quét nhiệt vi sai SHIMADZU DSC (Differential Scanning Calorimeter) – 60;
- Máy quang phổ tử ngoại khả kiến (UV – VIS) Agilent Technologies 8453;
- Máy đo phổ hồng ngoại 670- FTIR Nicolet- Nexus;
- Cân phân tích Mettler Toledo AB 204 (0,01 mg);
- Cân phân tích XB 220A Precisa (0,1 mg);
- Thiết bị sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC) AGILENT TECHNOLOGIES 1200 với detector UV –VIS (PDA); cột sắc kí RP 18 với các kích thước hạt và kích thước cột khác nhau;
- Thiết bị sắc kí lỏng khối phổ (LC–MS) THERMO – FINNIGAN LCQ advantage max;
- Thiết bị LC–MS AGILENT TECHNOLOGIES 1100 LC-MSD TRAP;
- Máy cộng hưởng từ Bruker Avance AM500FT- NMR;
- Buồng sạch GLOVE BOX LABCONCO....

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Sơ đồ nghiên cứu

Sơ đồ nghiên cứu được trình bày ở Hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ nghiên cứu

2.2.2. Thiết kế thí nghiệm

- *Cỡ mẫu*: Tùy theo hàm lượng hợp chất đặc trưng trong dược liệu, khối lượng dược liệu (cỡ mẫu) sử dụng đủ để chiết xuất nhiều mẻ nhằm thu được 2,0 g hợp chất (không kể lượng đem phân tích). Hàm lượng nước trong dược liệu được xác định bằng phương pháp *Xác định mất khối lượng do làm khô* (ĐBVN III, Phụ lục 5.16) hoặc xác định bằng máy đo hàm ẩm Sartorius MA45 [4].

- *Chiết xuất, phân lập, tinh chế*: Tiến hành thí nghiệm tại các phòng thí nghiệm đủ điều kiện thiết bị (Trường Đại học Dược Hà Nội, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên).

- *Phân tích và kiểm nghiệm*: Yêu cầu phải tiến hành tại các PTN đạt tiêu chuẩn, có thẩm quyền và có đủ điều kiện tham gia đánh giá trong khu vực và quốc tế. Vì vậy, các nghiên cứu này cần phải tiến hành tại Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương, nơi được WHO công nhận là Trung tâm thiết lập và đánh giá chuẩn khu vực, đồng thời cũng là nơi có hệ thống PTN đạt tiêu chuẩn GLP theo WHO, và đạt tiêu chuẩn quốc tế ISO IEC 17025. Thiết bị sử dụng trong các thí nghiệm phân tích được hiệu chuẩn theo qui định. Trong giai đoạn thiết lập chất chuẩn còn có sự tham gia của Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh để đánh giá liên PTN.

2.2.3. Chiết xuất, phân lập và tinh chế

2.2.3.1. Chiết xuất, phân lập, tinh chế

❖ *Chiết xuất*

Để chiết được nhóm chất chứa đối tượng nghiên cứu phải xây dựng được các qui trình chiết xuất thích hợp. Tùy theo tính chất của mỗi chất mà sử dụng dung môi có độ phân cực khác nhau. Khảo sát sự ảnh hưởng của nhiệt độ đến quá trình chiết xuất (chiết nguội, chiết nóng) để đảm bảo hợp lý cả hai yêu cầu: chiết được tối đa lượng chất nghiên cứu và tối thiểu tạp chất để thuận tiện cho quá trình phân lập và tinh chế tiếp theo [8], [49].

▪ Đối với hợp chất alkaloid (Conessin, Nuciferin): Alkaloid nói chung là các base yếu, thường tồn tại trong cây dưới dạng muối của các acid hữu cơ và vô cơ, vì

vậy có thể dùng các dung dịch kiềm trung bình hoặc kiềm mạnh để giải phóng hợp chất ra khỏi muối, sau đó sử dụng một trong những kỹ thuật sau [119]:

- Chiết bằng dung môi hữu cơ ở môi trường kiềm
- Chiết bằng dung dịch acid loãng trong cồn hoặc nước
- Chiết bằng cồn.

▪ Đối với hợp chất flavonoid: Sử dụng phương pháp ngâm lạnh hoặc chiết nóng với ethanol ở các độ cồn khác nhau. Ở mỗi độ cồn tiến hành theo 2 cách (có acid hoá hoặc không acid hoá) để thu căn flavonoid toàn phần. Loại bớt tạp chất bằng cloroform rồi chiết nhóm chất chứa đối tượng nghiên cứu bằng ethyl acetat.

❖ *Phân lập*

Sử dụng sắc ký cột với các loại pha tĩnh hấp phụ (silica gel), phân bố pha đảo (C_{18}), thẩm qua gel (Sephadex LH-20). Tùy theo từng chất mà chọn pha tĩnh thích hợp hoặc phải kết hợp sử dụng các pha tĩnh khác nhau. Khảo sát lựa chọn dung môi rửa giải bằng TLC [119], [136], [137.]

❖ *Tinh chế*

- Kết tinh trong dung môi: hòa tan bão hòa tinh thể sau phân lập vào một lượng nhỏ dung môi ở nhiệt độ nóng, khi làm lạnh hoặc bay hơi dung dịch có hiện tượng quá bão hòa và hợp chất chính kết tinh trong khi tạp chất chưa đạt được nồng độ bão hòa vẫn nằm trong dung dịch, lọc lấy tinh thể. Kết tinh lại nhiều lần sẽ thu được hợp chất có độ tinh khiết theo yêu cầu [119].

- Lặp lại quá trình sắc ký cột giống như giai đoạn phân lập, lựa chọn phân đoạn tinh khiết hơn hoặc thay đổi dung môi rửa giải hay tỉ lệ thành phần của dung môi rửa giải.

- Tiến hành sắc ký cột như giai đoạn phân lập, nhưng thay đổi kiểu sắc ký, ví dụ như giai đoạn phân lập sử dụng sắc ký hấp phụ pha thuận trên silica gel, giai đoạn tinh chế sử dụng sắc ký phân bố pha đảo trên C_{18} hoặc sắc ký thẩm qua gel [119].

2.2.3.2. Định tính đối tượng nghiên cứu trong sản phẩm chiết xuất, phân lập, tinh chế

❖ Định tính bằng sắc kí lớp mỏng

Sử dụng TLC để xác định sự có mặt của đối tượng nghiên cứu trong dịch chiết, kiểm tra vết trong quá trình phân lập để xác định phân đoạn có chứa hợp chất nghiên cứu và giúp tìm hệ dung môi phân lập thích hợp [119].

Cách tiến hành: Dược liệu sau khi xử lý sơ bộ được chiết bằng dung môi phù hợp. Xử lý dịch chiết sao cho dung dịch thử thu được chứa hợp chất đặc trưng với nồng độ khoảng 1 mg/ml theo lý thuyết. Triển khai TLC trên bản mỏng silica gel tráng sẵn, phát hiện chất bằng kỹ thuật phun hiện màu với các thuốc thử đặc trưng. Dung dịch chất đối chiếu tương ứng pha trong dung môi có nồng độ 1mg/ml. Đối với mỗi chất, khảo sát các hệ dung môi triển khai khác nhau và lựa chọn hệ có khả năng phân tách tốt nhất.

❖ Định tính bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao (HPLC)

HPLC được sử dụng kết hợp với TLC để kiểm tra sự có mặt của hợp chất là đối tượng nghiên cứu ngay từ khâu định tính dược liệu và trong quá trình chiết xuất bằng cách so sánh thời gian lưu t_R , phổ PDA của mẫu thử và mẫu đối chiếu [6], [7].

2.2.3.3. Định lượng đối tượng nghiên cứu trong sản phẩm chiết xuất, phân lập, tinh chế

❖ Định lượng bằng phương pháp cân

Phương pháp cân được sử dụng để sơ bộ xác định lượng hợp chất toàn phần hay lượng sản phẩm chiết được, xác định lượng hợp chất phân lập, qua đó tính được hiệu suất của mỗi quá trình. Đây là phương pháp đơn giản, chủ yếu được sử dụng để đánh giá hiệu suất chiết và phân lập.

Hàm lượng hợp chất toàn phần chiết được từ dược liệu theo công thức:

$$X\% = \frac{n}{m(1 - ha)} \times 100 \quad (1)$$

trong đó:

- X : hàm lượng hợp chất toàn phần trong mẫu dược liệu
- n : khối lượng hợp chất toàn phần chiết xuất được
- M : khối lượng dược liệu đem chiết
- Ha : hàm ẩm của dược liệu

❖ *Định lượng các hợp chất đặc trưng trong các sản phẩm bằng HPTLC*

Sử dụng HPTLC để xác định sơ bộ hàm lượng của hợp chất trong các sản phẩm chiết xuất, phân lập và tinh chế. Kỹ thuật này được dùng khi hỗn hợp phức tạp khó tách bằng HPLC hay có thể gây hỏng cột [119].

❖ *Định lượng các hợp chất đặc trưng trong các sản phẩm bằng HPLC*

Sử dụng HPLC để xác định hàm lượng của hợp chất trong các sản phẩm chiết, phân lập, tinh chế, kiểm tra tạp chất.

2.2.4. Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất

Các hợp chất đối tượng nghiên cứu của đề tài đều là những chất đã biết cấu trúc. Dữ liệu chuẩn dùng để nhận dạng chất nhằm cung cấp thông tin cho thiết lập hồ sơ nhận dạng chuẩn. Việc nhận dạng chất dựa vào:

- So sánh phổ của chất phân tích với phổ chất chuẩn trong cùng điều kiện.
- So sánh thông tin phổ, dữ liệu hóa lí, hằng số vật lí của chất với tài liệu khoa học hoặc thông tin đã công bố. Tập hợp các dữ liệu chuẩn đó có thể khẳng định được hợp chất là đúng đối tượng nghiên cứu.

Các phương pháp được sử dụng để xây dựng bộ dữ liệu gồm có: Đo điểm chảy; đo phổ tử ngoại khả kiến (trong dung môi MeOH), đo phổ hồng ngoại (trong KBr); đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1 chiều (H^1 NMR, C^{13} NMR, DEPT) và 2 chiều (COSY, HMBC, HSQC), đo phổ khối lượng (MS) [4].

2.2.5. Đánh giá độ tinh khiết và phân tích tạp chất

❖ *Sắc kí lớp mỏng*: TLC được sử dụng để đánh giá độ tinh khiết dựa vào sự có mặt của vết duy nhất hoặc vết chính là vết của đối tượng phân tích. Chất càng tinh khiết khi không có vết phụ hoặc vết phụ càng nhỏ [6], [7].

❖ *Quét nhiệt vi sai*: Sử dụng thiết bị DSC (Differential Scanning Calorimetry) để xác định thông số nhiệt lượng, qua đó đánh giá mức độ tinh khiết của chất chuẩn [123].

❖ *Sắc kí lỏng hiệu năng cao*: Sử dụng HPLC để xác định cụ thể số lượng tạp chất và tính gần đúng tỉ lệ tạp chất dựa trên tỉ lệ phần trăm diện tích pic [4], [59], [133].

2.2.6. Thiết lập chất chuẩn và xây dựng tiêu chuẩn đánh giá chất chuẩn

2.2.6.1. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng

❖ *Xây dựng chỉ tiêu chất lượng*:

Căn cứ vào tính chất lí – hóa của nguyên liệu thiết lập chuẩn và các CTCL thông thường của CCĐC sơ cấp để xây dựng các CTCL của CCĐC cần thiết lập.

❖ *Xây dựng phương pháp đánh giá*:

- Tham khảo DĐVN và các dược điển quốc tế để lựa chọn phương pháp phù hợp đánh giá các CTCL.

- Khảo sát lựa chọn chương trình sắc kí thích hợp để định lượng và xác định tạp chất.

Dựa trên công thức phân tử và cấu trúc hóa học của các hợp chất chiết xuất từ dược liệu để tìm các điều kiện sắc kí phù hợp như: Bản chất pha tĩnh, thành phần pha động, bước sóng phát hiện, tốc độ dòng pha động, thể tích tiêm mẫu, nồng độ dung dịch thử, dung môi pha mẫu.

- Thẩm định phương pháp phân tích theo các chỉ tiêu:

- Tính đặc hiệu (Specificity)

- Độ tuyến tính và khoảng nồng độ tuyến tính (Linearity and range)

- Độ chính xác (Precision)

- Độ đúng (Accuracy): Độ đúng được xác định bằng phương pháp thêm chuẩn và tính thông qua tỷ lệ thu hồi:

$$\text{Tỷ lệ thu hồi (\%)} = \frac{\text{Hàm lượng tìm thấy}}{\text{Hàm lượng thực cho vào}} \times 100 \quad (2)$$

- Giới hạn phát hiện LOD và giới hạn định lượng LOQ
- Sự phù hợp của hệ thống sắc ký (System suitability)

2.2.6.2. Quy trình thiết lập và phân tích đánh giá chất chuẩn

❖ Đánh giá nguyên liệu thiết lập chất chuẩn

Nguyên liệu để thiết lập chất chuẩn là các hợp chất đặc trưng chiết tách từ dược liệu, có độ tinh khiết trên 95,0%. Áp dụng phương pháp phân tích đã thẩm định để đánh giá nguyên liệu có đáp ứng yêu cầu chất lượng không.

- Định tính: Tiến hành phương pháp đo phổ IR, NMR hoặc phối hợp thêm phương pháp HPLC.

- Xác định độ tinh khiết: Sử dụng một trong các phương pháp HPLC, DSC, đo điểm chảy hoặc phối hợp.

Công thức tính hàm lượng tạp chất gần đúng theo tỉ lệ diện tích pic khi áp dụng phương pháp HPLC:

$$C_{tap} \% = \frac{S_{pic}}{\sum S_{pic}} \times 100 \quad (3)$$

trong đó:

C_{tap} : tỉ lệ phần trăm tạp chất trong mẫu phân tích

S_{pic} : diện tích pic tạp chất

$\sum S_{pic}$: tổng diện tích pic

- Xác định hàm lượng: Sử dụng phương pháp HPLC đã được thẩm định, tiến hành song song với chất chuẩn liên kết.

Công thức tính hàm lượng hợp chất chính (theo nguyên trạng):

$$C\% = \frac{m_{chuan}}{V_{chuan}} \times \frac{S_{thu}}{S_{chuan}} \times \frac{V_{thu}}{m_{thu}} \times 100 \quad (4)$$

trong đó:

C : hàm lượng hoạt chất tính theo phần trăm

m_{chuan} : khối lượng chất chuẩn liên kết

m_{thu} : khối lượng mẫu thử

S_{chuan} : diện tích pic của mẫu chuẩn liên kết

S_{thu} : diện tích pic của mẫu thử

V_{chuan} : thể tích pha mẫu chuẩn

V_{thu} : thể tích pha mẫu thử

❖ Đóng gói

Nguyên liệu sau khi được đánh giá theo qui trình và đạt yêu cầu về chất lượng được đưa vào đóng lọ theo các bước qui định trong VKN/TT/21.20 [50]. Sử dụng lọ thủy tinh nâu, nút xoáy có lớp đệm Teflon đạt tiêu chuẩn chất lượng theo qui định. Để đảm bảo chất lượng của chất đối chiếu trong suốt thời gian bảo quản và sử dụng thì việc đóng gói các CCĐC dự kiến được tiến hành trong Glove - Box là nơi có thể kiểm soát được độ ẩm. Tiến hành trong Glove – box đã nạp khí nitơ 99,99%, độ ẩm tương đối trong buồng đóng khoảng 40%. Khối lượng 20 mg/lọ. Dán nhãn có ghi tên hoạt chất và đánh số thứ tự cho từng lọ [65], [66], [148].

❖ Đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng gói

Sử dụng cách lấy mẫu ngẫu nhiên, số lượng lọ được lấy để tiến hành kiểm tra $\sqrt{N} + 1$ trong đó N là tổng số lọ đóng được (ít nhất 5 lọ). Tiến hành xác định hàm lượng của hoạt chất trong từng lọ, sử dụng phương pháp phân tích giống như đánh giá sơ bộ. Đánh giá kết quả theo kỹ thuật thống kê [65], [66], [148].

Yêu cầu: Lô sản xuất được coi là đồng nhất khi giá trị RSD của kết quả hàm lượng giữa các lọ được kiểm tra nhỏ hơn 1,0%. Với kết quả này có thể kết luận điều kiện đóng gói ổn định, mẫu nguyên liệu đóng trong các lọ là đồng nhất.

2.2.6.3. Đánh giá liên phòng thí nghiệm chất lượng chất chuẩn đối chiếu

Thành phẩm sau khi đóng gói được lấy ngẫu nhiên theo qui định $\sqrt{N} + 1$ (N là tổng số lọ đóng được) gửi đến ít nhất 2 PTN để đánh giá lại chỉ tiêu định lượng. Mỗi PTN sẽ nhận được 5 lọ mẫu kèm theo chất chuẩn liên kết, qui trình phân tích

và các tài liệu có liên quan khác [65], [66], [148].

2.2.6.4. Phương pháp xử lý số liệu

❖ Xử lý kết quả phân tích trong từng phòng thí nghiệm

Tập hợp kết quả và loại giá trị thô theo qui tắc của test – Dixon.

- Tính giá trị trung bình:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (5)$$

- Tính độ lệch chuẩn:

$$S = \sqrt{\frac{1}{(n-1)} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{X})^2} \quad (6)$$

- Tính độ lệch chuẩn tương đối:

$$RSD = \frac{S}{\bar{X}} \times 100\% \quad (7)$$

trong các công thức (5), (6), (7):

$\bar{X}$: giá trị trung bình của hàm lượng hợp chất chính

x_i : giá trị của hàm lượng hợp chất chính của mẫu thứ i

n : số thử nghiệm được sử dụng để tính giá trị trung bình về hàm lượng của hợp chất chính

S : độ lệch chuẩn

RSD : độ lệch chuẩn tương đối

❖ Xử lý kết quả phân tích liên phòng thí nghiệm

Áp dụng phương pháp thống kê phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA-one way) theo qui định trong ISO 13528.

❖ Đánh giá độ tái lập của phương pháp phân tích

Phân tích phương sai một yếu tố để đánh giá sự ảnh hưởng của một yếu tố nào đó trên các giá trị quan sát x_i ($i = 1, 2, \dots, k$). Áp dụng phương pháp thống kê phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA – one way) xử lý kết quả phân tích của các PTN tham gia, để đánh giá ảnh hưởng của việc thay đổi PTN, từ đó kết luận

phương pháp phân tích lựa chọn có độ tái lập hay không.

Bảng 2.1. Mô hình phòng thử nghiệm

Số phòng thử nghiệm					
	1	2		P	
	X ₁₁	X ₂₁		X _{p1}	
	X ₁₂	X ₂₂		X _{p2}	
	...	...		...	
	X _{1n}	X _{2n}		X _{pn}	
Trung bình $\bar{X}_{(i)}$	$\bar{X}_{(1)}$	$\bar{X}_{(2)}$		$\bar{X}_{(p)}$	
Độ lệch chuẩn $S_{(i)}$	$S_{(1)}$	$S_{(2)}$		$S_{(p)}$	$S_{total}^2 = \frac{\sum_{i=1}^N x_i}{E - 1}$

Bảng 2.2. Bảng ANOVA

Nguồn sai số	Tổng số bình phương (SS)	Bậc tự do (v)	Bình phương trung bình (MS)	Giá trị F_{tn}	Giá trị F_{tc}
Giữa các nhóm (B)	$SS_B = SS_{TOTAL} - SS_W$	$A = (E - 1) - [p(n - 1)]$	$MS_B = \frac{SS_B}{A}$	$F_{tn} = \frac{MS_B}{MS_W}$	
Trong một nhóm (W)	$SS_W = \sum_{i=1}^p v_i S_i^2$	p (n-1)	$MS_W = \frac{SS_W}{p(n - 1)}$		
Tổng cộng (total)	$SS_{total} = (N - 1)S_{total}^2$	E - 1			

trong đó:

p: Số phòng thử nghiệm tham gia đánh giá hợp tác.

E: Tổng số kết quả của p phòng thử nghiệm

n: Tổng số kết quả của một phòng thử nghiệm

Biện luận:

- Nếu $F_{tn} < F_{tc} (p - 1; E - p)$: Phương pháp phân tích có độ lặp lại trong từng PTN và có độ tái lặp giữa các PTN.
- Nếu $F_{tn} > F_{tc} (p - 1; E - p)$: Phương pháp phân tích có độ lặp lại trong từng PTN nhưng không có độ tái lặp giữa các PTN.

❖ *Xác định giá trị công bố trên COA*: Được tiến hành khi $F_{tn} \leq F_{tc}$

Vì khối lượng các hợp chất tinh chế được đều khá nhỏ không đủ để tiến hành xác định độ ẩm, nên các kết quả định lượng đều được tính theo nguyên trạng.

❖ *Xác định giá trị ấn định*

GTAD được xử lý thống kê từ tập hợp kết quả của các PTN độc lập tham gia đánh giá hợp tác (yêu cầu số phép thử $n \geq 11$), cùng sử dụng phương pháp phân tích qui định trong qui trình thiết lập chất chuẩn. Cách tính GTAD như sau:

Bước 1:

Nhập số liệu x_i là tập hợp kết quả của các PTN tham gia, sắp xếp theo thứ tự tăng dần: $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_p$

Bước 2:

Qui ước: Giá trị trung bình thực (robust average) $\bar{x}_{(n)}^*$.

Độ lệch chuẩn thực (robust standard deviation) $s_{(n)}^*$.

Tính giá trị trung bình thực (robust average) $\bar{x}_{(n)}^*$ và độ lệch chuẩn thực (robust standard deviation) $s_{(n)}^*$ của dãy kết quả:

Tính giá trị $\bar{x}_{(0)}$ và $s_{(0)}$:

$\bar{x}_{(0)}$: Giá trị trung vị của dãy kết quả sắp xếp tăng dần.

Cách tính: $\bar{x}_{(0)}$ là giá trị chính giữa dãy nếu p là số lẻ

$$\bar{x}_{(0)} = \frac{x_{p/2} + x_{p/2+1}}{2} \quad \text{nếu p là số chẵn} \quad (8)$$

$$s_{(0)} = 1,483 \times \text{trung vị của dãy } |x_i - \bar{x}_{(0)}|, \text{ (với } i = 1, 2, \dots, p)$$

Cập nhật giá trị $x_{i(1)}^*$ như sau:

$$\text{Tính } \delta_{(1)} = 1.5s_{(0)} \quad (9)$$

Với mỗi giá trị x_i trong dãy kết, tính giá trị $x_{i(1)}^*$

$$x_{i(1)}^* = \bar{x}_{(0)} - \delta_{(1)} \text{ nếu } x_i < \bar{x}_{(0)} - \delta_{(1)} \quad (10)$$

$$x_{i(1)}^* = \bar{x}_{(0)} + \delta_{(1)} \text{ nếu } x_i > \bar{x}_{(0)} + \delta_{(1)} \quad (11)$$

$$x_{i(1)}^* = x_i \text{ khi } \bar{x}_{(0)} - \delta_{(1)} < x_i < \bar{x}_{(0)} + \delta_{(1)}$$

Tính giá trị $\bar{x}_{(1)}^*$ và $s_{(1)}^*$ theo công thức:

$$\bar{x}_{(1)}^* = \frac{\sum_{i=1}^p x_{i(1)}^*}{p} \quad (12)$$

$$s_{(1)}^* = 1,134 \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (x_{i(1)}^* - \bar{x}_{(1)}^*)^2}{p-1}} \quad (13)$$

Bước 3:

Tiến hành tính toán lặp lại bước 2 cho đến khi giá trị $s_{(n)}^*$ không thay đổi ở số thứ 3 sau dấu phẩy và giá trị $\bar{x}_{(n)}^*$ không thay đổi thì dừng lại.

Chọn giá trị $\bar{x}_{(n)}^*$ cuối cùng là GTAD sử dụng để tính giá trị Z – Score.

$$\bar{x}_{(n)}^* = \frac{\sum_{i=1}^p x_{i(n)}^*}{p} \quad (14)$$

❖ Xác định giá trị công bố của chất chuẩn

Tính giá trị $|Z|$ - Score: Đánh giá độ lệch giữa từng giá trị riêng so với

$$\text{GTAD} \quad |Z| = \frac{(x_i - \bar{x}_{(n)}^*)}{s^*} \quad (15)$$

trong đó: x_i : Giá trị riêng của từng phòng thử nghiệm

$\bar{x}_{(n)}^*$: Giá trị trung bình của các phòng thử nghiệm.

s^* : Độ lệch chuẩn

Kết quả phân tích tương ứng với giá trị $|Z| \leq 2$: Đạt

Kết quả phân tích tương ứng với giá trị $|Z| > 2$: Loại bỏ

Chọn các kết quả có giá trị $|Z| \leq 2,0$ để tính giá trị trung bình.

❖ *Tính độ không đảm bảo đo của kết quả công bố trên chứng chỉ:*

Kết quả công bố trên chứng chỉ phân tích là giá trị trung bình từ tập hợp các kết quả phân tích có giá trị $|Z| \leq 2,0$ được tính toán theo phương pháp thống kê với số phép thử $n \geq 11$, do đó độ không đảm bảo đo của giá trị này được tính theo loại A, với hệ số phủ $k = 2$ ở mức tin cậy 95% là:

$$U = \frac{S}{\sqrt{n}} \times 2 \quad (16)$$

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ CÁC HỢP CHẤT TỪ DƯỢC LIỆU

3.1.1. Chiết xuất, phân lập và tinh chế Conessin từ Múc hoa trắng

3.1.1.1. Chiết xuất alkaloid toàn phần từ vỏ thân Múc hoa trắng

Chuẩn bị nguyên liệu: vỏ thân Múc hoa trắng được thái lát, sấy khô ở nhiệt độ dưới 60 °C trong tủ sấy, nghiền thành bột thô rồi tiến hành chiết xuất theo 3 phương pháp khác nhau:

❖ *Chiết alkaloid bằng dung môi hữu cơ trong môi trường kiềm (PP₁)*

Cân khoảng 300 g dược liệu đã xay nhỏ dưới dạng bột thô, thấm ảm bằng NH₄OH đậm đặc, sau đó dàn tơi và làm khô trong khay men. Chiết bằng cloroform trong đến kiệt alkaloid. Trước hết cho cloroform vào ngập hết dược liệu. Ngâm trong 8 giờ, rút dịch chiết. Chiết thêm 5 lần nữa, mỗi lần bổ sung cloroform đến ngập dược liệu (khoảng 50 ml), ngâm trong 8 giờ. Gạn và lọc dịch chiết. Cát thu hồi cloroform. Cô cách thủy dịch chiết để thu được cặn alkaloid toàn phần.

❖ *Chiết bằng dung dịch acid loãng (PP₂)*

Cân khoảng 300 g bột dược liệu, thấm ảm dược liệu bằng một lượng dung dịch HCl 10%, bổ sung dung dịch HCl 10% đến ngập hết dược liệu (tổng cộng khoảng 1350 ml), ngâm trong 24 giờ. Chiết bột dược liệu bằng dung dịch HCl 10% thêm 3 lần, mỗi lần với 400 ml dung dịch HCl 10% bằng phương pháp ngâm lạnh trong 6 - 8 giờ. Gạn lấy dịch chiết và lọc. Gộp các dịch lọc. Kiểm hóa dịch lọc bằng amoniac đặc đến pH = 9 - 10. Để lắng và gạn bỏ phần dịch trong ở trên qua giấy lọc. Hút kiệt nước. Chiết alkaloid base trong cặn và giấy lọc bằng cloroform 6 lần, mỗi lần với 250 ml. Cát thu hồi cloroform, cô cách thủy dịch chiết để thu được cặn alkaloid toàn phần.

❖ *Chiết bằng cồn (PP₃)*

Cân khoảng 300 g bột dược liệu. Thấm ẩm bột dược liệu bằng một lượng ethanol 90° vừa đủ rồi bổ sung ethanol 90° đến ngập hết dược liệu (tổng cộng khoảng 1200 ml) và ngâm trong 24 giờ. Rút dịch chiết và lọc. Tiếp tục chiết bằng ethanol 90° đến khi dịch chiết trong suốt (khoảng 3 lần nữa). Mỗi lần bổ sung ethanol 90° đến ngập hết dược liệu (khoảng 125 ml) và ngâm trong 24 giờ. Gộp các dịch chiết thu được đem lọc. Cất thu hồi cồn, cô cách thủy đến cạn nhão. Hoà tan cặn nhão trong khoảng 50 ml dung dịch HCl 10%, khuấy kỹ và ngâm trong 24 giờ. Gạn dịch acid và tiếp tục hoà tan bằng dung dịch HCl 10% như vậy 2 lần nữa. Lọc dịch acid và xử lý tiếp qua các khâu kiểm hoá bằng amoniac đặc đến pH = 9 - 10, chiết alcaloid base bằng cloroform, cất thu hồi dung môi và cô cách thủy thu cặn toàn phần tương tự như chiết bằng acid loãng (PP2).

Với mỗi phương pháp thực hiện chiết xuất 5 lần, mỗi lần với 300 g dược liệu được xay thô và sấy khô. Xác định lượng cặn alcaloid toàn phần thu được bằng phương pháp cân. Tính hiệu suất thu được từ từng lần chiết của mỗi phương pháp (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Hiệu suất chiết alcaloid toàn phần từ vỏ thân Múc hoa trắng

S T T	Lượng dược liệu đem chiết (g)	PP ₁		PP ₂		PP ₃	
		<i>Khối lượng alcaloid toàn phần (g)</i>	<i>Hiệu suất (%)</i>	<i>Khối lượng alcaloid toàn phần (g)</i>	<i>Hiệu suất (%)</i>	<i>Khối lượng alcaloid toàn phần (g)</i>	<i>Hiệu suất (%)</i>
1	300	15,06	5,02	9,51	3,17	7,53	2,51
2	300	15,72	5,24	11,10	3,27	7,02	2,34
3	300	14,49	4,83	10,20	3,40	8,01	2,67
4	300	15,39	5,13	9,42	3,14	7,89	2,63
5	300	14,22	4,74	9,21	3,07	7,35	2,45
Trung bình (%)			5,01		3,21		2,52

Nhận xét:

- *Chiết alkaloid bằng dung môi hữu cơ trong môi trường kiềm:* Phương pháp này thu được căn alkaloid toàn phần với hiệu suất trung bình là $5,01 \pm 0,031\%$. Hàm lượng Conessin có trong căn xác định được bằng HPTLC là 32,06%. Tuy là phương pháp cho hiệu suất chiết cao nhất nhưng sản phẩm lẫn nhiều tạp chất, đặc biệt là nhựa. Lượng căn tuy nhiều, hàm lượng hoạt chất chính là Conessin khá cao, nhưng lại nhiều nhựa gây khó khăn cho quá trình phân lập tiếp theo.

- *Chiết alkaloid bằng cồn:* Phương pháp này thích hợp cho qui mô chiết xuất với lượng mẫu lớn. Lượng mẫu nghiên cứu tại phòng thí nghiệm mỗi lần không nhiều, do đó không cần thiết theo phương pháp này, hơn nữa hiệu suất của phương pháp này là thấp nhất chỉ đạt được $2,52 \pm 0,018\%$ và hàm lượng conessin có trong căn xác định chỉ là 18,97%.

- *Chiết alkaloid bằng dung dịch acid loãng:* Hiệu suất chiết tương đối cao, hiệu suất trung bình thu được là $3,21 \pm 0,016\%$, dễ thực hiện, dung môi dễ kiếm. Mặt khác hàm lượng Conessin có trong căn cũng khá cao 30,32%. Do đó phương pháp này được lựa chọn để chiết xuất alkaloid toàn phần từ vỏ thân Múc hoa trắng.

Từ kết quả khảo sát, và nâng khối lượng dược liệu lên 400 g, qui trình chiết alkaloid toàn phần từ vỏ thân Múc hoa trắng được xác định như sau:

Qui trình chiết xuất alkaloid toàn phần từ vỏ thân cây Múc hoa trắng:

Cân khoảng 400 g bột dược liệu, làm ẩm bằng 100 ml dung dịch HCl 10%, bổ sung 1 600 ml dung dịch HCl 10% đến ngập hết dược liệu và ngâm trong 24 giờ. Rút dịch chiết và lọc. Tiếp tục chiết thêm bột dược liệu 2 lần nữa bằng cách bổ sung 600 ml dung dịch HCl 10% đến ngập dược liệu, mỗi lần ngâm lạnh trong 6 - 8 giờ. Gạn để thu dịch chiết và lọc. Gộp các dịch chiết acid thu được, kiềm hóa dịch chiết acid bằng amoniac đặc đến pH = 9 - 10. Để lắng và gạn bỏ phần dịch ở trên bằng cách lọc qua giấy lọc. Hút kiệt nước. Có thể tiến hành li tâm rồi gạn bỏ dịch nước ở trên, thu được căn. Chiết alkaloid base trong

cẩn và giấy lọc nhiều lần bằng cloroform, mỗi lần 300 ml, cho đến khi thử bằng thuốc thử *Dragendorff* không cho tủa vàng. Gộp dịch chiết, cất thu hồi cloroform dưới áp suất giảm. Chuyển cẩn thu được ra cốc có mỏ, cô cách thủy tới cạn, sấy ở 60 °C trong 3 giờ, thu được 12,0 g alcaloid toàn phần. Qui trình chiết xuất alcaloid toàn phần từ vỏ thân Múc hoa trắng được thể hiện tóm tắt như sơ đồ ở Phụ lục 1.

3.1.1.2. Phân lập Conessin từ alcaloid toàn phần của vỏ thân Múc hoa trắng

❖ Phân lập chỉ sử dụng dung môi ether dầu hoả:

Cẩn alcaloid toàn phần thu được sau tiến hành chiết từ 400 g dược liệu được chiết 4 lần với ether dầu hoả, mỗi lần 200 ml. Lọc và gộp các dịch chiết ether dầu hoả. Lắc dịch chiết ether dầu hoả với dung dịch HCl 10% 3 lần, mỗi lần 150 ml. Gạn thu lấy dịch chiết nước acid. Kiểm hoá dịch chiết nước bằng dung dịch Na₂CO₃ đến pH = 9 - 10 bằng cách cho từ từ dung dịch Na₂CO₃ vào dịch chiết nước đồng thời khuấy đều đến khi dung dịch trong và không có bọt. Chiết Conessin base trong dịch chiết nước đã kiểm hoá với ether dầu hỏa 4 lần, mỗi lần 200 ml. Làm khan, cất thu hồi ether dầu hỏa đến cạn. Cẩn thu được hòa tan trong dung dịch ethanol của acid oxalic (dung dịch acid oxalic trong ethanol 17,5%). Để yên ở nhiệt độ thường thu được tinh thể Conessin hydrooxalat. Hòa tan tinh thể Conessin hydrooxalat trong nước, cho từ từ dung dịch Na₂CO₃ vào kiểm hóa đến pH = 9 - 10 đến khi hết bọt để tạo tủa Conessin base. Chiết Conessin base bằng ether dầu hỏa 4 lần, mỗi lần 30 ml. Cất thu hồi ether dầu hỏa được cẩn Conessin. Đem kết tinh cẩn Conessin trong aceton thu được Conessin tinh khiết.

❖ Phân lập sử dụng phối hợp dung môi ether dầu hoả với ethyl ether:

Cẩn alcaloid toàn phần cũng được chiết 4 lần với ether dầu hỏa, mỗi lần 200 ml nhưng được chiết thêm lần thứ 5 bằng ethyl ether (200 ml) để thu hồi nốt phần Conessin còn lại. Lọc và gộp các dịch chiết ether dầu hỏa thu được qua 4 lần chiết. Lắc dịch chiết ether dầu hỏa với dung dịch HCl 10% 4 lần, mỗi lần 150 ml. Gạn thu lấy dịch chiết nước acid. Kiểm hoá dịch chiết nước bằng dung dịch

Na_2CO_3 đến pH = 9 - 10 bằng cách cho từ từ dung dịch Na_2CO_3 vào dịch chiết nước đồng thời khuấy đều đến khi dung dịch trong và không có bọt. Chiết Conessin base trong dịch chiết nước đã kiềm hoá với ether dầu hỏa 4 lần, mỗi lần 200 ml. Gộp các dịch chiết để thu được dịch chiết ether dầu hỏa 1. Dịch chiết ethyl ether ở trên được lắc với dung dịch HCl 10%. Kiềm hoá dịch chiết nước acid thu được bằng amoniac đậm đặc đến pH = 9 - 10. Để lắng hoặc li tâm loại bỏ phần dịch trong, rồi chiết cạn với ether dầu hỏa, lọc dịch chiết ether dầu hỏa thu được dịch chiết ether dầu hỏa 2. Gộp dịch chiết ether dầu hỏa 1 và dịch chiết ether dầu hỏa 2. Quá trình xử lý tiếp theo được tiến hành tương tự như phương pháp trên.

Nhận xét:

Phương pháp 2 có thêm giai đoạn chiết cạn toàn phần bằng ethyl ether giúp tăng hiệu suất, thu thêm một lượng Conessin nhất định. Tuy nhiên trong quá trình nghiên cứu với lượng mẫu vừa phải (300 – 1 000 g dược liệu mỗi lần), lượng Conessin tăng khi chiết thêm bằng ethyl ether là không đáng kể. So với phương pháp 1, phương pháp này phải thêm nhiều bước, tốn dung môi hoá chất và thời gian. Mặt khác, cặn còn lại nếu còn có chứa Conessin sẽ được gộp lại với các mẻ khác để thu hồi sẽ kinh tế hơn.

Từ các kết quả nghiên cứu trên, qui trình phân lập Conessin từ alcaloid toàn phần được xác định như sau:

Qui trình phân lập Conessin từ alcaloid toàn phần của vỏ thân cây Múc hoa trắng:

12,0 g cặn alcaloid toàn phần được hòa tan trong 300 ml ether dầu hỏa, rửa giấy lọc và rửa bằng 50 ml ether dầu hỏa. Lắc 3 lần dịch chiết ether dầu hỏa với dung dịch HCl 10%, mỗi lần 150 ml. Gộp các dịch chiết nước acid và kiềm hóa dịch chiết nước acid bằng Na_2CO_3 đến pH = 9 - 10 bằng cách cho từ từ Na_2CO_3 vào dung dịch, đồng thời khuấy đều đến khi dung dịch trong và không có bọt. Chiết bằng ether dầu hỏa 3 lần, mỗi lần 300 ml. Gộp các dịch chiết ether dầu hỏa và làm khan dịch chiết bằng cách lọc dịch chiết ether dầu hỏa qua giấy

lọc khô, cất thu hồi ether dầu hỏa, cặn thu được hòa tan trong 50 ml dung dịch acid oxalic 17,5% trong ethanol. Để yên ở nhiệt độ phòng để thu được tinh thể Conessin hydrooxalat, lọc lấy tinh thể. Hòa tan tinh thể thu được trong 300 ml nước. Kiểm hóa dung dịch đến pH = 9 - 10 bằng cách cho từ từ Na_2CO_3 đến khi hết bọt để tạo tủa Conessin base. Chiết Conessin base 4 lần bằng ether dầu hỏa, mỗi lần 50 ml. Gộp các dịch chiết ether dầu hỏa và làm khan dịch chiết bằng cách lọc dịch chiết ether dầu hỏa qua giấy lọc khô, cất thu hồi ether dầu hỏa, thu được sản phẩm PL_1 . Đem kết tinh sản phẩm PL_1 trong acetone, để yên ở nhiệt độ phòng thu được Conessin tương đối tinh khiết. Lọc lấy tinh thể, sấy dưới áp suất giảm ở 60 °C trong 4 giờ, sử dụng chất hút ẩm là phosphor pentoxyd (P_2O_5) thu được 2,55 g sản phẩm PL_2 .

Xác định hàm lượng Conessin bằng HPTLC cho thấy sản phẩm phân lập được đạt độ tinh khiết khoảng 82,50%. Quy trình phân lập Conessin từ alcaloid toàn phần được thể hiện tóm tắt như sơ đồ ở Phụ lục 2.

3.1.1.3. Tinh chế Conessin

Thử nghiệm tinh chế bằng phương pháp sắc kí lớp mỏng điều chế cho thấy phương pháp này phức tạp, phải tiến hành nhiều lần vì mỗi lần chỉ cho phép tách được một lượng Conessin nhỏ.

Thử nghiệm tinh chế bằng phương pháp sắc kí cột nhanh cho thấy quy trình tinh chế tiện lợi, nhanh chóng, có thể thu được lượng sản phẩm cần thiết. Khảo sát với chất nhồi cột silica gel cho kết quả như sau:

- Nếu rửa giải bằng hỗn hợp cloroform : methanol theo các tỉ lệ khác nhau như: (99,5 : 05), (99 : 1), (98,5 : 1,5), (98 : 2)... đều không tách riêng được Conessin tinh khiết. Như vậy hệ dung môi rửa giải này chưa thật phù hợp cho tinh chế Conessin bằng cột silica gel.

- Lựa chọn hỗn hợp Toluen : ethyl acetat và tăng dần tỉ lệ ethyl acetat trong quá trình rửa giải sẽ có khả năng tách được Conessin tinh khiết.

Trên cơ sở đó tiếp tục nghiên cứu chi tiết các thông số cho sắc kí cột để đưa ra quy trình tinh chế Conessin.

Qui trình tinh chế conessin từ alcoloid toàn phần của vỏ thân cây Múc hoa trắng:

Bước 1: Tinh chế bằng sắc kí cột

- Chuẩn bị cột sắc kí: Dùng cột thủy tinh trung tính có đường kính 3 cm, chiều dài 50 cm, được lắp thẳng đứng trên giá, phía dưới cột có van để điều chỉnh tốc độ dung môi. Khóa van, cho một ít dung môi rửa giải vào cột. Lót một lớp bông mỏng ở phía đáy cột, ngay trên van để chất nhồi sau khi được nhồi vào cột không gây tắc cột.

- Nhồi cột: Cân 50 g chất nhồi cột silica gel 60 (0,04 – 0,063 mm), được hoạt hóa ở 100 °C trong 3 giờ, sau đó ngâm trong toluen 1 giờ, khuấy đều rồi đổ từ từ lên cột. Mở khóa cột để dung môi chảy từ từ, để các hạt chất nhồi cột lắng xuống (có thể dùng thìa thủy tinh có bọc cao su gõ nhẹ vào cột, để tránh cột bị khô). Ổn định trong khoảng 3 giờ. Đến khi khoảng cách từ mặt trên lớp chất nhồi đến mặt trên dung môi rửa giải còn khoảng 1 cm thì đóng khóa cột.

- Đưa mẫu lên cột: Hòa 2,55 g PL₂ trong 5 ml benzen, đổ từ từ vào cột để tránh xáo động lớp chất nhồi trong cột, dùng pipet tráng vòng quanh bên trong cột trước khi thêm dung môi rửa giải.

- Dùng lần lượt các hỗn hợp dung môi sau để rửa giải:

100 ml hỗn hợp toluen : ethyl acetat (98 : 2)

150 ml hỗn hợp toluen : ethyl acetat (95 : 5)

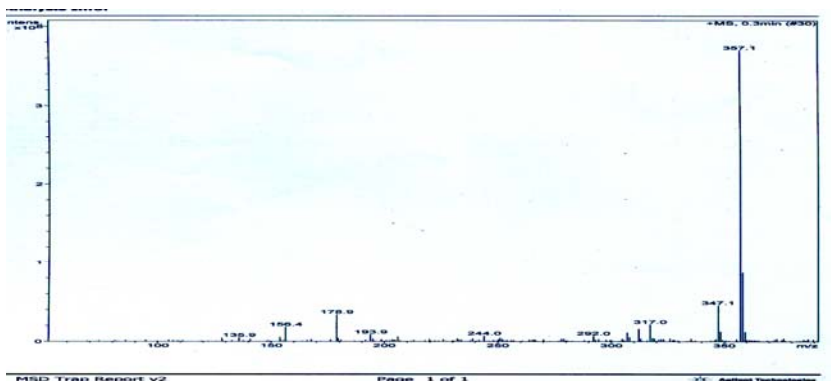
50 ml hỗn hợp toluen : ethyl acetat (93 : 7)

Tốc độ rửa giải 2 ml/phút (khoảng 40 giọt/phút). Bỏ khoảng 100 ml dịch rửa giải đầu tiên, lấy 180 ml dịch rửa giải tiếp theo (xác định sự có mặt của hoạt chất bằng TLC trong các phân đoạn), cất thu hồi dung môi được sản phẩm TC₁.

Bước 2: Kết tinh lại trong dung môi

Kết tinh 3 lần sản phẩm TC₁ trong aceton, lọc lấy tinh thể, sấy dưới áp suất giảm ở 60 °C trong 4 giờ, sử dụng chất hút ẩm là phosphor pentaoxyd (P₂O₅) thu được 2 g sản phẩm có hàm lượng Conessin khoảng 99%.

Sự có mặt của Conessin trong sản phẩm được khẳng định bằng phổ khối lượng kết quả thu được như Hình 3.1.



Hình 3.1. Kiểm tra khối lượng phân tử của Conessin bằng phổ khối (ESI-MS)

Quy trình tinh chế Conessin được thể hiện tóm tắt như sơ đồ ở Phụ lục 3.

3.1.2. Chiết xuất, phân lập và tinh chế Kaempferol từ Đơn lá đỏ

3.1.2.1. Chiết xuất flavonoid toàn phần từ lá Đơn lá đỏ

Chuẩn bị nguyên liệu: lá cây Đơn lá đỏ được sấy ở 65 °C trong 24 giờ, sau đó xay thành bột thô rồi tiến hành chiết xuất bằng hai phương pháp như sau:

❖ Phương pháp ngâm lạnh:

Cân chính xác khoảng 50 g dược liệu, cho dược liệu vào bình ngâm, thêm 250 ml dung môi chiết (lần lượt là ethanol 50°, 70°, 90°), ngâm ở nhiệt độ phòng. Sau 24 giờ, rút dịch chiết lần thứ nhất. Thực hiện chiết tiếp với bã dược liệu trên thêm 2 lần nữa với 250 ml dung môi, thời gian ngâm lần 2 là 48 giờ và lần 3 là 72 giờ. Cất thu hồi bớt dung môi dưới áp suất giảm. Gộp dịch chiết của 3 lần chiết, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến cạn. Hoà tan cặn vào nước, lọc lấy dịch lọc. Xử lý dịch lọc thu được theo một trong hai cách sau:

- Cách 1 (*phương pháp ngâm lạnh không acid hoá*): Lắc nhiều lần với cloroform sau đó với ethyl acetat. Lấy dịch chiết ethyl acetat đem cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến cạn. Cặn thu được đem sấy khô ở 60 °C. Cân rồi tính kết quả hàm lượng cặn EtOAc thu được.

- Cách 2 (*phương pháp ngâm lạnh có acid hoá*): acid hoá dịch lọc bằng dung dịch HCl 10% đến pH = 3 - 4. Các bước tiếp theo tiến hành như cách 1.

❖ *Phương pháp chiết nóng:*

Cân chính xác khoảng 50 g dược liệu cho vào bình cầu có nút mài dung tích 500 ml, thêm 250 ml dung môi chiết (lần lượt là ethanol 50°, 70°, 90°), đun hồi lưu cách thủy trong 2 giờ, lấy dịch chiết lần 1. Thực hiện chiết tiếp thêm 2 lần với bã dược liệu. Gộp dịch chiết 3 lần đem cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến gần. Dịch lọc thu được tiến hành xử lý theo 2 cách:

- Cách 1 (*phương pháp chiết nóng không acid hoá*): Lắc nhiều lần với cloroform sau đó với ethyl acetat. Lấy dịch chiết ethyl acetat đem thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến gần. Cẩn thu được đem sấy khô ở 60 °C. Cân rồi tính hàm lượng cồn EtOAc thu được.

- Cách 2 (*phương pháp chiết nóng có acid hoá*): acid hoá dịch lọc bằng dung dịch HCl 10% đến pH = 3 - 4. Các bước tiếp theo tiến hành như cách 1.

Với mỗi độ cồn khảo sát của mỗi phương pháp, tiến hành lặp lại 3 lần. Hàm lượng cồn flavonoid toàn phần được trình bày ở Bảng 3.2.

Nhận xét:

- Ở mỗi độ cồn, phương pháp chiết nóng luôn cho lượng cồn flavonoid toàn phần thu được cao hơn phương pháp ngâm lạnh.

- Ở cả 2 phương pháp chiết, dung môi chiết xuất là cồn 70° đều cho hiệu suất cao nhất, tiếp theo đến cồn 50° và thấp nhất là cồn 90°.

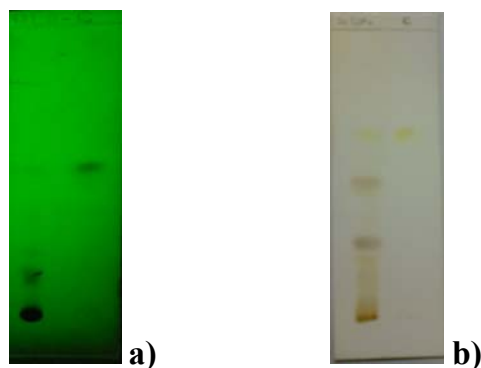
- Chiết nóng bằng cồn 70° cho lượng cồn flavonoid toàn phần thu được cao nhất.

Bảng 3.2. Kết quả khảo sát hàm lượng cồn flavonoid toàn phần từ Đơn lá đỏ

Dung môi	Hàm lượng cồn EtOAc (%)			
	Ngâm lạnh		Chiết nóng	
	Không acid hoá	Có acid hoá	Không acid hoá	Có acid hoá
Cồn 50°	4,22	4,44	5,44	5,69
Cồn 70°	5,14	5,36	7,09	7,58
Cồn 90°	3,91	3,70	4,60	5,06

❖ *Định tính Kaempferol trong dịch chiết bằng TLC:*

- Dịch chấm sắc kí: Dịch chiết cò và dịch chiết ethyl acetat.
- Điều kiện sắc kí: Bản mỏng silica gel GF₂₅₄ (Merck) được hoạt hóa ở 110 °C trong 1 giờ. Hệ dung môi triển khai: Toluene : Ethyl acetat : Acid formic (5 : 4 : 1). Phát hiện vết bằng cách: Quan sát dưới đèn tử ngoại UV 254 nm (đối với dịch chiết cò) hoặc hiện vết bằng hơi ammoniac bão hòa (đối với dịch chiết EtOAc). Kết quả thu được như ở Hình 3.2.



Hình 3.2. SKĐ các dịch chiết Kaempferol từ Đơn lá đỏ

a) Dịch chiết cò và Kaempferol chuẩn (C, bên phải)

b) Dịch chiết ethyl acetat và Kaempferol chuẩn (C, bên phải)

Nhận xét:

- SKĐ của dịch chiết cò không tách được thành các vết riêng nên không xác định rõ số vết trên SKĐ. Điều này có thể do trong dịch chiết cò còn có rất nhiều tạp chất.

- SKĐ của dịch chiết ethyl acetat cho thấy các vết đã được tách rõ ràng. Các vết có giá trị R_f tương ứng là 0,06; 0,19; 0,25; 0,41 và 0,54. Vết trên cùng (có R_f là 0,54) tương ứng với vết Kaempferol chuẩn. Các vết này đậm màu hơn khi hơi trên miệng lọ amoniac đặc, chứng tỏ dịch chiết ethyl acetat chứa hỗn hợp nhiều flavonoid.

❖ *Định lượng Kaempferol trong cấn EtOAc bằng HPLC:*

Cần một lượng chính xác cấn EtOAc, hòa tan trong methanol, định mức thành 25 ml dung dịch. Lọc qua màng lọc kích thước 0,45 μ m. Dung dịch này

được tiêm vào hệ thống HPLC với điều kiện sắc kí như sau: Cột sắc kí ODS-3 (250 mm x 4,6 mm x 5 μ m), nhiệt độ cột 40 °C, detector DAD, λ = 370 nm, pha động: đệm phosphat 10 mM, pH = 2,5 : Acetonitril (60 : 40), tốc độ dòng pha động: 1,2 ml/phút, thể tích tiêm: 50 μ l, thời gian chạy sắc kí 12 phút. Với mỗi căn EtOAc, tiến hành định lượng 3 mẫu, tính kết quả trung bình. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.3.

Bảng 3.3. Hàm lượng Kaempferol trung bình trong căn EtOAc

Dung môi	Hàm lượng Kaempferol trung bình trong căn EtOAc (%)			
	<i>Ngâm lạnh</i>		<i>Chiết nóng</i>	
	<i>Không acid hoá</i>	<i>Có acid hoá</i>	<i>Không acid hoá</i>	<i>Có acid hoá</i>
Cồn 50°	0,1346	0,4439	0,0432	0,1577
Cồn 70°	0,1865	0,2945	0,0900	0,1391
Cồn 90°	0,0412	0,7199	0,0412	0,2092

Từ kết quả tính hàm lượng flavonoid toàn phần và hàm lượng Kaempferol có trong từng căn EtOAc, chúng tôi đã xác định được hàm lượng Kaempferol chiết được từ Đơn lá đỏ theo các phương pháp chiết (Bảng 3.4).

Nhận xét:

- Đối với mỗi phương pháp chiết, ở mỗi độ cồn khác nhau, có acid hoá luôn cho hàm lượng Kaempferol thu được cao hơn so với không acid hoá.
- Trong tất cả các phương pháp, ngâm lạnh bằng EtOH 90°, acid hoá là phương pháp cho kết quả hàm lượng Kaempferol thu được là cao nhất, vì vậy phương pháp này được lựa chọn.

