

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



NGUYỄN LÂM HỒNG

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, TINH CHẾ,
THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN ĐỀ ĐỊNH TÍNH,
ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ LIGNAN TRONG QUẢ
CỦA CHI *CLEISANTHUS*, HỌ THẦU DẦU
(EUPHORBIACEAE)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI - 2019

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



NGUYỄN LÂM HỒNG

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, TINH CHẾ,
THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN ĐỀ ĐỊNH TÍNH,
ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ LIGNAN TRONG QUẢ CỦA
CHI *CLEISANTHUS*, HỌ THÀU DẦU
(EUPHORBIACEAE)**

CHUYÊN NGÀNH : KIỂM NGHIỆM THUỐC VÀ ĐỘC CHẤT
MÃ SỐ : 62720410

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS Trần Việt Hùng
PGS.TS Đoàn Thị Mai Hương

HÀ NỘI - 2019

LỜI CAM ĐOAN

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

Nguyễn Lâm Hồng

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự giúp đỡ tận tình và có hiệu quả của nhiều cá nhân và tập thể, của các thầy, cô giáo, đồng nghiệp, bạn bè và gia đình. Cho phép tôi bày tỏ lòng cảm ơn sâu sắc tới:

PGS.TS. Trần Việt Hùng, Viện trưởng Viện Kiểm nghiệm thuốc TP HCM và **PGS.TS. Đoàn Thị Mai Hương** – Phó phòng tổng hợp hữu cơ, Viện Hóa Sinh Biển-Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam, người thầy đã định hướng và đưa tôi đến với lĩnh vực nghiên cứu mới mẻ, đầy li thú về thiết lập chất chuẩn gốc.

Ban Giám hiệu, Phòng Đào tạo Sau đại học, **GS.TS. Thái Nguyễn Hùng Thu**, cùng các thể hệ thầy, cô, các anh, chị đồng nghiệp của Bộ môn Hóa phân tích-Độc chất, Trường Đại học Dược Hà Nội đã tạo điều kiện, tận tình giúp đỡ, chia sẻ kinh nghiệm để tôi hoàn thiện luận án này.

Bộ Khoa học và Công nghệ đã cấp kinh phí cho *Đề tài độc lập cấp Nhà nước, mã số ĐTDLCN.14/16* và các anh, chị, em của Trung tâm tiên tiến-Viện Hóa Sinh Biển Viện Hàn Lâm KH & CN Việt Nam, cùng các bạn sinh viên “*Team Chá chôi*” đã hỗ trợ và phối hợp với tôi trong quá trình thực nghiệm.

Các anh, chị và các bạn đồng nghiệp của Phòng chất chuẩn-chất đối chiếu, Phòng KN đông dược, Phòng KN nguyên liệu, Phòng vật lí-đo lường, Phòng nghiên cứu phát triển của Viện KNT TŨ và Viện KNT TPHCM đã chia sẻ kinh nghiệm quý báu, giúp đỡ và tạo điều kiện để tôi hoàn thành luận án.

Công trình nghiên cứu này được hoàn thành với sự nỗ lực của bản thân và sự ủng hộ của gia đình và bạn bè, xin cảm ơn mọi người đã luôn sát cánh bên tôi, đặc biệt là Bố, Mẹ và những “*Người đàn ông*” của tôi.

Hà Nội, ngày 10 tháng 10 năm 2019

NCS. Nguyễn Lâm Hồng

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN

MỤC LỤC

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

DANH MỤC BẢNG

DANH MỤC HÌNH

ĐẶT VẤN ĐỀ..... 1

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN..... 3

1.1. Tình hình nghiên cứu về chỉ cách hoa trên thế giới và tại Việt Nam..... 3

1.1.1. Tổng quan về chi Cách hoa (*Cleistanthus*)..... 3

1.1.2. Tình hình nghiên cứu thành phần hoá học và hoạt tính kháng ung thư của chi
Cleistanthus trên thế giới và tại Việt Nam..... 5

1.2. Tổng quan về nhóm chất aryltetralin lignan 10

1.2.1. Định nghĩa..... 10

1.2.2. Phân loại lignan..... 10

1.2.3. Một số hoạt chất nhóm aryltetralin lignan được phát triển thành thuốc..... 12

1.2.4. Một số hoạt chất chính nhóm aryltetralin lignan phân lập được từ quả của chi
Cleistanthus tại Việt Nam..... 13

1.2.5. Một số phương pháp phân tích hoạt chất nhóm aryltetralin lignan trong dịch
chiết thực vật..... 15

1.3. Tổng quan về chất chuẩn 16

1.3.1. Khái niệm..... 16

1.3.2. Phân loại chất chuẩn đối chiếu hóa học..... 17

1.3.3. Tổng quan các hướng dẫn về thiết lập chất chuẩn gốc..... 18

1.3.4. Tình hình thiết lập chất chuẩn gốc trên thế giới và tại Việt Nam..... 28

1.4. Tính cấp thiết của đề tài..... 29

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU ..30

2.1. Đối tượng nghiên cứu..... 30

2.2. Hoá chất và trang thiết bị..... 31

2.2.1. Nguyên, vật liệu.....	31
2.2.2. Hoá chất.....	31
2.2.3. Thiết bị nghiên cứu.....	32
2.3. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	33
2.3.1. Phân lập, tinh chế và khẳng định cấu trúc một số chất tinh khiết nhóm lignan trong quả Chà chôi làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn.....	33
2.3.2. Thiết lập chất chuẩn gốc định lượng và định tính.....	35
2.3.3. Xây dựng phương pháp định tính và định lượng đồng thời một số lignan trong quả của chi Cách hoa.....	41
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU.....	43
3.1. Phân lập, tinh chế một số chất nhóm lignan từ quả chà chôi làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn.....	43
3.1.1. Phân lập thô cleistantoxin và cleisindoside D trên cột silica gel.....	43
3.1.2. Phân lập, tinh chế và khẳng định cấu trúc của cleistantoxin làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng.....	45
3.1.3. Phân lập, tinh chế và khẳng định cấu trúc của cleisindoside D làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng.....	49
3.1.4. Khẳng định cấu trúc của cleisindoside A làm chất chuẩn định tính.....	55
3.1.5. Phân lập, tinh chế và xác định cấu trúc các chất mới phân lập được.....	57
3.2. Thiết lập chất chuẩn gốc.....	71
3.2.1. Thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D.....	71
3.2.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin (chất mới-CT1).....	99
3.3. Xây dựng và thẩm định phương pháp định tính và định lượng một số lignan trong quả của chi cách hoa.....	106
3.3.1. Xây dựng phương pháp định tính 4 lignan trong quả của chi Cách hoa bằng HPLC/DAD.....	106
3.3.2. Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong quả của chi Cách hoa bằng HPLC/DAD.....	111

3.3.3. Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định tính và định lượng đồng thời một số lignan trong mẫu quả của chi Cách hoa (<i>Cleistanthus</i>).....	120
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN.....	123
4.1. Phân lập, tinh chế và khẳng định cấu trúc cleistantoxin và cleisindoside D làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn	123
4.1.1. Phân lập thô cleistantoxin và cleisindoside D trên cột silicagel.....	123
4.1.2. Phân lập, tinh chế, khẳng định cấu trúc cleistantoxin làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng.....	123
4.1.3. Phân lập, tinh chế, khẳng định cấu trúc cleisindoside D làm NLTLCG gốc định lượng.....	125
4.1.4. Khẳng định cấu trúc cleisindoside A làm NLTLCG định tính.....	126
4.1.5. Phân lập, tinh chế và xác định cấu trúc các chất tinh khiết mới từ quả Chà chôi.....	127
4.2. Thiết lập chất chuẩn gốc	130
4.2.1. Thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D.....	130
4.2.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho NLTLCG định tính cleisindoside A 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1).....	139
4.3. Xây dựng phương pháp định tính, định lượng đồng thời một số lignan trong quả của chi Cách hoa.....	142
4.3.1. Xây dựng, thẩm định phương pháp định tính đồng thời 4 chất chuẩn đã được thiết lập trong quả của chi Cách hoa	142
4.3.2. Xây dựng, thẩm định phương pháp định lượng đồng thời cleistantoxin và cleisindoside D trong quả của chi Chà chôi	143
4.3.3. Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định tính và định lượng một số lignan trong quả của chi Cách hoa bằng HPLC/DAD.....	144
NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN AN	146
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	147
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÍ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tên tiếng Anh	Tên tiếng Việt
AAS	Atomic Absorption Spectrometry	Quang phổ hấp thụ nguyên tử
ACN	Acetonitrile	Acetonitril
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	Ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển
ASEAN	Association of Southeast Asian Nations	Hiệp hội các quốc gia Đông Nam Á
CCDC		Chất chuẩn đối chiếu
CE	Capillary Electrophoresis	Điện di mao quản
CEC	Capillary Electrochromatography	Điện sắc ký mao quản
CIFF	Capillary Isoelectric Focusing	Điện di mao quản hội tụ đẳng điện
CITP	Capillary Isotachopheresis	Điện di mao quản đẳng tốc
CZE	Capillary Zone Electrophoresis	Điện di mao quản vùng
DAD	Diode Array Detector	Detector mảng diod
DKSK		Điều kiện sắc kí
DMF	N,N-dimethylformamide	N,N-dimethylformamid
DMI	1,3-dimethyl-2-imidazolidinone	1,3-dimethyl-2-imidazolidinon
DSC	Differential Scanning Calorimetry	Quét nhiệt vi sai
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicine -HealthCare	Hội đồng Châu Âu về chất lượng thuốc
EI	Electron Impact	Ion hóa bằng dòng electron
EOF	Electroendosmotic Flow	Dòng điện thẩm
EPRS	European Pharmacopeia Reference Substances	Chất chuẩn đối chiếu Dược điển Châu Âu
ESI	Electrospray Ionization	Ion hóa bằng tia điện
EIOAc		Ethyl acetat
FAAS	Flame Atomic Absorption Spectrometry	Nguyên tử hóa bằng ngọn lửa
GC	Gas Chromatography	Sắc ký khí
GMP	Good Manufacturing Practices	Thực hành tốt sản xuất thuốc
HCTN		Hợp chất tự nhiên
HL		Hàm lượng

HĐDD		Hội đồng Dược điển
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HR-MS	High Resolution-Mass Spectroscopy	Phổ khối lượng phân giải cao
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals of Human Use	Hội nghị quốc tế về hài hòa các yêu cầu kỹ thuật để đăng ký dược phẩm sử dụng cho con người
ICP-MS	Inductively Coupled Plasma-Mass Spectroscopy	Quang phổ plasma cảm ứng kết nối phổ khối lượng
ICRS	International Chemical Reference Substances	Chất chuẩn đối chiếu quốc tế
IP	International Pharmacopoeia	Dược điển quốc tế
IR	Infrared Radiation	Quang phổ hồng ngoại
ISO	International Organization for Standardization	Tổ chức tiêu chuẩn hóa quốc tế
LOD	Limit of Detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of Quantitation	Giới hạn định lượng
LT		Lý thuyết
MEKC	Micellar Electrokinetic Chromatography	Sắc ký mixen điện động
NLTLC		Nguyên liệu thiết lập chất chuẩn
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
NP-HPLC	Normal Phase-High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao pha thuận
PCRS	Primary Chemical Reference Standards	Chất chuẩn đối chiếu hóa học gốc
PDE	Permitted daily exposure	Liều phơi nhiễm cho phép mỗi ngày
PD		Phân đoạn
Ph.Eur	European Pharmacopoeia	Dược điển Châu Âu
PF	Purity factor	Hệ số tinh khiết pic
PKN		Phiếu kiểm nghiệm
PT		Phân tử
PTN		Phòng thí nghiệm

qNMR	Quantitative Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân định lượng
RP-HPLC	Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao pha đảo
S		Diện tích
SK		Sắc kí
SKD		Sắc kí đồ
SCRS	Secondary Chemical Reference Standards	Chất chuẩn đối chiếu thứ cấp
TCLQ	Related substances	tạp chất liên quan
TCPH		tạp chất phân hủy
TCCS		Tiêu chuẩn cơ sở
TGA	Thermogravimetric Analysis	Phân tích nhiệt trọng lượng
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TOF	Time- of- Flight Analyser	Bộ phân tích thời gian bay
USPRS	United States Pharmacopeia Reference Substances	Chất chuẩn đối chiếu Dược điển Mỹ
UV-VIS	Ultraviolet - Visible Spectroscopy	Quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến
Viện HL KH &CN VN		Viện Hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam
VKNT TPHCM		Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh
VKNT TƯ		Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương
WHO	World Health Organization	Tổ chức y tế thế giới

DANH MỤC BẢNG

Bảng 3.1.	Kết quả tách PD7-8-9-10 (PD7) trên cột silica gel	46
Bảng 3.2.	Kết quả phân lập cleisindoside D từ PD16 trên cột silica gel.....	50
Bảng 3.3.	Kết quả phân lập CT1 và CT7 từ PD11-12-13-14-15 trên cột silica gel.....	58
Bảng 3.4.	Kết quả phân lập CT2, CT3, CT4, CT5, CT6 từ PD19-23 trên cột silica gel ...	58
Bảng 3.5.	Tính chất của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D	71
Bảng 3.6.	Góc quay cực riêng của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D.....	71
Bảng 3.7.	Chương trình gia nhiệt của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D	72
Bảng 3.8.	Kết quả xác định nhiệt độ nóng chảy và độ tinh khiết DSC	72
Bảng 3.9.	Dữ liệu phổ IR, UV, HRESI-MS của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D	72
Bảng 3.10.	Dữ liệu phổ 1D-NMR của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D.....	73
Bảng 3.11.	Chương trình gradient I.....	74
Bảng 3.12.	Chương trình sắc kí định lượng TCLQ.....	75
Bảng 3.13.	Kết quả thẩm định độ ổn định hệ thống.....	78
Bảng 3.14.	Độ lặp lại của dung dịch cleistantoxin và cleisindoside D ở nồng độ LOQ.....	83
Bảng 3.15.	Khoảng tuyến tính của cleistantoxin và cleisindoside D.....	83
Bảng 3.16.	Độ lặp lại của dung dịch cleistantoxin và cleisindoside D 1000 µg/ml	84
Bảng 3.17.	Kết quả đánh giá độ chính xác trung gian	85
Bảng 3.18.	Độ ổn định của dung dịch cleistantoxin và cleistantoxin 1000 µg/ml	86
Bảng 3.19.	Hàm lượng tạp chất bay hơi trong nguyên liệu thiết lập chất chuẩn	87
Bảng 3.20.	Kết quả định lượng tạp vô cơ bằng kĩ thuật tro sulfat	87
Bảng 3.21.	Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin	91
Bảng 3.22.	Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của chất chuẩn gốc định lượng cleisindoside D	93
Bảng 3.23.	Đánh giá độ đồng nhất lô của quá trình đóng ống chất chuẩn gốc cleistantoxin và cleisindoside D.....	95
Bảng 3.24.	Độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D.....	96
Bảng 3.25.	Hàm lượng tạp chất bay hơi của chất chuẩn cleisatntoxin và cleisindoside D	97
Bảng 3.26.	Kết quả định lượng tạp vô cơ bằng phép thử tro sulfat	97

Bảng 3.27.	Nghiên cứu độ ổn định ống chuẩn góc cleistantoxin và cleisindoside D.....	99
Bảng 3.28.	Tính chất của chất chuẩn cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin.....	99
Bảng 3.29.	Góc quay riêng của chất chuẩn cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin.....	99
Bảng 3.30.	Nhiệt độ nóng chảy cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin.....	100
Bảng 3.31.	Dữ liệu phổ IR, UV và HRESI-MS của chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin.....	100
Bảng 3.32.	Dữ liệu phổ ¹ H và ¹³ C-NMR của chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin.....	101
Bảng 3.33.	Chương trình sắc kí xác định độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin.....	102
Bảng 3.34.	Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của NLTCC định tính cleisindoside A ..	103
Bảng 3.35.	Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của NLTCC định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin.....	104
Bảng 3.36.	Độ tinh khiết SK của chất chuẩn cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin.....	105
Bảng 3.37.	Chương trình gradient tách hỗn hợp 4 chất.....	107
Bảng 3.38.	Kết quả thu được từ 6 lần tiêm của dung dịch chuẩn hỗn hợp.....	114
Bảng 3.39.	Khoảng nồng độ tuyến tính của cleisindoside D và cleistantoxin	116
Bảng 3.40.	Độ lặp lại HL cleisindoside D và cleistantoxin trong quả Chà chôi.....	117
Bảng 3.41.	Kết quả độ tái lập của cleisindoside D trong mẫu thử quả Chà chôi.....	117
Bảng 3.42.	Kết quả độ tái lập của cleistantoxin trong mẫu thử quả Chà chôi	118
Bảng 3.43.	Kết quả đánh giá độ đúng của cleisindoside D trên mẫu quả Chà chôi	119
Bảng 3.44.	Kết quả đánh giá độ đúng của cleistantoxin trên mẫu quả Chà chôi.....	119
Bảng 3.45.	Hàm lượng cleisindoside D và cleistantoxin trong quả của chi Cách hoa.	121

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1.	Cây Cách hoa đông dương (a), Chà chồi (b), Cách hoa eberhardt (c) ..	5
Hình 1.2.	Cây <i>C. collinus</i> và cấu trúc của cleistanthin A (a) cleistanthin B (b) ...	6
Hình 1.3.	Cây <i>Cleistanthus boivinianus</i> và cấu trúc một số chất phân lập được ..	7
Hình 1.4.	Một số hợp chất nhóm lignan phân lập được từ quả cây chi Cách hoa.	8
Hình 1.5.	Chu trình Apoptosis tế bào	8
Hình 1.6.	Cấu dạng và tương tác các chất trong trung tâm hoạt động của PARP-1	9
Hình 1.7.	Đơn vị phenylpropanoid (a) và cấu trúc lignan (b)	11
Hình 1.8.	Một số khung cấu trúc của nhóm lignan	11
Hình 1.9.	Cấu trúc của podophyllotoxin, etoposid, teniposid và etoposid phosphat	12
Hình 1.10.	Cấu trúc hoá học của cleistantoxin	13
Hình 1.11.	Cấu trúc hoá học của cleisindoside D	14
Hình 1.12.	Cấu trúc hoá học của cleisindoside A	14
Hình 1.13.	Sơ đồ qui trình thiết lập chất chuẩn theo hướng dẫn ISO GUIDE 35 ..	18
Hình 2.1.	Sơ đồ qui trình chiết xuất cao cồn khô từ quả cây Chà chồi	30
Hình 2.2.	Quả cây Chà chồi	31
Hình 2.3.	Quả cây Cách hoa eberhardt	31
Hình 2.4.	Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu luận án	33
Hình 2.5.	Sơ đồ đánh giá chất lượng nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc.....	37
Hình 3.1.	SKĐ phát hiện cleistantoxin trong các phân đoạn từ PD1-14	44
Hình 3.2.	SKĐ phát hiện cleisindoside D trong các phân đoạn từ PD12-23	44
Hình 3.3.	Độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin trong PD7.2-3	45
Hình 3.4.	Độ tinh khiết sắc kí cleistantoxin trong NLTCC	46
Hình 3.5.	Cấu trúc hóa học của cleistantoxin	47
Hình 3.6.	Một số tương tác chính trên phổ COSY và HMBC của chất cleistantoxin	48
Hình 3.7.	Sơ đồ phân lập, tinh chế cleistantoxin thành nguyên liệu thiết lập chuẩn	49
Hình 3.8.	SKĐ xác định độ tinh khiết của chất cleisindoside D trong căn E	50
Hình 3.9.	SKĐ xác định độ tinh khiết của chất cleisindoside D trong căn F.....	51
Hình 3.10.	SKĐ của các lọ 31 và 42 xuất hiện chất cleisindoside D	51

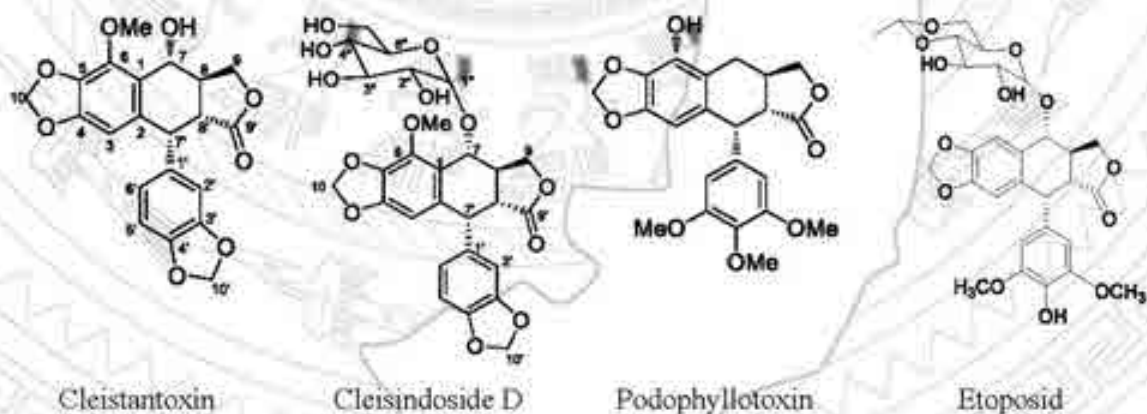
Hình 3.11.	Cấu trúc hóa học của cleisindoside D.....	52
Hình 3.12.	Một số tương tác chính trên phổ COSY và HMBC của eleisindoside D.....	53
Hình 3.13.	Sơ đồ phân lập, tinh chế cleisindoside D thành NLTLCC	54
Hình 3.14.	Cấu trúc hóa học của chất cleisindoside A	55
Hình 3.15.	Một số tương tác chính trên phổ HMBC của chất cleisindoside A.....	56
Hình 3.16.	Cấu trúc hóa học của chất neo-cleistantoxin	56
Hình 3.17.	Một số tương tác chính trên phổ HMBC của chất neo-cleistantoxin...	57
Hình 3.18.	Cấu trúc hóa học của chất CT1	59
Hình 3.19.	Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của chất CT1.....	61
Hình 3.20.	Cấu trúc hóa học của chất CT2	61
Hình 3.21.	Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY và NOESY của chất CT2	63
Hình 3.22.	Công thức cấu tạo của CT3.....	63
Hình 3.23.	Một số tương tác HMBC, COSY của chất CT3	64
Hình 3.24.	Cấu trúc hóa học của chất CT4.....	64
Hình 3.25.	Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của chất CT4.....	65
Hình 3.26.	Cấu trúc hóa học của chất CT5 và chất tham khảo.....	65
Hình 3.27.	Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của chất CT5.....	67
Hình 3.28.	Cấu trúc hóa học của chất CT6 và chất tham khảo cleistantoxin	67
Hình 3.29.	Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY và NOESY của CT6	68
Hình 3.30.	Cấu trúc hóa học của CT7 và chất tham khảo CT1.....	68
Hình 3.31.	Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY và NOESY của CT7	69
Hình 3.32.	Cấu trúc hóa học của chất CT8 và chất tham khảo CT1 và taiwanin C.....	70
Hình 3.33.	Một số tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của chất CT8	70
Hình 3.34.	Độ tinh khiết DSC của chất chuẩn cleistantoxin (a) và cleisindoside D (b).....	72
Hình 3.35.	Phổ UV cleistantoxin (a), Tạp 1 (b), Tạp 2 (c), Tạp 3 (d), Tạp 4 (e), Tạp 5 (f).76	
Hình 3.36.	Phổ UV của cleisindoside D (a), Tạp 1 (b), Tạp 2 (c), Tạp 3 (d).....	76
Hình 3.37.	SKĐ dd cleistantoxin 1000 µg/ml đo tại bước sóng 286 (a) và 203 nm (b).....	77
Hình 3.38.	SKĐ xác định khả năng tách của cleistantoxin với chất CT6 và CT1.....	77
Hình 3.39.	SKĐ dung dịch mẫu trắng và dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml	79
Hình 3.40.	Độ tinh khiết pic SK và phổ 3D của dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml	79

Hình 3.41.	SKĐ dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml và các dung dịch phân hủy	80
Hình 3.42.	SKĐ mẫu trắng và dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml	81
Hình 3.43.	Độ tinh khiết pic của cleisindoside D và phổ 3D của dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml	81
Hình 3.44.	SKĐ dd cleistantoxin 0,05 µg/ml (a) và cleisindoside D 0,1 µg/ml (b)	82
Hình 3.45.	Đường chuẩn của cleistantoxin (a) và cleisindoside D (b)	84
Hình 3.46.	Hàm lượng công bố trên ống chuẩn cleistantoxin (a) và cleisindoside D (b)	98
Hình 3.47.	SKĐ dung dịch phân giải (a), mẫu thử quả cây Chà chôi (b) và mẫu thử quả cây Cách hoa eberhardt (c)	108
Hình 3.48.	SKĐ của mẫu trắng (a), mẫu chuẩn phân giải (b), các mẫu chuẩn đơn (c, d, e, f) mẫu thử quả cây Chà chôi (g) và mẫu thử thêm chuẩn (h)	109
Hình 3.49.	Hệ số tinh khiết pic cleisindoside D trong dd chuẩn (a), thử (b) và thử thêm chuẩn (c)	110
Hình 3.50.	Hệ số tinh khiết pic cleistantoxin trong dd chuẩn (a), thử (b) và thử thêm chuẩn (c)	110
Hình 3.51.	Chồng phổ UV-Vis pic cleisindoside D và cleistantoxin trong dung dịch chuẩn và dung dịch thử	110
Hình 3.52.	Hàm lượng cleistantoxin và cleisindoside D được chiết bằng các hệ dung môi khác nhau	111
Hình 3.53.	Hàm lượng cleistantoxin và cleisindoside D chiết bằng các kĩ thuật khác nhau	112
Hình 3.54.	Sơ đồ qui trình chiết đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong dược liệu	113
Hình 3.55.	SKĐ của mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn	115
Hình 3.56.	Đường chuẩn của cleisindoside D (a) và cleistantoxin (b)	116
Hình 3.57.	SKĐ dung dịch thử quả Chà chôi ở nồng độ LOQ	120
Hình 3.58.	SKĐ định tính 4 lignan trong quả một số loài thuộc chi Cách hoa	120
Hình 4.1.	Công thức cấu tạo của các chất chuẩn và chất mới phân lập được từ quả Chà chôi	130

ĐẠT VẤN ĐỀ

Nghiên cứu, tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính sinh học từ thực vật dùng làm thuốc, nguồn bán tổng hợp thành thuốc và chất dẫn đường để định hướng tổng hợp và nghiên cứu phát triển thuốc mới đang được các nhà khoa học quan tâm. Trong đó, có nhiều hoạt chất đã phát triển thành thuốc điều trị ung thư như: vinblastin, vincristin được chiết xuất từ cây dừa cạn *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, podophyllotoxin (lignan) từ các loài *Podophyllum*, từ đó bán tổng hợp được etoposid và teniposid đang được sử dụng làm thuốc điều trị ung thư phổi.

Cùng với xu hướng nghiên cứu và phát triển thuốc mới từ thực vật, đặc biệt là thuốc điều trị ung thư, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam phối hợp với Viện Hóa học các hợp chất tự nhiên - Cộng hòa Pháp CNRS đã thu hái, định danh khoa học và thử sàng lọc hoạt tính sinh học của dịch chiết ethyl acetat của 2.500 loài thực vật của nước ta, trong đó nổi bật là dịch chiết từ quả cây Cách hoa Đông Dương (*C. indochinensis* Merr. ex Croiz), Chà chôi (*C. tonkinensis* Jabl) và Cách hoa eberhardt (*C. eberhardtii* Gagn) có phần trăm ức chế mạnh dòng tế bào ung thư biểu mô KB từ 88,40 đến 95,17%. Từ quả của 3 loài trên đã phân lập và xác định cấu trúc được nhiều hợp chất tinh khiết nhóm aryltetralin lignan như: cleistantoxin, cleisindoside D, cleisindoside A..... [82], [83], trong đó quả cây Chà chôi có hàm lượng 2 hoạt chất cleistantoxin, cleisindoside D cao nhất. Một điều rất thú vị là, các hợp chất cleistantoxin, cleisindoside D có cấu trúc hoá học gần giống etoposid và teniposid là 2 dẫn chất glycosid của podophyllotoxin đang được sử dụng làm thuốc điều trị ung thư phổi, tinh hoàn, buồng trứng...



Nghiên cứu liên quan cấu trúc cleistantoxin và cleisindoside D với tác dụng dược lý, cơ chế gây độc tế bào cho thấy các chất này có khả năng ức chế enzym

topoisomerase IIB và enzym caspase và được dự đoán có hoạt tính kháng tế bào ung thư [62] phù hợp với kết quả thử trên *in vitro* và *in vivo*, cleistantoxin có hoạt tính kháng ung thư mạnh nhất.

Từ các kết quả đó, *Đề tài độc lập cấp Nhà nước, mã số ĐTDLCN.14/16* của Bộ Khoa học và Công nghệ đã tiến hành thử hoạt tính kháng ung thư của cao khô chiết xuất từ quả cây Chà chôi trên chuột Nude cấy tế bào ung thư phổi người. Sau 6 tuần điều trị bằng cao khô với liều 100mg/kg cân nặng, cho thấy 100% chuột còn sống và kéo dài được thời gian sống so với nhóm chứng không được dùng cao. Vì vậy, cao khô đang được tiếp tục nghiên cứu, phát triển thành nguyên liệu thuốc.

Để xây dựng tiêu chuẩn cho cao khô chiết xuất từ quả cây Chà chôi, rất cần có chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D. Tuy nhiên, 2 chất này đang được nghiên cứu, phát triển thuốc mới nên trên thế giới chưa có chất chuẩn đối chiếu. Vì vậy, cleistantoxin và cleisindoside D phải được thiết lập thành chất chuẩn gốc. Đây là lĩnh vực nghiên cứu mới, hầu như ở Việt Nam còn chưa có công trình nào công bố về thiết lập chuẩn gốc, chủ yếu là thiết lập chuẩn thứ cấp.

Xuất phát từ nhu cầu thực tế, luận án "*Nghiên cứu phân lập, tinh chế, thiết lập chất chuẩn để định tính, định lượng một số lignan trong quả của chi Cleistanthus, họ Thầu dầu (Euphorbiaceae)*" là công trình đầu tiên đã thiết lập hai chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D từ quả cây Chà chôi (có hàm lượng 2 chất này cao nhất) với các mục tiêu sau:

1. Phân lập, tinh chế và khẳng định cấu trúc của cleistantoxin và cleisindoside D từ quả cây Chà chôi làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn và xác định cấu trúc các chất tinh khiết mới phân lập được.
2. Thiết lập được hai chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D.
3. Xây dựng và thẩm định phương pháp định tính và định lượng một số lignan trong quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*).

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN

1.1. TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU VỀ CHI CÁCH HOA TRÊN THẾ GIỚI VÀ TẠI VIỆT NAM

1.1.1. Tổng quan về chi Cách hoa (*Cleistanthus*)

1.1.1.1. Vị trí phân loại

Theo APG, chi Cách Hoa (*Cleistanthus*) được phân loại như sau:

Thực vật có hoa (*Angiosperms*)

Thực vật hai lá mầm thật sự (*Eudicots*)

Nhánh Hoa hồng (*Rosids*)

Bộ Sơ-ri (*Malpighiales*)

Họ Thầu Dầu (*Euphorbiaceae*)

1.1.1.2. Họ Thầu Dầu (*Euphorbiaceae*)

Họ Thầu Dầu (*Euphorbiaceae*) hay còn gọi là họ Đại Kịch là một họ lớn của thực vật có hoa với 240 chi và khoảng 6000 loài, được chia thành 5 phân họ bao gồm *Acalyphoideae*, *Crotonoideae*, *Euphorbioideae*, *Oldfieldioideae* và *Phyllanthoideae*. Ba phân họ đầu tiên là các phân họ một lá mầm trong khi hai phân họ sau là hai lá mầm. Phần lớn là thân cây thảo, ở khu vực nhiệt đới cũng tồn tại các loài cây bụi hoặc cây thân gỗ, phân bố chủ yếu ở khu vực nhiệt đới [2], [3].

1.1.1.3. Chi Cách hoa (*Cleistanthus*)

Chi Cách hoa (*Cleistanthus*) là một chi thuộc họ Thầu dầu thường phân bố ở các vùng nhiệt đới, cụ thể địa [6]. Một số công trình nghiên cứu trên thế giới cho thấy đây là chi chứa nhiều hợp chất có hoạt tính sinh học lý thú như hoạt tính chống ung thư, chống oxy hóa, kháng vi sinh vật.

Cleistanthus (do chữ latin *cleisto*, từ chữ Hy Lạp *kleistos*: đóng, không mở và *anthos*: hoa) – cách hoa, cọc rào. Là cây gỗ hay nhỏ, lá mọc so le xếp hai dãy, nguyên. Cụm hoa ở nách lá, thành xim đơn hoặc bông, nhiều hoa hoặc ít hoa; lá bắc thường ngắn hơn hoa; hoa không cuống hoặc có cuống, cùng gốc hoặc khác gốc; đài hợp ở gốc. Hoa đực có 4-6 lá đài, thường là 5, xếp van. Cánh hoa 5 nhỏ, thường nguyên. Đĩa mặt phẳng hay lõm. Bầu không lông hoặc có lông nhưng. Quả nang có 3 mảnh vỏ tròn ở lưng; hạt hình trứng - 3 góc.

Chi *Cleistanthus* có khoảng 140 loài mọc tự nhiên từ châu Phi, sang châu Á (Ấn Độ), đến Australia. Ở nước ta, theo sách “Cây cỏ Việt Nam” của tác giả Phạm Hoàng Hộ thì chi *Cleistanthus* có 14 loài [6] và theo sách “Taxonomy of *Euphorbiaceae* in Vietnam” của tác giả Nguyễn Nghĩa Thìn có 11 loài do một số loài là đồng vật (synonym) [61] đó là:

<i>C. acuminatus</i>	: Cách hoa nhọn
<i>C. concinnus</i> Croiz	: Cách hoa ca
<i>C. indochinensis</i> Merr.ex Croiz	: Cách hoa đông dương
<i>C. annamensis</i> Gagn	: Cách hoa ganep
<i>C. eberhardtii</i> (Gagn) Croiz	: Cách hoa eberhardt
<i>C. tonkinensis</i> Jabl	: Chà chôi, cọc rào
<i>C. sageretoides</i> Merr	: Cách hoa dạng Chanh châu
<i>C. sumatramus</i> (Miq.). Muell. Arg	: Cách hoa Sumatra
<i>C. longipedicellatus</i>	: Cách hoa cọng dài
<i>C. myrianthus</i> Kurz	: Cách hoa nhiều hoa
<i>C. peteloti</i> Merr. Ex Croiz	: Cách hoa Peteloti
<i>C. hirsutulib</i> Hook.f	: Cách hoa phún
<i>C. tomentosus</i> Hana	: Cách hoa dây lông
<i>C. pierrei</i> (Gagnep.) Croiz.	: Cách hoa Pierre

1.1.1.4. Đặc điểm thực vật của một số loài trong chi *Cleistanthus*

❖ Loài Cách hoa đông dương (*C. indochinensis* Merr. ex Croiz.)

Cây Cách hoa đông dương có tên khoa học là *Cleistanthus indochinensis* Merr. ex Croiz., là cây tiểu mộc, lá có phiến bầu dục thon, to 8- 14 x 3,5 - 5 cm, đầu có đuôi dài 1-1,5 cm, nhọn, đáy tù, gân phụ 8-9 cặp, cuống 5 mm, không lông. Hoa có lá đài 5, cao 4,5 mm, cánh hoa 5, đĩa mật tiểu nhụy 5, cái lép ở hoa đực, hoa cái ngũ phân. Nang cao 1 cm; mảnh 3-4, có vòi còn lại chẻ hai, hạt nâu tái. Cây phân bố ở nơi rất ẩm miền Bắc và miền Trung nước ta như Hoà Bình... [6]. [61].

❖ Loài Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis* Jabl.)

Cây Chà chôi có tên khoa học *Cleistanthus tonkinensis* Jabl, cây gỗ nhỏ cao 1 - 3 m; nhánh láng, đen. Phiến lá tròn dài, to 7 - 13 x 2 - 5 cm, chót có mũi nhọn, đáy tròn, mỏng, cứng, láng, gân phụ 7 - 8 cặp; cuống 1 cm, lá bẹ 2 - 3 mm. Chùm hoa cao 1 - 1,5 cm; hoa nhỏ, không cọng; cánh hoa 5, to 1 mm, tiểu nhụy 5, nhụy cái lép; hoa cái không cọng, cánh hoa 2 mm, đĩa mật quanh noãn sào có ít lông. Nang (quả) xoan, cao 1,3 cm, nâu đen, nở làm 3 mảnh; hạt hoe, cao 7 mm. Cây phân bố ở khu vực rừng trên đá vôi từ Cao Bằng, Lạng Sơn đến Nghệ An, Hà Tĩnh [6]. [61].

❖ Loài Cách hoa eberhardt (*Cleistanthus eberhardtii* Gagn.)

Cây Cách hoa eberhardt có tên khoa học là *Cleistanthus eberhardtii* Gagn, là loại cây đại mộc, cao khoảng 10 m, không lông, nhánh mảnh. Lá có phiến bầu dục thon, dài đến 14cm, đầu có mũi dài, đáy tù tròn, mỏng, gân phụ 7 - 9 cặp, cuống ngắn, lá bẹ tam giác cao 2 - 3 mm, mau rụng. Chùm 3 đến 5 hoa, không cọng, lá hoa cao 4

mm, hoa có 5 cánh hoa nhỏ, 5 tiểu nhụy quanh noãn sào lép; hoa cái có noãn sào có lông, noãn đứng, vòi nhụy 3. Cây phân bố ở Thừa Thiên Huế [6], [61].



(a)

(b)

(c)

Hình 1.1. Cây Cách hoa đông dương (a), Chà chôi (b), Cách hoa eberhardt (c)

1.1.2. Tình hình nghiên cứu thành phần hoá học và hoạt tính kháng ung thư của chi *Cleistanthus* trên thế giới và tại Việt Nam

1.1.2.1. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

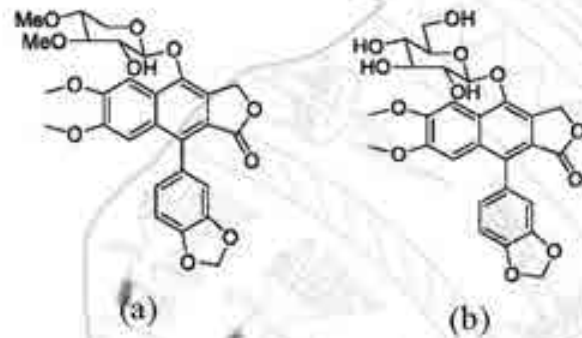
Chi *Cleistanthus* có nguồn gốc từ châu Phi, Ấn Độ, Úc, bao gồm khoảng 140 loài, nhưng chỉ có năm loài: *C. collinus* Roxb., ở Ấn Độ, *C. patulus* và *C. schlechteri* var. *Schlechteri* ở Nam Phi, *C. gracilis* Hook.f. ở Thái Lan và *C. indochinensis* ở Việt Nam đã được nghiên cứu thành phần hóa học, chủ yếu là các hợp chất nhóm aryl-naphthalide lignan, aryltetralin, furofuranoid, dibenzylbutan lignan và được nghiên cứu khả năng gây độc tế bào trên *in vitro* và *in vivo*.

❖ Loài *Cleistanthus collinus* Roxb ở Ấn độ

Cleistanthus collinus: một loài cây có độc tính cao được tìm thấy ở Nam Ấn Độ, tất cả các bộ phận của cây đều có độc tính đối với người, động vật và độc tố chính được tìm thấy từ các phần khác nhau của thực vật là lignan lacton, diphyllin và glycosid như cleistanthin A và B. Qua tổng quan các tài liệu về loài *Cleistanthus collinus* cho thấy loài cây là nguồn thực vật quý có tiềm năng dược lý. Nhiều tác giả đã nghiên cứu các phân đoạn và chất tinh được phân lập có khả năng ức chế sự phát triển các dòng tế bào ung thư trên *in vitro* và *in vivo* [12], [63], [69], [71].

Thamburaj Suman và cộng sự đã thử tác dụng gây độc tế bào *in vitro* của các dịch chiết và các phân đoạn nước, methanol, ethhyl acetat ($\geq 100 \mu\text{g/mL}$) từ bột lá khô *Cleistanthus collinus* Roxb (Virallimalai, Ấn Độ)... có khả năng kiểm soát đáng kể sự phát triển của dòng tiền tế bào mô mỡ 3T3-L1 trong thời gian 48 giờ [75]. Từ đó, nhiều tác giả đã tiến hành nghiên cứu hoá thực vật đã phát hiện trong lá cây có các thành phần như: cleistanthin A, cleistanthin B, cleistanon... [71], trong lõi gỗ cây có: taiwanin C, E, cleistanthin E,.... [12]. Các thử nghiệm trên *in vitro* cho thấy cleistanthin A có tác dụng kháng dòng tế bào ung thư biểu mô KB và ung thư biểu

mồ vòm họng SiHa [68], cleistanon tác dụng dòng TB ung thư MT₂, với giá trị LD₅₀ là 38,1 μ M so với chất đối chứng etoposid là 22,1 μ M [71]. Cleistanthin A và B có cấu trúc tương tự nhau đã được nghiên cứu tác dụng dược lý và cơ chế độc tính tế bào, cả 2 chất được dự đoán có khả năng chống ung thư [63] và hạ huyết áp [64].



Hình 1.2. Cây *C. collinus* và cấu trúc của cleistanthin A (a) cleistanthin B (b)

Cleistanthin A và cleistanthin B được tiếp tục nghiên cứu khả năng chống ung thư trên động vật so với thuốc chống ung thư. Cleistanthin A có hiệu quả kim giữ sự phát triển khối u ở những con chuột có chứa u lympho cổ tử cung Dalton và khối u rắn S-180, khối u được giảm đáng kể và tăng tuổi thọ của chuột tương tự như nhóm điều trị bằng cisplatin và etoposid [69]. Cleistanthin B thử *in vivo* với dòng ung thư biểu mô cổ tử cung của Ehrlich (EAC) và tế bào ung thư của Dalton (DAL) để tạo ra khối u cổ tử cung ác tính và khối u rắn trên chuột abino Swiss. Chuột được điều trị bằng cleistanthin B tiêm ba liều là 25, 50 và 100 mg/kg trong 10 ngày so với thuốc đối chứng 5-fluorouracil (5-FU) 20 mg/kg. Kết quả cho thấy cleistanthin B ở liều 50 mg/kg có hoạt tính kháng u dòng EAC và DAL nhưng không hiệu quả như 5-FU [81].

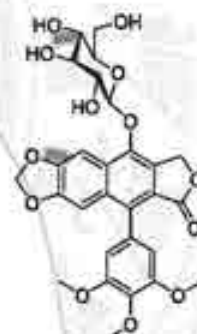
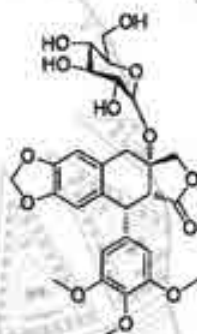
Từ kết quả nghiên cứu về loài *Cleistanthus collinus* Roxb tại Ấn Độ cho thấy, loài cây này được nghiên cứu rất kỹ lưỡng từ sàng lọc từng dịch chiết và phân đoạn thử hoạt tính gây độc tế bào trên *in vitro*, tiếp đó phân lập tìm được các chất tinh khiết, xác định cấu trúc và thử hoạt tính kháng tế bào ung thư trên *in vitro*, trong đó nổi bật là 2 chất cleistanthin A và B. Các chất này đã được nghiên cứu tìm đích tác dụng và dự đoán tác dụng dược lý cũng như độc tính của chúng. Hai ứng viên cleistanthin A và B sau khi dự đoán được tác dụng theo đích đã được tiến hành thử nghiệm tiền lâm sàng trên chuột đều cho kết quả rất khả quan so với nhóm thuốc đối chứng. Các ứng viên này có thể được tiếp tục nghiên cứu thử lâm sàng trên người. Đây là hướng nghiên cứu phát triển thuốc mới và thuốc có nguồn gốc từ tự nhiên đang được thực hiện trên thế giới.