Bảng 3.4. Hàm lượng Kaempferol có thể chiết xuất được từ Đơn lá đỏ

Phương pháp và dung môi chiết xuất			Lượng Kaempferol có thể chiết xuất được (%)
Ngâm lạnh	Cồn 50°	không acid hoá	0,0057
		acid hoá	0,0197
	Cồn 70°	không acid hoá	0,0096
		acid hoá	0,0158
	Cồn 90°	không acid hoá	0,0076
		acid hoá	0,0266
Chiết nóng	Cồn 50°	không acid hoá	0,0024
		acid hoá	0,0090
	Cồn 70°	không acid hoá	0,0064
		acid hoá	0,0105
	Cồn 90°	không acid hoá	0,0019
		acid hoá	0,0106

Từ kết quả khảo sát, và nâng khối lượng dược liệu lên 1 500 g, qui trình chiết flavonoid toàn phần từ lá cây Đơn lá đỏ được xác định như sau:

Qui trình chiết xuất flavonoid toàn phần từ lá cây Đơn lá đỏ:

Cân khoảng 1,5 kg lá cây Đơn lá đỏ đã được xay thành dạng bột thô cho vào bình inox 10 ℓ, thêm khoảng 7,5 ℓ ethanol 90°, dùng thìa thủy tinh khuấy đều rồi để yên. Sau 24 giờ, rút dịch chiết lần thứ nhất, lọc. Thực hiện ngâm bã dược liệu trên thêm 2 lần nữa với 7,5 ℓ ethanol 90° trong 48 giờ với lần thứ hai và 72 giờ với lần thứ ba. Gộp các dịch chiết ethanol, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao dược liệu. Thêm 1 ℓ nước cất đun nóng vào cao dược liệu và lắc đều, lọc lấy dịch chiết nước. Chuyển dịch chiết nước vào bình gạn. Với mỗi 100 ml dịch chiết nước chiết loại tạp chất 4 lần, mỗi lần với cloroform đến khi dịch cloroform hết xanh, mỗi lần sử dụng 30 ml. Dịch nước sau khi chiết

với cloroform được điều chỉnh tới pH = 3-4 bằng dung dịch HCl 10%, sau đó đem chiết tiếp với ethyl acetat. Với mỗi 100 ml dịch chiết nước chiết 6 lần với ethyl acetat đến khi dịch chiết ethyl acetat hết màu vàng, mỗi lần sử dụng 30 ml, gạn lấy lớp ethyl acetat. Gộp dịch chiết ethyl acetat đem cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 76,8 g căn flavonoid toàn phần.

Qui trình chiết xuất flavonoid toàn phần từ lá Đơn lá đỏ được thể hiện tóm tắt như sơ đồ ở Phụ lục 4.

3.1.2.2. Phân lập Kaempferol từ flavonoid toàn phần của lá Đơn lá đỏ

Bước 1: Phân tách trên cột silica gel

- Chuẩn bị cột sắc kí: Dùng cột thủy tinh trung tính có đường kính 6 cm, chiều dài 100 cm, được lắp thẳng đứng trên giá, phía dưới cột có van để điều chỉnh tốc độ dung môi. Khóa van, cho một ít dung môi rửa giải vào cột. Lót một lớp bông mỏng ở phía đáy cột, ngay trên van để chất nhồi sau khi được nhồi vào cột không gây tắc cột.

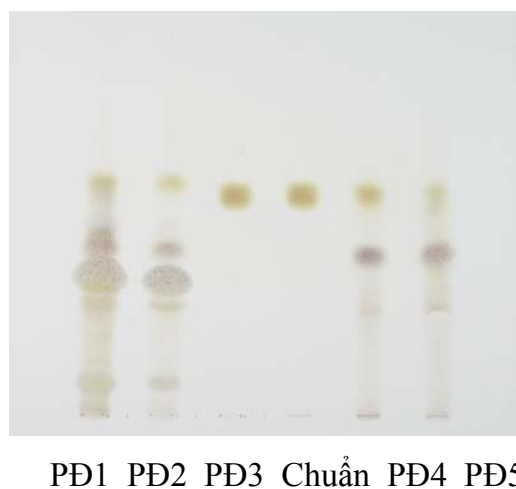
- Nhồi cột: Cân 200 g chất nhồi cột silica gel 60 (0,04 – 0,063 mm), thêm 300 ml cloroform, trộn đều, đổ từ từ lên cột. Mở khóa cột để dung môi chảy từ từ để các hạt chất nhồi cột lắng xuống (dùng đĩa thủy tinh có bọc cao su gõ nhẹ vào cột, để tăng nhanh quá trình lắng), trong quá trình này luôn bổ sung dung môi lên cột, tránh để cột bị khô. Ổn định cột trong khoảng 3 giờ, đến khi khoảng cách từ mặt trên lớp chất nhồi đến mặt trên dung môi rửa giải còn khoảng 1 cm thì đóng khóa cột.

- Đưa mẫu lên cột: Hòa tan khoảng 3 g flavonoid toàn phần trong 15 ml cloroform, thêm 10 g chất nhồi cột silica gel 60 (0,04 – 0,063 mm), trộn đều, cất thu hồi dung môi thu được hỗn hợp bột tơi. Chuyển nhẹ nhàng vào cột, tránh xáo động lớp chất nhồi trong cột, dùng pipet tráng vòng quanh bên trong cột trước khi thêm dung môi rửa giải. Dùng lần lượt các hệ dung môi như trong bảng 3.5 để rửa giải.

Bảng 3.5. Thành phần và thể tích các hệ dung môi giải hấp phụ cột silicagel

Hệ dung môi	Tỉ lệ các dung môi (v/v)				Thể tích sử dụng (ml)
	<i>Cloroform</i>	<i>Ethyl acetat</i>	<i>Aceton</i>	<i>Methanol</i>	
Hệ 1	40	0	0	0	40
Hệ 2	80	1	1	1	83
Hệ 3	40	1	1	1	172
Hệ 4	20	1	1	1	345
Hệ 5	10	2	2	1	150

Tốc độ rửa giải 2 ml/phút (khoảng 40 giọt/phút). Bỏ khoảng 150 ml dịch rửa giải đầu tiên và lấy 500 ml dịch rửa giải tiếp theo. Thu được 5 phân đoạn, xác định sự có mặt của hoạt chất bằng TLC trong các phân đoạn như ở Hình 3.3.



Hình 3.3. SKĐ các phân đoạn phân lập Keampferol

Lặp lại quá trình phân lập trên để phân lập hết 76,8 g cặn flavonoid toàn phần. Gộp các dịch rửa giải thu được, cất thu hồi dung môi được cặn, làm khô cặn trong tủ sấy chân không với phosphor pentaoxyd thu được cặn 5,4 g PL₁.

Bước 2: Phân tách trên cột Sephadex

- Chuẩn bị cột sắc kí: Dùng cột thủy tinh trung tính có đường kính 3 cm, chiều dài 50 cm, được lắp thẳng đứng trên giá, phía dưới cột có van để điều chỉnh tốc độ dung môi. Khóa van, cho một ít dung môi rửa giải vào cột. Lót một lớp bông mỏng ở phía đáy cột, ngay trên van để chất nhồi sau khi được nhồi vào

cột không gây tắc cột.

- Nhồi cột: Ngâm ngập 100 g Sephadex LH-20 trong methanol trong 48 giờ. Khuấy đều để tạo hỗn dịch, rót liên tục và từ từ vào cột (dùng đĩa thủy tinh giúp rót hỗn dịch lên thành cột, tránh tạo bọt khí). Mở khóa cột để dung môi chảy từ từ, hứng dung môi đổ ngược trở lại cột, tránh để khô cột. Cho dung môi chảy tiếp tục như trên để ổn định cột (trong 3 giờ). Đến khi khoảng cách từ mặt trên lớp chất nhồi đến mặt trên dung môi rửa giải còn khoảng 1 cm thì đóng khóa cột.

- Đưa mẫu lên cột: Hòa 5,4 g PL₁ trong 5 ml methanol và chuyển vào trong cột (đổ từ từ vào thành cột để tránh xáo động lớp chất nhồi trong cột), dùng pipet tráng vòng quanh bên trong cột trước khi thêm methanol.

- Rửa giải bằng methanol, tốc độ rửa giải 2 ml/phút. Bỏ khoảng 20 ml dịch rửa giải đầu tiên và lấy 200 ml dịch rửa giải tiếp theo (xác định sự có mặt của hoạt chất bằng phương pháp TLC trong các phân đoạn). Cất thu hồi dung môi ở nhiệt độ 70 - 80 °C đến cạn, sấy cạn thu được ở nhiệt độ 60 – 65 °C, áp suất giảm trong 3 giờ thu được khoảng 3,6 g sản phẩm PL₂. Cứ 3,0 g flavonoid toàn phần phân lập qua 2 giai đoạn thu được 0,14 g sản phẩm PL, 76,8 g flavonoid toàn phần phân lập qua 2 giai đoạn thu được 3,6 g sản phẩm PL.

Quy trình phân lập Kaempferol từ flavonoid toàn phần được thể hiện tóm tắt như sơ đồ ở Phụ lục 5.

3.1.2.3. Tinh chế Kaempferol

- Chuẩn bị cột sắc kí: Dùng cột thủy tinh trung tính có đường kính 3 cm, chiều dài 50 cm, được lắp thẳng đứng trên giá, phía dưới cột có van để điều chỉnh tốc độ dung môi. Khóa van, cho một ít dung môi rửa giải vào cột. Lót một lớp bông mỏng ở phía đáy cột, ngay trên van để chất nhồi sau khi được nhồi vào cột không gây tắc cột.

- Nhồi cột: Ngâm ngập 50 g Sephadex LH-20 trong methanol trong 48 giờ. Khuấy đều để tạo hỗn dịch, rót liên tục và từ từ vào cột (dùng một đĩa thủy tinh giúp rót hỗn dịch lên thành cột, tránh tạo bọt khí). Mở khóa cột để dung môi

chảy từ từ, hứng dung môi đổ ngược trở lại cột, tránh để khô cột. Cho dung môi chảy tiếp tục như trên đến khi cột ổn định (trong 3 giờ). Đến khi khoảng cách từ mặt trên lớp chất nhồi đến mặt trên dung môi rửa giải còn khoảng 1 cm thì đóng khóa cột.

- Đưa mẫu lên cột: Hòa 3,0 g PL₂ trong 5 ml methanol và chuyển vào trong cột (đổ từ từ vào thành cột để tránh xáo động lớp chất nhồi trong cột), dùng pipet tráng vòng quanh bên trong cột trước khi thêm methanol.

- Rửa giải bằng methanol, tốc độ rửa giải 2 ml/phút (khoảng 40 giọt/phút). Bỏ khoảng 20 ml dịch rửa giải đầu tiên và lấy 200 ml dịch rửa giải tiếp theo (có thể xác định sự có mặt của hoạt chất bằng phương pháp TLC trong các phân đoạn). Cất thu hồi dung môi ở nhiệt độ 70 – 80 °C đến cạn, sấy cạn thu được ở nhiệt độ 60 – 65 °C, áp suất giảm trong 3 giờ thu được khoảng 2,2 g sản phẩm có hàm lượng Kaempferol 96,6%.

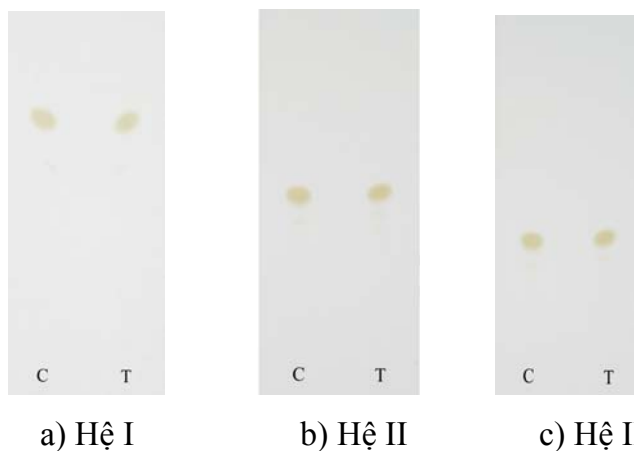
Tiến hành sắc kí lớp mỏng Kaempferol song song với chất chuẩn Kaempferol trên 3 hệ dung môi:

Hệ I: Cloroform : Ethyl acetat : Acid formic (5:4:1)

Hệ II: Toluen : Ethyl acetat : Acid formic (5:4:1)

Hệ III: Toluen : Ethyl acetat : Acid formic (5:2:1)

Phát hiện vết bằng hơi amoniac bão hòa. Kết quả triển khai căn trên các hệ dung môi được trình bày ở Hình 3.4 và Bảng 3.6.



Hình 3.4. SKĐ của Kaempferol tinh chế được với các hệ dung môi

Bảng 3.6. Giá trị R_f và màu sắc các vết sắc kí của Kaempferol tinh chế được với các hệ dung môi I, II, III

Hệ dung môi	Vết	R_f	Màu sắc
I	Chuẩn	0,82	Vàng nâu
	Thử	0,82	Vàng nâu
II	Chuẩn	0,54	Vàng nâu
	Thử	0,54	Vàng nâu
III	Chuẩn	0,39	Vàng nâu
	Thử	0,39	Vàng nâu

Nhận xét:

Các kết quả cho thấy căn Kaempferol sau tinh chế luôn cho 1 vết có màu sắc và R_f tương tự vết chuẩn Kaempferol. Với hệ I các vết đều có R_f là 0,82; hệ II đều là 0,54 và hệ III đều là 0,39.

Quy trình tinh chế Kaempferol được thể hiện tóm tắt như sơ đồ ở Phụ lục 6.

3.1.3. Chiết xuất, phân lập và tinh chế Nuciferin từ lá Sen

3.1.3.1. Chiết xuất alkaloid toàn phần từ lá cây Sen

Chuẩn bị nguyên liệu: Lá sen phơi khô, thái nhỏ, sấy khô ở 60 °C trong tủ sấy, tán nhỏ thành bột được liệu bằng thuyền tán rồi tiến hành chiết xuất theo hai qui trình khác nhau:

❖ Chiết nóng:

Cân chính xác khoảng 70,00 g bột lá sen, làm ẩm bằng NH_4OH 10%. Chiết nóng bằng đun hồi lưu sôi với ethanol 96° (khoảng 500 ml). Cát thu hồi còn, hòa tan căn trong dung dịch HCl 5% (pH = 2). Loại tạp chất trong dịch acid bằng dung dịch ether dầu hỏa 3 lần, mỗi lần 100 - 150 ml. Kiểm hóa dịch nước bằng dung dịch amoniac đặc tới pH = 10 - 11. Chiết 5 - 6 lần bằng cloroform, mỗi lần 100 - 150 ml để lấy hết alkaloid (kiểm tra bằng thuốc thử *Dragendorff*).

❖ Chiết nguội:

Cân chính xác khoảng 70,00 g bột lá sen, làm ẩm bằng NH_4OH 10%. Ngâm với ethanol 96° (khoảng 500 ml) trong 3 ngày. Cát thu hồi còn, hòa tan

cẩn trong dung dịch HCl 5% (pH = 2). Loại tạp chất trong dịch acid bằng dung dịch ether dầu hỏa 3 lần, mỗi lần 100 - 150 ml. Kiểm hóa dịch nước bằng dung dịch amoniac đặc tới pH = 10 - 11. Chiết 5 - 6 lần bằng cloroform, mỗi lần 100 - 150 ml để lấy hết alcaloid (kiểm tra bằng thuốc thử *Dragendorff*). Kết quả định lượng alcaloid toàn phần trong dịch chiết trình bày ở Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Hàm lượng alcaloid toàn phần trong lá Sen thu được bằng hai phương pháp chiết

STT	Hàm lượng alcaloid toàn phần (%)	
	<i>Chiết nóng</i>	<i>Chiết nguội</i>
1	0,89	0,87
2	0,87	0,79
3	0,96	0,89
4	0,83	0,85
5	0,92	0,82
6	0,85	0,75
Trung bình	0,89	0,83
RSD (%)	0,04	0,05

Nhận xét:

- Phương pháp chiết nóng cho lượng alcaloid trong lá sen nhiều hơn so với phương pháp chiết nguội. Vì vậy chúng tôi lựa chọn phương pháp chiết nóng trong qui trình chiết xuất alcaloid toàn phần từ lá sen.

Từ kết quả khảo sát, và nâng khối lượng dược liệu lên 320 g, qui trình chiết xuất alcaloid toàn phần từ lá Sen được xác định như sau:

Qui trình chiết xuất alcaloid toàn phần từ lá cây Sen:

Cân khoảng 320 g bột dược liệu, làm ẩm bằng NH₄OH 10%, thêm 2,5 lít ethanol 96° và chiết nóng bằng cách đun hồi lưu cách thủy trong 2 giờ. Gạn và lọc lấy dịch lọc, rửa lại bã dược liệu bằng ethanol. Dịch chiết ethanol được cất thu hồi ethanol dưới áp suất giảm ở 60 °C. Hòa tan cẩn bằng dung dịch HCl 5% (pH = 2). Tiến hành chiết (3 - 4 lần) đồng lượng dịch chiết acid với ether dầu hỏa

để loại tạp chất. Kiểm hóa dịch chiết acid bằng dung dịch amoniac đặc tới pH = 10 - 11. Chiết 5 - 6 lần đồng lượng bằng cloroform (đến khi dịch chiết nước cho phản ứng âm tính với thuốc thử *Dragendorff*), thu được dịch chiết cloroform. Cát dưới áp suất giảm để thu hồi dung môi cloroform, hòa tan cặn thu được bằng 50 ml methanol và chuyển ra cốc có mỏ, bay hơi tới cạn, sấy ở 60 °C trong 3 giờ, thu được 2,85 g alcaloid toàn phần.

Quy trình chiết xuất alcaloid toàn phần từ lá Sen được thể hiện tóm tắt như sơ đồ ở Phụ lục 7.

3.1.3.2. Phân lập Nuciferin từ alcaloid toàn phần của lá Sen

❖ Khảo sát chọn hệ dung môi

Tiến hành sắc kí lớp mỏng hỗn hợp alcaloid toàn phần thu được từ lá Sen với các hệ dung môi sau:

- (1) Cloroform : aceton : NH_4OH (4 : 1 : 0,1).
- (2) Cloroform : ethyl acetat (5 : 1).
- (3) n-Hexan : aceton : H_2O (1 : 1 : 0,1)
- (4) Cloroform : methanol (10 : 1)
- (5) n-Hexan : aceton (5 : 1).
- (6) n-Hexan : aceton : NH_4OH (4 : 1 : 0,1)
- (7) n-Hexan : aceton : NH_4OH (3 : 1 : 0,1)

Trong đó, hệ dung môi n-Hexan : aceton : NH_4OH (3 : 1 : 0,1) cho kết quả tách tốt nhất nên được lựa chọn để tiến hành chạy sắc kí cột pha thuận phân lập Nuciferin từ alcaloid toàn phần thu được.

❖ Xây dựng qui trình phân lập Nuciferin từ alcaloid toàn phần của lá Sen:

▪ Chuẩn bị cột sắc kí: Dùng cột thủy tinh trung tính có đường kính 3 cm, chiều dài 50 cm, được lắp thẳng đứng trên giá, phía dưới cột có van để điều chỉnh tốc độ dung môi. Khóa van, cho một ít dung môi rửa giải vào cột. Lót một lớp bông mỏng ở phía đáy cột, ngay trên van để chất nhồi sau khi được nhồi vào cột không gây tắc cột.

▪ Nhồi cột: Cân 50 g chất nhồi cột silica gel 60 (0,04 – 0,063 mm), cho vào cốc thủy tinh có chứa 300 ml cloroform, khuấy đều rồi đổ từ từ lên cột. Mở khóa cột cho dung môi chảy từ từ để các hạt chất nhồi cột lắng xuống (có thể dùng đĩa thủy tinh có bọc cao su gõ nhẹ vào cột, để tăng nhanh quá trình lắng), trong quá trình này luôn bổ sung dung môi lên cột, tránh để cột bị khô. Ổn định cột trong khoảng 3 giờ và đến khi khoảng cách từ mặt trên lớp chất nhồi đến mặt trên dung môi rửa giải còn khoảng 1 cm thì đóng khóa cột.

▪ Đưa mẫu lên cột: Hòa tan khoảng 2,85 g alcaloid toàn phần trong 10 ml cloroform, thêm 5 g chất nhồi cột silica gel 60, trộn đều, cất thu hồi dung môi được hỗn hợp bột tơi. Chuyển nhẹ nhàng vào cột, tránh xáo động lớp chất nhồi trong cột, dùng pipet tráng vòng quanh bên trong cột trước khi thêm dung môi rửa giải.

▪ Dùng hỗn hợp dung môi n-Hexan : aceton : NH_3 đặc (3 : 1 : 0,1) để rửa giải. Tốc độ rửa giải 2 ml/phút (khoảng 40 giọt/phút). Bỏ khoảng 75 ml dịch rửa giải đầu tiên và lấy 100 ml dịch rửa giải tiếp theo, cất thu hồi dung môi được cặn, sấy dưới áp suất giảm ở 60 °C trong 4 giờ, sử dụng chất hút ẩm là phosphor pentoxyd (P_2O_5) thu được khoảng 2,1 g sản phẩm phân lập chứa hoạt chất Nuciferin khoảng 96,2%.

Quy trình phân lập Nuciferin từ alcaloid toàn phần được thể hiện tóm tắt như sơ đồ ở Phụ lục 8.

3.1.3.3. Tinh chế Nuciferin

Tinh thể Nuciferin thu được sau khi phân lập được hòa tan trong một lượng vừa đủ cloroform rồi chấm lên 3 bản mỏng silica gel tráng sẵn (Merck) và được khai triển bằng 3 hệ dung môi khác nhau.

Hệ I: n-Hexan : aceton : NH_4OH (3 : 1 : 0,1).

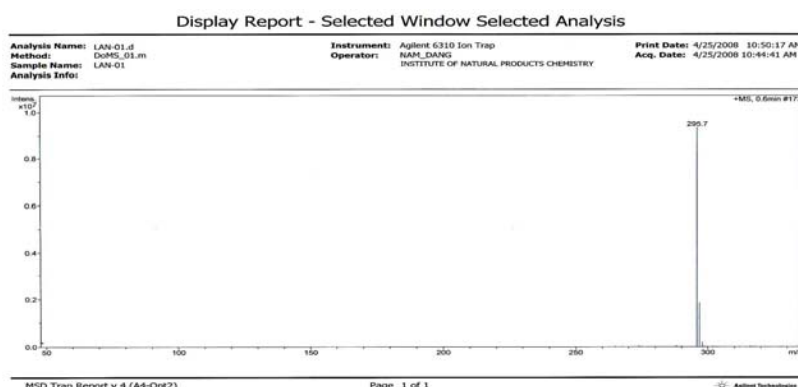
Hệ II: Cloroform : methanol (10 : 1).

Hệ III: Cloroform : ethyl acetat (5 : 1).

Phát hiện vết bằng thuốc thử *Dragendorff*. Soi dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm. Với cả 3 hệ dung môi đều chỉ có một vết trên sắc kí đồ song song

với chuẩn liên kết chứng tỏ Nuciferin tinh chế được đã tinh khiết. Vì vậy, để đơn giản qui trình tinh chế được lựa chọn là kết tinh lại nhiều lần trong cloroform như sau: Hòa tan 2,1 g sản phẩm phân lập được ở trên trong 50 ml cloroform, để yên 3 giờ trong ngăn mát tủ lạnh (nhiệt độ 2 - 8 °C) để tăng khả năng kết tinh, lọc lấy tinh thể. Kết tinh lại 3 lần, sấy trong tủ sấy chân không với phosphor pentoxyd (P_2O_5) thu được 2,0 g sản phẩm Nuciferin tinh thể đạt độ tinh khiết 98,23 – 99,08%.

Nuciferin trong sản phẩm được khẳng định bằng phổ khối lượng, kết quả được trình bày ở Hình 3.5.



Hình 3.5. Kiểm tra khối lượng phân tử của Nuciferin bằng phổ khối (ESI-MS)

Qui trình tinh chế Nuciferin được thể hiện tóm tắt như sơ đồ ở Phụ lục 9.

3.2. XÂY DỰNG BỘ DỮ LIỆU NHẬN DẠNG VÀ XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT CỦA CÁC CHẤT

3.2.1. Đặc điểm cảm quan

Đặc điểm cảm quan của các đối tượng nghiên cứu quan sát bằng mắt thường dưới ánh sáng ban ngày được ghi trong Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Đặc điểm cảm quan của các chất

Tên chất	Đặc điểm cảm quan
Conessin	Bột kết tinh màu trắng
Nuciferin	Bột kết tinh trắng
Kaempferol	Bột kết tinh trắng

Nhận xét: Cả 3 hợp chất nghiên cứu đều là các chất kết tinh vì vậy đều có điểm nóng chảy xác định và do đó đều có thể ứng dụng được phương pháp phân tích nhiệt vi sai để xác định độ tinh khiết.

3.2.2. Điểm chảy

Tiến hành đo điểm chảy của các hợp chất nghiên cứu theo ĐBVN IV (PL-150, Phương pháp 1 - phương pháp đo trong mao quản).

Bảng 3.9. Kết quả đo điểm chảy

Tên chất	Điểm chảy đo được (°C)	Điểm chảy lí thuyết (°C)
Conessin	Mẫu thử: $124,5 \pm 0,3$	$123,5 \pm 1$
Kaempferol	Mẫu thử: $279,1 \pm 0,3$ Mẫu ĐC: $278,5 \pm 0,3$	277 ± 1
Nuciferin	Mẫu thử: $164,3 \pm 0,3$ Mẫu ĐC: $164,5 \pm 0,3$	$165,5 \pm 1$

Nhận xét: Điểm chảy đo được của các hợp chất nghiên cứu phù hợp với điểm chảy lí thuyết của các hợp chất này.

3.2.3. Kết quả đo phổ

Để nhận dạng các chất, tiến hành đo phổ tử ngoại khả kiến (UV-VIS), hồng ngoại (FT-IR), phổ khối lượng (ESI-MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR một chiều.

3.2.3.1. Phổ tử ngoại khả kiến

Mẫu thử và mẫu đối chiếu được hòa tan trong MeOH, nồng độ 0,01 mg/ml. Ghi phổ ở cùng điều kiện. Kết quả được ghi ở Bảng 3.10. Hình ảnh phổ UV-VIS của 3 chất được trình bày ở Phụ lục 10 ~ 12.

Bảng 3.10. Kết quả đo phổ tử ngoại khả kiến

Tên chất	Cực đại hấp thụ đo được	Cực đại hấp thụ lí thuyết
Conessin	Hấp thụ rất yếu	Không có
Kaempferol	Mẫu thử: $\lambda_{\max} = 266,366 \text{ nm}$ Mẫu đối chiếu: $\lambda_{\max} = 266,366 \text{ nm}$	266,366 nm
Nuciferin	Mẫu thử: $\lambda_{\max} = 270,5 \text{ nm}$ Mẫu đối chiếu: $\lambda_{\max} = 270,5 \text{ nm}$	Phù hợp ($\sim 270 \text{ nm}$)

Nhận xét:

Kết quả cho thấy Nuciferin và Kaempferol cho phổ UV-VIS phù hợp với phổ của chất chuẩn liên kết và có các cực đại hấp thụ như tài liệu đã công bố [1], [34]. Kaempferol có $\lambda_{\max} = 266,366 \text{ nm}$. Nuciferin có $\lambda_{\max} = 270,5 \text{ nm}$. Conessin không có cực đại hấp thụ trong khoảng 200 – 900 nm.

Phổ UV-VIS chủ yếu khảo sát cực đại hấp thụ giúp cho việc lựa chọn bước sóng phát hiện trong định lượng bằng HPLC.

3.2.3.2. Phổ hồng ngoại

Tiến hành đo mẫu thử và mẫu chuẩn liên kết song song trong cùng điều kiện. So sánh hệ số phù hợp (Match Factor), phổ được coi là giống nhau nếu hệ số phù hợp lớn hơn hoặc bằng 90,0%. Hình ảnh phổ IR của 3 chất được trình bày ở Phụ lục 10 ~ 12.

Bảng 3.11. Kết quả đo phổ hồng ngoại

Tên chất	Các dải hấp thụ đặc trưng trong phổ IR ($\nu_{\max}^{\text{KBr}}, \text{cm}^{-1}$)	Kết quả so sánh
Conessin	2935,9; 2763,6; 1584,1; 1449,4; 1375,3; 1331,4; 1209,2; 1174,4; 1041,0; 997,1; 888,4; 798,8 cm^{-1} .	Hệ số phù hợp: 98,9%
Kaempferol	3411 cm^{-1} (OH), 1618 cm^{-1} (C=O)	Hệ số phù hợp: 99,7%
Nuciferin	1572 cm^{-1} (C=C); 1030 cm^{-1} (C-O-C)	Hệ số phù hợp: 99,5%

3.2.3.3. Phổ khối lượng (ESI-MS)

Tiến hành đo phổ ESI-MS của các hợp chất nghiên cứu, kết quả được ghi ở Bảng 3.12. Hình ảnh phổ MS của 3 chất được trình bày ở Phụ lục 10 ~ 12.

Nhận xét:

Kết quả cho thấy các chất phân tích đều cho mảnh ion phân tử phù hợp với khối lượng phân tử tương ứng. Phổ ESI-MS được lưu làm phổ chuẩn cho các nghiên cứu khác.

Bảng 3.12. Kết quả đo phổ khối lượng (ESI-MS)

Tên chất	Số khối của mảnh ion phân tử m/z	Số khối của các mảnh thứ cấp
Conessin	Phổ đồ xuất hiện pic 357,3 ứng với mảnh $[M+H]^+$, tương ứng với khối lượng phân tử 356,6 ($C_{24}H_{40}N_2$).	Mẫu thử cho phổ với mảnh m/z đặc trưng m/z 269,2; 312,2 .
Kaempferol	Phổ đồ xuất hiện pic 287,2 ứng với mảnh $[M+H]^+$, tương ứng khối lượng phân tử 286,2 ($C_{15}H_{10}O_6$).	Mẫu thử cho phổ với mảnh m/z đặc trưng m/z 121,0; 133,1; 153,1; 165,1; 182,9; 213,1; 231,1; 241,1; 258,1 .
Nuciferin	Phổ đồ xuất hiện pic 296,1 ứng với mảnh $[M+H]^+$, tương ứng khối lượng phân tử 295,2 ($C_{19}H_{21}NO_2$).	Mẫu thử cho phổ với mảnh m/z đặc trưng m/z 265,1 .

3.2.3.4. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân

Phổ cộng hưởng từ 1 chiều cho thấy các hợp chất nghiên cứu có công thức phân tử và cấu trúc hoàn toàn phù hợp với các dữ liệu phổ đã được công bố cho các hợp chất này. Dữ liệu phổ NMR (1H -NMR, ^{13}C -NMR) của 3 hợp chất được ghi ở Bảng 3.13 ~ 3.15. Hình ảnh phổ NMR (1H -NMR, ^{13}C -NMR) của 3 chất được trình bày ở Phụ lục 10 ~ 12. Bộ dữ liệu phổ trên được lưu để sử dụng trong thiết lập chất chuẩn.

Bảng 3.13. Kết quả phân tích phổ NMR của Conessin

C	δ_C^*	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$
1	38,2	38,42	1,06 m; 1,89 m
2	24,8	25,15	1,40 m; 1,74 m
3	64,9	64,94	2,09 m*
4	34,8	35,30	2,19 m
5	141,4	142,00	-
6	121,1	120,67	5,34 d (5,0)
7	31,9	32,09	1,60 m; 2,06 m
8	33,4	33,50	1,40 m
9	49,9	50,13	0,97 dd (4,0, 12,0)
10	36,9	36,95	-
11	22,0	22,02	1,18 m; 1,63 m
12	38,6	38,83	1,79 m/1,37 m
13	50,5	50,40	-
14	55,8	55,97	1,12 m
15	24,3	24,66	1,74 m; 1,40 m
16	27,4	27,67	1,18 m; 1,61 m
17	53,5	53,66	1,82 m
18	64,3	64,77	1,86 m 2,97 d (11,0)
19	19,4	19,42	0,93 s
20	63,4	63,14	2,34 m
21	14,6	14,90	1,03 d (6,0)
22	41,1	41,10	2,19 s
N ³ - CH ₃	41,3	41,69	2,28 s
N ³ - CH ₃	41,3	41,69	2,28 s

(a) Dung môi: CDCl₃; (b) ở 125 MHz; (c) ở 500 MHz; (*) Dữ liệu công bố của Conessin

Bảng 3.14. Kết quả phân tích phổ NMR của Kaempferol

C	δ_{C}^*	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$
2	146,8	146,80	-
3	135,6	135,56	-
4	175,9	175,84	-
5	160,7	160,66	-
6	98,2	98,16	6,19 (d)
7	163,9	163,86	-
8	93,5	93,41	6,43 (d)
9	156,2	156,15	-
10	103,1	102,99	-
1'	121,7	121,63	-
2'	129,5	129,40	8,03 (d)
3'	115,4	115,37	6,93 (d)
4'	159,2	159,13	-
5'	115,4	115,37	6,93 (d)
6'	129,5	129,40	8,03 (d)

^(a) Dung môi: DMSO; ^(b) ở 125 MHz; ^(c) ở 500 MHz; ^(*) Dữ liệu công bố của Kaempferol

Bảng 3.15. Kết quả phân tích phổ NMR của Nuciferin

C	δ_c^*	$\delta_c^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$
1	144.6	145.13	-
1a	126.3	126.84	-
1b	127.5	128.00	-
2	151.4	151.95	-
3	110.9	111.27	6.63 s
3a	128.1	128.68	-
4	28.9	29.22	3.15 m 2.67 dd (16.5, 3.5)
5	52.8	53.26	3.03* 2.49 td (12.0, 3.5)
6a	61.9	62.32	3.01*
7	34.8	35.11	3.08 dd (13.5, 4.0) 2.61 t (13.5)
7a	135.9	136.45	-
8	127.3	127.81	7.25
9	126.7	127.26	7.22
10	126.4	126.93	7.30 tt (8.0, 0.5)
11	127.7	128.28	8.36 dd (8.0, 0.5)
11a	131.6	132.12	-
1-OMe		60.17	3.65 s
2-OMe		55.82	3.87 s
6-Me	43.5	43.96	2.53 s

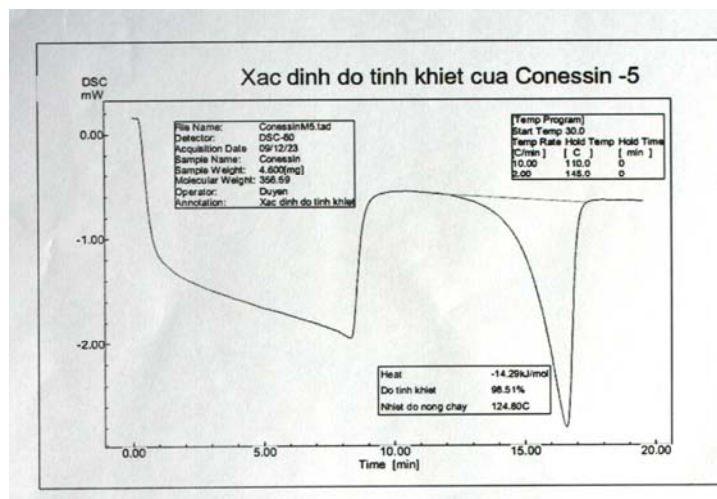
^(a) Dung môi: CDCl₃; ^(b) ở 125 MHz; ^(c) ở 500 MHz; ^(*) Dữ liệu công bố của Nuciferin

3.2.4. Xác định độ tinh khiết bằng quét nhiệt vi sai (DSC)

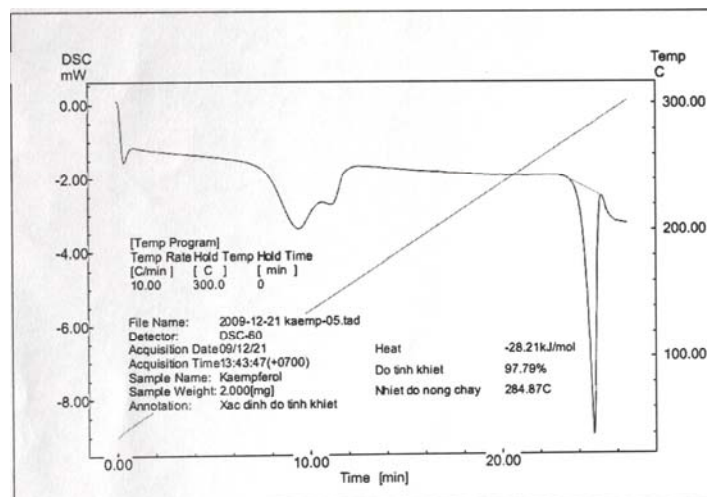
Các hợp chất nghiên cứu đều là các hợp chất kết tinh có điểm nóng chảy xác định nên có thể sử dụng phương pháp quét nhiệt vi sai để xác định độ tinh khiết. Chương trình gia nhiệt được xây dựng dựa trên điểm nóng chảy của mỗi chất. Kết quả được ghi trong Bảng 3.16 và Hình 3.6 ~ 3.7.

Bảng 3.16. Kết quả xác định độ tinh khiết bằng quét nhiệt vi sai

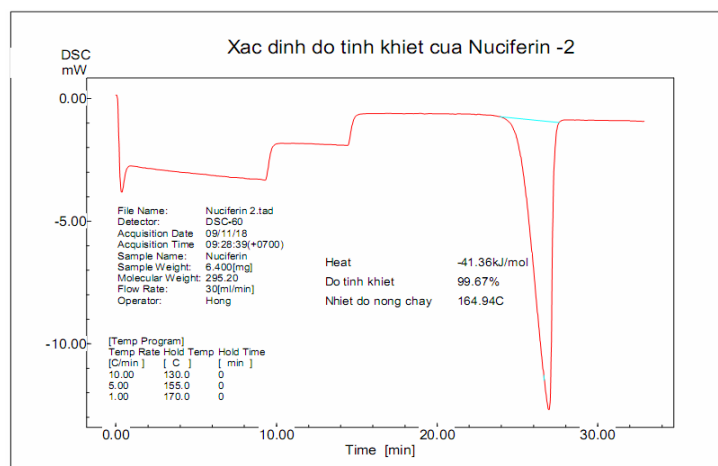
Mẫu thử	Conessin t° phòng - 110 °C: 10 °C/phút. 110 °C – 145 °C: 2 °C/phút.		Kaempferol t° phòng - 300 °C: 10 °C/phút.		Nuciferin t° phòng – 130 °C: 10 °C/phút. 130 °C – 155 °C: 5 °C/phút.	
	<i>Lượng cân (mg)</i>	<i>Độ tinh khiết (%)</i>	<i>Lượng cân (mg)</i>	<i>Độ tinh khiết (%)</i>	<i>Lượng cân (mg)</i>	<i>Độ tinh khiết (%)</i>
1	4,9	98,42	1,8	97,44	6,8	99,64
2	5,3	98,56	1,8	97,96	6,4	99,67
3	5,2	98,60	1,5	97,53	6,8	99,64
4	5,2	98,56	2,0	97,79	9,7	99,58
5	4,6	98,51	1,8	97,44	6,8	99,64
Trung bình		98,53		97,68		99,63
RSD (%)		0,07		0,24		0,40



Hình 3.6. Nhiệt độ của mẫu Conessin



Hình 3.7. Nhiệt độ của mẫu Kaempferol



Hình 3.8. Nhiệt độ của mẫu Nuciferin

3.3. NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU

3.3.1. Xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích

3.3.1.1. Xây dựng phương pháp định lượng và xác định tạp chất bằng HPLC

Dựa trên công thức phân tử và cấu trúc hóa học của các hợp chất nghiên cứu để tìm các điều kiện sắc kí phù hợp như:

- Bản chất pha tĩnh: tất cả các hợp chất đối tượng phân tích đều phù hợp phân tích bằng sắc kí phân bố pha đảo sử dụng cột RP 18 (Bảng 3.17).
- Thành phần pha động: được khảo sát như nêu trong Bảng 3.18.

Bảng 3.17. Loại cột HPLC đã khảo sát xây dựng phương pháp phân tích

Hợp chất	Cột	Cột đã sử dụng
Conessin	RP 18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Phenomenex Luna
Kaempferol	RP 18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm)	Phenomenex Luna
Nuciferin	RP 18 (150 x 4,6mm; 5µm)	Purospher STAR

Bảng 3.18. Khảo sát pha động và thành phần pha động

Hợp chất	Pha động	Thành phần pha động	Nhận xét
Conessin	1	MeOH – nước (35 : 65)	Pic không cân xứng.
	2	MeOH - đệm phosphat pH 3,0 (35 : 65)	Diện tích pic và thời gian lưu ổn định, pic bị kéo đuôi.
	3	Đệm phosphat -MeOH (65 : 35), Pha động có chứa 0,1% TEA, điều chỉnh pH 3,0	Diện tích pic và thời gian lưu ổn định, pic có hình dạng cân xứng (Hệ số bất đối khoảng 1,6).
Kaempferol	1	MeOH : H ₃ PO ₄ 0,4% (60 : 40)	Diện tích pic không ổn định.
	2	MeOH - NaH ₂ PO ₄ 0,05 M đã chỉnh đến pH 2,0 bằng H ₃ PO ₄ (55 : 45)	Diện tích pic và thời gian lưu ổn định.
Nuciferin	1	ACN: H ₂ O:TEA 0,1%: AcOH (56 : 44 : 1: 0,15)	Diện tích pic nhỏ.
	2	ACN: H ₂ O : TEA 0,1%:AcOH (27 : 70,5 : 1,5: 1,0)	Có hiện tượng giảm diện tích pic.
	3	ACN : TEA 0,1%, Gradient	Có hiện tượng giảm diện tích pic.
	4	ACN : TEA 0,1% (70 : 30)	Diện tích pic lớn và ổn định.

- Bước sóng phát hiện: detector tử ngoại khả kiến UV-VIS loại PDA có thể quét phổ. Dựa vào bước sóng theo tài liệu tham khảo hoặc quét phổ để tìm bước sóng thích hợp.

- Tốc độ dòng: 1 ml/phút

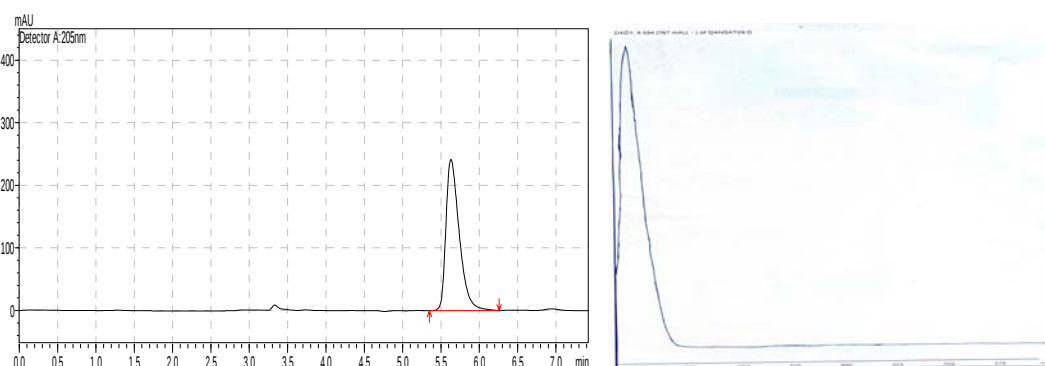
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ l

- Nồng độ dung dịch thử: tùy theo mỗi chất, khảo sát nồng độ thích hợp trong khoảng tuyến tính.

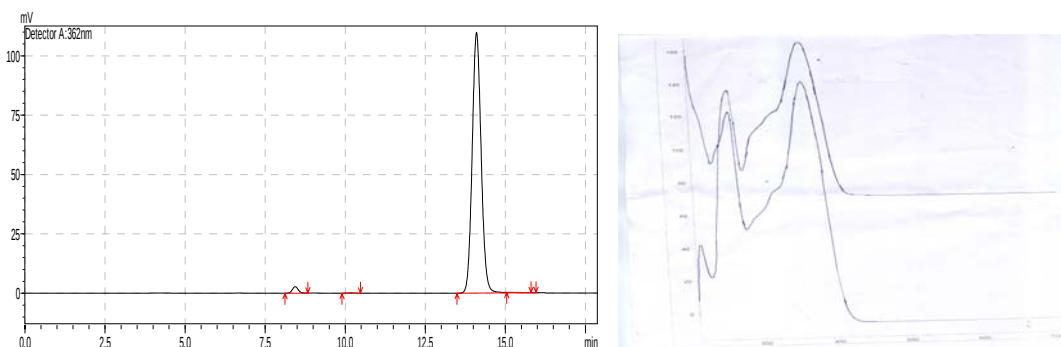
- Dung môi pha mẫu

Với mỗi hợp chất nghiên cứu, khảo sát từ 2 - 4 pha động để lựa chọn pha động phù hợp nhất.

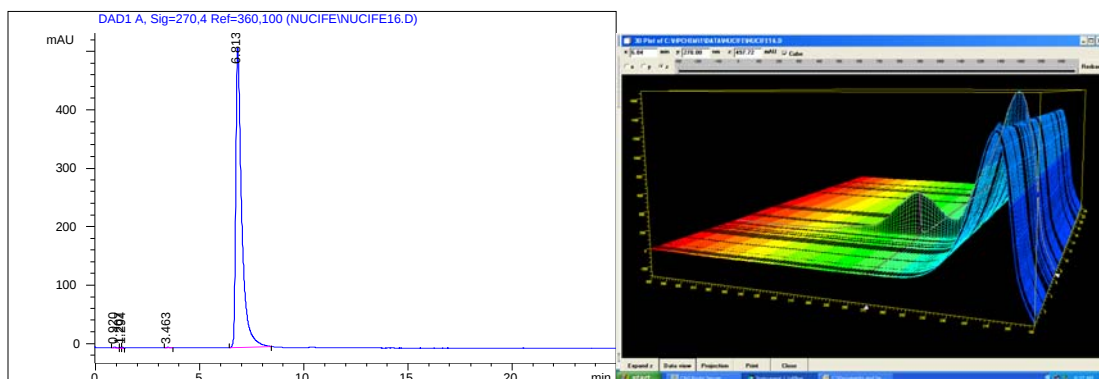
Kết luận: Từ kết quả quét phổ UV-VIS (Hình 3.9 ~ 3.11) lựa chọn được bước sóng phát hiện như trình bày ở Bảng 3.19.



Hình 3.9. SKĐ và phổ UV của dung dịch đối chiếu Conessin



Hình 3.10. SKĐ và phổ UV của dung dịch đối chiếu Kaempferol



Hình 3.11. SKĐ và phổ UV của dung dịch đối chiếu Nuciferin

Bảng 3.19. Kết quả khảo sát bước sóng phát hiện

Hợp chất	Bước sóng phát hiện	Nhận xét
Conessin	205 nm	Phổ hấp thụ yếu
Kaempferol	362 nm	Có cực đại hấp thụ ở vùng đặc hiệu
Nuciferin	270 nm và 280 nm	Khả năng hấp thụ tại 270 nm mạnh hơn

3.3.1.1. Thẩm định phương pháp phân tích

❖ Tính thích hợp của hệ thống sắc kí:

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn đã chuẩn bị ở trên, ghi lại các giá trị về thời gian lưu, diện tích pic. Độ lặp lại của hệ thống được biểu thị bằng độ lệch chuẩn tương đối RSD của diện tích pic. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.20.

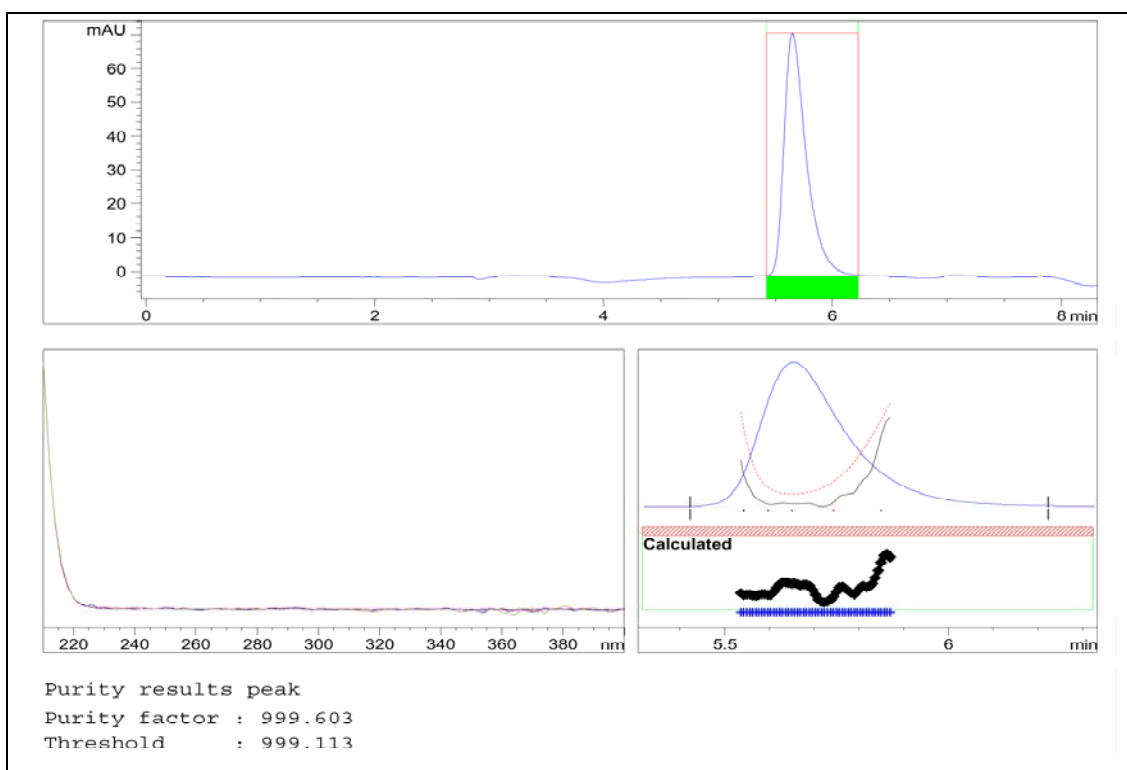
Bảng 3.20. Một số thông số thể hiện sự phù hợp của hệ HPLC đã lựa chọn

Hợp chất	Thời gian lưu t_R (phút)	Độ lặp lại thời gian lưu	Hệ số bất đối T	Số đĩa lí thuyết N	Độ lặp lại diện tích pic
Conessin	5,59	0,54%	1,6	3700	0,27
Nuciferin	7,32	0,65%	1,8	4250	0,61
Kaempferol	15,24	0,87%	1,1	11600	0,68
Yêu cầu		$\leq 2,0\%$	$T \leq 2,0$	$N \geq 2000$	$\leq 2,0\%$

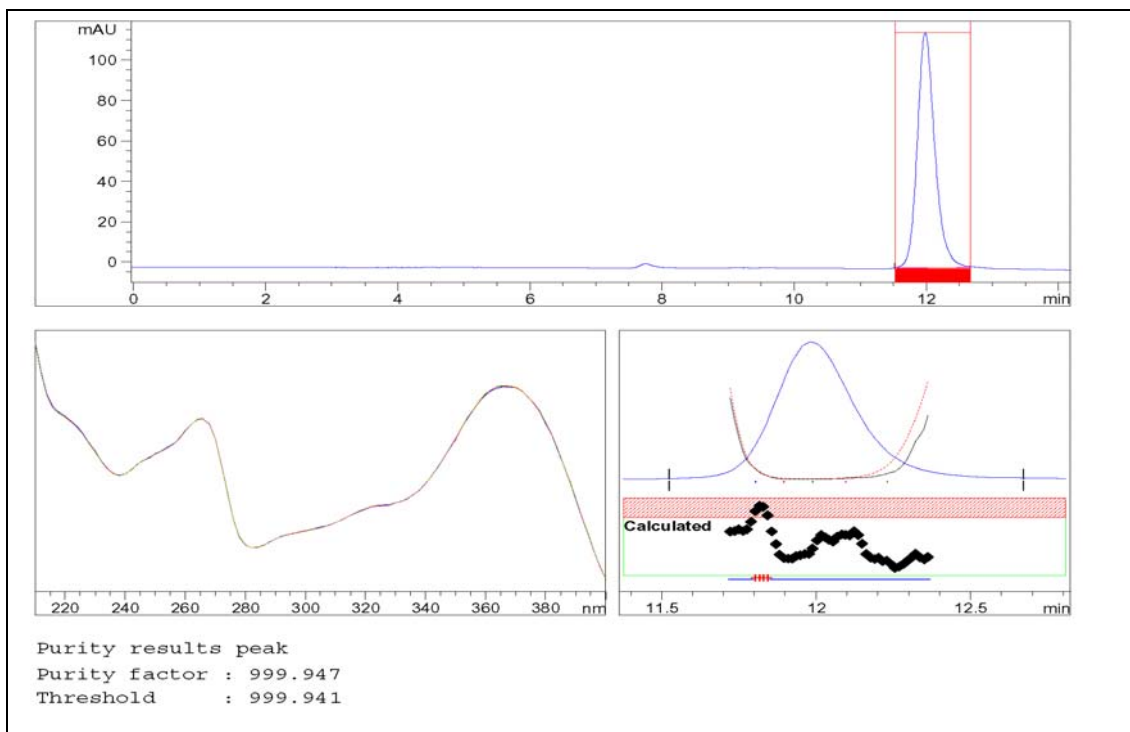
Nhận xét:

Các thông số thực nghiệm thể hiện sự phù hợp của hệ thống sắc kí đã lựa chọn để phân tích các hợp chất nghiên cứu.

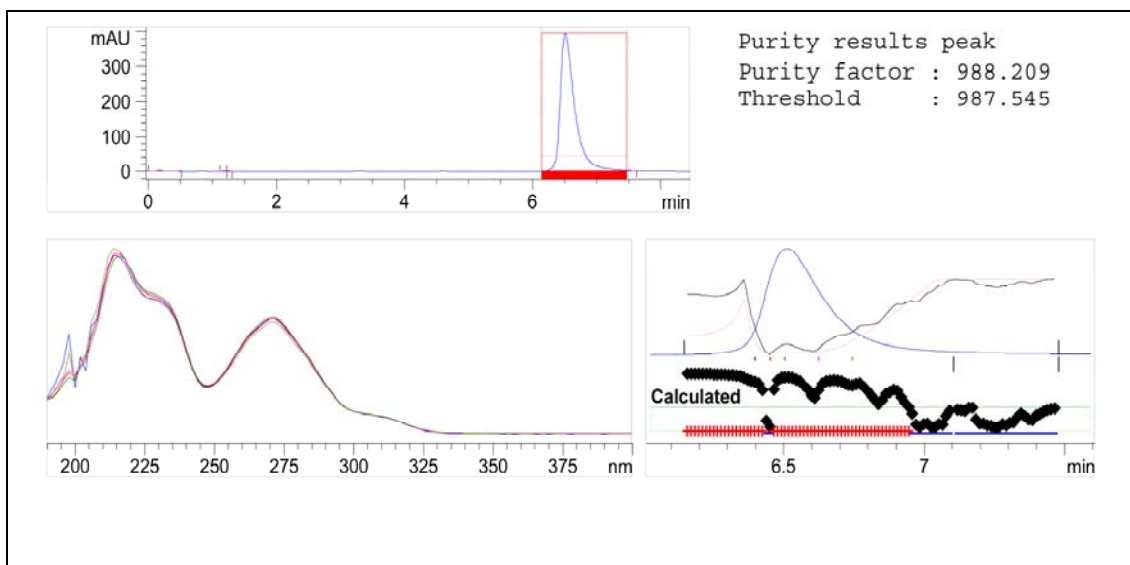
❖ *Tính đặc hiệu:* Tiêm lần lượt dung môi pha mẫu, dung dịch thử và dung dịch đối chiếu vào hệ thống sắc kí, kết quả cho thấy dung dịch chuẩn và dung dịch thử tương ứng cho pic có thời gian lưu tương ứng, còn dung môi pha mẫu không cho pic ở thời gian tương ứng. Các dữ liệu về độ tinh khiết pic được trình bày ở Hình 3.12 ~ 3.14. Hệ HPLC đặc hiệu với chất phân tích.



Hình 3.12. Dữ liệu độ tinh khiết pic Conessin



Hình 3.13. Dữ liệu độ tinh khiết pic Kaempferol



Hình 3.14. Dữ liệu độ tinh khiết pic Nuciferin

❖ **Độ chính xác:** Tiêm 6 dung dịch thử ở nồng độ khảo sát đối với mỗi chất vào hệ thống sắc kí để khảo sát độ chính xác, kết quả được ghi trong Bảng 3.21.

Bảng 3.21. Kết quả khảo sát độ chính xác của 3 chất

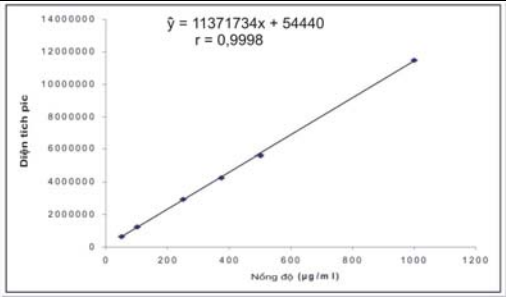
	Conessin			Kaempferol			Nuciferin		
	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng nguyên trạng (%)	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng nguyên trạng (%)	Lượng cân (mg)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng nguyên trạng (%)
1	25,45	6247356	97,93	36,24	1870557	96,55	9,52	69867,0	99,55
2	24,58	6043626	98,63	37,08	1915220	96,62	11,40	83866,1	99,79
3	25,50	6250797	97,41	37,50	1912984	95,42	11,25	83534,2	100,72
4	25,42	6249362	97,93	40,42	2072142	95,90	10,12	73969,0	99,15
5	25,98	6257901	97,92	36,98	1896811	95,95	10,13	74397,5	99,62
6	24,74	6104579	97,91	36,74	1882562	95,85	10,18	75249,0	100,27
Trung bình (%)			97,96			96,05			99,85
RSD (%)			0,40			0,43			0,56

Nhận xét:

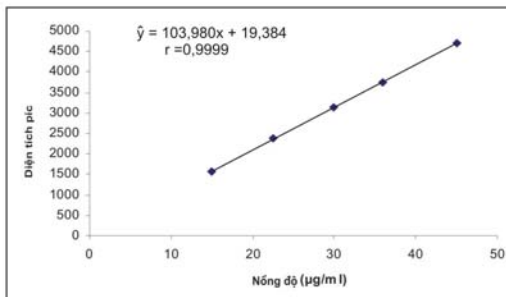
Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp HPLC đã chọn có độ chính xác cao với độ lệch chuẩn tương đối rất nhỏ, thấp nhất là 0,04% và cao nhất là 0,56%.

❖ *Tính tuyến tính:* Tiêm dung dịch chuẩn trong khoảng nồng độ khảo sát vào hệ thống sắc kí để khảo sát độ tuyến tính, kết quả được ghi trong Bảng 3.22 – 3.24.

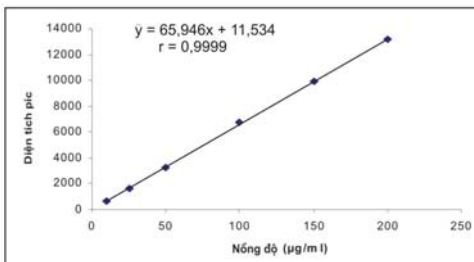
Bảng 3.22. Kết quả khảo sát tính tuyến tính với Conessin

Nồng độ C (mg/ml)	0,05	0,10	0,25	0,375	0,50	1,00
Diện tích pic S (mAu.s)	634668	1245000	2925888	4279451	5628558	11483770
Phương trình hồi qui $\hat{y} = 11371734x + 54440$ Hệ số tương quan $r = 0,9998$						

Bảng 3.23. Kết quả khảo sát tính tuyến tính với Kaempferol

Nồng độ C (µg/ml)	15,0	22,5	30,0	36,0	45,00
Diện tích pic S (mAu.s)	1572,1	2376,5	3130,8	3755,4	4703,2
Phương trình hồi qui $\hat{y} = 103,980x + 19,384$ Hệ số tương quan $r = 0,9999$					

Bảng 3.24. Kết quả khảo sát tính tuyến tính với Nuciferin

Nồng độ C (µg/ml)	10,0	25,0	50,0	100,0	150,0	200,0
Diện tích pic S (mAu.s)	652,01	1619,47	3284,59	6754,81	9893,33	13146,0
Phương trình hồi qui $\hat{y} = 65,946x + 11,534$ Hệ số tương quan $r = 0,9999$						

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ chất phân tích và diện tích pic đáp ứng trong khoảng nồng độ khảo sát đối với các hợp chất nghiên cứu. Kết quả này được sử dụng làm cơ sở để lựa chọn nồng độ định lượng của các hợp chất nghiên cứu tương ứng.

❖ *Độ đúng:* Thêm một lượng chính xác dung dịch chuẩn vào dung dịch thử, sao cho tổng nồng độ sau khi thêm vẫn nằm trong khoảng tuyến tính của phương pháp. Tiến hành phân tích sắc kí để khảo sát độ đúng, kết quả được ghi trong Bảng 3.25.

Bảng 3.25. Kết quả khảo sát độ đúng của 3 chất

Mẫu	TT	Đã có (mg)	Thêm chuẩn (mg)	Tổng lượng tìm lại (mg)	Tỉ lệ thu hồi (%)
Conessin	1	22,94	4,741	27,64	99,14
	2	22,53	4,741	27,13	97,03
	3	21,13	4,741	25,79	98,29
	4	21,70	4,741	26,35	98,08
	5	20,20	4,741	24,88	98,71
	Trung bình				98,25
	RSD (%)				0,81
Kaempferol	1	0,5466	0,0882	0,6345	99,70
	2	0,5522	0,0882	0,6383	97,66
	3	0,5358	0,0882	0,6262	102,46
	4	0,5372	0,0882	0,6246	99,12
	5	0,5285	0,0882	0,6249	97,93
	Trung bình				99,4
	RSD (%)				1,93
Nuciferin	1	0,2000	0,2500	0,4555	101,23
	2	0,2000	0,5000	0,7153	102,19
	3	0,2000	0,7500	0,9530	100,32
	4	0,2000	1,0000	1,2149	101,24
	5	0,2000	1,2500	1,4525	100,17
	Trung bình				101,0
	RSD (%)				0,81

Nhận xét:

Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp phân tích đã lựa chọn cho tỉ lệ thu hồi cao, có độ đúng tốt.

❖ *Giới hạn phát hiện LOD và giới hạn định lượng LOQ:*

Xác định LOD dựa vào tỉ lệ đáp ứng so với nhiễu (S/N). Việc xác định tỉ lệ S/N được tiến hành bằng cách so sánh đáp ứng đo được của mẫu thử có nồng độ chất phân tích thấp đã biết với đáp ứng của mẫu trắng từ đó tính được nồng độ tối thiểu của chất phân tích có thể phát hiện được. Tỉ lệ S/N nằm giữa 3 : 1 hoặc 2 : 1 thường được chấp nhận để thiết lập giới hạn phát hiện. Từ đó suy giới hạn định lượng LOQ ($LOQ = 3,3 \times LOD$). Kết quả được ghi trong Bảng 3.26.

Bảng 3.26. Kết quả khảo sát LOD và LOQ ($\mu\text{g/ml}$)

	Conessin	Kaempferol	Nuciferin
LOD	10	0,038	0,313
LOQ	33	0,120	1,031

Nhận xét:

Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp HPLC có độ nhạy cao, giới hạn định lượng LOQ thấp hơn nồng độ định lượng nhiều lần. Việc xác định LOQ chủ yếu giúp cho việc phân tích tạp chất.

Từ kết quả khảo sát đưa ra chương trình sắc kí cho các hợp chất nghiên cứu ở Bảng 3.27.

Bảng 3.27. Chương trình sắc kí để định lượng và xác định tạp chất trong nguyên liệu thiết lập chuẩn

Điều kiện sắc kí	Conessin	Nuciferin	Kaempferol
Cột sắc kí	RP 18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)	RP 18 (150 x 4,6mm; 5µm)	RP 18 (250 mm x 4,6 mm; 5 µm)
Nhiệt độ cột	Nhiệt độ phòng	Nhiệt độ phòng	Nhiệt độ phòng
Pha động	Đệm phosphat – MeOH (65 : 35), Pha động có chứa 0,1% TEA, điều chỉnh pH 3,0	ACN – TEA 0,1% (70 : 30)	Methanol - dung dịch NaH ₂ PO ₄ 0,05M đã điều chỉnh pH = 2 với acid H ₃ PO ₄ (55 : 45)
Bước sóng	205 nm	270 nm	362 nm
Tốc độ dòng (ml/phút)	0,8	1,0	1,4
Thể tích tiêm (µl)	20	10	20
Nồng độ dung dịch thử (mg/ml)	Định lượng: 0,5 Xác định tạp chất: 0,5	Định lượng: 0,125 Xác định tạp chất: 0,25	Định lượng: 0,03 Xác định tạp chất: 0,045

3.3.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng đánh giá chất chuẩn

Căn cứ vào tính chất vật lí, hóa học và mục đích sử dụng của các nguyên liệu thiết lập chuẩn, dựa vào kết quả của các nghiên cứu đã nêu trên, tham khảo chứng chỉ phân tích của các chất đối chiếu sơ cấp, dự kiến tiêu chuẩn chất lượng của chất chuẩn đối chiếu hóa học là các hợp chất tự nhiên đặc trưng chiết ra từ dược liệu gồm các chỉ tiêu và phương pháp thử được tóm tắt trong Bảng 3.28.

Bảng 3.28. Tóm tắt các chỉ tiêu và phương pháp thử của các chất đối chiếu

Chỉ tiêu chất lượng	Yêu cầu	Phương pháp thử
1. Định tính - Phổ hồng ngoại IR - Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: ^1H - NMR, ^{13}C - NMR	Phải giống mẫu chuẩn hoặc phù hợp với phổ đối chiếu trong bộ dữ liệu chuẩn. Phải giống mẫu chuẩn hoặc phù hợp với phổ đối chiếu trong bộ dữ liệu chuẩn.	Theo TCCL, Phụ lục 13, 14, 15 Theo TCCL, Phụ lục 13, 14, 15
2. Điểm chảy	Phải nằm trong khoảng điểm chảy lí thuyết của chất đó $\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ hoặc phù hợp với điểm chảy trong bộ dữ liệu chuẩn.	Theo TCCL, Phụ lục 13, 14, 15
3. Độ tinh khiết	Không được thấp hơn 95,0%.	Theo TCCL, Phụ lục 13, 14, 15
4. Tạp chất liên quan	Không được vượt quá 3% (Mức 1) hoặc không được vượt quá 5% (Mức 2) tính theo chế phẩm nguyên trạng, loại những pic có tỉ lệ diện tích dưới 0,05%.	Theo TCCL, Phụ lục 13, 14, 15
5. Định lượng	Không được ít hơn 95,0% tính theo nguyên trạng.	Theo TCCL, Phụ lục 13, 14, 15

3.3.3. Áp dụng tiêu chuẩn chất lượng và phương pháp phân tích đã được thẩm định để xác định chất lượng nguyên liệu thiết lập chuẩn

Tiến hành đánh giá chất lượng nguyên liệu theo TCCL đã xây dựng (Bảng 3.27) và qui trình phân tích đã công bố (Phụ lục 13, 14, 15).

3.3.3.1. Định tính

Định tính nguyên liệu thiết lập chất chuẩn, sử dụng phổ IR và phổ 1D NMR (^1H – NMR và ^{13}C – NMR), so sánh với phổ của mẫu chuẩn ghi song song

cùng điều kiện hoặc với phổ chuẩn trong bộ dữ liệu chuẩn (Mục 3.2). Kết quả phân tích cho thấy các mẫu nguyên liệu đáp ứng đúng phép thử định tính.

3.3.3.2. Điểm chảy

Tiến hành đo điểm chảy, mỗi mẫu đo 3 lần, xác định điểm chảy trung bình, so sánh với điểm chảy lý thuyết và điểm chảy đã đo ghi trong bộ dữ liệu chuẩn (Mục 3.2). Kết quả điểm chảy của các chất được tóm tắt trong Bảng 3.29.

Bảng 3.29. Điểm chảy của các hợp chất dùng làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn

Mẫu thử	Điểm chảy (°C)		
	<i>Conessin</i>	<i>Kaempferol</i>	<i>Nuciferin</i>
A	124,5	278,1	164,8
B	124,5	278,2	164,9
C	124,6	277,7	165,2
Trung bình	124,5	278,0	165,0
Điểm chảy lý thuyết	123,5 ± 1	277 ± 1	165,5 ± 1

Nhận xét:

Kết quả phân tích cho thấy các mẫu kiểm tra đều đạt yêu cầu, cho điểm chảy đúng như kết quả ghi trong bộ dữ liệu chuẩn.

3.3.3.3. Xác định độ tinh khiết

Các hợp chất nghiên cứu đều là các hợp chất kết tinh có điểm nóng chảy xác định nên có thể sử dụng phương pháp quét nhiệt vi sai để xác định độ tinh khiết. Kết quả được nêu ở mục 3.2.4 cho thấy cả 3 chất kiểm tra đều đạt yêu cầu chất lượng. Độ tinh khiết của các chất xác định được với Conessin là 98,53%, Kaempferol là 97,68% và Nuciferin là 99,63%.

3.3.3.4. Xác định tạp chất liên quan

Yêu cầu: Tổng hàm lượng tạp chất trong nguyên liệu không được quá 3% tính theo chế phẩm nguyên trạng, loại những pic có tỉ lệ diện tích dưới 0,05%.

Tiến hành phương pháp HPLC ghi trong qui trình phân tích (Phụ lục 13, 14, 15). Điều kiện sắc kí như mục định lượng, thời gian chạy sắc kí phải gấp 2 đến gấp 3 lần thời lưu của pic chính thu được trong SKĐ của mẫu thử. Kết quả phân tích tạp chất được ghi ở Bảng 3.30 ~ 3.32. Sắc kí đồ phân tích tạp chất được ghi ở Hình 3.15 ~ 3.17.

Bảng 3.30. Kết quả phân tích tạp chất trong nguyên liệu Conessin

Mẫu thử	Diện tích pic (mAu.s)			Hàm lượng tạp chất (%)			
	<i>Tạp chất 1</i> <i>t_R = 7,04 phút</i>	<i>Tạp chất 2</i> <i>t_R = 7,76 phút</i>	<i>Tạp chất 3</i> <i>t_R = 10,38 phút</i>	<i>Tạp chất 1</i>	<i>Tạp chất 2</i>	<i>Tạp chất 3</i>	<i>Tổng tạp chất</i>
1	72206	18145	16320	1,14	0,29	0,26	1,69
2	63224	19363	16615	1,05	0,32	0,27	1,64
3	61521	18463	16111	1,03	0,31	0,27	1,61
4	64211	20027	16255	1,08	0,34	0,27	1,69
5	66173	19700	16319	1,05	0,31	0,26	1,62
6	65441	19574	20374	1,01	0,30	0,31	1,62
Trung bình				1,06	0,31	0,27	1,64

Bảng 3.31. Kết quả phân tích tạp chất trong nguyên liệu Kaempferol

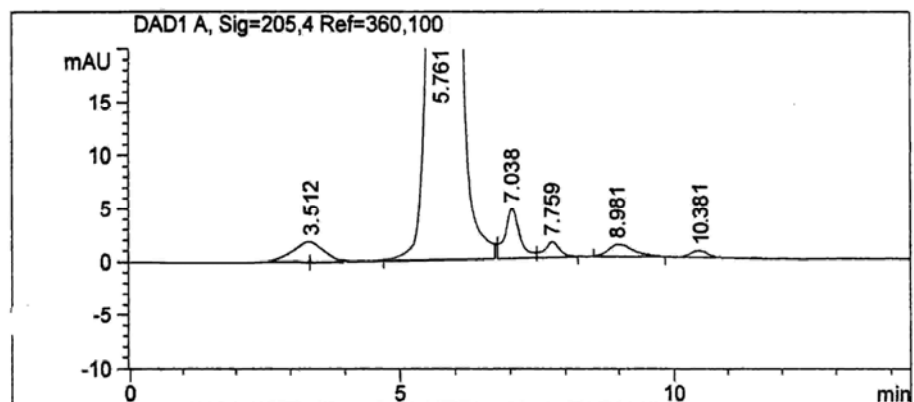
Mẫu thử	Diện tích pic (mAu.s)		Hàm lượng tạp chất (%)		
	<i>Tạp chất 1</i> <i>t_R = 9,75 phút</i>	<i>Tạp chất 2</i> <i>t_R = 18,15 phút</i>	<i>Tạp chất 1</i>	<i>Tạp chất 2</i>	<i>Tổng tạp chất</i>
1	67,1	6,3	1,61	0,15	1,76
2	67,4	6,0	1,62	0,14	1,76
3	68,0	5,7	1,60	0,13	1,74
4	68,9	5,6	1,64	0,13	1,77
Trung bình			1,62	0,14	1,76

Bảng 3.32. Kết quả phân tích tạp chất trong nguyên liệu Nuciferin

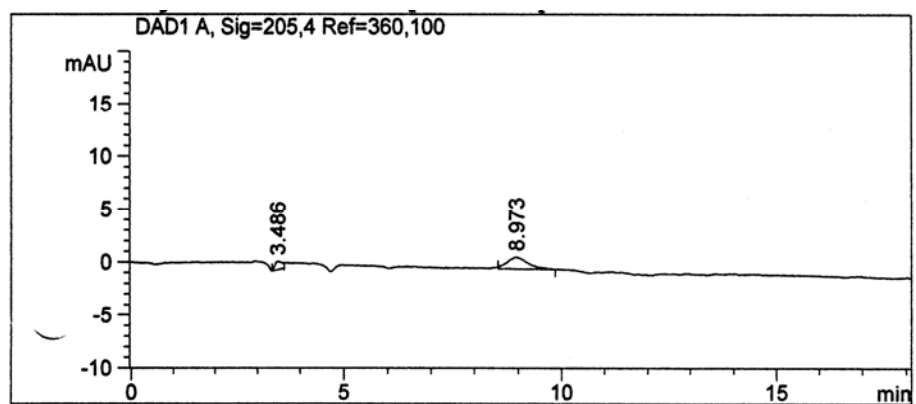
Mẫu thử	Diện tích pic (mAu.s) $t_R = 3,33$ phút	Hàm lượng tạp chất (%)
1	14,95	0,10
2	14,91	0,10
3	16,02	0,11
4	15,77	0,10
Trung bình		0,10

Nhận xét:

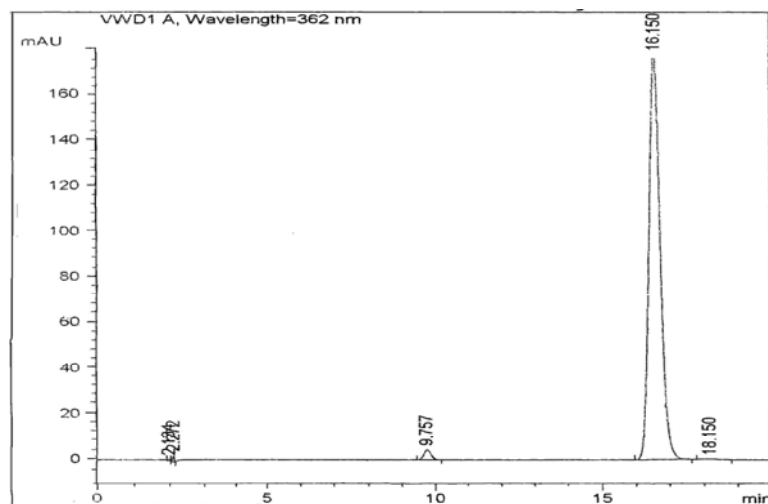
Kết quả phân tích tạp chất cho thấy: Mẫu Conessin có 3 tạp chất với các thời gian lưu tương ứng là 7,04 phút; 7,76 phút và 10,38 phút. Mẫu Kaempferol có 2 tạp chất ở các thời gian lưu tương ứng là 9,75 phút và 18,15 phút. Mẫu Nuciferin có một tạp chất duy nhất ở thời gian lưu 3,33 phút. Các kết quả phân tích tạp chất hoàn toàn phù hợp với kết quả định lượng và xác định độ tinh khiết bằng DSC. Sắc kí đồ xác định tạp chất và sắc kí đồ mẫu trắng trong xác định tạp chất của 3 chất được trình bày ở Hình 3.15 ~ 3.20.



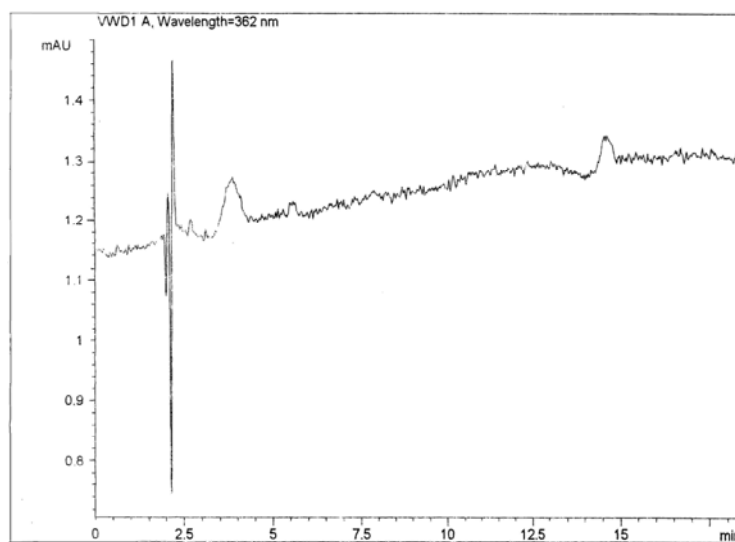
Hình 3.15. SKĐ xác định tạp chất của mẫu Conessin



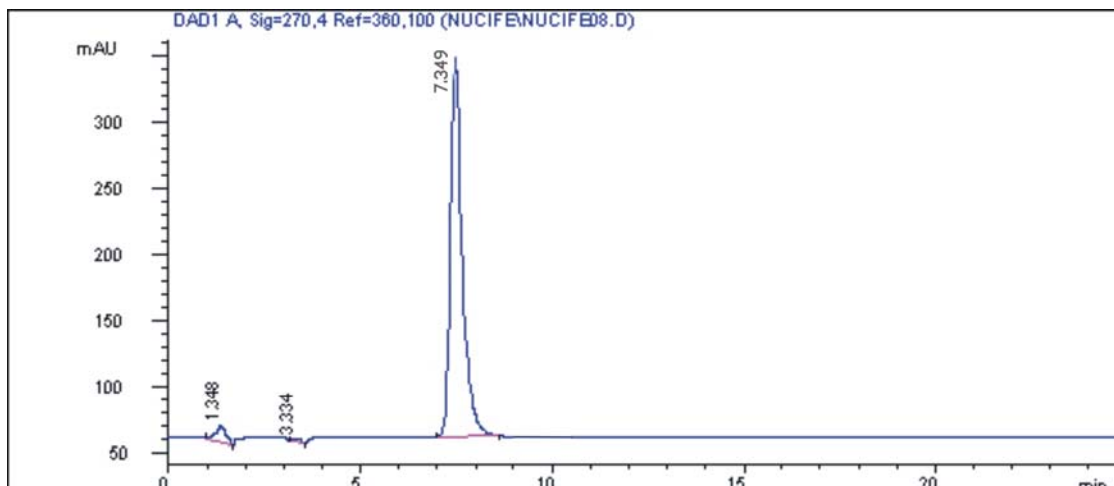
Hình 3.16. SKĐ mẫu trắng trong xác định tạp chất của mẫu Conessin



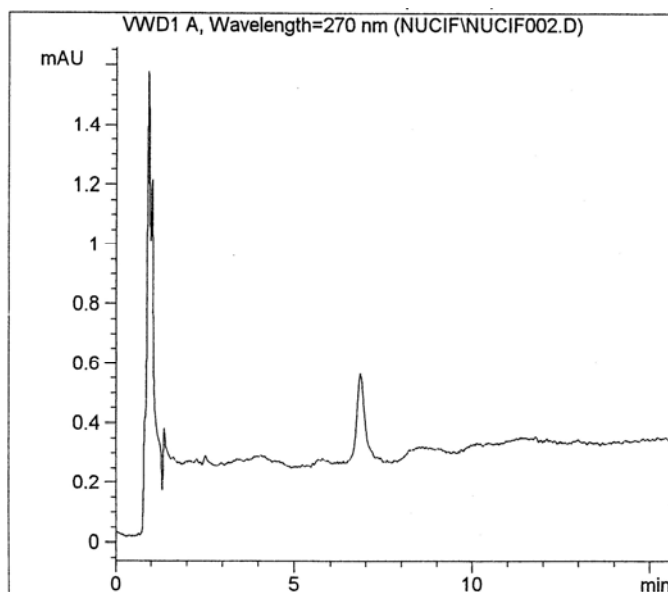
Hình 3.17. SKĐ xác định tạp chất của mẫu Kaempferol



Hình 3.18. SKĐ mẫu trắng trong xác định tạp chất của mẫu Kaempferol



Hình 3.19. SKĐ xác định tạp chất của mẫu Nuciferin



Hình 3.20. SKĐ mẫu trắng trong xác định tạp chất của mẫu Nuciferin

3.3.3.5. Định lượng

Yêu cầu: Hàm lượng không được thấp hơn 95,0% tính theo nguyên trạng.

Tiến hành định lượng nguyên liệu theo qui trình phân tích (Phụ lục 13, 14, 15). Kết quả định lượng được ghi trong Bảng 3.33 ~ 3.35.

Bảng 3.33. Kết quả định lượng Conessin nguyên liệu thiết lập chuẩn

Mẫu thử	Khối lượng (mg)	Diện tích pic (mAu.s)		Hàm lượng (%)
		Pic chính	Tổng pic	
1	10,21	6247356	6354027	98,32
2	9,81	6048310	6147512	98,39
3	9,64	5880045	5976140	98,39
4	9,35	5851784	5952277	98,31
5	9,91	6179818	6282010	98,37
6	11,46	6373289	6478678	98,37
Hàm lượng trung bình (%)				98,36
RSD (%)				0,04

Bảng 3.34. Kết quả định lượng Kaempferol nguyên liệu thiết lập chuẩn

Mẫu thử	Khối lượng (mg)	Diện tích pic (mAu.s)		Hàm lượng (%)
		Pic chính	Tổng pic	
1	18,12	1870557	1937397	96,55
2	18,54	1915220	1982198	96,62
3	18,75	1912984	2004804	95,42
4	20,21	2072142	2160732	95,90
5	18,49	1896811	1976874	95,95
6	18,37	1882562	1964070	95,85
Hàm lượng trung bình (%)				96,05
RSD (%)				0,47

Bảng 3.35. Kết quả định lượng Nuciferin nguyên liệu thiết lập chuẩn

Mẫu thử	Khối lượng (mg)	Diện tích pic (mAu.s)		Hàm lượng%
		Pic chính	Tổng pic	
1	25,01	14815,8	14830,6	99,90
2	25,30	15196,8	15213,5	99,89
3	25,02	14983,3	14999,8	99,89
4	24,79	14802,9	14817,7	99,90
5	25,01	15043,4	15058,5	99,90
6	24,88	14862,5	14877,4	99,90
Hàm lượng trung bình (%)				99,90
RSD (%)				0,63

Nhận xét:

Các mẫu thử đều có hàm lượng lớn hơn 95,0% (tính theo nguyên trạng), đạt yêu cầu để thiết lập chất chuẩn đối chiếu.

3.3.4. Đóng gói và đánh giá đồng nhất lô

Đóng gói, ghi nhãn, bảo quản: Nguyên liệu được cân và đóng gói 20 mg/lọ, tiến hành đóng trong Glove – box, nạp khí nitơ 99,99% vào buồng đóng, độ ẩm tương đối trong buồng đóng xấp xỉ 40%. Ghi nhãn theo qui định. Bảo quản ở nhiệt độ 2 – 8 °C, tránh ánh sáng.

Đánh giá đồng nhất mẫu trong quá trình đóng gói: Theo qui định về lấy mẫu ngẫu nhiên để kiểm tra chất lượng, số lượng lọ thành phẩm được lấy để kiểm tra đồng nhất mẫu là 06 lọ. Sử dụng phương pháp phân tích HPLC như mục định lượng. Kết quả đánh giá độ đồng nhất lô được ghi trong Bảng 3.36.

Nhận xét: Độ lặp lại tương đối của hàm lượng giữa các lọ trong một lô sản xuất đều có RSD dưới 1,0%. Do đó, theo qui định của ASEAN, các lọ thành phẩm của lô sản xuất có hàm lượng đồng nhất. Từ đó kết luận điều kiện đóng gói ổn định và phù hợp.

Bảng 3.36. Kết quả đánh giá độ đồng nhất lô

Mẫu thử	Conessin		Kaempferol		Nuciferin	
	<i>Lọ số</i>	<i>Hàm lượng (%)</i>	<i>Lọ số</i>	<i>Hàm lượng (%)</i>	<i>Lọ số</i>	<i>Hàm lượng (%)</i>
1	10	97,93	08	95,44	04	99,25
2	20	98,63	17	95,46	10	99,44
3	30	97,41	30	95,06	24	100,82
4	40	97,93	44	95,36	43	101,49
5	50	97,92	53	95,96	53	100,77
6	60	97,91	60	96,04	75	100,84
Trung bình		97,96		95,55		100,44
RSD (%)		0,40		0,39		0,88

3.3.5. Đánh giá liên phòng thí nghiệm và xác định giá trị ấn định

Yêu cầu: Ít nhất 2 phòng thí nghiệm tham gia đánh giá cho mỗi chất

Sau khi đóng gói, các chất chuẩn vừa thiết lập được gửi sang phòng thí nghiệm khác (1 hoặc 2 phòng thí nghiệm) để phân tích đánh giá và so sánh kết quả liên phòng thí nghiệm. Sau đó được xử lý thống kê để xác định giá trị ấn định ghi trên chứng chỉ phân tích. Kết quả chi tiết đánh giá liên phòng thí nghiệm được trình bày ở Phụ lục 16A, 17A, 18A. Trong số 3 chất chuẩn thiết lập, có Kaempferol và Nuciferin được đánh giá ở 3 phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn ISO – IEC 17025 và đạt tiêu chuẩn GLP của WHO, 2 phòng thí nghiệm của VKNTTU là Khoa Thiết lập chất chuẩn và Khoa Kiểm nghiệm các dạng bào chế, và 1 phòng thí nghiệm của Viện kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh. Conessin được đánh giá ở 2 phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn ISO – IEC 17025 và đạt tiêu chuẩn GLP của WHO (2 phòng thí nghiệm của VKNTTU).

Kết quả trung bình của 2 và 3 phòng thí nghiệm giống nhau, phương pháp phân tích có độ tái lập và độ lặp lại cao, kết quả kiểm nghiệm đáng tin cậy.

Từ kết quả đánh giá liên phòng của các phòng thí nghiệm, kết quả định lượng đã được xử lý thống kê để xác định giá trị ấn định. Kết quả xác định giá trị ấn định được trình bày chi tiết ở Phụ lục 16B, 17B, 18B. Kết quả hàm lượng công bố của các chất chuẩn ghi trên chứng chỉ phân tích và số lượng chất chuẩn thiết lập được đưa ra ở Bảng 3.37.

*Bảng 3.37. Kết quả hàm lượng công bố
và số lượng của các chất chuẩn đã thiết lập được*

STT	Hợp chất	Hàm lượng ghi trên nhãn (%)	Số lượng lọ 20 mg thiết lập được
1	Conessin	97,80	59
2	Kaempferol	95,17	50
3	Nuciferin	100,11	50



Hình 3.21. Ảnh chất chuẩn đối chiếu Conessin



Hình 3.22. Ảnh chất chuẩn đối chiếu Kaempferol



Hình 3.23. Ảnh chất chuẩn đối chiếu Nuciferin

3.4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU

3.4.1. Đề cương nghiên cứu độ ổn định

- Mục đích: Để đánh giá các chỉ tiêu chất lượng chủ yếu của CCĐC Conessin, Kaempferol, Nuciferin sau thời gian bảo quản 9 tháng và 15 tháng.

- Nguyên liệu thử: Mẫu được bảo quản ở nhiệt độ 2-8 °C, độ ẩm 40%, đựng trong lọ thủy tinh màu nâu, nút kín bằng nút teflon.

- Các thông số thử nghiệm và yêu cầu chất lượng như sau:

Bảng 3.38. Các chỉ tiêu chất lượng đánh giá và giới hạn chấp nhận

Chỉ tiêu thử	Giới hạn chấp nhận
Tạp chất liên quan	Không được vượt quá 3% (Mức 1) hoặc không được vượt quá 5% (Mức 2) tính theo chế phẩm nguyên trạng, loại những pic có tỉ lệ diện tích dưới 0,05%.
Định lượng	Không được ít hơn 95,0% tính theo nguyên trạng.

Kết quả định lượng nếu hàm lượng CCĐC nhỏ hơn 95,0% thì mẫu thử không đạt yêu cầu sử dụng làm CCĐC nữa. Nếu kết quả định lượng không ít hơn 95,0% nhưng chênh lệch hàm lượng giữa kết quả kiểm tra định kì và kết quả công bố trên chứng chỉ phân tích lớn hơn 1% thì phải điều chỉnh lại GTAD đã công bố.

Tại thời điểm 9 tháng kiểm tra chất lượng dựa trên 2 chỉ tiêu: phân tích tạp chất liên quan dựa trên tỉ lệ diện tích pic và xác định hàm lượng hợp chất chính so với chất chuẩn liên kết (đối với Kaempferol và Nuciferin), phân tích tạp chất liên quan và sơ bộ xác định hàm lượng hợp chất chính.

- Điều kiện HPLC để phân tích tạp chất liên quan và định lượng:

- Conessin: Máy sắc kí: Agilent 1100. Cột C18, 250 x 4,6 mm; 5 µm. Pha động: dung dịch đệm phosphat pH 3,0 : MeOH (65 : 35). Dung môi pha mẫu: pha động. Detector UV (205 nm). Tốc độ dòng: 0,8 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu: 20 µL.

▫ Kaempferol: Máy sắc kí: HP 1100. Cột C18, 250 x 4,6 mm; 5 μ m. Pha động: Methanol : dd NaH_2PO_4 0,05M (đã điều chỉnh pH = 2 với H_3PO_4) (55 : 45). Dung môi pha mẫu: MeOH và pha động. Detector UV (362 nm). Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút (ở thời điểm 9 tháng), 1,4 ml/phút (ở thời điểm 15 tháng). Thể tích tiêm mẫu: 20 μ L.

▫ Nuciferin: Máy sắc kí: Agilent 1100. Cột C18, 250 x 4,6 mm; 5 μ m. Pha động: Acetonitril : Triethylamin 0,1% (70 : 30). Dung môi pha mẫu: Acetonitril. Detector UV (270 nm). Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu: 20 μ L.

▫ Chuẩn bị mẫu thử để phân tích tạp chất liên quan:

▫ Conessin: Cân chính xác khoảng 10 mg chế phẩm vào bình định mức 20 ml, hòa tan và pha loãng bằng pha động tới vừa đủ (dung dịch có nồng độ 0,5 mg/ml).

▫ Kaempferol: Cân chính xác khoảng 30 mg nguyên liệu Kaempferol vào bình định mức 100 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng methanol. Hút chính xác 3 ml dung dịch này, pha loãng đến vừa đủ 20,0 ml bằng pha động (dung dịch có nồng độ 0,045 mg/ml).

▫ Nuciferin: Hoà tan 25,0 mg mẫu thử trong Acetonitril và pha loãng thành 100,0 ml với cùng dung môi (dung dịch có nồng độ 0,25 mg/ml)

▫ Chuẩn bị mẫu thử để định lượng và bán định lượng CCĐC

▫ Conessin: *Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 10 mg chế phẩm vào bình định mức 20 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng pha động (dung dịch có nồng độ 0,5 mg/ml).

▫ Kaempferol: *Dung dịch chuẩn*: Cân chính xác khoảng 20 mg chuẩn Kaempferol vào bình định mức 100 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng methanol. Hút chính xác 3 ml dung dịch này, pha loãng đến vừa đủ 20,0 ml bằng pha động được (dung dịch có nồng độ 0,03 mg/ml). *Dung dịch thử*: Cân chính xác khoảng 20 mg chế phẩm Kaempferol vào bình định mức 100 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng methanol. Hút chính xác 3 ml dung dịch này, pha loãng

đến vừa đủ 20,0 ml bằng pha động (dung dịch có nồng độ 0,03 mg/ml).

▫ Nuciferin: *Dung dịch chuẩn*: Hoà tan 25,0 mg Nuciferin chuẩn trong Acetonitril và pha loãng thành 100,0 ml với cùng dung môi. Hút 5,0 ml pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi (dung dịch có nồng độ 0,125 mg/ml). *Dung dịch thử*: Hoà tan 25,0 mg mẫu thử trong Acetonitril và pha loãng thành 100,0 ml với cùng dung môi. Hút 5,0 ml pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi (dung dịch có nồng độ 0,125 mg/ml).

- Các chỉ tiêu cần nghiên cứu tại thời điểm ban đầu như sau:

Bảng 3.39. Các giá trị tại thời điểm ban đầu

Hợp chất	Tạp chất liên quan (%)	Hàm lượng (%)
Conessin	1,64	97,80
Kaempferol	1,76	95,17
Nuciferin	0,10	100,11

3.4.2. Kết quả đánh giá độ ổn định của các chất chuẩn đối chiếu sau 9 tháng

3.4.2.1. Kết quả đánh giá độ ổn định của Conessin sau 9 tháng

Trong dung dịch thử, sau khi loại pic dung môi và các pic tạp chất có tỉ lệ phần trăm diện tích dưới 0,05% còn lại 3 pic tạp chất có thời gian lưu và diện tích pic được ghi ở Bảng 3.40.

Bảng 3.40. Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Conessin sau 9 tháng

Mẫu thử	Tỉ lệ mỗi tạp chất (%)			Tỉ lệ Tổng tạp chất (%)
	Tạp chất 1	Tạp chất 2	Tạp chất 3	
t_R (phút)	7,40	8,04	9,70	
A	1,15	0,36	0,24	1,75
B	1,14	0,38	0,23	1,75
C	1,13	0,33	0,24	1,70
Trung bình	1,14	0,36	0,23	1,73

Nhận xét: Tổng tạp chất 1,73% lớn hơn so với tổng tạp chất tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu độ ổn định (1,64%) nhưng vẫn dưới 3% chứng tỏ mẫu thử vẫn đạt yêu cầu chất lượng ở mức 1 sau thời gian bảo quản 9 tháng.

Bảng 3.41. Kết quả bán định lượng Conessin sau 9 tháng

Mẫu thử	Lượng cân (g)	Diện tích pic chính (mAu.s)	Tổng diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng nguyên trạng (%)
1	0,0101	5961,537	6067,695	98,25
2	0,0102	5961,584	6079,401	98,06
3	0,0101	5894,754	5997,111	98,29
4	0,0100	5930,756	6036,230	98,25
5	0,0100	5808,881	5909,749	98,29
6	0,0100	5936,532	6035,140	98,37
Trung bình				98,25
RSD (%)				0,11

Nhận xét: Hàm lượng trung bình sau 9 tháng là 98,25% cao hơn hàm lượng ghi trên chứng chỉ phân tích (97,80%). Giá trị RSD bằng 0,11% nằm trong phạm vi sai số phân tích (SKĐ xác định tạp chất và định lượng Conessin ở thời điểm 9 tháng được trình bày ở Phụ lục 19).

3.4.2.2. Kết quả đánh giá độ ổn định của Kaempferol sau 9 tháng

Trong dung dịch thử, sau khi loại pic dung môi và các pic tạp chất có tỉ lệ phần trăm diện tích dưới 0,05% còn lại 2 pic tạp chất có thời gian lưu và diện tích pic được ghi ở Bảng 3.42.

Bảng 3.42. Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Kaempferol sau 9 tháng

Mẫu thử	Tỉ lệ mỗi tạp chất (%)		Tỉ lệ Tổng tạp chất (%)
	Tạp chất 1	Tạp chất 2	
t_R (phút)	15,05	30,96	
A	1,63	0,15	1,78
B	1,65	0,15	1,80
C	1,62	0,15	1,77
Trung bình	1,63	0,15	1,78

Nhận xét: Tổng tạp chất 1,78% hơi tăng nhẹ so với tổng tạp chất tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu độ ổn định (1,76%) và dưới 3% chứng tỏ mẫu thử vẫn đạt yêu cầu chất lượng ở mức 1 sau thời gian bảo quản 9 tháng.

Bảng 3.43. Kết quả định lượng Kaempferol sau 9 tháng

Mẫu thử	Lượng cân (g)	Diện tích pic chính (mAu.s)	Hàm lượng nguyên trạng (%)
Chuẩn liên kết	0,01020	2187,01	
1	0,01015	2155,20	94,97
2	0,01006	2140,18	95,15
3	0,01002	2139,23	95,49
4	0,01002	2134,94	95,30
5	0,01026	2195,86	95,72
6	0,00990	2104,71	95,09
Trung bình			95,29
RSD (%)			0,29

Nhận xét: Hàm lượng trung bình sau 9 tháng là 95,29% hơi cao hơn hàm lượng ghi trên chứng chỉ phân tích (95,17%). Giá trị RSD bằng 0,29% nằm trong phạm vi sai số phân tích (SKĐ xác định tạp chất và định lượng Kaempferol ở thời điểm 9 tháng được trình bày ở Phụ lục 20).

3.4.2.3. Kết quả đánh giá độ ổn định của Nuciferin sau 9 tháng

Trong dung dịch thử, sau khi loại pic dung môi và các pic tạp chất có tỉ lệ phần trăm diện tích dưới 0,05% còn lại 1 pic tạp chất có thời gian lưu và diện tích pic được ghi ở Bảng 3.44.

Bảng 3.44. Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Nuciferin sau 9 tháng

Mẫu thử	Tổng tạp chất (%) $t_R = 2,84 \text{ phút}$
A	0,10
B	0,10
C	0,10
Trung bình	0,10

Nhận xét: Tổng tạp chất 0,10% không thay đổi so với tổng tạp chất tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu độ ổn định (0,10%) và dưới 3% chứng tỏ mẫu thử vẫn đạt yêu cầu chất lượng ở mức 1 sau thời gian bảo quản 9 tháng.

Bảng 3.45. Kết quả định lượng Nuciferin sau 9 tháng

Mẫu thử	Lượng cân (g)	Diện tích pic chính (mAu.s)	Hàm lượng nguyên trạng (%)
Chuẩn liên kết	0,0121	7292,51	
1	0,0125	7534,23	100,01
2	0,0124	7506,40	100,44
3	0,0115	6956,16	100,36
4	0,0118	7065,35	99,35
5	0,0122	7370,44	100,24
6	0,0120	7183,56	99,33
Trung bình			99,96
RSD (%)			0,50

Nhận xét: Hàm lượng trung bình sau 9 tháng là 99,96% thấp hơn hàm lượng ghi trên chứng chỉ phân tích (100,11%), giá trị RSD bằng 0,50% nằm trong phạm vi sai số phân tích. (SKĐ xác định tạp chất và định lượng Nuciferin ở thời điểm 9 tháng được trình bày ở Phụ lục 21).

3.4.3. Kết quả đánh giá độ ổn định của các chất chuẩn đối chiếu sau 15 tháng

3.4.3.1. Kết quả đánh giá độ ổn định của Conessin sau 15 tháng

Trong dung dịch thử, sau khi loại pic dung môi và các pic tạp chất có tỉ lệ phần trăm diện tích dưới 0,05% còn lại 3 pic tạp chất có thời gian lưu và diện tích pic được ghi ở Bảng 3.46.

Bảng 3.46. Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Conessin sau 15 tháng

Mẫu thử	Tỉ lệ mỗi tạp chất (%)			Tổng tạp chất (%)
	Tạp chất 1 ($t_R = 7,17'$)	Tạp chất 2 ($t_R = 7,82'$)	Tạp chất 3 ($t_R = 9,97'$)	
A	1,09	0,42	0,35	1,86
B	1,08	0,41	0,27	1,76
C	1,07	0,34	0,29	1,70
Trung bình	1,08	0,39	0,30	1,77

Nhận xét: Tổng tạp chất 1,77% lớn hơn so với tổng tạp chất tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu độ ổn định (1,64%) và thời điểm 9 tháng (1,73%) nhưng vẫn nhỏ hơn 3% chứng tỏ mẫu thử vẫn đạt yêu cầu về chỉ tiêu tạp chất liên quan ở mức 1 sau thời gian bảo quản 15 tháng (SKĐ xác định tạp chất trong Conessin ở thời điểm 15 tháng được trình bày ở Phụ lục 22).

3.4.3.2. Kết quả đánh giá độ ổn định của Kaempferol sau 15 tháng

Trong dung dịch thử, sau khi loại pic dung môi và các pic tạp chất có tỉ lệ phần trăm diện tích dưới 0,05% còn lại 1 pic tạp chất có thời gian lưu và diện tích pic được ghi ở Bảng 3.47.

Bảng 3.47. Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Kaempferol sau 15 tháng

Mẫu thử	Tỉ lệ mỗi tạp chất (%)		Tổng tạp chất (%)
	Tạp chất 1 ($t_R = 15,04'$)	Tạp chất 2 ($t_R = 29,93'$)	
A	1,56	0,16	1,72
B	1,53	0,15	1,68
C	1,54	0,17	1,71
Trung bình	1,54	0,16	1,70

Nhận xét: Tổng tạp chất 1,70% hơi giảm nhẹ so với tổng tạp chất tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu độ ổn định (1,76%), sau 9 tháng (1,78%) và dưới 3% chứng tỏ mẫu thử vẫn đạt yêu cầu về chỉ tiêu tạp chất liên quan ở mức 1 sau thời gian bảo quản 15 tháng (SKĐ xác định tạp chất trong Kaempferol ở thời điểm 15 tháng được trình bày ở Phụ lục 23).

3.4.3.3. Kết quả đánh giá độ ổn định của Nuciferin sau 15 tháng

Trong dung dịch thử, sau khi loại pic dung môi và các pic tạp chất có tỉ lệ diện tích dưới 0,05% còn lại một pic tạp chất có thời gian lưu và diện tích pic được ghi ở Bảng 3.48.

Bảng 3.48. Kết quả phân tích tạp chất liên quan của Nuciferin sau 15 tháng

Mẫu thử	Tổng tạp chất (%) <i>($t_R = 2,85$ phút)</i>
A	0,10
B	0,10
C	0,10
Trung bình	0,10

Nhận xét: Tổng tạp chất 0,10% không thay đổi so với tổng tạp chất tại thời điểm bắt đầu nghiên cứu độ ổn định (0,10%), sau 9 tháng và dưới 3% chứng tỏ mẫu thử vẫn đạt yêu cầu về chỉ tiêu tạp chất liên quan ở mức 1 sau thời gian bảo quản 15 tháng (SKĐ xác định tạp chất trong Nuciferin sau 15 tháng trình bày ở Phụ lục 24).

3.5. KẾT QUẢ ỨNG DỤNG CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU

Sử dụng các chất chuẩn đối chiếu đã thiết lập để định lượng hoạt chất trong hai dược liệu (lá cây Đơn lá đỏ, lá cây Chè vằng, sử dụng chất chuẩn Kaempferol) và một sản phẩm đông dược được bào chế dưới dạng viên nén (viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT*, sử dụng chất chuẩn Conessin).

3.5.1. Định lượng Kaempferol trong dược liệu

3.5.1.1. Định lượng Kaempferol trong lá cây Đơn lá đỏ

❖ Chuẩn bị mẫu thử:

Tham khảo kết quả khảo sát quá trình chiết chúng tôi đưa ra qui trình xử lý mẫu để định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ như sau:

Cân chính xác khoảng 0,25 g bột dược liệu Đơn lá đỏ (đã xác định hàm ẩm) thêm 50 ml methanol và 1,5 ml acid hydrochloric đặc, đun hồi lưu cách thủy 40 phút ở 70 °C, để nguội, lọc lấy dịch methanol. Tiến hành quá trình chiết như vậy thêm 2 lần nữa. Gộp dịch chiết methanol, thu hồi dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 40 °C tới khi dung dịch còn khoảng 10 ml. Chuyển vào bình định mức dung tích 25 ml, tráng bình cầu bằng methanol và thêm methanol tới đủ thể tích, lắc đều rồi lọc qua màng lọc kích thước 0,45 µm thu được dung dịch thử để định lượng Kaempferol trong dược liệu.

❖ Điều kiện sắc kí:

Dựa vào tài liệu tham khảo [130], [155], và điều kiện hiện có của phòng thí nghiệm, tiến hành khảo sát và lựa chọn điều kiện sắc kí để định lượng Kaempferol như sau:

- Cột sắc kí ODS-3 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm), nhiệt độ cột 40 °C
- Detector DAD, $\lambda = 370$ nm
- Pha động: Đệm phosphat 10 mM, pH = 2,5 : acetonitril (60 : 40)
- Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút
- Thể tích tiêm: 50 µl
- Thời gian chạy sắc kí 10 phút (thời gian lưu khoảng 7,5 phút)

❖ Thẩm định phương pháp định lượng

Tiến hành thẩm định phương pháp định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ với các nội dung sau: xác định khoảng tuyến tính; giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ); độ lặp lại và độ đúng.

▪ Tính thích hợp của hệ thống

Để xác định tính thích hợp của hệ thống, tiến hành tiêm 6 lần dung dịch

chuẩn Kaempferol 2 µg/ml vào hệ thống HPLC và tiến hành sắc kí theo điều kiện đã chọn. Xác định thời gian lưu, diện tích pic. Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc kí được thể hiện ở Bảng 3.49.

Bảng 3.49 - Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc kí định lượng Kaempferol trong lá Đơn lá đỏ

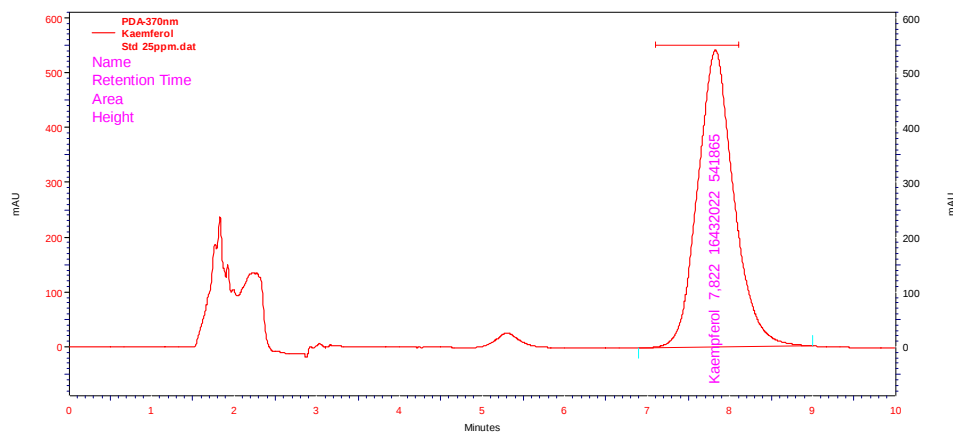
TT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAu.s)
1	7,682	1818229
2	7,695	1843719
3	7,700	1859433
4	7,698	1799476
5	7,703	1836602
6	7,690	1810590
Trung bình	7,695	1828008
SD	0,008	22455
RSD (%)	0,099	1,228

Nhận xét: Kết quả khảo sát tính thích hợp của hệ thống cho thấy độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu và diện tích pic trong các phép thử lần lượt là 0,099 và 1,288, đều nhỏ hơn 2%. Điều đó chứng tỏ hệ thống HPLC đã sử dụng là thích hợp để định tính, định lượng Kaempferol trong dược liệu.

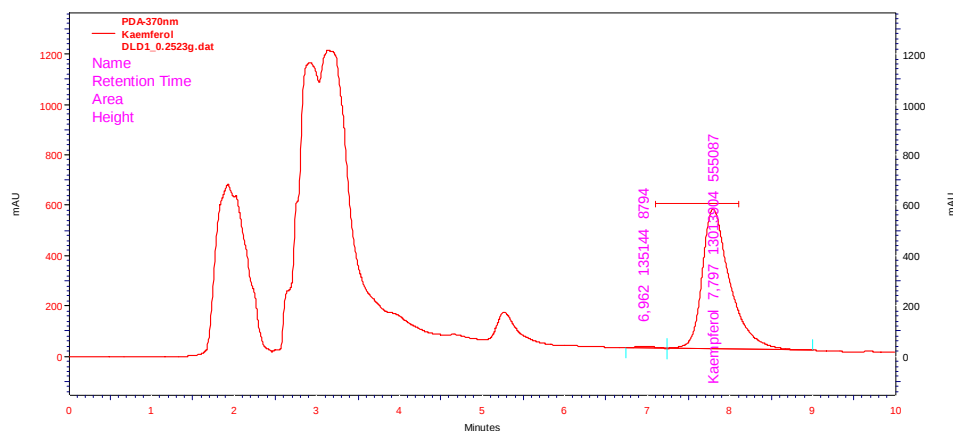
▪ *Tính đặc hiệu*

Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn và dung dịch thử theo điều kiện như ở trên. Ghi lại thời gian lưu của pic. Kết quả định tính được thể hiện ở Hình 3.24 và Hình 3.25.

Nhận xét: Kết quả trên sắc ký đồ cho thấy dung dịch thử cho 1 pic có thời gian lưu $t_R = 7,797$ phút tương tự thời gian lưu của pic Kaempferol của dung dịch chuẩn ($t_R = 7,822$ phút), hệ sắc kí đặc hiệu với chất phân tích.