❖ *Loài Cleistanthus patulus (Muell)*

Từ lõi gỗ loài cây *Cleistanthus patulus* (Muell) đã phân lập được các hoạt chất cleistanthosid A và B, taiwanin C, cleistanthin A, B, C và D diphyllin, cleistanon... [72]. Hợp chất cleistanthin A đã được thử hoạt tính trên *in vitro* và *in vivo* [68].

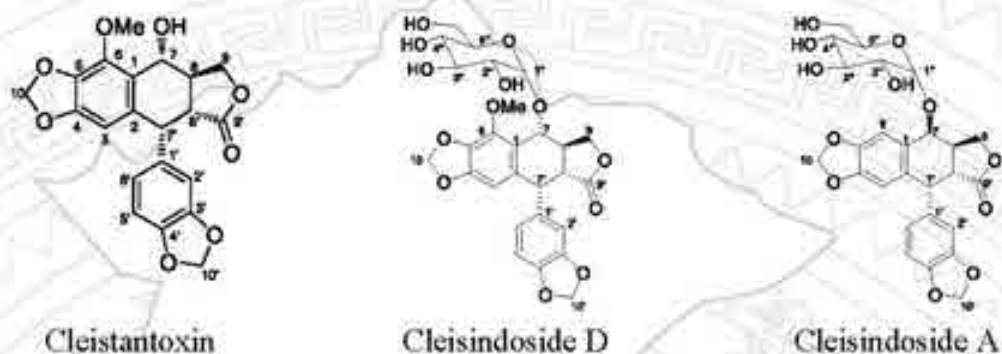
❖ *Loài Cleistanthus boivinianus (Baill) ở rừng Madagascar:*

Trong chương trình nghiên cứu của tổ chức hợp tác đa dạng sinh học quốc tế Madagascar (ICBG), dịch chiết ethanol của thân cây *Cleistanthus boivinianus* (Baill.) Müll. Arg. được tìm thấy có hoạt tính ức chế sự phát triển trung bình với dòng tế bào ung thư buồng trứng A2780 (IC_{50} 4,5 μ g/mL) và được lựa chọn để đánh giá tác nhân chống ung thư mới. Từ dịch chiết EtOAc của loài cây này, đã phân lập được hai lignans mới là: hợp chất (1) 3 α -O- (β -D-glucopyranosyl) desoxypodophyllotoxin có tác dụng kháng lại sự phát triển của dòng tế bào ung thư buồng trứng A2780, với IC_{50} giá trị tương ứng là $33,0 \pm 3,6$, $63,1 \pm 6,7$ và 230 ± 1 nM và hoạt tính kháng mạnh sự phát triển của dòng tế bào ung thư biểu mô HCT-116 ở người với giá trị IC_{50} là 20,5 nM. Hợp chất (2) 4-O- (β -D-glucopyranosyl) dehydropodophyllotoxin có tác dụng kháng lại sự phát triển của dòng tế bào ung thư buồng trứng A2780 ở mức trung bình với các giá trị IC_{50} là $2,1 \pm 0,3$ và $4,9 \pm 0,1$ μ M [90].



Hình 1.3. Cây *Cleistanthus boivinianus* và cấu trúc một số chất phân lập được
1.1.2.2. Tình hình nghiên cứu cấu tại Việt Nam

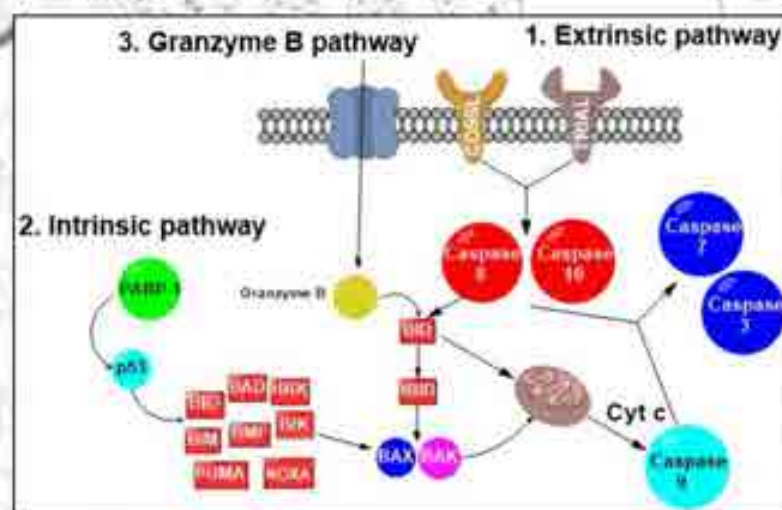
Trong khuôn khổ của dự án “Nghiên cứu sàng lọc các chất có hoạt tính sinh học từ thảm thực vật Việt Nam”, Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam phối hợp với Viện Hóa học HCTN – Cộng hòa Pháp CNRS đã phát hiện dịch chiết EtOAc của quả cây Cách hoa Đông Dương (*C. indochinensis* Merr.ex Croiz.), Chà chôi (*C. tonkinensis* Jabl.) và Cách hoa eberhardt (*C. eberhardtii* Gagn.) ức chế mạnh sự phát triển dòng tế bào ung thư biểu mô KB từ 88,40 đến 95,17% ở nồng độ 1 μ g/mL. Từ dịch chiết quả của 3 loài cây này đã phân lập và xác định được cấu trúc nhiều hợp chất có khung là aryltetralin lignan và các glycosid của chúng là: cleistantoxin, cleisindoside D, cleisindoside A có hàm lượng lớn trong cây, bên cạnh đó còn có: cleisindoside B, C, E và neo-cleistantoxin.... [82], [83].



Hình 1.4. Một số hợp chất nhóm lignan phân lập được từ quả cây chi Cánh hoa

Trong số các hợp chất mới phân lập được, cleistantoxin có hàm lượng lớn nhất trong quả cây và có hoạt tính kháng ung thư mạnh trên *in vitro* với các dòng tế bào: MCF7, MCF7R, HT29 với giá trị IC_{50} trong khoảng 14 - 36 nM (tương đương với khoảng 0,006 - 0,014 $\mu\text{g/ml}$), bên cạnh đó hợp chất này ức chế chọn lọc dòng tế bào ung thư vú kháng thuốc MCF7R với IC_{50} 14 nM khi so sánh với dòng ung thư vú thường MCF7: IC_{50} 36 nM [82]. Theo Viện nghiên cứu ung thư Mỹ (NCI), một hợp chất có giá trị $IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/ml}$ thì chất đó được coi là có hoạt tính gây độc tế bào.

Từ kết quả thử hoạt tính kháng tế bào ung thư trên *in vitro*, hợp chất cleistantoxin, cleisindoside D được xác định cơ chế gây độc tế bào bằng phương pháp mô phỏng tương tác giữa hợp chất nghiên cứu với đích phân tử. Cleistantoxin và cleisindoside D được gắn vào các protein tham gia vào ba con đường gây độc tế bào u ác tính thông qua apoptosis: con đường nội bào, con đường ngoại bào và con đường qua kênh Perforin/granzyme B (Hình 1.5).

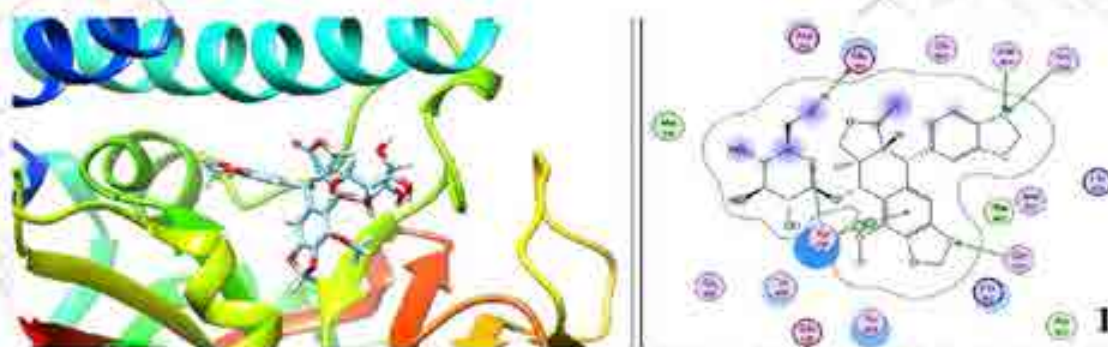


Hình 1.5. Chu trình Apoptosis tế bào [29]

Kết quả thu được cho thấy 2 hợp chất cleistantoxin và cleisindoside D có ái lực với các receptor của con đường nội bào (PARP-1, BID, BIM, NOXA, BAK). Những receptor còn lại không có sự liên kết hoặc tương tác tạo thành là không đáng

kê. Cleisindoside D là chất có độc tính mạnh hơn cleistantoxin và cũng có khả năng tương tác mạnh hơn với các đích thụ thể trên màng tế bào (Hình 1.6).

Xét giá trị điểm tương tác của các chất với receptor có sự liên kết, có thể thấy các hợp chất tương tác với PARP-1 là mạnh nhất. Cleisindoside D cho ái lực là -10.1 kCal/mol, thể hiện phức hợp giữa cơ chất và receptor là bền vững nhất (Hình 1.6).



Hình 1.6. Cấu trúc và tương tác các chất trong trung tâm hoạt động của PARP-1

Tóm lại, các hợp chất cleistantoxin và cleisindoside D có khả năng tiêu diệt tế bào ung thư do tác động lên quá trình chết theo chương trình (*Apoptosis*) theo cơ chế apoptosis nội bào [62].

Một điểm rất thú vị là, cleistantoxin phân lập từ quả cây chi Cách hoa có cấu trúc hóa học tương tự với podophyllotoxin được phân lập từ rễ và thân rễ của 2 loài trong chi *Podophyllum* [47] và glycosid của cleistantoxin là cleisindoside D có cấu trúc hóa học gần giống với etoposid, etopophos (etoposid phosphat) và teniposid, đang được dùng làm thuốc điều trị ung thư tinh hoàn và phổi [23], [36], [46].

Xác định được tiềm năng tác dụng kháng ung thư của dịch chiết và các chất tinh khiết cleistantoxin và cleisindoside D được chiết xuất, phân lập từ quả cây chi Cách hoa. Các nhà khoa học tiến hành chiết xuất cao khô từ quả cây Chà chối (có hàm lượng 2 chất cleistantoxin và cleisindoside D cao nhất) để thử tác dụng kháng ung thư trên chuột Nude tại Học viện Quân Y. Tế bào ung thư phổi người (công ty ATCC, Hoa Kỳ) được nuôi cấy trong môi trường thích hợp. Mỗi chai nuôi cấy diện tích 75 cm² được cấy 10⁶ tế bào, tế bào được nuôi cấy tăng sinh và thay môi trường 2 lần mỗi tuần ở điều kiện nhiệt độ 37°C, CO₂ 5%. Dung dịch tế bào ung thư đã chuẩn bị được tiêm 0,1 ml (khoảng 10⁶ tế bào) vào dưới da đùi phải chuột Nude. Chuột Nude được tiêm và tạo khối u, sau khi hình thành u, chuột được chia ngẫu nhiên thành 3 nhóm, mỗi nhóm 10 con:

Nhóm chứng: chuột mang u, không điều trị.

Nhóm CT-HSB 1: chuột mang u, được điều trị với liều 50mg/kg cân nặng (LD50 là 0,977g/kg).

Nhóm CT-HSB 2: chuột mang u, được điều trị với liều 100mg/kg cân nặng.

Đánh giá hiệu quả điều trị của cao khô chiết xuất từ quả cây Chà chôi (CT-HSB) trên chuột mang u tại thời điểm 5 tuần và 6 tuần sau điều trị, kích thước u nhóm CT-HSB 2 giảm đáng kể so với nhóm chứng và nhóm CT-HSB 1. Sự khác biệt này được duy trì đến khi kết thúc thí nghiệm. Tại thời điểm 6 tuần sau điều trị, nhóm điều trị bằng CT-HSB 1 có kích thước khối u nhỏ hơn đáng kể so với nhóm chứng ($p < 0,05$) và nhóm chứng còn 20% chuột sống, nhóm CT-HSB 2 còn 100% số chuột sống sót, nhóm CT-HSB 1 còn 60% số chuột sống. Có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê giữa nhóm điều trị bằng CT-HSB liều cao (CT-HSB 2) so với nhóm chứng và nhóm CT-HSB 1 về số lượng chuột sống. Thời gian sống trung bình của nhóm CT-HSB 2 và CT-HSB 1 kéo dài hơn so với nhóm chứng lần lượt là 45,43% và 21,14%. Từ kết quả đó cho thấy, nhóm chuột Nude được tiêm dung dịch tạo khối ung thư phổi được điều trị bằng CT-HSB 2 với liều 100mg/kg cân nặng cho thấy 100% chuột còn sống và kéo dài được thời gian sống của chuột. Vì vậy, cần tiếp tục nghiên cứu, phát triển cao khô CT-HSB 2 theo hướng tác dụng kháng ung thư phổi.

Để xây dựng tiêu chuẩn cho cao khô chiết xuất từ quả Chà chôi đang được nghiên cứu, phát triển thành nguyên liệu thuốc, rất cần có phương pháp định tính và định lượng cleistantoxin và cleisindoside D trong dược liệu và trong cao khô. Xuất phát từ nhu cầu này, luận án sẽ tiến hành thiết lập hai chất chuẩn định lượng cleistantoxin và cleisindoside D.

1.2. TỔNG QUAN VỀ NHÓM CHẤT ARYLTETRALIN LIGNAN

1.2.1. Định nghĩa

Lignan là một phân nhóm lớn trong nhóm phenol của các hợp chất có nguồn gốc tự nhiên theo con đường sinh tổng hợp acid shikimic và cấu trúc được kết hợp dimer giữa 2 phenylpropanoid C_6-C_3 từ acid cinnamic [7]. Chất lignan được biết đến nhiều nhất là podophyllotoxin được phân lập từ rễ của cây *podophyllum peltatum*, sau đó bán tổng hợp thành 3 glycosid là: etoposid, etopophos và teniposid hiện đang được dùng làm thuốc điều trị ung thư tinh hoàn và phổi [14], [24], [38].

1.2.2. Phân loại lignan

1.2.2.1. Nhóm lignan

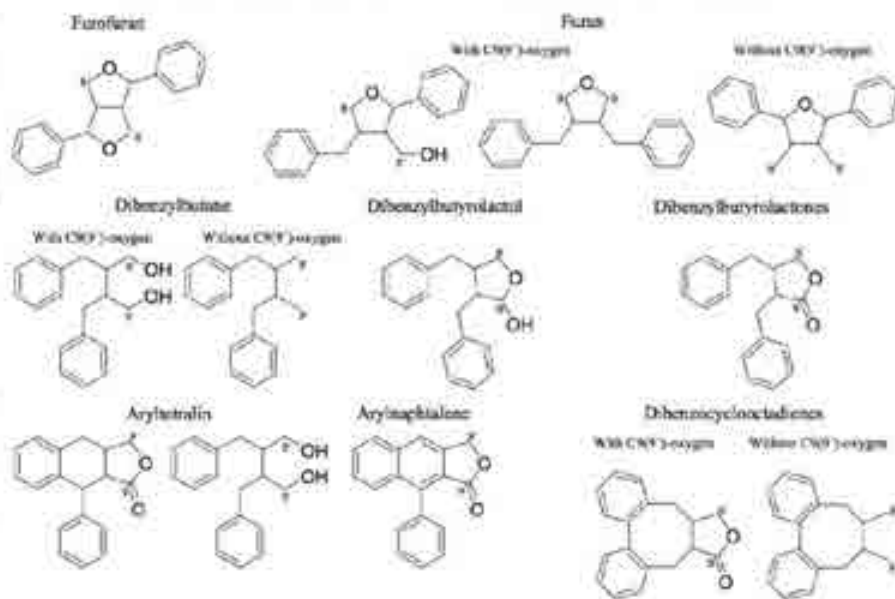
Lignan có 2 đơn vị phenylpropanoid C_6-C_3 , 2 nhóm nối với nhau bởi liên kết giữa các vị trí C-8 và C-8' (8-8' hoặc β - β') như: sauriol A. Danh pháp lignan được xem đơn vị C_6-C_3 là một propylbenzen và đánh số vòng từ 1-6 bắt đầu từ carbon liên kết với propyl, sau đó trên nhóm propyl đánh số từ 7 đến 9 bắt đầu từ carbon liên kết với vòng benzen. Với đơn vị C_6-C_3 thứ hai các số chỉ vị trí được thêm dấu ' [7], [78], [80].



Hình 1.7. Đơn vị phenylpropanoid (a) và cấu trúc lignan (b) [78]

Nhóm lignan được phân thành 8 nhóm dựa vào khung carbon và cách oxy kết hợp với khung: aryl-naphthalen, aryltetralin, dibenzocyclooctadien, dibenzylbutan, dibenzylbutyrolactol, dibenzylbutyrolacton, furan, furofuran.

- Dẫn xuất dibenzocyclooctadien
- Dẫn xuất aryl-naphthalen và aryltetralin
- Dẫn xuất dibenzylbutan, dibenzylbutyrolactol, dibenzylbutyrolacton
- Dẫn xuất furofuran
- Dẫn xuất furan



Hình 1.8. Một số khung cấu trúc của nhóm lignan [78]

1.2.2.2. Nhóm neolignan

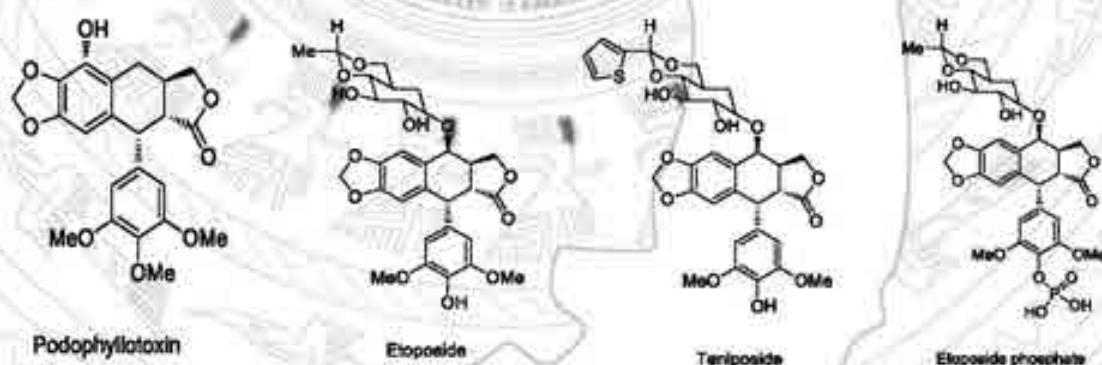
Sự vắng mặt của liên kết C-8 và C-8' thay vào đó là một liên kết hoá học khác, dimer được tạo ra từ 2 nhóm C6-C3 được gọi là "neolignan". Các hợp chất có nguyên tử O trong ete liên kết giữa 2 nhóm C6-C3 cũng nằm trong phân nhóm neolignan [7], [80].

- Benzofuran
- Alkyl aryl ether
- Benzodioxan
- Biphenyl neolignan
- Các neolignan khác

1.2.3. Một số hoạt chất nhóm aryltetralin lignan được phát triển thành thuốc.

Aryltetralin lignan là một nhóm lignan rất quan trọng đang thu hút được sự quan tâm của ngành công nghệ dược phẩm vì phân lập được nhiều hợp chất từ tự nhiên có hoạt tính sinh học thú vị trong đó nổi bật là podophyllotoxin. Podophyllotoxin là một aryltetralin cyclolignan tự nhiên có 4 trung tâm C bất đối liên tiếp (C1 – C4) và bốn vòng hợp nhất gần như phẳng (A – D). Podophyllotoxin được phân lập từ rễ và thân rễ của 2 loài trong chi *Podophyllum* thu hái từ tự nhiên là: *P. hexandrum* và *P. peltatum* (hàm lượng tương ứng 4,3% và 0,25%) [28].

Trong thế kỉ 19, dịch chiết cồn của rễ và thân rễ khô của 2 loài trên là Podophyllin được sử dụng điều trị các bệnh giang mai, bệnh lậu và ho [51]. Do tác dụng dược lí hữu ích, các nhà khoa học quan tâm nghiên cứu thành phần hóa học trong Podophyllin đã phân lập được độc tố podophyllotoxin (năm 1880) [65], [66], [67] và xác định được cấu trúc của podophyllotoxin (năm 1930) [18], sau đó 30 năm lần đầu tiên tổng hợp podophyllotoxin [32], [33]. Nhiều dẫn chất của podophyllotoxin cũng được phân lập từ 2 loài trên như: 4'-demethylpodophyllotoxin, α và β -peltatin, desoxypodophyllotoxin... [48], trong đó podophyllotoxin là hợp chất gây độc tế bào mạnh nhất, nhưng có độc tính trên đường tiêu hoá. Các glycosid của nó như: 4-O- β -D-glucosid podophyllotoxin, 4-O- β -D-glucosid 4'-demethylpodophyllotoxin được phân lập từ loài *Podophyllum versipelle* [20], các glycosid kém độc tính hơn aglycon nhưng hoạt tính kháng tế bào ung thư của chúng bị giảm xuống do tính chất các glycosid thân nước hơn. Các nghiên cứu bán tổng hợp các dẫn xuất podophyllotoxin, cho đến năm 1991 có khoảng 600 dẫn xuất được công bố có hoạt tính sinh học chống ung thư, trong đó 3 glycosid của podophyllotoxin là: etoposid, etopophos (etoposid phosphat) và teniposid, đang được dùng làm thuốc điều trị ung thư buồng trứng và phổi... [14], [24], [38].



Hình 1.9. Cấu trúc của podophyllotoxin, etoposid, teniposid và etoposid phosphat

Hiện nay, trên thị trường dược phẩm đang lưu hành các chế phẩm như: Vepesid ống tiêm tĩnh mạch 5, 25, 50 ml, mỗi ml chứa 20 mg etoposid và viên nang mềm chứa 50 hoặc 100 mg etoposid. Teniposid dung dịch truyền tĩnh mạch 50 mg trong ống 5 ml [38].

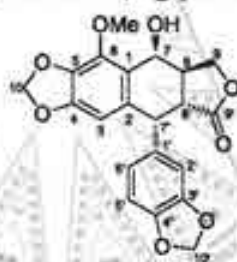
Đây là một trường hợp điển hình của nhóm chất aryltetralin lignan từ cao côn *Podophyllin*, hoạt chất *podophyllotoxin* phân lập được và các dẫn chất được bán tổng hợp từ *podophyllotoxin* đã được nghiên cứu thành công và đang được sử dụng làm thuốc. Vì vậy, nhóm nghiên cứu về chi *Cách hoa* của Viện HL KH & CN Việt Nam đã nghiên cứu phát triển cao côn, hoạt chất chính là *cleistantoxin* và *cleisindoside D* thành thuốc.

1.2.4. Một số hoạt chất chính nhóm aryltetralin lignan phân lập được từ quả của chi *Cleistanthus* tại Việt Nam

Trên thế giới có một số công trình nghiên cứu về các cây thuộc chi *Cleistanthus*, nhưng chưa có nghiên cứu nào công bố phân lập được hoạt chất *cleistantoxin*, *cleisindoside D*, *cleisindoside A* từ tự nhiên. Năm 2012, các nhà khoa học thuộc Viện Hàn lâm KH và CN Việt Nam đã lần đầu tiên phân lập, công bố cấu trúc và hoạt tính kháng tế bào ung thư của chất *cleistantoxin*, *cleisindoside D* phân lập từ quả cây thuộc chi *Cách hoa* (*Cleistanthus*), loài cây đặc hữu ở Việt Nam [82].

1.2.4.1. Hợp chất *cleistantoxin*

- Danh pháp IUPAC: (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-7-hydroxy-6-methoxy-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7'-cyclo lignan-9',9'-olid
- Công thức phân tử: C₂₁H₁₈O₈. Khối lượng phân tử: 398,0 Da.



Hình 1.10. Cấu trúc hoá học của *cleistantoxin* [82]

❖ Tính chất

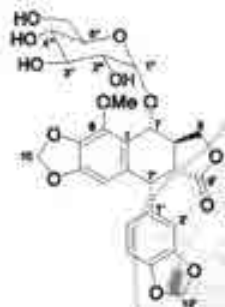
- Bột kết tinh màu trắng. Tan tốt trong dicloromethan, aceton và acetonitril, kém tan trong MeOH.
- Nhiệt độ nóng chảy: 195 - 196°C.
- Góc quay cực $[\alpha]^{30}_D$ -148,0 (*c* 0,5; CHCl₃) [82].

❖ Bộ dữ liệu phổ *cleistantoxin*

- Bộ dữ liệu phổ đã được công bố trong các nghiên cứu [82] bao gồm:
 - Phổ khối HRESI-MS m/z 421,0888 [M+Na]⁺ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử C₂₁H₁₈O₈Na, 421,0899)
 - Phổ UV (CHCl₃) λ_{max} nm (log ϵ): 207,3 (3,39); 240,0 (4,18); 286,7 (3,83)
 - Phổ IR (KBr) cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng ν_{max} : 3565, 3466, 2931, 1773, 1617, 1483, 1297, 1230, 1142, 1047 cm⁻¹
 - Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR trong dung môi CDCl₃ (Bảng 3.10) [82].

1.2.4.2. Hợp chất *cleisindoside D*

- Danh pháp IUPAC: 6-methoxy-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7'-cyclo lignan-9',9'-olide
- Công thức phân tử: $C_{27}H_{28}O_{13}$
- Khối lượng phân tử: 560,0 Da



Hình 1.11. Cấu trúc hoá học của *cleisindoside D* [83]

◇ **Tính chất:**

- Bột màu trắng. Tan tốt trong dicloromethan, aceton, methanol và acetonitril, kém tan trong nước.
- Nhiệt độ nóng chảy: 261 - 262°C.
- Góc quay cực $[\alpha]^{30}_D$ -188,0 (c 0,5; MeOH) [83].

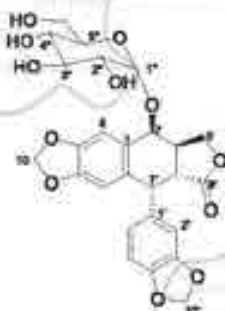
◇ **Bộ dữ liệu phổ *cleisindoside D***

Bộ dữ liệu phổ đã được công bố trong các nghiên cứu [83] gồm:

- Phổ khối HRESI pic $[M^+Na]^+$ cho tín hiệu m/z 583,1409 phù hợp với công thức phân tử $C_{27}H_{28}O_{13}Na$.
- Phổ UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 222,7 (4,37); 286,7 (3,82)
- Phổ IR (KBr) cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng ν_{max} : 3419, 2932, 1772, 1619, 1475, 1235, 1073, 1035 cm^{-1}
- Phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR trong dung môi $CDCl_3 + CD_3OH$ (Bảng 3.10) [83]

1.2.4.3. Hợp chất *cleisindoside A*

- Danh pháp IUPAC: (7-(β -D-glucopyranosyloxy)-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7'-cyclo lignan-9',9'-olide Công thức phân tử: $C_{26}H_{26}O_{12}$.
- Khối lượng phân tử: 530,0 Da



Hình 1.12. Cấu trúc hoá học của *cleisindoside A* [83]

◇ **Tính chất:**

- Bột màu trắng. Tan tốt trong dicloromethan, aceton, methanol và acetonitril, kém tan trong nước.
- Nhiệt độ nóng chảy: 261 - 262°C.
- Góc quay cực $[\alpha]_D^{30}$ -50,0 (*c* 0,5; MeOH) [83].

◇ **Bộ dữ liệu phổ cleisindoside A**

Bộ dữ liệu phổ đã được công bố trong các nghiên cứu [83] gồm:

- Phổ khối HRESI m/z 553,1323 $[M+ Na]^+$ (tính toán lý thuyết cho CTPT $C_{26}H_{26}NaO_{12}$, 553,1424).
- Phổ UV (MeOH) λ_{max} nm (log ϵ): 215,4 (4,32); 287,5 (3,98)
- Phổ IR (KBr) cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng ν_{max} : 3444, 2910, 1773, 1626, 1491, 1244, 1382, 1080, 1034 cm^{-1}
- Phổ 1H -NMR và ^{13}C -NMR trong dung môi $CDCl_3$ (Bảng 3.32) [83].

1.2.5. Một số phương pháp phân tích hoạt chất nhóm aryltetralin lignan trong dịch chiết thực vật

1.2.5.1. Phân tích các aryltetralin lignan trong cây *Podophyllum peltatum*.

Cây *Podophyllum peltatum* thu hái các vùng khác nhau tách riêng thành lá, cuống lá, thân rễ. Mẫu được làm khô ngay ở 40°C và nghiền thành bột mịn. Dung dịch chuẩn được chuẩn bị từ các chất tinh khiết được phân lập từ cây *Podophyllum resin* (Podophyllin Sigma) và *P. peltatum* trên cột silica gel, sau đó tinh chế bằng cách kết tinh hoặc sắc kí lớp mỏng điều chế thu được các chất tinh khiết.

Các chất phân lập được nhận dạng bằng cách so sánh trực tiếp các đặc tính vật lý và phổ (UV-VIS, 1H và ^{13}C -NMR) với chất chuẩn gốc hoặc so sánh với với các tài liệu đã công bố [16]. Độ tinh khiết sắc kí được xác định bằng HPLC/DAD [16] gồm (1-9) chất: podophyllotoxin 4-*O*- β -D-glucopyranoside (1), epipodophyllotoxin 4-*O*- β -D-glucopyranosid (2), 4'-demethylpodophyllotoxin (3), R-peltatin (4), epipodophyllotoxin (5), podophyllotoxin (6), peltatin (7) dehydrodesoxypodophyllotoxin (9) sử dụng thêm chất chuẩn nội acetylpodophyllotoxin (8) ($C=400 \mu g/ mL$ EtOH) [15]. Đây là hướng thiết lập chất chuẩn có nguồn gốc từ dược liệu đang được các nhà nghiên cứu thực hiện và có thể áp dụng để thiết lập chất chuẩn cho các nghiên cứu tiếp theo. Tuy nhiên, nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng và xác định độ tinh khiết sắc kí và tạp chất hữu cơ bằng HPLC, mà chưa xác định được tạp chất bay hơi và tạp chất vô cơ theo hướng dẫn của IP và WHO.

Jairo K.Bastos và cộng sự đã tiến hành xây dựng phương pháp phân tích mẫu thử được chuẩn bị 2 g mẫu khô của lá, cuống lá, thân rễ thêm 25g men sinh học khô và 10 ml dung dịch chuẩn nội/ EtOH 95% ($C=400 \mu g/ mL$) chiết xuất bằng EtOH. Điều

kiện sắc kí HPLC pha đảo là cột Tassil[®] với hệ dung môi B là MeOH: H₂O: CH₃COOH (84:15:1) chứa 0,1% NH₄COOH pH=3,46 và hệ dung môi C: ACN, chương trình gradient chạy 20 phút để lần lượt rửa giải các chất. Sau đó dùng hệ dung môi A: EtOH:tetrahydrofuran: Ete metyl tertbutyl (40:30:30) phối hợp với hệ dung môi C: ACN với tỉ lệ (40:60) để rửa giải các chất kém phân cực ra khỏi cột trong vòng 3 phút, cân bằng cột trong vòng 11 phút [16].

1.2.5.2. Phân tích các aryltetralin lignan trong cây *Schisandra chinensis*

0,5 g mẫu hạt nghiền thành bột được chiết lỏng siêu tới hạn với CO₂ để loại bỏ các chất kém phân cực trong dịch chiết siêu tới hạn như lipid. Đây là phương pháp chiết hiện đại nhằm loại bỏ các tạp chất kém phân cực trong dịch chiết trước khi các lignan được tiến hành phân tích trong điều kiện sắc kí lỏng pha đảo RP-HPLC sử dụng cột Separon SGX C18, (5µm, 150x 3mm), pha động MeOH: nước (v/v) 73:27 chạy đẳng dòng [79].

1.2.5.3. Phân tích các aryltetralin lignan trong cây *Cleistanthus indochinensis*

Nghiên cứu mới chỉ bước đầu xác định được hàm lượng cleistantoxin và cleisindosid B trong dịch chiết CH₂Cl₂ và MeOH từ quả cây Cách hoa đông dương [82], [83] và chiết phân đoạn bằng 2 dung môi CH₂Cl₂ và MeOH. Chương trình sắc kí lỏng pha đảo: cột Zorbax XDB C-18 và pha động là MeOH: nước và kĩ thuật chiết siêu âm ở nhiệt độ phòng, chưa khảo sát trên nhiều loại, thể tích dung môi chiết, kĩ thuật chiết để tìm được qui trình chiết cho hiệu suất cao nhất.

Dung dịch chuẩn cleistantoxin và cleisindoside B để xác định hàm lượng 2 chất này trong quả cây được pha từ chất tinh khiết cleistantoxin và cleisindoside B trong MeOH. Các chất tinh khiết này được phân lập, tinh chế từ 5,5 g cần chiết xuất từ 100 g quả cây Cách hoa Đông dương (*C. indochinensis*) bằng MeOH và xác định cấu trúc bằng nhiệt nóng chảy, $[\alpha]_D^{30}$ và phổ IR, UV, HRESI-MS, 1D và 2D-NMR [82], [83]. Tuy nhiên, 2 chất chuẩn được sử dụng mới chỉ dừng lại ở việc nhận dạng chính xác cấu trúc mà chưa tiến hành xác định được độ tinh khiết. Cần thiết lập chất chuẩn theo đúng hướng dẫn của IP, WHO, USP. Đây là hướng nghiên cứu mà luận án sẽ thực hiện để thiết lập các chất chuẩn gốc định lượng.

1.3. TỔNG QUAN VỀ CHẤT CHUẨN

1.3.1. Khái niệm

Nguyên liệu đối chiếu 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 [45].

Chất chuẩn đối chiếu (Reference standards) thường được gọi là chất chuẩn được WHO định nghĩa như sau: “Chất chuẩn đối chiếu là nguyên liệu đồng nhất, xác thực, được sử dụng trong các phép thử vật lí, hóa học mà ở đó các tính chất của nó

được so sánh với các tính chất của chất cần thử, với độ tinh khiết phù hợp với mục đích sử dụng” [87].

1.3.2. Phân loại chất chuẩn đối chiếu hóa học

1.3.2.1. Chất chuẩn gốc (primary chemical reference standards -PCRS)

❖ Khái niệm

Theo ICH Guideline Q7 định nghĩa: Chất chuẩn gốc là một chất được xác định nhiều đặc tính bằng các kỹ thuật phân tích phù hợp để trở thành nguyên liệu có độ tinh khiết cao và đáng tin cậy [41] và giá trị ấn định của nó được sử dụng làm tiêu chuẩn phân tích mà không cần phải so sánh với chất chuẩn khác” [86], [87].

❖ Phân loại chất chuẩn gốc (PCRS)

➢ Chất chuẩn gốc chính thức

Các chất chuẩn gốc chính thức có thể tìm được từ các nguồn sau: Trung tâm hợp tác về chất chuẩn đối chiếu của WHO, Hội đồng Dược điển Châu Âu, các phòng thí nghiệm trực thuộc của Hội đồng Dược điển Anh và Mỹ [22], [39].

- *Chất chuẩn quốc tế (ICRS)* là một chất chuẩn gốc được thiết lập tại Trung tâm hợp tác về các chất chuẩn của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO) về tiêu chuẩn chất lượng của các chế phẩm dược dụng. Các tổ chức tham gia hợp tác đánh giá ICRS do WHO chỉ định. 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 [43], [86].
- *Chất chuẩn gốc của Hội đồng Dược điển Châu Âu (EPRS)*: Được thiết lập và cung cấp bởi Ban thư ký Kỹ thuật thuộc Hội đồng Dược điển Châu Âu [30].
- *Chất chuẩn gốc của Hội đồng Dược điển Mỹ (USPRS)*: Được thiết lập và phân phối bởi Hội đồng chất đối chiếu Dược điển Mỹ [84].

➢ Chất chuẩn gốc nhà sản xuất

Trong trường hợp chưa có chất chuẩn gốc chính thức, nhà sản xuất có thể xây dựng chất chuẩn gốc của cơ sở (in-house primary reference standard) bao gồm số lô và đầy đủ đặc tính của chất chuẩn gốc. Chất chuẩn gốc của nhà sản xuất thường được các nhà phát minh xây dựng trong các giai đoạn nghiên cứu và phát triển thuốc.

1.3.2.2. Chất chuẩn thứ cấp (secondary chemical reference standards - SCRS)

❖ Khái niệm

Chất chuẩn thứ cấp là một chất chuẩn đối chiếu hóa học mà các tính chất hay chỉ tiêu chất lượng của nó được xác định bằng cách so sánh với một chất chuẩn gốc. Chuẩn thứ cấp được dùng làm chất chuẩn đối chiếu cho các phân tích thường ngày của phòng thí nghiệm [41], [86], [87].

❖ Phân loại chất chuẩn thứ cấp

➢ Chuẩn thứ cấp - SCRS “chính thức”

là một chuẩn thứ cấp khu vực hay quốc gia.

- Chuẩn thứ cấp - SRCS ASEAN: do các PTN của các HDDD, Viện Kiểm nghiệm quốc gia thiết lập, trong quá trình thiết lập chuẩn có sử dụng chuẩn gốc PCRS để so sánh. Quá trình thiết lập, phân phối chất chuẩn Được diễn do các HDDD thực hiện và tuân theo các hướng dẫn của ISO Guide 35 – 2017 [44].
- Chuẩn quốc gia - VNRS: Được thiết lập tại Viện Kiểm Nghiệm thuốc Trung ương (VKNT TU) - Bộ Y tế hoặc Viện Kiểm Nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh - Bộ Y tế (VKNT TPHCM) được đánh giá bởi ít nhất hai khoa thử nghiệm là khoa Thiết lập CC & CDC và một khoa khác, được liên kết với chất chuẩn gốc.

➤ **Chuẩn làm việc (Working standard)**

là một chuẩn thứ cấp do một nhà sản xuất hoặc một PTN tự thiết lập [11].

1.3.3. Tổng quan các hướng dẫn về thiết lập chất chuẩn gốc

Chất chuẩn gốc được công nhận rộng rãi nên quy trình thiết lập chất chuẩn gốc phải được ban hành bởi các tổ chức có thẩm quyền và tuân thủ nghiêm ngặt. Theo hướng dẫn ISO 17034 và ISO GUIDE 35 quy trình thiết lập chất chuẩn gốc các bước sau [40], [44].



Hình 1.13. Sơ đồ qui trình thiết lập chất chuẩn theo hướng dẫn ISO GUIDE 35 [44]

Theo hướng dẫn của ISO GUIDE 35 khi thiết lập chất chuẩn cần thực hiện các bước trên, trong đó hầu hết các bước thiết lập chất chuẩn đã được thực hiện theo qui trình thường qui. Tuy nhiên, đối với chất chuẩn gốc thì việc xác định các đặc tính (characterization) rất khác so với chất chuẩn thứ cấp và hầu như ở Việt Nam còn chưa có nghiên cứu nào công bố thiết lập chất chuẩn gốc. Vì vậy, luận án đã tổng quan tài liệu về xác định các đặc tính của chất chuẩn gốc gồm: xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn gốc và xác định độ tinh khiết của chất chuẩn gốc, theo hướng dẫn của IP và WHO [22] [86], [91], [94] (Hình 2.5).

❖ *Bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn gốc*

- Các mô tả vật lý

Cảm quan, kính hiển vi quang học, nhiệt độ nóng chảy, góc quay cực riêng,

- Bộ phổ:

Nếu chất chuẩn gốc được đề xuất có cấu trúc đã được xác định rõ ràng thì có thể nhận dạng thông qua bộ dữ liệu phổ IR, NMR, MS, UV bằng cách so sánh với các tài liệu đã công bố trước đó [39], [86], [91], [94]

Nếu chất chuẩn được đề xuất là chất có cấu trúc mới hoặc thiếu dữ kiện mô tả về tính chất thì ngoài việc sử dụng bộ phổ (IR, NMR, MS, UV) thì cần phải sử dụng thêm các kỹ thuật phân tích hiện đại dùng để mô tả các hợp chất mới như phân tích nguyên tố, nghiên cứu tinh thể học, phân tích nhóm chức,... để mô tả đầy đủ đặc tính của ứng viên thiết lập chất chuẩn gốc.

Nếu chất chuẩn gốc được phân lập lần đầu tiên, phải áp dụng các phép thử hóa học và vật lý thích hợp như cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), phổ khối lượng (MS) và phân tích nguyên tố để mô tả đặc tính cấu trúc. Độ tinh khiết của chất chuẩn gốc được xác định bằng nhiều kỹ thuật phân tích và yêu cầu phụ thuộc vào mục đích sử dụng chất chuẩn gốc [22] [39], [86], [91], [94].

❖ *Một số kỹ thuật xác định độ tinh khiết chất chuẩn gốc*

- Xác định tạp chất liên quan và tạp chất phân hủy bằng các kỹ thuật: HPLC/DAD, LC/MS, CE/DAD, CE/MS, thông dụng nhất HPLC/DAD sử dụng kỹ thuật chuẩn hoá điện tích hay so sánh với đáp ứng của chất chuẩn tạp [39], [86], [91], [94].
- Xác định tạp chất vô cơ bằng phương pháp cân sau nung (residue on ignition-ROI) hay tro sulfat [39], [86], [91], [94].
- Xác định lượng nước và các chất dễ bay hơi bằng mất khối lượng do làm khô, phân tích nhiệt trọng lượng TGA; ngoài ra lượng nước có thể được xác định bằng kỹ thuật chuẩn độ Karl Fischer, lượng dung môi dễ bay hơi xác định bằng GC [39], [86], [91], [94].
- Xác định độ tinh khiết trực tiếp bằng các kỹ thuật: qNMR, DSC...

1.3.3.1. Tổng quan một số kỹ thuật nhận dạng chất chuẩn gốc

❖ *Mô tả vật lý*

➤ *Kiểm tra cảm quan*

Các đặc điểm nhìn thấy được như màu sắc, kết cấu (texture), hình thái học (morphology) cũng như sự nhiễm bẩn nhìn thấy được. Các chất hầu như sẽ thay đổi màu sắc hoặc kết cấu khi tiếp xúc với các tác nhân như ánh sáng hoặc độ ẩm. Do đó, kiểm tra cảm quan là một biện pháp quan trọng để kiểm tra các chất chuẩn.

➤ *Kính hiển vi quang học*

Kính hiển vi quang học liên quan đến việc kiểm tra nguyên liệu thiết lập chuẩn và xác định sự kết tinh dưới kính hiển vi. Một đánh giá ban đầu về hình thái chất chuẩn, tinh đồng nhất, một khía cạnh định tính của khúc xạ ánh sáng bằng tinh thể có thể dễ dàng quan sát bằng kỹ thuật này. Các hạt tinh thể sẽ xuất hiện sự thay đổi từ sáng đến tối (hoặc thay đổi màu sắc), dạng vô định hình sẽ không thay đổi khi xoay bản soi của kính hiển vi phân cực.

➤ *Xác định nhiệt độ nóng chảy*

Nhiệt độ nóng chảy (Điểm chảy) của một chất là nhiệt độ đã hiệu chỉnh, tại đó hạt chất rắn cuối cùng của chất thử nghiệm chuyển thành trạng thái lỏng, bắt đầu biến màu, hóa than hoặc sủi bọt. Nhiệt độ nóng chảy là một hằng số vật lý biểu thị sự nhận dạng và độ tinh khiết của nguyên liệu. Để xác định điểm chảy hầu hết các chuyên luận nguyên liệu trong dược điển đều xác định theo phương pháp mao quản [5], [19], [86].

Tuy nhiên, các nguyên liệu thiết lập chất chuẩn thường được xác định nhiệt độ nóng chảy bằng kỹ thuật quét nhiệt vi sai (DSC) [59].