Hình 3.24. Sắc ký đồ dung dịch chuẩn Kaempferol 0,025 mg/ml



Hình 3.25. Sắc ký đồ dịch chiết đơn lá đồ

▪ Độ chính xác

Tiến hành định lượng 6 mẫu thử được chuẩn bị theo qui trình xử lý mẫu như trên với điều kiện sắc kí đã chọn. Hàm lượng Kaempferol có trong mẫu được liệu đem thử được tính theo công thức:

$$X(\%) = \frac{S_T}{S_C} \times \frac{C_C \times V \times 10^6}{m_{dl}} \times 100 \quad (17)$$

trong đó:

S_T , S_C : Diện tích pic của mẫu thử và mẫu chuẩn tương ứng.

C_C : Nồng độ Kaempferol trong dung dịch chuẩn ($\mu\text{g/ml}$)

V : Thể tích mẫu dung dịch thử ($V = 25 \text{ ml}$)

m_{dl} : Khối lượng dược liệu đã cân (g)

Kết quả được trình bày như ở Bảng 3.50.

Bảng 3.50. Kết quả khảo sát độ chính xác của phương pháp định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ

Mẫu	Khối lượng dược liệu (g)	Diện tích pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
Thử 1	0,2523	13013904	0,2123
Thử 2	0,2509	12834076	0,2105
Thử 3	0,2254	11206301	0,2037
Thử 4	0,2612	13991921	0,2209
Thử 5	0,2553	13003456	0,2097
Thử 6	0,2375	12007498	0,2076
Trung bình (%)			0,2108
RSD (%)			2,73

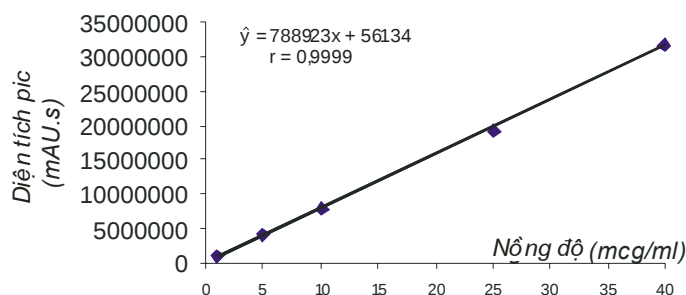
Nhận xét: Kết quả thử độ chính xác của phương pháp cho thấy trong các điều kiện sắc kí đã chọn, độ lệch chuẩn tương đối thu được là 2,73%. Như vậy phương pháp đạt yêu cầu về độ chính xác.

▪ *Khoảng tuyến tính*

Pha các dung dịch chuẩn từ Kaempferol chuẩn có các nồng độ trong khoảng 1 - 40 µg/ml. Tiến hành sắc kí như điều kiện đã chọn và ghi kết quả diện tích pic tương ứng với các nồng độ trên. Lập đường chuẩn phụ thuộc giữa diện tích pic và nồng độ tương ứng. Kết quả xác định khoảng tuyến tính và phương trình đường chuẩn được thể hiện ở Bảng 3.51 và Hình 3.26.

Bảng 3.51. Kết quả xác định khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ

Nồng độ dung dịch (µg/ml)	Diện tích pic (mAU.s)
1	842356
5	4092174
10	8003489
25	19456641
40	31788750



Hình 3.26. Đồ thị khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ

▪ Độ đúng

Thêm chính xác 1 ml, 2 ml, 3 ml dung dịch chuẩn nồng độ 120 $\mu\text{g/ml}$ vào mẫu thử. Xử lý các mẫu thử theo qui trình đã xây dựng. Kết quả khảo sát độ đúng bằng phương pháp thêm được trình bày ở Bảng 3.52.

Bảng 3.52. Kết quả thẩm định độ đúng của phương pháp định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ

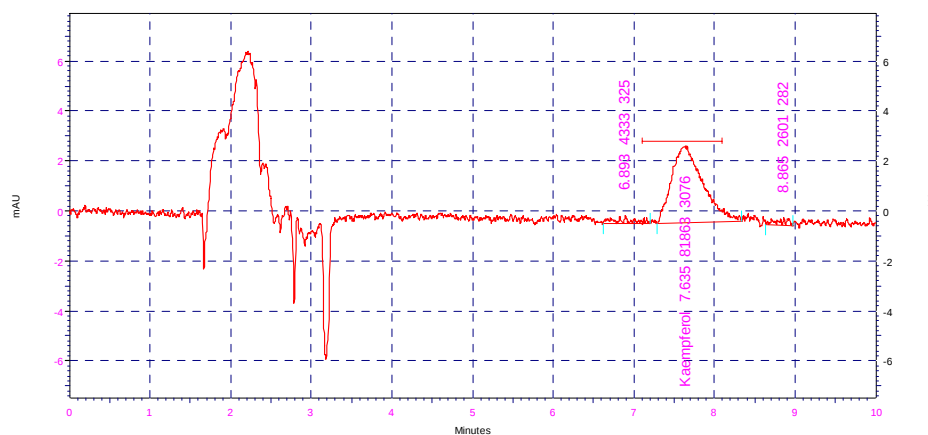
STT	Lượng cân (g)	Lượng thêm vào (mg)	Lượng tìm lại (mg)	Tỉ lệ tìm lại (%)
1	0,1324	0,12	0,113	94,17
2	0,1498	0,12	0,114	95,00
3	0,1381	0,24	0,227	94,58
4	0,1428	0,24	0,226	94,17
5	0,1447	0,36	0,338	93,89
6	0,1398	0,36	0,343	95,28
Trung bình				94,52
RSD (%)				0,31

Nhận xét: Kết quả trên cho thấy phương pháp có độ đúng trong khoảng khảo sát với khả năng tìm lại trung bình là 94,52%, đáp ứng được yêu cầu của phương pháp phân tích bằng HPLC áp dụng cho dược liệu (yêu cầu 90 - 110%).

▪ Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Tiến hành phân tích mẫu trắng thêm chuẩn mức nồng độ gần giới hạn

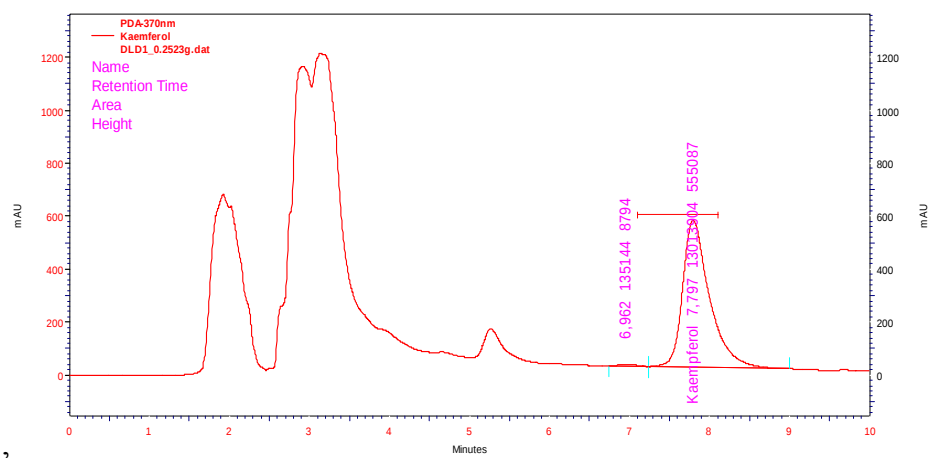
phát hiện, mỗi nồng độ phân tích 3 lần và tính giá trị chiều cao pic chia cho nhiễu đường nền (S/N). Nồng độ mà tại đó có tỉ lệ S/N lớn hơn và sát giá trị 3 nhất là giới hạn phát hiện (LOD). Kết quả xác định giới hạn phát hiện thu được: LOD = 0,01 µg/ml. Từ đó xác định được giới hạn định lượng LOQ = 0,033 µg/ml (Hình 3.27).



Hình 3.27. SKĐ tại giới hạn định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ

❖ Định lượng Kaempferol trong Đơn lá đỏ

Từ kết quả xác định độ lặp lại (Bảng 3.48), suy ra hàm lượng Kaempferol trong mẫu Đơn lá đỏ đem thử là 0,211%, RSD = 2,73%.



Hình 3.28. SKĐ định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ.

3.5.1.2. Định lượng Kaempferol trong lá cây Chè vằng

❖ Chuẩn bị mẫu thử từ dược liệu chè vằng:

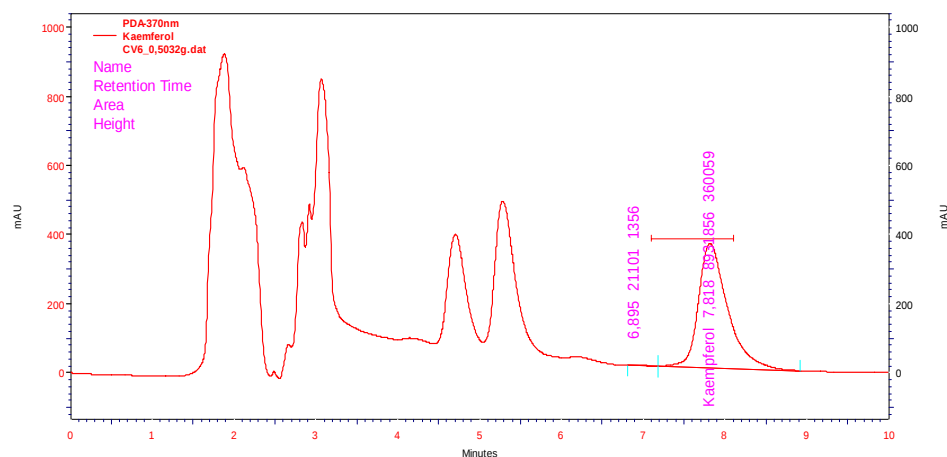
Cân chính xác khoảng 0,50 g bột dược liệu Chè vằng (đã xác định hàm ẩm) thêm 50 ml methanol và 1,5 ml acid hydrochloric đặc, đun hồi lưu cách thủy 40 phút ở 70 °C, để nguội, lọc lấy dịch methanol. Tiến hành quá trình chiết như vậy thêm 2 lần nữa. Gộp dịch chiết methanol, thu hồi dung môi dưới áp suất giảm ở nhiệt độ 40 °C tới khi dung dịch còn khoảng 10 ml. Chuyển vào bình định mức dung tích 25 ml, tráng bình cầu bằng methanol và thêm methanol tới đủ thể tích, lắc đều rồi lọc qua màng lọc kích thước 0,45 µm thu được dung dịch thử để định lượng Kaempferol trong dược liệu.

❖ *Kết quả định lượng:*

- Chuẩn bị 6 dung dịch thử từ dược liệu Chè vằng.
- Tiến hành sắc kí như điều kiện đã chọn ở phần định lượng Kaempferol trong dược liệu Đơn lá đỏ. Tính hàm lượng Kaempferol có trong mẫu Chè vằng theo công thức (17). Kết quả được trình bày như ở Bảng 3.53 và Hình 3.29.

Bảng 3.53. Kết quả định lượng Kaempferol trong dược liệu Chè vằng

Mẫu thử	Khối lượng dược liệu (g)	Diện tích Pic (mAU.s)	Hàm lượng (%)
1	0,6038	11027745	0,074
2	0,6246	11052134	0,072
3	0,5034	8429425	0,067
4	0,5384	9929448	0,075
5	0,5694	10133101	0,072
6	0,5032	8991856	0,072
Hàm lượng trung bình (%)			0,072
RSD (%)			3,60



Hình 3.29. SKĐ định lượng Kaempferol trong dược liệu Chè vằng

Nhận xét: Hàm lượng Kaempferol có trong dược liệu Chè vằng khoảng 0,072%. Như vậy Chè vằng cũng có thể xem xét để sử dụng làm nguyên liệu chiết xuất Kaempferol làm CCĐC.

3.5.2. Định lượng Conessin trong chế phẩm đông dược

3.5.2.1. Mẫu nghiên cứu

Mẫu nghiên cứu là viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT*. Mỗi viên nén bao phim chứa:

Cao đặc mộc hoa trắng (Tiêu chuẩn cơ sở):	136 mg
Berberin clorid (ĐĐVN III):	5 mg
Cao mộc hương (Tiêu chuẩn cơ sở):	10 mg
Tá dược vừa đủ:	1 viên

3.5.2.2. Xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT*

❖ Xây dựng phương pháp

▪ Điều kiện sắc kí:

Cột Inertsil ODS-3 (250 × 4,6 mm; 5µm). Detector Diode Array với bước sóng chỉ thị 205 nm. Tốc độ dòng: 1,2 ml/phút. Thể tích tiêm: 20 µl. Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng. Pha động: dung môi A: MeOH; dung môi B: dung dịch KH₂PO₄ 25 mM pH = 3 (Hòa tan 3,4 g KH₂PO₄ trong 1000 ml nước, thêm 3 ml

triethylamin điều chỉnh đến pH = 3,0 bằng acid phosphoric). Chương trình gradient dung môi trình bày ở Bảng 3.54.

Bảng 3.54. Chương trình gradient dung môi định lượng Conessin trong viên nén Mộc hoa trắng HT

Thời gian (phút)	Dung môi A	Dung môi B
0 – 20	24	76
20 – 21	24 → 45	76 → 55

▪ *Phương pháp xử lý mẫu:*

Dung dịch chuẩn: Dung dịch Conessin chuẩn trong dung dịch HCl 0,1N có nồng độ khoảng 0,12 mg/ml.

Dung dịch thử: Lấy 20 viên, loại bỏ lớp bao ngoài, cân và tính khối lượng trung bình viên, nghiền mịn. Cân chính xác một lượng chế phẩm tương ứng khoảng 2 viên vào ống li tâm thủy tinh có nút xoáy, thêm 2 g nhôm oxyd trung tính, trộn đều. Làm ẩm bằng amoniac đặc (khoảng 1,2 ml), để yên trong 15 phút, thêm 20 ml dicloromethan, lắc mạnh bằng tay trong 2 phút, lắc siêu âm trong 20 phút, để nguội. Li tâm với tốc độ 2 500 vòng/phút trong 10 phút, gạn lấy dịch li tâm. Cẩn trọng ống li tâm tiếp tục chiết như trên 4 lần nữa, mỗi lần với 15 ml dicloromethan. Gộp các dịch li tâm, cô nhẹ trên cách thủy đến cạn. Hòa tan cạn vừa đủ trong 20 ml dung dịch acid hydrocloric 0,1N. Lọc qua màng lọc 0,45 µm được dung dịch tiêm sắc kí.

▪ *Tiến hành:*

Tiêm riêng biệt 20 µl các dung dịch thử và dung dịch chuẩn vào hệ thống sắc kí, tiến hành sắc kí theo điều kiện đã mô tả. Ghi nhận SKĐ.

▪ *Kết quả:*

- *Định tính:* SKĐ của dung dịch thử phải cho pic có cùng thời gian lưu với pic của Conessin trong SKĐ của dung dịch chuẩn.

- *Định lượng:* Hàm lượng Conessin (mg) trong mỗi viên tính theo khối lượng trung bình viên được tính theo công thức:

$$X \text{ (mg/viên)} = \frac{S_T}{S_C} \times C_C \times 20 \times \frac{m_V}{m_T}$$

trong đó: S_T , S_C lần lượt là diện tích pic Conessin thu được trong SKĐ của dung dịch thử và chuẩn tương ứng.

C_C : Nồng độ conessin trong dung dịch chuẩn (mg/ml)

m_V : Khối lượng trung bình viên (g)

m_T : Khối lượng cân mẫu thử (g).

❖ **Thẩm định phương pháp**

▪ *Tính thích hợp của hệ thống sắc kí:* Tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn Conessin trong dung dịch acid hydrocloric 0,1N có nồng độ 0,122 mg/ml. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.55.

Bảng 3.55. Khảo sát tính thích hợp của hệ thống sắc kí định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT

STT	Diện tích (mAu.s)	Thời gian lưu (phút)
1	3546398	15,667
2	3497145	15,520
3	3499551	15,607
4	3578484	15,693
5	3495750	15,520
6	3577646	15,473
Trung bình	3532496	15,580
RSD	1,13%	0,57%
<i>Số đĩa lí thuyết: 3368</i>		
<i>Hệ số bất đối: 1,94</i>		

Như vậy hệ thống sắc kí thích hợp sử dụng cho phân tích.

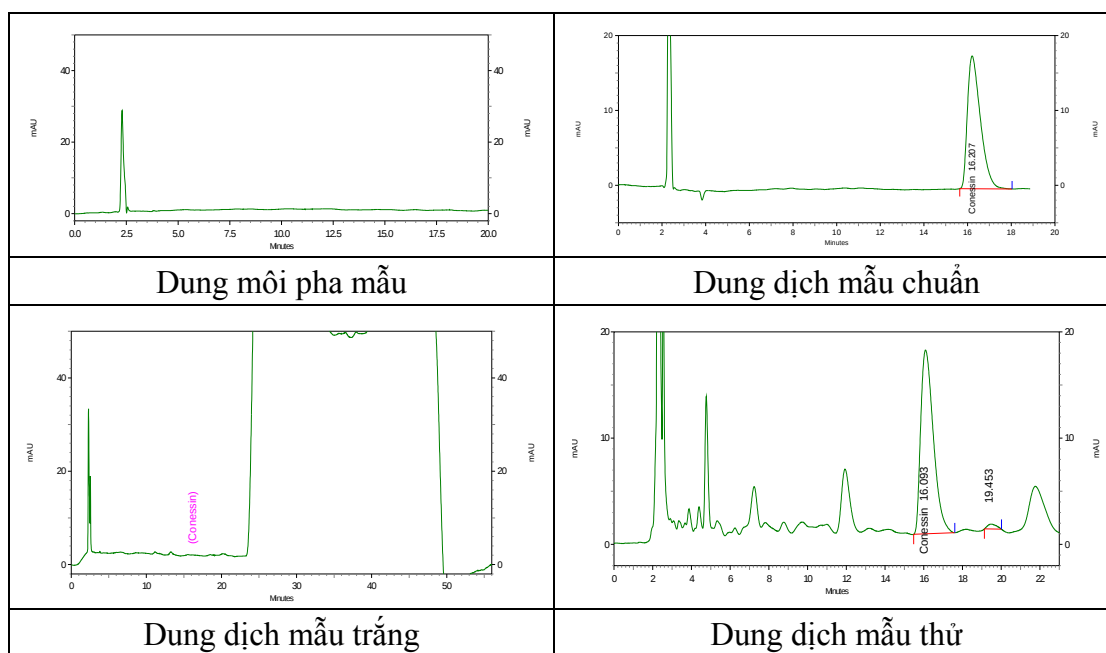
▪ *Tính đặc hiệu:* Với phương pháp đã chọn, tiến hành tiêm vào hệ thống sắc kí lần lượt các dung dịch sau :

- Dung môi pha mẫu: Dung dịch acid hydrocloric 0,1N.

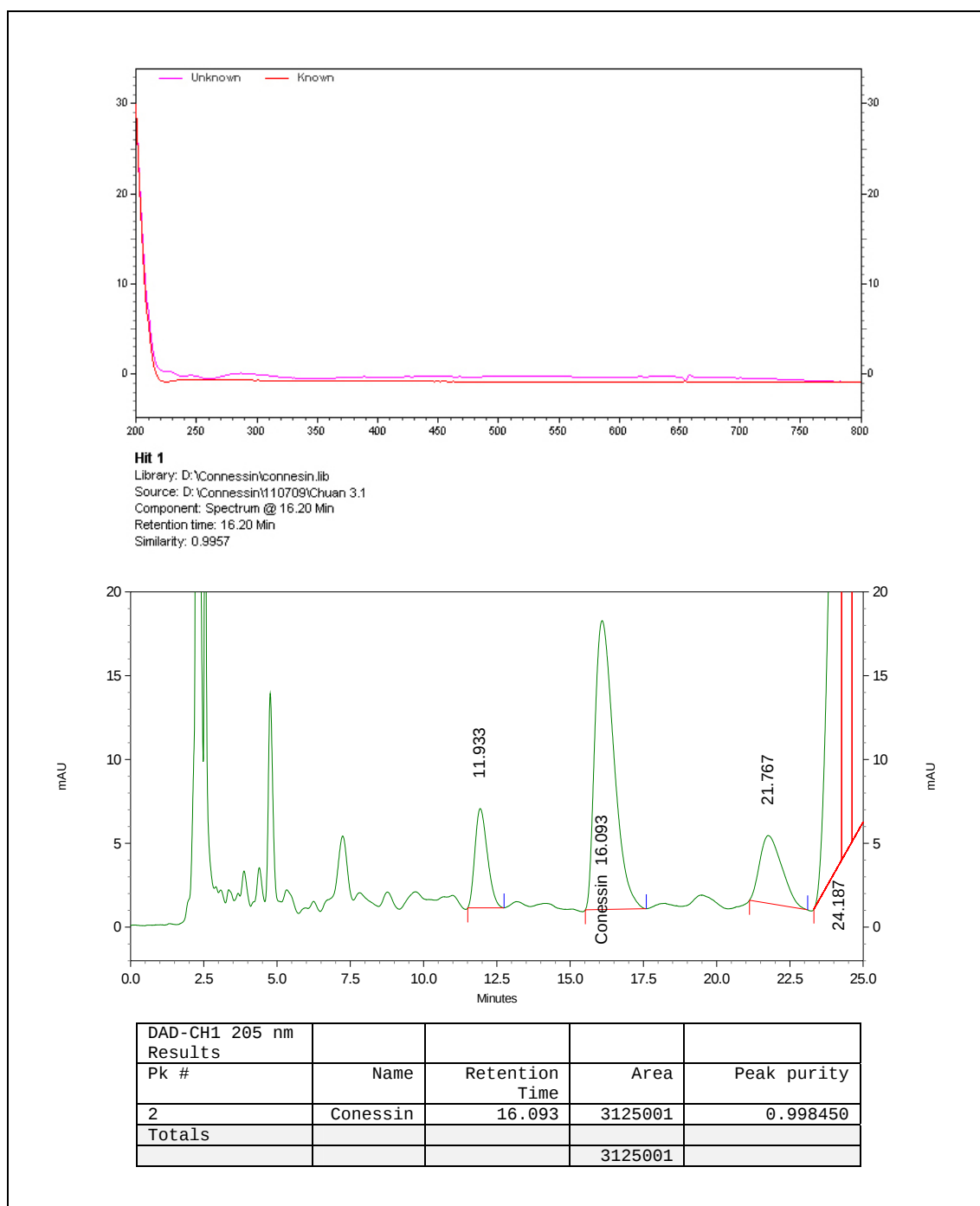
- Dung dịch mẫu trắng: Tiến hành tự tạo một mẫu trắng gồm 2 thành phần là cao mộc hương và berberin clorid với lượng tương ứng của 2 viên. Tiếp tục tiến hành xử lý mẫu như trên thu được dung dịch mẫu trắng.

- Dung dịch chuẩn: Dung chuẩn Conessin trong acid hydrocloric 0,1N có nồng độ 0,122 mg/ml.

Kết quả phân tích cho thấy: trên SKĐ của mẫu chuẩn có pic Conessin với thời gian lưu 15,08 phút; SKĐ của dung môi pha mẫu và mẫu trắng không có pic tại vị trí này. Như vậy phương pháp có tính đặc hiệu với đối tượng phân tích.



Hình 3.30. SKĐ khảo sát tính đặc hiệu của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT

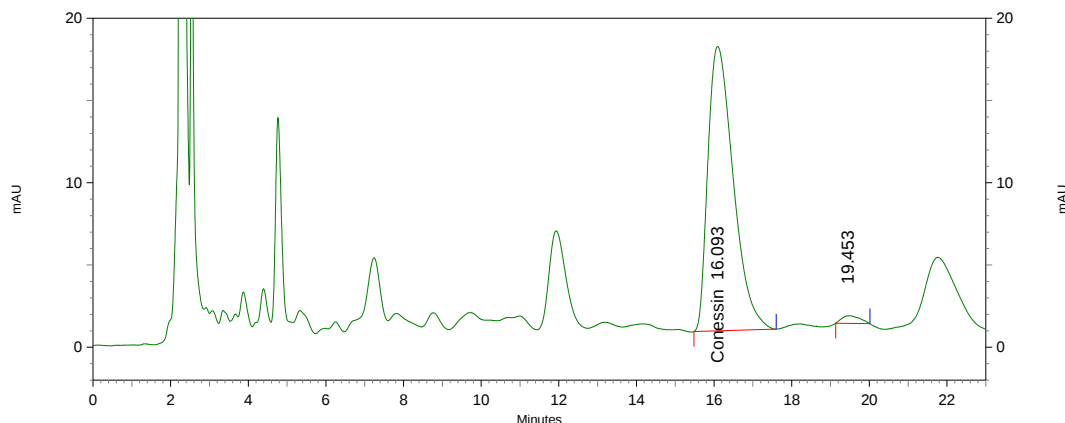


Hình 3.31. Phổ UV và độ tinh khiết pic hoạt chất trong dung dịch mẫu thử viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT

▪ *Độ chính xác:* Tiến hành định lượng mẫu thử lặp lại trên 6 mẫu với phương pháp xử lý mẫu và điều kiện sắc kí như trên. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.56 và Hình 3.31.

Bảng 3.56. Khảo sát độ chính xác của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT

Mẫu thử	Lượng cân (g)	Diện tích (mAu.s)	Hàm lượng (mg/viên)
1	1,1678	3145745	1,4790
2	1,1659	3189776	1,5022
3	1,1651	3147805	1,4834
4	1,1682	3171522	1,4906
5	1,1668	3146794	1,4808
6	1,1669	3147578	1,4810
Trung bình			1,4862
RSD (%)			0,59



Hình 3.32. SKĐ định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT

Nhận xét: Độ lặp lại của phương pháp là khá tốt (RSD = 0,59%), đáp ứng yêu cầu cho phân tích định lượng.

▪ *Độ chính xác trung gian:* Tiến hành thử độ lặp lại vào ngày khác, kết quả được trình bày ở Bảng 3.57.

Bảng 3.57. Khảo sát độ chính xác trung gian (khác ngày) của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT

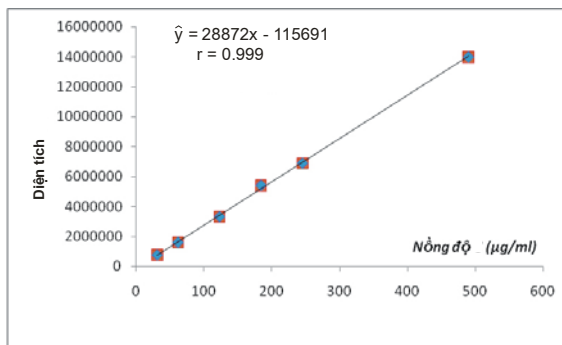
Mẫu thử	Lượng cân (g)	Diện tích (mAu.s)	Hàm lượng (mg/viên)
1	1,1056	2802970	1,3803
2	1,1324	2908230	1,3982
3	1,1493	2996689	1,4196
4	1,1368	2978625	1,4265
5	1,1356	2953067	1,4158
6	1,1354	2913288	1,3970
Trung bình			1,4062
RSD (%)			1,1

So sánh kết quả thử độ lặp lại giữa hai lần thử nghiệm: Sử dụng test F:
 $F_{TN} = 3,86 < 5,05$ [$F_{Lt}(0,05; 5; 5) = 5,05$]. Vậy phương pháp có độ chính xác đạt yêu cầu.

▪ *Tính tuyến tính*: Pha một dãy các dung dịch chuẩn trong dung dịch HCl 0,1N có nồng độ từ 30 đến 500 $\mu\text{g/ml}$, tiến hành sắc kí theo điều kiện như trên. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.58 và Hình 3.33.

Bảng 3.58. Khảo sát khoảng tuyến tính của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	30,624	61,247	122,494	183,742	244,989	489,978
Diện tích (mAu.s)	766546	1605356	3325735	5416460	6903232	14003104



Hình 3.33. Khảo sát tính tuyến tính của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT

Nhận xét: Như vậy ở nồng độ khảo sát từ 30 đến 500 µg/ml có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ dung dịch và diện tích pic tương ứng thu được, khoảng tuyến tính rộng và có điểm cận dưới thấp cho phép phân tích tốt hàm lượng hoạt chất trong dược liệu và chế phẩm đông dược.

▪ *Độ đúng:* Thêm chính xác lượng 30% chất chuẩn vào mẫu thử đã biết hàm lượng, xử lý mẫu và sắc kí theo điều kiện như trên. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.59.

Nhận xét: Kết quả trên cho thấy khả năng thu hồi của phương pháp là khá tốt (101,9%) với dao động từ 90% đến 110% là chấp nhận được cho phân tích trong chế phẩm đông dược.

Bảng 3.59. Khảo sát độ đúng của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT

TT	Lượng cân (g)	Diện tích (mAu.s)	Lượng thêm vào (mg)	Lượng tìm lại (mg)	Tỉ lệ thu hồi (%)
1	0,9503	3133659	0,4491	0,3906	86,97
2	0,9672	3351793	0,4491	0,5292	117,81
3	0,9624	3179174	0,4491	0,4001	89,09
4	0,9684	3265154	0,4491	0,4562	101,58
5	0,9581	3228465	0,4491	0,4498	100,15
6	0,9560	3167004	0,4491	0,4048	90,12
7	0,9695	3327392	0,4491	0,5042	112,25
8	0,9672	3324859	0,4491	0,5073	112,96
9	0,9653	3279672	0,4491	0,4750	105,76
Trung bình					101,86

▪ *Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ):*

LOD: Tiêm vào hệ thống sắc kí các dung dịch chuẩn có nồng độ 15, 10 và 5 µg/ml. Dùng dung dịch mẫu trắng được chuẩn bị ở trên để pha 7 dung dịch

Conessin có nồng độ khoảng 10 µg/ml. Tiến hành phân tích với điều kiện sắc kí như trên. Ghi diện tích pic, tính độ lệch chuẩn (δ). Giá trị LOD được tính theo

công thức sau:
$$\text{LOD } (\mu\text{g/ml}) = \frac{3,3 \times S}{a}$$

trong đó: S: độ lệch chuẩn của diện tích pic Conessin
a: hệ số góc của đường hồi qui tuyến tính ($y = ax + b$)
giữa nồng độ và đáp ứng pic của chất cần phân tích.

Kết quả được trình bày ở Bảng 3.60.

Giới hạn phát hiện $\text{LOD} = 0,92 \mu\text{g/ml}$; tương ứng với $9,2 \mu\text{g}$ Conessin/viên. Giới hạn định lượng $\text{LOQ} = 3,3 \times 0,92 = 3,04 \mu\text{g/ml}$; tương ứng với $30,4 \mu\text{g}$ Conessin/viên.

Bảng 3.60. Kết quả khảo sát LOD của phương pháp định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT

TT	1	2	3	4	5	6	7	δ
S (mAu.s)	195694	208487	207209	193939	210874	190414	198100	8060,6

▪ *Kết quả định lượng Conessin trong viên nén bao phim Mộc hoa trắng HT*

Từ kết quả xác định độ chính xác của phương pháp (Bảng 3.56) suy ra hàm lượng trung bình của Conessin trong viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT* là $1,49 \text{ mg/viên}$.

▪ *Kết luận:*

Phương pháp định lượng đã xây dựng có độ chính xác, độ đúng tốt, có khoảng tuyến tính rộng và tuyến tính xuống nồng độ thấp đồng thời có giới hạn pháp hiện và giới hạn định lượng thấp do đó thích hợp cho phân tích thành phần hoạt chất trong mẫu chế phẩm đông dược có thành phần phức tạp và hàm lượng hoạt chất không ổn định.

Chương 4

BÀN LUẬN

4.1. VỀ VIỆC LỰA CHỌN ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Ba đối tượng được lựa chọn nghiên cứu thiết lập CCĐC là Conessin, Nuciferin và Kaempferol. Qua quá trình tham khảo tài liệu, các dược liệu sau đây đã được lựa chọn: vỏ thân cây Múc hoa trắng dùng để chiết xuất Conessin, lá cây Sen dùng để chiết xuất Nuciferin và lá cây Đơn lá đỏ dùng để chiết xuất Kaempferol. Các dược liệu trên được lựa chọn vì những lý do sau:

- Đây là những dược liệu có hợp chất chính là các đối tượng nghiên cứu của đề tài, vì vậy, hàm lượng hợp chất đủ lớn để tiến hành quá trình chiết xuất.

- Các dược liệu này phân bố rộng rãi ở Việt Nam, đã có những nghiên cứu cơ bản về dược liệu học của các tác giả trong nước [1], [15], [21], [22], [23], [29], [30], [33], [39], [40], nghiên cứu phương pháp định tính định lượng hợp chất trong các đối tượng khác nhau bằng HPTLC, HPLC của các tác giả nước ngoài [87], [99], [102], [107], [130], [155].

- Các dược liệu này đều có tiêu chuẩn cơ sở trong DĐVN IV, có chế phẩm lưu hành trên thị trường, là các sản phẩm đông dược của các nhà sản xuất trong nước. Hiện nay, do chưa có CCĐC nên trong tiêu chuẩn thành phẩm các nhà sản xuất chưa đưa ra được phương pháp phân tích đặc hiệu. Vì vậy, kết quả nghiên cứu thiết lập chuẩn có thể tiếp tục được sử dụng để nghiên cứu xây dựng và nâng cao chỉ tiêu chất lượng của chế phẩm thuốc, góp phần vào việc hiện đại hóa các phương pháp kiểm nghiệm thuốc đông dược và dược liệu, cũng như hoàn thiện các chuyên luận của DĐVN.

Xuất phát từ việc lựa chọn đối tượng và nguyên liệu nghiên cứu như trên, kết quả nghiên cứu đạt được có ý nghĩa khoa học và thực tiễn.

4.2. VỀ CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ĐÃ SỬ DỤNG

4.2.1 Nhóm các phương pháp chiết xuất, phân lập, tinh chế

Để chiết nhóm chất từ dược liệu có thể sử dụng một trong số các phương

pháp hoặc kết hợp các phương pháp sau: ngâm (ngâm nóng, ngâm lạnh), ngấm kiệt, chiết Soxhlet, chiết bằng siêu âm, chiết siêu tốc, chiết ngược dòng [8], [49]... Việc lựa chọn các phương pháp chiết phụ thuộc vào đặc điểm dược liệu, nhóm hợp chất cần chiết, điều kiện phòng thí nghiệm và đặc biệt là mục đích sử dụng hỗn hợp chiết. Nếu chiết hợp chất toàn phần để làm cao lỏng, cao đặc dùng trong sản xuất dược phẩm thì yêu cầu về hiệu suất chiết là quan trọng vì liên quan đến chi phí sản xuất và giá thành sản phẩm. Để chiết nhóm hợp chất để làm CCĐC thì yêu cầu về tính chọn lọc của quá trình chiết xuất được quan tâm hơn, để có thể thu được sản phẩm chiết ít tạp chất, thuận lợi cho quá trình phân lập và tinh chế tiếp theo. Một số yếu tố ảnh hưởng chính đến quá trình chiết xuất dược liệu như ảnh hưởng của nhiệt độ, dung môi chiết cũng đã được khảo sát, nhằm lựa chọn điều kiện chiết tối ưu cho mục đích nghiên cứu, ưu tiên sử dụng các dung môi ít độc, dễ kiếm.

Sau khi thu được dịch chiết toàn phần, thực hiện quá trình phân lập để tách riêng đối tượng nghiên cứu. Để phân lập các hợp chất tự nhiên có thể dùng một trong các kỹ thuật: sắc ký lớp mỏng điều chế, sắc ký cột, sắc ký lỏng điều chế, phân lập bằng phương pháp phân bố vào dung môi [53], [119]. Việc phân lập các hợp chất nghiên cứu trong đề tài dựa trên các quá trình hóa lý như dựa vào tính tan của hợp chất trong dung môi, khả năng thẩm thấu, khả năng phân bố của chất vào môi trường, hoặc dựa trên các quá trình hóa học bằng cách tạo phản ứng hóa học để cô lập hợp chất cần tách dưới dạng sản phẩm của quá trình phản ứng, thực hiện phản ứng hóa học lần thứ hai để chuyển sản phẩm thành chất ban đầu. Hợp chất Nuciferin và Kaempferol được phân lập bằng kỹ thuật sắc ký cột, là kỹ thuật phổ biến nhất được thực hiện tại hầu hết các phòng thí nghiệm về hợp chất thiên nhiên. Kỹ thuật này không đòi hỏi trang thiết bị đắt tiền và vận hành phức tạp như kỹ thuật PHPLC, hợp chất thu được sau phân lập đạt yêu cầu về độ tinh khiết để tiếp tục tinh chế làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn đối chiếu. Hợp chất Conessin được phân lập dựa trên tính chất hóa học đặc thù của Conessin là có thể tạo hợp chất kết tinh với acid oxalic trong ethanol, sản phẩm phản ứng là Conessin hydrooxalat được tách ra khỏi môi trường phản ứng rồi chuyển thành Conessin base và tiếp tục

chiết bằng dung môi hữu cơ.

Tùy thuộc vào mức độ tinh khiết của hợp chất sau phân lập, quá trình tinh chế có thể được thực hiện bằng một trong các phương pháp sau: nếu hợp chất sau phân lập đã có độ tinh khiết khá cao thì chỉ cần tinh chế đơn giản bằng cách kết tinh lại trong dung môi nhiều lần, nếu hợp chất sau phân lập có độ tinh khiết chưa cao thì quá trình tinh chế có thể thực hiện bằng cách lặp lại quá trình sắc kí cột như giai đoạn phân lập để lựa chọn phân đoạn tinh khiết hơn, hoặc thay đổi dung môi rửa giải hoặc kiểu sắc kí. Hợp chất Nuciferin sau khi phân lập đã đạt được độ tinh khiết khá cao (khoảng 96,2%), vì vậy quá trình tinh chế tiếp theo được thực hiện đơn giản bằng cách kết tinh lại trong dung môi ở nhiệt độ thấp (2 - 8 °C). Hợp chất Conessin được tinh chế bằng kỹ thuật sắc kí cột nhanh là kỹ thuật cải tiến của sắc kí cột để rút ngắn thời gian chạy mẫu và làm tăng độ phân giải. Hợp chất Kaempferol được tinh chế bằng cách lặp lại quá trình sắc kí cột, sử dụng chất nhồi cột Sephadex LH-20, lấy phân đoạn tinh khiết hơn.

Sau giai đoạn chiết xuất, phân lập, tinh chế, cả 3 hợp chất đều đạt được mức độ tinh khiết đáp ứng yêu cầu sử dụng làm nguyên liệu thiết lập CCĐC sử dụng trong phương pháp định lượng bằng HPLC, theo hướng dẫn của Tổ chức y tế thế giới về thiết lập, duy trì và phân phối CCĐC hóa học [148].

4.2.2. Nhóm các phương pháp nhận dạng, xác định độ tinh khiết

Theo các tài liệu hướng dẫn thiết lập CCĐC của WHO [148] và của khu vực ASEAN [65], [66], để định tính một CCĐC cần phải sử dụng phổ IR. Trường hợp không có phổ đối chiếu đáng tin cậy hoặc trường hợp mô tả đặc tính một chất mới thì cần phải xác minh nhận dạng chất đó bằng một số kỹ thuật như nghiên cứu tinh thể học, phổ NMR, MS, phân tích nhóm chức, và các phương pháp khác có thể, để đảm bảo một CCĐC được mô tả đặc tính đầy đủ. Trong nghiên cứu này, cả ba hợp chất thiết lập chuẩn đều là những hợp chất đã biết cấu trúc, vì vậy, chỉ cần sử dụng phổ IR là đạt yêu cầu nhận dạng CCĐC. Tuy nhiên, tham khảo chứng chỉ phân tích một số CCĐC thương mại lưu hành trên thị trường hoặc của một số nhà sản xuất được phẩm nước ngoài, nhiều CCĐC được định tính bằng phổ NMR, vì

vậy đề tài đã thực hiện xây dựng một bộ dữ liệu phổ đầy đủ của hợp chất sau khi tinh chế đạt yêu cầu về độ tinh khiết (phổ UV-Vis, IR, MS, NMR).

Các hợp chất nghiên cứu đều là những chất kết tinh, vì vậy đã tiến hành xác định điểm chảy bằng phương pháp đo trong mao quản (ĐĐVN IV). Đo điểm chảy là kỹ thuật đơn giản, tiến hành nhanh chóng, cho phép sơ bộ định tính và đánh giá mức độ tinh khiết của hợp chất ngay sau giai đoạn kết tinh. Kỹ thuật đo điểm chảy có ưu điểm là chỉ cần sử dụng một lượng mẫu rất ít (từ 1 - 2 mg) và không làm hao hụt mẫu.

Trong nghiên cứu thiết lập CCĐC, khuyến khích sử dụng nhiều phương pháp khác nhau để xác định hàm lượng chất chính, đặc biệt các phương pháp tuyệt đối (phương pháp không phải sử dụng đến CCĐC) được đánh giá cao. Vì cả 3 chất nghiên cứu đều là hợp chất kết tinh nên có thể sử dụng kỹ thuật DSC để xác định độ tinh khiết.

4.2.3. Phương pháp định lượng và xác định tạp chất liên quan

Các hợp chất nghiên cứu thiết lập CCĐC là những hợp chất tinh khiết. Đối với hợp chất tinh khiết có thể lựa chọn một số phương pháp định lượng khác nhau đáp ứng được yêu cầu của phép định lượng trong phân tích như đo độ hấp thụ tử ngoại, HPLC [7]. Tuy nhiên, theo yêu cầu về thiết lập CCĐC [148], CCĐC dùng cho định lượng thì phải được định lượng bằng phương pháp mà CCĐC dự kiến được sử dụng. Dược liệu và chế phẩm từ dược liệu có thành phần nền phức tạp, để đáp ứng được tính đặc hiệu, thông thường phương pháp HPLC hay được sử dụng. HPLC cũng là phương pháp định lượng phổ biến nhất trong các dược điển hiện hành. Vì vậy, phương pháp HPLC được lựa chọn trong nghiên cứu này để định lượng và xác định tạp chất liên quan.

Phương pháp định lượng và phân tích tạp chất đều sử dụng sắc ký lỏng pha đảo, kiểu phân bố, trên cột thông dụng là C18. Các dung môi sử dụng đều là những dung môi thường và ít độc hại.

Như vậy, với việc sử dụng nhiều nhóm phương pháp nghiên cứu khác nhau, từ kinh điển đến hiện đại, các kết quả thu được là khoa học và tin cậy. Kết

quả nghiên cứu có thể sử dụng tham khảo để xây dựng tiêu chuẩn chất lượng của chế phẩm đông dược của các nhà sản xuất trong nước.

4.3. VỀ QUI TRÌNH CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ TINH CHẾ

Với 3 hợp chất nghiên cứu, các tác giả trước đây [1], [30], [34] đều đã đưa ra phương pháp chiết xuất, phân lập để lấy được hợp chất tinh khiết dùng cho nghiên cứu phổ (qui mô phân lập từ vài milligram đến vài chục milligram). Song, các tài liệu trên là các nghiên cứu về dược liệu học nên các tác giả chỉ quan tâm đến việc lấy được hợp chất và nhận dạng đúng chất bằng một số phương pháp phổ mà chưa tiến hành khảo sát lựa chọn phương pháp tối ưu để chiết xuất, phân lập và tinh chế hợp chất. Nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Nhung [34], trong phương pháp phân lập bằng sắc ký cột chưa rõ hệ dung môi sử dụng. Chưa có tác giả nào xác định độ tinh khiết hay hàm lượng của hợp chất sau phân lập. Chưa tìm thấy tài liệu tham khảo xác định các tạp chất liên quan thường đi cùng với hợp chất chính trong quá trình chiết xuất hợp chất chính từ các dược liệu nêu trên và ảnh hưởng của các tạp chất này đến độ ổn định của hợp chất chính. Vì vậy, lần đầu tiên, luận án đã khảo sát các phương pháp chiết xuất, phân lập, tinh chế khác nhau để lựa chọn phương pháp phù hợp nhất cho mục đích nghiên cứu thiết lập CCĐC từ dược liệu với qui mô pilot (thu được trên 2 g hợp chất tinh khiết) với các dung môi thông dụng và rẻ tiền, đồng thời đã xác định một cách định lượng độ tinh khiết của các hợp chất sau tinh chế (đạt trên 95% đối với cả ba hợp chất), xác định các tạp chất liên quan và nghiên cứu độ ổn định của CCĐC trong thời gian 15 tháng để làm rõ ảnh hưởng của tạp chất liên quan đến hàm lượng của hợp chất chính trong thời gian bảo quản. Cụ thể như sau:

4.3.1. Chiết xuất, phân lập, tinh chế Conessin

❖ Chiết xuất Conessin: Conessin là một alcaloid, có thể được chiết xuất bằng một trong 3 phương pháp:

- Chiết bằng dung môi hữu cơ trong môi trường kiềm.
- Chiết bằng dung dịch acid loãng trong cồn hoặc trong nước

- Chiết bằng cồn.

Trong nghiên cứu của tác giả Phạm Thanh Kỳ và Phí Tùng Lâm [29], [30], Conessin được chiết từ vỏ thân cây Múc hoa trắng bằng dung môi hữu cơ trong môi trường kiềm, nhưng nghiên cứu này sử dụng lượng mẫu ít và mục đích là thu được một lượng nhỏ hợp chất tinh khiết để xác định cấu trúc. Để thu được 2 gam hợp chất tinh khiết dùng cho thiết lập chất chuẩn, luận án đã khảo sát cả ba phương pháp trên để lựa chọn phương pháp phù hợp nhất cho mục đích nghiên cứu. Phương pháp chiết bằng dung môi hữu cơ trong môi trường kiềm cho lượng alcaloid toàn phần nhiều nhất ($5,01 \pm 0,031\%$), nhưng dịch chiết lẫn nhiều nhựa, là những chất cũng hòa tan tốt trong dung môi hữu cơ gây khó khăn cho qui trình phân lập tiếp theo, đặc biệt khi cần phân lập lượng mẫu lớn. Phương pháp chiết bằng cồn cho lượng alcaloid toàn phần thấp nhất ($2,52 \pm 0,018\%$) và hàm lượng Conessin trong hợp chất thấp ($18,97\%$). Phương pháp chiết bằng dung dịch acid loãng cho hiệu suất chiết tương đối cao ($3,21 \pm 0,016\%$) và đặc biệt hàm lượng Conessin trong cặn khá cao ($30,32\%$), phương pháp tiến hành đơn giản. Nguyên nhân có thể do trong thực vật alcaloid thường tồn tại dưới dạng muối của acid hữu cơ nên độ tan trong cồn thấp hơn trong acid loãng. Dung môi acid loãng cũng rẻ hơn rất nhiều so với dung môi cồn. Vì vậy, phương pháp chiết bằng dung dịch acid loãng được lựa chọn (Bảng 3.1).

❖ Phân lập Conessin: Conessin có được phân lập bằng sắc kí cột trong nghiên cứu của tác giả Phí Tùng Lâm [30], đây là kĩ thuật phân lập phổ biến nhất hiện nay trong nghiên cứu HCTN. Trong nghiên cứu này, do tính chất đặc thù của Conessin có thể tạo hợp chất kết tinh với acid oxalic trong môi trường ethanol, vì vậy sau khi thu được cặn alcaloid toàn phần, tiến hành chiết luân phiên trong môi trường acid - base để loại bớt tạp chất, sau đó tiến hành phản ứng tạo ra Conessin hydrooxalat trong môi trường ethanol, đây là hợp chất không tan trong ethanol nên có thể kết tinh ngay ở nhiệt độ thường, tinh thể Conessin hydrooxalat sau đó được cho phản ứng với Na_2CO_3 ($\text{pH} = 9 - 10$) để giải phóng Conessin base ban đầu. Phương pháp phân lập này giúp tiết kiệm đáng kể thời gian và công sức so với trường hợp phân

lập bằng sắc kí cột, đặc biệt khi cần phân lập lượng mẫu lớn (cỡ hàng gam). Sở dĩ phương pháp này có thể áp dụng cho trường hợp phân lập Conessin từ alcaloid toàn phần là vì theo một số tài liệu về thực vật học [5], [32], [48], Conessin là hợp chất chiếm thành phần lớn hơn hẳn trong số các alcaloid trong vỏ thân cây Múc hoa trắng. Do đó, phương pháp này không thể áp dụng đại trà cho quá trình phân lập các hợp chất alcaloid nói chung. Ngoài ra, trong trường hợp phân lập lượng mẫu nhỏ (cỡ vài chục milligram Conessin) hoặc phân lập để lấy các phân đoạn khác nhau chứa các hợp chất khác nhau thì phương pháp sắc kí cột vẫn hay được áp dụng hơn.

❖ Tinh chế Conessin: Để tinh chế Conessin từ alcaloid toàn phần chiết xuất từ vỏ thân cây Múc hoa trắng thu hái ở Hải Dương, tác giả Phí Tùng Lâm [30] tiến hành trên sắc kí cột bằng chế độ gradient với hệ dung môi Cloroform : MeOH, tăng dần độ phân cực bằng cách thay tăng dần tỉ lệ MeOH như sau: Cloroform : MeOH (99,5 : 0,5); (99 : 1); (98,5 : 1,5); (98 : 2). Luận án đã tiến hành khảo sát hệ dung môi trên để phân lập Conessin từ alcaloid toàn phần chiết xuất từ vỏ thân cây Múc hoa trắng thu hái ở Hà Tĩnh. Kết quả cho thấy không tách được Conessin tinh khiết. Nguyên nhân có thể do nguồn nguyên liệu hoặc thời điểm thu hái khác nhau đã dẫn đến thành phần hóa học của các mẫu nghiên cứu có sự khác nhau nhỏ. Qua tham khảo tài liệu [99], tiến hành khảo sát hệ Toluen : ethyl acetat, tăng dần tỉ lệ ethyl acetat như sau Toluen : ethyl acetat (98 : 2), (95 : 5), (93 : 7), kiểm tra bằng TLC cho thấy có thể tách được Conessin khiết, vì vậy hệ dung môi Toluen : ethyl acetat, chế độ gradient được lựa chọn để tinh chế Conessin bằng kĩ thuật sắc kí cột nhanh. Sau giai đoạn tinh chế bằng sắc kí cột, tiến hành kết tinh lại trong dung môi acetone để thu được Conessin tương đối tinh khiết (khoảng 99%).

4.3.2. Chiết xuất, phân lập, tinh chế Kaempferol

❖ Chiết xuất Kaempferol: Kaempferol là hợp chất tương đối phân cực do có nhiều nhóm -OH trong cấu trúc phân tử, Kaempferol tan tốt trong methanol, ethanol, diethylether, tan trong dung dịch kiềm, không tan trong cloroform, benzen. Xuất phát từ đặc điểm này, tham khảo kết quả nghiên cứu dược liệu Đơn lá đỏ của tác

giả Nguyễn Thái An [1], luận án đã lựa chọn ethanol là dung môi chiết xuất. Khảo sát các nồng độ cồn khác nhau (EtOH 50°, EtOH 70°, EtOH 90°), khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ (chiết nóng hoặc chiết lạnh) và pH môi trường (có acid hóa và không acid hóa dịch chiết nước trước khi chiết bằng ethyl acetat). Kết quả khảo sát cho thấy, trong tất cả các phương pháp, phương pháp ngâm lạnh bằng EtOH 90°, acid hóa là phương pháp cho hàm lượng Kaempferol cao nhất (khoảng 0,0266%). Với nhiều nhóm –OH trong cấu trúc phân tử, Kaempferol tan khá tốt trong các dung môi phân cực, tuy nhiên phương pháp ngâm lạnh trong ethanol 90° cho hiệu suất chiết cao nhất có thể là vì với độ cồn cao hơn thì ethanol 90° làm đông vón tế bào được liệu tốt hơn, giúp giải phóng các chất trong tế bào tốt hơn cồn thấp độ.

❖ Phân lập Kaempferol: Phương pháp phân lập Kaempferol được tiến hành qua hai giai đoạn, giai đoạn một sử dụng cột silica gel 60 (0,04 – 0,063 mm), giai đoạn hai tiếp tục phân lập trên cột Sephadex LH-20. Trong quá trình phân lập bằng sắc ký cột, có thể rửa giải bằng một trong hai chế độ: chế độ đẳng dòng hoặc chế độ gradient. Chế độ đẳng dòng tiến hành nhanh và đơn giản, chế độ gradient cho phép tách tốt hơn. Ở giai đoạn một của quá trình phân lập, sử dụng pha tĩnh silicagel 60 nên để tăng cường khả năng phân giải, chế độ gradient được lựa chọn. Ở giai đoạn hai, sử dụng pha tĩnh có hiệu lực tách cao là Sephadex LH-20 nên có thể chọn chế độ rửa giải đẳng dòng với dung môi MeOH.

❖ Tinh chế Kaempferol: Kaempferol được tinh chế bằng cách lặp lại giai đoạn phân lập trên cột Sephadex LH-20, thu phân đoạn tinh khiết hơn. Độ tinh khiết của Kaempferol sau giai đoạn tinh chế là trên 96,6%.

4.3.3. Chiết xuất, phân lập, tinh chế Nuciferin

❖ Chiết xuất Nuciferin: Trong nghiên cứu của tác giả Nguyễn Thị Nhung [34], Nuciferin được chiết bằng ethanol 70° trong môi trường kiềm bằng phương pháp ngâm kiệt. Xuất phát từ công thức hóa học của Nuciferin, đây là một alkaloid có độ phân cực thấp, tan tốt trong CHCl₃, MeOH, EtOH nóng, vì vậy, luận án lựa chọn dung môi chiết là ethanol 96° để làm tăng độ tan của Nuciferin và khảo sát cả hai phương pháp là chiết nóng bằng đun sôi hồi lưu và chiết nguội bằng phương pháp

ngâm lạnh. Kết quả cho thấy chiết nóng có hiệu suất cao hơn ($0,89 \pm 0,04\%$) so với chiết nguội ($0,83 \pm 0,05\%$). Vì vậy, phương pháp chiết nóng bằng đun hồi lưu với ethanol 96° được lựa chọn.

❖ Phân lập Nuciferin: Nuciferin được phân lập bằng sắc kí cột, khảo sát bằng TLC để chọn hệ dung môi thích hợp nhất cho quá trình phân lập. Theo kinh nghiệm phân lập alkaloid, nếu thành phần pha động có một ít NH_4OH thì sẽ giảm hiện tượng kéo đuôi. Kết quả khảo sát cho thấy với hệ dung môi n-Hexan : aceton : NH_4OH (3 : 1 : 0,1), các vết tách rõ rệt và xa nhau, vì vậy hệ dung môi n-Hexan : aceton : NH_4OH (3 : 1 : 0,1) được lựa chọn để phân lập Nuciferin trong alkaloid toàn phần của lá Sen bằng sắc kí cột. Kết quả giai đoạn phân lập cho Nuciferin khá tinh khiết (96,2%). Với độ tinh khiết này đã đủ yêu cầu để dùng làm nguyên liệu thiết lập CCĐC từ nguồn gốc dược liệu. Một nguyên nhân nữa để thu được Nuciferin với độ tinh khiết cao sau phân lập có thể do thành phần hóa học của lá Sen tương đối ít phức tạp chất: lá Sen chứa 0,77 - 0,84% alkaloid, trong đó chủ yếu là Nuciferin [48].