➤ *Góc quay cực riêng*

Theo DDVN V- Phụ lục 6.4: Góc quay cực là góc của mặt phẳng phân cực khi bị quay đi khi ánh sáng phân cực đi qua chất đó nếu là chất lỏng hoặc qua dung dịch chất đó nếu là chất rắn. Góc quay cực riêng ngoài việc cho biết chất chuẩn là tá tuyền hay hữu tuyền còn cho biết độ tinh khiết của chất chuẩn [5], [19], [86].

❖ *Bộ phổ nhận dạng về cấu trúc*

➤ *Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)*

- *Ưu điểm:* Phổ NMR cung cấp thông tin về cấu trúc phân tử rất chi tiết do phổ có tính đặc hiệu cao trong việc phát hiện một số hạt nhân nhất định như ^1H , ^{13}C , ^{31}P và ^{19}F [9], [73]. Vì vậy, phổ NMR là một kỹ thuật mạnh để xác định cấu trúc các hợp chất hữu cơ. Các cấu trúc tương đối đơn giản có thể được xác định bằng cách xác định độ dịch chuyển hoá học của H và C trên phổ một chiều: ^1H và ^{13}C . Đối với các chất cấu trúc phức tạp hơn, cần đo phổ hai chiều để xác định kết nối đồng nhất hoặc kết nối hạt nhân [84].

- *Nhược điểm:* Kỹ thuật NMR có độ nhạy tương đối thấp do sự khác biệt nhỏ về năng lượng giữa các trạng thái liên kết dẫn đến kết quả là sự khác biệt số lượng hạt nhân giữa 2 mức của chỉ có một phần triệu [84].
- *Ứng dụng:* Phổ NMR là một kỹ thuật hiệu quả trong xác định cấu trúc hóa học của các phân tử hữu cơ bằng cách giải phổ. Để xác định cấu trúc thường đo phổ 1D NMR, trong các trường hợp phức tạp cần sử dụng thêm phổ 2D. Bên cạnh đó, phổ NMR có thể được sử dụng cho mục đích định tính và định lượng [19], [30], trong trường hợp định tính phổ của nguyên liệu chất chuẩn phải luôn được ghi lại dưới cùng một điều kiện với chất phân tích, trường hợp không có sẵn dữ liệu tham chiếu cần bổ sung thêm phổ MS [58], [73]. Ngoài ra, phổ cộng hưởng từ hạt nhân định lượng (qNMR) sử dụng để xác định độ tinh khiết của chất chuẩn.
- **Phổ khối lượng (MS)**
 - *Ưu điểm:* Phổ MS sử dụng lượng mẫu nhỏ nhất có thể xác định được khối lượng tương đối của phân tử và thậm chí thành phần các nguyên tố của một hợp chất. Qua việc phân mảnh trong khối phổ có thể suy ra thông tin về cấu trúc hoặc thông tin về xác định khối lượng phân tử [1], [5], [9].
 - *Nhược điểm:* Phổ MS không phân biệt được các đồng phân. Trong ion hóa bằng dòng electron (EI), độ nhạy cỡ nanogram [96]; kỹ thuật EI thường tạo ra nhiều mảnh nhỏ, ít hoặc thậm chí không có ion phân tử cho nên đôi khi khó biện giải phổ. Trong trường hợp đó người ta dùng kỹ thuật ion hóa "mềm" hơn. Mặt khác, kỹ thuật này đòi hỏi phải hóa hơi mẫu nên ít thích hợp với các chất phân cực hoặc dễ bị nhiệt phân hủy [1].
 - *Ứng dụng:* Từ phổ khối thu được các thông tin định tính xác định khối lượng phân tử và thông tin về cấu trúc nhờ các mảnh thu được của các hợp chất hữu cơ như: các hợp chất mới, các chất chuyển hóa, tạp chất hay các sản phẩm phân hủy khác [5], [8], [50], [61], [70], [81], [84].
- **Phổ hồng ngoại (IR)**
 - *Ưu điểm:* Phổ IR là đặc trưng cho các nhóm chức có trong hợp chất hữu cơ (trừ trường hợp đồng phân quang học) và phổ IR thường không bị ảnh hưởng nhiều bởi sự có mặt của một lượng nhỏ tạp chất (vài phần trăm) trong chất thử [5], [86].
 - *Nhược điểm:* Ứng dụng về định tính của phổ IR trong trường hợp đồng phân quang học bị hạn chế [5], [9], [86].
 - *Ứng dụng:* Phổ IR được sử dụng chủ yếu để xác định cấu trúc và nhận dạng chất phân tích thông qua các đỉnh đặc trưng cho các nhóm chức đặc biệt trong phân tử hợp chất và định tính một chất bằng cách so sánh với phổ IR của chất chuẩn hoặc phổ trong thư viện phổ chất chuẩn để xác định 2 chất có giống nhau hay không [5], [9], [96]. Trong các Dược điển, phổ IR thường được sử dụng để định tính các

nguyên liệu thuốc bằng cách so sánh với phổ chất chuẩn [5], [19], [84], [86]. Bên cạnh đó, phổ IR được sử dụng để nhận dạng các chất chuẩn gốc bằng cách so sánh với dữ liệu phổ đã công bố trong nghiên cứu trước đây [11], [30], [86].

➤ **Quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến (UV-VIS)**

- *Nhược điểm:* Các hợp chất có cấu trúc nối đôi liên hợp mới hấp thụ tia UV-VIS, nên thực tế việc ứng dụng phổ UV bị giới hạn khi hợp chất hấp thụ kém/không hấp thụ UV. Tại vùng bước sóng dưới 200 nm xảy ra sự hấp thụ UV không chọn lọc, các dung môi đều hấp thụ ánh sáng tại vùng bước sóng này [96].
- *Ứng dụng:* Phổ UV-VIS dùng để định tính các chất bằng cách so sánh các cực đại, cực tiểu hấp thụ và tỷ lệ mật độ quang giữa các bước sóng đó phải nằm trong một giới hạn cho phép hoặc chồng phổ của chất cần phân tích với phổ của chất chuẩn hoặc so sánh với dữ liệu phổ đã công bố trước đây do cùng dung môi [11], [86]. Trong các Dược điển đã áp dụng quang phổ UV-VIS để định tính rất nhiều nguyên liệu và các dạng chế phẩm thuốc [5], [19], [30], [84], [86]. Mặt khác, phổ UV-VIS là một kỹ thuật cung cấp thêm thông tin để nhận dạng NLTLC bằng so sánh với dữ liệu phổ đã công bố trước đây do cùng dung môi [11], [84].

1.3.3.2. Tổng quan một số kỹ thuật xác độ tinh khiết chất chuẩn gốc

❖ *Nguồn gốc và phân loại tạp chất trong chất chuẩn gốc*

➤ **Nguồn gốc tạp chất**

Các tạp chất có thể phát sinh ra trong quá trình sản xuất và/hoặc bảo quản chất chuẩn gốc, các chất chuẩn gốc tiếp xúc với môi trường, tá dược hoặc bao bì trực tiếp tạo ra các tạp chất phân hủy [84].

➤ **Phân loại tạp chất**

- Tạp chất hữu cơ
- Tạp chất vô cơ
- Tạp chất bay hơi
- *Tạp chất hữu cơ:* có thể phát sinh ra trong quá trình sản xuất và/hoặc bảo quản chất chuẩn gốc. Các tạp chất này có thể được xác định hoặc không xác định, dễ bay hơi hoặc không bay hơi và bao gồm: nguyên liệu ban đầu, sản phẩm phụ, sản phẩm trung gian, sản phẩm phân hủy, thuốc thử, phối tử, các chất xúc tác, các đồng phân lập thể.
 - Tạp chất liên quan (TCLQ) thường được hình thành trong quá trình tổng hợp, phân lập và tinh chế chất chuẩn gốc [31].
 - Tạp chất phân hủy (TCPH) của chất chuẩn gốc được coi như là sản phẩm biến đổi hóa học được tạo thành trong quá trình sản xuất, phân lập, tinh chế, bảo quản bị ảnh hưởng của nhiệt, dung môi (pH), tác nhân oxy hóa, các chất phản ứng hóa học khác, độ ẩm, ánh sáng, bao bì, ... [26], [37], [42].

Để xác định độ tinh khiết của chất chuẩn gốc cần định lượng tổng các tạp chất hữu cơ. Vì vậy, cần xây dựng một phương pháp phân tích phù hợp để xác định và định lượng tạp chất hữu cơ sinh ra trong quá trình tổng hợp, phân lập tinh chế và bao gói chất chuẩn gốc có thể gây ra các TCLQ và TCPH [22]. Trong các dược điển, hầu hết các loại nguyên liệu thuốc và chế phẩm thuốc đều phải kiểm soát các tạp chất hữu cơ: TCLQ, TCPH... [5], [19], [30], [37], [84].

- *Tạp chất vô cơ*: tạp chất vô cơ có thể được tạo ra và thường biết trong quá trình sản xuất bao gồm [84]: thuốc thử, phối tử và các chất xúc tác; kim loại nặng hoặc kim loại còn dư; muối vô cơ và các chất khác (ví dụ: thiết bị lọc, than hoạt). Nguồn gốc tạp vô cơ có thể xuất phát từ: nguyên liệu, thuốc thử và dung môi sử dụng trong quá trình sản xuất/tổng hợp là ion vô cơ: clorid, sunfat, phosphat... và các kim loại nặng bắt nguồn từ các bình phản ứng và ống dẫn được sử dụng trong quá trình sản xuất, bộ lọc, thiết bị lọc và chất hấp phụ được sử dụng trong quá trình tinh chế và kết tinh cũng có thể giải phóng các kim loại nặng và muối của acid vô cơ [31], [96].
- *Tạp chất bay hơi bao gồm*: nước và dung môi tồn dư, trong đó dung môi tồn dư là chất lỏng hữu cơ được sử dụng trong quá trình tổng hợp, tinh chế các nguyên liệu thiết lập chất chuẩn. Các dung môi này thường có độc tính nên trong quá trình tổng hợp, tinh chế cần lựa chọn các dung môi ít độc tính hơn và các biện pháp kiểm soát thích hợp để hàm lượng tồn dư dung môi nằm trong giới hạn cho phép [5], [22], [84]. Bên cạnh đó, còn có các dung môi do hấp phụ nếu hoạt chất là chất dễ hút ẩm với các thành phần dễ bay hơi trong không khí hay gặp nhất là nước.

❖ *Các kỹ thuật xác định tạp chất trong chất chuẩn gốc*

Nhìn chung có hai hướng chính để xác định độ tinh khiết của chất chuẩn gốc là xác định trực tiếp hoạt chất chính và xác định gián tiếp qua hàm lượng từng loại tạp chất [22], [59], [86], [89].

➤ *Kỹ thuật xác định gián tiếp*

❖ **Nguyên tắc xác định gián tiếp**

Theo hướng dẫn của WHO, IP và USP khi thiết lập chất chuẩn gốc để định lượng cần phải xác định độ tinh khiết của chất chuẩn gốc. Để xác định độ tinh khiết của chất chuẩn gốc cần xác định hàm lượng từng loại tạp (tạp hữu cơ, tạp vô cơ, tạp chất bay hơi) trong chất chuẩn gốc bằng các kỹ thuật phân tích phù hợp [19], [30]. Độ tinh khiết của chất chuẩn gốc được tính theo công thức [22], [86], [91], [93]:

$$\begin{aligned} \text{Độ tinh khiết} &= (100 - \% \text{ tạp chất liên quan}) \times (100 - \% \text{ tạp bay hơi} - \% \text{ tạp vô cơ}) / 100 \\ &= \text{Độ tinh khiết sắc ký} \times (100 - \% \text{ tạp bay hơi} - \% \text{ tạp vô cơ}) / 100 \end{aligned}$$

Trong đó:

- Độ tinh khiết: hàm lượng phần trăm của chất chuẩn gốc (đơn vị %);

- % tạp chất liên quan: phần trăm tổng tạp chất liên quan tính theo phương pháp chuẩn hóa diện tích.
- Độ tinh khiết sắc kí = (100 - % tạp chất liên quan)
- ❖ **Tạp chất hữu cơ được xác định bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC)**
 - Trong đa số các chuyên luận nguyên liệu hóa dược của Dược điển [5], [19], [84], tạp chất liên quan được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng HPLC/DAD. Các phương pháp để định lượng tạp chất bằng HPLC là:
 - *Phương pháp 1: Chuẩn hóa diện tích*
 - Nguyên tắc: Hàm lượng của tạp đơn và tổng TCLQ tính theo công thức sau:
 - % tạp đơn = $\frac{S_{pic}(\text{tạp đơn})}{\Sigma S_{pic}} \times 100\%$
 - % tổng tạp chất liên quan = $\Sigma \% \text{ tạp đơn} = \frac{\Sigma S_{pic}(\text{tạp đơn})}{\Sigma S_{pic}} \times 100\%$
 - Trong đó:
 - $S_{pic}(\text{tạp đơn})$: diện tích của pic sắc kí của tạp đơn
 - ΣS_{pic} : tổng diện tích pic tất cả các pic trên SKĐ (pic của hoạt chất chính và tổng các TCLQ).
 - Ưu điểm: Đây là cách đơn giản nhất để định lượng TCLQ vì không cần chất chuẩn tạp [5], [19], [30], [84].
 - Nhược điểm: Yêu cầu các thành phần TCLQ đều có hệ số đáp ứng tương đối so với chất chuẩn gần với 1. Nếu không, phải tính hệ số đáp ứng. Vì vậy, phương pháp chỉ định lượng được TCLQ mà không định lượng được các tạp chất hữu cơ khác mà có hệ số đáp ứng khác xa 1. Tuy nhiên, khi xác định TCLQ của chất chuẩn được phân lập từ tự nhiên, bỏ qua sự hiệu chỉnh về hệ số đáp ứng vì thành phần tạp chất khó xác định nên không xác định được hệ số đáp ứng [25], [91].
 - Yêu cầu:
 - Khoảng nồng độ tuyến tính rộng: Do hàm lượng các TCLQ thường dưới 1% và độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn gốc trên 95%, nên phải xây dựng khoảng tuyến tính từ nồng độ của các TCLQ đến nồng độ của chất chuẩn. Trong một số trường hợp, hình dạng pic sắc ký của chất chuẩn ở nồng độ cao không còn đối xứng, pic tù và diện tích pic sẽ không tuyến tính trong khoảng nồng độ rộng, nên tính hàm lượng TCLQ bằng chuẩn hoá diện tích sẽ không chính xác.
 - Độ nhạy của phương pháp: vì hình dạng pic của chất chuẩn không đối xứng ở nồng độ cao nên có thể dẫn đến sự mất tuyến tính. Do đó, để duy trì tính tuyến tính ở nồng độ của chất chuẩn, người phân tích sẽ giảm nồng độ mẫu để cải thiện hình dạng pic của chất chuẩn. Tuy nhiên, nếu nồng độ mẫu quá thấp sẽ ảnh hưởng đến độ nhạy của phương pháp và không phát hiện đầy đủ các TCLQ có hàm lượng thấp [25], [91].

- *Phương pháp 2: Pha loãng dung dịch thử (Low-high)*
- Nguyên tắc: Mẫu chất chuẩn được chuẩn bị ở hai nồng độ cao và nồng độ thấp. Mục đích tiêm mẫu nồng độ cao nhằm phát hiện tất cả các tạp chất nên tăng độ nhạy của phương pháp. Tiêm mẫu ở nồng độ thấp được sử dụng để diện tích của chất chuẩn trong mẫu nồng độ thấp sẽ tuyến tính với diện tích của TCLQ có trong mẫu nồng độ cao. Do đó chỉ cần một khoảng tuyến tính hẹp để định lượng TCLQ.
- Ưu điểm: khắc phục hạn chế của khoảng tuyến tính rộng trong phương pháp chuẩn hóa diện tích và tăng độ nhạy phát hiện TCLQ.
- Nhược điểm: Thời gian phân tích tăng lên gấp đôi và có thể mắc sai số do pha loãng.
- *Phương pháp 3: Sử dụng chất chuẩn tạp*
- Ưu điểm:
 - Khoảng tuyến tính hẹp: Phương pháp chuẩn ngoại sử dụng một đường chuẩn được pha từ chất chuẩn tạp và chỉ yêu cầu khoảng tuyến tính hẹp, nên ưu điểm hơn so với phương pháp chuẩn hóa diện tích.
 - Tăng độ nhạy của phương pháp: phương pháp này chỉ tính riêng các tạp chất liên quan đơn khí so sánh với chất chuẩn tạp. Vì vậy, diện tích pic hoạt chất trong mẫu thử không cần thiết cho việc tính toán nên có thể sử dụng nồng độ mẫu cao khi mà diện tích pic có thể nằm ngoài khoảng tuyến tính, để phát hiện được hết tạp chất vì vậy tăng độ nhạy của phương pháp.
 - Tăng khả năng định danh các tạp chất có trong chất chuẩn gốc, nếu biết các tạp chất bên cạnh chất chuẩn gốc có thể dùng chất chuẩn tạp này để xác định độ phân giải của tạp chất này so với chất chuẩn gốc.
- Nhược điểm: Cần phải có một chất chuẩn tạp với giá thành khá đắt và không xác định được tổng tạp chất LQ. Ngoài ra, mỗi phép phân tích đòi hỏi phải cân chính xác một lượng nhỏ chuẩn tạp. Vì vậy, sai số khi cân có thể ảnh hưởng đến độ chính xác và độ đúng của phương pháp.

❖ **Xác định tạp vô cơ**

Cần xác định giới hạn tạp chất vô cơ vì một số tạp vô cơ (thủy ngân, arsen, hydrazin...) có độc tính. Mặt khác, hàm lượng của các tạp chất vô cơ trong chất chuẩn cũng là một chỉ tiêu đánh giá độ tinh khiết của chất chuẩn gốc trong quá trình sản xuất/ tinh chế [96]. Để xác định độ tinh khiết của chất chuẩn gốc cần định lượng tổng tạp chất vô cơ theo một số phương pháp sau: [22], [39], [84], [86], [91].

- *Cẩn sau nung (residue on ignition)*
- Cách tiến hành: DDVN V - Phụ Lục 9.9 Cẩn sau nung, USP 40 <281> residue on ignition [5], [84], [86].
- Nhược điểm: Phương pháp cẩn sau nung dùng nhiệt độ lên đến 600°C để vô cơ hoá mẫu, nhưng nếu lên nhiệt độ này mà mẫu không được vô cơ hết sẽ gây sai số.

Mặt khác, lượng mẫu thử thường dùng khá nhiều (từ 1-2 g) được tính từ giới hạn cần sau nung đã quy định sao cho khối lượng cần còn lại (khoảng 1 mg) có thể cân được để đảm bảo độ chính xác [5], [84], [86]. Vì vậy, để xác định tạp chất vô cơ trong chất chuẩn gốc tốn một lượng mẫu khá lớn.

- Ứng dụng: Phương pháp này thường được sử dụng để xác định hàm lượng các tạp chất vô cơ trong nguyên liệu thuốc trong các dược điển [5], [84].
- *Phương pháp xác định tro sulfat (Sulfated ash)*
- Cách tiến hành: IP-2.3 Sulfated ash, Ph.Eur-5.6, JP-2.44, ĐĐVN V - Phụ Lục 9.6
- Ưu điểm: Phương pháp này đã sử dụng acid sulfuric đặc để vô cơ hoá hết mẫu, rồi nung đến 800°C để vô cơ lượng mẫu còn lại và phân huỷ acid sulfuric có trong mẫu thành SO₂ bay hơi. Lượng cần còn lại là lượng tạp chất vô cơ có trong mẫu.
- Nhược điểm: Lượng mẫu thử thường dùng khá nhiều (từ 1-2 g) được tính từ giới hạn tro sulfat đã quy định sao cho khối lượng tro sulfat (khoảng 1 mg) có thể cân được để đảm bảo độ chính xác [5], [84], [86]. Vì vậy, để xác định tạp chất vô cơ trong chất chuẩn gốc tốn một lượng mẫu khá lớn.
- Ứng dụng: Phương pháp tro sulfat đã được áp dụng để xác định các tạp chất vô cơ trong các nguyên liệu hòa dược trong ĐĐVN V. Xác định tạp chất vô cơ trong chất chuẩn gốc tốn một lượng mẫu khá lớn, nhưng theo các hướng dẫn của IP, WHO và USP khi thiết lập chất chuẩn gốc vẫn sử dụng phương pháp cần sau nung (ROI) hoặc tro sulfat (Sulfat Ash) để định lượng tổng lượng tạp chất vô cơ.

❖ **Xác định tạp chất bay hơi**

• *Mất khối lượng do làm khô*

Mất khối lượng do làm khô là kỹ thuật thông dụng để xác định tạp chất bay hơi trong nguyên liệu hoá dược. Tuy nhiên, kỹ thuật này sử dụng lượng mẫu khá lớn (1-2 g) không phù hợp khi xác định hàm lượng tạp chất bay hơi trong nguyên liệu thiết lập chất chuẩn.

• *Kỹ thuật phân tích nhiệt lượng (TGA)*

- Nguyên tắc: Tương tự phương pháp mất khối lượng do làm khô. Trong TGA chất phân tích được kiểm soát bởi một chương trình nhiệt độ và khối lượng của nó được xác định liên tục như một hàm số của nhiệt độ/thời gian. Hai thông số thực nghiệm được xác định đồng thời là mất khối lượng và khối lượng còn lại. Tổng “mất khối lượng” và “khối lượng còn lại” cộng lại bằng 100% [17], [19], [84]. Phương pháp phân tích nhiệt lượng đã được đưa vào USP 40 để xác định tổng hàm lượng của nước và các dung môi khác ở dạng tự do hoặc liên kết [84], [96].
- Ưu điểm: Lượng mẫu cần dùng nhỏ (10-20 mg) nên phù hợp trong thiết lập chất chuẩn [84].

- Nhược điểm: Có thể xảy ra sự không đồng nhất mẫu, lượng mẫu nhỏ có thể không mang tính đại diện cho chất phân tích. Khối lượng mẫu nhỏ thì lượng dung môi tồn dư chứa trong đó chỉ rơi vào khoảng một vài microgram và có thể gây sai số tương đối lớn khi độ nhạy giới hạn của thiết bị (0,1-1,0 μg). Bên cạnh đó, không cho biết cụ thể phần khối lượng giảm đi là của nước hay của dung môi khác [35]. Khi muốn xác định dung môi tồn dư sử dụng kỹ thuật sắc ký khí (GC) và xác định hàm lượng nước bằng Karl Fischer.
- Ứng dụng: Khi xác định tổng hàm lượng tạp chất bay hơi của chất chuẩn nên sử dụng kỹ thuật TGA để sử dụng lượng chất nhỏ nhất.

➤ **Kỹ thuật xác định độ tinh khiết trực tiếp**

◇ **Nguyên tắc**

Kỹ thuật xác định độ tinh khiết trực tiếp thì % độ tinh khiết của chất chuẩn bằng % hoạt chất chính.

◇ **Phân loại**

Các phương pháp điển hình như: chuẩn độ, sử dụng phản ứng có hệ số tỷ lệ đã biết, quét nhiệt vi sai, phổ cộng hưởng từ hạt nhân định lượng (qNMR)... Tuy nhiên, các phương pháp này chỉ đóng vai trò hỗ trợ để xác nhận lại giá trị độ tinh khiết thu được sau khi định lượng bằng các phương pháp khác [19], [27], [87]

◇ **Các phương pháp xác định độ tinh khiết trực tiếp**

• **Kỹ thuật quét nhiệt vi sai (DSC)**

- Yêu cầu: NLTLCC phải có độ tinh khiết cao > 95% và tốt nhất nên > 97%.
- Ưu điểm: DSC là kỹ 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 kỹ thuật định lượng bằng HPLC. Phương pháp này được khuyến sử dụng trong thiết lập chất chuẩn vì lượng mẫu thường từ 1- 3 mg. Theo Ph.Eur trong chuyên luận chung, độ tinh khiết của chất chuẩn gốc được xác định giá trị ấn định bằng kỹ thuật sắc ký hoặc phổ cần được xác minh độc lập bằng kỹ thuật quét nhiệt vi sai (DSC) nếu thích hợp [20], [21], [22], [30], [39], [74].

➤ **Kết hợp cả 2 kỹ thuật xác định độ tinh khiết trực tiếp và gián tiếp**

Kết quả thu được từ các kỹ thuật xác định độ tinh khiết gián tiếp bằng phương pháp cân bằng khối lượng (Mass-balance) và được xác nhận lại độ tinh khiết bằng các kỹ thuật đo trực tiếp. Nếu kết quả khác biệt nhau nhiều, cần tiến hành đánh giá lại để tìm nguyên nhân. Điều này đảm bảo rằng tất cả các tạp chất đã được phân tích đầy đủ trong quá trình xác định hàm lượng chuẩn. Nhiều tác giả đã sử dụng phương pháp cân bằng khối lượng để xác định hàm lượng của chất chuẩn gốc acid folic và diosgenin (xác định tạp liên quan bằng HPLC/DAD, xác định tồn dư dung môi bằng GC, hàm lượng nước bằng Karl Fischer và xác định tạp vô cơ bằng tro sulfat [34].

1.3.4. Tình hình thiết lập chất chuẩn gốc trên thế giới và tại Việt Nam

1.3.4.1. Tình hình thiết lập chất chuẩn gốc trên thế giới

Trên thế giới có các trung tâm thiết lập chất chuẩn gốc lớn như Hội đồng Dược điển quốc tế, Hội đồng Dược điển Mỹ, Hội đồng Dược điển Châu Âu... và một số công ty Dược phẩm lớn khác như Sigma, Merk, LGC standards, Chromadex...

Một trong những trung tâm thiết lập chất chuẩn lớn trên thế giới là Trung tâm thiết lập chất chuẩn của WHO, mỗi năm trung tâm này nghiên cứu và thiết lập chất chuẩn gốc mới phục vụ cho nghiên cứu và phát triển thuốc mới. Năm 2005, theo báo cáo số 32 của WHO trong báo cáo kỹ thuật 832, WHO đã thiết lập thêm 4 chất chuẩn gốc mới là Didanosin, Didanosin, Efavirenz, Nevirapin. Theo báo cáo năm 2014, Ban ICRS đã xét các báo cáo thiết lập và giám sát ICRS và thông qua các chất chuẩn gốc mới (Biperiden HCl ICRS 1, Clofazimine ICRS 1, Cytarabine ICRS 1, Hydrobromide ICRS 1, Gallamine triethiodide ICRS 1, Glibenclamide ICRS 1, Salbutamol sulfate ICRS 1, Vimolol maleate ICRS 1, Valproic acid ICRS 1, Verapamil HCl ICRS 1).

Hội đồng Dược điển Châu Âu cung cấp chất chuẩn Dược điển Châu Âu cho tất cả các phép thử định tính, định lượng và thử tạp chất trong các chuyên luận trong Dược điển Châu Âu, bên cạnh đó Hội đồng Dược điển Châu Âu còn tham gia chương trình hợp tác phát triển CCDC của Trung tâm hợp tác về chất chuẩn gốc của WHO [30]. Từ 16/04/2010, EDQM chịu trách nhiệm thiết lập, lưu trữ và phân phối các ICRS của WHO từ Apoteket AB (trung tâm cộng tác WHO trước đây về ICRS) [92]. Trong năm 2015, EDQM đã triển khai 26 dự án trong các lĩnh vực khác nhau dẫn đến việc thiết lập 5 chất chuẩn gốc mới; 8 dự án tiến hành để thiết lập các lô thay thế cho các chất chuẩn gốc trước đó; 5 dự án tiến hành để xây dựng các CCDC cho các chuyên luận mới hoặc các yêu cầu mới trong các chuyên luận đã có. Cũng trong năm 2015, EDQM đã thông qua 5 báo cáo thiết lập chuẩn ICRS được đưa ra bởi PTN của EDQM (Abacavir sulfate ICRS 2; Artemether ICRS 2, Rifampicin ICRS 3 và Stavudine impurity F ICRS 1). Vào cuối năm 2015, đã có 2.708 CCDC trong Ph.Eur. Trong năm 2016, EDQM đã thiết lập được 4 chất chuẩn gốc, tiến hành 7 dự án nhằm thiết lập các lô thay thế cho các CCDC hiện hành và 8 dự án để xây dựng các chất chuẩn cho các chuyên luận mới hoặc các yêu cầu mới trong chuyên luận hiện hành. Hiện tại theo danh sách cập nhật tháng 05/2018, EDQM cung cấp hơn 2.800 CCDC và giá của các chất chuẩn dao động trong khoảng 79-1000 € [53], [92].

Hội đồng Dược điển Mỹ cung cấp CCDC Dược điển Mỹ cho tất cả các dược chất, tá dược, tạp chất, sản phẩm phân hủy và thực phẩm chức năng có trong các chuyên luận của Dược điển Mỹ. Lịch sử phát triển về thiết lập chất chuẩn gốc của USP từ năm 1936, mới chỉ có 6 chất chuẩn gốc đến năm 2013 đã phát triển mạnh và danh sách chất chuẩn gốc lên tới hơn 3000 chất chuẩn với hơn 400 chất chuẩn gốc

mới trong các giai đoạn khác nhau của phát triển thuốc mới. Hiện nay USP đang cung cấp hơn 3.500 CCDC của hợp chất thuốc, tá dược, tạp chất, sản phẩm phân hủy, thực phẩm chức năng... Giá của các CCDC này dao động từ 125 - 2.875\$ theo thống kê cập nhật vào tháng 05/2018 [95]. Việc thiết lập USPR được thực hiện bởi ít nhất 3 PTN đáp ứng tiêu chuẩn [84].

Bên cạnh các hội đồng dược điển cung cấp các chất chuẩn gốc thì các trung tâm nghiên cứu và các nhà phát minh thuốc mới cũng đã nghiên cứu và công bố các kết quả của mình như thiết lập chất chuẩn gốc Glibenclamid [55], Itraconazol [56]...

1.3.4.2. Tình hình thiết lập chất chuẩn gốc tại Việt Nam

Hiện nay, ở Việt Nam có hai đơn vị cung cấp chất chuẩn chính thức là Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương (VKNT TŨ) và Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM (VKNT TPHCM) chủ yếu thiết lập chất chuẩn thứ cấp được nối với chuẩn quốc tế mà chưa có công bố về thiết lập chất chuẩn gốc.

Năm 2008 - 2010, VKNT TŨ đã phối hợp với các cơ sở nghiên cứu trong nước như Trường Đại học Dược Hà Nội, Viện Dược liệu... thực hiện đề tài nghiên cứu cấp Nhà nước thiết lập 10 chất chuẩn đối chiếu quốc gia có nguồn gốc dược liệu.

VKNT TŨ hiện cung cấp 10 chất chuẩn thứ cấp từ dược liệu bên cạnh hàng trăm chất chuẩn tân dược. Viện KNT TP HCM cung cấp 213 chất chuẩn tân dược và 18 chất chuẩn từ dược liệu (8/2018) [4], [10].

Bên cạnh đó, có nhiều đề tài cấp nhà nước KC 10, Đề tài cấp Bộ, Dự án cấp Sở (Sở KH&CN TP.HCM) đã chiết xuất, phân lập, thiết lập được một số chất chuẩn từ dược liệu gồm: acid oleanolic, asiaticosid, curcumin I, damnacanthal, diosgenin, hesperidin, ginsenosid-Rb1, ginsenosid-Rg1 và majonosid-R2... [4]

1.4. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Nghiên cứu phát triển thuốc mới, đặc biệt là thuốc điều trị ung thư có nguồn gốc từ tự nhiên hay tổng hợp hoá dược là hướng nghiên cứu mà các nhà khoa học trên thế giới đang tìm kiếm những ứng viên nổi trội để có thể đưa ra thị trường dược phẩm.

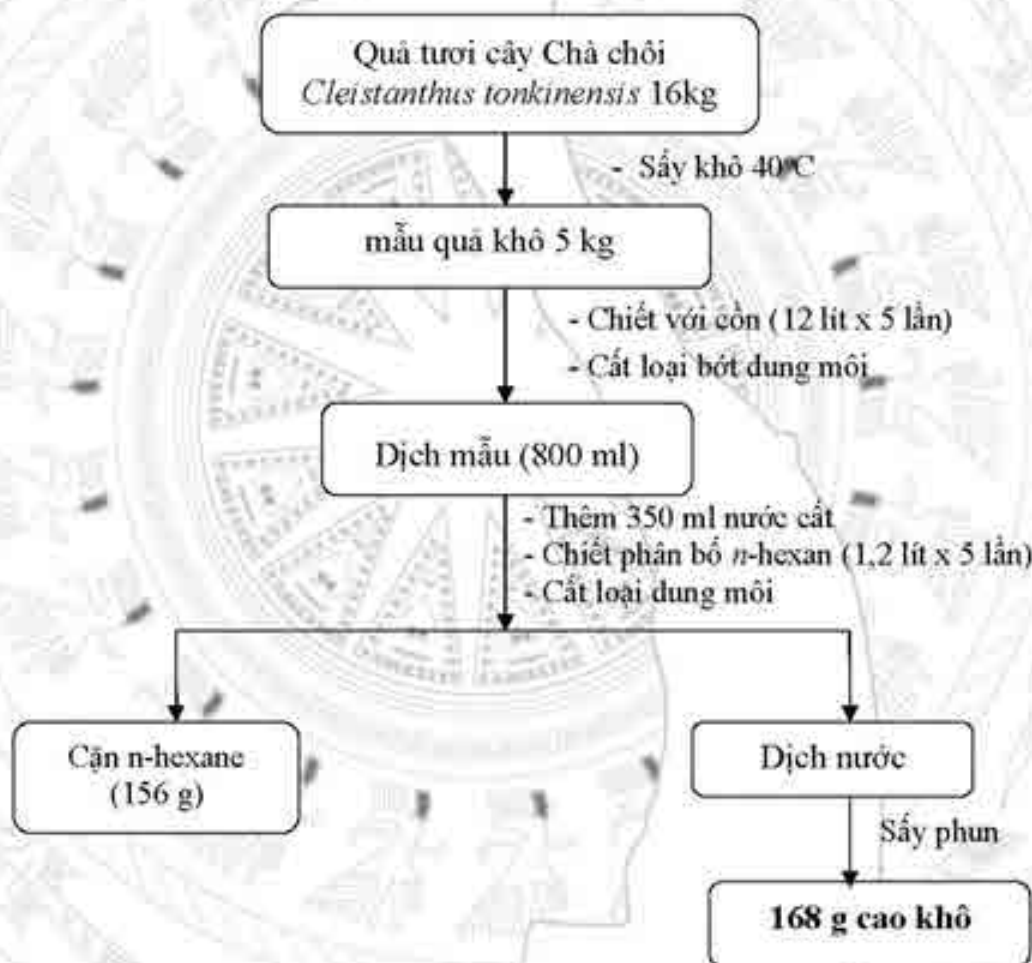
Đây cũng chính là nhu cầu cần thiết cho chuyên ngành kiểm nghiệm thuốc là nghiên cứu thiết lập chất chuẩn gốc phục vụ cho nghiên cứu phát triển thuốc mới trong các pha thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng để chuẩn bị sẵn sàng khi thuốc có thể đưa vào thị trường. Xuất phát từ nhu cầu thực tế này, luận án đã tìm hiểu và thực hiện thiết lập một số chất chuẩn gốc dược phân lập từ tự nhiên.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

❖ *Đối tượng để phân lập, tinh chế các chất tinh khiết làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn*

168 g cao cồn khô được chiết xuất theo sơ đồ (Hình 2.1) từ quả cây Chà chôi hay Cọc rào (*Cleistanthus tonkinensis*, Jabl.) được thu hái ngày 06/06/2016, tại Đại từ-La Bằng-Thái Nguyên, ki hiệu VN 0308 (LB-TN) để phân lập, tinh chế các chất tinh khiết nhóm lignan làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn.



Hình 2.1. Sơ đồ quy trình chiết xuất cao cồn khô từ quả cây Chà chôi

❖ *Đối tượng để phân tích định tính, định lượng một số lignan trong quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*)*

Quả cây Chà chôi hay Cọc rào (*Cleistanthus tonkinensis*, Jabl.) có tên đồng nghĩa là: Cách hoa Chanh châu (*Cleistanthus sageretoides* Merr.) được thu hái ngày 16/06/2018, tại Đại từ-La Bằng-Thái Nguyên, ki hiệu ĐL 2338 (LB-TN).



Hình 2.2. Quả cây Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis* Jabl.)

Quả cây Cách hoa eberhardt (*Cleistanthus eberhardtii*, Gagn), được thu hái ngày 08/06/2018 tại Phú lộc-Thừa Thiên Huế, kí hiệu ĐL 2151 (PL-TTH)



Hình 2.3. Quả cây Cách hoa eberhardt (*Cleistanthus eberhardtii* Gagn.)

Việc xác định đúng tên loài và lưu giữ mẫu tại Viện Tài nguyên và sinh thái-Viện hàn lâm khoa học và công nghệ Việt Nam (Viện HL KH&CN VN) (Phụ lục 1.D).

2.2. HOÁ CHẤT VÀ TRANG THIẾT BỊ

2.2.1. Nguyên, vật liệu

- Chất tinh khiết cleistantoxin và cleisindoside D được phân lập từ quả cây Cách hoa Đông dương (*C. indochinensis*) do phổ xác định cấu trúc cleistantoxin và cleisindoside D (Phòng tổng hợp hữu cơ - Viện Hoá sinh biển - Viện HL KH&CN VN).

2.2.2. Hoá chất

- Hoá chất, dung môi dễ chiết xuất, phân lập, tinh chế đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích: *n*-hexan, chloroform, dichloromethan, aceton, ethyl acetat, ethanol, isopropanol, *n*-butanol, methanol.
- Silica gel nhồi cột cỡ hạt 40-63 μm (Merck).
- Silica gel pha đảo YMC-GEL ODS-A có cỡ hạt 75 μm (YMC)
- Bản mỏng Silica gel 60 GF254 (Merck).
- Bản mỏng Silica gel 60 RP-18 GF254 (Merck).
- Thuốc thử dung dịch $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (TT): 1 g Ceri sulfat, 2,5 g Phosphomolipdat thêm 6,0 ml acid sulfuric đặc và thêm nước vừa đủ 100 ml.
- Thuốc thử vanilin/ H_2SO_4 đặc: 1,2 g vanilin, thêm 23 ml acid acetic băng và 11 ml acid sulfuric đặc và ethanol vừa đủ 200 ml.

- Dung môi và hóa chất loại tinh khiết dùng đo phổ NMR (Merck): CDCl_3 , CD_3OD , DMSO, MeOD, CD_3CN ...
- Chất chuẩn nội TMS, acid maleic tinh khiết 99,94% dùng đo phổ NMR (Sigma).
- Dung môi và hóa chất loại tinh khiết dùng cho HPLC (Merck): ACN, MeOH, triethylamin, ammonium acetat, acid acetic, acid phosphoric, acid formic...
- Cột sắc kí Inertsil RP 18 (250 x 4,6 mm, 5 μm).
- Cột sắc kí Phenyl Phenomenex (250 x 4,6 mm, 5 μm).
- Dung dịch đệm acetat pH 4,0: 2,72 g natri acetat/1L nước, điều chỉnh pH 4,0 bằng acid acetic băng.

2.2.3. Thiết bị nghiên cứu

- Thiết bị đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân Bruker AM500 FT-NMR, Viện Hoá học- Viện HL KH & CN VN.
- Thiết bị đo phổ khối lượng phân giải cao (HRESI-MS): FT-ICR-Mass spectrophotometer, Viện Hoá học-Viện HL KH & CN VN.
- Thiết bị đo phổ hồng ngoại NILOLET LEXUSB 670FT-IR, Phòng Vật li đo lường, Viện KNT TỰ.
- Thiết bị quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-VIS): Phòng Vật lí đo lường, Viện KNT TỰ.
- Thiết bị đo Phổ lượng sắc tròn (CD): Chirascan TM CD spectrometer của Viện Hoá sinh biển- Viện HL KH & CN VN
- Thiết bị đo điểm chảy
 - Kofler micro-hotstage, Viện Hoá sinh biển-Viện HL KH & CN VN
 - Buchi M-565, Phòng kiểm nghiệm nguyên liệu, Viện KNT TỰ.
- Thiết bị đo góc quay cực: JASCO DIP-2000 KUP polarimeter, Viện Hoá sinh biển- Viện HL KH & CN VN.
- Thiết bị sắc kí lỏng hiệu năng cao HPLC/DAD
 - Agilent 1200, Bộ môn Hoá Phân tích - Độc chất, Đại học Dược Hà Nội.
 - Shimadzu 20A, Phòng chất chuẩn-chất đối chiếu, Viện KNT TỰ.
- Thiết bị phân tích nhiệt lượng Mettler Toledo TGA/DSC1, STAR^c System
 - Phòng chất chuẩn-chất đối chiếu, Viện KNT TỰ và Viện KNT TP HCM.
 - Bộ môn Hoá Phân tích-Độc chất, Đại học Dược Hà Nội.
- Cân kỹ thuật SARTORIUS BSA 224S
- Cân phân tích METTLER TOLEDO (d=0,01 mg)
- Lò nung Nabertherm, Phòng KN nguyên liệu, Viện KNT TỰ.

2.3. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các nội dung nghiên cứu của luận án được trình bày tóm tắt ở sơ đồ:

Phân lập, tinh chế và khẳng định cấu trúc cleistantoxin và cleisindoside D từ quả cây Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis* Jabl.) làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn



Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng và phương pháp xác định độ tinh khiết của nguyên liệu thiết lập chuẩn gốc



Thiết lập chất chuẩn từ các chất phân lập được

- Chất chuẩn gốc định lượng (độ tinh khiết sắc kí $\geq 95,0\%$)
- Chất chuẩn gốc định tính (độ tinh khiết sắc kí $\geq 90,0\%$)



Xây dựng, thẩm định phương pháp định tính, định lượng một số lignan trong quả cây Chà chôi



Áp dụng phương pháp đã xây dựng bước đầu định tính, định lượng một số lignan trong quả một số loài thuộc chi Cách hoa

Hình 2.4. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu luận án

2.3.1. Phân lập, tinh chế và khẳng định cấu trúc một số chất tinh khiết nhóm lignan trong quả Chà chôi làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn

2.3.1.1. Phân lập, tinh chế một số chất tinh khiết nhóm lignan có trong quả Chà chôi làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn (NLTLC)

❖ *Tiêu chí lựa chọn chất nhóm lignan để phân lập, tinh chế làm NLTLC*

➢ *Tiêu chí lựa chọn các chất để thiết lập chất chuẩn*

- Chất chuẩn định lượng: là những chất đặc trưng cho loài *Cleistanthus*, chiếm hàm lượng lớn trong cây và/hoặc có tác dụng sinh học.
- Chất chuẩn định tính: là những chất đặc trưng cho chi *Cleistanthus* hoặc để phân biệt các loài trong chi *Cleistanthus*.