❖ Tinh chế Nuciferin: Nuciferin sau giai đoạn phân lập bằng sắc kí cột đã khá tinh khiết nên chỉ cần tinh chế đơn giản bằng cách kết tinh lại trong môi ở nhiệt độ lạnh. Sau giai đoạn kết tinh, độ tinh khiết của Nuciferin đạt được khoảng 98 - 99%.

Các hợp chất sau khi tinh chế đều đạt yêu cầu để sử dụng làm nguyên liệu thiết lập CCĐC có nguồn gốc dược liệu dùng cho phân tích định lượng bằng HPLC (trên 95%). Kết quả đạt được sau giai đoạn chiết xuất phân lập, tinh chế được thống kê ở Bảng 4.1.

Bảng 4.1. Kết quả đạt được của nghiên cứu chiết xuất, phân lập và tinh chế

Đối tượng nghiên cứu	Lượng HCTP (g)	Lượng sản phẩm PL (g)	Lượng sản phẩm tinh chế (g)	Hàm lượng sau tinh chế (%)
Conessin	12,0	2,55	2,0	98,0
Kaempferol	76,8	3,58	2,2	96,6
Nuciferin	2,9	2,14	2,0	98,7

Đối với việc phân lập và tinh chế, trong phạm vi đề tài mới chỉ áp dụng sắc

kí cột mà chưa sử dụng sắc kí sắc kí lỏng điều chế. Hiện nay các hệ thống sắc kí lỏng điều chế còn rất đắt tiền chưa phổ biến ở Việt Nam. Nếu đề tài có điều kiện phát triển tiếp, nên áp dụng sắc kí lỏng điều chế để phân lập và tinh chế cho việc thiết lập CCĐC là hợp chất đặc trưng từ dược liệu.

4.4. VỀ BỘ DỮ LIỆU NHẬN DẠNG VÀ ĐỘ TINH KHIẾT CỦA CÁC HỢP CHẤT

4.4.1. Về bộ dữ liệu đo phổ

Các hợp chất là đối tượng nghiên cứu trong đề tài đều là những hợp chất đã biết, vì vậy các dữ liệu phổ có thể tìm thấy trong thư viện phổ. Tuy nhiên, luận án đã tiến hành xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất, bao gồm dữ liệu phổ, đo điểm chảy bằng chính nguyên liệu thu được sau quá trình chiết xuất, phân lập, tinh chế. Kết quả nghiên cứu đã khẳng định các hợp chất được sử dụng làm nguyên liệu thiết lập CCĐC đã được mô tả đặc tính một cách đầy đủ, đáp ứng yêu cầu của WHO [148] và ASEAN [65], [66] về thiết lập CCĐC.

4.4.2. Về độ tinh khiết xác định bằng kĩ thuật quét nhiệt vi sai

DSC là kĩ thuật phân tích không phải sử dụng đến chất đối chiếu, vì vậy có giá trị tham khảo tốt bên cạnh giá trị ấn định của chất chuẩn thiết lập được khi sử dụng kĩ thuật định lượng bằng HPLC. Phương pháp này rất được khuyến khích sử dụng trong nghiên cứu thiết lập CCĐC. Các nghiên cứu của các tác giả trong và ngoài nước trước đây về 3 hợp chất này đều chưa tiến hành xác định độ tinh khiết của chất bằng DSC. Kết quả xác định độ tinh khiết bằng DSC đã được xem xét để xây dựng CTCL cho các CCĐC. Kết quả này có sự phù hợp với kết quả định lượng và xác định tạp chất liên quan: Conessin đạt độ tinh khiết 98,53%, Nuciferin đạt độ tinh khiết 99,63% và Kaempferol đạt độ tinh khiết 97,68%.

4.5. VỀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU

4.5.1. Về tiêu chuẩn chất lượng của chất chuẩn đối chiếu

Tiêu chuẩn chất lượng (TCCL) của một CCĐC gồm có chỉ tiêu chất lượng (CTCL) và phương pháp phân tích (PPPT). TCCL của một CCĐC được xây dựng

dựa trên các yếu tố như TCCL của các hợp chất được sử dụng làm CCĐC được công bố trong Dược điển hoặc TCCL của NSX, các đặc điểm thuộc về bản chất vật lí, hóa học của chất nghiên cứu và mục đích sử dụng của CCĐC. PPPT sử dụng để đánh giá các CTCL của CCĐC phải là các phương pháp chính thống trong Dược điển, và là phương pháp dự kiến sẽ sử dụng để đánh giá mẫu bằng CCĐC đó [148].

❖ Về chỉ tiêu chất lượng: Trong số các CCĐC trong luận án, chỉ có Kaempferol có trong danh mục CCĐC của Dược điển Mỹ, Dược điển Trung Quốc, nhưng chưa có trong ĐĐVN, hai chất còn lại Conessin và Nuciferin chưa có trong danh mục CCĐC của bất kì Dược điển nào, vì vậy các CTCL của CCĐC được xây dựng dựa trên các đặc tính hóa – lí của chất nghiên cứu và mục đích sử dụng là dùng để phân tích định tính và định lượng bằng HPLC. Các CTCL còn được xây dựng trên cơ sở tham khảo CTCL của một số nguyên liệu và thành phẩm có trong các Dược điển để đảm bảo đánh giá được đầy đủ chất lượng của CCĐC, phù hợp với mục đích dự kiến sử dụng.

❖ Về phương pháp phân tích: Các PPPT sử dụng để đánh giá chất lượng của CCĐC bao gồm: Định tính bằng đo phổ (IR, MS, NMR), xác định điểm chảy bằng phương pháp đo trong mao quản, xác định độ tinh khiết bằng kĩ thuật DSC, xác định tạp chất liên quan và định lượng bằng HPLC. Trừ phương pháp phân tích nhiệt vi sai (DSC), các phương pháp trên đều là những phương pháp chính thống trong các Dược điển quốc tế và ĐĐVN để xác định CTCL của hoạt chất hoặc thành phẩm thuốc. Luận án đã tiến hành xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng bằng HPLC để xác định hàm lượng các CCĐC ở dạng nguyên trạng và trong dược liệu. Các thông số của hệ sắc kí định lượng CCĐC được xây dựng mới so với tài liệu tham khảo để đảm bảo tách được hợp chất chính ra khỏi tạp chất liên quan thường đi kèm trong quá trình chiết xuất các dược liệu phân bố trong nước như đã đề cập trong đề tài. Riêng đối với hợp chất Conessin, do hợp chất này hấp thụ tử ngoại rất yếu nên không tìm thấy tài liệu tham khảo nào đề cập đến việc định lượng hợp chất bằng HPLC với detector UV-VIS, chỉ có duy nhất một tài liệu tham khảo đề cập đến phương pháp định lượng bằng HPLC với detector chỉ số khúc xạ, nhưng

do điều kiện phòng thí nghiệm không có detector loại này nên luận án đã khảo sát phương pháp định lượng bằng HPLC với detector UV ở bước sóng 205 nm.

4.5.2. Về qui trình đánh giá chất lượng của chất chuẩn đối chiếu

Qui trình phân tích được xây dựng theo hướng dẫn của WHO và ASEAN, đảm bảo tính khoa học và chặt chẽ. Trong việc xây dựng qui trình phân tích, việc xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng CCĐC có ý nghĩa quyết định đến chất lượng của CCĐC. Đối với chỉ tiêu tạp chất liên quan, do không có chuẩn tạp chất, chỉ tiến hành đánh giá hàm lượng tạp chất gần đúng thông qua tỉ lệ phần trăm diện tích pic. Đối với các CCĐC tổng hợp hóa được, có thể có một số sản phẩm phụ của quá trình tổng hợp luôn đi kèm hợp chất chính, một số trong các sản phẩm phụ này có thể có độc tính cao, vì vậy việc định danh tạp chất và xác định được chính xác hàm lượng tạp chất trong một số trường hợp là đặc biệt quan trọng, nếu hoạt chất đó được sử dụng để bào chế các thuốc điều trị lâu dài.

Kết quả xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng của các hợp chất nghiên cứu bằng HPLC được tóm tắt ở Bảng 4.2.

Bảng 4.2. Số liệu thẩm định phương pháp HPLC

Tên chất	Tính đặc hiệu	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)	Hệ số tương quan (r)	Độ đúng (%)	Độ chụm (%)
Conessin	+	10	33	0,9998	98,32 - 99,27	0,27
Kaempferol	+	0,038	0,12	0,9999	97,13 - 102,46	0,89
Nuciferin	+	0,313	1,033	0,9999	100,17 - 102,19	0,61

Sử dụng phương pháp đã được thẩm định, đồng thời đánh giá liên phòng thí nghiệm để xác định GTAĐ của CCĐC để đảm bảo tính tin cậy của giá trị công bố trên chứng chỉ phân tích. Có sự khác nhau về kết quả định lượng ở giai đoạn tinh chế và giai đoạn thiết lập chuẩn là do:

- Các nghiên cứu được tiến hành với các chất chuẩn liên kết khác nhau.

- Thiết bị và PTN khác nhau, trong đó các nghiên cứu thiết lập chuẩn phải được tiến hành ở các PTN đạt tiêu chuẩn ISO – IEC 17025 và GLP theo qui định về thiết lập CCĐC của WHO và ASEAN.

4.5.3. Về qui trình đóng gói và đánh giá độ đồng nhất lô

❖ Về đóng gói và bảo quản: CCĐC được đánh giá chất lượng bằng các kỹ thuật và thiết bị phân tích hiện đại. Tuy nhiên, trong quá trình bảo quản bị tác động bởi nhiều yếu tố bên ngoài như ánh sáng, nhiệt độ, độ ẩm, không khí... và mỗi loại chất chuẩn đều có những thuộc tính riêng, vì thế cần phải có kỹ thuật đóng gói và bảo quản phù hợp. Do có tầm quan trọng như vậy, việc đóng gói CCĐC đã được thực hiện trong điều kiện nghiêm ngặt (môi trường khí trơ N₂ 99,99%, độ ẩm tương đối 40%) và được bảo quản trong điều kiện nhiệt độ ổn định từ 2 – 8 °C để đảm bảo chất lượng không thay đổi trong một thời gian dài. Đối với một số nguyên liệu thiết lập chuẩn có độ tinh khiết cao, được đóng gói và bảo quản thích hợp, kiểm tra định kì ở thời điểm sau 15 năm vẫn đạt yêu cầu chất lượng để sử dụng làm CCĐC mà không có sự thay đổi có ý nghĩa về GTAĐ công bố trên chứng chỉ phân tích.

❖ Về đánh giá đồng nhất lô: Kết quả kiểm tra đồng nhất lô cho thấy hàm lượng giữa các lọ chuẩn được lấy ngẫu nhiên là ổn định thể hiện qua giá trị RSD đều nhỏ hơn 1,0%, điều đó đã chứng tỏ qui trình phân tích, qui trình sản xuất, bao bì đóng gói và điều quản bảo quản được xây dựng là phù hợp.

4.6. VỀ ĐỘ ỔN ĐỊNH CỦA CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU

Độ ổn định của các CCĐC được kiểm soát bằng cách tiến hành đánh giá lại theo định kì. Thiết lập CCĐC là một công việc cầu kì, tốn kém, vì vậy, đối với CCĐC người ta không xác định hạn dùng để tránh sự lãng phí CCĐC. Chỉ trong một số trường hợp đặc biệt, một số chất rất dễ bị phân huỷ thì phải ghi hạn sử dụng lên nhãn. GTAĐ của CCĐC được định kì đánh giá lại, nếu có những thay đổi có ý nghĩa về GTAĐ nhưng vẫn đáp ứng được yêu cầu về độ tinh khiết phù hợp với mục đích sử dụng thì thay nhãn của CCĐC với GTAĐ mới hoặc thông báo cho các cơ sở đã được phân phối CCĐC để các cơ sở tự điều chỉnh. Theo qui định của

ASEAN, nếu kết quả định kì cho thấy GTAD thay đổi trên 1% so với giá trị ấn định thiết lập ban đầu thì tiến hành công bố lại GTAD [66].

Đối với các CCĐC được thiết lập chỉ cho các mục đích định tính, ví dụ để đo phổ IR, thường không phải kiểm tra lại. Nhưng nếu các CCĐC được sử dụng cho các mục đích khác thì nên lựa chọn các phép thử có thể tiến hành nhanh và có độ nhạy cao để không sử dụng quá nhiều số lượng CCĐC, các phương pháp sắc kí và quét nhiệt vi sai hay được áp dụng cho kiểm tra lại. Luận án đã lựa chọn phương pháp HPLC để đánh giá độ ổn định của CCĐC nhằm hai mục đích:

- Kiểm tra GTAD trên chứng chỉ phân tích.
- Kiểm tra tạp chất xem có sự thay đổi lớn về hàm lượng tạp chất hay sự xuất hiện các tạp chất mới, thể hiện bằng các pic mới trên sắc kí đồ hay không.

Tần suất của các lần kiểm tra lại phụ thuộc vào bản chất của nguyên liệu dự kiến thiết lập chất đối chiếu và điều kiện bảo quản. Theo qui định của WHO và ASEAN, thông thường việc kiểm tra lại được áp dụng theo chu kì 2 năm, nhưng đối với một số chất nhạy cảm với ánh sáng hoặc độ ẩm cần được tiến hành kiểm tra với chu kì ngắn hơn. Do điều kiện về trang thiết bị thí nghiệm cũng như thời gian thực hiện, luận án đã tiến hành đánh giá độ ổn định của CCĐC ở thời điểm 9 tháng và đánh giá chỉ tiêu tạp chất liên quan ở thời điểm 15 tháng kể từ thời điểm phát hành chứng chỉ phân tích.

4.6.1. Về độ ổn định ở thời điểm 9 tháng

Sử dụng phương pháp HPLC, chất đối chiếu liên kết là những chất đã sử dụng để thiết lập GTAD, được bảo quản trong cùng điều kiện, đánh giá CCĐC thiết lập được theo protocol của từng chất đã ghi trong các Phụ lục 13 - 15. Kết quả phân tích được tóm tắt ở Bảng 4.3.

Kết quả cho thấy sự dao động về GTAD là rất nhỏ (dưới 0,5%), nhỏ hơn giá trị qui định của ASEAN (trên 1%), vì vậy có thể kết luận không có sự thay đổi về GTAD sau thời gian 9 tháng. Tỷ lệ tổng tạp chất có sự biến động về hàm lượng nhưng không xuất hiện tạp chất mới. Đối với Nuciferin, tỷ lệ tổng tạp chất không thay đổi, điều này có thể gợi ý do độ tinh khiết của Nuciferin là cao nhất trong số 3

chất thiết lập chuẩn, ngay sau quá trình phân lập Nuciferin đã đạt được độ tinh khiết đáp ứng được yêu cầu thiết lập CCĐC từ dược liệu.

Bảng 4.3. Tóm tắt kết quả nghiên cứu độ ổn định sau 9 tháng

Tên chất	Ban đầu		Sau 9 tháng		Chênh lệch về GTAD (%)
	GTAD (%)	Tổng tạp chất (%)	GTAD (%)	Tổng tạp chất (%)	
Conessin	97,80	1,64	98,25	1,73	+ 0,46
Nuciferin	100,11	0,10	99,96	0,10	- 0,15
Kaempferol	95,17	1,78	95,29	1,76	+ 0,13

4.6.2. Về chỉ tiêu tạp chất liên quan ở thời điểm 15 tháng

Sử dụng phương pháp HPLC, do đã hết chất chuẩn liên kết nên chỉ đánh giá tạp chất liên quan bằng phương pháp gần đúng là so sánh diện tích pic. Đánh giá theo TCCL của từng chất đã ghi trong các Phụ lục 10 ~ 12.

Kết quả phân tích trong toàn bộ quá trình nghiên cứu được trình bày tóm tắt ở Bảng 4.4.

Bảng 4.4. Tóm tắt kết quả nghiên cứu độ ổn định sau 9 tháng và phân tích tạp chất liên quan sau 15 tháng

Tên chất	Ban đầu		Sau 9 tháng		Sau 15 tháng
	GTAD (%)	Tổng tạp chất (%)	GTAD (%)	Tổng tạp chất (%)	Tổng tạp chất (%)
Conessin	97,80	1,64	98,25	1,73	1,77
Nuciferin	100,11	0,10	99,96	0,10	0,10
Kaempferol	95,17	1,78	95,29	1,76	1,70

Tại thời điểm 15 tháng, không thấy xuất hiện pic mới trên sắc kí đồ. Có sự thay đổi nhẹ về tỉ lệ tổng tạp chất của Conessin và Kaempferol. Tổng tạp chất của

Nuciferin vẫn rất ổn định trong toàn bộ thời gian nghiên cứu. Tổng tạp chất của các 3 CCĐC đều nhỏ hơn 3% (đạt mức 1).

Từ kết quả nghiên cứu độ ổn định, có thể sơ bộ kết luận qui trình chiết xuất, phân lập và tinh chế đã xây dựng là phù hợp, qui trình đã tạo ra nguyên liệu có chất lượng tương đối ổn định. Qui trình này có thể áp dụng để điều chế các nguyên liệu Conessin, Nuciferin, Kaempferol sử dụng làm CCĐC từ dược liệu.

4.7. VỀ VIỆC ỨNG DỤNG CÁC CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU

4.7.1. Định lượng Kaempferol trong dược liệu

Áp dụng các CCĐC đã thiết lập, luận án đã xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích để xác định hàm lượng của Kaempferol trong lá cây Đơn lá đỏ và lá cây Chè vằng, là hai loại dược liệu có chứa Kaempferol. Phương pháp này có thể sử dụng để đánh giá chất lượng nguyên liệu đầu vào của quá trình sản xuất thuốc đông dược là các chế phẩm từ các dược liệu trên.

Qui trình chiết từ dược liệu lấy chuẩn và qui trình chiết định lượng có sự khác nhau về dung môi và nhiệt độ chiết. Đối với qui trình chiết từ dược liệu lấy chuẩn sử dụng phương pháp ngâm lạnh với ethanol 90 °C, còn qui trình chiết định lượng sử dụng phương pháp chiết hồi lưu với dung môi methanol vì trong qui trình chiết từ dược liệu lấy chuẩn thì tính chọn lọc được ưu tiên hơn so với hiệu suất chiết, có thể không cần chiết kiệt hợp chất chính (Kaempferol) nhưng phải đảm bảo kéo theo ít tạp chất để thuận lợi cho quá trình phân lập và tinh chế tiếp theo còn trong qui trình chiết định lượng thì cần chiết kiệt hoạt chất nên chọn methanol làm dung môi chiết định lượng vì methanol là một dung môi hòa tan tốt nhiều nhóm chất hay được dùng trong chiết các nhóm hoạt chất khác nhau khỏi dược liệu trước khi chiết lỏng - lỏng sang các dung môi khác. Do vậy chiết bằng methanol sẽ triệt để hơn nhưng cũng nhiều tạp chất hơn khó tách trong phân lập và tinh chế. Mặt khác, qui trình chiết để lấy chuẩn thực hiện với lượng mẫu lớn (1,5 kg dược liệu) nên sử dụng phương pháp ngâm lạnh thì thao tác đơn giản thuận tiện hơn tuy thời gian có kéo dài, trong khi qui trình chiết định lượng chỉ thực hiện với lượng mẫu rất

nhỏ (0,25 gam dược liệu) nên thực hiện bằng cách chiết hồi lưu để rút ngắn thời gian phân tích mẫu.

4.7.2. Định lượng Conessin trong chế phẩm đông dược

Cho đến nay, cục quản lý dược đã cấp số đăng kí cho khá nhiều mặt hàng viên nén hoặc viên nang Mộc hoa trắng của các cơ sở sản xuất trong nước (Phụ lục 22). Trong đó, riêng công ty Dược và Thiết bị y tế Hà Tĩnh đã đăng kí cả hai chế phẩm: viên nén bao phim *Mộc hoa trắng* (thành phần hoạt chất là cao đặc Mộc hoa trắng) và viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT* (thành phần hoạt chất gồm có cao đặc Mộc hoa trắng, berberin clorid, cao Mộc hương). Từ khi viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT* lưu hành trên thị trường thì các chế phẩm còn lại bán được rất ít nên các nhà sản xuất khác đã tạm ngừng sản xuất, vì vậy, luận án đã phải sử dụng chế phẩm viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT* để xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng Conessin trong chế phẩm. Trong tiêu chuẩn cơ sở của viên nén bao phim *Mộc hoa trắng*, nhà sản xuất đưa ra chỉ tiêu định lượng dựa trên việc xác định hàm lượng alcaloid toàn phần có trong viên nén, do không có CCĐC. Trong tiêu chuẩn cơ sở của viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT*, nhà sản xuất chỉ đưa ra chỉ tiêu định lượng dựa trên việc xác định hàm lượng berberin clorid bằng HPLC, không xác định hàm lượng các hoạt chất khác, do không có CCĐC. Phần định tính xác định sự có mặt của hoạt chất Conessin bằng TLC, so sánh với dịch chiết dược liệu chuẩn. Như vậy tiêu chuẩn chất lượng của viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT* của nhà sản xuất chưa phản ánh đầy đủ chất lượng của chế phẩm.

Kết quả xây dựng và thẩm định phương pháp phân tích để xác định hàm lượng Conessin trong viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT* của Công ty Dược và Thiết bị y tế Hà Tĩnh có thể sử dụng để nâng cao tiêu chuẩn chất lượng của chế phẩm viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT*.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

KẾT LUẬN

1. Về xây dựng qui trình chiết xuất, phân lập, tinh chế

Đã khảo sát đầy đủ và xây dựng qui trình chiết xuất, phân lập, tinh chế được 03 hợp chất đặc trưng từ dược liệu là Conessin, Kaempferol và Nuciferin đủ điều kiện để làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn đối chiếu.

2. Về thiết lập chất chuẩn đối chiếu

Đã xây dựng được bộ dữ liệu nhận dạng chất: Phổ IR, phổ UV-VIS, phổ MS, phổ NMR, điểm chảy và xác định độ tinh khiết của các hợp chất tinh chế được bằng phương pháp quét nhiệt vi sai. Kết quả độ tinh khiết của Conessin là 98,53%, của Kaempferol là 97,68% và của Nuciferin là 99,63%.

Đã phân tích tạp chất liên quan thường đi kèm với các hợp chất trên trong quá trình chiết xuất bằng kỹ thuật HPLC, đánh giá được hàm lượng của tạp chất liên quan dựa trên tỉ lệ diện tích pic và nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn đối chiếu để làm rõ ảnh hưởng của tạp chất liên quan đến hàm lượng của hợp chất chính trong thời gian bảo quản.

Lần đầu tiên tại Việt Nam đã thiết lập 03 chất chuẩn đối chiếu với Conessin, Kaempferol và Nuciferin từ nguồn dược liệu trong nước theo đúng hướng dẫn của WHO và ASEAN về thiết lập, phân phối và bảo quản chất chuẩn đối chiếu hóa học, bao gồm 5 chỉ tiêu: định tính (bằng phổ IR, NMR), điểm chảy, độ tinh khiết, tạp chất liên quan và định lượng (bằng HPLC). Các phương pháp để xác định các chỉ tiêu trên đều là những phương pháp chính thống được qui định trong Dược điển Việt Nam và các Dược điển quốc tế. Kết quả đánh giá độ đồng nhất mẫu trong quá trình đóng gói cho thấy các lọ thành phẩm của lô sản xuất có hàm lượng đồng nhất. Như vậy điều kiện đóng gói là ổn định và phù hợp. Số lượng chuẩn thiết lập được với mỗi chất là 50 lọ 20mg.

Đã tiến hành đánh giá liên phòng thí nghiệm để xác định giá trị ấn định của

chất chuẩn đối chiếu. Kết quả công bố trên chứng chỉ phân tích như sau: Conessin 97,80%, Kaempferol 95,17% và Nuciferin 100,11%.

Đã tiến hành nghiên cứu độ ổn định của các chất chuẩn đối chiếu thiết lập được sau thời gian 9 tháng và phân tích chỉ tiêu tạp chất liên quan sau thời gian 15 tháng. Kết quả cho thấy chất lượng của CCĐC ổn định sau 9 tháng; sau 15 tháng cả 3 chất đều không xuất hiện thêm tạp chất mới, hàm lượng tổng tạp chất vẫn nhỏ hơn 3% (đạt mức chất lượng 1).

3. Về ứng dụng chất chuẩn đối chiếu

Đã sử dụng chất chuẩn đối chiếu Kaempferol thiết lập được để xây dựng phương pháp định lượng và xác định được hàm lượng Kaempferol trong lá cây Đơn lá đỏ là 0,211% và trong lá cây Chè vằng là 0,072%. Sử dụng chất chuẩn đối chiếu Conessin thiết lập được để xây dựng phương pháp định lượng và xác định được hàm lượng Conessin trong viên nén bao phim *Mộc hoa trắng HT* là 1,49mg/viên.

ĐỀ XUẤT

- Tiếp tục nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn đối chiếu làm cơ sở cho việc cải tiến qui trình chiết xuất, phân lập, tinh chế đã xây dựng, để tạo ra nguồn nguyên liệu thiết lập chuẩn có độ tinh khiết cao.

- Bổ sung các chất chuẩn đối chiếu trên vào Dược điển Việt Nam xuất bản lần thứ 5 và nâng cấp tiêu chuẩn dược liệu có hoạt chất tương ứng trong các chuyên luận của Dược điển Việt Nam: Mức hoa trắng, Đơn lá đỏ, Lá Sen.

- Tiếp tục nghiên cứu thiết lập các chất chuẩn đối chiếu khác có nguồn gốc dược liệu để xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng các hợp chất này trong các dược liệu và chế phẩm đông dược, góp phần vào việc nâng cao chất lượng đông dược và hiện đại hóa công tác kiểm nghiệm thuốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Nguyễn Thái An (2003), *Nghiên cứu dược liệu đơn lá đỏ*, Luận án Tiến sĩ dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội.
2. Trần Tử An (2002), *Phương pháp chiết ứng dụng trong kiểm nghiệm thuốc và độc chất*, Tài liệu giảng dạy sau đại học, Trường Đại học Dược Hà Nội, 87-109.
3. Bộ Khoa học và Công nghệ (2010), *Nghiên cứu chiết tách, tinh chế một số hợp chất tự nhiên đặc trưng từ dược liệu để làm chất chuẩn phục vụ kiểm nghiệm dược liệu*, Báo cáo kết quả nghiệm thu đề tài khoa học cấp nhà nước, mã số đề tài: KC.10.16/06-10.
4. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, Nxb. Y học, Hà Nội.
5. Bộ Y tế (2007), *Dược liệu học*, Tập II, Nxb. Y học, Hà Nội.
6. Bộ Y tế (2007), *Hóa phân tích II*, Nxb. Y học, Hà Nội, 13-20.
7. Bộ Y tế (2005), *Kiểm nghiệm thuốc*, Nxb. Y học, Hà Nội, 72-79.
8. Bộ Y tế (2007), *Kỹ thuật sản xuất dược phẩm*, Tập 1, Nxb. Y học, Hà Nội, 146-199.
9. Bộ Y tế (2004), *Nghiên cứu thiết lập và sản xuất 14 chất đối chiếu quốc gia dùng trong kiểm nghiệm thuốc*, Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cấp Bộ, Hà Nội, 11-15.
10. Bộ Y tế (2008), *Nghiên cứu thiết lập bộ chuẩn kháng sinh phục vụ công tác kiểm nghiệm thuốc*, Báo cáo kết quả nghiên cứu đề tài cấp Bộ, Hà Nội, 6-23.
11. Bộ Y tế, Cục quản lý Dược (2010), *Quyết định về việc công bố 782 tên thuốc nước ngoài được phép lưu hành tại Việt Nam - Đợt 67*.
12. Bộ Y tế, Cục quản lý Dược (2010), *Quyết định về việc công bố 471 tên*

thuốc nước ngoài được phép lưu hành tại Việt Nam - Đợt 68.

13. Bộ Y tế, Cục quản lý Dược (2010), *Quyết định về việc công bố 780 tên thuốc nước ngoài được phép lưu hành tại Việt Nam - Đợt 69.*
14. Bộ Y tế, Cục quản lý Dược (2010), *Quyết định về việc công bố 745 tên thuốc nước ngoài được phép lưu hành tại Việt Nam - Đợt 70.*
15. Nguyễn Kim Cẩn, Đinh Thị Thuyết (2001), “Phương pháp khối lượng định lượng alcaloid toàn phần của lá Sen và sự thay đổi hàm lượng alcaloid theo tuổi và thời vụ thu lá”, *Tạp chí Dược liệu*, 2+3 (6), 45-48.
16. Nguyễn Gia Chấn (1999), “Kết hợp y dược học cổ truyền và y dược học hiện đại trong công tác dược”, *Tạp chí Dược liệu*, 3 (4), 65-67.
17. Nguyễn Gia Chấn (1999), “Kết hợp y dược học cổ truyền và y dược học hiện đại trong công tác dược - (tiếp theo)”, *Tạp chí Dược liệu*, 4 (4), 97-99.
18. Nguyễn Gia Chấn (2005), “Tổng quan về nghiên cứu triển khai gần đây các chất chống u từ các thuốc thảo mộc Trung Quốc”, *Tạp chí Dược liệu*, 2 (10), 35-40.
19. Nguyễn Thượng Dong (2001), “Viện Dược liệu – 40 năm nghiên cứu và phát triển để phục vụ chăm sóc và bảo vệ sức khỏe nhân dân”, *Tạp chí Dược liệu*, 2+ 3 (6), 33-38.
20. Nguyễn Thượng Dong (2009), “Lịch sử phát triển dược thảo và vấn đề bảo vệ tri thức y học cổ truyền”, *Tạp chí Dược liệu*, 6 (14), 259-262.
21. Đỗ Trung Đàm, Đỗ Thị Phương (2006), “Tác dụng an thần của senin, bột alcaloid lá sen”, *Tạp chí Dược học*, 368, 19-22.
22. Nguyễn Minh Đức, Nguyễn Viết Tựu, Vĩnh Định (2002), “Flavanol từ đơn lá đỏ”, *Tạp chí Dược liệu*, 6 (7), 165-169.
23. Nguyễn Minh Đức, Nguyễn Viết Tựu, Vĩnh Định (2003), “Hợp chất phenolic từ đơn lá đỏ”, *Tạp chí Dược liệu*, 8 (1), 16-18.

24. Trần Việt Hùng (2003), “Giới thiệu một số phương pháp chiết hiện đại”, *Thông báo kiểm nghiệm*, 1, 25-30.
25. Nguyễn Khang (2003), “Hiện trạng trên thế giới về chính sách, đăng ký và điều lệ quản lý thuốc cổ truyền”, *Tạp chí Dược học*, 3, 9-11.
26. Nguyễn Khang (2003), “Hiện trạng trên thế giới về chính sách, đăng ký và điều lệ quản lý thuốc cổ truyền - Tiếp theo”, *Tạp chí Dược học*, 6, 9-11.
27. Nguyễn Minh Khởi (2011), “Kết quả hoạt động khoa học Viện Dược liệu giai đoạn 2006-2010 và định hướng phát triển tới 2015”, *Tạp chí Dược liệu*, 1+2 (16), 4-9.
28. Từ Minh Koóng, Nguyễn Đình Luyện (2010), “Bộ môn Công nghiệp dược - Trường Đại học Dược Hà Nội – 45 năm xây dựng và phát triển”, *Tạp chí Dược học*, 415, 2-5.
29. Phạm Thanh Kỳ, Chu Đình Kính, Phí Tùng Lâm (2006), “Phân lập và nhận dạng conessin và norconessin trong vỏ cây Múc hoa trắng thu hái ở Hải Dương”, *Tạp chí dược liệu*, 11 (1), 6-8.
30. Phí Tùng Lâm (2005), *Nghiên cứu dược liệu Múc hoa trắng thu hái ở Chí Linh, Hải Dương*, Luận văn Thạc sĩ Dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội.
31. Nguyễn Thị Lập, Lưu Hoàng Ngọc, Nguyễn Thanh Bình (2010), “Nghiên cứu chiết xuất phospholipid từ lòng đỏ trứng bằng phương pháp sử dụng CO₂ ở trạng thái siêu tới hạn làm nguyên liệu chế tạo liposom”, *Tạp chí Dược học*, 407, 35-39.
32. Đỗ Tất Lợi (2001), *Những cây thuốc và vị thuốc Việt Nam*, Nxb. Y học, Hà Nội, 182 - 184.
33. Nguyễn Thị Nhung, Phạm Thanh Kỳ, Phó Đức Thuần (2000), “Tác dụng của Nuciferin chiết từ lá Sen lên điện tim và điện não đồ”, *Tạp chí Dược học*, 6, 12-14.

34. Nguyễn Thị Nhung (2001), *Nghiên cứu đặc điểm thực vật, thành phần hóa học và tác dụng sinh học của cây sen ở Việt Nam*, Luận án tiến sĩ Dược học, Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội.
35. Trịnh Văn Quỳ, Phùng Hòa Bình (2005), “Một số vấn đề về tiêu chuẩn hóa, nâng cao chất lượng thuốc và nguyên liệu làm thuốc có nguồn gốc thực vật về độ an toàn”, *Tạp chí Dược học*, 346, 8-11.
36. Trần Đình Sơn, Chu Đình Kính, Nguyễn Thị Hồng Điệp, Phạm Thanh Hải (2007), *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân, Quyển 1*, Nxb Y học, Hà Nội, 25-40.
37. Trần Đình Sơn, Chu Đình Kính, Nguyễn Thị Hồng Điệp, Phạm Thanh Hải (2007), *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân, Quyển 2*, Nxb. Y học, Hà Nội, 163-182.
38. Trần Văn Sung (2002), *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân trong hóa hữu cơ, Tập 1, Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều*, Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội, Hà Nội, 94-127.
39. Trần Huy Thái, Nguyễn Quang Hưng, Phan Văn Kiệm, Châu Văn Minh, Nguyễn Hải Đăng, Nguyễn Xuân Cường (2006), “Các hợp chất alcaloid steroid từ vỏ cây Mộc hoa trắng (*Holarrhena pubescens* Buch. Harm) Wall.ex.G.Don”, *Tạp chí Dược học*, 362, 24-27.
40. Trần Huy Thái, Phùng Tuyết Hồng, Nguyễn Quang Hưng (2007), “Một số kết quả nghiên cứu về đặc điểm hình thái, sinh thái và khả năng nhân giống, phát triển của cây Mộc hoa trắng (*Holarrhena pubescens* Wall.ex G.Don) ở Việt Nam”, *Tạp chí Dược học*, 373, 19-23.
41. Nguyễn Đình Thành (2011), *Cở sở các phương pháp phổ ứng dụng trong hóa học*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 72, 426-464.
42. Nguyễn Viết Thân (2004), *Những cây thuốc và vị thuốc thường dùng*, Nxb. Y học, 73, 120, 151.
43. Trần Văn Thi, Trần Thanh Minh (2011), “Nghiên cứu phân lập và nhân

dạng cấu trúc alcaloid trong dịch chiết từ lá vòng nem (*Erythrina orientalis* L. Fabaceae)”, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế*, 65, 225-230.

44. Đào Đình Thúc (2007), *Một số phương pháp phổ ứng dụng trong hóa học*, Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội, 342-345.
45. Lê Văn Truyền (2010), “Một số vấn đề về chiến lược nghiên cứu thuốc từ dược liệu”, *Tạp chí dược học*, 413, 2-4, 46-51.
46. Trường Đại học Dược Hà Nội (2006), *Bài giảng Dược liệu Tập I*, Bộ môn Dược liệu, 79-85.
47. Viện Dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập I*, Nxb. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 818-819.
48. Viện Dược liệu (2004), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam, tập II*, Nxb. Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, 721-726.
49. Viện Dược liệu (2008), *Chiết xuất dược liệu*, Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, 11-29, 39-49, 66-76.
50. Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương (2010), *Thủ tục thiết lập và hiệu chuẩn chất chuẩn, ống chuẩn độ*, Ban hành lần thứ 4, Hà Nội, 12-32.
51. Trần Anh Vũ, Nguyễn Thị Chung (2006), “Bước đầu nghiên cứu chiết xuất tinh dầu dương tam cục bằng carbon dioxid lỏng siêu tới hạn”, *Tạp chí Dược học*, 358, 12-14.

TIẾNG ANH

52. Agilent Technologies (2007), *Handbook of Hyphenated ICP-MS Applications*, USA, 4-36.
53. Agilent Technologies (2010), *Principles in PHPLC*, Delaware.
54. Agilent Technologies (2010), *Analysis of Herbal Medicines and Healthcare Products*, Germany.
55. Akhtar P., et al (2011), “Development of Quality Standards of Holarrhena

antidysenterica (Linn.) Bark”, *Recent Research in Science and Technology*, 3 (1), 73-80.

56. Betz J. M., Brown P.N., Roman M. C. (2011), “Accuracy, precision, and reliability of chemical measurements in natural products research”, *Fitoterapia*, 82, 44-52.
57. Bhosale B., Pragma J., Avinash K.. (2011), “HPLC Method of Medicinal Important Plants: A Review”, *Imperial Pharma Journal*, 1 (1), 1-17.
58. Bissada S.M. (1999), *Application of Modern NMR Methods to Structural Studies of Natural and Synthetic Organic Compounds*, Thesis of Master of Science, University of Toronto, Canada.
59. British Pharmacopoeia (2010), Stationary Office, United Kingdom.
60. Cai W., Gu X., Tang J. (2010), “Extraction, Purification and Characterisation of the Flavonoids from *Opuntia milpa alta* Skin”, *Czech Journal of Food Science* 2 (28), 108-116.
61. Chakraborty A., Brantner A. H. (1999), “Antibacterial steroid alkaloids from the stem bark of *Holarrhena pubescens*”, *J. Ethnopharmacol.*, 68 (1-3), 339-344.
62. Chang W. S., Lee Y. J., Lu F. J., Chiang H. C. (1993), “Inhibitory effects of flavonoids on xanthine oxidase”, *Anticancer Research*, 13 (6A), 2165-2170.
63. Chen J. et al. (2007), “Standardized Extracts of Chinese Medicinal Herbs: Case Study of Danshen (*Salvia Miltiorrhiza* Bunge)”, *Journal of Food and Drug Analysis*, 4 (15), 347-364.
64. Choi et al. (2011), “Effect of Lotus (*Nelumbo Nucifera*) Leaf Powder on the Quality Characteristics of Chicken Patties in Refrigerated Storage”, *Korean J. Food Sci. Resour*, 1 (31), 9-18.
65. Committee on Asean reference substances (2005), *Guidelines for the establishment, handling, storage and use of Asean reference substances*,

Thailand, 2-12.

66. Committee on Asean reference substances (2009), *SOP for the production of Asean reference substances*, Thailand, 1-6.
67. Cordella C., et al. (2002), "Use of Differential Scanning Calorimetry (DSC) as a New Technique for Detection of Adulteration in Honeys. 1. Study of Adulteration Effect on Honey Thermal Behavior", *J. Agric. Food Chem.*, 50, 203-208.
68. Cseke L.G., Kyrakosyan A., Kaufman P.B., Warber S.L., Duke J.A., Brielmann H.L. (2006), *Natural products from plants*, Second Edition, CRC Press, Florida, 1-35.
69. Dastmalchi *et al.* (2007), Plants as Potential Sources for Drug Development against Alzheimer's Disease, *International Journal of Biomedical and Pharmaceutical Science*, 1 (2), 83-104.
70. Deinstrop E. H. (2007), *Applied Thin-Layer Chromatography*, Wiley-VCH, Weinheim, 1-13.
71. Ding Z. (2007), "Studies on Extraction and Isolation of Flavonoids from Ginkgo Leaves", *Journal of Food Quality*, 6 (22), 693-700.
72. Dorsey J.G., Cooper W.T. (1998), Liquid Chromatography: Theory and Methodology, *Anal. Chem.* 70 (12), 591-644.
73. DuPont M. S., Day A. J., Bennett R. N., Mellon F. A., Kroon P. A. (2004), "Absorption of kaempferol from endive, a source of kaempferol-3-glucuronide, in humans", *European Journal of Clinical Nutrition*, 58, 947-954.
74. Edward R., Quibai S., Zhiquiang Z., Chongmin Z., Wei G. (2009), "Green Sustainable Processes Using Supercritical Fluid Carbon Dioxide", *Journal of Environmental Sciences*, 21, 720-726.
75. Ekka N. R., Namdeo K. P., Samal P. K. (2008), "Standardization Strategies for Herbal Drug – An Overview", *Research J. Pharm. and Tech.*, 1 (4),

310-312.

76. Eurachem Guide (2002), *The selection and use of reference materials, a basic guide for laboratories and accreditation bodies*, Council of Europe, 2-3.
77. Eurachem/CITAC Guide (2003), *Traceability in Chemical Measurement*, - Council of Europe.
78. European Directorate for the Quality of Medicine and Healthcare (2010), *Annual Report*.
79. Exarchou V. et al (2005), "LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis", *Magn. Reson. Chem.*, 43, 681-687.
80. Fukushi E. (2006), "Advanced NMR Approaches for a Detailed Structure Analysis of Natural Products", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70 (8), 1803-1812.
81. Garg S., Bhutani K.K. (2008), "Chromatographic Analysis of Kutajarista – an Ayurvedic Polyherbal Formulation", *Phytochemical Analysis*, 19, 323-328.
82. Gikas E., et al. (2011), "Quantitation of the Flavonols Quercetin and Kaempferol in the Leaves of *Trigonella foenum-graecum* by High Performance Liquid Chromatography - Diod Array Detection", *Analytical Letters*, 44 (8), 1463-1472.
83. Glowniak K., Bartnik M., Mroczek T., Zabra A., Wierzejska A. (2002), "Application of Column Chromatography and Preparative TLC for Isolation and Purification of Coumarins from *Peucedanum tauricum* Bieb. Fruits", *Journal of Planar Chromatography*, 15, 94-100.
84. Hauthal W.H. (2001), "Advances with Supercritical Fluids", *Chemosphere* 43, 123-135.

85. Henri M.C. (2006), "Supercritical Fluid Chromatography, Pressurized Liquid Extraction, and Supercritical Fluid Extraction", *Analytical Chemistry*, 78 (12), 3909-3915.
86. Herrero M., Mediola J.A., Cifuentes A., Ibáñez E.(2010), "Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications", *Journal of Chromatography A*, 1217, 2495–2511.
87. Hostettmann K., Marston A. (2002), Twenty years of research into medicinal plants: Results and perspectives, *Phytochemistry Reviews* 1, 275–285
88. Houghton P. J., Dias Diogo M. L. (1996), "The conessine content of *Holarrhena pubescens* from Malawi", *Pharmaceutical Biology*, 4 (34), 305-307.
89. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) G12 (2000), *Guidelines for the requirements for the competence of reference materials producers*, 6-7.
90. International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC) G9 (2005), *Guidelines for the selection and use of reference materials*, 4-15.
91. International Organisation for Standardization (1992), *ISO Guide 30: 1992 Terms and definitions used in connection with reference materials*.
92. International Organisation for Standardization (2000), *ISO Guide 31:2000 Contents of certificates of reference materials*, 4-14.
93. International Organisation for Standardization (1997), *ISO Guide 32:1997 Calibration of chemical analysis and use of certified reference materials*.
94. International Organisation for Standardization (2000), *ISO Guide 33:2000 Uses of certified reference materials*.
95. International Organisation for Standardization (2000), *ISO Guide 34:2000 General requirements for the competence of reference material*

producers.

96. International Organisation for Standardization (1989), *ISO Guide 35:1989 Certification of reference materials-General and statistical principles.*
97. International Pharmacopoeia (2003).
98. Japanese Pharmacopoeia XV (2006), 17-127.
99. Jinno K. (1992), *Hyphenated Techniques in Supercritical Fluid Chromatography and Extraction*, Elsevier Science Publisher, Amsterdam., 197-221.
100. Kaur A.D., Ravichandran V., Jain P.K., Agrawal R.K. (2008), "High-performance thin layer chromatography method for estimation of conessine in herbal extract and pharmaceutical dosage formulations", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 391-394.
101. Korean pharmacopoeia IX (2007), 1243-1357.
102. Kuma N., Singh B., Bhandari P., Gupta A. P., Kaul V. K. (2007), "Steroidal Alkaloids from *Holarrhena antidysenterica* (L.), Wall", *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 55 (6), 912-914.
103. Lalla J. K., Hamrapurkar P. D., Parikh M. K. (2002), "Simple and Rapid TLC Method for Identification of *Holarrhena antidysenterica* Wall. Bark and its substituent *Wrightia tinctoria* R. P Bark", *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 3 (15), 226-229.
104. Lee M.S., Kerns E.H. (1999), "LC/MS Application in Drug Development", *Mass Spectrometry Reviews*, 18, 187-279.
105. Leitner W., Jessop P. (2010), *Green Solvent*, Wiley-VCH, Weinheim.
106. Liang Y. Z., Xie P., Chan K. (2004), "Quality Control of Herbal Medicines", *Journal of Chromatography B*, 812, 53-70.
107. Lim Y. H., Kim I. H., Seo J. J. (2007), "In vitro Activity of Kaempferol Isolated from the *Impatiens balsamina* alone and in combination with

Erythromycin or Clindamycin against *Propionibacterium acnes*”, *The Journal of Microbiology*, 5 (45), 473-477.

108. Luo X., Chen B., Liu J., Yao S. (2005), “Simultaneous Analysis of *N*-nornuciferine, *O*-nornuciferine, Nuciferine and Roemerine in Leaves of *Nelumbo Nucifera* Gaertn by High-performance Liquid Chromatography-photodiode Array Detection-Electrospray Mass Spectrometry”, *Analytica Chimica ACTA*, 538, 129-133.
109. Martinez J.L. (2008), *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*, CRC Press, New Jersey, 1-25.
110. Marston A, Hostettmann K. (2009), “Natural Product Analysis over the Last Decades”, *Natural Product Analysis*, 75, 672–682
111. Mitra P., Chang K. S., Yoo D. S. (2011), “Kaempferol Extraction from *Cuscuta reflexa* Using Supercritical Carbon Dioxide and Separation of Kaempferol from the Extracts ”, *International Journal of Food Engineering*, 4 (7), Article 9.
112. Moriyama H., Iizuka T., Nagai M., Murata Y. (2003), “HPLC quantification of kaempferol-3-*O*-gentibioside in *Cassia alata*”, *Fitoterapia*, 74, 425-430.
113. Official catalogue of the European Pharmacopoeia (2011), Pharmaceutical Reference Standards, 27-28.
114. Niu L. et al (2011), “Preparative isolation of alkaloids from *Corydalis bungeana* Turcz. by high-speed counter-current chromatography using stepwise elution”, *Journal of Separation Science*, 9 (34), 987-994.
115. Perkin Elmer (2010), *Differential Scanning Calorimeter (DSC), A Beginner's Guide*, USA.
116. Phutthawong N. et al (2007), “Application of Electrocoagulation to the Isolation of Alkaloids”, *Chiang Mai J. Sci.*, 34 (1), 127-133.

117. Raoa Y. K. et al. (2009), "High performance liquid chromatographic determination of kaempferol glycosides in *Cinnamomum osmophloeum* leaves", *International Journal of Applied Science and Engineering*, 7, 1-9.
118. REMCO-ISO committee on reference materials (2005), 10-11.
119. Rho H. S. et al. (2011), "Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides with Depigmenting and Anti-Inflammatory Properties", *Molecules*, 16, 3338-3344.
120. Sarker S.D., Latif Z., Gray A.I. (2006), *Natural Products Isolation*, Second Edition, Humana Press, New Jersey, 27-46, 77-117, 275-297.
121. Sathishkumar T. (2008), "Optimization of Flavonoids Extraction from the Leaves of *Tabernaemontana heyneana* Wall. using L₁₆ Orthogonal Design", *Nature and Science*, 6 (3), 10-21.
122. Shan-An H., Sheng N. (1997), "Utilization and Conservation of Medicinal Plants in China with Special Reference to *Atractylodes lancea*, Medicinal Plants for Forest Conservation and Healthcare, Non-wood Forest Products ", *GIFT & FAO*, 11, 109-115.
123. Sharma D. K. (2006), "Pharmaceutical Properties of Flavonoids including Flavonolignans Integration of Petrocrops with Drug Development from Plants", *Journal of Scientific and Industrial Research*, 65, 477-484.
124. Shimadzu Corporation (2005), DSC-60, *Differential Scanning Calorimeter Instruction manual*, Kyoto, 3-1.
125. Sloley B. D. et al (2000), "Identification of Kaempferol as a Monoamine Oxidase Inhibitor and Potential Neuroprotectant in Extracts of *Ginkgo Biloba* Leaves", *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4 (52), 454-459.
126. Spangenberg B., Poole C.F., Weins Ch. (2011), *Quantitative Thin-layer Chromatography, A Practical Survey*, Springer, Heidelberg, 1-10, 62-

127. SP-Swedish National Testing and Research Institute (2009), *Characterization of Purity by Differential Scanning Calorimeter Equilibrium Method*, Boras, Sweden, 1-12.
128. Srivastava MM. (2011), *High-Performance Thin-Layer Chromatography (HPTLC)*, Springer, Heidelberg, 3-27.
129. Stalikas C. D. (2007), "Extraction, Separation and Detection Methods for Phenolic Acids and Flavonoids", *J. Sep. Sci.*, 30, 3268-3295.
130. Taylor L. (2005), *The Healing Power of Rainforest Herbs*, Square One Publishers, New York, 5-10.
131. Tokuçoğlu Ö., Ünal M. K., Yildirim Z. (2003), "HPLC-UV and GC-MS Characterization of the Flavonol Aglycols Quercetin, Kaempferol, and Myricetin in Tomato Pastes and Other Tomato-based Products", *ACTA Chromatographica*, 13, 196-206.
132. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology (ICS-UNIDO) (2006), *Compendium of Medicinal and Aromatic Plants, Volume II*, Trieste.
133. United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology (ICS-UNIDO) (2008), *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*, Trieste, 22-26.
134. United States Pharmacopoeia 32 (2009), 31-58, 127-393.
135. Veličković D. et al. (2007), "Extraction of Flavonoids from Garden (*Salvia officinalis* L.) and Glutinous (*Salvia glutinosa* L.) Sage by Ultrasonic and Classical Maceration", *J. Serb. Chem. Soc.*, 72 (1), 73-80.
136. Vidal (1994), 378
137. Waksmundzka H. M., Sherma J., Kowalska T. (2008), *Thin Layer*

Chromatography in Phytochemistry, CRC Press, Florida, 3-15

138. Wagner H., Bladt S. (2001), *Plant Drug Analysis*, Second Edition, Springer, Heidelberg, 1-3, 3-22, 195-210.
139. Williams J.R , Clifford A.A. (2000), *Supercritical Fluid Methods and Protocols*, Humana Press, New Jersey, 1-17.
140. World Health Organization (1998), *Basis Tests for Drugs, Pharmaceutical Substances, Medicinal Plant Materials, and Dosage Forms*, Geneva, 3-9.
141. World Health Organization (1998), *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*, Genève, 29-34.
142. World Health Organization (1998), *Regulatory Situation of Herbal Medicines*, A Worldwide Review, Genève.
143. World Health Organization (1999), *WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations*, Genève.
144. World Health Organization (1999), *WHO Monographs on Selected Plants*, Genève, 2-4.
145. World Health Organization (2000), *General Guidelines for Methodologies on Research and Evaluation of Traditional Medicine*, Genève.
146. World Health Organization (2000), *Legal Status of Traditional Medicine*, Genève.
147. World Health Organization (2000), *Workshop on Development of National Policy on Traditional Medicine*, Western Pacific Region.
148. World Health Organization (2000), *Traditional and Modern Medicines: Harmonizing the two Approaches*, Western Pacific Region, Genève.
149. World Health Organization (2006), *General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference*

substances, Genève, 3-24.

150. World Health Organization (2011), *The World Medicines Situation 2011, Traditional Medicines: Global Situation, Issues and Challenges*, Genève.
151. Xie L.Q., Markides K.E., Lee M. L. (1992), “Biomedical Applications of Analytical Supercritical Fluid Separation Techniques”, *Analytical Biochemistry*, 200, 7-19.
152. Yang L et al. (2007), High-performance liquid chromatography-diode array detection/electrospray ionization mass spectrometry for the simultaneous analysis of cis-, trans- and dihydro-2-glucosyloxycinnamic acid derivatives from *Dendrobium* medicinal plants, *Rapid Commun. Mass Spectrum*. 21, 1833–1840.
153. York P., Kompella U.B., Shekunob B.Y. (2004), *Supercritical Fluid Technology for Drug Product Development*, Marcel Dekker, New York, 27-91
154. Zhao C. et al. (2008), “The alkaloid conessine and analogues as potent histamine H₃ receptor antagonists”, *J. Med. Chem.*, 51 (17), 5423-5430.
155. Zirihi G. N., Grellier P., Guédé-Guina F., Bodo B., Mambu L. (2005), “Isolation, Characterisation and Antiplasmodial Activity of Steroidal Alkaloids from *Funtumia elastica* (Preuss) Stapf”, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 10 (15), 2637-2640.
156. Zu Y., Li C., Fu Y., Zhao Y. (2006), “Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin, kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 714-719.

PHỤ LỤC

DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC

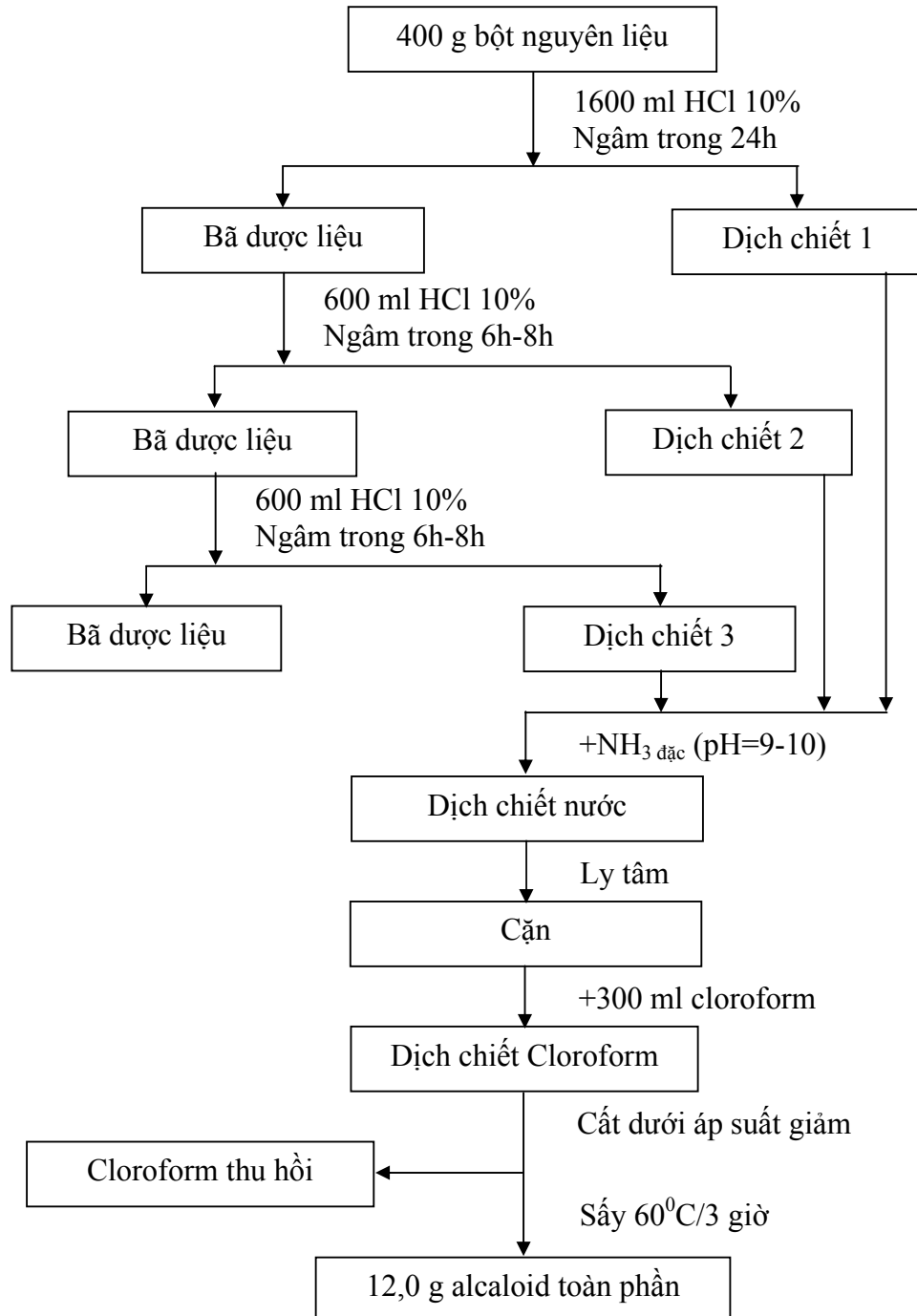
- Phụ lục 1. Quy trình chiết xuất alcaloid toàn phần từ vỏ thân Mộc hoa trắng
- Phụ lục 2. Quy trình phân lập Conessin từ alcaloid toàn phần
- Phụ lục 3. Quy trình tinh chế Conessin
- Phụ lục 4. Quy trình chiết xuất flavonoid toàn phần từ lá Đơn lá đỏ
- Phụ lục 5. Quy trình phân lập Kaempferol từ flavonoid toàn phần
- Phụ lục 6. Quy trình tinh chế Kaempferol
- Phụ lục 7. Quy trình chiết xuất alcaloid toàn phần từ lá Sen
- Phụ lục 8. Quy trình phân lập Nuciferin từ alcaloid toàn phần
- Phụ lục 9. Quy trình tinh chế Nuciferin
- Phụ lục 10. Bộ dữ liệu phổ chuẩn của Conessin
- Phụ lục 11. Bộ dữ liệu phổ chuẩn của Kaempferol
- Phụ lục 12. Bộ dữ liệu phổ chuẩn của Nuciferin
- Phụ lục 13. Tiêu chuẩn chất lượng đánh giá chất chuẩn Conessin
- Phụ lục 14. Tiêu chuẩn chất lượng đánh giá chất chuẩn Kaempferol
- Phụ lục 15. Tiêu chuẩn chất lượng đánh giá chất chuẩn Nuciferin
- Phụ lục 16. Báo cáo kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm và xác định giá trị ấn định chất chuẩn Conessin
- Phụ lục 17. Báo cáo kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm và xác định giá trị ấn định chất chuẩn Kaempferol
- Phụ lục 18. Báo cáo kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm và xác định giá trị ấn định chất chuẩn Nuciferin
- Phụ lục 19. SKĐ xác định tạp chất liên quan và định lượng Conessin ở thời điểm 9 tháng
- Phụ lục 20. SKĐ xác định tạp chất liên quan và định lượng Kaempferol ở thời

điểm 9 tháng

- Phụ lục 21. SKĐ xác định tạp chất liên quan và định lượng Nuciferin ở thời điểm 9 tháng
- Phụ lục 22. SKĐ xác định tạp chất liên quan của Conessin ở thời điểm 15 tháng
- Phụ lục 23. SKĐ xác định tạp chất liên quan của Kaempferol ở thời điểm 15 tháng
- Phụ lục 24. SKĐ xác định tạp chất liên quan của Nuciferin ở thời điểm 15 tháng

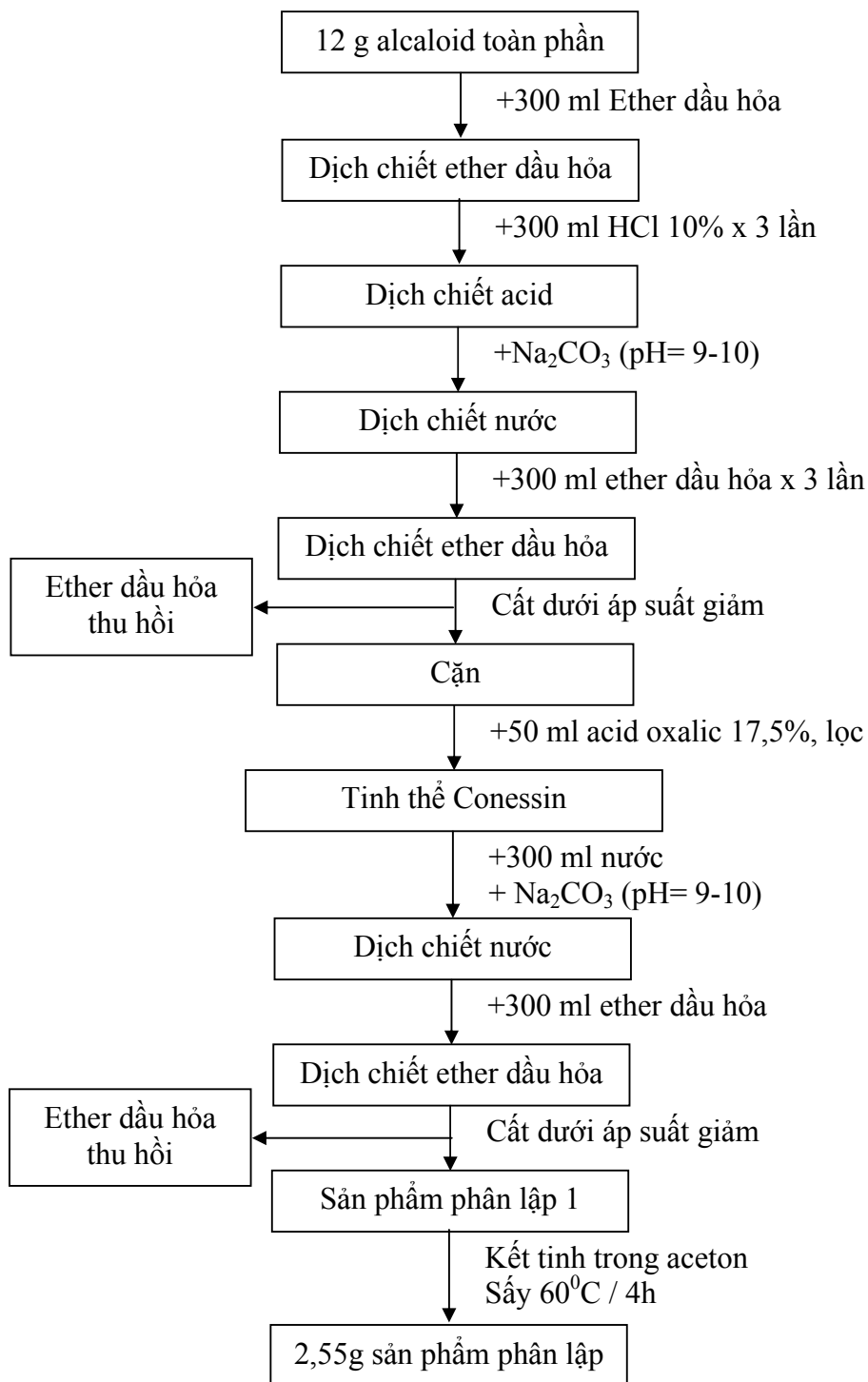
PHỤ LỤC 1.

QUI TRÌNH CHIẾT XUẤT ALCALOID TOÀN PHẦN TỪ VỎ THÂN MỘC HOA TRẮNG



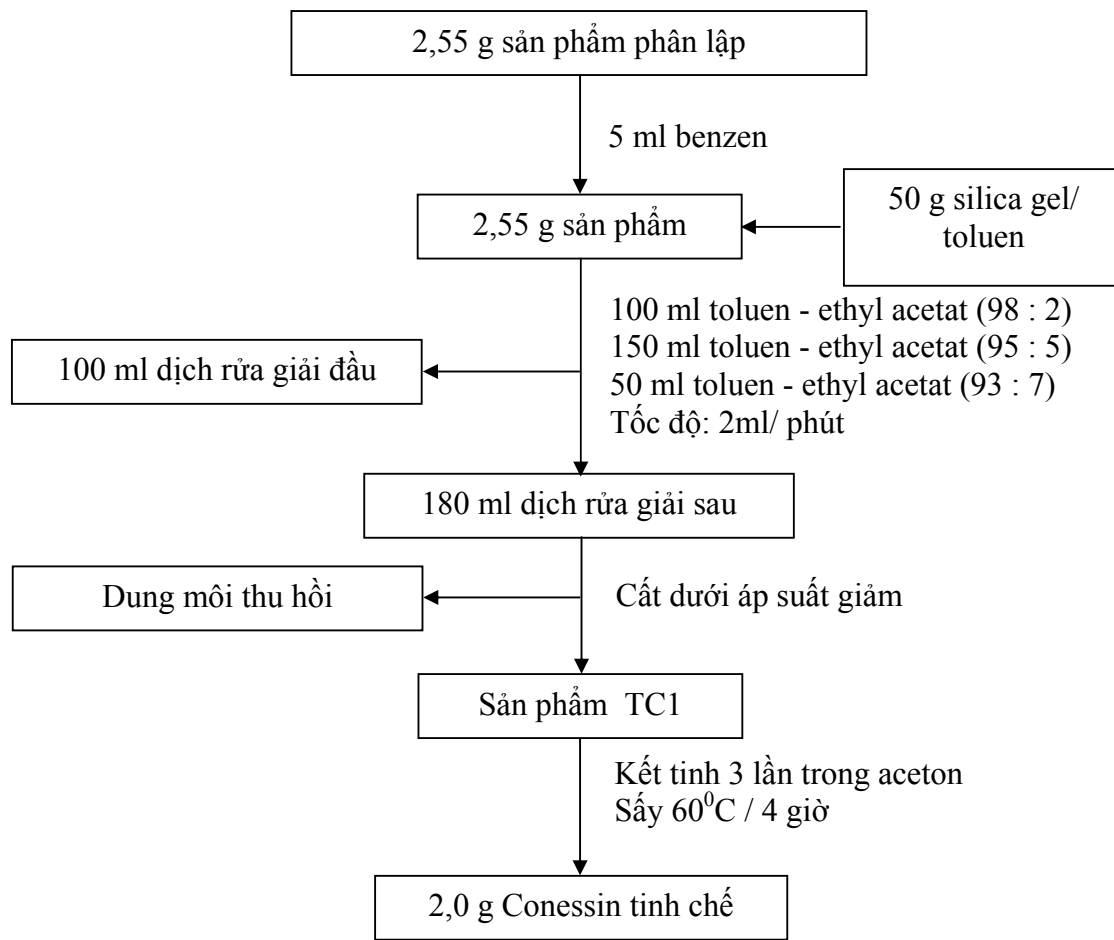
PHỤ LỤC 2

QUI TRÌNH PHÂN LẬP CONESSIN TỪ ALCALOID TOÀN PHẦN



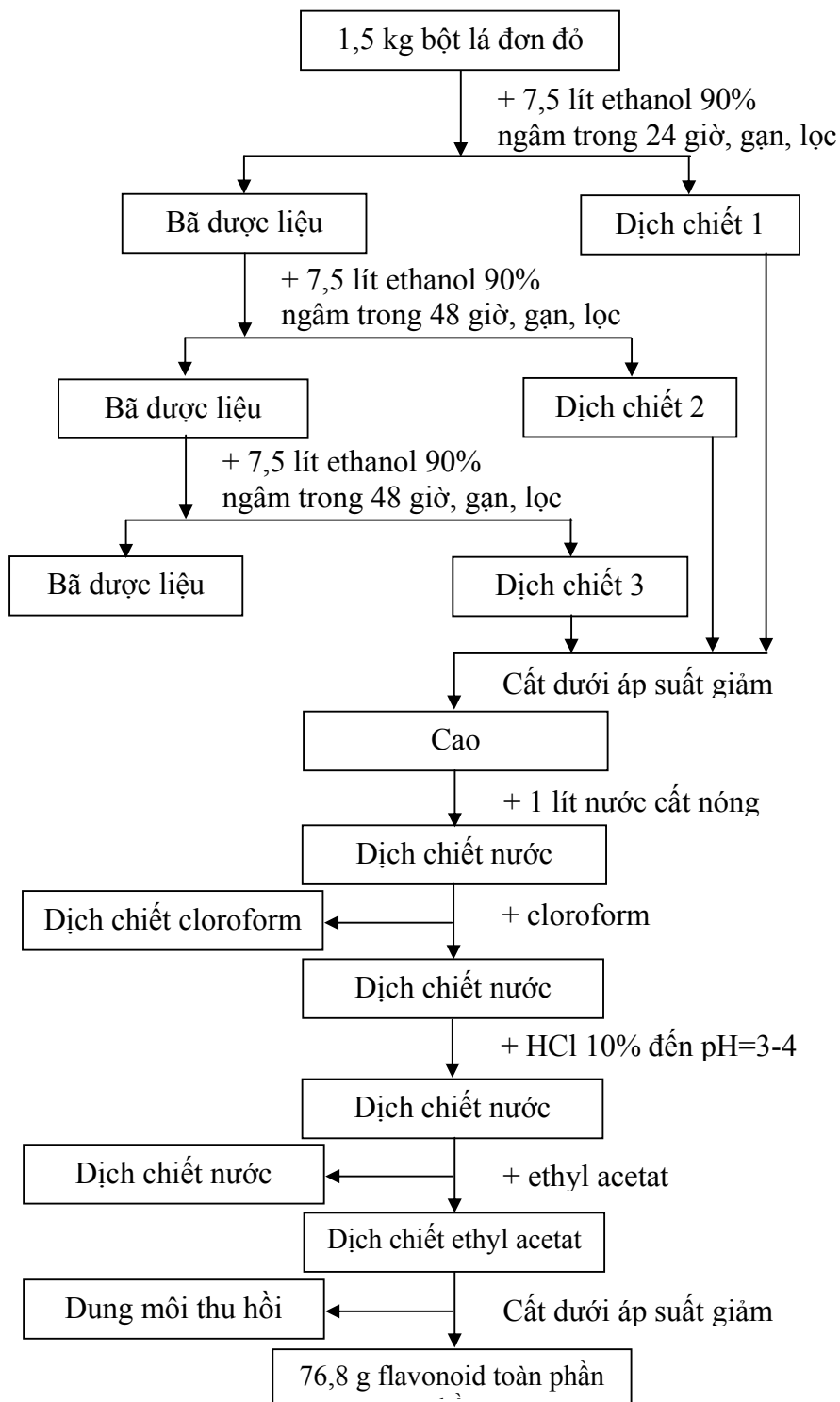
PHỤ LỤC 3

QUI TRÌNH TÍNH CHẾ CONESSIN



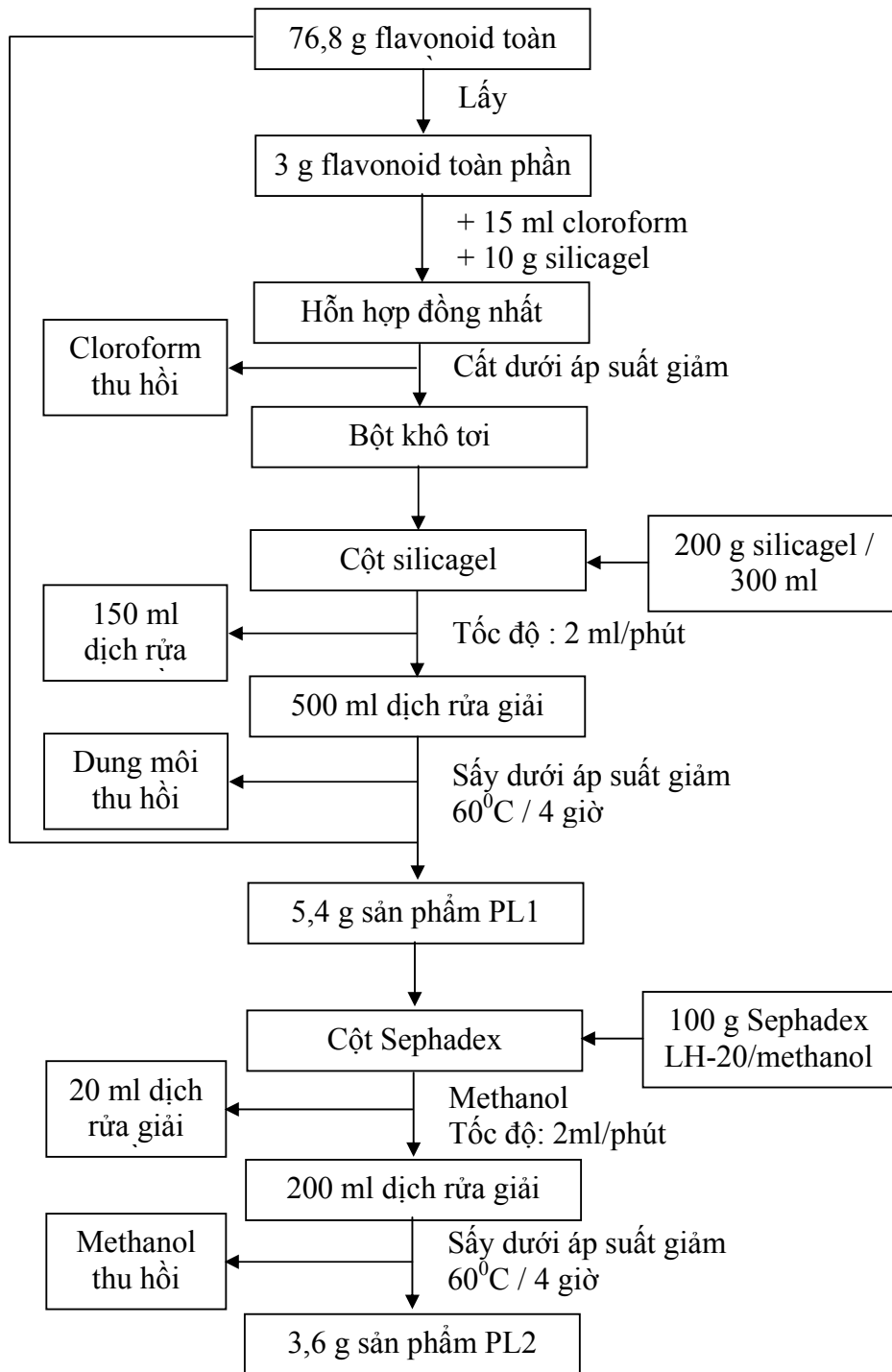
PHỤ LỤC 4

QUI TRÌNH CHIẾT XUẤT FLAVONOID TOÀN PHẦN TỪ ĐƠN LÁ ĐỎ



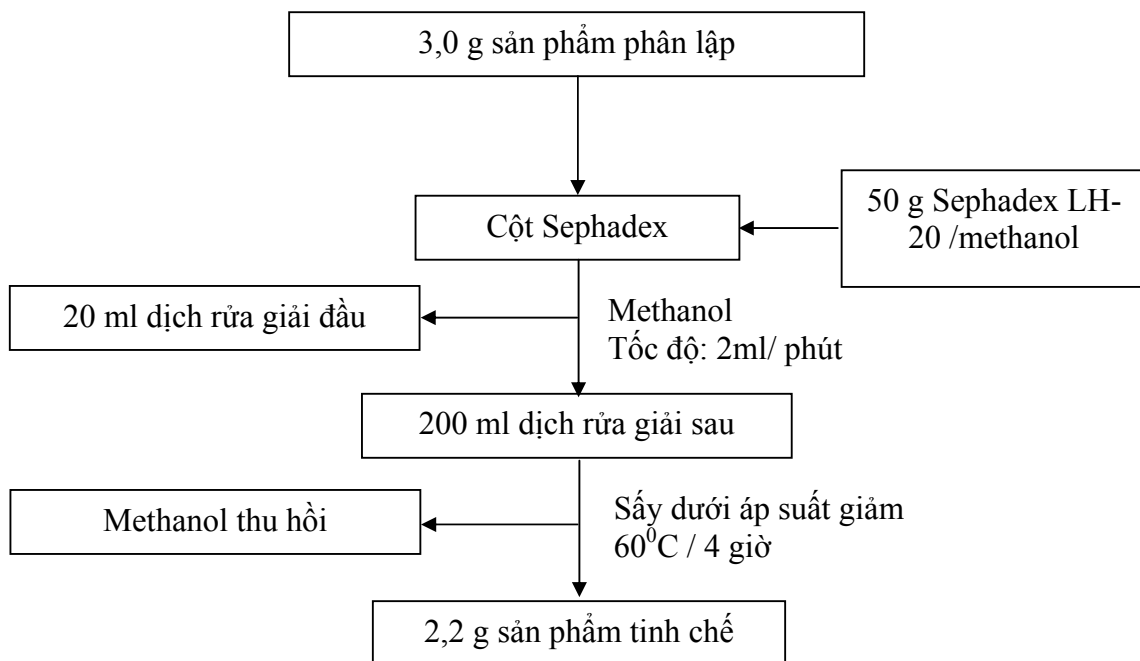
PHỤ LỤC 5

QUI TRÌNH PHÂN LẬP KAEMPFEROL TỪ FLAVONOID TOÀN PHẦN

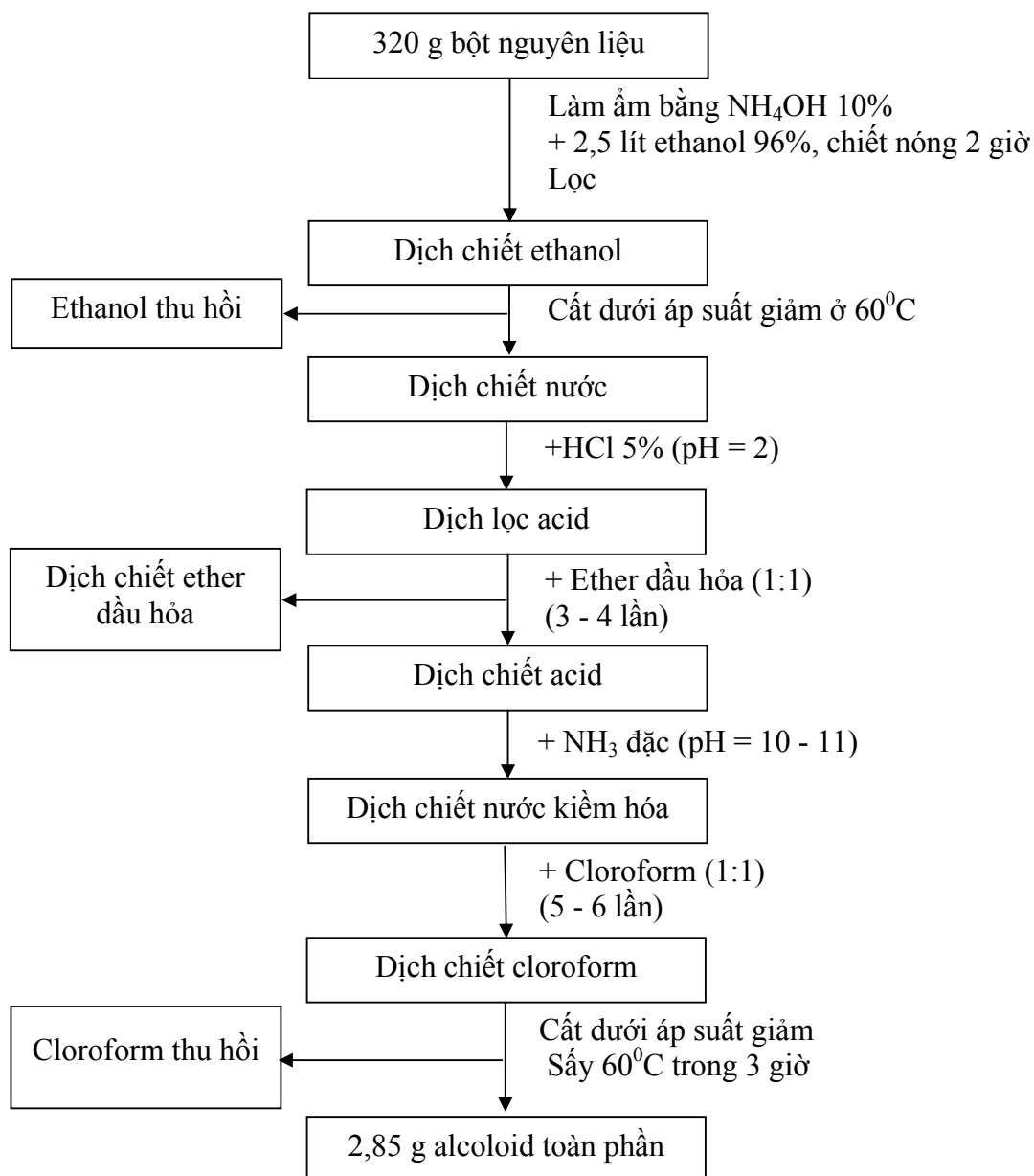


PHỤ LỤC 6

QUI TRÌNH TINH CHẾ KAEMPFEROL

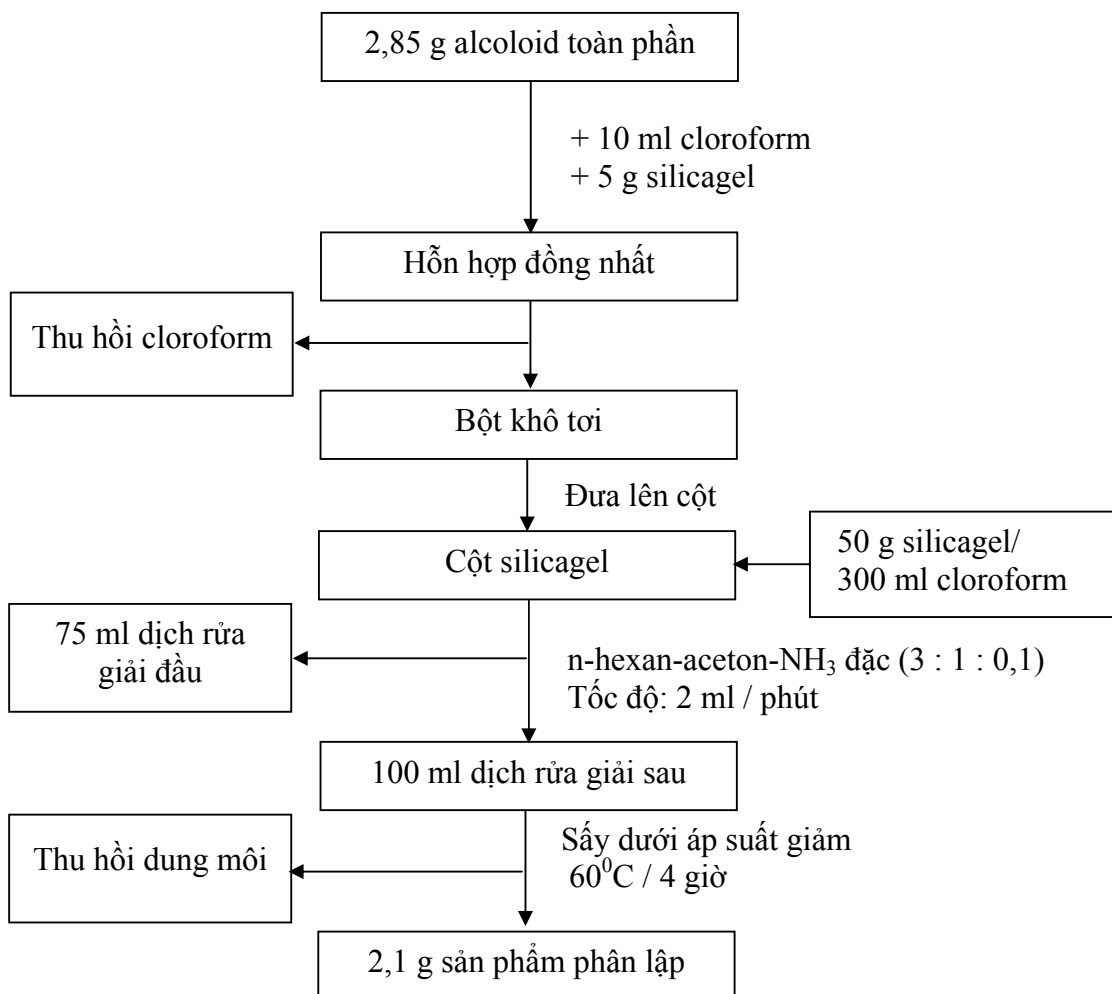


PHỤ LỤC 7
QUI TRÌNH CHIẾT XUẤT ALCALOID
TOÀN PHẦN TỪ LÁ SEN



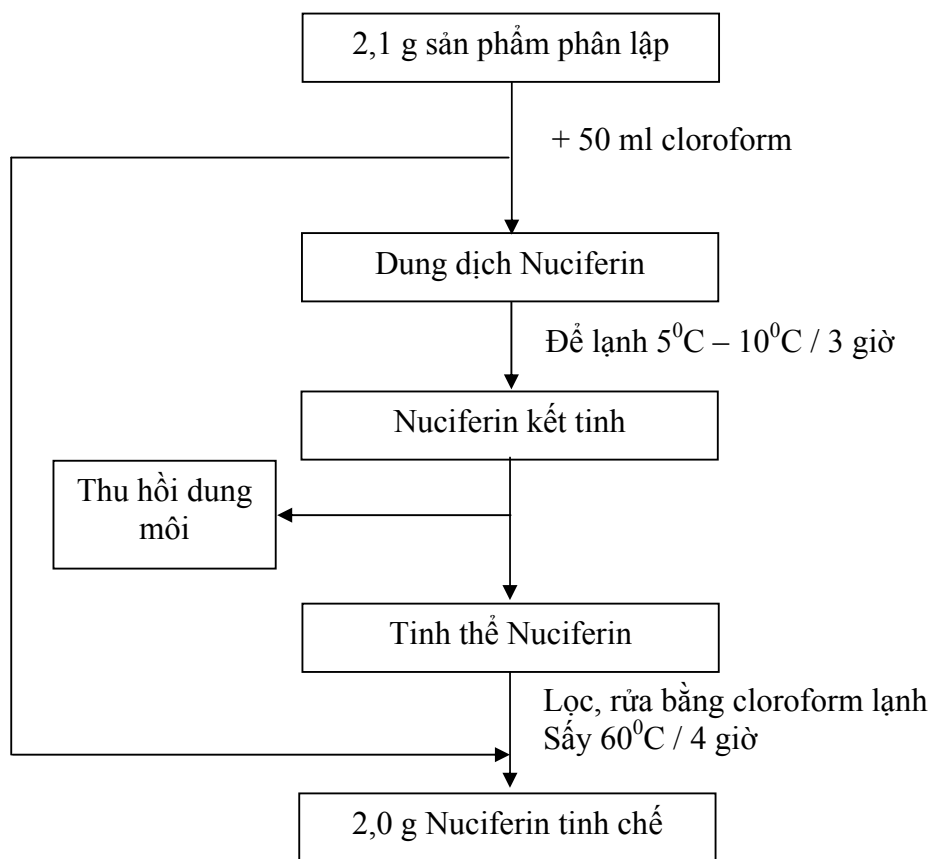
PHỤ LỤC 8

QUI TRÌNH PHÂN LẬP NUCIFERIN TỪ
ALCALOID TOÀN PHẦN



PHỤ LỤC 9

QUI TRÌNH TÍNH CHẾ NUCIFERIN

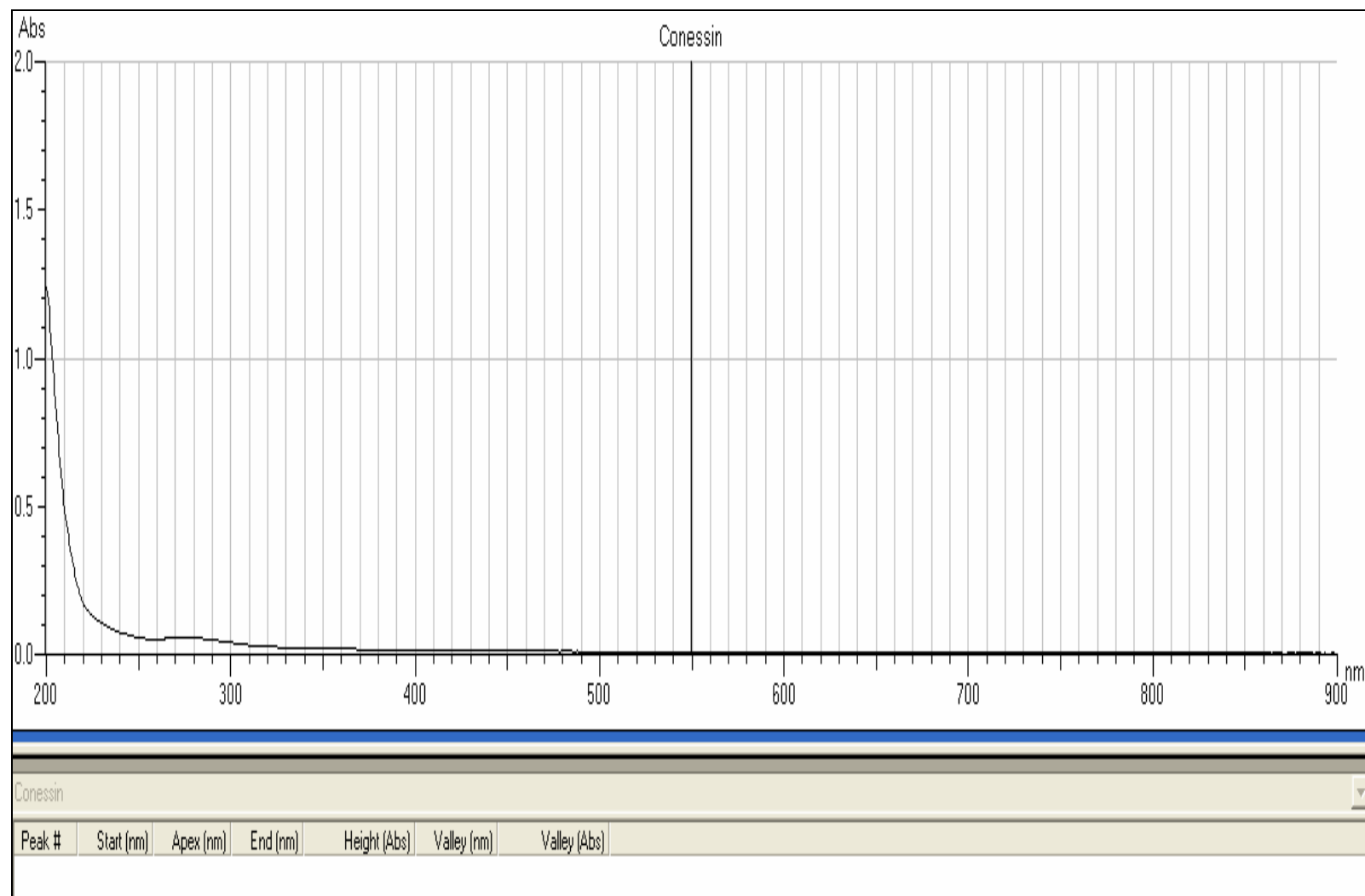


PHỤ LỤC 10

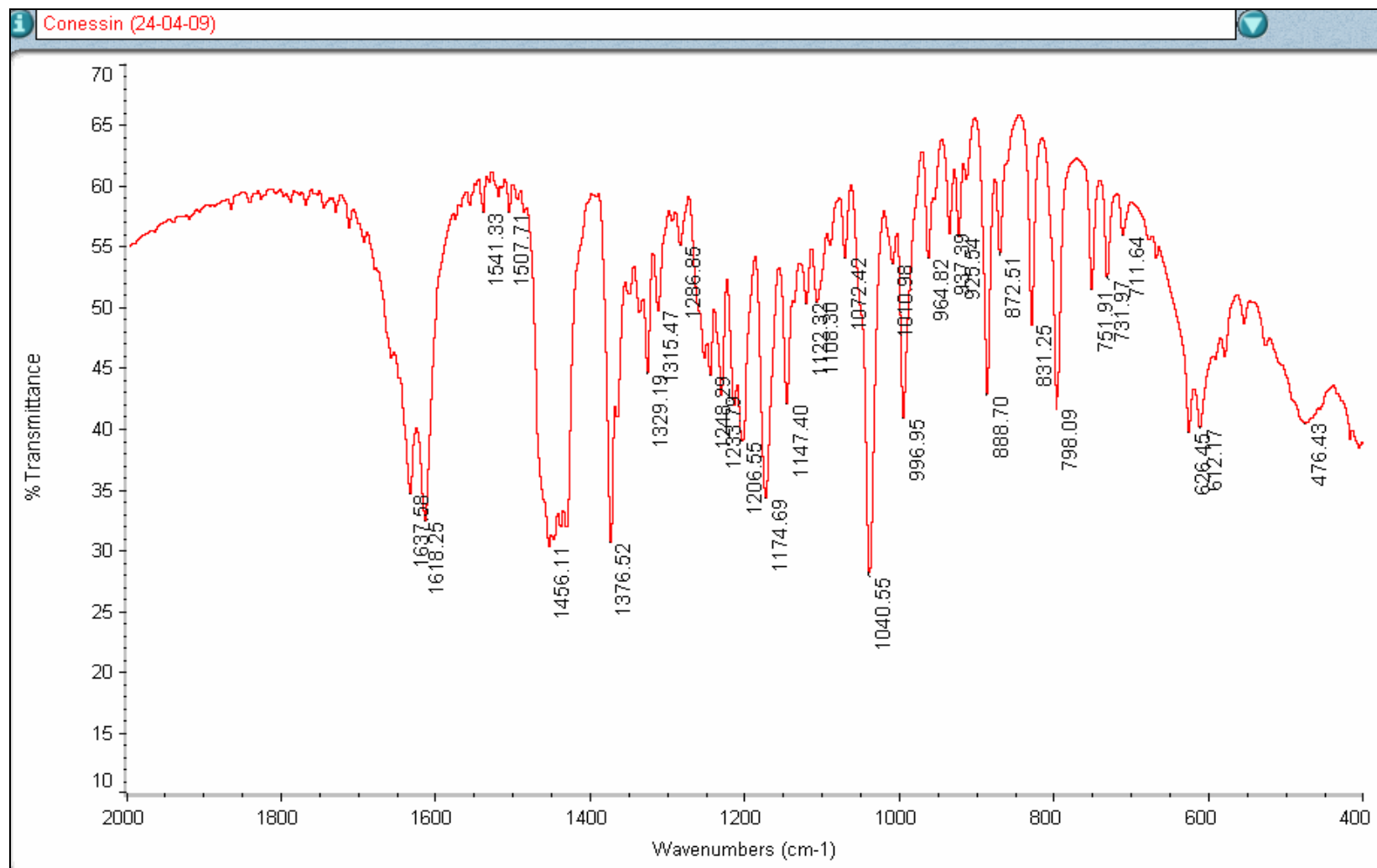
BỘ DỮ LIỆU PHỔ CHUẨN CỦA CONESSIN

- (1) PHỔ UV-VIS**
- (2) PHỔ IR**
- (3) PHỔ MS**
- (4) PHỔ NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR)**

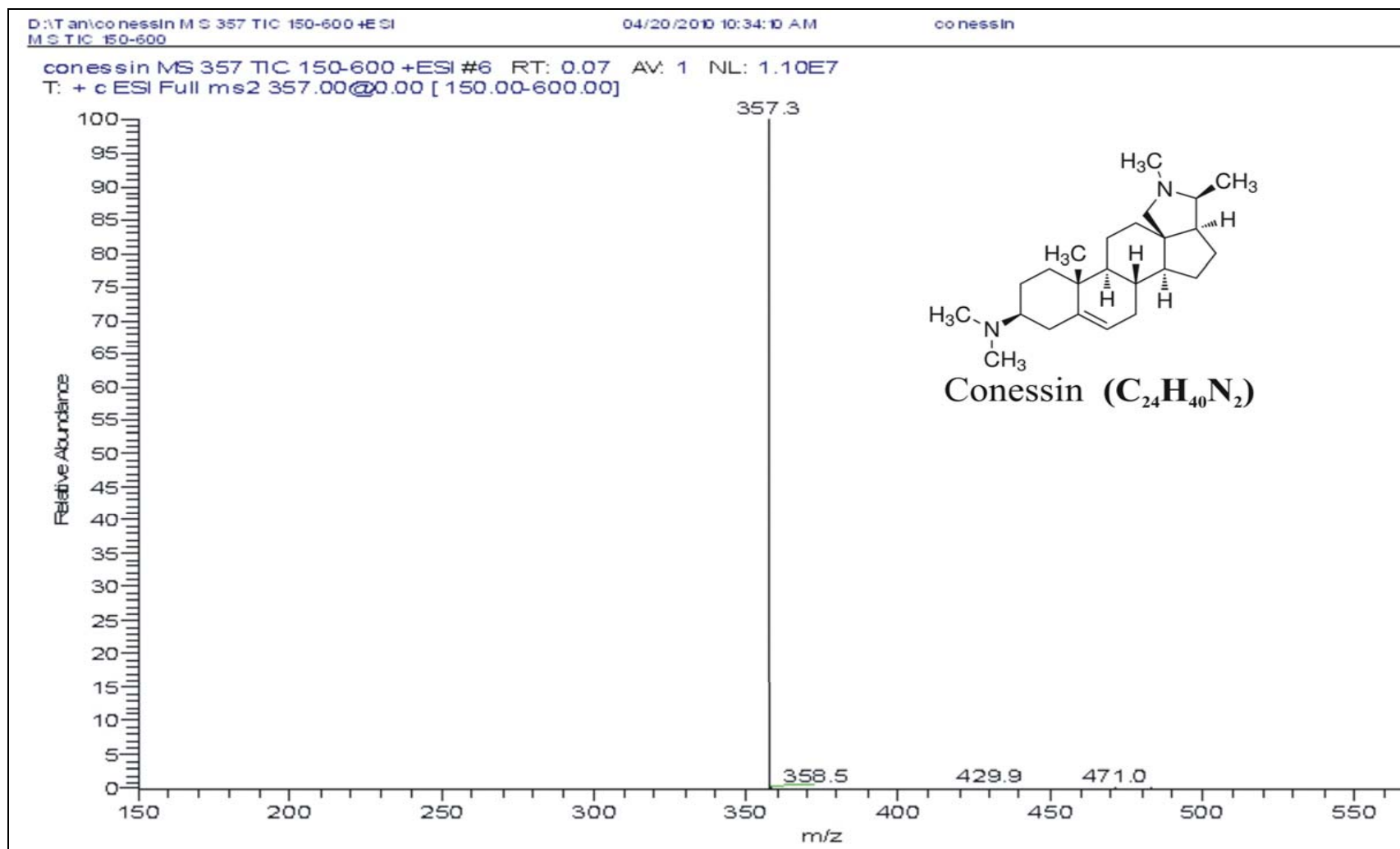
PHỔ UV-VIS CỦA CONESSIN (*Methanol, 0,01 mg/ml*)



PHỔ IR CỦA CONESSIN



PHỔ ESI-MS CỦA CONESSIN



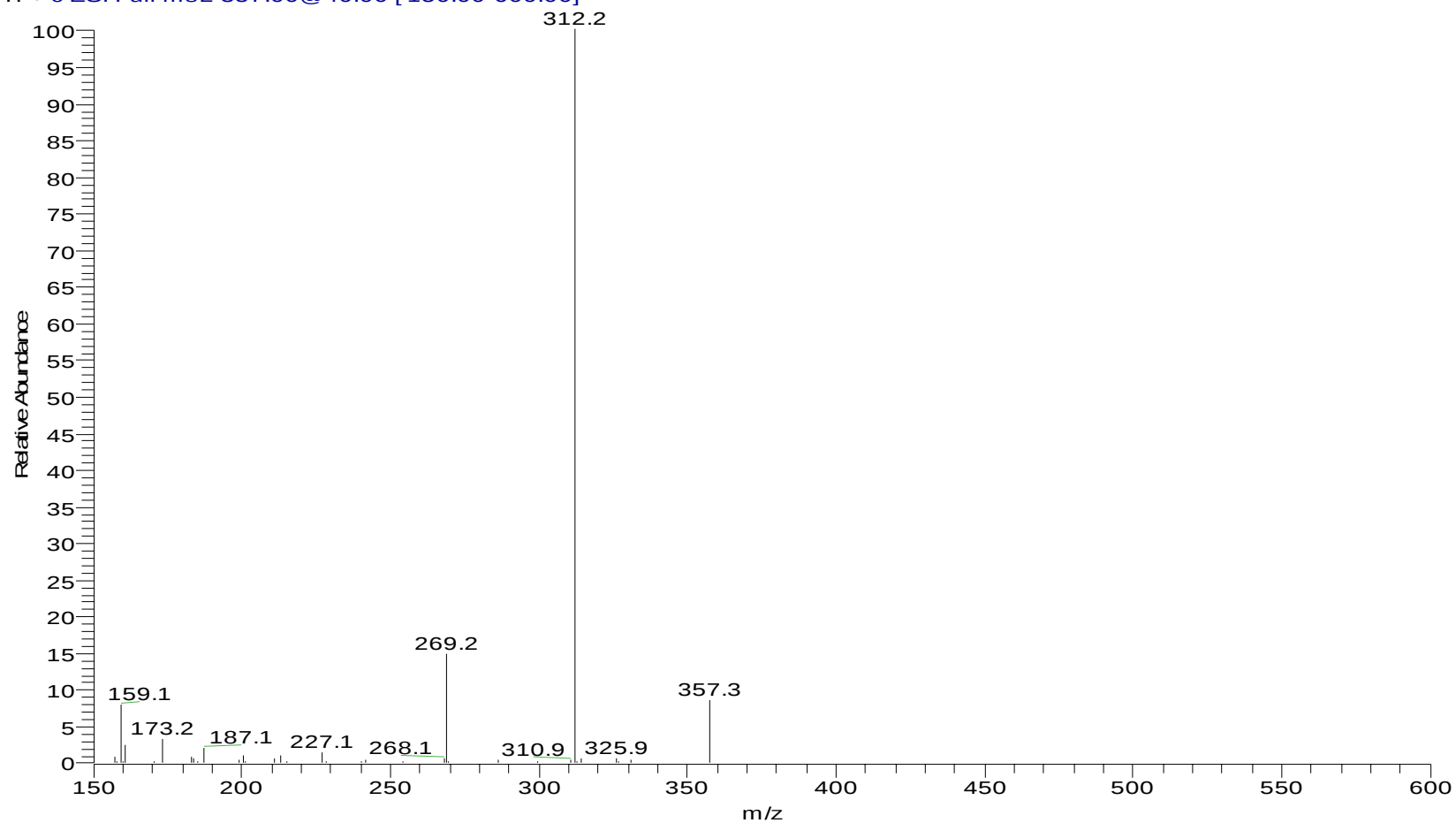
PHỔ ESI-MS CỦA CONESSIN (Tiếp)

D:\Tan\conessin M S2 357 TIC 150-600 +ESI
MS2 TIC 150-600, E=40%

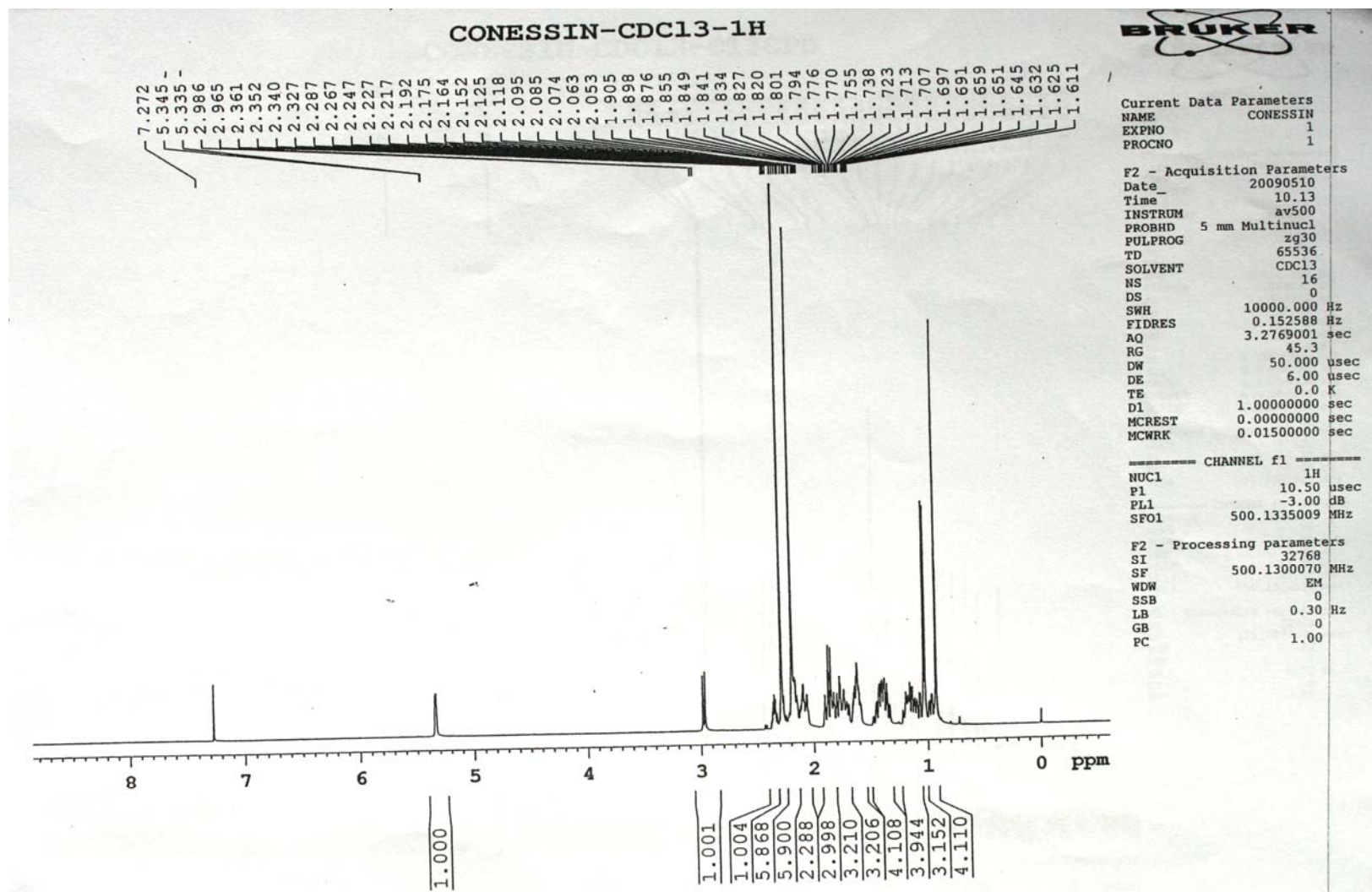
04/20/2010 10:36:17 AM

conessin

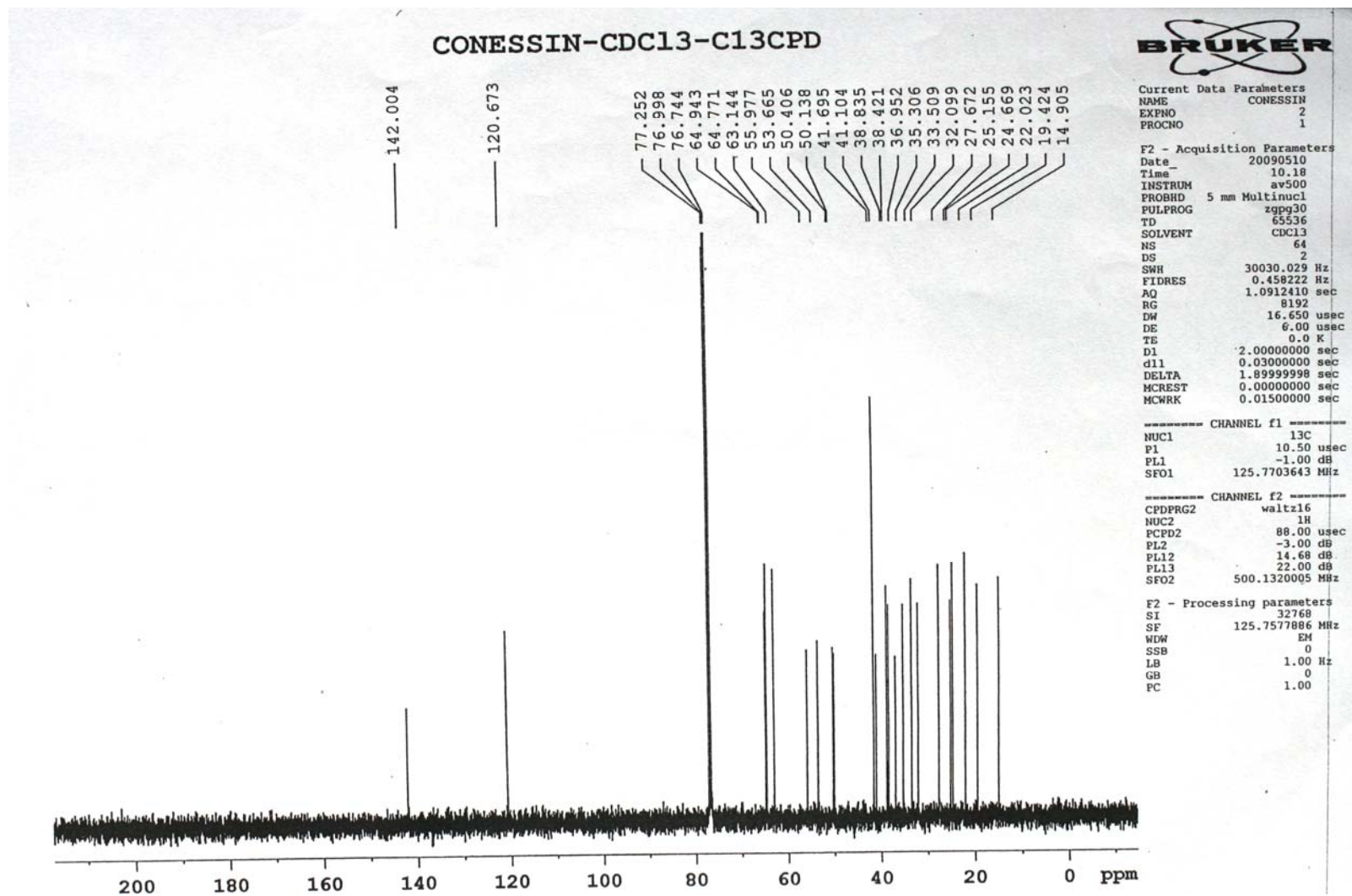
conessin MS2 357 TIC 150-600 +ESI #8 RT: 0.11 AV: 1 NL: 4.25E6
T: + c ESI Full ms2 357.00@40.00 [150.00-600.00]