➤ ***Yêu cầu nguyên liệu thiết lập chất chuẩn***

- Độ tinh khiết sắc kí $\geq 95\%$ để thiết lập chất chuẩn định lượng.
- Độ tinh khiết sắc kí $\geq 90\%$ để thiết lập chất chuẩn định tính.
- ❖ ***Các kỹ thuật sử dụng trong phân lập, tinh chế các chất tinh khiết làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn (NLTLCC)***
 - Sắc kí cột cổ điển (CC):
 - Cột nhồi silica gel kích cỡ hạt 40-63 μm (Merck). Pha động sử dụng các dung môi kém phân cực như: *n*-hexan, CH_2Cl_2 , EtOAc,... thêm dần dung môi phân cực như: acetone, MeOH tỉ lệ phù hợp.
 - Cột nhồi sephadex LH-20 25-100 μm (Sigma) và rửa giải bằng MeOH 100%.
 - Cột nhồi hạt pha đảo YMC-GEL ODS-A có cỡ hạt 75 μm (YMC), dung môi pha động phân cực như: acetone- H_2O , MeOH- H_2O
 - Sắc ký lớp mỏng (TLC): được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck) hoặc silica gel pha đảo 60 RP-18 GF254 (Merck), phát hiện các chất trong các phân đoạn bằng soi dưới đèn UV ở bước sóng 254 nm và 365 nm, phun thuốc thử dung dịch $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (TT) hoặc vanilin/ H_2SO_4 đặc, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu, gom các phân đoạn có các thành phần giống nhau.
 - Sắc ký lớp mỏng điều chế (TLC điều chế): được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn silica gel 60 GF₂₅₄ (Merck) hoặc silica gel 60 RP-18 GF254 (Merck), phát hiện các chất bằng soi dưới đèn tử ngoại ở các bước sóng 254 nm, 365 nm hoặc cắt rìa bản mỏng đem phun thuốc thử dung dịch $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ (TT) hoặc vanilin/ H_2SO_4 đặc, sấy khô rồi hơi nóng từ từ đến khi hiện màu, ghép bản mỏng lại như cũ để xác định vùng chất, sau đó cạo lớp silica gel có chất, giải hấp phụ và tinh chế lại bằng cách kết tinh trong dung môi thích hợp.
 - Kết tinh: là kỹ thuật sử dụng một dung môi hoà tan tốt chất cần tinh chế sau đó thêm từ từ một dung môi thứ 2 không tan chất cần tinh chế đến trạng thái bão hoà, để yên dung dịch cho chất cần tinh chế được kết tinh.
- ❖ ***Xác định độ tinh khiết của các nguyên liệu thiết lập chất chuẩn bằng HPLC/DAD.***
 - Hoà tan chất tinh chế được trong dung môi thích hợp được nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$, lọc qua màng lọc 0,45 μm . Tiêm sắc kí.
 - Độ tinh khiết sắc kí của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn được xác định bằng HPLC/DAD sử dụng phương pháp chuẩn hoá diện tích.

2.3.1.2. Khẳng định cấu trúc một số chất tinh khiết nhóm lignan làm NTLCC

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) 1 chiều ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT) và 2 chiều (HSQC, HMBC, COSY, NOESY)
- Phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS)
- Phổ hồng ngoại (IR),
- Phổ lưỡng sắc tròn (CD)
- Góc quay cực riêng ($[\alpha]_D^{20}$)

2.3.2. Thiết lập chất chuẩn gốc định lượng và định tính

2.3.2.1. Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng một số chất tinh khiết làm NTLCC

- Bộ dữ liệu nhận dạng nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc gồm:
 - Nhiệt độ nóng chảy (Mp)
 - Góc quay cực riêng ($[\alpha]_D^{20}$)
 - Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) 1 chiều ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT)
 - Phổ khối lượng phân giải cao (HRESI-MS).
 - Phổ hồng ngoại (IR),
 - Phổ tử ngoại khả kiến (UV-VIS)
- Bộ dữ liệu nhận dạng nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc dựa vào:
 - So sánh thông tin phổ, dữ liệu hoá lý, hằng số vật lý của của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn với tài liệu khoa học hoặc thông tin đã công bố.
 - Tập hợp và phân tích các dữ liệu phổ để khẳng định được cấu trúc của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn là đúng đối tượng nghiên cứu (đối với chất mới)

2.3.2.2. Xây dựng và thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí của NTLCC bằng HPLC/DAD

❖ *Xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn bằng HPLC/DAD*

- *Lựa chọn dung môi pha mẫu:* Dựa trên khả năng hòa tan của chất chuẩn trong các dung môi hữu cơ để lựa chọn dung môi pha mẫu.
- *Lựa chọn pha tĩnh và pha động:* Dựa vào cấu trúc của chất chuẩn lựa chọn sắc kí phân bố pha đảo để tiến hành khảo sát:

Cột sắc kí	Pha động
Cột phenyl (250 mm x 4,6 mm; 5 μm)	ACN và dung dịch đệm acetat pH 4,0.
Cột C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μm)	Pha động A: Acid formic: TEA: ACN (1, 1, 998) Pha động B: Acid formic: TEA: nước (1, 1, 998)
	ACN: acid acetic (999, 1)
	ACN: Nước

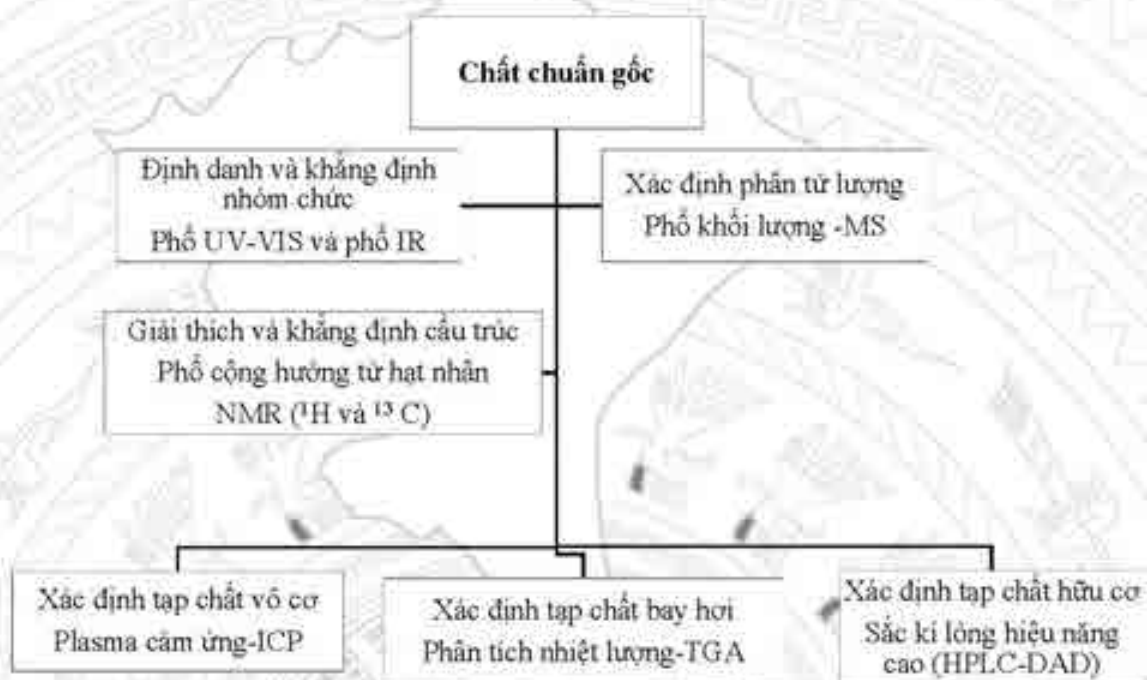
- *Kỹ thuật rửa giải*: chương trình dung môi (gradient) tuyến tính được chọn để tách tốt các chất khỏi TCLQ với thời gian phân tích phù hợp nhất.
- *Lựa chọn bước sóng phát hiện*: Quét phổ UV – VIS từ 200-400 nm của các chất để xác định cực đại hấp thụ của mỗi chất, từ đó chọn bước sóng thích hợp.
- Chuẩn bị dung dịch để xác định độ tinh khiết của các chất chuẩn
 - Dung dịch chất chuẩn có nồng độ 1000 µg/ml trong dung môi pha mẫu.
 - Mẫu trắng (dung môi pha mẫu).
- Tiến hành sắc kí dung dịch thử, ghi nhận SKĐ. Xác định số lượng TCLQ và diện tích của mỗi pic tạp đơn và tổng TCLQ trong từng mẫu thử.
- Xác định độ tinh khiết của chất chuẩn bằng kỹ thuật HPLC/DAD sử dụng phương pháp chuẩn hoá diện tích pic.
- Độ tinh khiết sắc kí của các chất chuẩn được xác định dựa trên diện tích của pic chất chính so với tổng diện tích của tất cả các pic trên SKĐ.
 - Độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn gốc định lượng phải lớn hơn 95%.
 - Độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn gốc định tính phải lớn hơn 90%.
- Xác định hàm lượng từng tạp chất và tổng TCLQ:
 - Số lượng tạp chất được xác định bằng số pic tạp chất xuất hiện trên SKĐ.
 - Hàm lượng từng TCLQ được xác định dựa trên diện tích của từng pic tạp (nếu có) so với tổng diện tích của tất cả các pic bao gồm cả pic chính của chất chuẩn trên SKĐ. Bỏ qua pic của dung môi và pic có S/N < 2.
 - Hàm lượng tổng TCLQ được xác định dựa trên tổng diện tích của tất cả các pic tạp (nếu có) so với tổng diện tích của tất cả các pic bao gồm cả pic chính của chất chuẩn trên SKĐ. Bỏ qua pic của dung môi và pic có S/N < 2.
 - Hàm lượng tổng tạp trong chất chuẩn gốc định lượng không được lớn hơn 5%.
 - Hàm lượng tổng tạp trong chất chuẩn gốc định tính không được lớn hơn 10%.

❖ *Thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí bằng HPLC/DAD.*

Phương pháp xác định độ tinh khiết của mỗi chất chuẩn gốc được đánh giá độ phù hợp hệ thống và thẩm định phương pháp theo hướng dẫn của ICH Q2B.

2.3.2.3. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc

Quy trình đánh giá chất lượng nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng được thực hiện theo hướng dẫn của ASEAN Q35, IP, WHO [86], [91], [94] như sau:



Hình 2.5. Sơ đồ đánh giá chất lượng nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc

Theo hướng dẫn của IP, WHO, ASEAN Q35 về thiết lập chất chuẩn gốc, tiêu chuẩn cơ sở được xây dựng để đánh giá chất lượng nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc như sau [8], [43]:

❖ *Tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng*

➤ *Yêu cầu kỹ thuật*

❖ **Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn gốc**

- *Tính chất:* Mô tả dạng thù hình, mùi, độ tan của chất chuẩn.
- *Điểm chảy:* phụ lục 6.7 DDVN V hoặc kỹ thuật quét nhiệt vi sai (DSC).
- *Góc quay cực riêng:* phụ lục 6.4 DDVN V
- Bộ dữ liệu phổ gồm:
 - Phổ hồng ngoại (trong KBr)
 - Phổ tử ngoại khả kiến UV-VIS
 - Phổ khối lượng phân giải cao (HRESI-MS)
 - Phổ cộng hưởng từ hạt nhân 1D-NMR (^1H , ^{13}C , DEPT)

❖ **Độ tinh khiết (Hàm lượng) chất chuẩn**

- Xác định độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn bằng kỹ thuật HPLC/DAD
- Xác định tạp chất vô cơ sử dụng phép thử tro sulfat
- Xác định tạp chất bay hơi bằng phân tích nhiệt trọng lượng TGA
- Xác định độ tinh khiết DSC bằng quét nhiệt vi sai

➤ **Phương pháp thử**

❖ **Độ tinh khiết sắc kí bằng kĩ thuật HPLC/DAD**

- Độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn được xác định dựa trên diện tích pic của chất chuẩn trong SKĐ của dung dịch thử trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKĐ (trừ pic dung môi và pic có S/N <2).

❖ **Xác định hàm lượng tạp chất bay hơi bằng kĩ thuật phân tích nhiệt lượng TGA**

- Lượng cân mẫu: khoảng 10-20 mg
- Gia nhiệt tốc độ 10°C/ phút đến trước nhiệt độ 105°C, sau đó duy trì nhiệt độ 105°C trong 4 giờ. Tính khối lượng chất giảm đi so với lượng chất ban đầu.
- Lưu lượng dòng khí nitơ 50 mL/phút.
- Mỗi mẫu xác định 6 lần, lấy kết quả trung bình.

❖ **Xác định tạp chất vô cơ sử dụng phép thử tro sulfat (ĐDVN V-Phụ lục 9.12, PP 2)**

❖ **Xác định độ tinh khiết DSC bằng quét nhiệt vi sai**

- Lượng cân mẫu: khoảng 3-5 mg
- Gia nhiệt tốc độ 10°C/ phút đến trước nhiệt nóng chảy 10°C, sau đó duy trì tốc độ gia nhiệt 2°C/ phút khi qua khối nhiệt nóng chảy của mẫu khoảng 20°C.
- Lưu lượng dòng khí nitơ 50 mL/phút.
- Mỗi mẫu xác định 3 lần, lấy kết quả trung bình.

❖ **Tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định tính**

- Bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn gốc
- Xác định độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn bằng kĩ thuật HPLC/DAD

2.3.2.4. Thiết lập chất chuẩn gốc

❖ **Đóng ống chất chuẩn**

- Hoạt động đóng gói phải tuân thủ các yêu cầu GMP. Lọ chứa chất chuẩn phải tránh độ ẩm, ánh sáng, oxy và phải được kiểm tra tính thẩm ẩm. Chất chuẩn phải được đóng gói trong khí trơ hoặc trong điều kiện độ ẩm được kiểm soát [44].
- Các nguyên liệu thiết lập chất chuẩn sau khi được đánh giá chất lượng được đóng thành lọ nhỏ có khối lượng 10 mg. Sử dụng lọ thủy tinh nâu có hàn kín, có lớp đệm teflon đạt tiêu chuẩn chất lượng theo qui định.
- Việc đóng gói được thực hiện trong glove-box với điều kiện đóng ống:
 - Nhiệt độ 25°C
 - Độ ẩm tương đối trong buồng đóng khoảng 40%
 - Nạp khí nitơ 99,99% vào buồng đóng.

- Dán nhãn tạm ghi tên hoạt chất và đánh số thứ tự từng lọ

❖ **Đánh giá độ đồng nhất lọ trong quá trình đóng gói**

- PKN đạt tiêu chuẩn GLP hoặc ISO-IEC 17025 đề tiên hành đánh giá độ đồng nhất của lọ. Thực hiện tại Khoa thiết lập chất chuẩn-chất đối chiếu, Viện KNT TỰ

- Thứ độ đồng nhất là yêu cầu quan trọng cho tất cả các chất chuẩn và cần tiến hành thử độ đồng nhất trong ống và độ đồng nhất giữa các ống
 - Độ đồng nhất trong ống (within-unit homogeneity): Mỗi ống chuẩn có cùng một giá trị ở các vị trí khác nhau.
 - Độ đồng nhất giữa các ống (between-unit homogeneity): Đảm bảo đồng nhất giữa các ống khi mà người sử dụng chất chuẩn lấy các mẫu phụ đem đo.
- Cỡ mẫu: Tối đa 10 ống hoặc $n = \sqrt[3]{N}$
 - Trong đó: n là số ống chất chuẩn lấy để kiểm tra độ đồng nhất
 - N: số lượng ống chuẩn đồng được
- Tiến hành xác định độ đồng nhất của các ống chuẩn đã lựa chọn bằng phương pháp định lượng đã xây dựng, mỗi ống chuẩn đo 1 mẫu, mỗi mẫu đo 3 lần [44].
- Đánh giá độ đồng nhất giữa các ống chuẩn: Theo hướng dẫn của ISO Guide 35, các lọ được xem là đồng nhất trong lô khi đánh giá bằng test thống kê ANOVA một yếu tố, so sánh 2 giá trị F_{tn} và F_{lt} [44].
 - Nếu $F_{tn} < F_{lt}$: kết quả giữa các mẫu là đồng nhất
 - Nếu $F_{tn} > F_{lt}$: kết quả giữa các mẫu là không đồng nhất
- ❖ *Xác định giá trị ấn định trên COA*
- *Xác định độ tinh khiết sắc kí bằng HPLC/DAD và hàm lượng tạp chất bay hơi bằng TGA*
- Xác định độ tinh khiết của chất chuẩn gốc gồm: độ tinh khiết sắc kí, hàm lượng tạp chất liên quan bằng HPLC/DAD, hàm lượng tạp chất bay hơi bằng TGA được kiểm nghiệm tại ít nhất 3 PTN độc lập đạt tiêu chuẩn GLP hoặc ISO-IEC 17025 tham gia thiết lập chuẩn gốc.
 - Khoa thiết lập chất chuẩn-chất đối chiếu, Viện KNT TỰ (PTN1)
 - Khoa kiểm nghiệm nguyên liệu, Viện KNT TỰ (PTN2)
 - Khoa thiết lập chất chuẩn-chất đối chiếu Viện KNT TP HCM (PTN3)
- Mỗi PTN nhận 6 ống chất chuẩn lấy ngẫu nhiên cùng tiêu chuẩn cơ sở theo yêu cầu trong thường qui kỹ thuật để tiến hành phân tích.
- Trước khi phân tích, mỗi PTN sẽ đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc kí. Nếu đạt yêu cầu, tiến hành xác định độ tinh khiết sắc kí, hàm lượng tổng TCLQ bằng HPLC/DAD và hàm lượng tổng tạp chất bay hơi bằng TGA.
- Tập hợp các kết quả của ba PTN tham gia ($n = 18$), đánh giá kết quả bằng cách so sánh kết quả phân tích giữa các PTN thông qua việc sử dụng test kiểm định thống kê ANOVA một yếu tố [44] so sánh 2 giá trị F_{tn} và F_{lt}

- Trường hợp 1: $F_{tn} \leq F_{lt}$ kết quả trung bình của 3 phòng thí nghiệm khác nhau không có ý nghĩa, độ tinh khiết SK và hàm lượng tổng tạp chất bay hơi của chất chuẩn không phụ thuộc vào PTN tham gia đánh giá.
- Trường hợp 2: $F_{tn} > F_{lt}$ kết quả trung bình của 3 phòng thí nghiệm khác nhau có ý nghĩa, độ tinh khiết SK và hàm lượng tổng tạp chất bay hơi của chất chuẩn thay đổi phụ thuộc vào mỗi PTN tham gia đánh giá.
- Khi $F_{tn} \leq F_{lt}$ thì giá trị độ tinh khiết sắc kí và hàm lượng tạp chất bay hơi được lấy từ kết quả trung bình của 3 PTN.

➤ **Xác định giá trị ấn định công bố trên phiếu kiểm nghiệm-COA**

- Xác định giá trị công bố trên phiếu kiểm nghiệm COA, độ tinh khiết của chất chuẩn gốc định lượng được xác định bằng phương pháp cân bằng khối lượng (mass-balance) tính theo công thức sau: [22], [39], [86], [91], [94]

Độ tinh khiết = $100\% - \% \text{ tạp chất hữu cơ} - \% \text{ tạp chất vô cơ} - \% \text{ nước} - \% \text{ dung môi tồn dư}$
 Độ tinh khiết = $[100\% - (\text{tạp chất bay hơi} + \text{tạp chất vô cơ}) \times \text{độ tinh khiết sắc ký/điện di}] (\%)$

➤ **Xác định độ không đảm bảo đo**

❖ **Xác định độ không đảm bảo đo của kết quả hàm lượng tạp chất liên quan bằng HPLC/DAD và tạp chất bay hơi bằng TGA.**

Mỗi chất chuẩn được gửi đến 3 PKN, mỗi phòng 6 ống, tiến hành phân tích 6 mẫu cho từng chỉ tiêu độ tinh khiết sắc kí và hàm lượng tạp chất bay hơi theo TCCS gửi kèm.

- Độ không đảm bảo đo chuẩn của mỗi PKN : $u_s = \frac{t \times s}{\sqrt{N}}$

Trong đó:

- N : Số lần lặp lại thí nghiệm
- t : Giá trị tra bảng test Student
- S : Độ lệch chuẩn

- Độ không đảm bảo đo kết hợp của 3 PKN ($U_{\text{combined}}=U_c$)

$$U_c = \sqrt{u_{s1}^2 + u_{s2}^2 + u_{s3}^2}$$

❖ **Độ không đảm bảo đo lan truyền của kết quả tro sulfat:**

Độ không đảm bảo đo của kết quả tro sulfat không được thực hiện lặp lại trên 6 lần nên phải tính độ không đảm bảo đo lan truyền. Để tính được tro sulfat cần cân trên cân phân tích 2 lần: lần 1 cân khối lượng bi (m_1) và lần 2 cân khối lượng bi và cân (m_2). Lượng cân (tro sulfat) được tính bằng $m_2 - m_1$, nên độ không đảm bảo đo lan truyền của kết quả tro sulfat được tính theo công thức:

$$U_{\text{Khối lượng Tro sulfat}} = U_{\text{chế phẩm}} = \sqrt{u_{s1}^2 + u_{s2}^2}$$

$$U_{\text{Hàm lượng tro sulfat}} = \text{HL}_{\text{Tro sulfat}} \times \sqrt{\left(\frac{U_{\text{Tro sulfat}}}{m_{\text{Tro sulfat}}}\right)^2 + \left(\frac{U_{\text{chế phẩm}}}{m_{\text{chế phẩm}}}\right)^2}$$

Tiến hành phép thử tro sulfat 2 lần lấy giá trị trung bình, nên:

$$U_{\text{c kết hợp của tro sulfat}} = \sqrt{u_{\text{thứ 1}}^2 + u_{\text{thứ 2}}^2}$$

❖ **Độ không đảm bảo đo mở rộng**

Độ không đảm bảo đo mở rộng được tính cho tổng cả kết quả của 3 phép thử tạp chất liên quan, tạp chất bay hơi và tro sulfat theo công thức:

$$U_{\text{mr}} = \sqrt{u_{c1}^2 + u_{c2}^2 + u_{c\text{ân}}^2}$$

➤ **Giá trị công bố trên chứng chỉ phân tích: $X \pm 2 \cdot U_{\text{mr}}$**

❖ **Dán nhãn và bảo quản ống chuẩn**

- Lập hồ sơ chất chuẩn, dán nhãn ống chuẩn và kèm phiếu kiểm nghiệm
- Trên nhãn của chất chuẩn gốc cần cung cấp các thông tin sau [87]
 - Tên thích hợp: tên quốc tế (International Nonproprietary Name – INN);
 - Tên của cơ quan ban hành;
 - Số lượng của nguyên liệu trong bao bì;
 - Số lô hoặc số đăng kí.
- Bảo quản: Thông tin về các điều kiện bảo quản thường có thể lấy từ nhà sản xuất NLTLCG gốc. Bảo quản ở nhiệt độ khoảng 2 – 8°C với các biện pháp chống hấp phụ độ ẩm thích hợp [87].

❖ **Nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn**

- Chất chuẩn phải ổn định bền vững cho mục đích sử dụng của nó, cho đến khi người sử dụng cuối cùng có thể dựa vào giá trị ổn định của chất chuẩn trong khoảng tin cậy trên phiếu kiểm nghiệm chất chuẩn.
- Có thể nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn trong điều kiện bảo quản lâu dài cách 3 tháng đến khi chất chuẩn còn ổn định và có thể sử dụng được.
- Nghiên cứu độ ổn định ở DK vận chuyển và DK bảo quản tại PTN sử dụng chất chuẩn, có thể nghiên cứu cả độ ổn định sau khi mở ống chuẩn [44].

2.3.3. Xây dựng phương pháp định tính và định lượng đồng thời một số lignan trong quả của chi Cách hoa.

2.3.3.1. Xác định độ ẩm của bột quả của chi *Cleistanthus*

Phần quả của chi Cách hoa, sau khi thu hái được phơi khô trong bóng râm, nghiền thành bột thô rồi xác định độ ẩm của dược liệu theo phương pháp mất khối lượng do làm khô (DDVN V - Phụ lục 9.6).

2.3.3.2. Xây dựng phương pháp định tính đồng thời một số lignan trong quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*) bằng HPLC/DAD

❖ Khảo sát chương trình sắc ký tách và định tính được 4 chất

- Hoạt chất nhóm lignan đang được nghiên cứu là hoạt chất mới nên chưa có nghiên cứu nào xây dựng phương pháp phân tích định tính, định lượng đồng thời các chất này trong quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*) bằng HPLC/DAD.
- Dựa trên ĐKSK định lượng TCLQ của 2 chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D, lựa chọn cột RP18 (250 x 4,6 mm; 5 μm) và pha động: ACN: Nước
- Lựa chọn bước sóng phát hiện: Quét phổ UV – VIS từ 200-400 nm của các chất để xác định cực đại hấp thụ của mỗi chất, từ đó chọn bước sóng thích hợp.

❖ Thẩm định phương pháp định tính được 4 chất

Tiến hành thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp đã xây dựng.

2.3.3.3. Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời cleistantoxin và cleisindoside D trong quả Chà chôi bằng HPLC/DAD

❖ Xây dựng qui trình chiết xuất cleistantoxin và cleisindoside D trong quả Chà chôi

- Khảo sát dung môi chiết xuất: chiết siêu âm với các hệ dung môi: CH₂Cl₂-MeOH (3:1), (1:1), (1:3), MeOH, MeOH-H₂O (9:1), (3:1), (1:1), ethanol 96°
- Khảo sát kỹ thuật chiết xuất: chiết siêu âm, chiết hồi lưu, chiết Soxhlet.

❖ Tính hiệu suất chiết

Hàm lượng % của cleistantoxin/cleisindoside D trong dược liệu:

$$HL\% = \frac{S_T \times C_c \times D_T \times 100\%}{S_C \times m \times (100 - X) \times 100 \times 1000}$$

Trong đó:

HL: Hàm lượng (%)

S_C: Diện tích pic cleistantoxin/cleisindoside D trên SKĐ từ dung dịch chuẩn

S_T: Diện tích pic cleistantoxin/cleisindoside D trên SKĐ từ dung dịch thử

C_c: Nồng độ dung dịch chuẩn cleistantoxin/cleisindoside D (mg/ml)

m: Khối lượng dược liệu đem chiết (g)

D_T: Độ pha loãng của mẫu thử

X: Độ ẩm dược liệu (%)

2.3.3.4. Thẩm định phương pháp phân tích

Thẩm định phương pháp theo hướng dẫn của ICH (2005) với các chỉ tiêu sau: tính thích hợp của hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ lặp lại, độ tái lập, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ).

2.3.3.5. Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định tính, định lượng đồng thời một số lignan trong quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*)

- Quả cây Chà chôi
- Quả cây Cách hoa eberhardt.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. PHÂN LẬP, TINH CHẾ MỘT SỐ CHẤT NHÓM LIGNAN TỪ QUẢ CHÀ CHÔI LÂM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN

Qua khảo sát hàm lượng một số hoạt chất trong cao khô có hoạt tính kháng ung thư trên chuột Nude và trong quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*), tìm thấy 2 hoạt chất chính là cleistantoxin, cleisindoside D (glycosid của cleistantoxin) có hoạt tính sinh học, hàm lượng cao nhất và là những chất đặc trưng của loài cây này. Vì vậy, luận án đã lựa chọn hai chất tinh khiết này để thiết lập chất chuẩn định lượng. Bên cạnh đó, tìm thấy trong quả Chà chôi có hàm lượng cleistantoxin, cleisindoside D cao nhất, nên sử dụng nguồn thực vật này để phân lập, tinh chế cleistantoxin, cleisindoside D làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn.

3.1.1. Phân lập thô cleistantoxin và cleisindoside D trên cột silica gel

Để phân lập được 2 chất cleistantoxin và cleisindoside D làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn sử dụng cột thủy tinh trung tính có chiều dài 80 cm, đường kính cột 10 cm nhồi 700 g silica gel 60 (kích thước hạt 40-63 μm). Sau đó hoà tan 168 g cao còn trong 200 ml CH_2Cl_2 thêm 170 g silica gel 60, cô quay chân không đến khô, nghiền thành bột mịn đưa lên cột. Dung hệ dung môi rửa giải là CH_2Cl_2 sau đó thêm MeOH với tỉ lệ tăng dần từ 2, 5, 10, 20, ... 100%. Hứng dịch rửa giải vào các bình nón 100 mL. Kiểm tra các bình giống nhau bằng SKLM, gom các bình giống nhau vào thành một phân đoạn, thu được 23 phân đoạn (Phụ lục 1.2.)

Để thu được cleistantoxin, chấm các PD1-14 và dung dịch chất tinh khiết cleistantoxin (0,1 mg/ml CH_2Cl_2) lên bản mỏng GF₂₅₄, sau đó khai triển sắc kí với hệ dung môi pha động là CH_2Cl_2 : acetone (99:1). Trên SKĐ nhận thấy phân đoạn PD7, 8, 9, 10 xuất hiện 1 vết có màu khi soi đèn UV 254 nm, không hiện UV ở bước sóng 365 nm và hiện màu thuốc thử vanilin/ H_2SO_4 đặc, tương ứng với vết của chất cleistantoxin tinh khiết (Hình 3.1). Vì vậy, các PD7, 8, 9, 10 (PD7) có chứa chất cleistantoxin gom lại đem cô chân không được 10,6916 g căn A, căn tiếp tục phân lập và tinh chế và khẳng định cấu trúc chất phân lập được là cleistantoxin. PD11 chứa chất cleistantoxin nhưng có nhiều tạp chất nên để riêng.



(a): Phát hiện tại 254 nm



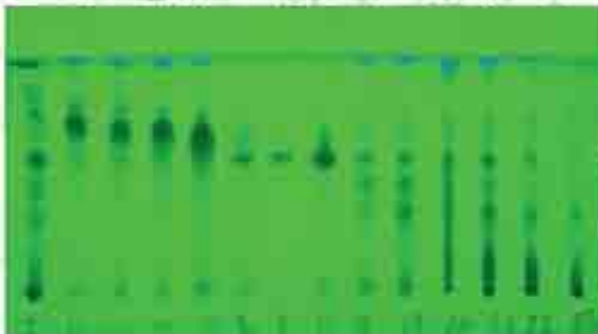
(b): Phát hiện tại 366 nm



(c): Hiện màu thuốc thử valinin/H₂SO₄ đặc

Hình 3.1. SKĐ phát hiện cleisiantoxin trong các phân đoạn từ PD1-14

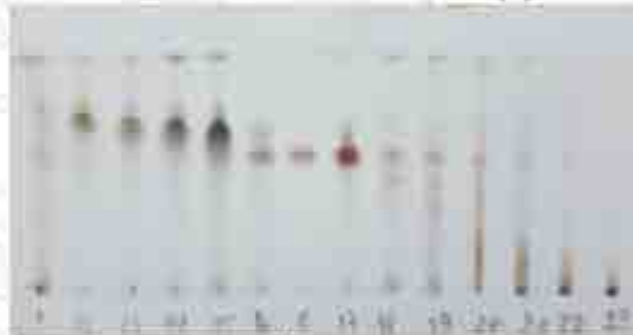
Để thu được cleisindoside D, chấm các PD12-23 và dung dịch chất tinh khiết cleisindoside D (0,1 mg/ml MeOH) lên bản mỏng GF 254, triển khai sắc kí với hệ dung môi pha động là CH₂Cl₂: MeOH: (93:7).



(a): Soi đèn 254 nm



(b): Soi đèn 366 nm



(c): Hiện màu thuốc thử vanilin/H₂SO₄ đặc

Hình 3.2. SKĐ phát hiện cleisindoside D trong các phân đoạn từ PD12-23

Nhận xét:

Trên SKD nhận thấy PD16, 17, 18 xuất hiện 1 vết có màu khi soi đèn UV 254 nm, không hiện UV ở bước sóng 365 nm và hiện màu thuốc thử vanilin/H₂SO₄ đặc tương ứng với vết của chất cleisindoside D tinh khiết (Hình 3.2). Vì vậy, các PD16, 17, 18, được gom lại đem cô quay chân không thu được 52,9519 g căn D, cần tiếp tục tinh chế và khẳng định cấu trúc chất phân lập được là cleisindoside D. Phân đoạn PD12, 13, 14, 15 và PD19, 20, 21, 22, 23 có chứa chất cleisindoside D, nhưng lượng chất ít, có nhiều tạp chất nên để riêng.

Tóm lại, quá trình phân lập thô trên cột silica gel đã thu được 10,6916 g căn A có chứa chất cleistantoxin từ PD7 và 52,9519 g căn D có chứa chất cleisindoside D từ PD16, cần tiếp tục phân lập, tinh chế và khẳng định cấu trúc chất tinh chế được là cleistantoxin và cleisindoside D.

3.1.2. Phân lập, tinh chế và khẳng định cấu trúc của cleistantoxin làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng

3.1.2.1. Phân lập cleistantoxin từ PD7 trên cột silica gel

Chuẩn bị cột thủy tinh trung tinh có chiều dài 70 cm, đường kính cột 4 cm, nhồi 150 g silica gel 60 (kích thước hạt 40-63 μm). Sau đó, hoà tan 10,6916 g căn A trong 200 ml CH₂Cl₂ thêm 15 g silica gel 60 cô quay chân không đến khô, nghiền thành bột mịn rồi đưa lên cột. Dùng hệ dung môi rửa giải là CH₂Cl₂ sau đó thêm acetone tỉ lệ tăng dần 1, 2, 5, 10... 30%. Hứng dịch rửa giải vào bình nón mỗi bình hứng 50 mL. Kiểm tra các bình có chứa cleistantoxin bằng SKLM, so sánh với chất tinh khiết cleistantoxin thu được PD7.2 và 7.3 có chứa chất cleistantoxin, gom PD7.2-7.3 đem cô quay chân không được 8,7465 g căn B. Căn B được hoà tan trong CH₂Cl₂ và kết tinh bằng n-hexan được 5,4547 g căn C chứa cleistantoxin, xác định độ tinh khiết sắc kí khoảng 87,8% bằng HPLC (Hình 3.3), nên cần tiếp tục tinh chế.



Hình 3.3. Độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin trong PD7.2-3

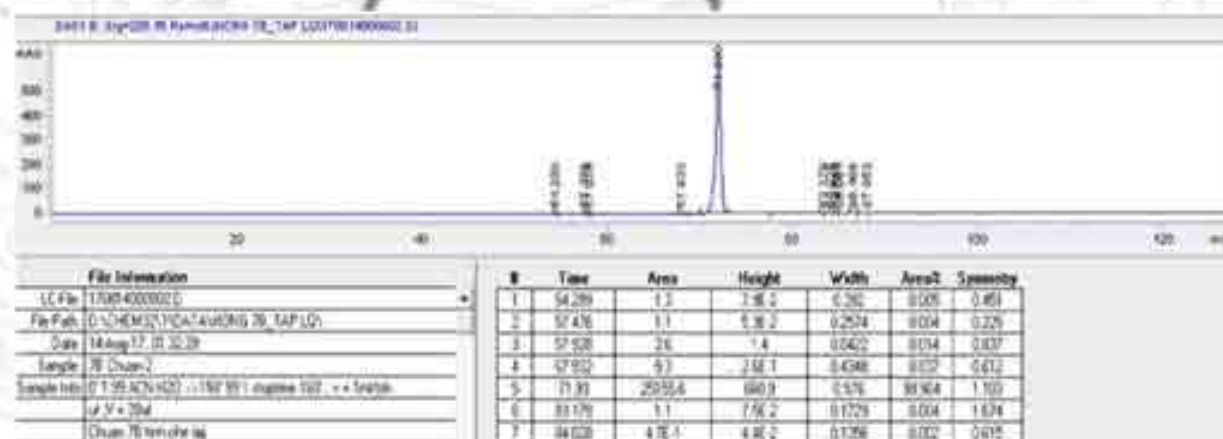
Khi phân lập cleistantoxin, thu được PD7.4 có chứa chất CT1, đem cô quay chân không được 0,8437 g căn. Kết tinh trong hệ n -hexan: CH_2Cl_2 (3:7) được 0,3649 g chất CT1 (chất mới). Chất này được phân lập rất gần cleistantoxin nên được sử dụng làm chất chuẩn định tính và xác định độ phân giải của chương trình sắc kí khi phân tích cleistantoxin. Bên cạnh đó, thu được phân đoạn PD7.1 chứa chất CT8 đem cô quay chân không thu được 0,1215 g căn, đưa lên cột sephadex phân lập được chất CT8 (chất mới), kết quả được trình bày trong bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả tách PD7-8-9-10 (PD7) trên cột silica gel

PD	Hệ dung môi	Khối lượng (g)	KT tinh chế	Chất tinh
PD7.1	CH_2Cl_2	0,1215	Cột Sephadex- MeOH 100%	CT8 (368 mg)
PD7.2	CH_2Cl_2 :Aceton (99:1)	3,3920	kết tinh n -hexan: CH_2Cl_2 (3:7)	5,4547 g căn C (Cleistantoxin 87,8%)
PD7.3	CH_2Cl_2 :Aceton (98:2)	5,3545		
PD7.4	CH_2Cl_2 :Aceton (95:5)	0,8437	kết tinh n -hexan: CH_2Cl_2	CT1 (0,3649 g)
PD7.5	CH_2Cl_2 :Aceton (90:10) CH_2Cl_2 :Aceton (70:30)	0,9799		Tạp chất

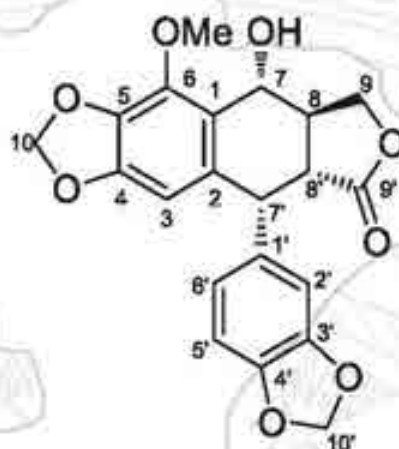
3.1.2.2. Tinh chế cleistantoxin bằng cách kết tinh

5,4547g căn C có hàm lượng cleistantoxin khoảng 87,8%, được kết tinh tiếp 3 lần bằng hệ dung môi CH_2Cl_2 : n -hexan (7:3) thu được 4,0235 g cleistantoxin tinh khiết. Kiểm tra độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin 99,9% (Hình 3.4), đủ điều kiện làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định lượng (NLTLCC).



Hình 3.4. Độ tinh khiết sắc kí cleistantoxin trong NLTLCC

3.1.2.3. Khẳng định cấu trúc hợp chất cleistantoxin

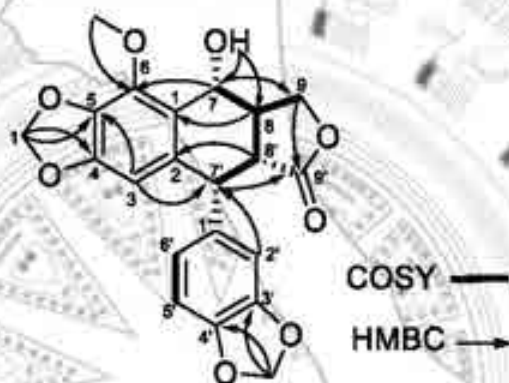


Hình 3.5. Cấu trúc hóa học của cleistantoxin

Hợp chất được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, độ quay cực $[\alpha]_D^{30} -148,0$ ($c, 0,5; \text{CHCl}_3$). Phổ HRESI-MS của hợp chất cho pic ion giả phân tử ở m/z 421,0902 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$, 421,0899). Kết hợp với dữ liệu phổ ^{13}C NMR cho phép xác định hợp chất này có CTPT là $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_8$. Trên phổ ^1H -NMR xuất hiện tín hiệu của một proton thơm ở δ_{H} 6,25 (1H, s), 3 proton vòng thơm hệ ABX ở δ_{H} 6,73 (1H, d, $J = 1,5$ Hz), 6,69 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) và 6,65 (1H, dd, $J = 1,5; 8,0$ Hz) và 1 nhóm methoxy ở δ_{H} 4,15 (3H, s). Tín hiệu của 1 nhóm oxymethin ở δ_{H} 5,02 (1H, d, $J = 9,0$ Hz), 2 nhóm dioxymethylen ở δ_{H} 5,89 (1H, br s), 5,90 (1H, br s), 5,91 (1H, d, $J = 1,0$ Hz), 5,94 (1H, d, $J = 1,0$ Hz), 1 nhóm OH ở δ_{H} 4,11 (1H, d, $J = 1,0$ Hz) và các proton vùng aliphatic nằm trong khoảng δ_{H} 2,71-4,64 cũng được quan sát thấy trên phổ ^1H -NMR. Phân tích phổ ^{13}C -NMR và DEPT, cho thấy tín hiệu cộng hưởng của 21 nguyên tử carbon, trong đó có 1 nhóm methoxy ở δ_{C} 59,9; 4 nhóm methin sp^2 ở δ_{C} 104,3, 111,3, 107,8 và 124,2; 1 nhóm carbonyl ở δ_{C} 174,2; 3 nhóm methylen sp^3 ở δ_{C} 101,3, 101,0 và 71,9; 4 nhóm methin sp^3 ở δ_{C} 70,7, 38,8, 44,1 và 44,8 và 8 carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Độ chuyển dịch hoá học của các nguyên tử carbon C-4 (δ_{C} 149,5), C-5 (δ_{C} 135,0), C-6 (δ_{C} 141,6), C-3' (δ_{C} 147,4), C-7 (δ_{C} 70,7), C-9 (δ_{C} 71,9) và C-4' (δ_{C} 146,7) gợi ý sự liên kết của chúng với nguyên tử oxy. Các mảnh cấu trúc phân tử được thiết lập nhờ phân tích phổ COSY và HMBC.

Phổ COSY cho phép xác định 2 chuỗi tương tác spin-spin giữa H-5'/H-6' và H-7'/H-8'/H-8, H-7/H-8/ CH_2 -9 (Hình 3.6). Các dữ liệu phổ trên cho phép gợi ý hợp chất phân lập được có khung lignan aryltetralin. Tương tác trên phổ HMBC giữa H-8 (δ_{H} 2,87) với C-1 (δ_{C} 124,8)/C-7' (δ_{C} 44,1)/C-7 (δ_{C} 70,7), giữa H-7 (δ_{H} 5,02) với C-1 (δ_{C} 124,8)/C-2 (δ_{C} 133,0)/C-8 (δ_{C} 38,8) và giữa H-8' (δ_{H} 2,72) với C-8 (δ_{C} 2,72)/C-7' (δ_{C}

44,1)/C-7 (δ_C 70,7)/C-2 (δ_C 133,0) cho phép xác định chuỗi liên kết C-1 với C-7, C-8, C-8', C-7' và C-2 tạo vòng C. Trên phổ HMBC cho thấy tương tác xa giữa proton H-3 (δ_H 6,25), H-2' (δ_H 6,73) và H-6' (δ_H 6,66) với carbon C-7' (δ_C 44,1) cho phép xác định C-7' liên kết với cả 2 vòng thơm A và B. Sự có mặt của vòng lacton được xác định nhờ tương tác HMBC của proton thuộc nhóm CH₂-9 (δ_H 4,05 và 4,63) với C-9' (δ_C 174,2)/C-8 (δ_C 38,8)/C-8' (δ_C 44,8). Vị trí của 2 nhóm dioxymethylen cũng được xác định tại C-4/C-5 và C-3'/C-4' dựa vào tương tác HMBC giữa proton của chúng với C-4/C-5 và C-3'/C-4' (Hình 3.6 và Phụ lục 1.3). Nhóm methoxy gắn với C-6 và nhóm OH gắn với C-7 được xác định nhờ tương tác HMBC giữa proton của nhóm methoxy ở δ_H 4,15 với C-6 và giữa proton của nhóm OH với C-7 và C-8.

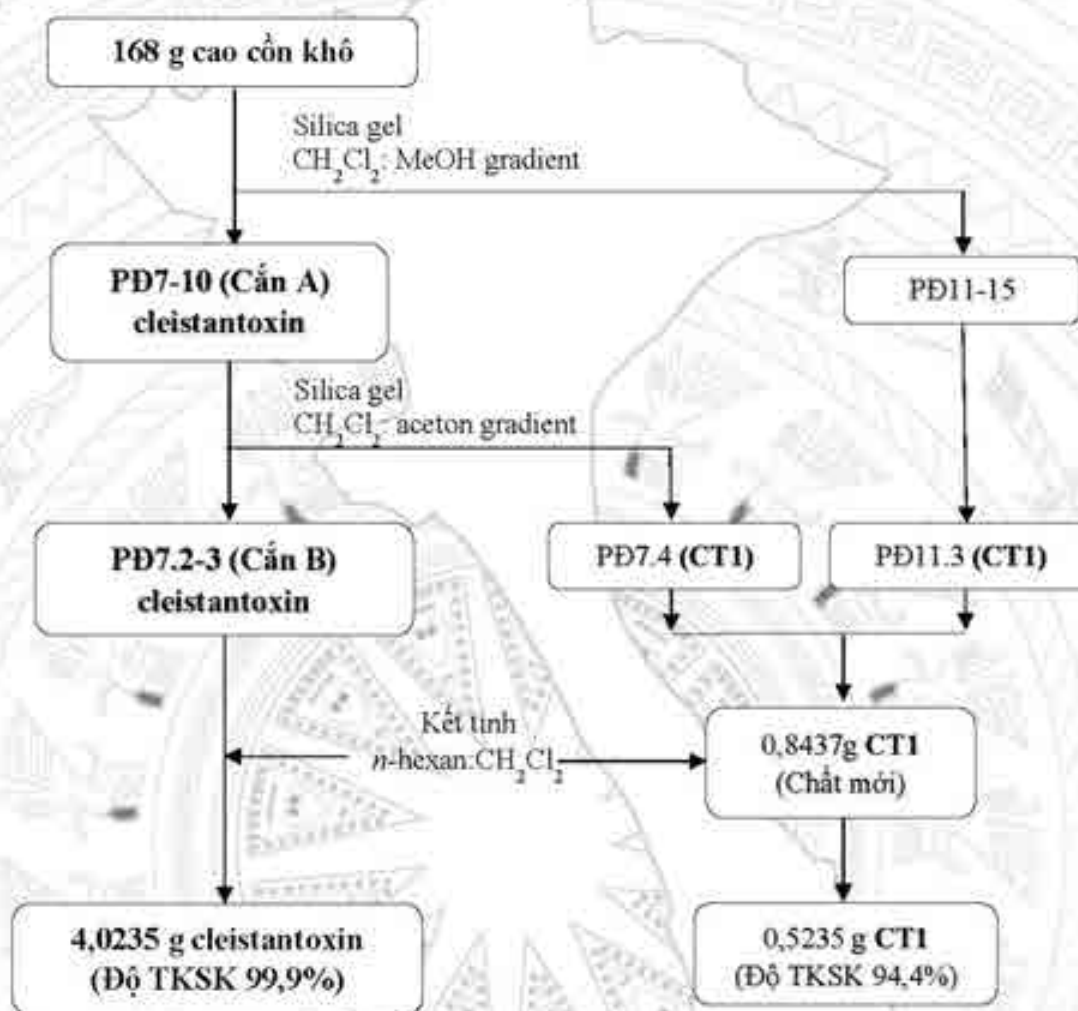


Hình 3.6. Một số tương tác chính trên phổ COSY và HMBC của chất cleistantoxin

Cấu hình tương đối của hợp chất được xác định bằng phân tích phổ NOESY và hằng số tương tác spin-spin. Proton H-7 có một tương tác kiểu *anti* ($J = 9,0$ Hz) với H-8 cho phép xác định H-7 có mối tương quan *pseudodaxial* với H-8. Ngoài ra, H-8' có 1 tương tác kiểu *gauche* ($J = 4,5$ Hz) và 1 tương tác kiểu *anti* ($J = 15,0$ Hz) cho phép xác định H-8' chiếm giữ vị trí *pseudoaxial* trong khi H-7' ở vị trí *pseudoequatorial*. Điều này cũng phù hợp với tương tác giữa H-7 với H-8' trên phổ NOESY. Cấu hình tuyệt đối sau đó đã được thiết lập nhờ phân tích phổ CD (Circular dichroism). Phổ CD cho hiệu ứng Cotton dương tại 297 nm ($\Delta\epsilon: +2,17$) cho phép kết luận cấu hình *R* của carbon C-7' [49], [77]. Dựa vào cấu hình tương đối nêu trên, cấu hình *R* được xác định cho các trung tâm bất đối còn lại C-7, C-8 và C-8'. Từ các dữ liệu phổ cho phép xác định hợp chất phân lập được chính là hợp chất (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-7-hydroxy-6-methoxy-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7'-cyclo lignan-9',9-olide có tên gọi là cleistantoxin, là chất đã được phân lập từ loài *C. indochinensis* [82].

Phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HRESI-MS, IR, UV-VIS của chất tinh chế được (Phụ lục 1.3) trùng khớp với dữ liệu phổ của cleistantoxin đã được công bố [82]. Từ đó, đưa ra bộ dữ liệu nhận dạng NLTLC gốc cleistantoxin (xem mục 3.2.1.1).

3.1.2.4. Sơ đồ phân lập, tinh chế cleistantoxin thành nguyên liệu thiết lập chuẩn



Hình 3.7. Sơ đồ phân lập, tinh chế cleistantoxin thành nguyên liệu thiết lập chuẩn

3.1.3. Phân lập, tinh chế và khẳng định cấu trúc của cleisindoside D làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng

3.1.3.1. Phân lập cleisindoside D từ PD16 trên cột silica gel

Chuẩn bị cột thủy tinh trung tính có chiều dài 60 cm đường kính 8 cm, nhồi 500 g silica gel 60 (40-63 μm) vào cột. Sau đó, hoà tan 52,9519 g cần D (PD16-17-18) trong CH_2Cl_2 , thêm 70 g silica gel 60, cô quay chân không đến khô, nghiền thành bột mịn, đưa lên cột. Dùng hệ dung môi rửa giải là CH_2Cl_2 -MeOH (98:2) tăng dần tỉ lệ MeOH từ 5, 10%... Hứng dịch rửa giải vào bình nón, mỗi bình 100 ml. Kiểm tra sự có mặt chất cleisindoside D bằng SKLM với hệ dung môi pha động là CH_2Cl_2 : MeOH (90:10) so với dung dịch chất tinh khiết cleisindoside D, thu được PD16.2-4 chứa cleisindoside D, gom PD16.2-4 cô quay chân không được 32,9088 g cần E.

Kiểm tra độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside D trong căn E là 85,8% (Hình 3.8) sử dụng phương pháp chuẩn hoá điện tích, với ĐKSK cột sắc kí pha đảo Inertsil-C18, pha động: ACN:H₂O (30:70), bước sóng: 286 nm và tốc độ dòng 1.0 mL/phút.



Hình 3.8. SKD xác định độ tinh khiết của chất cleisindoside D trong căn E

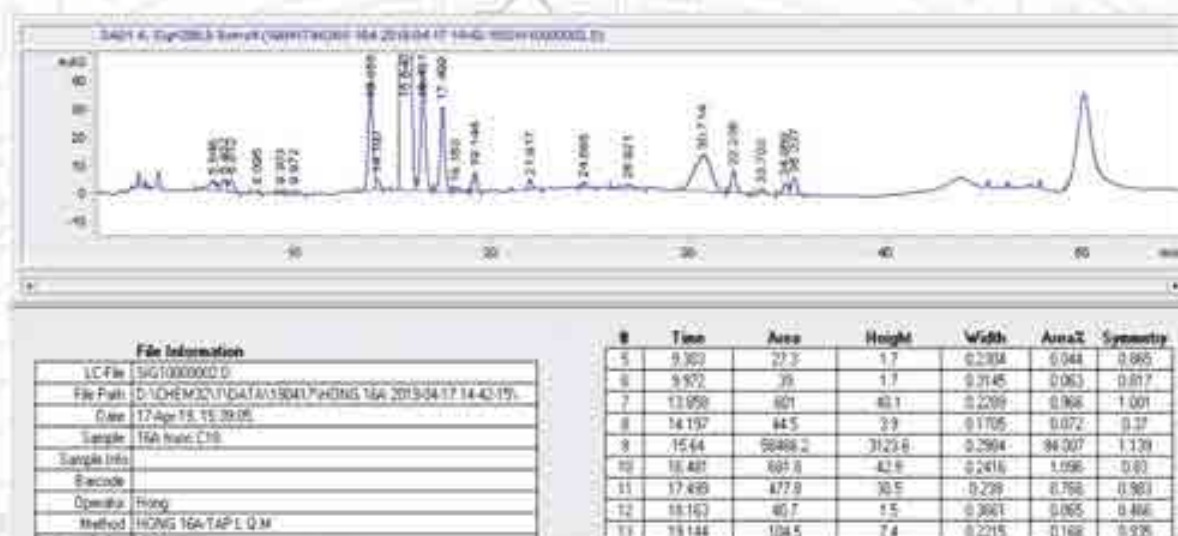
Bảng 3.2. Kết quả phân lập cleisindoside D từ PD16 trên cột silica gel

PD	Hệ dung môi	Khối lượng (g)	KT tinh chế	Chất tinh khiết
PD16.1	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (98:2)	3,1215	Cột Sephadex MeOH 100%	Cleistantoxin (500,5 mg) CT6 (34,7 mg) Neo-cleistantoxin (15mg)
PD16.2	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (95:5)	3,9639	32,9088 g căn E SK trên cột Sephadex, dung môi MeOH 100%	7,7945 g căn F Cleisindoside D (94,0%) CT8 (30 mg) CT2 (59 mg)
PD16.3	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (90:10)	17,6396		
PD16.4	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (80:20)	11,3053		
PD16.5	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (70:30) CH ₂ Cl ₂ :MeOH(50:50)	16,3469		Tạp chất

3.1.3.2. Phân lập cleisindoside D trên cột sephadex

Chuẩn bị cột thủy tinh trung tính cỡ chiều dài 1m đường kính 5cm, nhồi 400 g sephadex LH-20 vào cột. Hoà tan khoảng 7,5 g căn E trong MeOH rồi đưa lên cột, dùng hệ dung môi rửa giải là MeOH 100%.

Kiểm tra sự có mặt của cleisindoside D bằng SKLM với hệ dung môi pha động là CH₂Cl₂: MeOH: (90:10) so với dung dịch cleisindoside D. Gộp các lọ chứa cleisindoside D, đem cô quay chân không. Tiến hành lặp lại 4 lần qui trình trên thu được 7,7945 g căn F. Kiểm tra độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside D trong căn F bằng HPLC/DAD (Hình 3.9).



Hình 3.9. SKĐ xác định độ tinh khiết của chất cleisindoside D trong căn F

Nhận xét:

Độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside D trong căn F là 94,0%, còn một số tạp chất chiếm khoảng 5-7% ya căn F có màu vàng chưa đủ điều kiện làm NLTLCC định lượng. Vì vậy, cần tiếp tục tinh chế cleisindoside D tinh khiết hơn.

3.1.3.3. Tinh chế cleisindoside D trên cột sắc kí pha đảo C18

Lựa chọn phương pháp tinh chế bằng cột sắc kí pha đảo: cột sắc kí nhồi hạt silica gel pha đảo RP-18, pha động: aceton: nước.

Chuẩn bị cột thủy tinh trung tính có kích thước 5x50 cm, nhồi 100 g hạt pha tinh silica gel RP-18 (cỡ hạt 140 μm). Rửa giải bằng hệ dung môi aceton: nước với tỉ lệ aceton tăng dần từ 10 đến 50%... Hứng dịch rửa giải vào bình, mỗi bình 40 mL.

Kiểm tra sự có mặt của chất cleisindoside D bằng TLC pha đảo với hệ pha động aceton: nước=1:1, phát hiện vết cleisindoside D bằng cách soi đèn UV 254 nm. Xác định độ tinh khiết của cleisindoside D trong các lọ từ 31 đến 48 bằng HPLC/DAD (Hình 3.10).



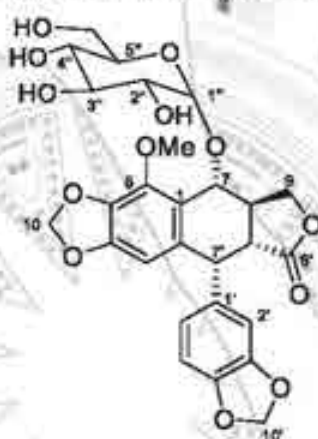
Hình 3.10. SKĐ của các lọ 31 và 42 xuất hiện chất cleisindoside D

Nhận xét:

Các lọ từ số 31- 47 có hàm lượng cleisindoside D cao được gom lại, đem cô quay chân không, kết tinh lại bằng hệ dung môi CH_2Cl_2 : *n*-butanol (6:4), sấy chân không ở nhiệt độ 60°C trong 2 ngày thu được 3,6562 g cleisindoside D. Kiểm tra độ tinh khiết của cleisindoside D là 97,6% bằng HPLC/DAD, đủ điều kiện làm NTLCC và đo phổ NMR khẳng định cấu trúc chất phân lập được là cleisindoside D.

Các lọ 27-30 được đem gom lại, cô quay chân không đến khô và sấy chân không ở nhiệt độ 60°C trong 2 ngày thu được 0,5481g chất đem đo phổ NMR khẳng định chất phân lập được là cleisindoside A.

3.1.3.4. Khẳng định cấu trúc hợp chất cleisindoside D



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của cleisindoside D

Hợp chất được phân lập dưới dạng chất bột màu trắng, điểm nóng chảy $261-262^\circ\text{C}$, $[\alpha]_{\text{D}}^{20} - 188,0$ (*c*, 0,5; MeOH). Phổ IR cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl ở ν_{max} 3419 cm^{-1} , nhóm carbonyl ở 1773 cm^{-1} , nối đôi C=C vòng thơm ở $1654, 1440\text{ cm}^{-1}$. Phổ khối phân giải cao HRESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 583,1409 $[\text{M}^+\text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho CTPT $\text{C}_{27}\text{H}_{28}\text{O}_{13}\text{Na}$, 583,1428).

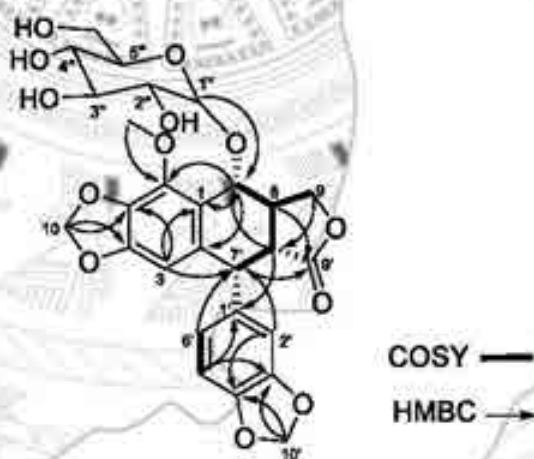
Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất phân lập được rất giống với hợp chất **cleistantoxin**, chỉ khác là có thêm tín hiệu của 1 đường glucose. Giống như chất **cleistantoxin**, phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất này xuất hiện tín hiệu của một proton thơm ở δ_{H} 6,31 (1H, s), 3 proton vòng thơm hệ ABX ở δ_{H} 6,81 (1H, s), 6,67 (1H, d, $J = 7,5\text{ Hz}$), 6,69 (1H, d, $J = 8,0\text{ Hz}$), 1 nhóm methoxy ở δ_{H} 4,00 (3H, s). Ngoài ra, khác với chất **cleistantoxin**, tín hiệu của 1 proton anome đặc trưng cho phân tử đường glucose ở δ_{H} 4,34 (d, $J = 7,5\text{ Hz}$) và các proton vùng aliphatic nằm trong khoảng δ_{H} 2,71-4,65 cũng được quan sát thấy trên phổ $^1\text{H-NMR}$. Phân đường được xác định là β -glucopyranose nhờ phân tích hằng số tương tác proton $J=7,5\text{ Hz}$. Phân tích phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT, kết hợp với phổ HSQC cho thấy tín hiệu cộng hưởng của 27 nguyên tử carbon, trong đó có 1 nhóm methoxy, 4 nhóm methin sp^2 , 1 nhóm carbonyl, 4 nhóm methylen sp^3 , 9 nhóm methin sp^3

và 8 nguyên tử carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Độ chuyển dịch hoá học của các nguyên tử carbon C-4 (δ_C 150,3), C-5 (δ_C 136,8), C-6 (δ_C 142,0), C-3' (δ_C 147,4) và C-4' (δ_C 146,8) gợi ý sự liên kết của chúng với nguyên tử oxy.

Phổ COSY cho phép xác định 2 chuỗi tương tác spin-spin giữa H-5'/H-6' và H-7'/H-8'/H-8, H-7/H-8/CH₂-9 (Hình 3.12). Trên phổ HMBC cho thấy tương tác xa giữa proton H-3, H-2' và H-6' với carbon C-7' cho phép xác định C-7' liên kết với cả 2 vòng A và B. Sự có mặt của vòng lacton được xác định nhờ tương tác HMBC của proton thuộc nhóm CH₂-9 với C-9'/C-8/C-8'. Tương tác trên phổ HMBC giữa H-8 với C-1/C-7'/C-7, giữa H-7 với C-1/C-2/C-8 và giữa H-8' với C-8/C-7'/C-7/C-2 cho phép xác định chuỗi liên kết C-1 với C-7, C-8, C-8', C-7' và C-2 tạo vòng C. Vị trí của 2 nhóm dioxymethylen cũng được xác định tại C-4/C-5 và C-3'/C-4' dựa vào tương tác HMBC giữa proton của chúng với C-4/C-5 và C-3'/C-4' (Hình 3.12). Nhóm methoxy gắn với C-6 được xác định nhờ tương tác HMBC giữa proton của nhóm methoxy với C-6.

Proton H-7 cho 1 hằng số tương tác *anti* với H-8 ($J = 9,5$ Hz) cho phép xác định H-7 có mối tương quan *pseudodiaxial* với H-8. Ngoài ra, H-8' có 1 tương tác kiểu *gauche* ($J = 4,0$ Hz) và 1 tương tác kiểu *anti* ($J = 14,5$ Hz) cho phép xác định H-8' chiếm giữ vị trí *pseudoaxial* trong khi H-7' ở vị trí *pseudoequatorial*.

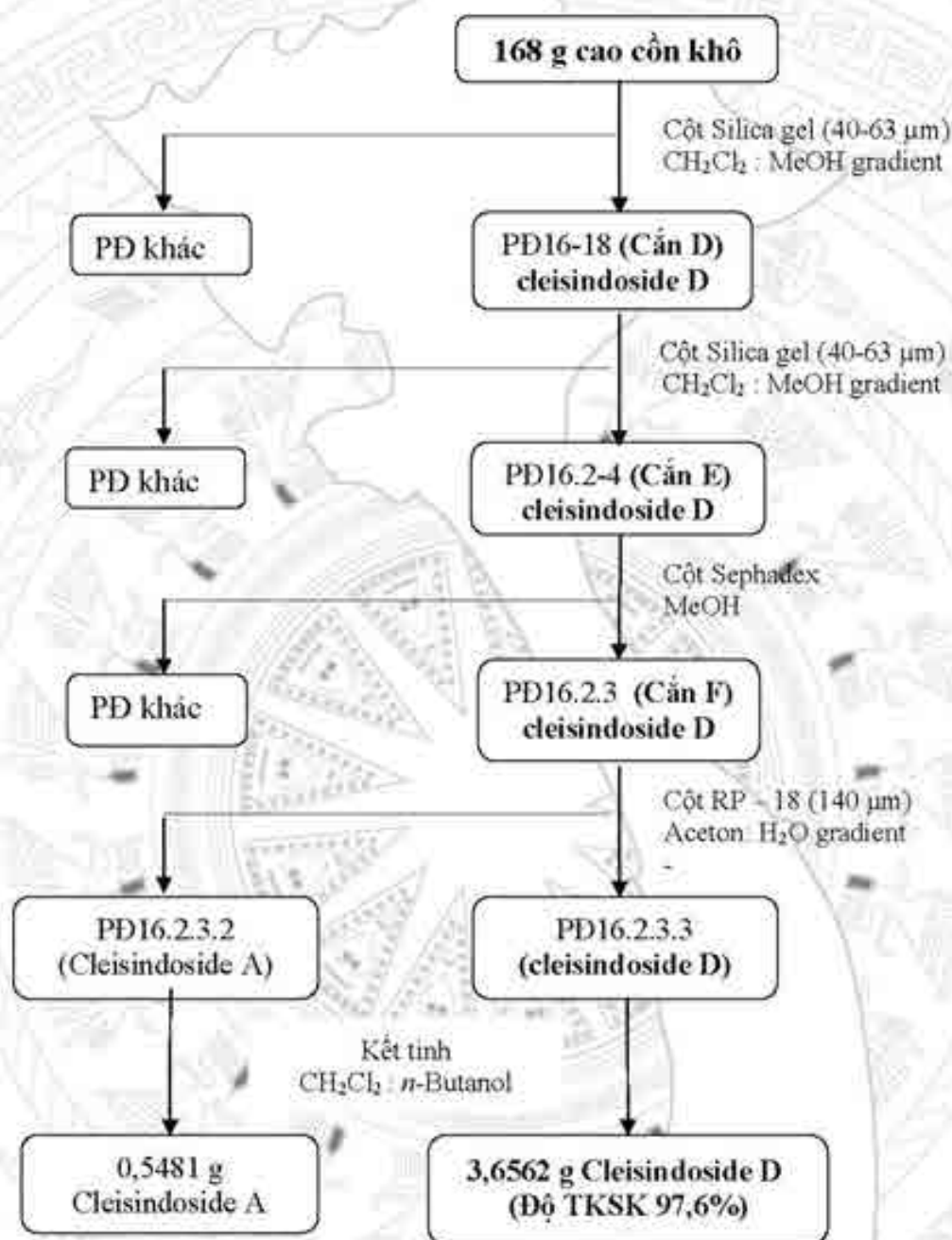
Từ các dữ liệu phổ HRESI-MS, 1D-NMR, 2D-NMR, $[\alpha]_D^{20}$ và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định hợp chất phân lập được chính là 6-methoxy-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7-cyclolignan-9',9-olide (cleisindoside D), hợp chất này đã được phân lập từ quả cây Cành hoa đồng dương (*C. indochinensis*) [83].



Hình 3.12. Một số tương tác chính trên phổ COSY và HMBC của cleisindoside D

Phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HRESI-MS, IR, UV-VIS của chất phân lập được (Phụ lục 1.4) trùng khớp với dữ liệu phổ của cleisindoside D đã được công bố [83]. Từ đó, đưa ra bộ dữ liệu phổ nhận dạng NLTLC cleisindoside D (xem mục 3.2.1.1).

3.1.3.5. Sơ đồ phân lập, tinh chế cleisindoside D làm nguyên liệu thiết lập chuẩn



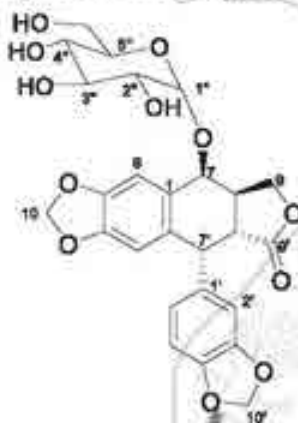
Hình 3.13. Sơ đồ phân lập, tinh chế cleisindoside D thành NLT.LCC

TÓM LẠI:

Trong quá trình phân lập cleistantoxin và cleisindoside D làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng, đã phân lập thêm được 0,5235 g CT1 (chất mới), 0,5481 g cleisindoside A, lượng không đủ để thiết lập chất chuẩn gốc định lượng, chỉ đủ làm chất chuẩn định tính và 0,070 g neo-cleistantoxin quá ít không đủ làm chuẩn định tính. Vì vậy, cần khẳng định cấu trúc của cleisindoside A (mục 3.1.4.1) và xác định cấu trúc của chất CT1 (mục 3.1.5.2) làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính.

3.1.4. Khẳng định cấu trúc của cleisindoside A làm chất chuẩn định tính

3.1.4.1. Khẳng định cấu trúc hợp chất cleisindoside A



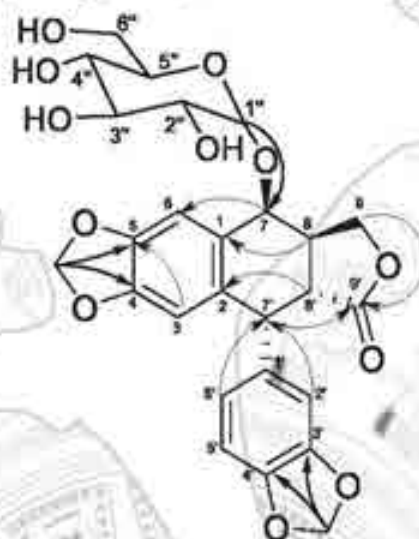
Hình 3.14. Cấu trúc hóa học của chất cleisindoside A

Hợp chất phân lập được dưới dạng chất rắn màu trắng, điểm nóng chảy 261-262°C, $[\alpha]_D^{20} - 50.0$ (*c*, 0,3; MeOH). Phổ IR cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl ở ν_{max} 3444 cm^{-1} , nhóm carbonyl ở 1773 cm^{-1} , nối đôi C=C vòng thơm ở 1654, 1440 cm^{-1} . Phổ HRESI-MS của hợp chất cho pic ion giả phân tử ở m/z 529,1416 [M-H]⁻ (tính toán lý thuyết cho CTPT C₂₆H₂₆O₁₂, 529,1424).

Phổ ¹H-NMR và của ¹³C-NMR của hợp chất phân lập được gần giống với hợp chất **cleisindoside D**, chỉ thấy mất đi tín hiệu của 1 nhóm methoxy và 1 carbon bậc 4, thay vào đó là tín hiệu của 1 nhóm methin sp². Trên phổ ¹H-NMR thấy xuất hiện tín hiệu singlet của 2 proton thơm ở δ_H 6,44 (1H, s, H-3); 7,00 (1H, s, H-6) và 1 hệ ABX ở δ_H 6,35 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-6'); 6,69 (1H, d, *J* = 8,0 Hz, H-5'); 6,50 (1Hs, H-2'); 1 proton anome ở δ_H 4,26 (1H, d, *J* = 7,5 Hz, H-1'') và các proton trong vùng aliphatic, gợi ý sự xuất hiện của một aryltetralin ligand với 1 phân tử đường. Phần đường được xác định là β -glucopyranose nhờ phân tích hằng số tương tác proton của proton anome. Trên phổ HMBC cho thấy tương tác của proton anomeric H-1'' ở δ_H 4,26 với C-7 ở δ_C 71,6 chứng tỏ phần đường được liên kết với C-7.

Khác với hợp chất **cleisindoside D** tín hiệu của H-7 được quan sát thấy như một doublet trên phổ ¹H NMR với một hằng số tương tác *gauche* (*J* = 3,0 Hz). Trong khi đó, H-8' thể hiện 1 hằng số tương tác lớn (*J* = 14,5 Hz) và 1 hằng số tương tác nhỏ (*J* = 5,5 Hz) và H-7' xuất hiện như 1 doublet với 2 hằng số tương tác nhỏ (*J* = 5,5 Hz), chứng tỏ cả H-8 và H-8' đều ở vị trí *axial*, còn H-7' chiếm giữ vị trí *equatorial*. Các phân tích này cho thấy cấu hình của C-7', C-8' và C-8 tương tự như hợp chất của **cleisindoside D**, trong khi cấu hình của C-7 bị đảo ngược.

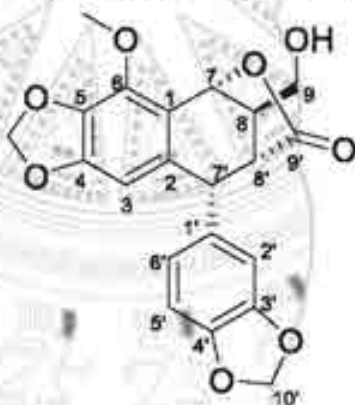
Kết hợp các dữ liệu phổ HRESI-MS, 1D, 2D-NMR và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất này được xác định là 7-(β -D-glucopyranosyloxy)-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7'-cyclo lignan-9',9'-olide có tên gọi là cleisindoside A [83].



Hình 3.15. Một số tương tác chính trên phổ HMBC của chất cleisindoside A

Phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRESI-MS, IR, UV-VIS của chất phân lập được (Phụ lục 1.5) trùng khớp với dữ liệu phổ của cleisindoside A đã được công bố [83]. Từ đó, đưa ra bộ dữ liệu nhận dạng NTLCC cleisindoside A (xem mục 3.2.2.1)

3.1.4.2. Khẳng định cấu trúc hợp chất neo-cleistantoxin

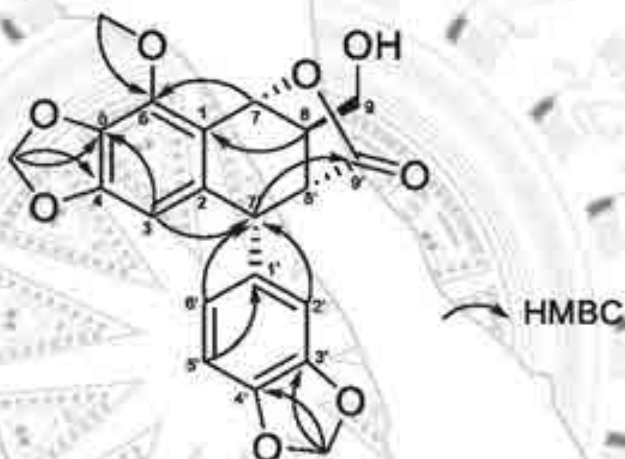


Hình 3.16. Cấu trúc hóa học của chất neo-cleistantoxin [82].

Hợp chất được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng. Phổ HRESI-MS của hợp chất cho pic ion giả phân tử ở m/z 421,0897 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (tính toán lý thuyết cho CTPT $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$, 421,0899).

Giống như hợp chất **cleistantoxin**, phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất phân lập được xuất hiện tín hiệu singlet của proton thơm ở δ_{H} 6,20 (1H, br. s, H-3) và hệ vòng thơm ABX ở δ_{H} 6,73 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-6'), 6,56 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5'), 6,49 (1H, br. s, H-2'), một nhóm methoxy ở δ_{H} 4,04 (3H, s, OCH_3). Mặt khác phân tích phổ

HMBC, cũng xác định các hệ vòng A, B và C tương tự như hợp chất **cleistantoxin**. Tuy nhiên tương tác giữa H-7 (δ_H 5,81) với nhóm carboxylic C-9' (δ_C 175,7) trên phổ HMBC của hợp chất phân lập được cho phép kết luận vòng lacton được hình thành giữa carbonyl C-9' và nhóm hydroxyl ở C-7 thay vì nhóm hydroxyl ở C-9 trong cấu trúc hợp chất **cleistantoxin**. Kết hợp các dữ liệu phổ HRMS, 1D, 2D-NMR, CD (Phụ lục 1.6) và so sánh với tài liệu tham khảo cho phép xác định hợp chất phân lập được là (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-9-hydroxy-6-methoxy-3',4':4,5-bis(metylenedioxy)-2,7-cyclolignan-9',7-olide hay còn gọi là **neo-cleistantoxin**, đây là chất được các nhà khoa học Viện hóa sinh biển phân lập lần đầu tiên từ quả cây Cách hoa đồng dương (*C. indochinensis*) [82].



Hình 3.17. Một số tương tác chính trên phổ HMBC của chất neo-cleistantoxin

Tuy nhiên, lượng chất neo-cleistantoxin phân lập được từ quả cây Chà chôi rất ít khoảng 70 mg nên không đủ để làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính.

3.1.5. Phân lập, tính chế và xác định cấu trúc các chất mới phân lập được

3.1.5.1. Phân lập, tính chế các chất lignan mới trong các phân đoạn còn lại

❖ Phân lập CT8 từ PD1-6

Từ phân đoạn 1-6 châm bản mỏng thấy xuất hiện 1 vết có màu và phát huỳnh quang tại bước sóng 254 nm, phát huỳnh quang xanh tại bước sóng 365 nm. Gôm toàn bộ phân đoạn PD1-6 cô quay chân không được 469 mg, tiến hành sắc kí cột (1x50 cm), nhồi silica gel (40-63 μ m), rửa giải bằng *n*-hexan thêm EtOAc từ 0 đến 50%, thu được 10 mg hợp chất **CT8**.

❖ *Phân lập CT1, CT7 từ PD11-15*

Gom toàn bộ phân đoạn PD11-15 cô quay chân không được 14,5998 g, tiến hành sắc kí cột (5 x 50 cm), nhồi 150 g silica gel (40-63 μ m), rửa giải bằng dung môi CH_2Cl_2 sau đó thêm acetone tăng dần 2, 5, 10%...(Bảng 3.3).

Bảng 3.3. Kết quả phân lập CT1 và CT7 từ PD11-12-13-14-15 trên cột silica gel

PD	Hệ dung môi	Khối lượng (g)	KT tinh chế	Chất tinh
PD11.1	CH_2Cl_2 (100)	1,1844		Tạp chất
PD11.2	CH_2Cl_2 :Aceton (98:2)	1,9782	kết tinh <i>n</i> -hx: CH_2Cl_2	Cleistantoxin (1,3456 g)
PD11.3	CH_2Cl_2 :Aceton (98:2)	1,0965	kết tinh <i>n</i> -hx: CH_2Cl_2	CT1 (0,4788 g)
PD11.4	CH_2Cl_2 :Aceton (98:2)	1,1566 g	Cột Sephadex, MeOH 100%	CT7 (65,1 mg)
PD11.5	CH_2Cl_2 :Aceton (98:2)	2,6242		Neo-cleistantoxin (55 mg)
PD11.6	CH_2Cl_2 :Aceton (98:2)	6,5164		Tạp chất
	CH_2Cl_2 :Aceton (95:5)			

❖ *Phân lập CT2, CT3, CT4, CT5, CT6 từ PD19-20-21-22-23.*

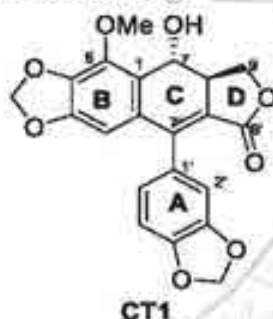
Gom toàn bộ PD19-23 cô quay chân không được 13,854 g, tiến hành nhồi cột (6x50 cm) 150 g silica gel (40-63 μ m), rửa giải bằng hệ dung môi CH_2Cl_2 -MeOH (98:2) sau đó thêm MeOH tăng dần 5, 10% đến MeOH 100% (bảng 3.4)

Bảng 3.4. Kết quả phân lập CT2, CT3, CT4, CT5, CT6 từ PD19-23 trên cột silica gel

PD	Hệ dung môi	Khối lượng (g)	KT tinh chế	Chất tinh khiết
PD20.1	CH_2Cl_2 :MeOH (98:2)	0,3623		Tạp chất
PD20.2	CH_2Cl_2 :MeOH (95:5)	0,2185	Kết tinh <i>n</i> -hx: CH_2Cl_2	CT4 (chất mới) (10 mg)
PD20.3	CH_2Cl_2 :MeOH (90:10)	2,4068		CT3 (chất mới) (10 mg)
PD20.4	CH_2Cl_2 :MeOH (85:15)	1,1383		CT6 (chất mới) (42,7 mg) Cleistantoxin (500 mg)
PD20.5		1,9725	Cột silica gel CH_2Cl_2 :MeOH Gradient	Cleisindoside D (0,5127 g) Cleisindoside A (0,2355 g) CT2 (10,8 mg)
PD20.6	CH_2Cl_2 :MeOH (85:15) CH_2Cl_2 :MeOH (50:0)	2,6402	Cột Sephadex MeOH 100%	CT5 chất mới (11 mg)
PD20.7	CH_2Cl_2 :MeOH (50:50)- MeOH 100%	4,8781		Tạp chất

3.1.5.2. Xác định cấu trúc các chất mới phân lập được từ quả cây Chà chôi

❖ Hợp chất CT1: 7',8'-dehydrocleistantoxin



Hình 3.18. Cấu trúc hóa học của chất CT1

Hợp chất CT1 được phân lập dưới dạng bột màu trắng, điểm nóng chảy 328-330°C, $[\alpha]_D^{20}$: +88,1 (c 0,042, CHCl₃). Phổ IR của CT1 có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl ở ν_{max} 3547 cm⁻¹, nhóm carbonyl ở 1745 cm⁻¹, nối đôi C=C_{thơm} ở 1656, 1489 cm⁻¹. Phổ khối phân giải cao HRESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 419,0749 [M+Na]⁺ (tính toán lý thuyết cho CTPT C₂₁H₁₆O₈Na, 419,0743). Kết hợp với dữ liệu phổ ¹³C NMR cho phép xác định hợp chất CT1 có CTPT là C₂₁H₁₆O₈.

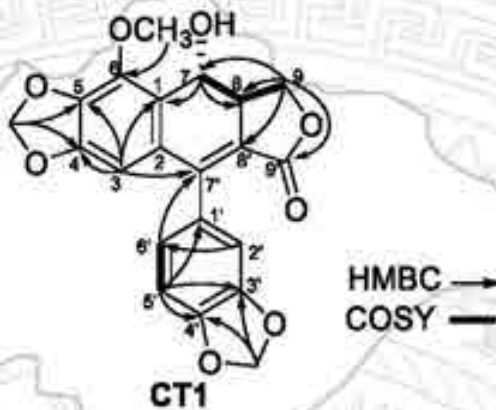
Phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR của CT1 rất giống với hợp chất cleistantoxin, chỉ khác thấy mất đi tín hiệu của 2 nhóm methine sp³, thay vào đó là tín hiệu của 2 carbon sp² không liên kết trực tiếp với hydro. Trên phổ ¹H-NMR của CT1 thấy xuất hiện tín hiệu singlet của 1 proton thơm ở δ_H 6,07 (1H, s) và 3 proton thơm hệ ABX ở δ_H 6,64 (1H, br s); 6,87 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) và 6,59 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), một nhóm methoxy ở δ_H 3,91 (3H, s) và hai nhóm methylenedioxy ở δ_H 5,95 (2H, s) và 5,96 (2H, s). Phổ ¹³C-NMR và DEPT cho tín hiệu của 21 nguyên tử carbon, trong đó có 1 nhóm carbonyl ở δ_C 168,4; một nhóm methoxy ở δ_C 60,9; hai nhóm methylenedioxy ở δ_C 101,6; 102,5, một nhóm oxymethylen sp³ ở δ_C 70,8; một nhóm oxymethine sp³ ở δ_C 73,4; 1 nhóm methine sp³ ở δ_C 43,1; 4 nhóm methine sp² ở δ_C 104,7; 110,5; 108,3; 123,8 và 10 nguyên tử carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Độ chuyển dịch hoá học của các nguyên tử carbon C-4 (δ_C 148,5), C-5 (δ_C 139,90), C-6 (δ_C 142,5), C-7 (δ_C 73,4), C-9 (δ_C 70,8), C-3' (δ_C 147,2) và C-4' (δ_C 147,7) gợi ý sự liên kết của chúng với nguyên tử oxy. Các mảnh cấu trúc phân tử được thiết lập nhờ phân tích phổ COSY và HMBC. Phổ COSY cho phép xác định 2 chuỗi tương tác spin-spin là H-7 (δ_H 5,12)/H-8 (δ_H 3,38)/CH₂-9 (δ_H 4,12 và 4,64) và H-5' (δ_H 6,87)/H-6' (δ_H 6,59) (Hình 3.19).

Các mảnh cấu trúc này sau đó được kết nối nhờ phân tích phổ HMBC. Trên phổ HMBC cho thấy tương tác giữa proton H-5' (δ_H 6,87) với C-1' (δ_C 128,4)/C-3' (δ_C

147,2)/C-4' (δ_c 147,7); tương tác giữa proton H-6' (δ_H 5,59) với C-2' (δ_c 110,5)/C-4' (δ_c 147,7)/C-7' (δ_c 145,6) và tương tác giữa proton H-2' (δ_H 6,64) với C-6' (δ_c 123,8) cho phép xác nhận cấu trúc của vòng A bị thế ở 3 vị trí và có sự liên kết giữa carbon C-7' với vòng A. Tương tác trên phổ HMBC giữa H-3 (δ_H 6,07) với C-1 (δ_c 126,3)/C-4 (δ_c 148,5)/C-5 (δ_c 139,9)/C-7' (δ_c 145,6) cho phép xác nhận cấu trúc của vòng B. Tương tác HMBC giữa H-8 với C-7 (δ_c 73,4)/C-7' (δ_c 145,6)/C-8' (δ_c 119,6) và tương tác giữa H-7 (δ_H 5,12) với C-1 (δ_c 126,3)/C-2 (δ_c 130,4)/C-8 (δ_c 43,1)/C-9 (δ_c 70,8) cho phép xác nhận cấu trúc của vòng C. Vòng lacton D được xác định gắn với vòng C ở vị trí C-8 và C-8' dựa vào tương tác HMBC giữa proton của nhóm CH₂-9 (δ_H 4,12 và 4,64) với C-7 (δ_c 73,4)/C-8 (δ_c 43,1)/C-8' (δ_c 119,6)/C-9' (δ_c 168,4). Tương tác của proton H-7 (δ_H 5,12) với C-8 (δ_c 43,1)/C-9 (δ_c 70,8)/C-1 (δ_c 126,3), chỉ ra mối liên kết của C-7 với cả vòng B và D. Vị trí của 2 nhóm dioxymethylen cũng được xác định tại C-4/C-5 và C-3'/C-4' dựa vào tương tác HMBC giữa proton của nhóm methylenedioxy ở δ_H 5,95 (CH₂-10') với C-3' (δ_c 147,2)/C-4' (δ_c 147,7) và proton của nhóm methylenedioxy ở δ_H 5,96 (CH₂-10) với C-4 (δ_c 148,5)/C-5 (δ_c 139,9). Tương tác trên phổ HMBC giữa proton thuộc nhóm methoxy ở δ_H 3,91 với C-6 (δ_c 142,5) cho phép xác định nhóm methoxy gắn ở vị trí C-6 (Hình 3.19).

Cấu hình tương đối của CT1 được xác định nhờ phân tích hằng số tương tác và phổ NOESY, proton H-7 cho 1 hằng số tương tác *anti* ($J = 13,5$ Hz), chứng tỏ H-7 có mối tương quan *trans*-pseudodiaxial với H-8. Điều này được khẳng định trên phổ NOESY khi xuất hiện tương tác giữa H-7 (δ_H 5,12) và H_b-9 (δ_H 4,12). Cấu hình tuyệt đối tại vị trí C-7 và C-8 của hợp chất CT1 được xác định dựa vào phương pháp tính toán lượng tử hóa học điện tử lưỡng sắc tròn (ECD - Electronic Circular Dichroism) dựa trên phần mềm Gaussian 09. Tính toán lý thuyết cho 2 đồng phân (7*S*,8*R*)-CT1 và (7*R*,8*S*)-CT1 cho phép xác định cấu hình 7*S*,8*R* của hợp chất CT1 phù hợp với mô hình tính toán (Phụ lục 1.7).

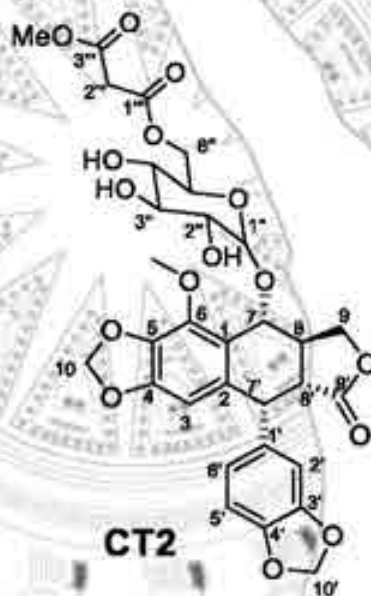
Dựa vào các dữ liệu phổ HRESI-MS, 1D, 2D-NMR và $[\alpha]_D^{20}$ (Phụ lục 1.7) cho phép xác định cấu trúc hóa học của hợp chất CT1 (Hình 3.18). Đây là một chất mới được đặt tên là **7',8'-dehydrocleistantoxin**.



Hình 3.19. Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của chất CT1

Từ dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRESI-MS, IR, UV-VIS... của chất 7',8'-dehydrocleistantoxin (Phụ lục 1.7) để xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng NLTLC định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin (xem mục 3.2.2.2)

❖ Hợp chất CT2: *Cleistonkaside A*



Hình 3.20. Cấu trúc hòa học của chất CT2

Hợp chất CT2 được phân lập dưới dạng bột màu trắng, điểm nóng chảy 174-176°C, $[\alpha]_D^{20}$: -218,18 (c 0,44; CHCl_3). Phổ IR của CT2 có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl ở ν_{max} 3523 cm^{-1} , nhóm carbonyl ở 1747 cm^{-1} , nối đôi C=C vòng thơm ở 1618, 1475 cm^{-1} . Phổ khối phân giải cao HRESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 695,1367 $[\text{M}+\text{Cl}]^+$ (tính toán lý thuyết cho CTPT $\text{C}_{31}\text{H}_{32}\text{O}_{16}\text{Cl}$, 695,1379).