PHỔ ^1H -NMR CỦA CONESSIN



PHỔ ^{13}C -NMR CỦA CONESSIN



PHỤ LỤC 11

BỘ DỮ LIỆU PHỔ CHUẨN CỦA KAEMPFEROL

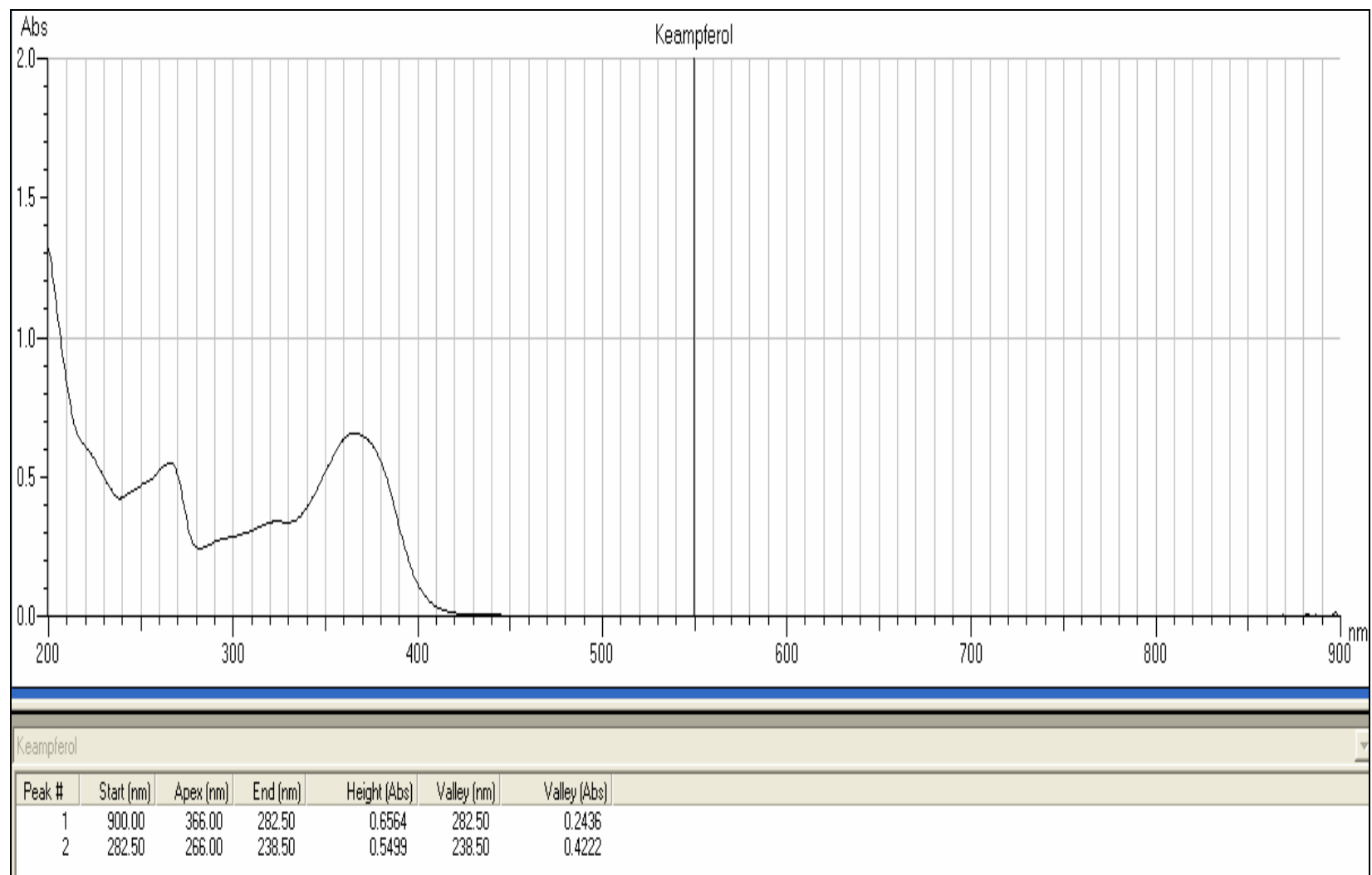
(1) PHỔ UV-VIS

(2) PHỔ IR

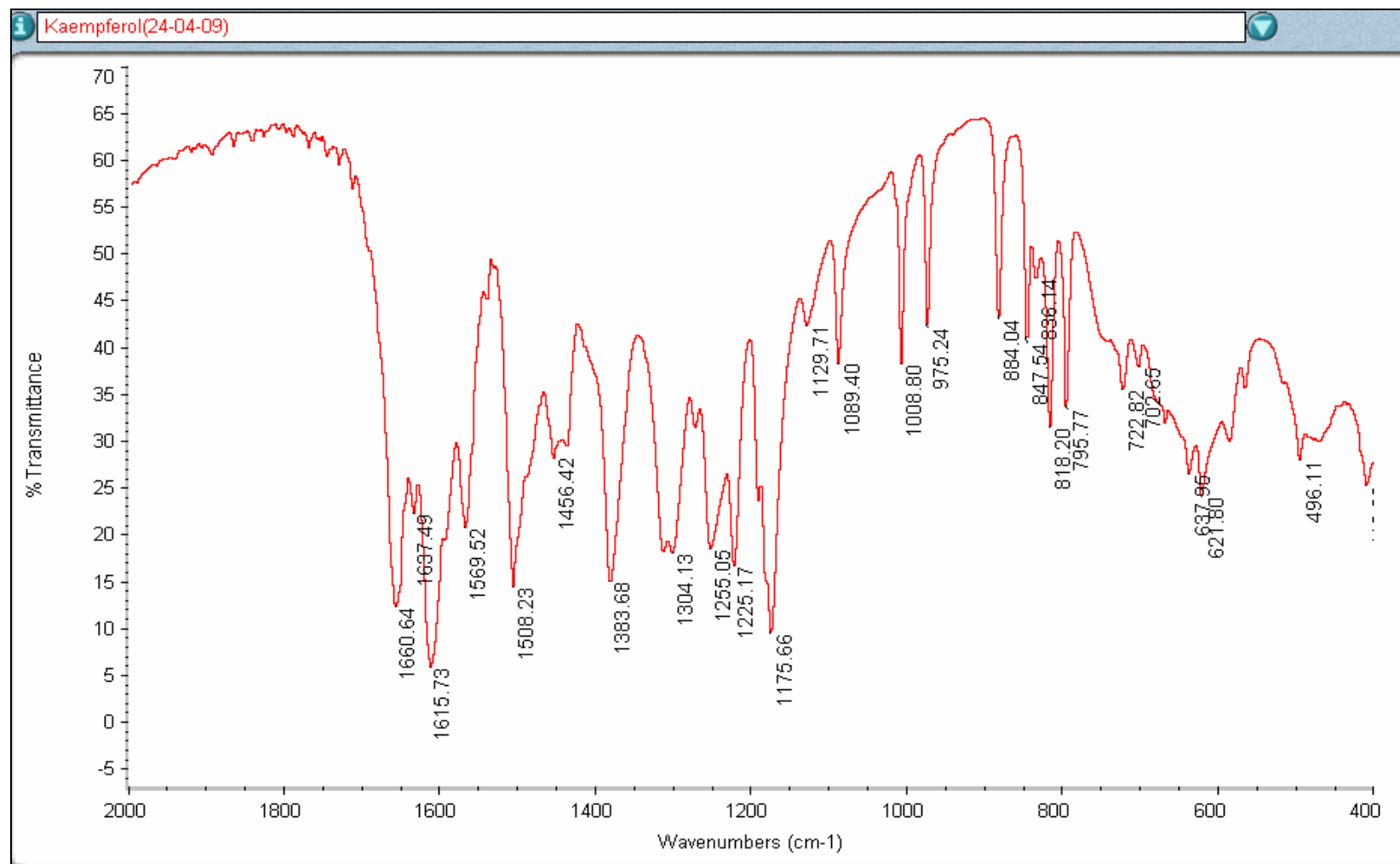
(3) PHỔ MS

(4) PHỔ NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR)

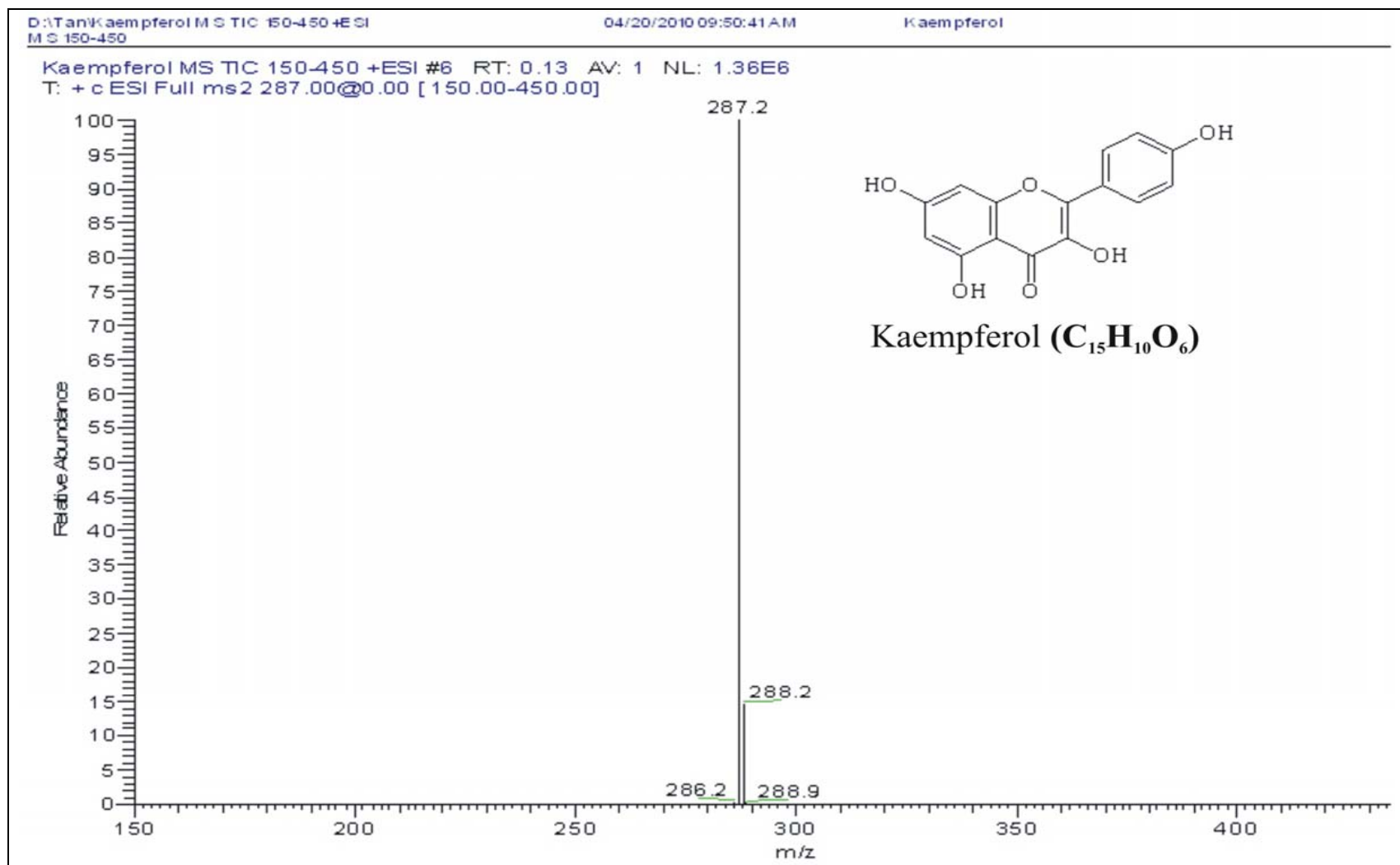
PHỔ UV-VIS CỦA KAEMPFEROL (*Methanol, 0,01 mg/ml*)



PHỔ IR CỦA KAEMPFEROL



PHỔ ESI-MS CỦA KAEMPFEROL



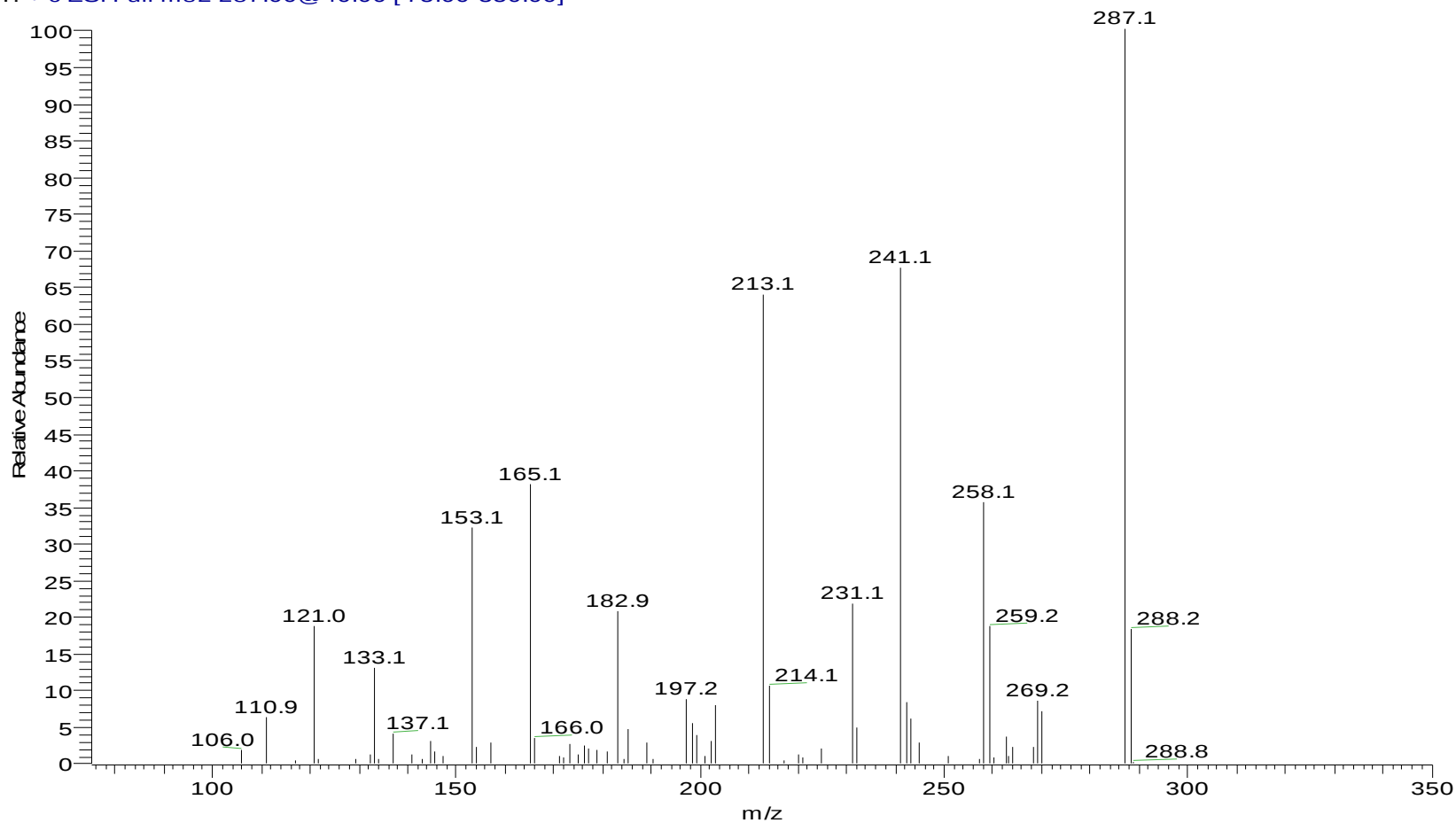
PHỔ ESI-MS CỦA KAEMPFEROL (Tiếp)

Kaempferol MS2 287 TIC 75-350 +ESI
MS2 750-350,E=40%

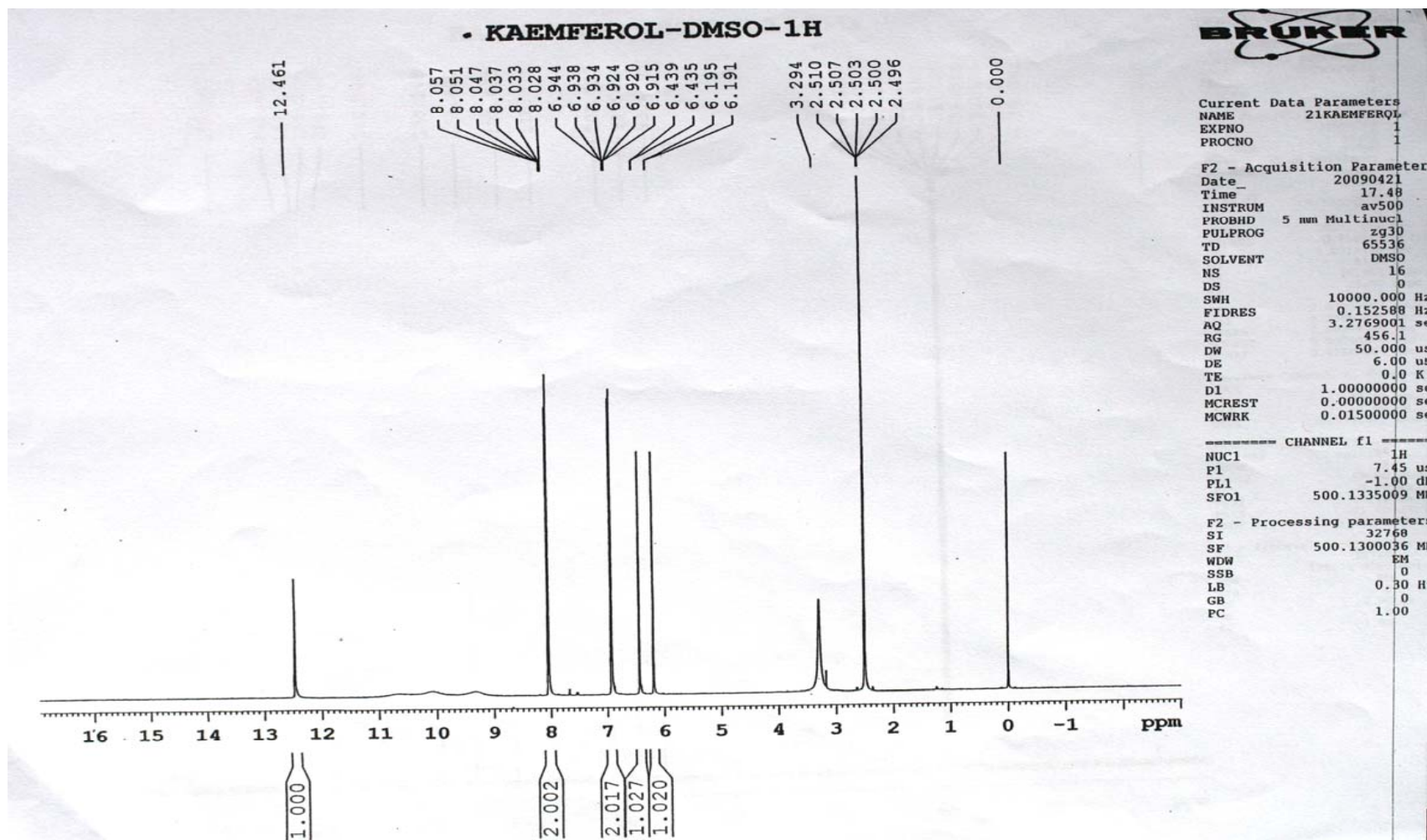
04/20/2010 09:53:14 AM

Kaempferol

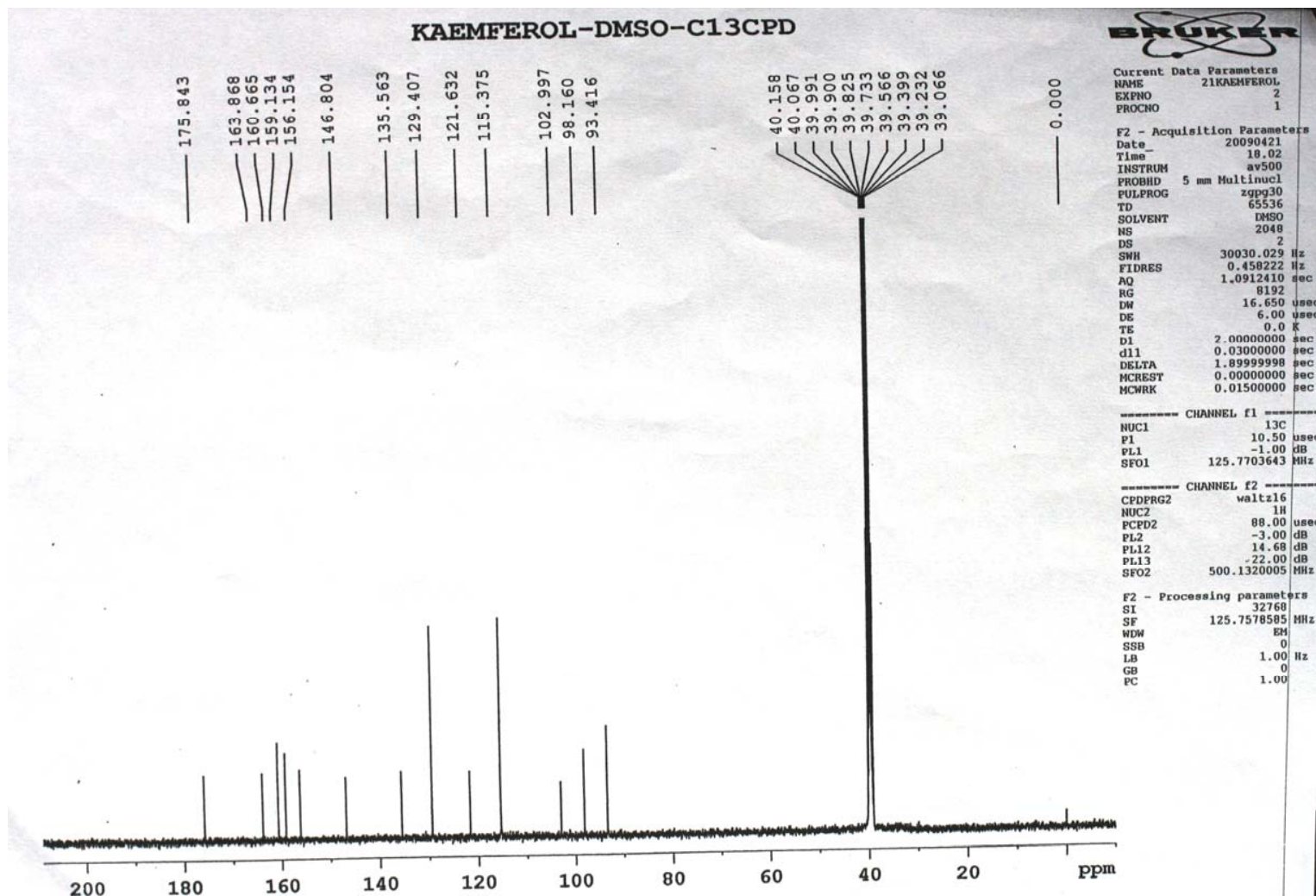
Kaempferol MS2 287 TIC 75-350 +ESI #8 RT: 0.16 AV: 1 NL: 1.71E5
T: + c ESI Full ms2 287.00@40.00 [75.00-350.00]



PHỔ ^1H -NMR CỦA KAEMPFEROL



PHỔ ^{13}C -NMR CỦA KAEMPFEROL



PHỤ LỤC 12

BỘ DỮ LIỆU PHỔ CHUẨN CỦA NUCIFERIN

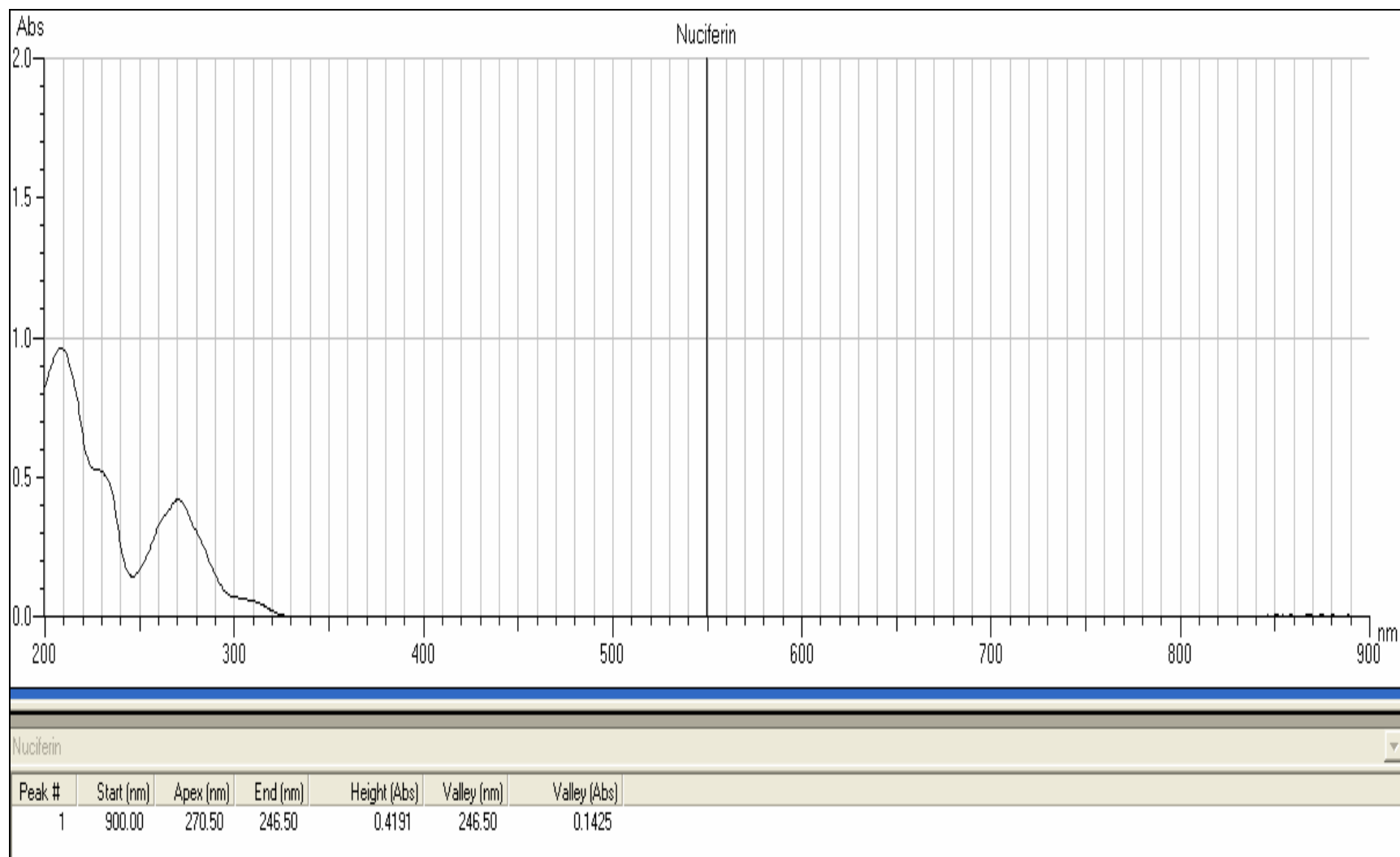
(1) PHỔ UV-VIS

(2) PHỔ IR

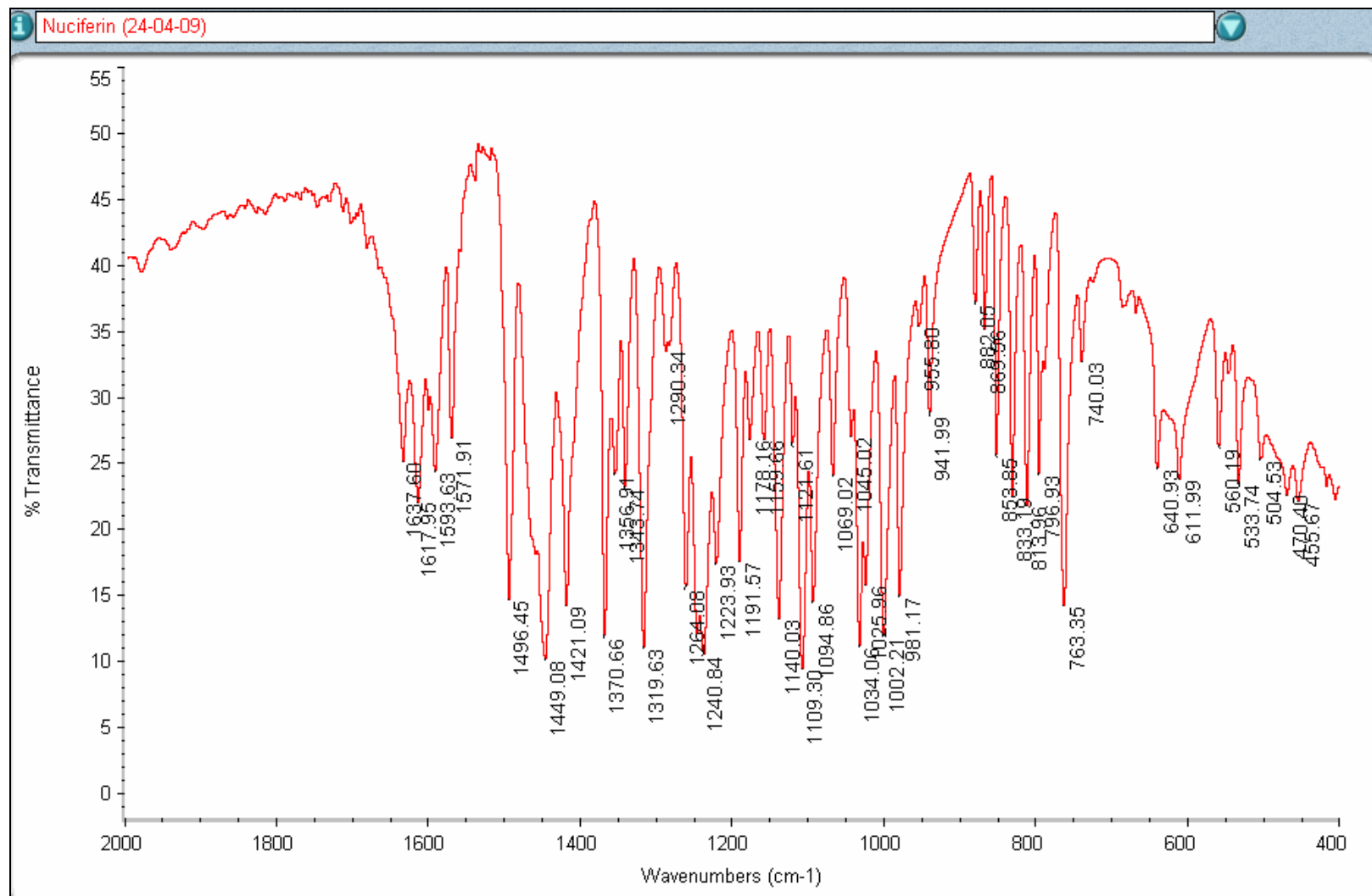
(3) PHỔ MS

(4) PHỔ NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR)

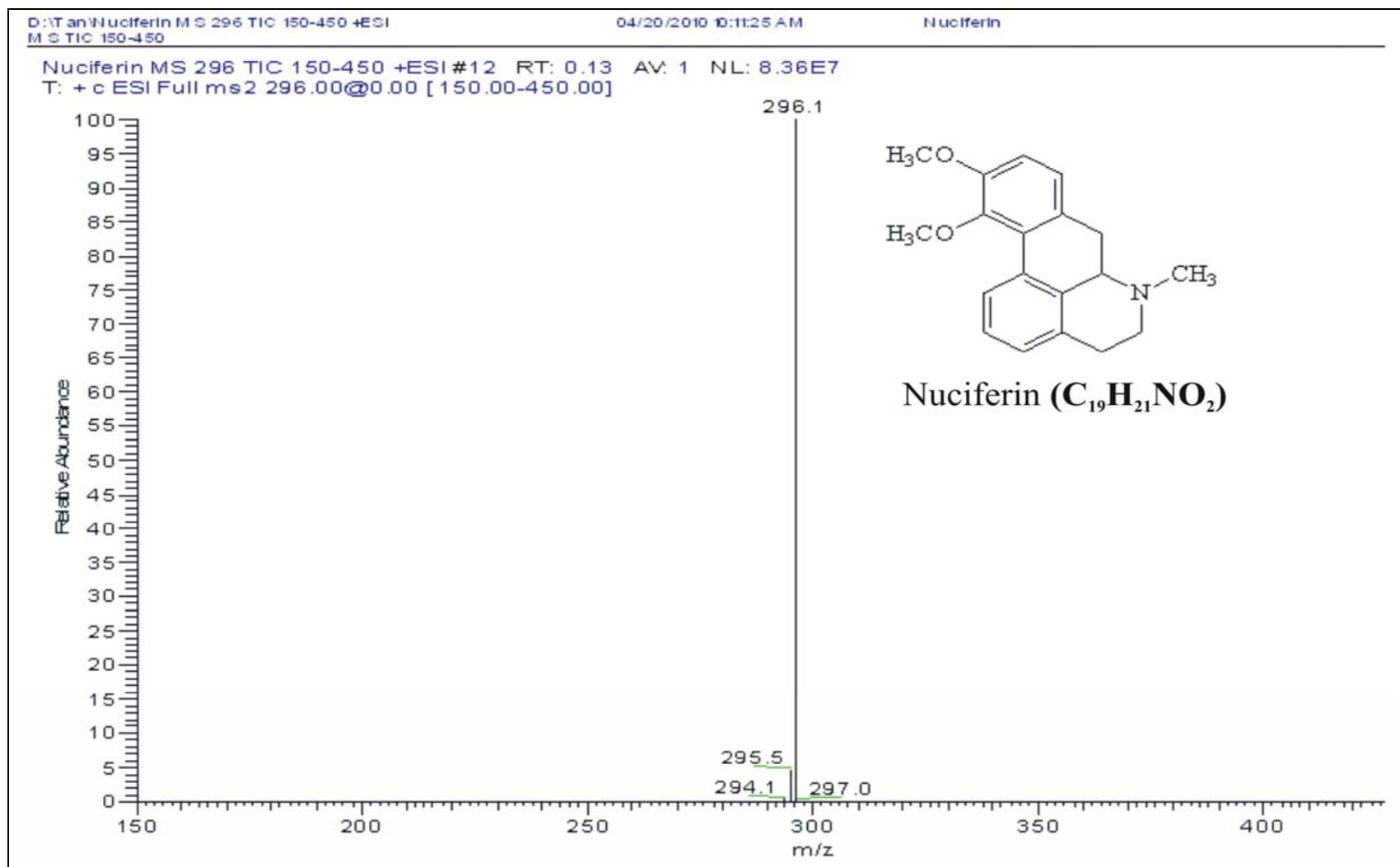
PHỔ UV-VIS CỦA NUCIFERIN (*Methanol, 0,01 mg/ml*)



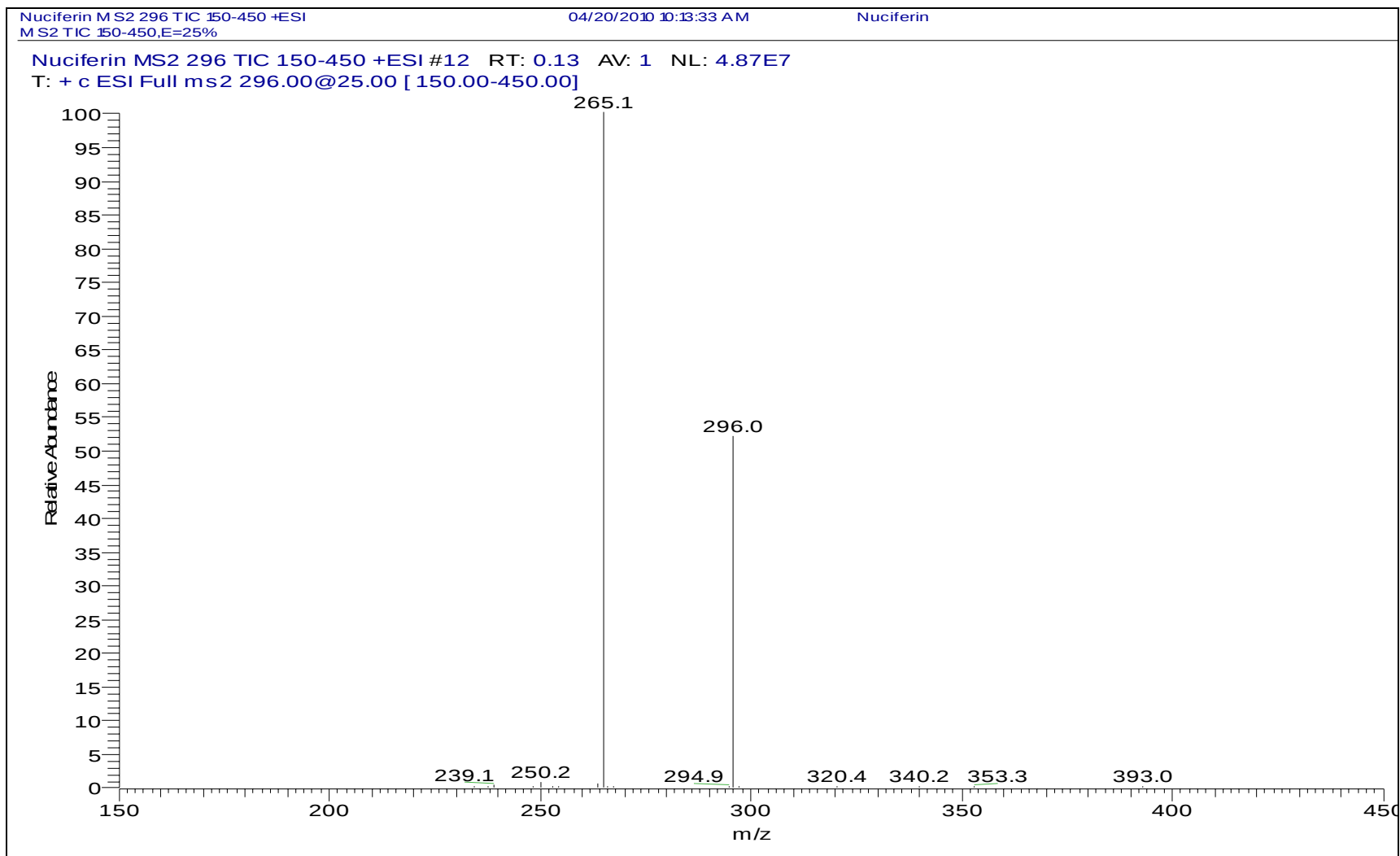
PHỔ IR CỦA NUCIFERIN



PHỔ ESI-MS CỦA NUCIFERIN

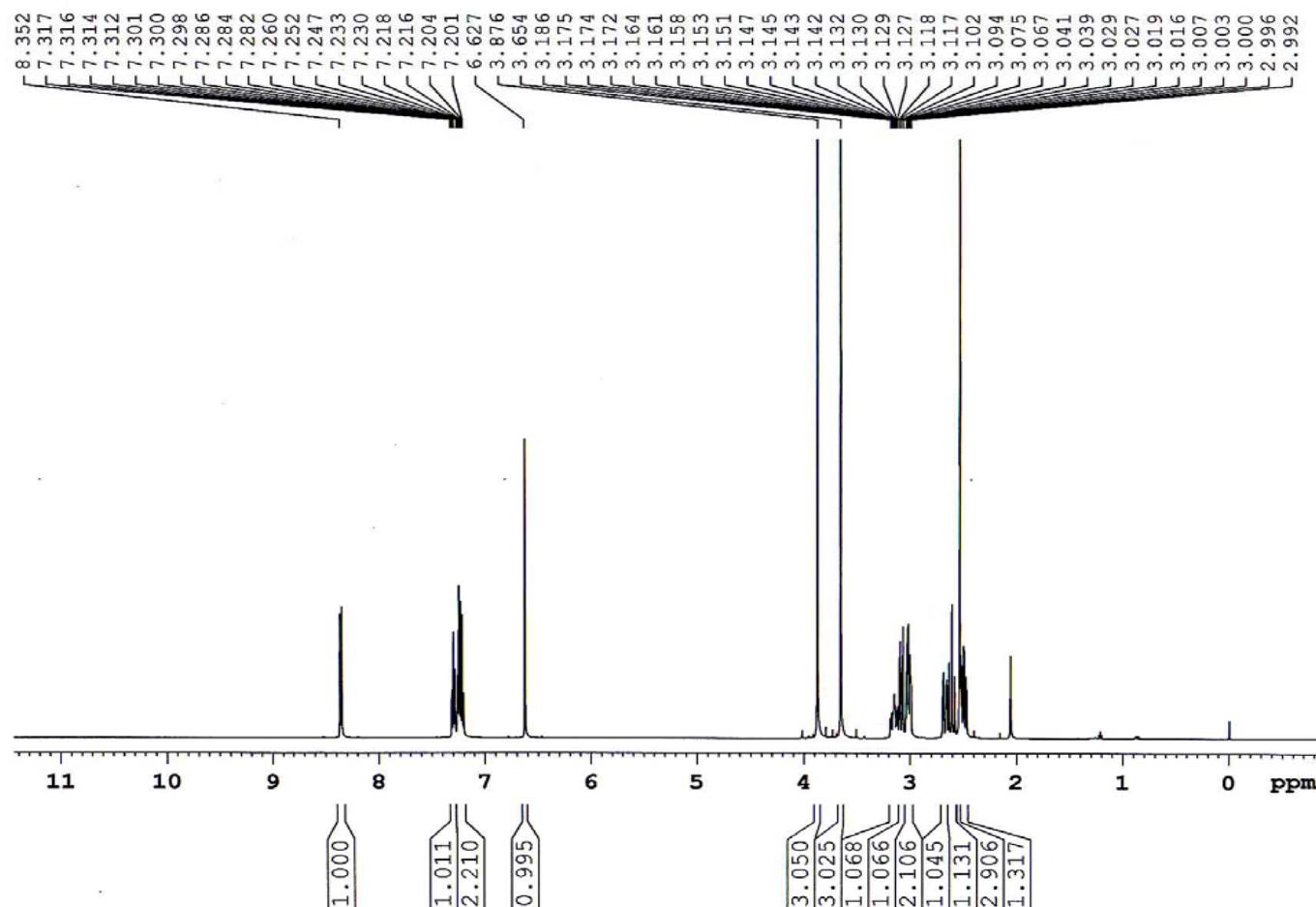


PHỔ ESI-MS CỦA NUCIFERIN (Tiếp)



PHỔ ^1H -NMR CỦA NUCIFERIN

LAN-01-CDC13-1H



Current Data Parameters
NAME 11LAN01
EXPNO 1
PROCNO 1

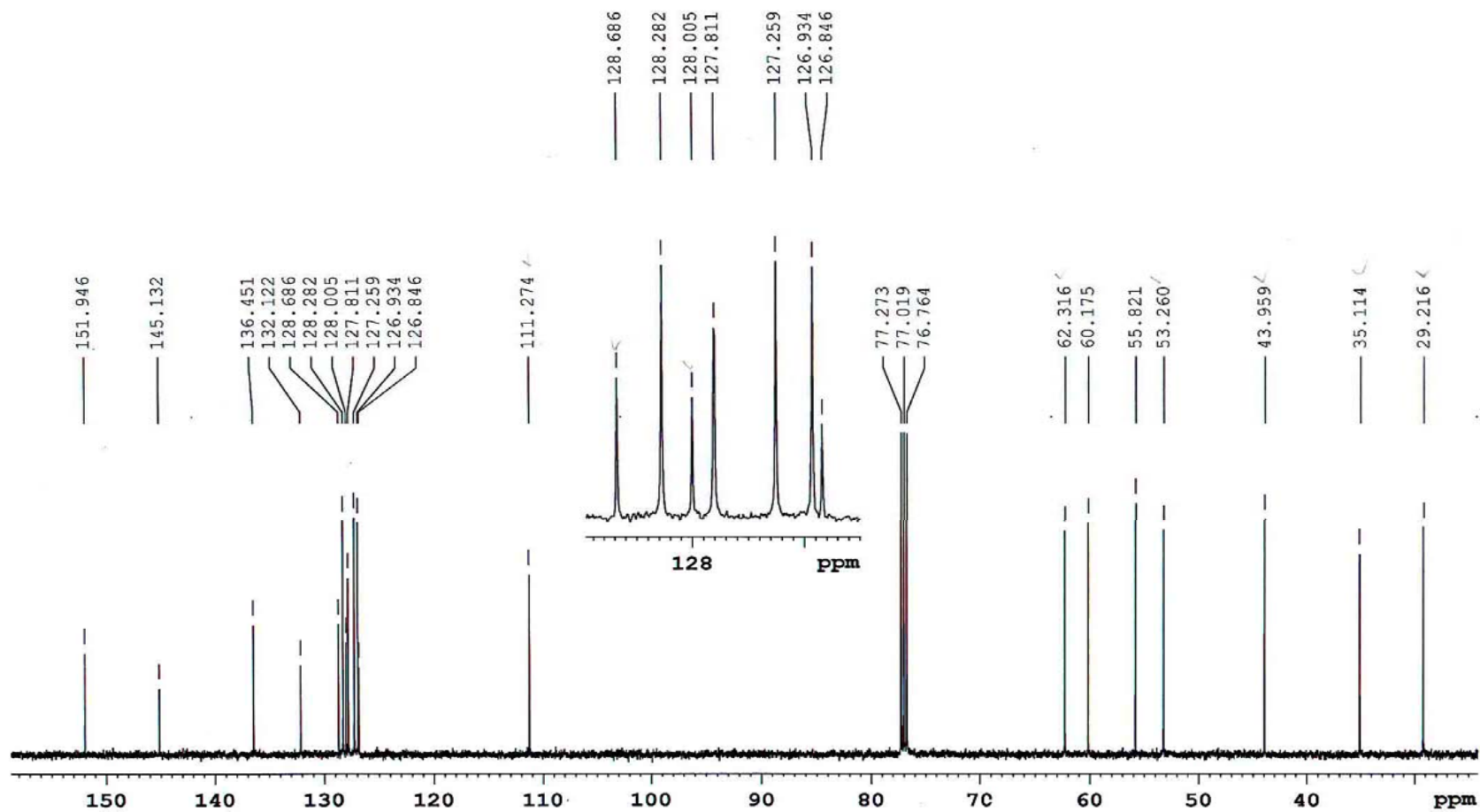
F2 - Acquisition Parameters
Date 20080425
Time 11.52
INSTRUM av500
PROBHD 5 mm Multinucl
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT CDCl3
NS 16
DS 0
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2769001 sec
RG 64
DW 50.000 usec
DE 6.00 usec
TE 300.6 K
D1 1.00000000 sec
MCREST 0.00000000 sec
MCWRK 0.01500000 sec

CHANNEL f1
NUC1 1H
P1 10.50 usec
PL1 -3.00 dB
SFO1 500.1340010 MHz

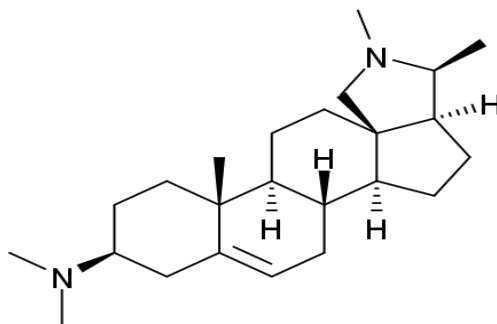
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 500.1300173 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

PHỔ ^{13}C -NMR CỦA NUCIFERIN

LAN-01-CDC13-C13CPD



PHỤ LỤC 13
TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG ĐÁNH GIÁ
CHẤT CHUẨN CONESSIN



Ptl. 356,59

Tên khoa học: N,N-Dimethyl-con-5-enin-3-amine

1. Kiểm tra chất lượng nguyên liệu

1.1. Định tính:

1.1.1. Phổ hồng ngoại (IR): Tiến hành theo phụ lục 4.1 – DĐVN IV

Phổ hồng ngoại của mẫu thử phải trùng với phổ hồng ngoại của mẫu chuẩn.

1.1.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: Phổ carbon (^{13}C) và phổ proton (1H) của mẫu thử phải giống phổ của chất chuẩn Conessin.

1.2. Điểm chảy: Tiến hành theo phụ lục 6.7 – DĐVN IV

Mẫu thử phải có nhiệt độ nóng chảy từ 124 đến 126 °C.

1.3. Xác định độ tinh khiết (DSC):

Tốc độ gia nhiệt: 10 °C/phút từ nhiệt độ phòng đến 110 °C

2,0 °C/phút từ 110 đến 145 °C

1.4. Tạp chất liên quan (HPLC): Tiến hành theo phụ lục 5.3 – DĐVN IV

Yêu cầu: Hàm lượng tạp chất trong nguyên liệu không được vượt quá 3 % tính theo chế phẩm nguyên trạng, loại những pic có % diện tích < 0,05%.

Điều kiện sắc ký tương tự như phân định lượng, thời gian chạy sắc ký gấp đôi thời gian lưu của pic chính trong sắc ký đồ của dung dịch thử.

Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác khoảng 10 mg chế phẩm vào bình định mức 20 ml, hòa tan và pha loãng bằng pha động tới vừa đủ.

Công thức tính:

$$\% \text{ tạp} = \frac{S_{\text{pic tạp}}}{\sum S_{\text{pic}}} \times 100$$

1.5. Định lượng (HPLC): Tiến hành theo phụ lục 5.3 – DĐVN IV

Yêu cầu: Mẫu thử phải có hàm lượng không được nhỏ hơn 95% $\text{C}_{24}\text{H}_{40}\text{N}_2$ tính theo nguyên trạng.

Pha động: Dung dịch đệm pH 3,0 - Methanol (65 : 35), nếu cần có thể điều chỉnh tỉ lệ pha động.

Dung dịch đệm pH 3,0: Thêm 1 ml triethylamin vào 1 lit dung dịch dịch natri dihydrophosphat 0,05 M và chỉnh đến pH 3,0 bằng acid phosphoric đặc.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn Conessin vào bình định mức 20 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng pha động.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 mg chế phẩm vào bình định mức 20 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng pha động.

Điều kiện sắc ký:

Cột thép không gỉ (250 mm x 4,6 mm) được nhồi octadecylsilyl silica gel dùng cho sắc ký (5 μm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 205 nm

Tốc độ dòng: 0,8 ml/phút.

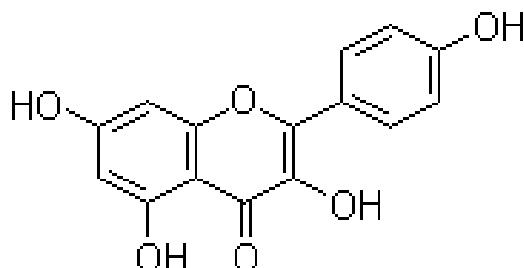
Thể tích tiêm: 20 μl .

Cách tiến hành:

Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ thống: Cân bằng cột bằng hỗn hợp pha động ít nhất 30 phút. Tiêm dung dịch chuẩn, hệ số bất đối của pic Conessin không được lớn hơn 2,0; số đĩa lý thuyết của cột không được nhỏ hơn 3000. Tiêm riêng biệt 6 lần dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic của 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0%.

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Căn cứ vào diện tích pic thu được từ dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng chuẩn, tính hàm lượng % của Conessin $C_{24}H_{40}N_2$ có trong chế phẩm.

PHỤ LỤC 14
TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG ĐÁNH GIÁ CHẤT CHUẨN
KAEMPFEROL



Ptl. 286,23

Tên khoa học: 3,4',5,7-Tetrahydroxyflavon

1. Kiểm tra chất lượng nguyên liệu

1.1. Định tính:

1.1.1. Phổ hồng ngoại (IR): Tiến hành theo phụ lục 4.1 – ĐĐVN IV

1.1.2. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân: Phổ carbon (¹³C) và phổ proton (¹H) của mẫu thử phải giống phổ của chất chuẩn Kaempferol.

1.2. Điểm chảy: Tiến hành theo phụ lục 6.7 – ĐĐVN IV

Mẫu thử phải có nhiệt độ nóng chảy từ 276 đến 280 °C.

1.3. Xác định độ tinh khiết (DSC):

Tốc độ gia nhiệt: 10 °C/phút từ nhiệt độ phòng đến 300 °C

1.4. Tạp chất liên quan (HPLC): Tiến hành theo phụ lục 5.3 – ĐĐVN IV

Yêu cầu: Tổng hàm lượng tạp chất trong nguyên liệu không được vượt quá 3 % tính theo chế phẩm nguyên trạng, loại những pic có % diện tích < 0,05%.