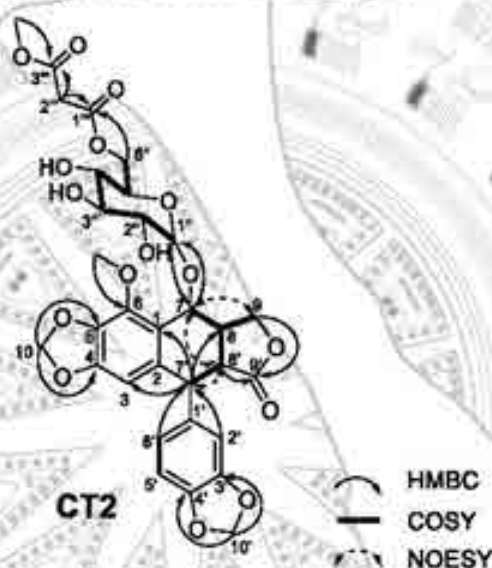
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của **CT2** xuất hiện tín hiệu của một proton thơm ở δ_{H} 6,34 (1H, s), một hệ vòng thơm ABX ở δ_{H} 6,64 (1H, br s), 6,73 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) và 6,74 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) và hai nhóm methoxy ở δ_{H} 3,71 (3H, s) và 4,06 (3H, s). Ngoài ra thấy xuất hiện tín hiệu của proton anomeric của phân tử đường ở δ_{H} 4,38 (1H, d, $J = 7,5$ Hz) và các proton vùng aliphatic nằm trong khoảng δ_{H} 2,87-4,28. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT cho tín hiệu của 31 nguyên tử carbon với ba nhóm carbonyl ở δ_{C} 173,9; 166,8; 166,6; 2 nhóm methyl, 5 nhóm methylene, 13 nhóm methin và 8 carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Phân tích phổ COSY $^1\text{H-}^1\text{H}$ cho thấy ba hệ tương tác spin-spin: H-7/H-8/CH₂-9, H-7'/H-8'/H-8; H-5'/H-6' và H-1''/H-2''/H-3''/H-4''/H-5''/CH₂-6'' (Hình 3.21). Các dữ liệu phổ NMR của **CT2** gần tương tự như hợp chất eleisindoside E, mà trước đó đã được phân lập từ loài *C. indochinensis*, ngoại trừ sự hiện diện của một phân tử methyl malonat thay vì một nhóm acetyl.

Cấu trúc phẳng của **CT2** được xác định dựa trên phân tích phổ HMBC. Trên phổ HMBC, tương tác của H-2' (δ_{H} 6,64)/H-6' (δ_{H} 6,74)/H-3 (δ_{H} 6,34) với C-7' (δ_{C} 44,3), chỉ ra liên kết C-7' với cả vòng A và B. Vòng lacton được xác định từ tương tác của proton CH₂-9 (δ_{H} 4,06; 6,61) với nhóm carbonyl ở δ_{C} 173,9 (C-9'). Ngoài ra, tương tác proton anomeric H-1'' (δ_{H} 4,38) với C-7 (δ_{C} 76,4) chứng tỏ phân tử đường gắn với C-7. Các tương tác HMBC giữa proton của nhóm methoxy tại δ_{H} 4,06 với C-6 (δ_{C} 141,9) và proton của nhóm methoxy ở δ_{H} 3,71 với C-3''' (δ_{C} 166,8) chứng tỏ hai nhóm methoxy gắn với C-6 và C-3''' tương ứng. Cuối cùng, vị trí của một phân tử methyl malonat tại C-6'' được xác định dựa trên phổ HMBC nhờ tương tác H-6'' (δ_{H} 4,28) với C-1''' (δ_{C} 166,6) và tương tác từ H-2''' (δ_{H} 2,87 và 3,09) với C-3''' (δ_{C} 166,8)/C-1''' (δ_{C} 166,6).

Cấu hình tương đối của **CT2** được xác định từ phân tích hằng số tương tác và phổ NOESY. Proton H-7 cho 1 hằng số tương tác *anti* ($J = 10,0$ Hz), chứng tỏ H-7 có mối tương quan *trans-diaxial* với H-8. Ngoài ra, H-8' được quan sát thấy có tín hiệu doublet doublet trên phổ $^1\text{H-NMR}$ và cho 1 hằng số tương tác *gauche* ($J = 4,5$ Hz) và hằng số tương tác *anti* ($J = 14,5$ Hz). Điều này cho thấy H-8' chiếm giữ vị trí *axial* trong khi H-7' ở vị trí *equatorial*. Điều này cũng được khẳng định thông qua tương tác giữa H-7 và H-8' trên phổ NOESY.

Cấu hình tuyệt đối của **CT2** được thiết lập nhờ phân tích phổ CD (circular dichroism), phổ (CD) của **CT2** cho hiệu ứng Cotton dương ở 296 nm ($\Delta\epsilon + 2,5$) phù

hợp với hiệu ứng dương cho lignan 7'R [52], [76], [82]. Những dữ liệu này kết hợp với cấu hình tương đối được xác định ở trên cho phép xác định cấu hình *R* được chỉ định cho các trung tâm bất đối còn lại, C-7, C-8 và C-8'. Cấu hình tuyệt đối của đường glucose được xác định bằng cách thủy phân CT2 trong dung dịch axit HCl. Phần glucose thu được đã được so sánh trên TLC với đường glucose chuẩn. Sản phẩm glucose thủy phân có giá trị quay cực dương ($[\alpha]_D^{27} +41,5$ (c 0,05, MeOH)) chứng tỏ cấu hình β -D cho đường glucose trong phân tử CT2. Trên cơ sở các dữ liệu phổ nêu trên (Phụ lục 1.8), cấu trúc của CT2 là một chất mới đã được xác định như được chỉ ra trong hình 3.21 và được đặt tên là **cleistonkaside A**.



Hình 3.21. Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY và NOESY của chất CT2
❖ Hợp chất CT3: cleistonkinin A



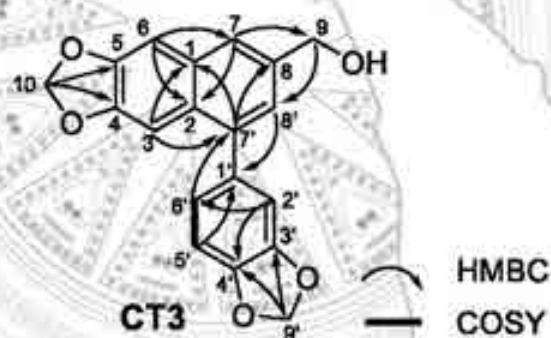
Hình 3.22. Công thức cấu tạo của CT3

Hợp chất CT3 được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng, điểm nóng chảy 131-134°C. Phổ IR của CT3 có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl ở ν_{max} 3341 cm^{-1} , nối đôi C=C vòng thơm ở 1616, 1465 cm^{-1} . Phổ khối phân giải cao HRESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 321,0753 [M-H]⁻ (tính toán lý thuyết cho CTPT C₁₉H₁₄O₅, 321,0763). Phổ ¹H-NMR của CT3 cho thấy các tín hiệu đặc trưng của

aryldihydronaphthalen lignan với tín hiệu của các proton thơm ở δ_H 7,19 (1H, s, H-3); 7,15 (1H, s, H-6); 7,25 (1H, d, $J=1,5$ Hz, H-8') và 7,64 (1H, br. s, H-7), ba proton thơm hệ ABX tại δ_H 6,92 (1H, d, $J=1,0$ Hz, H-2'), 6,91 (d, $J=8,0$ Hz, H-5') và 6,89 (dd, $J=1,5$ Hz; 8,0 Hz, H-6'), hai nhóm methylenedioxy (δ_H 6,04 và 6,02) và một nhóm oxymethylen ở δ_H 4,82.

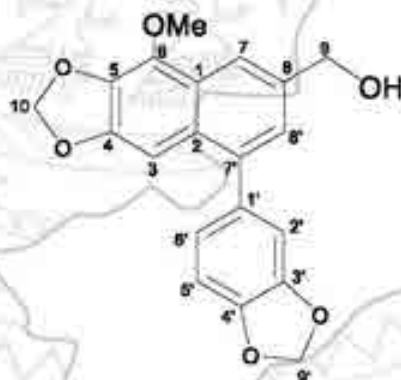
Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho tín hiệu của 19 nguyên tử carbon, bao gồm ba nhóm methylene sp^3 ở δ_C 65,5, 101,1; bảy nhóm methin sp^2 ở δ_C 102,4, 104,2, 124,5, 110,4, 108,3, 123,2, 124,9 và chín nguyên tử carbon sp^2 không liên kết trực tiếp với hydro. So với các hợp chất CT1-CT2, hợp chất CT3 cho thấy sự vắng mặt của vòng lacton. Vị trí của nhóm oxymethylen được xác định liên kết với C-8 nhờ tương tác của proton nhóm oxymethylen tại δ_H 4,82 (CH₂-9) với C-7 (δ_C 124,5)/ C-8 (δ_C 136,4) và C-8' (δ_C 124,9).

Kết hợp các dữ liệu phổ HRESI-MS, 1D-NMR và 2D-NMR (phụ lục 1.9) cho phép xác định hợp chất CT3 là 3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-8'-deshydroxymethylene-2,7'-cyclo lignan-7,7'-dien. Đây là một chất mới và được đặt tên là **cleistonkinin A**.



Hình 3.23. Một số tương tác HMBC, COSY của chất CT3

❖ Hợp chất CT4: Cleistonkinin B

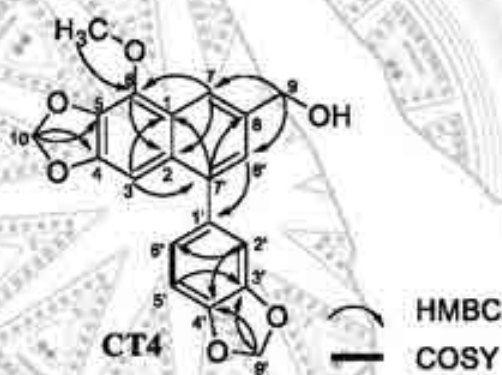


Hình 3.24. Cấu trúc hóa học của chất CT4

Hợp chất **CT4** được phân lập dưới dạng bột vô định hình màu vàng, điểm nóng chảy 154–156°C. Tan tốt trong CH_2Cl_2 , CHCl_3 và ACN, kém tan trong MeOH. Phổ IR của **CT4** có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl ở ν_{max} 3341 cm^{-1} , nối đôi $\text{C}=\text{C}_{\text{vòng thơm}}$ ở 1615, 1465 cm^{-1} . Phổ khối phân giải cao HRESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 351,0877 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (tính toán lý thuyết cho CIPT $\text{C}_{20}\text{H}_{15}\text{O}_6$, 351,0869)

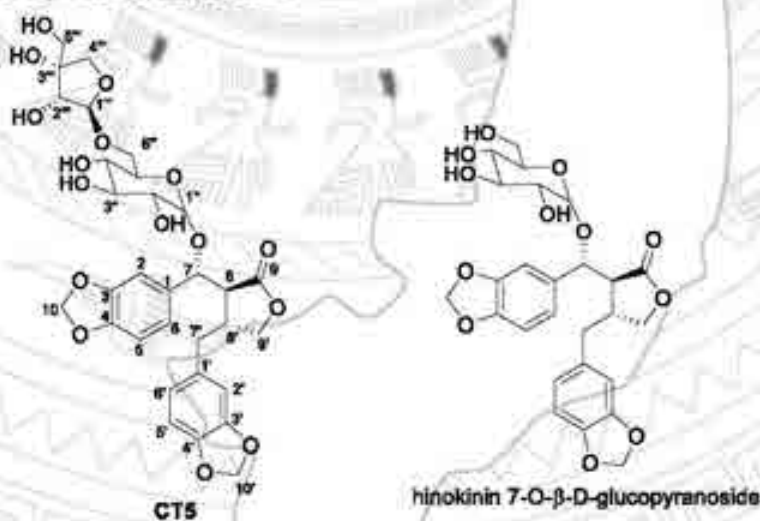
Phổ 1D-NMR của **CT4** gần giống với **CT3**, chỉ khác thấy mất đi tín hiệu của 1 nhóm methine sp^2 , thay vào đó thấy có thêm tín hiệu của 1 nhóm methoxy [δ_{H} 4,19 và δ_{C} 60,0] và một carbon bậc bốn sp^2 (δ_{C} 139,4). Điều này cho phép xác định nhóm methine sp^2 trong **CT3** đã được thay thế bởi một nhóm methoxy trong **CT4**. Tương tác HMBC của nhóm methoxy ở δ_{H} 4,19 với C-6 (δ_{C} 139,4) cho phép xác định nhóm methoxy gắn ở vị trí C-6.

Kết hợp các dữ liệu phổ HRESI-MS, 1D-NMR và 2D-NMR (phụ lục 1.10) cho phép xác định hợp chất **CT4** là 6-methoxy-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-8'-deshydroxymethylene-2,7'-cyclo lignan-7,7'-dien. Đây là một chất mới được đặt tên là **cleistonkinin B**.



Hình 3.25. Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của chất **CT4**

❖ Hợp chất **CT5** / Cleistonkiside B



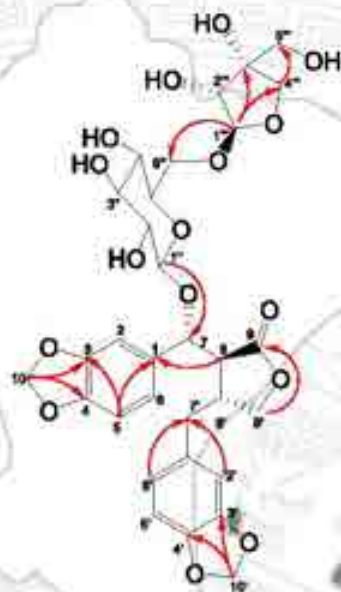
Hình 3.26. Cấu trúc hóa học của chất **CT5** và chất tham khảo

Hợp chất **CT5** được phân lập dưới dạng bột màu trắng, điểm nóng chảy 184-185°C, $[\alpha]_D^{20}$: -101,2 (c 0,083; MeOH). Phổ IR của **CT5** có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl ở ν_{max} 3329 cm^{-1} , nhóm carbonyl ở 1755 cm^{-1} , nối đôi C=C vòng thơm ở 1643, 1440 cm^{-1} . Phổ khối phân giải cao HRESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 663,1930 [M-H]⁻ (tính toán lý thuyết cho CTPT là C₃₁H₃₅O₁₆, 663,1925).

Cấu trúc phẳng của **CT5** đã được xác định bằng cách phân tích phổ NMR. So sánh phổ ¹³C-NMR và ¹H-NMR của **CT5** với hinokinin 7-O-β-D-glucopyranoside [54] cho thấy sự tương đồng về cấu trúc, ngoài ra **CT5** có thêm các tín hiệu bổ sung của một carbohydrat thứ hai ở δ_C 109,4 (C-1''), 76,0 (C-2''), 78,8 (C-3''), 73,3 (C-4'') và 63,4 (C-5''), các giá trị này đặc trưng cho một đơn vị đường apifuranose. Phân tích phổ COSY ¹H-¹H cho thấy hệ tương tác spin-spin từ H-8' đến CH₂-7'/CH₂-9' và H-8/H-7 (Hình 3.27). Những dữ liệu phổ cho thấy sự mở vòng C trong cấu trúc của **CT5** so với các hợp chất **CT1-CT4**. Trên phổ HMBC tương tác của proton H-7 (δ_H 5,21) với carbon anomeric ở δ_C 99,1 (C-1') xác định phân tử đường gắn với C-7. Tương tự như vậy, liên kết của O-β-apiofuranose với C-6'' của glucopyranose được xác định nhờ tương tác của proton H-1'' (δ_H 4,90) với C-6'' (δ_C 67,4). Trên phổ NOESY cho thấy tương tác giữa H-8' (δ_H 2,88) và H-7 (δ_H 5,21) cho phép xác định CH-7 và H-8' nằm cùng trên một mặt phẳng và vị trí của H-8/H-8' được xác định là dạng *trans* [54], [57].

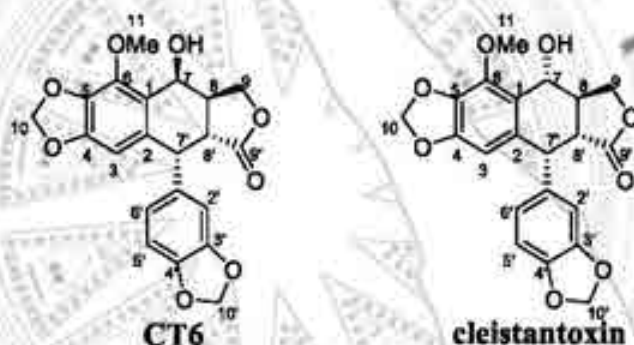
Phổ CD của **CT5** cho hiệu ứng Cotton âm ở 235nm ($\Delta\epsilon$ - 3,1) và 285 ($\Delta\epsilon$ - 1,1). Proton H-7 cho 1 hằng số tương tác *gauche* ($J = 3,5$ Hz) chỉ ra cấu hình tương đối giữa C-7 và C-8 là cấu hình *erythro* [60], [85]. Chất **CT5** sau khi thủy phân thu được đường glucopyranose và apiofuranose có độ quay cực dương, so sánh giá trị R_f trùng với của đường chuẩn do đó cấu hình β-D- được xác định cho cả glucopyranose và apiofuranose của **CT5**. Từ các dữ liệu phổ nêu trên cho phép giả thiết 4 dạng cấu hình của hợp chất **CT5** là 7*R*,8*S*,8'*R*, 7*R*,8*R*,8'*S*, 7*S*,8*R*,8'*S* và 7*S*,8*S*,8'*R*. Tính toán lý thuyết cho 4 đồng enantiomer trên cho phép xác định cấu hình tuyệt đối 7*R*,8*S*,8'*R* của hợp chất **CT5** phù hợp với mô hình tính toán (Phụ lục 1.11).

Kết hợp các dữ liệu phổ HRESI-MS, CD, 1D-NMR và 2D-NMR (Phụ lục 1.11), hợp chất aryltetralin lignan glycosid này được xác định có cấu trúc hóa học như hình 3.27, đây là một chất mới được đặt tên là **cleistonkaside B**.



Hình 3.27. Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY của chất CT5

❖ Hợp chất CT6: *cleistonkinen*



Hình 3.28. Cấu trúc hóa học của chất CT6 và chất tham khảo cleistantoxin

Hợp chất CT6 được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, điểm nóng chảy 328-330 °C, $[\alpha]_D^{20}$: -97,3 (*c* 0,54; CH₂Cl₂). Phổ IR của CT6 có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl ở ν_{max} 3593 cm⁻¹, nhóm carbonyl ở 1764 cm⁻¹, nối đôi C=C_{vòng thơm} ở 1612, 1471 cm⁻¹.

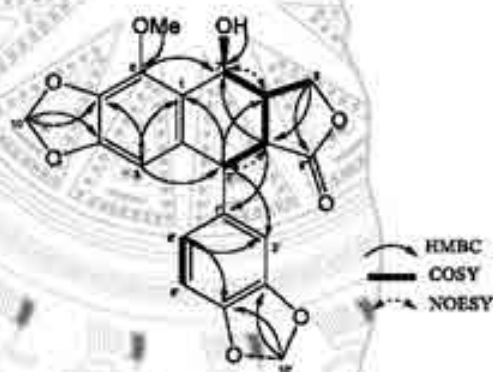
Phổ khối phân giải cao HRESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 421,0902 [M⁺Na]⁺ (tính toán lý thuyết cho CTPT là C₂₁H₁₈O₈Na, 421,0899). Phổ ¹³C-NMR và ¹H-NMR của CT6 rất giống với hợp chất **cleistantoxin**, cho tín hiệu của 1 nhóm carbonyl, một nhóm methoxy, hai nhóm methylenedioxy, một nhóm oxymethylen sp³, một nhóm oxymethine sp³, 3 nhóm methine sp³, 4 nhóm methine sp² và 8 nguyên tử carbon sp² không liên kết trực tiếp với hydro. Tuy nhiên, độ chuyển dịch hóa học cũng như hằng số tương tác của 2 hợp chất này có sự khác biệt, nhất là ở vùng aliphatic. Phân tích phổ COSY cho thấy hợp chất CT6 cho các hệ tương tác spin-spin tương tự như hợp chất **cleistantoxin**. Mặt khác, phân tích phổ HMBC cũng xác định các hệ vòng

A, B, C và vòng lacton tương tự như hợp chất **cleistantoxin**. Dựa vào phổ HRESI-MS, ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, COSY, HSQC và HMBC cho phép xác định cấu trúc phẳng của hợp chất **CT6** giống như hợp chất **cleistantoxin**.

Cấu hình tương đối của chất **CT6** được xác định bằng phân tích phổ NOESY và hằng số tương tác spin-spin. Proton H-7 có một tương tác kiểu *gauche* ($J = 3.0$ Hz) với H-8. Trong khi đó, H-8' thể hiện 1 hằng số tương tác lớn ($J = 14.0$ Hz) và 1 hằng số tương tác nhỏ ($J = 5.5$ Hz) và H-7' xuất hiện dưới dạng doublet với hằng số tương tác nhỏ ($J = 5.5$ Hz), chứng tỏ cả H-8 và H-8' đều ở vị trí *axial*, còn H-7' chiếm giữ vị trí *equatorial*. Điều này cũng phù hợp với tương tác giữa H-7 với H-8 và tương tác giữa H-7' và H-8' trên phổ NOESY.

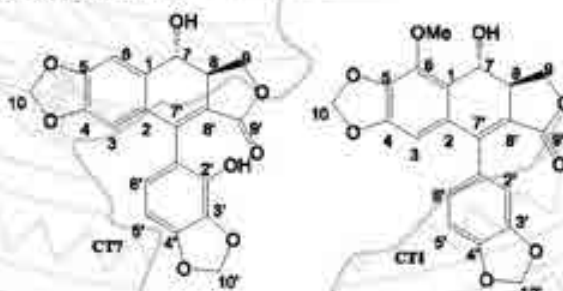
Cấu hình tuyệt đối của **CT6** sau đó đã được thiết lập nhờ phân tích phổ CD (Circular dichroism). Phổ CD cho hiệu ứng Cotton dương tại 295 nm ($\Delta\epsilon: +2.01$) cho phép kết luận cấu hình *R* của carbon C-7' [49], [77]. Dựa vào cấu hình tương đối nêu trên, cấu hình *R* được xác định cho các trung tâm bất đối C-7', C-8' và C-8 tương tự như hợp chất của **cleistantoxin**, trong khi cấu hình của C-7 bị đảo ngược.

Kết hợp các dữ liệu phổ HRESI-MS, 1D, 2D-NMR, CD và $[\alpha]_D$ của **CT6** (Phụ lục 1.12) cho phép xác định hợp chất **CT6** là (7*S*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-7-hydroxy-6-methoxy-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7'-cyclo lignan-9',9-olide, đây là một chất mới được đặt tên là **cleistonkinen**.



Hình 3.29. Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY và NOESY của **CT6**

❖ Hợp chất **CT7**: **cleistonkinin E**

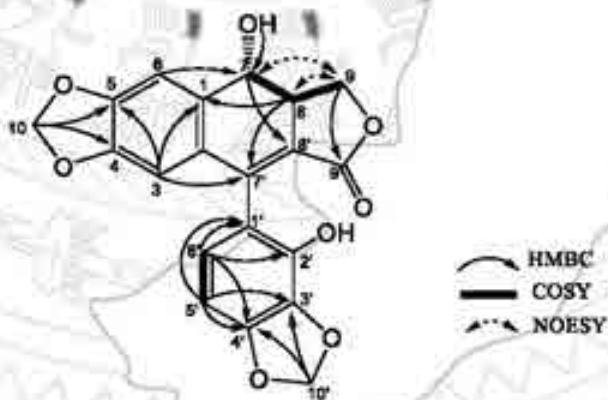


Hình 3.30. Cấu trúc hóa học của **CT7** và chất tham khảo **CT1**

Hợp chất **CT7** được phân lập dưới dạng chất rắn màu trắng, điểm nóng chảy 270-271°C, $[\alpha]_D^{20}$: +234,6 (c 0,108; CHCl_3). Phổ IR của **CT7** có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm hydroxyl ở ν_{max} 3466 cm^{-1} , nhóm carbonyl ở 1726 cm^{-1} , nối đôi C=C vòng thơm ở 1629, 1446 cm^{-1} . Phổ khối phân giải cao HRESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 405,0583 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho CTPT $\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_8\text{Na}$, 405,0581).

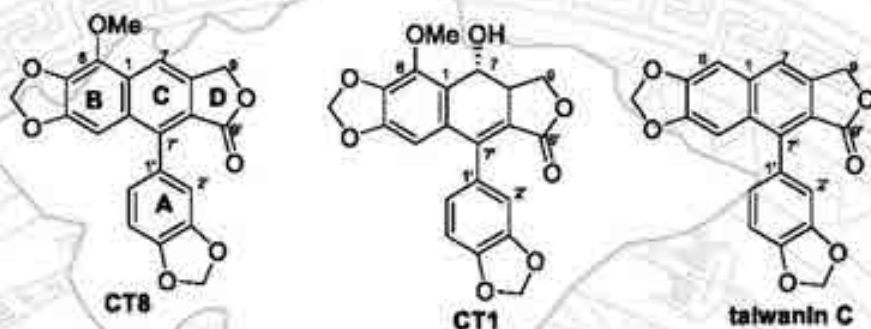
Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất **CT7** thể hiện các đặc điểm đặc trưng của một aryltetralin lignan như **CT1**, ngoại trừ sự vắng mặt của một nhóm methoxy. So với hợp chất **CT1**, hợp chất **CT7** không còn thấy xuất hiện hệ vòng thơm ABX thay vào đó là 2 proton thơm ở δ_{H} 6,95 (1H, d, $J = 8,0$ Hz) và 6,67 (1H, d, $J = 8,0$ Hz). Ngoài ra phổ $^1\text{H-NMR}$ của **CT7** thấy xuất hiện tín hiệu singlet của hai proton thơm tại δ_{H} 6,29 (1H, s) và 7,14 (1H, s). Tín hiệu của nhóm hydroxyl singlet ở δ_{H} 6,79 (1H, s) và doublet ở δ_{H} 5,92 (1H, d, $J = 6,5$ Hz). Trên phổ HMBC thấy có tương tác giữa proton của nhóm hydroxyl ở δ_{H} 5,92 với carbon C-1 (δ_{C} 137,3)/C-8 (δ_{C} 42,5)/C-7 (δ_{C} 71,7) cho phép xác định nhóm OH này gắn ở vị trí C-7. Tương tác trên phổ HMBC giữa H-6' với C-1', C-2' và C-4'; tương tác giữa H-5' với C-1', C-3', C-4' và tương tác giữa proton của nhóm dioxymethylene với C-3' và C-4' cho phép xác định nhóm dioxymethylene gắn ở vị trí C-3', C-4' và nhóm OH gắn ở vị trí C-2'.

Phân tích các hằng số tương tác và phổ NOESY của **CT7** cho thấy hợp chất **CT7** có cấu trúc lập thể tương đồng với **CT1**. Cấu hình tuyệt đối tại vị trí C-7 và C-8 của hợp chất **CT7** được xác định dựa vào phương pháp tính toán lưỡng từ hóa học điện từ lưỡng sắc tròn (ECD - Electronic Circular Dichroism) dựa trên phần mềm Gaussian 09. Tính toán lý thuyết cho 2 đồng phân (*7S,8R*)-**CT7** và (*7R,8S*)-**CT7** cho phép xác định cấu hình *7S,8R* của hợp chất **CT7** phù hợp với mô hình tính toán (Phụ lục 1.13). Kết hợp các dữ liệu phổ HRESI-MS, 1D, 2D-NMR (Phụ lục 1.13) cho phép xác định cấu trúc hóa học của hợp chất **CT7**, đây là một chất mới và được đặt tên là **cleistonkinin E**.



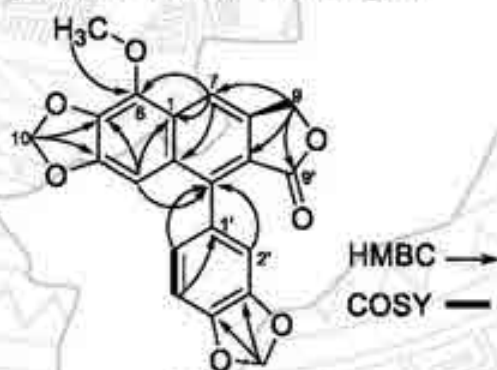
Hình 3.31. Một số tương tác chính trên phổ HMBC, COSY và NOESY của **CT7**

❖ Hợp chất CT8: cleistonkinin C



Hình 3.32. Cấu trúc hóa học của chất CT8 và chất tham khảo CT1 và taiwanin C

Hợp chất CT8 được phân lập dưới dạng bột kết tinh màu trắng ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{aceton}$), điểm nóng chảy $328\text{-}329^\circ\text{C}$. Phổ IR của CT8 có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm carbonyl ở $\nu_{\text{max}} 1759 \text{ cm}^{-1}$, nối đôi C=C vòng thơm ở $1616, 1489 \text{ cm}^{-1}$. Phổ khối phân giải cao HRESI-MS cho pic ion giả phân tử ở $m/z 401,0629 [M+\text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho CTPT $\text{C}_{21}\text{H}_{14}\text{NaO}_7$, 401,0632). Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất CT8 thấy xuất hiện tín hiệu singlet của hai proton thơm ở $\delta_{\text{H}} 6,86 (1\text{H}, \text{s})$ và $8,14 (1\text{H}, \text{s})$, ba proton vòng thơm hệ ABX tại $\delta_{\text{H}} 6,78 (1\text{H}, \text{br. s})$; $6,94 (1\text{H}, \text{d}, J = 8,0 \text{ Hz})$ và $6,76 (1\text{H}, \text{dd}, J = 1,5; 8,0 \text{ Hz})$, một nhóm methoxy tại $\delta_{\text{H}} 4,21 (3\text{H}, \text{s})$ và hai nhóm methylenedioxy ở $\delta_{\text{H}} 6,05 (2\text{H}, \text{s})$ và $6,07 (2\text{H}, \text{s})$, 1 nhóm oxymethylen ở $\delta_{\text{H}} 5,37 (2\text{H}, \text{s})$. Phân tích phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT, kết hợp với phổ HSQC cho thấy tín hiệu cộng hưởng của 21 nguyên tử carbon, trong đó có 1 nhóm methoxy ở $\delta_{\text{C}} 60,1$; 5 nhóm methine sp^2 ở $\delta_{\text{C}} 98,4$; $111,9$; $110,6$; $108,2$ và $123,5$; 3 nhóm methylene sp^3 ở $\delta_{\text{C}} 101,7$; $101,2$ và $68,3$; 1 nhóm carbonyl ở $\delta_{\text{C}} 169,9$; và 11 carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Phổ NMR của hợp chất CT8 gần giống với hợp chất CT1, chỉ khác là thấy xuất hiện thêm tín hiệu của 1 nhóm methine vòng thơm thay thế 1 nhóm oxymethine. Dữ liệu phổ của hợp chất CT8 cũng gần giống với hợp chất taiwanin C, chỉ khác là thấy xuất hiện thêm tín hiệu của 1 nhóm methoxy thay cho 1 nhóm methin sp^2 [88]. Hợp chất Các mảnh cấu trúc phân tử được thiết lập nhờ phân tích phổ COSY và HMBC. Phổ COSY cho phép xác định tương tác giữa H-5' và H-6' của vòng A.



Hình 3.33. Một số tương tác chính trên phổ HMBC và COSY của chất CT8

Trên phổ HMBC cho thấy tương tác giữa proton của nhóm methoxy ở δ_H 4,21 với C-6 (δ_C 135,7) cho phép gắn kết nhóm methoxy với C-6. Sự có mặt của vòng lacton được xác định nhờ tương tác HMBC của proton thuộc nhóm CH₂-9 (δ_H 5,37) với C-8' (δ_C 119,5)/ C-7 (δ_C 113,9)/C-9' (δ_C 169,9). Vị trí của 2 nhóm dioxymethylen cũng được xác định tại C-4/C-5 và C-3'/C-4' dựa vào tương tác HMBC giữa proton của CH₂-10 (δ_H 6,05) với C-4 (δ_C 149,6)/C-5 (δ_C 136,1) và CH₂-10' (δ_H 6,07) với C-3' (δ_C 147,6)/C-4' (δ_C 147,5). Từ các dữ liệu phổ IR, HR-MS, 1D, 2D- NMR (phụ lục 1.14) cho phép xác định hợp chất **CT8** là 6-methoxy-taiwanin C [88] và được đặt tên là **cleistonkinin C**.

TÓM LẠI

Từ 168 g cao cồn khô chiết xuất từ quả cây Chà chối đã phân lập, tinh chế được 4,0235 g cleistantoxin có độ tinh khiết sắc kí 99,9% và 3,6562 g cleisindoside D có độ tinh khiết sắc kí 97,6% để thiết lập chất chuẩn định lượng. Tuy nhiên, đây là 2 hoạt chất mới đang được nghiên cứu phát triển thành thuốc nên chưa có chất chuẩn đối chiếu. Vì vậy, cần thiết lập cleistantoxin và cleisindoside D thành chất chuẩn gốc.

Bên cạnh đó, đã phân lập được 0,5481 g cleisindoside A và 0,5615 g chất mới 7',8'-dehydrocleistantoxin (**CT1**) làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính và 8 chất mới **CT1-CT8**. Sơ đồ qui trình phân lập các chất từ quả Chà chối được trình bày ở phụ lục 1.2.

3.2. THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN GỐC

3.2.1. Thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D

3.2.1.1. Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D

❖ *Mô tả vật li*

➤ *Tính chất*

Bảng 3.5. Tính chất của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D

Chuẩn cleistantoxin	Chuẩn cleisindoside D
Bột kết tinh màu trắng	Bột kết tinh màu trắng
Dễ tan trong dicloromethan, ACN, aceton	Dễ tan trong dicloromethan, ACN, MeOH, aceton
Hơi tan trong ethylacetat	
Rất khó tan trong MeOH, ethanol 96° và nước	Rất khó tan trong ethanol 96° và nước

➤ *Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{20}$*

Tiến hành pha dung dịch 0,5% trong chloroform và đo góc quay cực.

Bảng 3.6. Góc quay cực riêng của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D

STT	Chuẩn cleistantoxin	Chuẩn cleisindoside D
1	135,1	226,38
2	133,4	226,57
3	134,8	225,25
Giới hạn cho phép	-130,0° đến -135,0°	-150,0° đến -157,0°

➤ **Nhiệt độ nóng chảy và độ tinh khiết DSC**

Nhiệt độ nóng chảy và độ tinh khiết DSC của nguyên liệu thiết lập chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D được xác định bằng kỹ thuật quét nhiệt vi sai (DSC)

Bảng 3.7. Chương trình gia nhiệt của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D

STT	Chuẩn cleistantoxin	Chuẩn cleisindoside D
Tốc độ gia nhiệt 10°C/ phút	25-180°C	25-220°C
Tốc độ gia nhiệt 2°C/ phút	180-220°C	220-230°C

Bảng 3.8. Kết quả xác định nhiệt độ nóng chảy và độ tinh khiết DSC

STT	Nhiệt độ nóng chảy (°C)		Độ tinh khiết DSC (%)	
	Cleistantoxin	Cleisindoside D	Cleistantoxin	Cleisindoside D
1.	199,45	226,38	99,29	97,36
2.	199,48	226,57	99,17	97,22
3.	199,43	225,25	99,04	97,32
Giới hạn cho phép	199 đến 202°C	225 đến 228°C	≥ 99,0%	≥ 95,0%



(a)

(b)

Hình 3.34. Độ tinh khiết DSC của chất chuẩn cleistantoxin (a) và cleisindoside D (b)

❖ **Bộ dữ liệu phổ nhận dạng chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D**

Bộ dữ liệu phổ nhận dạng NLTLC cleistantoxin và cleisindoside D được xây dựng dựa trên các dữ liệu phổ đã công bố của cleistantoxin [82] và cleisindoside D [83] và các kết quả thực nghiệm trên NLTLC (Phụ lục 1.3 và 1.4), kết quả phổ HRESI-MS, IR VÀ UV-VIS (Bảng 3.9) và phổ ¹H và ¹³C-NMR (Bảng 3.10)

➤ **Phổ HRESI-MS, IR và UV-VIS**

Bảng 3.9. Dữ liệu phổ IR, UV, HRESI-MS của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D

	Cleistantoxin [82]	Cleisindoside D [83]
Phổ IR ν_{max} (cm ⁻¹):	3565, 3466, 2931, 1773, 1617, 1483, 1297, 1230, 1142, 1047	3419, 2932, 1772, 1619, 1475, 1235, 1073, 1035
UV (ACN), λ_{max} nm	203 và 286 nm	203 và 286 nm
HRESI-MS (-):	m/z 421,0888 [M+Na] ⁺	m/z 583,1409 [M+Na] ⁺
Tính toán lý thuyết:	m/z 421,0899 [M+Na] ⁺	m/z 583,1428 [M+Na] ⁺
Công thức phân tử:	C ₂₁ H ₁₉ NaO ₈	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₃ Na

➤ Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$

Bảng 3.10. Dữ liệu phổ 1D-NMR của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D

Cleistantoxin [82]				Cleisindoside D [83]			
C	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$ (mult, J, Hz)	C	$\delta_{\text{C}}^{\text{b,c}}$	DEPT	$\delta_{\text{H}}^{\text{b,d}}$ (mult., J, Hz)
1	124,7	C	-	1	122,0	C	-
2	132,9	C	-	2	135,3	C	-
3	104,1	CH	6,22 s	3	104,8	CH	6,26 s
4	149,4	C	-	4	149,9	C	-
5	134,9	C	-	5	136,8	C	-
6	141,5	C	-	6	142,1	C	-
7	70,4	CH	4,99 d (9,0)	7	75,2	CH	5,28 d (8,5)
8	38,7	CH	2,84 dddd (9,0, 9,0, 10,5, 15,0)	8	38,4	CH	3,04 m
9	71,8	CH ₂	4,02 dd (9,0, 10,5) 4,59 dd (9,0, 9,0)	9	72,0	CH ₂	4,07 dd (8,2; 8,2); 4,64 dd (8,2; 8,2)
10	101,2	CH ₂	5,88 d (1,5) 5,91 d (1,5)	10	101,5	CH ₂	5,89 s; 5,93 s
1'	133,0	C	-	1'	132,8	C	-
2'	111,1	CH	6,72 d (1,5)	2'	107,6	CH	6,65 m
3'	147,2	C	-	3'	147,3	C	-
4'	146,5	C	-	4'	146,6	C	-
5'	107,6	CH	6,66 d (8,0)	5'	110,7	CH	6,69 m
6'	124,1	CH	6,64 dd (1,5, 8,0)	6'	123,8	CH	6,65 m
7'	43,9	CH	4,47 d (4,5)	7'	44,0	CH	4,45 d (4,0)
8'	44,6	CH	2,71 dd (4,5, 15,0)	8'	45,5	CH	2,70 dd (4,0, 15,0)
9'	174,2	C=O	-	9'	174,2	C=O	-
10'	100,9	CH ₂	5,86 br s 5,87 brs	10'	100,9	CH ₂	5,83 s; 5,84 s
OH-7	-	-	4,11 d (1,0)				
OMe-6	59,8	CH ₃	4,12 s	OMe-6	59,9	CH ₃	3,99 s
1''				1''	99,4	CH	4,34 d (7,5)
2''				2''	73,5	CH	3,28 dd (7,5; 8,5)
3''				3''	76,3	CH	3,39 dd (8,5; 8,5)
4''				4''	69,8	CH	3,41 dd (8,5; 8,5)
5''				5''	76,0	CH	3,18 m
6''				6''	61,5	CH ₂	3,67 m

^aCDCl₃, ^bCDCl₃+CD₃OD, ^c125MHz, ^d500 MHz

3.2.1.2. Xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết của chất chuẩn gốc cleistantoxin và cleisindoside D

❖ Xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn gốc cleistantoxin và cleisindoside D bằng HPLC/DAD

➤ Xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin và cleisindoside D bằng HPLC/DAD.

❖ Lựa chọn dung môi pha mẫu

Dựa trên khả năng hòa tan của cleistantoxin và cleisindoside D trong các dung môi hữu cơ (dễ tan trong ACN), nên dung môi pha mẫu cleistantoxin được lựa chọn là ACN và cleisindoside D được lựa chọn là ACN-H₂O (1-1).

❖ Lựa chọn pha tĩnh và pha động

Hoạt chất cleistantoxin và cleisindoside D là hai hoạt chất mới chưa có nghiên cứu nào xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí (TKSK) và hàm lượng các tạp chất liên quan (TCLQ) của cleistantoxin và cleisindoside D bằng HPLC/DAD.

Dựa trên tính chất hoá, lí của cleistantoxin và cleisindoside D cùng với ĐK của PTN, sắc kí phân bố pha đảo được lựa chọn để xác định độ tinh khiết sắc kí và TCLQ của hai chất này với điều kiện khảo sát như sau:

- Pha tĩnh
 - Cột: Inertsil® ODS-3 (250 x 4,6 mm; 5 µm) và
 - Cột Phenyl Phenomenex (250 x 4,6 mm; 5 µm).
- Pha động
 - Hệ pha động 1: ACN và đệm acetat pH 4,0.
 - Hệ pha động 2: Pha động A: Acid formic: triethylamin: ACN (1, 1, 998, v/v/v)
Pha động B: Acid formic: triethylamin: nước (1, 1, 998, v/v/v).
 - Hệ pha động 3: ACN: Acid acetic 0,1%
 - Hệ pha động 4: ACN: Nước
- Chương trình gradient 1

Bảng 3.11. Chương trình gradient 1

STT	Thời gian (phút)	A (%)	B (%)
1.	0	1	99
2.	60	99	1
3.	65	1	99
4.	Thời gian phân tích 70 phút		

- Tốc độ dòng: 1,0 mL/ phút
- Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng

Qua kết quả khảo sát khả năng tách cleistantoxin và cleisindoside D khỏi các TCLQ (Phụ lục 2.1) trên 2 cột SK với các hệ pha động trên, nhận thấy trên tất cả các SKD của dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml đều xuất hiện 5 TCLQ, độ tinh khiết SK của cleistantoxin khác nhau không đáng kể khoảng từ 99,92% đến 99,93%. SKD của dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml đều xuất hiện 3 TCLQ, độ tinh khiết SK của cleisindoside D khác nhau không đáng kể khoảng từ 97,62% đến 97,64%.

Khi khảo sát trên cột phenyl với hệ pha động ACN: dung dịch đệm acetat pH=4,0, trên SKD mẫu trắng xuất hiện nhiều pic dung môi, nền mẫu trắng nhiễu nên khó xác định và định lượng TCLQ. Bên cạnh đó, cột C18 là cột thông dụng hơn cột phenyl tại các PKN, nên cột C18 được khảo sát với các hệ pha động trên, trong đó hệ pha động ACN: nước được lựa chọn vì đơn giản, tiết kiệm nhất. Tuy nhiên, thời gian phân tích của cleistantoxin và cleisindoside D dài (36 phút), cần tối ưu hoá chương trình gradient như bảng 3.12.