Điều kiện sắc ký tương tự như phân định lượng, thời gian chạy sắc ký gấp đôi thời gian lưu của pic chính trong sắc ký đồ của dung dịch thử.

Chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác khoảng 30 mg nguyên liệu Kaempferol vào bình định mức 100 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng methanol. Hút chính xác

3 ml dung dịch này, pha loãng đến vừa đủ 20,0 ml bằng pha động (dung dịch có nồng độ 0,045 mg/ml).

Công thức tính:

$$\% \text{ tạp} = \frac{S_{\text{tạp}}}{\sum S_{\text{tạp}} + S_{\text{pic chính}}}$$

1.5. Định lượng (HPLC): Tiến hành theo phụ lục 5.3 – ĐĐVN IV

Yêu cầu: Mẫu thử phải có hàm lượng không nhỏ hơn 95% $C_{15}H_{10}O_6$ tính theo nguyên trạng.

Pha động: MeOH - Dung dịch natri dihydrophosphat 0,05M đã chỉnh đến pH 2,0 với H_3PO_4 đặc (55 : 45), nếu cần có thể điều chỉnh tỉ lệ pha động.

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 20 mg chuẩn Kaempferol vào bình định mức 100 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng methanol. Hút chính xác 3 ml dung dịch này, pha loãng đến vừa đủ 20,0 ml bằng pha động (được dung dịch có nồng độ 0,03 mg/ml).

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 mg chế phẩm Kaempferol vào bình định mức 50 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng methanol. Hút chính xác 3 ml dung dịch này, pha loãng đến vừa đủ 20,0 ml bằng pha động (dung dịch có nồng độ 0,03 mg/ml).

Điều kiện sắc ký:

Cột thép không gỉ (250 mm x 4,6 mm) được nhồi octadecylsilyl silica gel dùng cho sắc ký (5 μ m).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 362 nm

Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

Thể tích tiêm: 20 μ l.

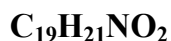
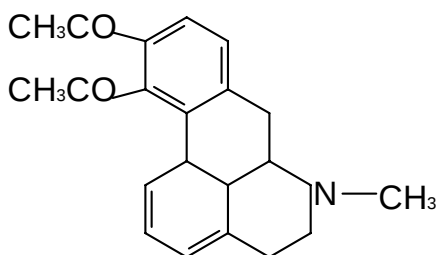
Cách tiến hành:

Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ thống: Cân bằng cột bằng hỗn hợp pha động ít nhất 30 phút. Tiêm dung dịch chuẩn, hệ số bất đối của pic không được lớn hơn 2,0; số đĩa lý thuyết của cột không được nhỏ hơn 6000. Tiêm riêng biệt 6 lần dung

dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic của 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0%.

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Căn cứ vào diện tích pic thu được từ dung dịch thử, dung dịch chuẩn và dựa vào hàm lượng % của Kaempferol $C_{15}H_{10}O_6$ có trong chế phẩm.

PHỤ LỤC 15
TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG ĐÁNH GIÁ
CHẤT CHUẨN NUCIFERIN



Ptl. 295,2

Tên khoa học: 5, 6, 6a, 7 tetrahydro-1, 2- dimethoxy -6- methyl-diabenz[quinoxaline] quinolin.

1. Kiểm tra chất lượng nguyên liệu

1.1. Định tính:

1.1.1. Phổ hồng ngoại (IR): Tiến hành theo phụ lục 4.1 – ĐDVN IV

Phổ hồng ngoại của mẫu thử phải trùng với phổ hồng ngoại của mẫu chuẩn.

1.1.2. HPLC: Điều kiện sắc ký như phân định lượng

Trên sắc ký đồ, thời gian lưu của mẫu thử phải trùng với thời gian lưu của chất chuẩn Nuciferin.

1.1.3. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân:

Phổ carbon (¹³C), phổ proton (¹H) của mẫu thử phải giống phổ của Nuciferin CRS.

1.2. Điểm chảy: Tiến hành theo phụ lục 6.7 – ĐDVN IV

Mẫu thử phải có nhiệt độ nóng chảy từ 164 đến 166 °C.

1.3. Xác định độ tinh khiết (DSC):

Tốc độ gia nhiệt: 10 °C/phút: từ nhiệt độ phòng đến 130 °C

5 °C/phút: từ 130 đến 155 °C

1 °C/phút: từ 155 đến 170 °C

1.4. Tạp chất liên quan (HPLC): Tiến hành theo phụ lục 5.3 – DĐVN IV

Yêu cầu: Tổng hàm lượng tạp chất trong mẫu thử không được vượt quá 3%, loại những pic có % diện tích < 0,05%.

Điều kiện sắc ký tương tự như phân định lượng, thời gian chạy sắc ký gấp đôi thời gian lưu của pic chính trong sắc ký đồ của dung dịch thử.

Chuẩn bị mẫu thử: Hoà tan 25,0 mg mẫu thử trong Acetonitril và pha loãng thành 100,0 ml với cùng dung môi.

Cách tính hàm lượng tạp: Theo tổng diện tích pic

$$C_{tap} \% = \frac{S_{pic}}{\sum S_{pic}} \times 100$$

1.5. Định lượng: Tiến hành theo phụ lục 5.3 – DĐVN IV

Yêu cầu: Hàm lượng của nguyên liệu không nhỏ hơn 95 % của C₁₉H₂₁NO₂ tính theo chế phẩm nguyên trạng.

Pha động: ACN: TEA 0,1% (70 : 30), chỉnh tỉ lệ pha động nếu cần.

Dung dịch chuẩn: Hoà tan 25,0 mg Nuciferin chuẩn trong Acetonitril và pha loãng thành 100,0 ml với cùng dung môi. Hút 5,0 ml pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi.

Dung dịch thử : Hoà tan 25,0 mg mẫu thử trong Acetonitril và pha loãng thành 100,0 ml với cùng dung môi. Hút 5,0 ml pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi.

Điều kiện sắc ký:

Cột thép không gỉ (15 cm x 4,6 mm) được nhồi *octadecylsilyl silica gel* dùng cho sắc ký (5µm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 270 nm.

Tốc độ dòng: 1,0 ml /phút.

Thể tích tiêm: 10 µl.

Cách tiến hành:

Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ thống: Cân bằng cột bằng hỗn hợp pha động ít nhất 30 phút. Tiêm dung dịch chuẩn, hệ số bất đối của pic chính không được lớn hơn 2,0; số đĩa lý thuyết của cột không được nhỏ hơn 2000. Tiêm riêng biệt 6 lần dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic chính sau 6 lần tiêm lặp lại không được lớn hơn 1,0%.

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Căn cứ vào diện tích pic thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn và dựa vào hàm lượng $C_{19}H_{21}NO_2$ Nuciferin chuẩn, tính hàm lượng Nuciferin, $C_{19}H_{21}NO_2$, có trong chế phẩm.

PHỤ LỤC 16

A. BÁO CÁO KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ LIÊN PHÒNG THÍ NGHIỆM CHẤT CHUẨN CONESSIN

SKS: KC 10.16 – 04.02

1. Xác định hàm lượng mẫu thành phẩm (HPLC):

Yêu cầu: Mẫu thử phải có hàm lượng không được nhỏ hơn 95% $C_{24}H_{40}N_2$ tính theo chế phẩm nguyên trạng.

Pha động: Dung dịch đệm pH 3,0 - Methanol (65 : 35), điều chỉnh tỉ lệ pha động nếu cần.

Dung dịch đệm pH 3,0: Thêm 1 ml triethylamin vào 1 lit dung dịch dịch natri dihydrophosphat 0,05 M và chỉnh đến pH 3,0 bằng acid phosphoric đặc.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 mg chế phẩm vào bình định mức 20 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng pha động.

Điều kiện sắc ký:

Cột thép không gỉ (25 cm x 4,6 mm) được nhồi *octadecylsilyl silica gel* dùng cho sắc ký (5 μ m).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 205 nm.

Tốc độ dòng: 0,8 ml /phút.

Thể tích tiêm: 20 μ l.

Cách tiến hành:

Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ thống: Cân bằng cột bằng hỗn hợp pha động ít nhất 30 phút. Tiêm dung dịch chuẩn, hệ số bất đối của pic chính không được lớn hơn 2,0; số đĩa lý thuyết của cột không được nhỏ hơn 3000. Tiêm riêng biệt 6 lần dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic chính sau 6 lần tiêm lặp lại không được lớn hơn 2,0%.

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Căn cứ vào diện tích pic thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn và dựa vào hàm lượng $C_{24}H_{40}N_2$ của Conessin chuẩn, tính hàm lượng Conessin, $C_{24}H_{40}N_2$, có trong chế phẩm.

Bảng 16.1. Các thông số của hệ sắc ký

Các thông số	Yêu cầu	PTN 1	PTN 2
	Thiết bị	Shimadzu LC-20A	Agilent 1100
	Cột sắc ký	C18, Phenomenex 250 x 4,6mm; 5µm	C18, Phenomenex 250 x 4,6mm; 5µm
Pha động	Dung dịch đệm pH 3,0 -Methanol (65 : 35)		
t_r		5,5 phút	5,7 phút
N	≥ 3000	3698	3105
T	$\leq 2,0$	1,61	1,1
RSD _{S dd chuẩn}	$\leq 2,0 \%$	0,26	0,26

Bảng 16.2. Kết quả xác định hàm lượng

Yêu cầu		PTN 1	PTN 2
Hàm lượng không được nhỏ hơn 95 % $C_{24}H_{40}N_2$ tính theo chế phẩm nguyên trạng.	1	97,93	97,97
	2	98,63	97,74
	3	97,41	97,84
	4	97,93	97,81
	5	97,92	97,53
	6	97,91	97,81
	TB	97,96% (nguyên trạng), n = 6, RSD = 0,40%	97,78 % (nguyên trạng) n = 6, RSD = 0,15%

2. Xử lý kết quả theo thống kê:

Tập hợp kết quả các PTN và đánh giá theo ANOVA

Bảng 16.3. Kết quả đánh giá theo ANOVA

TÓM TẮT				
<i>Nhóm</i>	<i>Số KQ</i>	<i>Tổng</i>	<i>Trung bình</i>	<i>Phương sai</i>
PTN 1	6	587,73	97,96	0,151
PTN 2	6	586,70	97,78	0,021

ANOVA					
<i>Nguồn sai số</i>	<i>Tổng số biên phương</i>	<i>Bậc tự do</i>	<i>Bình phương trung bình</i>	F_m	F_{tc}
Giữa các nhóm	0,088	1	0,088	1,025	4,965
Trong từng nhóm	0,863	10	0,086		
Tổng cộng	0,951	11			

Biện luận: $F_m = 1,025 < F_{tc} = 4,965$

3. Kết luận: Kết quả trung bình của 2 phòng thử nghiệm giống nhau, phương pháp phân tích có độ chính xác cao với giá trị độ tái lập và độ lặp lại nhỏ.

B. XÁC ĐỊNH GIÁ TRỊ ẮN ĐỊNH CHẤT CHUẨN CONESSIN

Bảng 16.4. Kết quả xác định giá trị ắn định

	Xếp tăng dần	$ x_i - \overline{x_{(0)}} $	$x^*_{i(1)}$	$(x^*_{i(1)} - \overline{x^*_{(1)}})^2$	$x^*_{i(2)}$	$(x^*_{i(2)} - \overline{x^*_{(2)}})^2$
x*- 1.5s*			97,73		97,37	
x*+ 1.5s*			98,02		98,37	
1	97,41	0,47	97,41	0,2108	97,41	0,2108
2	97,53	0,34	97,53	0,1150	97,53	0,1150
3	97,74	0,14	97,74	0,0167	97,74	0,0167
4	97,81	0,06	97,81	0,0035	97,81	0,0035
5	97,81	0,06	97,81	0,0035	97,81	0,0035
6	97,84	0,03	97,84	0,0009	97,84	0,0009
7	97,91	0,03	97,91	0,0017	97,91	0,0017
8	97,92	0,05	97,92	0,0026	97,92	0,0026
9	97,93	0,06	97,93	0,0037	97,93	0,0037
10	97,93	0,06	97,93	0,0037	97,93	0,0037
11	97,97	0,09	97,97	0,0102	97,97	0,0102
12	98,63	0,75	98,63	0,5789	98,63	0,5789
$\overline{x}$	97,87					
n	12					
s	0,294					
$\overline{x_{(0)}}$	97,88					
$s_{(0)}$	0,096					
$\overline{x^*_{(n)}}$	97,88		97,87		97,87	
$s^*_{(n)}$	0,096		0,333		0,333	

Nhận xét: Giá trị s^* không thay đổi sau 2 lần tính, giá trị ắn định được chọn là 97,87% với độ lệch chuẩn là 0,333.

Tính giá trị Z:

Bảng 16.5. Tập hợp kết quả của hai PTN và tính giá trị Z

TT	X_i (%) (nguyên trạng)	Z_1 $x^* = 97,87$ $s^* = 0,333$
1	97,41	-1,38
2	97,53	-1,02
3	97,74	-0,39
4	97,81	-0,18
5	97,81	-0,18
6	97,84	-0,09
7	97,91	0,12
8	97,92	0,15
9	97,93	0,18
10	97,93	0,18
11	97,97	0,30
12	98,63	2,28
TB	97,80% (n = 11; RSD = 0,18%)	

Nhận xét: Loại 1 giá trị $|Z| > 2$. Các giá trị $|Z|$ còn lại đều < 2 .

Chất chuẩn Conessin SKS: KC.10.16 - 04.02 có hàm lượng 97,80% tính theo nguyên trạng, độ không đảm bảo đo mở rộng $U = \pm 0,11\%$ với hệ số phủ $k = 2$, ở mức tin cậy 95%.

PHỤ LỤC 17

A. BÁO CÁO KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ LIÊN PHÒNG THÍ NGHIỆM CHẤT CHUẨN KAEMPFEROL

SKS: KC 10.16 – 04.04

1. xác định hàm lượng mẫu thành phẩm (HPLC):

Yêu cầu: Mẫu thử phải có hàm lượng không được nhỏ hơn 95% tính theo chế phẩm nguyên trạng.

Tiến hành song song với chuẩn Kaempferol CRS (Trung Quốc), SKS:110861-200808 có hàm lượng 95,9% (nguyên trạng).

Pha động: MeOH - Dung dịch natri dihydrophosphat 0,05M đã chỉnh đến pH 2,0 với H₃PO₄ đặc (55 : 45).

Dung dịch chuẩn: Cân chính xác khoảng 10 mg chuẩn Kaempferol vào bình định mức 50 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng methanol. Hút chính xác 3 ml dung dịch này, pha loãng đến vừa đủ 20,0 ml bằng pha động.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 mg nguyên liệu Kaempferol vào bình định mức 50 ml, hòa tan và pha loãng vừa đủ bằng methanol. Hút chính xác 3 ml dung dịch này, pha loãng đến vừa đủ 20,0 ml bằng pha động.

Điều kiện sắc ký:

Cột thép không gỉ (250 mm x 4,6 mm) được nhồi *octadecylsilyl silica gel* dùng cho sắc ký (5 µm).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 362 nm

Tốc độ dòng: 1,4 ml/phút.

Thể tích tiêm: 20 µl.

Cách tiến hành: Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ thống: Cân bằng cột bằng hỗn hợp pha động ít nhất 30 phút. Tiêm dung dịch chuẩn, hệ số bất đối của pic Kaempferol không được lớn hơn 2,0; số đĩa lý thuyết của cột không được nhỏ hơn 5000. Tiêm riêng biệt 6 lần dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic của 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2,0%.

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Căn cứ vào diện tích pic thu được từ dung dịch thử, dung dịch chuẩn và dựa vào hàm lượng % của Kaempferol $C_{15}H_{10}O_6$ có trong chế phẩm.

Bảng 17.1. Các thông số của hệ sắc ký

Các thông số	Yêu cầu	PTN 1	PTN 2	PTN 3
	Thiết bị	Shimadzu 20A-Series	HP100	Shimadzu
	Cột sắc ký	C18, Phenomenex 250 x 4,6mm; 5 μ m	C18, Phenomenex 250 x 4,6mm; 5 μ m	C18, Gemini 250 x 4,6mm; 5 μ m
	Pha động	MeOH - Dd NaH_2PO_4 0,05M đã chỉnh đến pH 2,0 với H_3PO_4 đặc (55 : 45)		
t_r		16,2 phút	12,3 phút	10,40 phút
N	≥ 3000	6999	5700	8970
T	$\leq 2,0$	1,13	1,01	1,56
RSD _S	$\leq 2,0 \%$	0,34 %	0,56 %	0,13%
dd chuẩn				

Bảng 17.2. Kết quả xác định hàm lượng

Yêu cầu		PTN 1	PTN 2	PTN 3
Hàm lượng mẫu thử không được nhỏ hơn 95 % tính theo chế phẩm nguyên trạng	1	95,44	95,04	95,34
	2	95,46	95,20	94,85
	3	95,06	96,28	95,51
	4	95,36	95,21	94,56
	5	95,96	95,29	94,97
	6	96,04	95,07	95,19
	TB	95,55 % (nguyên trạng), n = 6, RSD = 0,39%	95,35 % (nguyên trạng), n = 6, RSD = 0,49%	95,07 % (nguyên trạng), n = 6, RSD = 0,36%

2. Xử lý kết quả theo thống kê:

Tập hợp kết quả các PTN và đánh giá theo ANOVA

Bảng 17.3. Kết quả đánh giá theo ANOVA

TÓM TẮT				
<i>Nhóm</i>	<i>Số KQ</i>	<i>Tổng</i>	<i>Trung bình</i>	<i>Phương sai</i>
PTN 1	6	573,32	95,55	0,141
PTN 2	6	572,09	95,35	0,217
PTN 3	6	570,42	95,07	0,120

ANOVA					
<i>Nguồn sai số</i>	<i>Tổng số biên phương</i>	<i>Bậc tự do</i>	<i>Bình phương trung bình</i>	F_m	F_{tc}
Giữa các nhóm	0,706	2	0,353	2,217	3,682
Trong từng nhóm	2,389	15	0,159		
Tổng cộng	3,095	17			

Biện luận: $F_m = 2,217 < F_{tc} = 3,682$

3. Kết luận: Kết quả trung bình của 2 phòng thử nghiệm giống nhau, phương pháp phân tích có độ chính xác cao với giá trị độ tái lập và độ lặp lại nhỏ.

B. XÁC ĐỊNH GIÁ TRỊ ẮN ĐỊNH CHẤT CHUẨN KAEMPFEROL

Bảng 17.4. Kết quả xác định giá trị ắ định

	Xếp tăng dần	$ x_i - \overline{x_{(0)}} $	$x^*_{i(1)}$	$(x^*_{i(1)} - \overline{x^*_{(1)}})^2$	$x^*_{i(2)}$	$(x^*_{i(2)} - \overline{x^*_{(2)}})^2$
x*- 1.5s*			94,81		94,80	
x*+ 1.5s*			95,69		95,74	
1	94,56	0,69	94,81	0,2172	94,81	0,2172
2	94,85	0,40	94,85	0,1773	94,85	0,1773
3	94,97	0,28	94,97	0,0907	94,97	0,0907
4	95,04	0,21	95,04	0,0534	95,04	0,0534
5	95,06	0,19	95,06	0,0446	95,06	0,0446
6	95,07	0,18	95,07	0,0404	95,07	0,0404
7	95,19	0,06	95,19	0,0066	95,19	0,0066
8	95,20	0,05	95,20	0,0051	95,20	0,0051
9	95,21	0,04	95,21	0,0037	95,21	0,0037
10	95,29	0,04	95,29	0,0004	95,29	0,0004
11	95,34	0,09	95,34	0,0047	95,34	0,0047
12	95,36	0,11	95,36	0,0079	95,36	0,0079
13	95,44	0,19	95,44	0,0285	95,44	0,0285
14	95,46	0,21	95,46	0,0357	95,46	0,0357
15	95,51	0,26	95,51	0,0571	95,51	0,0571
16	95,96	0,71	95,69	0,1796	95,69	0,1796
17	96,04	0,79	95,69	0,1796	95,69	0,1796
18	96,28	1,03	95,69	0,1796	95,69	0,1796
$\overline{x}$	95,32					
N	18					
S	0,427					
$\overline{x_{(0)}}$	95,25					
$S_{(0)}$	0,297					
$\overline{x^*_{(n)}}$	95,25		95,27		95,27	
$S^*_{(n)}$	0,297		0,315		0,315	

Nhận xét: Giá trị s^* không thay đổi sau 2 lần tính, giá trị ấn định được chọn là 95,27% với độ lệch chuẩn là 0,315.

Tính giá trị Z:

Bảng 17.5. Tập hợp kết quả của ba PTN và tính giá trị Z

TT	X_i (%) (nguyên trạng)	Z $x^* = 95,27$ $s^* = 0,315$
1	94,56	-2,26
2	94,85	-1,34
3	94,97	-0,96
4	95,04	-0,73
5	95,06	-0,67
6	95,07	-0,64
7	95,19	-0,26
8	95,20	-0,23
9	95,21	-0,19
10	95,29	0,06
11	95,34	0,22
12	95,36	0,28
13	95,44	0,54
14	95,46	0,60
15	95,51	0,76
16	95,96	2,19
17	96,04	2,44
18	96,28	3,20
TB	95,21% (n = 14, RSD = 0,21%)	

Nhận xét: Loại 4 kết quả có giá trị $|Z| > 2$, các kết quả còn lại đều có giá trị $|Z|$ còn ≤ 2 .

Chất chuẩn Kaempferol SKS: KC.10.16-04.04 có hàm lượng 95,21% tính theo nguyên trạng, độ không đảm bảo đo mở rộng $U = \pm 0,45\%$ với hệ số phủ $k = 2$ ở mức tin cậy 95%.

PHỤ LỤC 18

A. BÁO CÁO KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ LIÊN PHÒNG THÍ NGHIỆM CHẤT CHUẨN NUCIFERIN

1. Xác định hàm lượng mẫu thành phẩm (HPLC):

Tiến hành song song với Nuciferin CRS (Trung quốc) SKS: 111566 - 200402 có hàm lượng 100,0% (nguyên trạng).

Pha động: ACN: TEA 0,1% (70 : 30), điều chỉnh tỉ lệ pha động nếu cần.

Dung dịch chuẩn: Hoà tan 25,0 mg Nuciferin chuẩn trong Acetonitril và pha loãng thành 100,0 ml với cùng dung môi. Hút 5,0 ml pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi.

Dung dịch thử: Hoà tan 25,0 mg mẫu thử trong Acetonitril và pha loãng thành 100,0 ml với cùng dung môi. Hút 5,0 ml pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi.

Điều kiện sắc ký:

Cột thép không gỉ (15 cm x 4,6 mm) được nhồi *octadecylsilyl silica gel* dùng cho sắc ký (5 μ m).

Detector quang phổ tử ngoại đặt ở bước sóng 270 nm.

Tốc độ dòng: 1,0 ml /phút.

Thể tích tiêm: 10 μ l.

Cách tiến hành:

Kiểm tra khả năng thích hợp của hệ thống: Cân bằng cột bằng hỗn hợp pha động ít nhất 30 phút. Tiêm dung dịch chuẩn, hệ số bất đối của pic chính không được lớn hơn 2,0; số đĩa lý thuyết của cột không được nhỏ hơn 2000. Tiêm riêng biệt 6 lần dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic chính sau 6 lần tiêm lặp lại không được lớn hơn 1,0%.

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Căn cứ vào diện tích pic thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn và dựa vào hàm lượng Nuciferin chuẩn ($C_{19}H_{21}NO_2$), tính hàm lượng Nuciferin có trong chế phẩm.

Bảng 18.1. Các thông số của hệ sắc ký

Yêu cầu	PTN 1	PTN 2	PTN 2
Thiết bị	Agilent 1200	Shimadzu LC – 20A	Shimadzu LC – 20A
Cột sắc ký	C18e, 15 cm x 4,6mm; 5µm		
	Purospher STAR	LichroCART	Gemini
Pha động	Acetonitril – TEA 0,1% (70 : 30)		
t _r (phút)	6,5	6,4	4,4
N ≥ 2000	4274	6100	7413
T ≤ 2,0	1,77	1,8	1,13
RSD _{chuẩn} ≤ 2,0 %	0,56	0,37	0,19

Bảng 18.2. Kết quả xác định hàm lượng

Yêu cầu	PTN 1		PTN 2	PTN 3
Hàm lượng của mẫu thử không được nhỏ hơn 95% của C ₁₉ H ₂₁ NO ₂ tính theo chế phẩm nguyên trạng	1	99,55	99,25	100,19
	2	99,79	99,44	100,57
	3	100,72	100,82	100,58
	4	99,15	100,98	100,45
	5	99,62	100,68	99,95
	6	100,27	99,65	100,39
	TB	99,85% (nguyên trạng), n = 6 RSD = 0,56%	100,14 % (nguyên trạng) n = 6 RSD = 0,77%	100,26 % (nguyên trạng) n = 6 RSD = 0,27%

2. Xử lý kết quả theo thống kê:

Tập hợp kết quả các PTN và đánh giá theo ANOVA

Bảng 18.3. Kết quả đánh giá theo ANOVA

TÓM TẮT				
Nhóm	Số KQ	Tổng	Trung bình	Phương sai
PTN 1	6	600,82	100,14	0,596
PTN 2	6	599,1	99,85	0,314
PTN 3	6	602,07	100,35	0,055

ANOVA					
<i>Nguồn sai số</i>	<i>Tổng số bình phương</i>	<i>Bậc tự do</i>	<i>Bình phương trung bình</i>	F_{tn}	F_{tc}
Giữa các nhóm	0,741	2	0,371	1,152	3,682
Trong từng nhóm	4,827	15	0,322		
Tổng cộng	5,568	17			

Biện luận: $F_{tn} = 1,152 < F_{tc} = 3,682$

3. Kết luận: Kết quả trung bình của 2 phòng thử nghiệm giống nhau, phương pháp phân tích có độ chính xác cao với giá trị độ tái lập và độ lặp lại nhỏ.

B. XÁC ĐỊNH GIÁ TRỊ ẮN ĐỊNH CHẤT CHUẨN NUCIFERIN

Bảng 18.4. Xác định giá trị ắc định

	Xếp tăng dần	$ x_i - \overline{x_{(0)}} $	$x^*_{i(1)}$	$(x^*_{i(1)} - \overline{x^*_{(1)}})^2$	$x^*_{i(2)}$	$(x^*_{i(2)} - \overline{x^*_{(2)}})^2$
x*- 1.5s*			99,18		99,14	
x*+ 1.5s*			101,28		101,08	
1	99,15	1,08	99,18	0,8612	99,18	0,8612
2	99,25	0,98	99,25	0,7439	99,25	0,7439
3	99,44	0,79	99,44	0,4522	99,44	0,4522
4	99,55	0,68	99,55	0,3164	99,55	0,3164
5	99,62	0,61	99,62	0,2425	99,62	0,2425
6	99,65	0,58	99,65	0,2139	99,65	0,2139
7	99,79	0,44	99,79	0,1040	99,79	0,1040
8	99,95	0,28	99,95	0,0264	99,95	0,0264
9	100,19	0,04	100,19	0,0060	100,19	0,0060
10	100,27	0,04	100,27	0,0248	100,27	0,0248
11	100,39	0,16	100,39	0,0770	100,39	0,0770
12	100,45	0,22	100,45	0,1139	100,45	0,1139
13	100,51	0,28	100,51	0,1580	100,51	0,1580
14	100,58	0,35	100,58	0,2186	100,58	0,2186
15	100,68	0,45	100,68	0,3221	100,68	0,3221
16	100,72	0,49	100,72	0,3691	100,72	0,3691
17	100,82	0,59	100,82	0,5006	100,82	0,5006
18	100,98	0,75	100,98	0,7526	100,98	0,7526
$\overline{x}$	100,11					
n	18					
s	0,57					
$\overline{x_{(0)}}$	100,23					
$S_{(0)}$	0,697					
$\overline{x^*_{(n)}}$			100,11		100,11	
$S^*_{(n)}$			0,645		0,645	

Nhận xét: Giá trị $s^*_{(n)}$ không thay đổi sau 2 lần tính, giá trị ấn định được chọn là 100,11% với độ lệch chuẩn là 0,645.

Tính giá trị Z:

Bảng 18.5. Tập hợp kết quả của hai PTN và tính giá trị Z

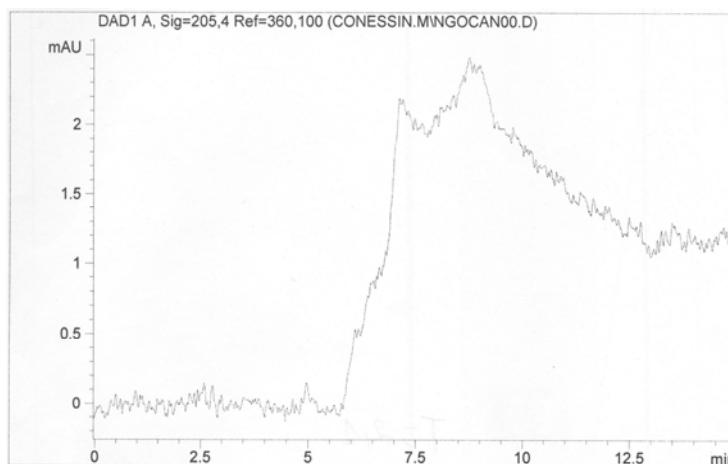
TT	X_i (%) (nguyên trạng)	Z $x^* = 100,11$ $s^* = 0,645$
1	99,15	-1,49
2	99,25	-1,33
3	99,44	-1,04
4	99,55	-0,87
5	99,62	-0,76
6	99,65	-0,71
7	99,79	-0,50
8	99,95	-0,25
9	100,19	0,12
10	100,27	0,25
11	100,39	0,43
12	100,45	0,53
13	100,51	0,62
14	100,58	0,73
15	100,68	0,88
16	100,72	0,95
17	100,82	1,10
18	100,98	1,35
TB	100,11% $n = 18, RSD = 0,57\%$	

Nhận xét: Các kết quả đều có giá trị $Z < 2,0$, không có kết quả nào bị loại.

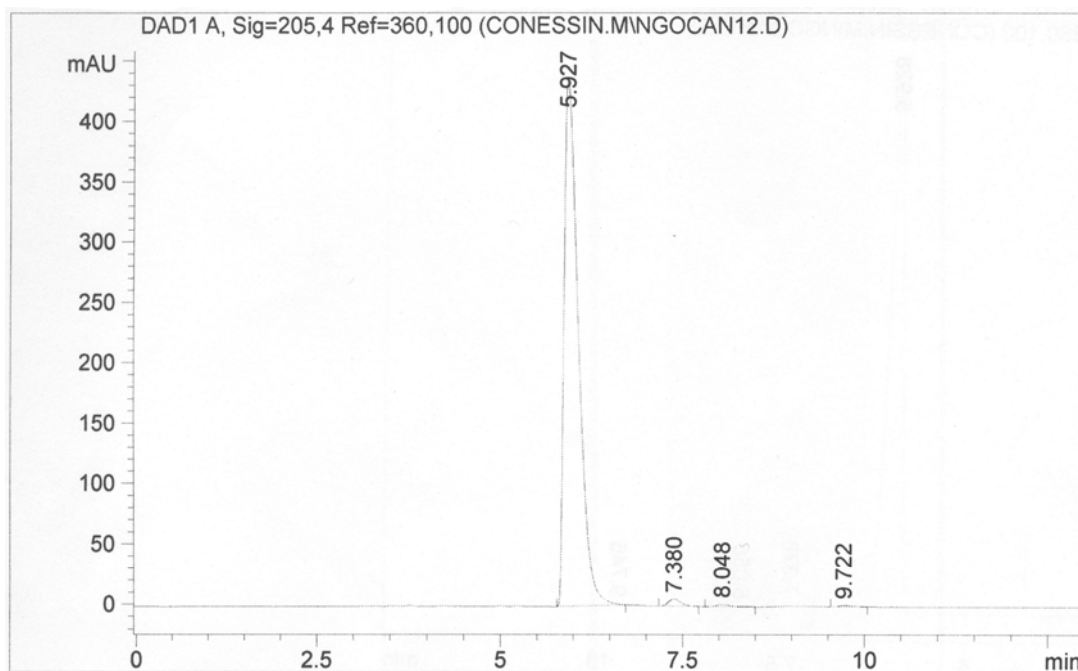
Chất chuẩn Nuciferin SKS: KC.10.16 - 04.08 có hàm lượng 100,11 % tính theo nguyên trạng, độ không đảm bảo đo mở rộng $U = \pm 0,27 \%$ với hệ số phủ $k = 2$ ở mức tin cậy 95%.

PHỤ LỤC 19

SKĐ XÁC ĐỊNH TẠP CHẤT LIÊN QUAN VÀ ĐỊNH LƯỢNG CONESSIN Ở THỜI ĐIỂM 9 THÁNG



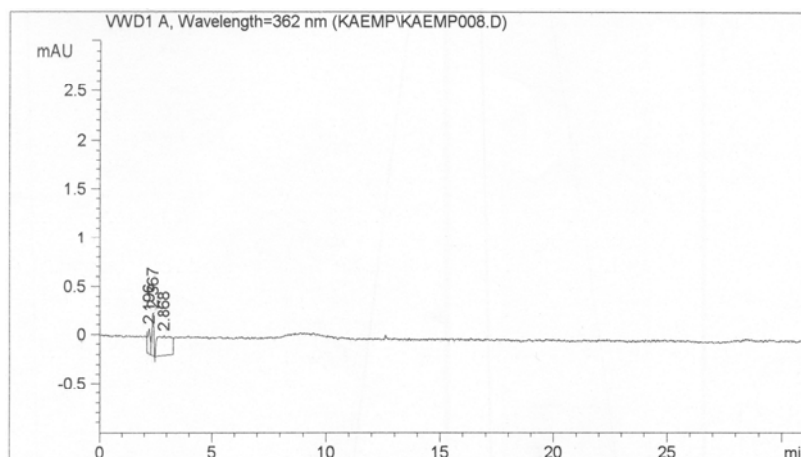
Hình 19.1. SKĐ mẫu trắng xác định tạp chất liên quan và định lượng Conessin ở thời điểm 9 tháng



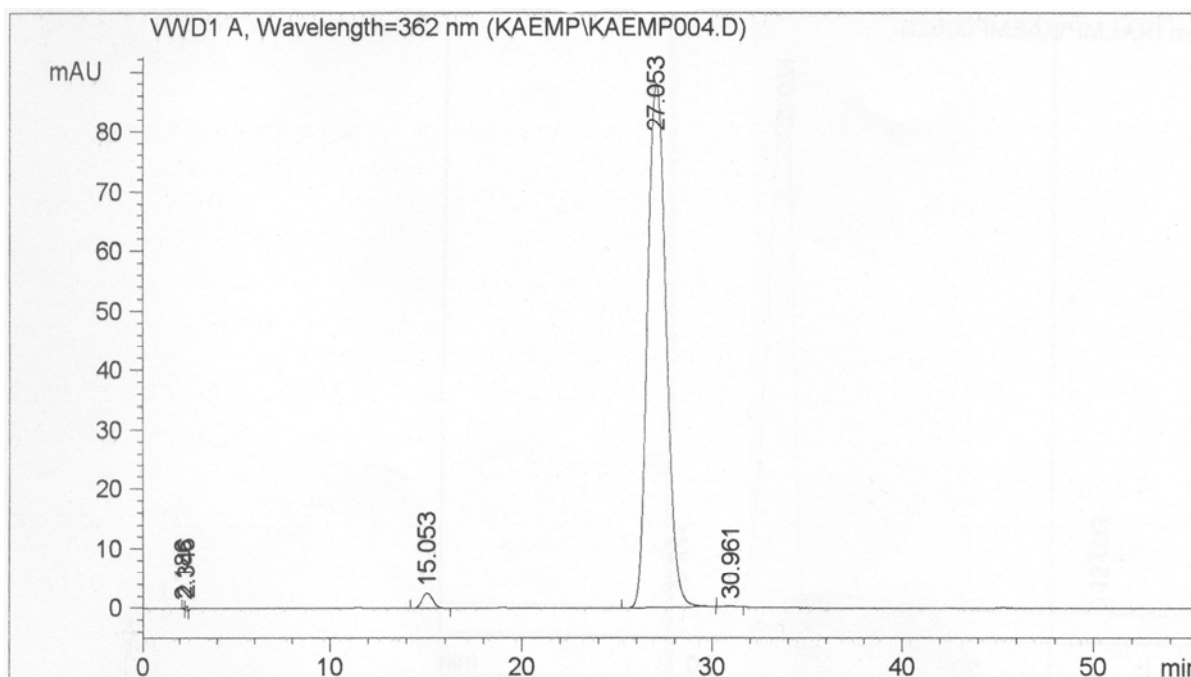
Hình 19.2. SKĐ mẫu thử xác định tạp chất liên quan và định lượng Conessin ở thời điểm 9 tháng

PHỤ LỤC 20

SKĐ XÁC ĐỊNH TẠP CHẤT LIÊN QUAN VÀ ĐỊNH LƯỢNG KAEMPFEROL Ở THỜI ĐIỂM 9 THÁNG



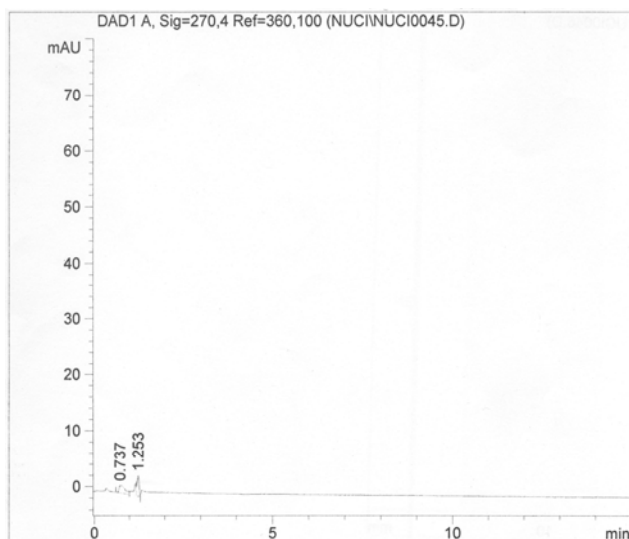
Hình 20.1. SKĐ mẫu trắng xác định tạp chất liên quan và định lượng
Kaempferol ở thời điểm 9 tháng



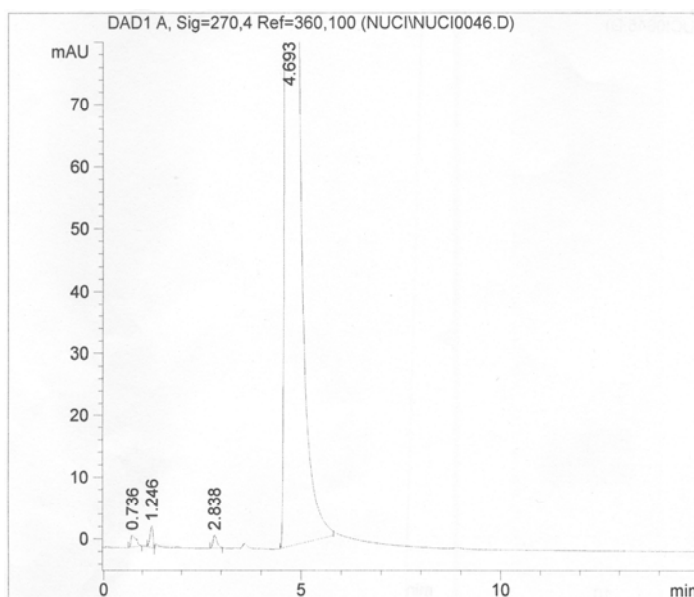
Hình 20.2. SKĐ mẫu thử xác định tạp chất liên quan và định lượng
Kaempferol ở thời điểm 9 tháng

PHỤ LỤC 21

SKĐ XÁC ĐỊNH TẠP CHẤT LIÊN QUAN VÀ ĐỊNH LƯỢNG NUCIFERIN Ở THỜI ĐIỂM 9 THÁNG



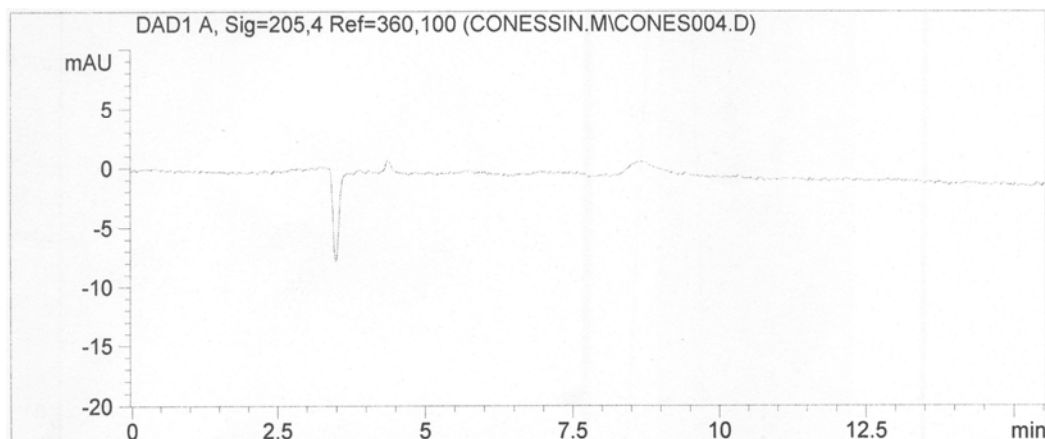
Hình 21.1. SKĐ mẫu trắng xác định tạp chất liên quan và định lượng Nuciferin ở thời điểm 9 tháng



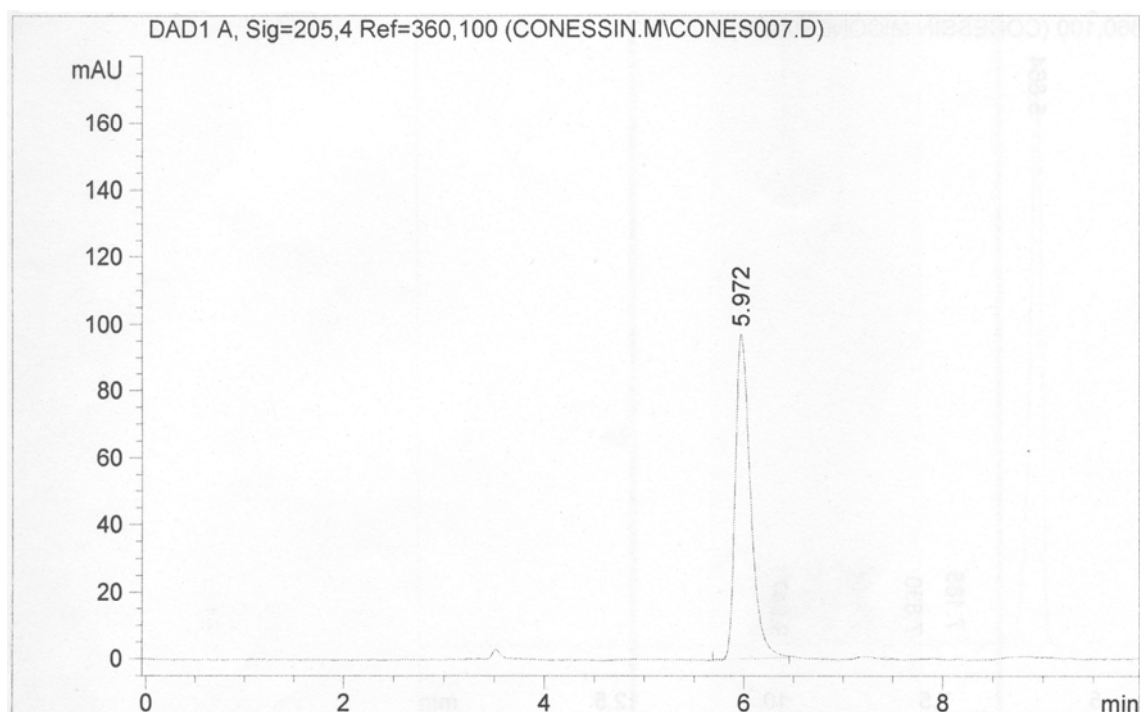
Hình 21.2. SKĐ mẫu thử xác định tạp chất liên quan và định lượng Nuciferin ở thời điểm 9 tháng

PHỤ LỤC 22

SKĐ XÁC ĐỊNH TẠP CHẤT LIÊN QUAN VÀ ĐỊNH LƯỢNG CONESSIN Ở THỜI ĐIỂM 15 THÁNG



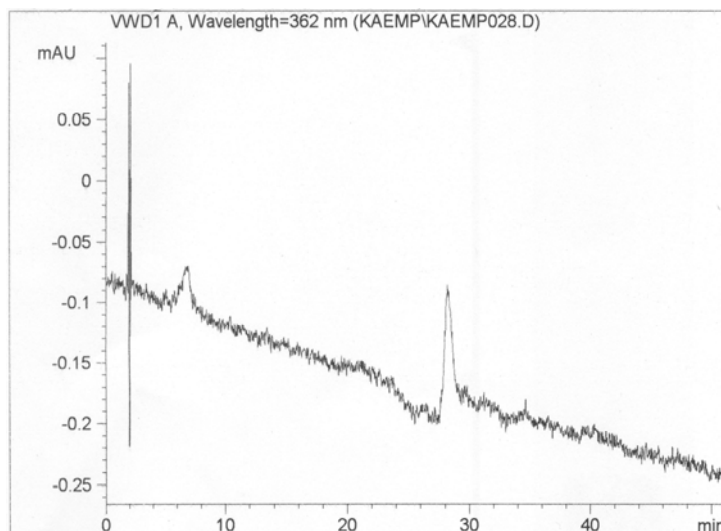
Hình 22.1. SKĐ mẫu trắng xác định tạp chất liên quan Conessin ở thời điểm 15 tháng



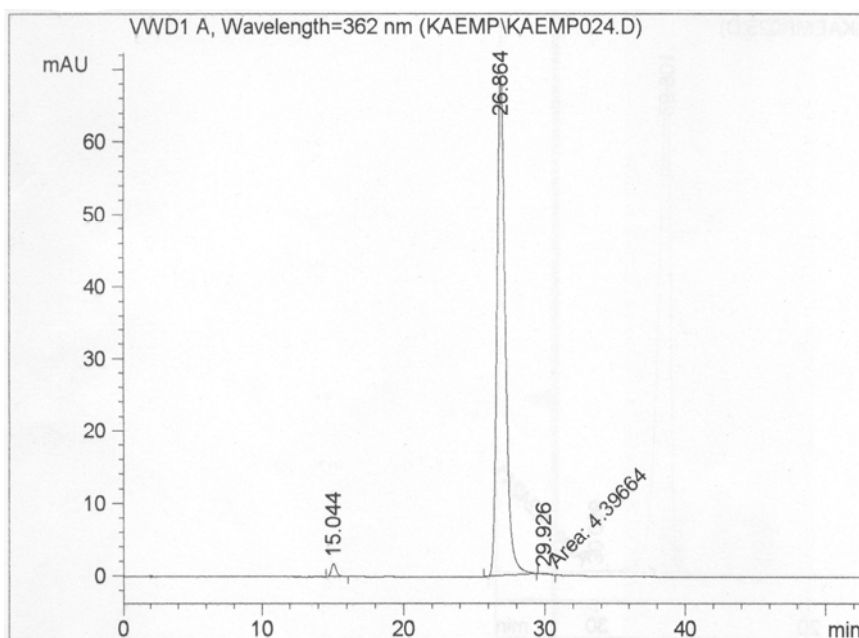
Hình 22.2. SKĐ mẫu thử xác định tạp chất liên quan và định lượng Conessin ở thời điểm 15 tháng

PHỤ LỤC 23

SKĐ XÁC ĐỊNH TẠP CHẤT LIÊN QUAN VÀ ĐỊNH LƯỢNG KAEMPFEROL Ở THỜI ĐIỂM 15 THÁNG



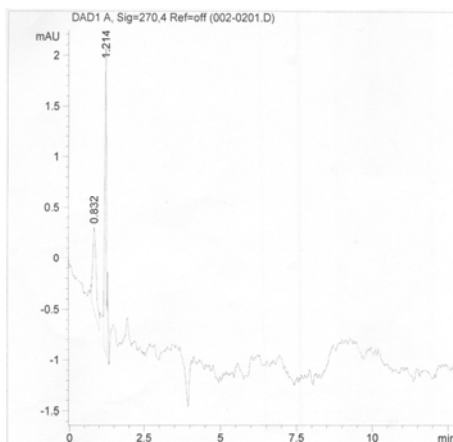
Hình 23.1. SKĐ mẫu trắng xác định tạp chất liên quan và định lượng
Kaempferol ở thời điểm 15 tháng



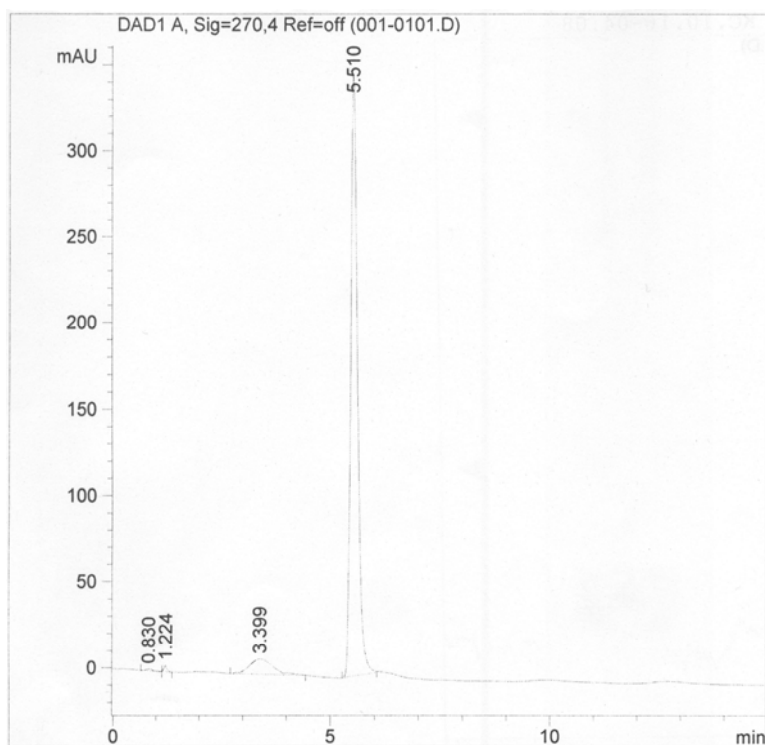
Hình 23.2. SKĐ mẫu thử xác định tạp chất liên quan và định lượng
Kaempferol ở thời điểm 15 tháng

PHỤ LỤC 24

SKĐ XÁC ĐỊNH TẠP CHẤT LIÊN QUAN VÀ ĐỊNH LƯỢNG NUCIFERIN Ở THỜI ĐIỂM 15 THÁNG



Hình 24.1. SKĐ mẫu trắng xác định tạp chất liên quan và định lượng Nuciferin ở thời điểm 15 tháng



Hình 24.2. SKĐ mẫu thử xác định tạp chất liên quan và định lượng Nuciferin ở thời điểm 15 tháng

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Hoàng Thị Tuyết Nhung, Thái Nguyễn Hùng Thu, Trịnh Văn Lầu (2012), “Nghiên cứu độ ổn định của các chất chuẩn đối chiếu có nguồn gốc dược liệu Conessin, Kaempferol và Nuciferin sau 15 tháng bảo quản”, *Tạp chí Dược học*, 423, 31-34.
2. Hoàng Thị Tuyết Nhung, Nguyễn Thị Lan Phương, Nguyễn Tuấn Anh, Trịnh Văn Lầu (2012), “Xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC để định tính, định lượng Conessin trong viên Mộc Hoa Trắng - HT”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 35 (10), 5-8.
3. Hoàng Thị Tuyết Nhung, Thái Nguyễn Hùng Thu, Trịnh Văn Lầu, Nguyễn Thị Kim Thanh, Trần Thị Hồng Anh (2011), “Nghiên cứu thiết lập một số chất chuẩn có nguồn gốc từ dược liệu để sử dụng trong kiểm nghiệm thuốc”, *Tạp chí Dược học*, 423, 22 – 25.
4. Thái Nguyễn Hùng Thu, Nguyễn Thái An, Hoàng Lan Nhung, Hoàng Thị Tuyết Nhung (2010), “Định lượng kaempferol trong một số dược liệu bằng sắc kí lỏng hiệu năng cao”, *Tạp chí Dược học*, 410, 31 - 33.
5. Thái Nguyễn Hùng Thu, Nguyễn Thái An, Hoàng Lan Nhung, Hoàng Thị Tuyết Nhung (2010), “Nghiên cứu chiết xuất tinh chế Kaempferol từ Đơn lá đỏ để làm chất đối chiếu trong kiểm nghiệm”, *Tạp chí Dược học*, 408, 45 - 47.
6. Thái Nguyễn Hùng Thu, Nguyễn Viêt Thân, Nguyễn Thị Thu Hương, Hoàng Thị Tuyết Nhung (2010), “Nghiên cứu chiết xuất conessin từ mộc hoa trắng dùng làm chất đối chiếu trong kiểm nghiệm”, *Tạp chí Dược học*, 407, 32 - 35.
7. Trịnh Văn Lầu, Trần Thị Hồng Anh, Lục Thị Vân, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn

Thị Hồng Yến, Hoàng Thị Tuyết Nhung (2010), “Định lượng Kaempferol chiết xuất từ Đơn lá đỏ bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 2 (8.(28)), 1 - 4.

8. Nguyễn Thị Kim Thanh, Trịnh Văn Lầu, Giản Thị Lan, Hoàng Thị Tuyết Nhung (2010), “Xây dựng và thẩm định phương pháp HPLC định lượng nuciferin trong nguyên liệu”, *Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc*, 1 (8.(27)), 4 - 8.
9. Trịnh Văn Lầu, Thái Nguyễn Hùng Thu, Nguyễn Viết Thân, Nguyễn Thái An, Hoàng Thị Tuyết Nhung (2009), “Study on extraction and isolation of Kaempferol from leaves of *Excoecaria Cochinchinensis* Lour, Euphorbiaceae and Conessin from stem bark of *Hollarhena Antidysenterica* (L.) Wall to be used as reference standard for quality control of some medicinal herbs and herbal products”, *Pharma Indochina VI*, Huế, 637 -641.