Bảng 3.12. Chương trình sắc kí định lượng TCLQ

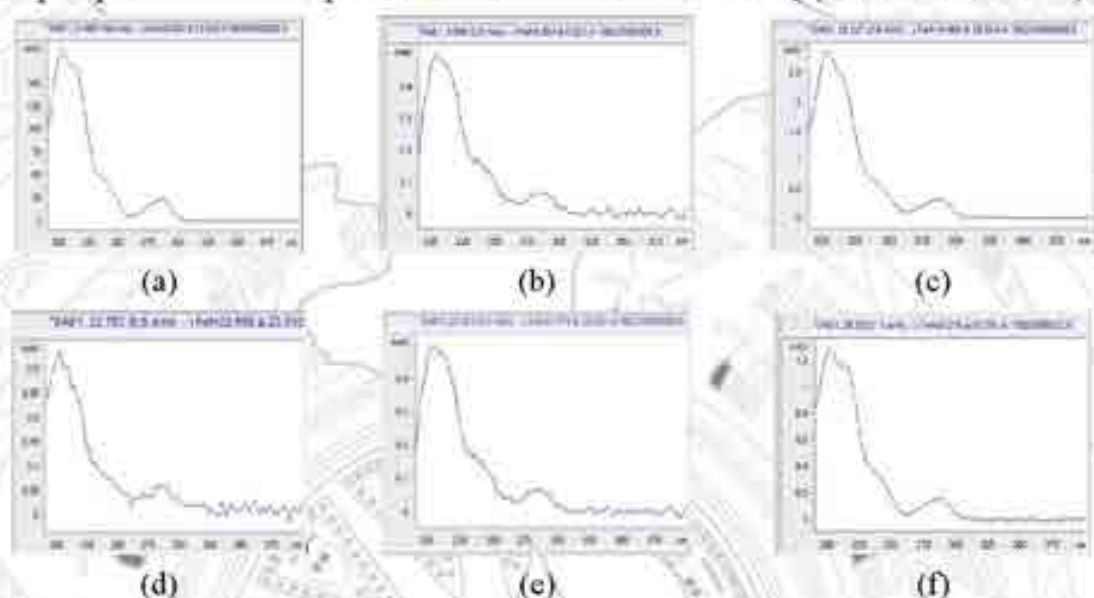
Chương trình gradient của cleistantoxin			Chương trình gradient của cleisindoside D		
Thời gian (phút)	% ACN	%H ₂ O	Thời gian (phút)	% ACN	%H ₂ O
0	30	70	0	27	73
20	50	50	40	50	50
50	70	30	45	73	27
55	30	70	50	27	73
Thời gian phân tích 60 phút			Thời gian phân tích 55 phút		
Tốc độ dòng 1,5 ml/phút			Tốc độ dòng 1,0 ml/phút		
Thể tích tiêm: 30 µL			Thể tích tiêm: 20 µL		
Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng			Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng		

Khi định lượng TCLQ của cleistantoxin và cleisindoside D theo chương trình gradient đã lựa chọn, trên SKD của dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml vẫn xuất hiện 5 pic TCLQ, độ TKSK của cleistantoxin là 99,92%, thời gian lưu của cleistantoxin đã rút ngắn lại là 21,213 phút (Hình 3.37 và Phụ lục 2.1).

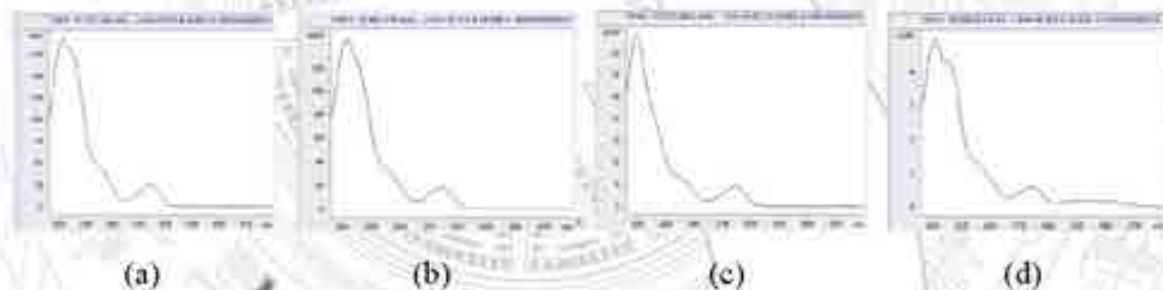
Trên SKD của dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml xuất hiện 3 pic TCLQ, độ TKSK của cleisindoside D là 97,64% và thời gian lưu của cleisindoside D là 17,049 phút (Phụ lục 2.2).

- Lựa chọn bước sóng phát hiện

Để lựa chọn bước sóng phát hiện cleistantoxin và cleisindoside D cùng với TCLQ, quét phổ các chất trên bằng detector DAD trong khoảng 200 - 400 nm, kết quả quét phổ UV với các pic SK của cleistantoxin và TCLQ (Hình 3.35 và 3.36)



Hình 3.35. Phổ UV cleistantoxin (a), Tạp 1 (b), Tạp 2 (c), Tạp 3 (d), Tạp 4 (e), Tạp 5 (f)

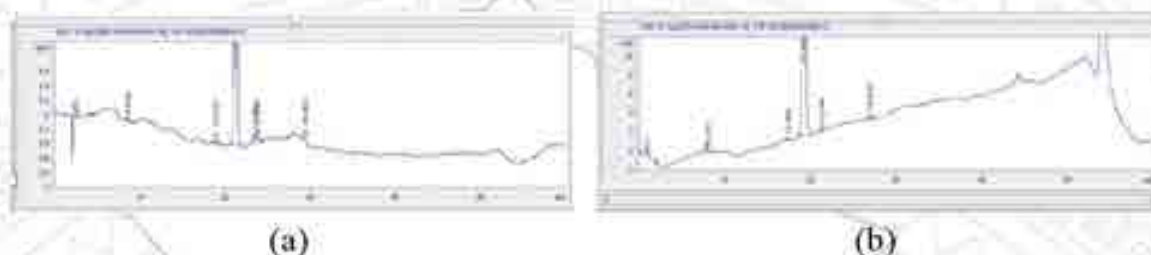


Hình 3.36. Phổ UV của cleisindoside D (a), Tạp 1 (b), Tạp 2 (c), Tạp 3 (d).

Nhận xét

Dựa vào phổ UV của cleistantoxin và các TCLQ và cleisindoside D và TCLQ, nhận thấy cleistantoxin và các TCLQ đều có cực đại hấp thụ tại các bước sóng 203 và 286 nm.

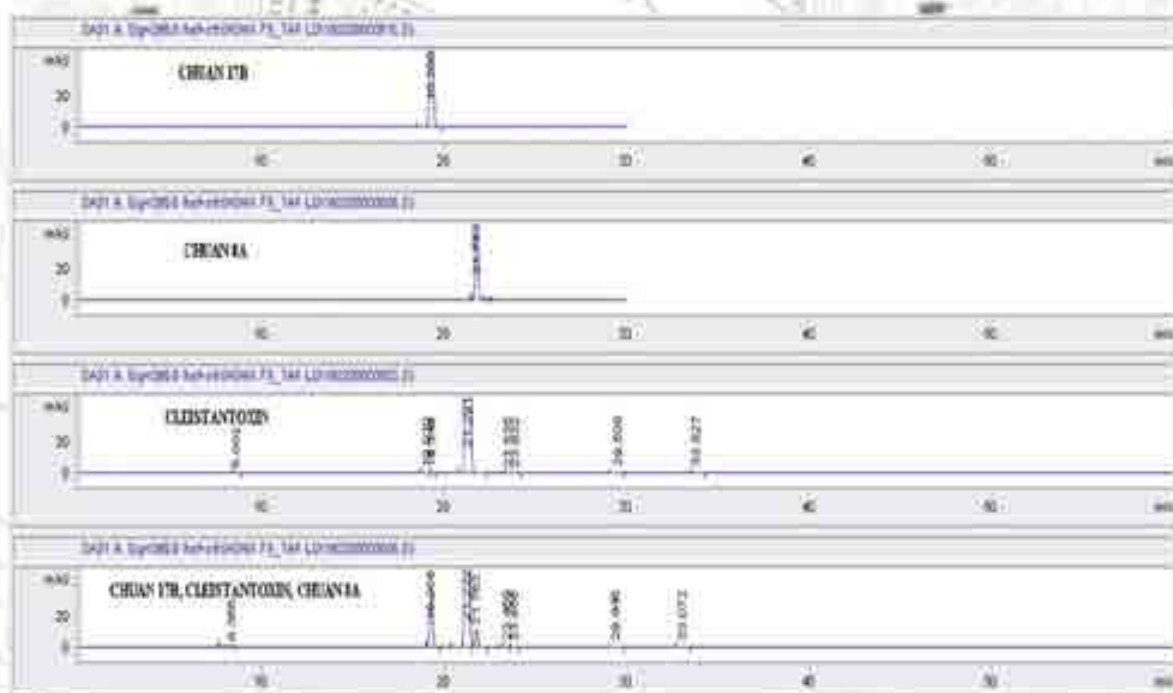
Tiến hành xác định độ TSKK của cleistantoxin tại hai bước sóng 203 và 286 nm lần lượt là 99,93 và 99,92% (hình 3.37 và phụ lục 2.1) và cleisindoside D là 97,66 và 97,64% (phụ lục 2.2) khác nhau không đáng kể. Tuy nhiên, khi xác định độ TSKK của cleistantoxin và cleisindoside D tại bước sóng 203 nm gần với bước sóng cut-off của dung môi pha động nên nền mẫu kém ổn định, rất khó để xác định và định lượng TCLQ, vì vậy bước sóng 286 nm được lựa chọn.



Hình 3.37. SKĐ dd cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ đo tại bước sóng 286 (a) và 203 nm (b)

◇ **Đánh giá khả năng tách của cleistantoxin và cleisindoside D khỏi các TCLQ**

Dung dịch chứa cleistantoxin, cleistonkinen (CT6) và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) được sử dụng để đánh giá khả năng tách của cleistantoxin khỏi các TCLQ với chương trình sắc kí đã lựa chọn. Vì trong quá trình phân lập cleistonkinen (CT6) và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) được rửa giải ngay trước và sau cleistantoxin. Trên SKĐ của dung dịch hỗn hợp 3 chất, pic cleistantoxin tách hoàn toàn khỏi các pic cleistonkinen (CT6) và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) với độ phân giải R_s lần lượt là 4,28 và 1,68 ($R_s \geq 1,5$), cho thấy ĐKSK đã lựa chọn đã tách được hoàn toàn cleistantoxin khỏi TCLQ (Hình 3.38 và phụ lục 2.1). Vì vậy, lựa chọn dung dịch phân giải cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) 50 $\mu\text{g/ml}$ để đánh giá khả năng tách của cleistantoxin khỏi TCLQ.



Hình 3.38. SKĐ xác định khả năng tách của cleistantoxin với chất CT6 và CT1

Tiến hành tương tự với cleisindoside D và lựa chọn dung dịch phân giải: cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$ và cleisindoside A 50 $\mu\text{g/ml}$ để đánh giá khả năng tách của cleisindoside D khỏi TCLQ.

➤ *Thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin và cleisindoside D bằng HPLC/DAD.*

❖ **Độ ổn định hệ thống sắc kí HPLC**

Kiểm tra độ ổn định hệ thống HPLC khi xác định độ TSKK và định lượng TCLQ của cleistantoxin

Tiến hành tiêm SK dung dịch phân giải: cleistantoxin 1000 µg/ml và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) 50 µg/ml, yêu cầu độ phân giải giữa pic cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) $R_s \geq 1,5$.

Chuẩn bị dung dịch cleistantoxin 5 µg/ml từ dung dịch cleistantoxin gốc 1000 µg/ml. Tiến hành SK dung dịch cleistantoxin 5 µg/ml lặp lại 6 lần. Xác định các thông số thời gian lưu (t_R), diện tích pic (S), số đĩa lý thuyết (N), hệ số đối xứng (T) của pic cleistantoxin, tính giá trị trung bình và RSD% của các thông số thời gian lưu và diện tích pic (Bảng 3.13). Chuẩn bị dung dịch cleistantoxin 5 µg/ml thứ 2 tiêm SK lặp lại 3 lần. Tính hệ số tương đồng (HSTD), yêu cầu $0,9 \leq HSTD \leq 1,1$

Kiểm tra độ ổn định hệ thống HPLC để định lượng TCLQ của cleisindoside D tiến hành chuẩn bị dung dịch phân giải: cleisindoside D 1000 µg/ml và cleisindoside A 50 µg/ml. Tiêm SK dung dịch phân giải, xác định độ phân giải giữa 2 pic $R_s \geq 3,0$. Chuẩn bị dung dịch cleisindoside D 50 µg/ml từ dung dịch cleisindoside D gốc 1000 µg/ml. Tiến hành tương tự cleistantoxin (Bảng 3.13).

Bảng 3.13. Kết quả thẩm định độ ổn định hệ thống

Lần tiêm	Dung dịch cleistantoxin 5 µg/ml				Dung dịch cleisindoside D 50 µg/ml			
	t_R (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Số đĩa LT (N)	HS. đối xứng T	t_R (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Số đĩa LT (N)	HS. đối xứng T
1	20,759	101,3	46472	0,94	16,985	635,2	36848	0,92
2	20,727	100,8	44560	0,92	16,887	631,7	37758	0,91
3	20,680	101,9	44578	0,92	16,938	623,1	37786	0,92
4	20,732	102,1	45258	0,91	16,932	631,9	38115	0,90
5	20,722	102,2	44689	0,92	16,888	622,3	37979	0,91
6	20,729	102,9	47268	0,91	16,914	624,4	39389	0,93
TB	20,725	101,9	45471		16,92	628,1		
RSD	0,112	0,658			0,22	0,87		
YC	$\leq 1,0\%$	$\leq 2,0\%$	≥ 5000	0,8-1,5	$\leq 1,0\%$	$\leq 2,0\%$	≥ 5000	0,8-1,5

Nhận xét:

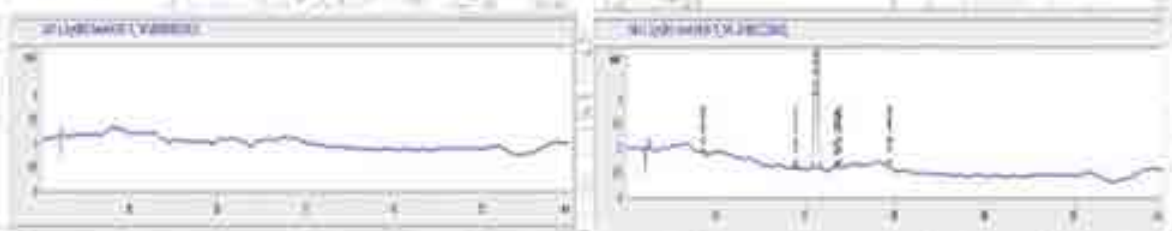
Trên SKĐ của dung dịch phân giải pic cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) độ phân giải giữa 2 chất R_s là 1,64 ($R_s \geq 1,5$), pic cleisindoside D và cleisindoside A là 4,74 ($R_s \geq 3,0$).

Dung dịch cleistantoxin 5 $\mu\text{g/ml}$ và cleisindoside D 50 $\mu\text{g/ml}$ đều có RSD(%) thời gian lưu $\leq 1,0\%$ và RSD(%) diện tích pic $\leq 2,0\%$, số đĩa lý thuyết của cả 2 chất $N \geq 5000$, hệ số đối xứng nằm trong khoảng (0,8 - 1,5).

Vì vậy, hệ thống sắc kí ổn định để xác định độ tinh khiết SK và định lượng TCLQ của cleistantoxin và cleisindoside D với DKSK đã chọn.

◇ **Độ đặc hiệu:**

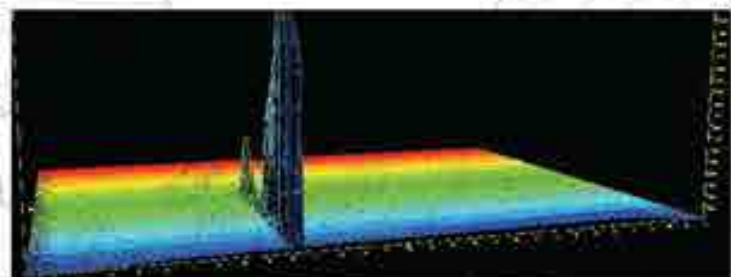
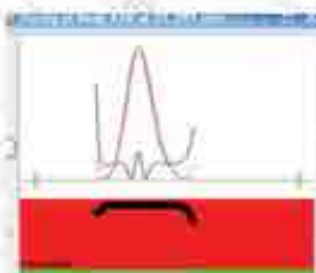
- *Độ đặc hiệu của cleistantoxin*
- Tiến hành chuẩn bị các dung dịch sau:
 - Mẫu trắng (dung môi pha mẫu ACN)
 - Dung dịch chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) 50 $\mu\text{g/ml}$.
 - Dung dịch cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$.
 - Dung dịch phân giải: cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) 50 $\mu\text{g/ml}$.
 - Dung dịch cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ soi UV 254 nm/24 giờ.
 - Dung dịch cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ cách thủy ở nhiệt độ 100°C/ 2 giờ
 - Dung dịch cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ phân hủy bằng H_2O_2 30%/4 giờ
 - Dung dịch cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ phân hủy bằng H_2SO_4 0,1N/15 phút
 - Dung dịch cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ phân hủy bằng NaOH 0,1N/15 phút
- Tiến hành chạy sắc kí dung dịch mẫu trắng ACN và dung dịch chuẩn cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ (Hình 3.39 và phụ lục 2.3).



Mẫu trắng

Dung dịch cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$

Hình 3.39. SKĐ dung dịch mẫu trắng và dung dịch cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$



Hình 3.40. Độ tinh khiết pic SK và phổ 3D của dung dịch cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$

Nhận xét:

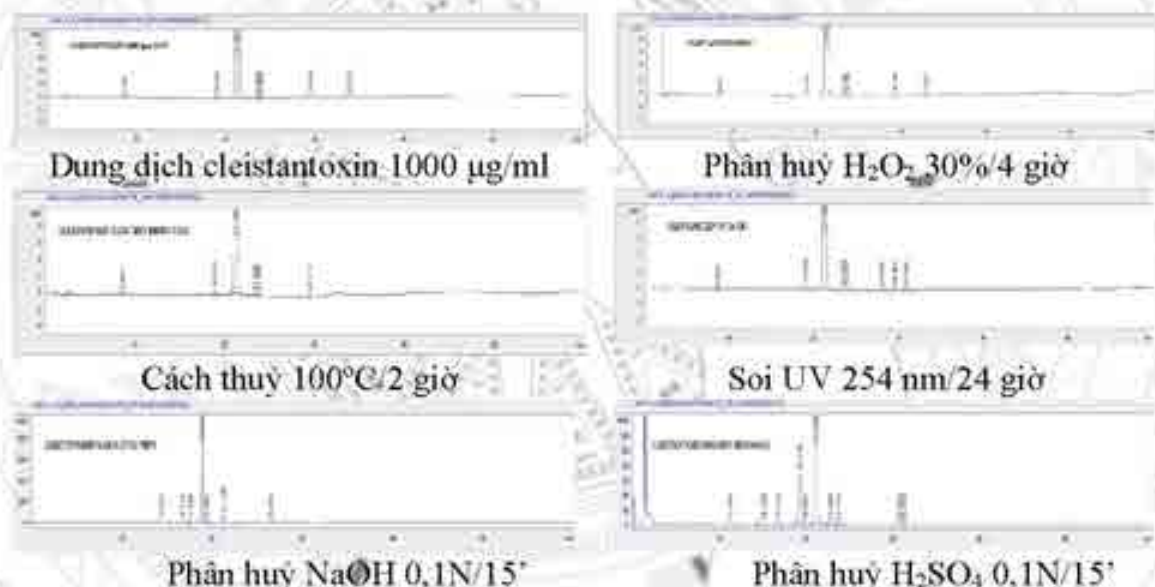
Trên SKĐ mẫu trắng (dung môi pha mẫu ACN) không xuất hiện pic tại thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của cleistantoxin và các TCLQ trên SKĐ dung dịch thử.

Trên SKĐ của dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml xuất hiện 5 pic TCLQ (trừ pic dung môi), các pic này tách hoàn toàn khỏi pic cleistantoxin (thời gian lưu 21,291') với R_s của 2 pic liền kề lần lượt là 7,41 và 6,58 ($R_s \geq 1,5$).

Pic của cleistantoxin 1000 µg/ml có độ tinh khiết 999,8. Phổ 3D của cleistantoxin 1000 µg/ml cho thấy pic cleistantoxin tinh khiết không lẫn TCLQ.

Từ các kết quả cho thấy dung dịch cleistantoxin pha ở nồng độ 1000 µg/ml đã tách được hoàn toàn TCLQ khỏi cleistantoxin để có thể phát hiện và để xác định được hàm lượng đầy đủ các TCLQ bằng ĐKSK đã chọn.

- Tiến hành sắc kí các dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml phân hủy ở ĐK khắc nghiệt: soi UV 254 nm/24 giờ, cách thủy ở nhiệt độ 100°C/2 giờ, phân hủy bằng H₂O₂ 30%/4 giờ, H₂SO₄ 0,1N/15 phút và NaOH 0,1N/15 phút (Hình 3.41).



Hình 3.41. SKĐ dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml và các dung dịch phân hủy

Nhận xét:

Trên SKĐ các dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml khi soi UV 254 nm/24 giờ, cách thủy 100°C/2 giờ, H₂O₂ 30%/4 giờ, cho thấy không xuất hiện thêm pic TCPH nào khác các TCLQ có trong dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml.

Trên SKĐ dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml khi phân hủy bằng H₂SO₄ 0,1N trong 15 phút và NaOH 0,1N trong 15 phút, thấy xuất hiện các tạp chất phân hủy (TCPH) có thời gian lưu 19,242', 19,900' và 22,805'. Các TCPH liền kề với cleistantoxin tách hoàn toàn khỏi cleistantoxin với $R_s=2,45$ và 3,61. Pic cleistantoxin còn lại có hệ số tinh khiết (purity factor) là 999,9. Vậy, cleistantoxin tách được hoàn toàn khỏi các tạp chất trong ĐKSK đã lựa chọn.

Từ các kết quả trên cho thấy, phương pháp xác định độ tinh khiết SK của cleisintoxin đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

- *Độ đặc hiệu của cleisindoside D*

- Tiến hành chuẩn bị các dung dịch sau:

- Mẫu trắng: dung môi pha mẫu ACN:H₂O (1:1)
- Dung dịch phân giải: cleisindoside D 1000 µg/ml và cleisindoside A 50 µg/ml.
- Dung dịch chuẩn cleisindoside D 1000 µg/ml trong ACN:H₂O (1:1).
- Dung dịch chuẩn cleisindoside D 1000 µg/ml soi UV 254 nm trong 24 giờ, cách thủy ở nhiệt độ 80°C trong 2 giờ, phân hủy bằng H₂O₂ 30%/4 giờ, H₂SO₄ 0,1N/ 15 phút, NaOH 0,1N/ 15 phút.

- Tiến hành chạy sắc kí dung dịch mẫu trắng ACN:H₂O (1:1) và dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml trong ACN:H₂O (1:1) (hình 3.42 và phụ lục 2.4)

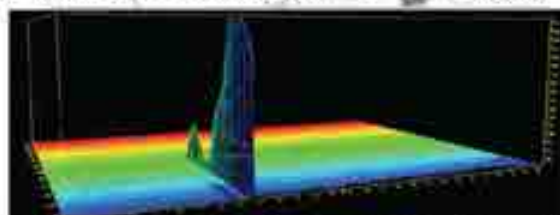
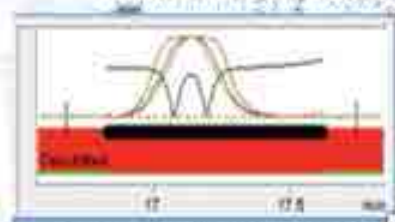


Mẫu trắng ACN-H₂O (1-1)



Dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml

Hình 3.42. SKĐ mẫu trắng và dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml



Hình 3.43. Độ tinh khiết pic của cleisindoside D và phổ 3D của dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml

Nhận xét:

Trên SKĐ mẫu trắng dung môi pha mẫu ACN-H₂O (1-1) không xuất hiện pic tại thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của cleisindoside D và các TCLQ trên SKĐ dung dịch thử.

Trên SKĐ của dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml xuất hiện 3 pic TCLQ có thời gian lưu tương đối của tap 1 so với cleisindoside D (t_R 17,291') là 0,890; tap 2 (1,05); tap 3 (1,11); các pic này tách hoàn toàn khỏi pic cleisindoside D với R_s của 2 pic tap 1 và tap 2 lần lượt là 4,84 và 1,97 ($R_s \geq 1,5$). Pic của cleisindoside D 1000 µg/ml có độ tinh khiết 992,66. Phổ 3D của cleisindoside D 1000 µg/ml cho thấy pic cleisindoside D tinh khiết không lẫn tạp chất.

Tiến hành tiêm sắc kí dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml phân hủy bởi H₂O₂ 30% trong 3 giờ. Trên SKĐ độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside D là 97,62% và không có thêm pic tạp chất khác ngoài 3 pic tạp chất có sẵn với hàm lượng của

từng tạp đơn và tổng tạp không thay đổi. Độ phân giải (R_s) của cleisindoside D so với tạp 1 và tạp 2 lần lượt là 5,73 và 2,20. Hệ số tinh khiết pic cleisindoside D là 996,83 cho thấy pic cleisindoside D và các tạp chất liền kề đã tách khỏi nhau.

Tiến hành tiêm sắc kí dung dịch cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$ cách thủy 80°C sau 2 giờ và NaOH 0,1 N sau 15 phút. Trên SKĐ không thấy xuất hiện thêm pic tạp chất khác ngoài 3 pic tạp chất có sẵn. Độ phân giải (R_s) của cleisindoside D so với tạp 1 và tạp 2 lần lượt là 5,62 và 2,20. Hệ số tinh khiết pic cleisindoside D còn lại sau khi bị phân hủy ở 2 điều kiện trên lần lượt là 992,77 và 999,79, cho thấy cleisindoside D đã tách hoàn toàn khỏi các tạp chất 1 và 2 (Phụ lục 2.4).

Tiến hành tiêm sắc kí dung dịch cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$ phân hủy bằng dung dịch acid sulfuric 0,1 N và tia UV 254 nm. SKĐ dung dịch cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$ khi chiếu tia UV trong 24 giờ xung quanh cleisindoside D có xuất hiện 3 tạp chất và các tạp chất 1 và 2, với hệ số phân giải 5,06; 1,92 với hệ số tinh khiết pic của cleisindoside D là 995,47, kết quả cho thấy pic của cleisindoside D là tinh khiết và tách hoàn toàn ra khỏi các tạp chất xung quanh (Phụ lục 2.4).

Trên SKĐ dung dịch cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$ bị phân hủy bởi H_2SO_4 0,1N trong 30 phút, xung quanh cleisindoside D vẫn chỉ xuất hiện 3 tạp chất và các tạp chất 1 và 2 đã tách hoàn toàn ra khỏi pic cleisindoside D với hệ số phân giải lần lượt là 5,71 và 2,10 và hệ số tinh khiết pic của cleisindoside D còn lại là 993,96 cho thấy pic cleisindoside D tinh khiết, tạp đã tách hoàn toàn (Phụ lục 2.4).

Từ các kết quả cho thấy chất chuẩn cleisindoside D khi pha ở nồng độ 1000 $\mu\text{g/ml}$ để xác định hàm lượng TCLQ bằng ĐKSK đã tách được hoàn toàn TCLQ khỏi cleisindoside D để có thể phát hiện và định lượng được đầy đủ các tạp chất.

◇ Giới hạn định lượng (LOQ)

Pha dãy dung dịch cleisindoside D với nồng độ giảm dần 1,0 $\mu\text{g/ml}$; 0,1 $\mu\text{g/ml}$; 0,05 $\mu\text{g/ml}$ xác định giá trị tín hiệu/nhiều (S/N) của từng chất. Từ SKĐ dung dịch cleisindoside D 0,05 $\mu\text{g/ml}$ và cleisindoside D 0,1 $\mu\text{g/ml}$ xác định được giá trị S/N lần lượt là 15,75 và 11 (Hình 3.44, phụ lục 2.3 và 2.4).



Hình 3.44. SKĐ dd cleisindoside D 0,05 $\mu\text{g/ml}$ (a) và cleisindoside D 0,1 $\mu\text{g/ml}$ (b)

Chuẩn bị 6 dung dịch cleistantoxin nồng độ 0,05 µg/ml và 6 dung dịch cleisindoside D 0,1 µg/ml. Tiêm SK 6 dung dịch này rồi tính RSD% của diện tích pic của 2 chất trên (Bảng 3.14)

Bảng 3.14. Độ lặp lại của dung dịch cleistantoxin và cleisindoside D ở nồng độ LOQ

STT	DD cleistantoxin 0,05 µg/ml		DD cleisindoside D 0,1 µg/ml	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAu.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAu.s)
1	20,96	2,0	17,41	2,4
2	21,01	2,2	17,49	2,4
3	21,02	2,6	17,40	1,9
4	21,93	3,0	17,39	2,5
5	20,98	1,8	17,29	1,9
6	20,98	2,5	17,30	1,9
TB	20,99	2,4	17,39	2,1
RSD (%)	0,11	18,60	0,44	13,60
Yêu cầu	≤ 1,0 %	≤ 20,0 %	≤ 1,0 %	≤ 20,0 %

Nhận xét:

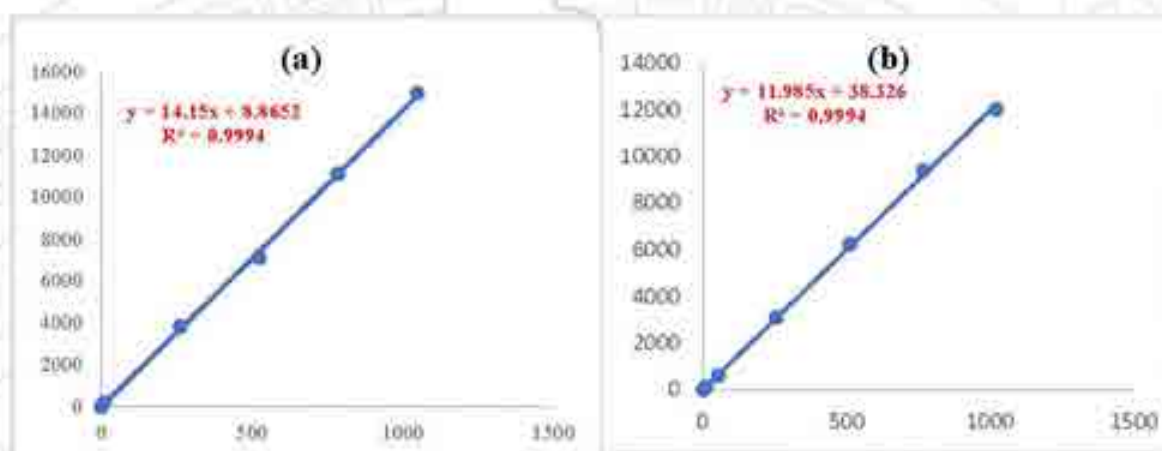
RSD% của diện tích pic 6 mẫu tiêm lặp lại của dung dịch cleistantoxin 0,05 µg/ml và cleisindoside D 0,1 µg/ml lần lượt là 18,6% và 13,6%. Vì vậy, giới hạn định lượng của cleistantoxin là 0,05 µg/ml và cleisindoside D là 0,1 µg/ml.

♦ Khoảng tuyến tính

Pha dung dịch chuẩn gốc cleistantoxin 1000 µg/ml và cleisindoside D 1000 µg/ml. Từ 2 dung dịch chuẩn gốc pha dãy dung dịch chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D có nồng độ từ nồng độ LOQ đến nồng độ dung dịch định lượng TCLQ của cleistantoxin và cleisindoside D (1000 µg/ml). Tiến hành sắc kí dãy dung dịch chuẩn (Bảng 3.15 và hình 3.45 và Phụ lục 2.3 và 2.4).

Bảng 3.15. Khoảng tuyến tính của cleistantoxin và cleisindoside D

STT	Khoảng tuyến tính của cleistantoxin		Khoảng tuyến tính của cleisindoside D	
	Nồng độ dung dịch (µg/ml)	Diện tích pic (mAu.s)	Nồng độ dung dịch (µg/ml)	Diện tích pic (mAu.s)
2	1,05	23,4	1,02	16,0
3	5,24	101,3	10,2	128,0
4	10,5	200,7	51,0	609,6
5	262	3848	255	3103,1
6	524	7110	510	6237,0
7	786	11117,7	765	9396,1
8	1048	14970,7	1020	12056,7
Phương trình hồi qui		14,15x + 8,8652	y = 11,974x + 38,326	
Hệ số tương quan		0,9997	0,9997	



Hình 3.45. Đường chuẩn của cleistantoxin (a) và cleisindoside D (b)

Nhận xét:

Trong khoảng nồng độ khảo sát có mối tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ của cleistantoxin và cleisindoside D với diện tích pic của 2 chất đó với hệ số tương quan $r=0.9997>0.998$.

Giá trị P intercept (b) của 2 đường chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D được tính toán bằng phần mềm Excel lần lượt là 0,922 và 0,622 >0.05 , cho thấy giá trị b của cả 2 đường chuẩn khác không không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (Phụ lục 2.3 và 2.4). Từ kết quả cho thấy cả 2 đường chuẩn không mắc sai số hệ thống.

♦ Độ chính xác của phương pháp (Precision)

- Độ lặp lại (Repeatability)

Tiến hành tiêm SK mẫu trắng (dung môi pha mẫu ACN) và 6 dung dịch cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ với mẫu trắng (dung môi pha mẫu ACN-H₂O) và 6 dung dịch cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$ để xác định độ lặp lại của phương pháp. Kết quả độ tinh khiết sắc kí và hàm lượng tạp chất liên quan của cleistantoxin và cleisindoside D được trình bày ở bảng 3.16, phụ lục 2.3 và phụ lục 2.4.

Bảng 3.16. Độ lặp lại của dung dịch cleistantoxin và cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$

STT	DD cleistantoxin		Dung dịch cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$				
	Độ TKSK (%)	Tổng TCLQ (%)	Độ TKSK (%)	HL tạp 1 (%)	HL tạp 2 (%)	HL tạp 3 (%)	HL tổng tạp (%)
1.	99,95	0,05	97,62	1,75	0,57	0,07	2,38
2.	99,94	0,06	97,61	1,74	0,59	0,06	2,39
3.	99,95	0,05	97,62	1,75	0,56	0,07	2,38
4.	99,93	0,07	97,60	1,76	0,58	0,06	2,40
5.	99,94	0,06	97,64	1,73	0,58	0,05	2,36
6.	99,94	0,06	97,58	1,75	0,60	0,07	2,42
TB	99,94	0,06	97,61	1,75	0,58	0,06	2,39
RSD%	0,01		0,02	0,62	2,84	9,03	0,9
Yêu cầu	$\leq 2,0\%$		$\leq 2,0\%$	$\leq 5,3\%$	$\leq 7,3\%$	$\leq 11\%$	$\leq 5,3\%$

Nhận xét:

Kết quả độ lặp lại của 6 dung dịch cleistantoxin và cleisindoside D 1000 µg/ml cho thấy RSD% của độ tinh khiết sắc kí cleistantoxin và cleisindoside D lần lượt là 0,01 và 0,02% < 2,0% đạt yêu cầu.

Kết quả độ lặp lại của 6 dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml cho thấy RSD% của hàm lượng tổng tạp là 0,9 % < 2,0 % và từng tạp đơn lần lượt là 0,62; 2,84; 9,03 % nhỏ hơn giới hạn cho phép ở mỗi mức hàm lượng TCLQ, cho thấy phương pháp có độ lặp lại cao.

- *Độ chính xác trung gian (Intermediate precision)*

Trong cùng phòng thí nghiệm, hai KNV tiến hành phân tích trên 2 cột khác nhau, mỗi KNV tiến hành trên 6 mẫu thử cleistantoxin và cleisindoside D ở nồng độ 1000 µg/ml để xác định độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin (cleisindoside D) và tổng tạp chất liên quan, kết quả được trình bày ở bảng 3.17.

Bảng 3.17. Kết quả đánh giá độ chính xác trung gian

STT	Chất chuẩn cleistantoxin				Chất chuẩn cleisindoside D			
	KNV 1		KNV 2		KNV 1		KNV 2	
	Độ TKSK (%)	Tổng TCLQ (%)	Độ TKSK (%)	Tổng TCLQ (%)	Độ TKSK (%)	Tổng TCLQ (%)	Độ TKSK (%)	Tổng TCLQ (%)
1.	99,95	0,05	99,95	0,05	97,62	2,38	97,66	2,35
2.	99,94	0,06	99,95	0,05	97,61	2,39	97,76	2,24
3.	99,95	0,05	99,94	0,06	97,62	2,38	97,72	2,28
4.	99,93	0,07	99,93	0,07	97,60	2,40	97,70	2,30
5.	99,94	0,06	99,94	0,06	97,64	2,36	97,75	2,25
6.	99,94	0,06	99,93	0,07	97,58	2,42	97,71	2,29
TB	99,94	0,06	99,94	0,06	97,61	2,39	97,72	2,28
RSD%	0,01%		0,01%		0,02%	0,85%	0,039	1,7
	TB (n=12) 99,94%				TB (n=12) 97,66%			
	RSD(%) (n=12) 0,01% < 3,0%				RSD(%) (n=12) 0,06% < 3,0%			
					TB (n=12) 2,34%			
					RSD(%) (n=12) 2,68% < 5,0%			

Nhận xét:

Kết quả độ chính xác trung gian giữa 2 KNV đạt yêu cầu, RSD (%) của độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D với mỗi KNV (n = 6) là 0,01 và 0,85% < 2,0% và RSD (%) độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D của cả hai KNV (n=12) là 0,01 và 0,06 % < 3,0%.

RSD (%) hàm lượng tổng TCLQ của cleisindoside D ứng với mỗi KNV (n = 6) là 0,85 và 1,7% < 3,0% và RSD (%) hàm lượng tổng TCLQ của cleisindoside D của cả hai PKN (n=12) là 2,68% < 5,0%.

❖ **Độ ổn định của dung dịch cleistantoxin và cleisindoside D 1000 µg/ml**

Chuẩn bị dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml và cleisindoside D 1000 µg/ml. bọc kín bằng parafilm và được bảo quản ở 2 điều kiện khác nhau như sau:

- Mẫu 1: bảo quản ở điều kiện phòng thí nghiệm (25°C)
- Mẫu 2: bảo quản trong tủ lạnh (2 - 8°C)

Sau các khoảng thời gian phù hợp, tiến hành SK các mẫu để xác định độ tinh khiết sắc kí (TKSK) (%) và hàm lượng tổng TCLQ (%) của dung dịch cleistantoxin và cleisindoside D 1000 µg/ml (Bảng 3.18).

Bảng 3.18. Độ ổn định của dung dịch cleistantoxin và cleisindoside D 1000 µg/ml

Thời gian	Dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml				Dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml			
	Bảo quản ở t° phòng		Bảo quản ở tủ lạnh		Bảo quản ở t° phòng		Bảo quản ở tủ lạnh	
	Độ TKSK	Tổng TCLQ	Độ TKSK	Tổng TCLQ	Độ TKSK	Tổng TCLQ	Độ TKSK	Tổng TCLQ
0	99,95	0,05	99,93	0,07	97,61	2,39	97,53	2,47
1 giờ	99,95	0,06	99,93	0,07	97,55	2,45		
3 giờ	99,94	0,06	99,93	0,07	97,60	2,40		
6 giờ	99,94	0,06	99,93	0,07	97,58	2,42	97,53	2,47
12 giờ	99,95	0,05	99,92	0,08	97,59	2,41		
24 giờ	99,90	0,10	99,93	0,07	97,33	2,67	97,52	2,48
48 giờ			99,93	0,07			97,55	2,45
1 tuần			99,93	0,07			97,54	2,46
2 tuần			99,93	0,07			97,52	2,48
3 tuần			99,93	0,07			97,47	2,53
4 tuần			99,92	0,08			96,72	3,28

Nhận xét:

Mẫu bảo quản ở nhiệt độ phòng (25°C): Độ TKSK của dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml ổn định trong vòng 24 giờ và dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml ổn định trong 8 giờ, sau 8 giờ tạp chất tăng về cả số lượng và hàm lượng.

Mẫu bảo quản trong tủ lạnh (2-8°C): Độ TKSK của dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml không thay đổi trong vòng 1 tháng và dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml không thay đổi trong 2 tuần.

Qua kết quả khảo sát trên, cho thấy dung dịch cleistantoxin 1000 µg/ml có thể sử dụng trong vòng 24 giờ ở điều kiện bảo quản nhiệt độ phòng (25°C) và trong vòng 1 tháng với điều kiện bảo quản tủ lạnh (2-8°C). Dung dịch cleisindoside D 1000 µg/ml có thể sử dụng trong vòng 8 giờ ở điều kiện bảo quản nhiệt độ phòng (25°C) và trong vòng 2 tuần với điều kiện bảo quản tủ lạnh (2-8°C).

❖ *Xác định hàm lượng tạp chất bay hơi bằng kỹ thuật phân tích nhiệt lượng TGA*

Tiến hành cân lượng chất chuẩn cleistantoxin (cleisindoside D) khoảng 10-20 mg cho vào cốc đo. Đặt chương trình nhiệt độ với tốc độ gia nhiệt 10°C/ phút đến

nhệt độ 105°C, duy trì nhiệt độ 105°C trong 4 giờ với lưu lượng dòng khí nitơ 50 mL/phút. Tính khối lượng chất giảm đi so với lượng chất chuẩn ban đầu, kết quả trình bày ở bảng 3.19 và từ đó đưa ra giới hạn cho phép của tạp chất bay hơi.

Bảng 3.19. Hàm lượng tạp chất bay hơi trong nguyên liệu thiết lập chất chuẩn

STT	NLTLCC cleistantoxin (%)	NLTLCC cleisindoside D (%)
1	0,535	3,73
2	0,603	3,81
3	0,720	3,55
Giới hạn cho phép	≤ 1,0%	≤ 5,0%

❖ *Xác định tạp chất vô cơ bằng phép thử tro sulfat*

Tiến hành cân 1 g chất chuẩn cleistantoxin (cleisindoside D) xác định tạp chất vô cơ bằng phép thử tro sulfat (DDVN V phụ lục 9.12, PP 2), kết quả được trình bày ở bảng 3.20 và từ đó đưa ra giới hạn cho phép của tạp chất vô cơ.

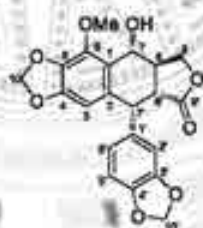
Bảng 3.20. Kết quả định lượng tạp vô cơ bằng kỹ thuật tro sulfat

STT	Hàm lượng tro sulfat trong chuẩn cleistantoxin (%)	Hàm lượng tro sulfat trong chuẩn cleisindoside D
1	0,063%	0,071%
2	0,074%	0,076
Giới hạn cho phép	≤ 0,1%	≤ 0,1%

3.2.1.3. Tiêu chuẩn chất lượng cho chất chuẩn gốc định lượng

❖ *Tiêu chuẩn chất lượng cho chất chuẩn gốc cleistantoxin*

➤ *Yêu cầu kỹ thuật*



Cấu trúc hoá học của cleistantoxin

- **Danh pháp IUPAC:** (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-7-hydroxy-6-methoxy-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7'-cyclo lignan-9',9-olide
- Công thức phân tử: C₂₁H₁₈O₈. Khối lượng phân tử: 398,0 Da.
- Cleistantoxin được phân lập từ cao cồn khô chiết xuất từ quả Chả chôi (*C. tonkinensis*, Jabl) phải chứa trên 98,0 đến 102,0% (C₂₁H₁₈O₈) tính trên chế phẩm khan.

Mục đích sử dụng

Chất chuẩn gốc cleistantoxin được dùng cho mục đích phân tích định tính và định lượng

Tính chất

Bột kết tinh màu trắng. Dễ tan trong dicloromethan, ACN và aceton. Hơi tan trong ethylacetat. Rất khó tan trong MeOH, ethanol 96° và nước.

Định tính

- *Phổ hồng ngoại-IR*: cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng là 3565, 3466, 2931, 1773, 1617, 1483, 1297, 1230, 1142, 1047 $\text{cm}^{-1} \pm 20 \text{cm}^{-1}$
- *Phổ UV-VIS*: Phổ hấp thụ tử ngoại của dung dịch thử 0,02 mg/ml ACN trong khoảng từ 200 nm đến 400 nm có hai cực đại hấp thụ ở bước sóng 203 và 286 nm; có hai cực tiểu ở bước sóng 260 và 309 $\text{nm} \pm 2 \text{nm}$.
- *Góc quay cực riêng*: $[\alpha]_D^{20} = -130,0$ đến $-135,0$
- *Nhiệt độ nóng chảy*: $t_{nc} = 199$ đến 202°C .
- *Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$*
 $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz), δ_{H} ppm: 6,72; 6,66; 6,64; 6,22; 5,91; 5,88; 5,87; 5,86; 4,99; 4,59; 4,47; 4,12; 4,02; 2,84; $2,71 \pm 0,5$ ppm
 $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz), δ_{C} ppm: 38,7; 43,9; 44,6; 59,8; 70,4; 71,8; 101,2; 100,9; 104,1; 107,6; 111,1; 124,1; 124,7; 132,9; 133,0; 134,9; 141,5; 146,5; 147,2; 149,4; $174,2 \pm 0,5$ ppm
- *Phổ khối HRESI-MS*: m/z 421,0888 $[\text{M}^+\text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$, 421,0899)

Tạp chất liên quan.

- Hàm lượng % của từng tạp đơn không được lớn hơn 0,1%
- Hàm lượng % của tổng tạp chất liên quan không được lớn hơn 0,5%

Độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin

Độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn cleistantoxin không được nhỏ hơn 99,5%

Mất khối lượng do làm khô hoặc TGA $\leq 1,0\%$

Tro sulfat $\leq 0,1\%$

Độ tinh khiết DSC của cleistantoxin

Độ tinh khiết DSC của cleistantoxin không được nhỏ hơn 99,0%

➤ Phương pháp thử

Tính chất

bằng cảm quan mẫu phải đạt yêu cầu đã nêu.

Định tính

- *Phổ hồng ngoại-IR* của chất chuẩn cleistantoxin (ĐDVN V-Phụ lục 4.2) phải có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của cleistantoxin $\pm 20 \text{cm}^{-1}$

- Phổ UV-VIS của chất chuẩn cleistantoxin pha trong dung môi ACN, quét phổ ở bước sóng 200-400 nm, có các bước sóng cực đại trùng dữ liệu phổ UV chuẩn của cleistantoxin ± 2 nm.
- Góc quay cực riêng: chất chuẩn cleistantoxin pha trong CHCl_3 được nồng độ 0,5%, tinh theo chế phẩm đã làm khô (ĐDVN V-Phụ lục 6.7)
- Nhiệt độ nóng chảy: Kỹ thuật đo mao quản (ĐDVN V-Phụ lục 6.4) hoặc kỹ thuật DSC với chương trình gia nhiệt từ 25-180°C: 10°C/phút, sau đó từ 180-220°C: 2°C/phút.
- Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của chất chuẩn cleistantoxin trùng dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ chuẩn của cleistantoxin $\pm 0,5$ ppm (đo trong dung môi CDCl_3).
- Phổ khối HRESI-MS của chất chuẩn cleistantoxin có m/z 421,0902 $[\text{M}^+\text{Na}]^+$

Tạp chất liên quan

Phương pháp HPLC (ĐDVN V, phụ lục 5.3), thực hiện theo phần độ tinh khiết sắc kí bằng HPLC sử dụng phương pháp chuẩn hoá diện tích.

- *Giới hạn tạp*

Xác định số lượng tạp chất và diện tích của mỗi pic tạp và tổng TCLQ trong từng mẫu thử. Qui trình chuẩn bị mẫu, điều kiện sắc kí và tiến hành sắc kí như phần độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin.

- Hàm lượng phần trăm tạp đơn bằng diện tích của từng pic phụ trên SKĐ dung dịch thử (trừ pic cleistantoxin và pic dung môi) trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKĐ (trừ pic dung môi) (% tạp đơn $\leq 0,1\%$).
- Hàm lượng phần trăm tổng TCLQ bằng tổng diện tích của tất cả các pic phụ trong SKĐ của dung dịch thử (trừ pic cleistantoxin và pic dung môi) trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKĐ (trừ pic dung môi) (% tổng tạp $\leq 0,5\%$).
- Ngoại trừ tất cả các pic có S/N < 2.

Độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin

Phương pháp HPLC (ĐDVN V-Phụ lục 5.3), sử dụng phương pháp chuẩn hoá diện tích.

- *Chuẩn bị mẫu:*

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 mg chất chuẩn cleistantoxin vào bình định mức 10 ml, thêm 5 mL ACN. Siêu âm 15 phút và định mức vừa đủ bằng ACN. Lọc qua màng lọc 0,45 μm . Chuẩn bị 6 dung dịch thử để tiến hành sắc kí.
- Dung dịch phân giải: cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ và 7',8'-dehydrocleistantoxin 50 $\mu\text{g/ml}$.
- *Điều kiện sắc kí:*
 - Pha động: Acetonitril: Nước
 - Mẫu trắng: Dung môi pha mẫu ACN.
 - Pha tĩnh: Cột C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μm)

- Chương trình gradient

STT	Thời gian	ACN (%)	H ₂ O (%)
1.	0 phút	30	70
2.	20 phút	50	50
3.	50 phút	70	30
3.	55 phút	30	70
4.	Thời gian phân tích 60 phút		

- Detector DAD: bước sóng 286 nm
- Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút
- Thể tích tiêm mẫu: 30 μ L.
- *Cách tiến hành:*
 - Kiểm tra độ ổn định của hệ thống sắc kí: Tiến hành sắc kí dung dịch phân giải: cleistantoxin 1000 μ g/ml và 7',8'-dehydrocleistantoxin 50 μ g/ml, độ phân giải giữa pic cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin ($R_s \geq 1,5$).
 - Tiến hành sắc kí dung dịch chuẩn cleistantoxin 5 μ g/ml lặp lại 6 lần, xác định các thông số thời gian lưu, diện tích pic, số đĩa lý thuyết, hệ số đối xứng của pic chính, tính giá trị trung bình và RSD% của các thông số thời gian lưu và diện tích pic phải không qua 2%. T phải nằm trong khoảng 0,8 đến 1,5.
 - Tiến hành sắc kí 6 dung dịch thử cleistantoxin 1000 μ g/ml, ghi SKĐ.
 - Độ tinh khiết SK của cleistantoxin bằng diện tích pic của cleistantoxin trong SKĐ của dung dịch thử trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKĐ (trừ pic dung môi và tất cả các pic có $S/N < 2$).

Hàm lượng tạp chất bay hơi bằng phân tích nhiệt lượng-TGA

- Hàm lượng tạp chất bay hơi được xác định bằng phân tích nhiệt lượng-TGA (10 mg, 105°C, 4 giờ)
- Hàm lượng tạp chất bay hơi được xác định trên thiết bị TGA được cài đặt nhiệt độ theo chương trình: từ 25-105°C: tốc độ gia nhiệt 2°C/phút, duy trì ở 105°C trong vòng 4 giờ, hạ nhiệt độ từ 105-25°C: tốc độ gia nhiệt 10°C/phút.

Tro sulfat

Tạp chất vô cơ được xác định bằng tro sulfat (ĐBVN V phụ lục 9.12, PP 2). Dùng 1 g chế phẩm

Độ tinh khiết DSC của cleistantoxin

Độ tinh khiết DSC của chất chuẩn cleistantoxin được xác định bằng quét nhiệt vi sai DSC với chương trình gia nhiệt từ 25-180°C: 10°C/ phút, sau đó từ 180-220°C: 2°C/ phút.

➤ **Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng chất chuẩn gốc cleistantoxin**

Bảng 3.21. Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin

Chỉ tiêu và tiêu chuẩn áp dụng		Yêu cầu	Phương pháp thử
1.	Tính chất	Bột kết tinh màu trắng, dễ tan trong dicloromethan, ACN và aceton, rất khó tan trong MeOH, ethanol 96° và nước	Phương pháp thử độ tan
2.	Nhiệt độ nóng chảy	199°C đến 202°C	Mao quản hoặc quét nhiệt vi sai
3.	Góc quay cực riêng	$[\alpha]_D^{20} = -130,0^\circ$ đến $-135,0^\circ$ (dung dịch 0,5% trong chloroform)	Xác định góc quay cực riêng
4. Định tính	Phổ UV-VIS	Phổ hấp thụ tử ngoại của dung dịch thử 0,02 mg/ml ACN có hai cực đại hấp thụ ở bước sóng 203 và 286 ± 2 nm	Quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến
	Phổ hồng ngoại (IR)	Phổ IR trong khoảng số sóng từ 4000 đến 400 cm^{-1} có các đỉnh đặc trưng trong khoảng: là 3565, 3466, 2931, 1773, 1617, 1483, 1297, 1230, 1142, $1047 \pm 20\text{ cm}^{-1}$	Phương pháp quang phổ hồng ngoại
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ có các độ chuyển dịch hoá học đặc trưng: 6,72; 6,66; 6,64; 6,22; 5,91; 5,88; 5,87; 5,86; 4,99; 4,59; 4,47; 4,12; 4,02; 2,84; $2,71 \pm 0,5$ ppm	Phương pháp phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz)
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^{13}\text{C-NMR}$	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^{13}\text{C-NMR}$ có các độ chuyển dịch đặc trưng: 38,7; 43,9; 44,6; 59,8; 70,4; 71,8; 101,2; 100,9; 104,1; 107,6; 111,1; 124,1; 124,7; 132,9; 133,0; 134,9; 141,5; 146,5; 147,2; 149,4; $174,2 \pm 0,5$ ppm	Phương pháp phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz)
	Phổ HRESI-MS	m/z 421,0888 $[\text{M}^+\text{Na}]^+$ (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{Na}$, 421,0899)	Phổ HRESI-MS
4.	Tạp chất bay hơi	Không lớn hơn 1,0%	Phương pháp TGA
5.	Tro sulfat	Không lớn hơn 0,1%	Phương pháp tro sulfat
6.	Tạp chất liên quan	Từng tạp đơn: Không lớn hơn 0,1% Tổng tạp: Không lớn hơn 0,5%	Phương pháp HPLC (Tinh bằng chuẩn hoá diên tích)
7.	Độ tinh khiết sắc ký	Độ tinh khiết sắc ký của chất chuẩn không được nhỏ hơn 99,5%	
8.	Độ tinh khiết theo DSC	Độ tinh khiết DSC của nguyên liệu thiết lập chuẩn không được nhỏ hơn 99,0%	Phương pháp quét nhiệt vi sai

➤ **Đánh giá chất lượng chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin**

Đánh giá chất lượng nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleistantoxin

Nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleistantoxin được đánh giá theo các chỉ tiêu:

- Tinh chất
- Định tính
- Độ tinh khiết sắc kí và tạp chất liên quan
- Tạp chất bay hơi bằng TGA
- Tạp chất vô cơ bằng tro sulfat
- Độ tinh khiết DSC

Tiêu chuẩn cơ sở được gửi sang Viện KNT TU đánh giá chất lượng của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleistantoxin là Cleistantoxin-01. Phiếu kiểm nghiệm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn cleistantoxin được trình bày ở phụ lục 2.5.

Xác định giá trị ấn định trên COA của ống chất chuẩn gốc cleistantoxin

Giá trị ấn định trên COA của chất chuẩn gốc cleistantoxin được đánh giá các chỉ tiêu:

- Độ tinh khiết sắc kí và tạp chất liên quan
- Tạp chất bay hơi bằng TGA

Tiêu chuẩn cơ sở được gửi sang 3 PKN thuộc Viện KNT TU và Viện KNT TPHCM đánh giá độ đồng nhất, độ tinh khiết sắc kí, tạp chất liên quan và tạp chất bay hơi bằng TGA của ống chuẩn chất chuẩn gốc cleistantoxin là Cleistantoxin-01. Phiếu kiểm nghiệm ống chuẩn gốc cleistantoxin được trình bày ở phụ lục 2.7.

Nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn gốc cleistantoxin

Nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn gốc cleistantoxin định kì kiểm tra mỗi 3 tháng theo các chỉ tiêu:

- Độ tinh khiết sắc kí và tạp chất liên quan
- Tạp chất bay hơi bằng TGA

➤ **Bảo quản**

Chất chuẩn gốc cleistantoxin được đóng ống thủy tinh trung tính, màu nâu 2 mL.

Tránh ánh sáng. Bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C

❖ **Tiêu chuẩn chất lượng cho chất chuẩn gốc định lượng cleisindoside D**

Tiêu chuẩn chất lượng của chất chuẩn gốc cleisindoside D (Phụ lục 2.9) và tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng được trình bày trong bảng 3.22 gồm yêu cầu kĩ thuật và phương pháp thử được xây dựng dựa trên bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn (mục 3.2.1.1) và các phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn gốc cleisindoside D, hàm lượng tạp chất bay hơi và tạp chất vô cơ (mục 3.2.1.2).

Bảng 3.22. Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của chất chuẩn gốc định lượng cleisindoside D

Chỉ tiêu và tiêu chuẩn áp dụng		Yêu cầu	Phương pháp thử
1.	Tinh chất	Bột kết tinh màu trắng, dễ tan trong dicloromethan, ACN và aceton, MeOH.	Phương pháp thử độ tan
2.	Nhiệt độ nóng chảy	225°C đến 228°C	Quét nhiệt vi sai
3.	Góc quay cực riêng	$[\alpha]_D^{20} = -150,0$ đến $-157,0^\circ$ (dung dịch 0,5% trong methanol)	Xác định góc quay cực riêng
4. Định tinh	Phổ UV-VIS	Phổ hấp thụ tử ngoại của dung dịch thử 0,02 mg/ml trong ACN-H ₂ O (1-1) từ 200 nm đến 400 nm có hai cực đại hấp thụ ở bước sóng 203 và 286 nm \pm 2 nm.	Quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến.
	Phổ hồng ngoại IR (KBr)	Phổ IR trong khoảng số sóng từ 4000 cm ⁻¹ đến 400 cm ⁻¹ có các đỉnh đặc trưng trong khoảng: 1035; 1073; 1235; 1475; 1619; 1772; 2932; 3419 cm ⁻¹ \pm 20 cm ⁻¹	Phương pháp quang phổ hồng ngoại
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹ H-NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹ H-NMR có các độ chuyển dịch đặc trưng: 2,70; 3,04; 3,18; 3,28; 3,39; 3,41; 3,67; 3,99; 4,07; 4,34; 4,45; 4,64; 5,28; 5,83; 5,84; 5,89; 5,93; 6,26; 6,65; 6,69 \pm 0,5 ppm	Phương pháp phổ ¹ H-NMR
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹³ C-NMR	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹³ C-NMR có các độ chuyển dịch đặc trưng: 38,4; 44,0; 45,5; 59,9; 61,5; 69,8; 72; 73,5; 75,2; 76,0; 76,3; 99,4; 100,9; 101,5; 104,8; 107,6; 110,7; 122; 123,8; 132,8; 135,3; 136,8; 142,1; 146,6; 147,3; 149,9; 174,2 ppm \pm 0,5 ppm	Phương pháp phổ ¹³ C-NMR
	Phổ HRESI-MS	Mảnh đặc trưng $m/z = 583, 1409 (M+Na)^+$	Phổ HRESI-MS
5.	Tạp chất bay hơi	Không lớn hơn 5,0%	Phương pháp TGA
6.	Tro sulfat	Không lớn hơn 0,1%	Phương pháp tro sulfat
7.	Tạp chất liên quan	Từng tạp đơn: Không lớn hơn 3,0% Tổng tạp: Không lớn hơn 5,0%	Phương pháp HPLC (Tinh bằng chuẩn hoá diện tích)
8.	Độ tinh khiết sắc kí	Độ tinh khiết sắc ký của chất chuẩn phải không được nhỏ hơn 95,0%	
9.	Độ tinh khiết theo DSC	Độ tinh khiết DSC của nguyên liệu thiết lập chuẩn không được nhỏ hơn 95,0%	Phương pháp quét nhiệt vi sai

➤ **Đánh giá chất lượng chất chuẩn gốc cleisindoside D**

Đánh giá chất lượng nguyên liệu thiết lập chất chuẩn

Nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindoside D được đánh giá theo các chỉ tiêu:

- Tinh chất và định tinh
- Độ tinh khiết sắc kí và tạp chất liên quan

- Tạp chất bay hơi bằng TGA
- Tạp chất vô cơ bằng tro sulfat
- Độ tinh khiết DSC

Tiêu chuẩn cơ sở được gửi sang Viện KNT TƯ đánh giá chất lượng của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindoside D là Cleisindoside D-01. Phiếu kiểm nghiệm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindoside D được trình bày ở phụ lục 2.10.

Xác định giá trị ấn định trên COA của ống chất chuẩn

Giá trị ấn định trên COA của chất chuẩn gốc cleisindoside D được đánh giá các chỉ tiêu:

- Độ tinh khiết sắc kí và tạp chất liên quan
- Tạp chất bay hơi bằng TGA

Tiêu chuẩn cơ sở được gửi sang 3 PKN thuộc Viện KNT TƯ và Viện KNT TPHCM đánh giá độ đồng nhất, độ tinh khiết sắc kí, tạp chất liên quan và tạp chất bay hơi bằng TGA của ống chuẩn chất chuẩn gốc cleisindoside D là Cleisindoside D-01. Phiếu kiểm nghiệm ống chuẩn gốc cleisindoside D được trình bày ở phụ lục 2.11.

Nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn

Nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn gốc cleisindoside D định kì kiểm tra mỗi 3 tháng theo các chỉ tiêu:

- Độ tinh khiết sắc kí và tạp chất liên quan
- Tạp chất bay hơi bằng TGA

3.2.1.4. Thiết lập chất chuẩn gốc định lượng

❖ Đóng ống chất chuẩn

Nguyên liệu thiết lập chất chuẩn được tiến hành đóng ống chuẩn trong buồng chuyên dụng Glove-box Labconco có kiểm soát nhiệt độ, độ ẩm và nạp khí nitơ vào buồng đóng.

- Đóng lọ thủy tinh màu nâu 2 mL
- Khối lượng chất chuẩn/lọ: 10 mg
- Điều kiện đóng ống:
 - Nhiệt độ 25°C
 - Độ ẩm tương đối trong buồng đóng khoảng 40%
 - Nạp khí nitơ 99,99% vào buồng đóng.
- Thời gian sản xuất: 01 ngày
- Số lượng ống chuẩn cleistantoxin là 96 lọ.
- Số lượng ống chuẩn cleisindoside D là 76 lọ.
- Các lọ chất chuẩn được dán nhãn tạm theo qui định và bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C, tránh ánh sáng.

❖ *Đánh giá độ đồng nhất của các ống trong quá trình đóng ống.*

Quá trình đóng ống chuẩn gốc cleistantoxin và cleisindoside D và đánh giá độ đồng nhất quá trình đóng ống được thực hiện tại Khoa thiết lập chất chuẩn - chất đối chiếu - Viện KNT TỰ, kết quả trình bày ở bảng 3.23.

Bảng 3.23. Đánh giá độ đồng nhất lô của quá trình đóng ống chất chuẩn gốc cleistantoxin và cleisindoside D

Hàm lượng cleistantoxin trong ống chuẩn (%)				Hàm lượng cleisindoside D trong ống chuẩn (%)			
Lô số	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Lô số	Lần 1	Lần 2	Lần 3
8	100,20	100,16	100,29	5	100,00	100,00	100,00
18	100,11	100,21	100,13	11	100,32	100,29	100,16
28	100,00	100,15	100,08	19	100,14	100,05	100,02
38	99,96	99,97	100,24	25	99,69	99,64	99,74
48	100,11	100,13	100,12	33	99,70	99,68	99,64
58	100,39	100,20	100,20	40	99,56	99,52	99,47
68	100,33	100,13	100,29	48	99,81	99,78	99,75
78	100,22	100,06	100,21	54	99,60	99,61	99,81
88	100,03	100,12	100,33	61	100,07	99,91	100,01
98	100,14	100,19	100,35	70	99,88	100,42	100,43

Nhận xét:

Độ đồng nhất quá trình đóng ống chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D được đánh giá bằng test kiểm định ANOVA 1 yếu tố trong phần mềm Excel. Kết quả lần lượt là $F_{tn}=1,424 < F_{bảng} = 2,393$ và $F_{tn}=0,022018 < F_{bảng} = 3,354$ (Phụ lục 2.6), cho thấy hàm lượng cleistantoxin và cleisindoside D giữa 10 ống chuẩn khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P=0,05$).

Vì vậy, theo qui định ISO GUIDE 35 giữa các ống chất chuẩn trong cùng một lô chất chuẩn Cleistantoxin-01 và Cleisindoside D-01 có hàm lượng đồng nhất, cho thấy điều kiện đóng ống chất chuẩn ổn định và phù hợp.

❖ *Xác định giá trị ấn định trên COA*

Ống chất chuẩn gốc cleistantoxin và cleisindoside D được gửi tới 3 PKN đạt GLP hoặc ISO-IEC 17025 thuộc Viện KNT TỰ và Viện KNT TP HCM, mỗi PKN gửi 6 ống chất chuẩn kèm tiêu chuẩn cơ sở (Mục 3.2.1.3 và phụ lục 2.9).

➤ *Xác định độ tinh khiết sắc kí bằng HPLC/DAD*

18 ống chất chuẩn được gửi tới 3 PKN là: Khoa KN nguyên liệu (PKN 1), Khoa Chất chuẩn – chất đối chiếu (PKN 2) của Viện KNT TỰ, Khoa Chất chuẩn –

chất đối chiếu của Viện KNT TP HCM (PKN 3) để xác định độ tinh khiết sắc kí bằng HPLC/DAD. Kết quả được trình bày ở bảng 3.24 và phiếu kiểm nghiệm ống chuẩn cleistantoxin (Phụ lục 2.7), ống chuẩn cleisindoside D (Phụ lục 2.11).

Bảng 3.24. Độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D

STT	Độ tinh khiết SK cleistantoxin (%)			Độ tinh khiết SK cleisindoside D (%)		
	PKN 1	PKN2	PKN 3	PKN 1	PKN2	PKN 3
1.	99,94	99,95	99,92	97,66	97,68	97,60
2.	99,94	99,92	99,95	97,66	97,66	97,62
3.	99,95	99,94	99,94	97,64	97,64	97,56
4.	99,94	99,93	99,91	97,64	97,63	97,61
5.	99,94	99,94	99,92	97,58	97,62	97,57
6.	99,94	99,93	99,90	97,56	97,64	97,65
TB	99,94	99,94	99,92	97,62	97,65	97,60
SD	0,004	0,01	0,02	0,043	0,022	0,033
Us	± 0,004	± 0,01	± 0,02	± 0,045	± 0,023	± 0,035
TB	TB của 3 PKN=99,93%			TB của 3 PKN=97,62%		
U _{C(HPLC)}	U _{C(HPLC)} =± 0,02			U _{C(HPLC)} =± 0,06		

Nhận xét:

Kết quả xác định độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin và cleisindoside D tại 3 PKN được đánh giá bằng test kiểm định ANOVA một yếu tố, cho giá trị P lần lượt là 0,116 và 0,066 > 0,05, khẳng định kết quả trung bình của 3 PKN khác nhau không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95,0%. (Phụ lục 2.8 và 2.12).

Vi vậy, giá trị của độ tinh khiết sắc kí của lô chất chuẩn Cleistantoxin-01 và Cleisindoside D-01 được lấy giá trị trung bình của 3 PKN là 99,93 và 97,62% với độ không đảm đo kết hợp (Uc) của 3 PKN tương ứng là 0,02 và 0,06%.

➤ **Xác định tạp chất bay hơi bằng TGA**

18 ống chất chuẩn được gửi tới 3 PKN là: Khoa Chất chuẩn – chất đối chiếu (PKN 1) của Viện KNT TỰ, Khoa Chất chuẩn – chất đối chiếu của Viện KNT TP HCM (PKN 2) và BM Hoá Phân tích- Độc chất (PKN 3) để xác định hàm lượng tạp chất bay hơi bằng TGA, kết quả trình bày ở bảng 3.25 và phụ lục 2.7 và 2.11.

Bảng 3.25. Hàm lượng tạp chất bay hơi của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D

STT	Hàm lượng tạp chất bay hơi trong ống chuẩn cleistantoxin (%)			Hàm lượng tạp chất bay hơi trong ống chuẩn cleisindoside D (%)		
	PKN 1	PKN2	PKN 3	PKN 1	PKN2	PKN 3
1.	0,535	0,603	0,594	3,54	3,44	3,55
2.	0,463	0,568	0,552	3,48	3,32	3,65
3.	0,572	0,596	0,459	3,12	3,55	3,48
4.	0,534	0,464	0,588	3,00	3,63	3,68
5.	0,415	0,629	0,631	3,08	3,72	3,81
6.	0,591	0,561	0,642	3,56	3,27	3,14
TB	0,518	0,570	0,578	3,30	3,49	3,55
SD	0,067	0,058	0,066	0,256	0,177	0,231
Us	± 0,07	± 0,06	± 0,07	± 0,27	± 0,19	± 0,24
TB	TB của 3 PKN=0,56%			TB của 3 PKN=3,45%		
Uc(TGA)	Uc(TGA)= ± 0,12			Uc(HPLC)= ± 0,41		

Nhận xét:

Kết quả xác định hàm lượng tạp chất bay hơi trong ống chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D bằng TGA tại 3 PKN được đánh giá bằng test kiểm định ANOVA một yếu tố, cho giá trị P lần lượt là 0,156 và 0,247 > 0,05, khẳng định kết quả trung bình của 3 PKN khác nhau không có ý nghĩa thống kê với độ tin cậy 95,0% (Phụ lục 2.8 và 2.12).

Vi vậy, giá trị ấn định của hàm lượng tạp chất bay hơi của lô chất chuẩn Cleistantoxin-01 và Cleisindoside D-01 được lấy giá trị trung bình của 3 PKN là 0,56 và 3,45% với độ không đảm bảo kết hợp (Uc) của 3 PKN tương ứng là 0,12 và 0,41%.

➤ **Xác định tạp chất vô cơ bằng phép thử tro sulfat**

Mẫu nguyên liệu thiết lập chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D được xác định hàm lượng tạp vô cơ theo phương pháp tro sulfat (ĐDVN V phụ lục 9.12- phương pháp 2), hàm lượng tro sulfat được tính bằng lượng cân còn lại sau khi nung/lượng chế phẩm x 100%, kết quả trình bày ở bảng 3.26.

Bảng 3.26. Kết quả định lượng tạp vô cơ bằng phép thử tro sulfat

Mô tả	Chuẩn cleistantoxin		Chuẩn cleisindoside D	
	Thứ 1	Thứ 2	Thứ 1	Thứ 2
Khối lượng bì sấy	51,66911	50,63490	30,88312	31,23496
Khối lượng mẫu thử a (g)	1,00995	1,00443	0,99943	0,99882
Khối lượng bì+chế phẩm (g)	52,67906	51,63933	31,88255	32,23378
Khối lượng bì+chế phẩm sau nung (g)	51,66975	50,63564	30,88383	31,23572
Cân còn lại sau nung (g)	0,00064	0,00074	0,00071	0,00076
Hàm lượng tro (%)	0,063%	0,074%	0,071%	0,076%
Trung bình	0,07%		0,073%	
U _{tro sulfat}	0,03	0,03	0,03	0,03
Uc(Tro sulfat)	0,04		0,04	

Vì vậy, hàm lượng tạp chất vô cơ được xác định bằng phép trừ tro sulfat của 2 chất là 0,07%, với độ không đảm đo của kết quả tro sulfat là 0,04%

➤ **Tính giá trị công bố trên COA**

Xác định giá trị công bố trên COA của ống chuẩn gốc cleistantoxin, lô Cleistantoxin-01 và ống chuẩn gốc cleisindoside D, lô Cleisindoside D-01 bằng phương pháp cân bằng khối lượng (mass-balance):

Độ tinh khiết = Độ tinh khiết sắc kí × (100- % tạp bay hơi - % tạp vô cơ)/100

Độ tinh khiết của ống chuẩn cleistantoxin = 99,93 × (100-0,56-0,07)/100 = 99,3%

Độ tinh khiết của ống chuẩn cleisindoside D = 97,62 × (100-3,45-0,07)/100 = 94,2%

➤ **Độ không đảm bảo đo mở rộng**

$$\text{Độ không đảm bảo đo mở rộng } U_{mr} = \sqrt{u_{c(HPLC)}^2 + u_{c(TGA)}^2 + u_{c(tro)}^2}$$

$$U_{mr(\text{cleistantoxin})} = \sqrt{0,02^2 + 0,12^2 + 0,04^2} = \pm 0,1\%$$

$$U_{mr(\text{cleisindoside D})} = \sqrt{0,06^2 + 0,41^2 + 0,04^2} = \pm 0,4\%$$

➤ **Hàm lượng chuẩn ghi trên nhãn**

Hàm lượng ghi trên ống chuẩn gốc cleistantoxin lô Cleistantoxin-01 và ống chuẩn gốc cleisindoside D lô Cleisindoside D-01 bằng giá trị ấn định $\pm 2 \cdot U_{mr}$ (Hình 3.46).



99,3 ± 0,2 % (a)



94,2 ± 0,8 % (b)

Hình 3.46. Hàm lượng công bố trên ống chuẩn cleistantoxin (a) và cleisindoside D (b)

❖ **Dán nhãn, bảo quản**

Ống chất chuẩn gốc cleistantoxin và cleisindoside D được dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, tránh ánh sáng.

❖ **Nghiên cứu độ ổn định chất chuẩn**

Định kì 3 tháng, 6 tháng, 9 tháng, 12 tháng, 15 tháng, 18 tháng... tiến hành theo dõi độ ổn định của chất chuẩn gốc theo tiêu chuẩn chất lượng của chất chuẩn gốc cleistantoxin (mục 3.2.1.3) và chất chuẩn gốc cleisindoside D (Phụ lục 2.9).

Bảng 3.27. Nghiên cứu độ ổn định ống chuẩn gốc cleistantoxin và cleisindoside D

Thời gian	Ống chuẩn cleistantoxin			Ống chuẩn cleisindoside D		
	Độ tinh khiết SK (%)	Tổng TCLQ (%)	Tạp chất bay hơi (%)	Độ tinh khiết SK (%)	Tổng TCLQ (%)	Tạp chất bay hơi (%)
0 tháng	99,93	0,07	0,56	97,62	2,38	3,45
3 tháng	99,94	0,06	0,60	97,64	2,36	3,63
6 tháng	99,93	0,07	0,54	97,66	2,34	3,47
9 tháng	99,94	0,06	0,57	97,60	2,40	3,71
12 tháng	99,94	0,06	0,61	97,61	2,39	3,82
15 tháng	99,95	0,05	0,51			
18 tháng	99,93	0,07	0,55			

3.2.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin (chất mới-CT1)

3.2.2.1. Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng cho chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

❖ *Mô tả vật li*

➤ *Tính chất*

Bảng 3.28. Tính chất của chất chuẩn cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

Cleisindoside A	7',8'-dehydrocleistantoxin
Bột kết tinh màu trắng	Bột kết tinh màu trắng
Dễ tan trong dicloromethan, ACN, MeOH	Dễ tan trong dicloromethan, ACN
Rất khó tan trong ethanol 96° và nước	Rất khó tan trong MeOH, ethanol 96° và nước

➤ *Góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{20}$*

Tiến hành pha dung dịch 0,5% trong chloroform và đo góc quay cực.

Bảng 3.29. Góc quay riêng của chất chuẩn cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

STT	Cleisindoside A	7',8'-dehydrocleistantoxin
1	51,3	88,5
2	52,4	86,7
3	49,2	89,2
Giới hạn cho phép	- 48,0° đến - 53,0°	85,0° đến -90,0°

➤ **Xác định nhiệt độ nóng chảy**

Nhiệt độ nóng chảy của nguyên liệu thiết lập chuẩn định tính được xác định bằng phương pháp mao quản, kết quả được trình bày ở bảng 3.30.

Bảng 3.30. Nhiệt độ nóng chảy cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

STT	Cleisindoside A	7',8'-dehydrocleistantoxin
1	232,3	328,9
2	231,7	329,5
3	233,4	330,2
Giới hạn cho phép	230 đến 233°C	327 đến 330°C

❖ **Bộ dữ liệu phổ nhận dạng chất chuẩn cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin**

Bộ dữ liệu phổ nhận dạng NLTLC định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin được xây dựng dựa trên các dữ liệu phổ đã công bố của cleisindoside A [83] và các kết quả thực nghiệm trên nguyên liệu thiết lập chuẩn định tính (Phụ lục 1.5 và 1.7), kết quả trình bày ở bảng 3.31 và 3.32.

➤ **Phổ HRESI-MS, IR và UV-VIS**

Bảng 3.31. Dữ liệu phổ IR, UV và HRESI-MS của chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

	Cleisindoside A [83]	7',8'-dehydrocleistantoxin
Phổ IR ν_{max} (cm^{-1})	3444, 2910, 1773, 1626, 1491, 1244, 1382, 1080, 1034	3547, 2912, 1745, 1656, 1602, 1489, 1440, 1396, 1346, 1240, 1195, 1114, 1051, 1004, 929, 854, 821
UV (ACN), λ_{max} nm	203; 286 nm	203; 251; 344 nm
HRESI-MS (-):	[M+Na] ⁺ 553,1323	[M+Na] ⁺ 419,0749
Tính toán lý thuyết:	[M+Na] ⁺ 553,1322	[M+Na] ⁺ 419,0743
Công thức phân tử:	C ₂₆ H ₂₆ NaO ₁₂	C ₂₁ H ₁₆ NaO ₈

➤ Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$

Bảng 3.32. Dữ liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của chất chuẩn định tinh cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleisistantoxin

Cleisindoside A [83]				7',8'-dehydrocleisistantoxin			
C	$\delta_c^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J, Hz)	C	$\delta_c^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J, Hz)
1	128,2	C	-	1	126,3	C	-
2	133,0	C	-	2	130,4	C	-
3	109,9	CH	6,50 s	3	104,7	CH	6,07 s
4	146,1	C	-	4	148,5	C	-
5	147,8	C	-	5	139,9	C	-
6	110,2	CH	7,04 s	6	142,5	C	-
7	70,4	CH	5,02 d (3,5)	7	73,4	CH	5,12 d (13,5)
8	37,2	CH	2,85 dddd (3,5; 8,5; 9,0; 14,5)	8	43,1	CH	3,38 m
9	67,8	CH ₂	4,32 dd (8,5; 8,5); 4,36 dd (8,5; 9,0)	9	70,8	CH ₂	4,12 t (9,0); 4,64 t (9,0)
10	101,3	CH ₂	6,01 s; 6,02 s	10	101,6	CH ₂	5,96 s
1'	134,3	C	-	1'	128,4	C	-
2'	110,8	CH	6,54 d (1,5) s	2'	110,5	CH	6,64 br. s
3'	145,9	C	-	3'	147,2	C	-
4'	146,6	C	-	4'	147,7	C	-
5'	107,4	CH	6,75 d (8,0)	5'	108,3	CH	6,87 d (8,0)
6'	123,5	CH	6,37 dd (1,5; 8,0)	6'	123,8	CH	6,59 d (8,0)
7'	42,6	CH	4,52 d (5,5)	7'	145,6	C	-
8'	40,1	CH	3,39 dd (5,5; 14,5)	8'	119,6	C	-
9'	174,8	C=O	-	9'	168,4	C=O	-
10'	100,8	CH ₂	5,94 s; 5,95 s	10'	102,5	CH ₂	5,95 s
				6-OMe	60,9	CH ₃	3,91 s
				7-OH	-	-	5,29 s
1''	99,8	CH	4,25 d (8,0)				
2''	73,6	CH	3,01 ddd (4,0; 8,0; 8,0)				
3''	76,6	CH	3,11 m				
4''	70,4	CH	3,03 ddd (4,0; 8,0; 9,0)				
5''	77,0	CH	3,12 m				
6''	61,3	CH ₂	3,46 dd (6,0; 11,0); 3,76 dd (6,0; 11,0)				
OH-2''	-	-	4,97 d (4,0)				
OH-3''	-	-	4,89 m				
OH-4''	-	-	4,89 m				
OH-6''	-	-	4,63 t (6,0)				

^a DMSO-*d*₆, ^b 125MHz, ^c 500MHz

3.2.2.2. Xây dựng và thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí và tạp chất liên quan của cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

❖ Xây dựng phương pháp

Hai chất chuẩn cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin là hai chất mới chưa có nghiên cứu nào xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí (TKSK) và hàm lượng các tạp chất liên quan (TCLQ) của cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin bằng HPLC/DAD.

Từ các kết quả nghiên cứu trước đó, áp dụng ĐKSK định tính cả 4 lignan trong mẫu dược liệu để xác định độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside A và ĐKSK xác định độ tinh khiết của cleistantoxin để xác định độ tinh khiết sắc kí của 7',8'-dehydrocleistantoxin như sau:

- *Cột sắc kí:* Cột: Inertsil® ODS-3 (250 x 4,6 mm; 5 µm)
- *Pha động:* ACN: Nước
- *Chương trình sắc kí*

Bảng 3.33. Chương trình sắc kí xác định độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

Cleisindoside A				7',8'-dehydrocleistantoxin		
Thời gian (phút)	% ACN	%H ₂ O	Tốc độ dòng	Thời gian (phút)	% ACN	%H ₂ O
0	30	70	1,0 mL/phút	0	30	70
12	38	62	1,5 mL/phút	20	50	50
13	38	62	1,0 mL/phút	50	70	30
30	50	50	1,0 mL/phút	55	30	70
31	30	70	1,0 mL/phút			
0	30	70	1,0 mL/phút			
Thời gian phân tích 35 phút				Thời gian phân tích 60 phút		
				Tốc độ dòng 1,5 ml/phút		
Thể tích tiêm: 20 µL				Thể tích tiêm: 20 µL		
Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng				Nhiệt độ cột: nhiệt độ phòng		

❖ Thẩm định phương pháp

Phương pháp đã xây dựng được thẩm định đầy đủ theo hướng dẫn ICH: độ đặc hiệu, LOD và độ lặp lại (Phụ lục 2.13 và 2.16).

3.2.2.3. Tiêu chuẩn chất lượng cho NTLCC định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

Tiêu chuẩn chất lượng của hai chất chuẩn định tính cleisindoside A (Phụ lục 2.14) và 7',8'-dehydrocleistantoxin (Phụ lục 2.17) gồm yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử được xây dựng dựa trên bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn, hàm lượng tạp chất liên quan và độ tinh khiết sắc ký. Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của 2 chất chuẩn định tính được trình bày ở bảng 3.34 và 3.35.

Bảng 3.34. Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của NTLCC định tính cleisindoside A

Chỉ tiêu và tiêu chuẩn áp dụng		Yêu cầu	Phương pháp thử
1.	Tính chất	Bột kết tinh màu trắng, dễ tan trong dicloromethan, ACN MeOH và aceton, rất khó tan trong nước	Phương pháp thử độ tan
2.	Nhiệt độ nóng chảy	230°C đến 233°C	Mao quản hoặc quét nhiệt vi sai
3.	Góc quay cực riêng	$[\alpha]_D^{20} = -48,0^\circ$ đến $-53,0^\circ$ (dung dịch 0,5% trong chloroform)	Xác định góc quay cực riêng
4.	Phổ UV-VIS	Phổ hấp thụ từ ngoài của dung dịch thử 0,02 mg/ml ACN trong khoảng từ 200 đến 400 nm có hai cực đại hấp thụ ở bước sóng 203, 251 và 344 ± 2 nm	Quang phổ hấp thụ từ ngoài khả kiến.
	Phổ hồng ngoại (IR)	Phổ IR trong khoảng số sóng từ 4000 đến 400 cm^{-1} có các đỉnh đặc trưng trong khoảng: 3444, 2910, 1773, 1626, 1491, 1244, 1382, 1080, 1034 ± 20 cm^{-1}	Phổ hồng ngoại
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$	Phổ $^1\text{H-NMR}$ có các độ chuyển dịch hóa học đặc trưng: 7,04; 6,75; 6,54; 6,50; 6,37; 6,01; 6,02; 5,95; 5,94; 5,02; 4,97; 4,89; 4,89; 4,63; 4,52; 4,36; 4,32; 4,25; 3,76; 3,46; 3,39; 3,12; 3,11; 3,03; 3,01; $2,85 \pm 0,5$ ppm	Phổ $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 500 MHz)
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^{13}\text{C-NMR}$	Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ có các độ chuyển dịch đặc trưng: 43,1; 60,9; 70,8; 73,4; 101,6; 102,5; 104,7; 108,3; 110,5; 119,6; 123,8; 126,3; 128,4; 130,4; 139,9; 142,5; 145,6; 147,2; 147,7; 148,5; $168,4 \pm 0,5$ ppm	Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 125 MHz),
	Phổ HRESI-MS	Có mảnh m/z là 553,1323 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ tính toán cho công thức phân tử $\text{C}_{26}\text{H}_{26}\text{NaO}_{12}$	Phổ HRESI-MS
5.	Tạp chất liên quan	Từng tạp đơn: Không lớn hơn 5,0% Tổng tạp: Không lớn hơn 10,0%	Phương pháp HPLC (Tinh bằng chuẩn hoá điện tích)
6.	Độ tinh khiết sắc ký	Độ tinh khiết sắc ký của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn không được nhỏ hơn 90,0%	

Bảng 3.35. Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của NTLCC định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin

Chỉ tiêu và tiêu chuẩn áp dụng		Yêu cầu	Phương pháp thử
1.	Tính chất	Bột kết tinh màu trắng, dễ tan trong dicloromethan, ACN và aceton, rất khó tan trong MeOH và nước	Phương pháp thử độ tan
2.	Nhiệt độ nóng chảy	327°C đến 330°C	Mao quản hoặc quét nhiệt vi sai
3.	Góc quay cực riêng	$[\alpha]_D^{20} = +85,0^{\circ}$ đến $+90,0^{\circ}$ (dung dịch 0,042% trong chloroform)	Xác định góc quay cực riêng
4.	Phổ UV-VIS	Phổ hấp thụ tử ngoại của dung dịch thử 0,02 mg/ml ACN trong khoảng từ 200 đến 400 nm có hai cực đại hấp thụ ở bước sóng 203 và 286 ± 2 nm.	Quang phổ hấp thụ tử ngoại khả kiến.
	Phổ hồng ngoại (IR)	Phổ IR trong khoảng số sóng từ 4000 đến 400 cm^{-1} có các đỉnh đặc trưng trong khoảng: 3547, 2912, 1745, 1656, 1602, 1489, 1440, 1396, 1346, 1240, 1195, 1114, 1051, 1004, 929, 854, $821 \pm 20 \text{ cm}^{-1}$	Phổ hồng ngoại
	Phổ công hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$	Phổ công hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$ có các độ chuyển dịch hoá học đặc trưng: 6,87, 6,64, 6,59, 6,07, 5,96, 5,95, 5,29, 5,12, 4,64, 4,12, 3,91, $3,38 \pm 0,5$ ppm	Phổ $^1\text{H-NMR}$
	Phổ công hưởng từ hạt nhân $^{13}\text{C-NMR}$	Phổ công hưởng từ hạt nhân $^{13}\text{C-NMR}$ có các độ chuyển dịch đặc trưng: 38,22, 44,16, 45,60, 60,14, 71,99, 76,33, 101,15, 101,15, 105,16, 107,86, 110,79, 121,61, 123,95, 132,85, 135,7, 136,8, 142,00, 146,79, 147,39, 150,25, $173,97 \pm 0,5$ ppm	Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
	Phổ HRESI-MS	m/z 419,0749 $[\text{M}+\text{Na}]^+$	Phổ HRESI-MS
5.	Tạp chất liên quan	Từng tạp đơn: Không lớn hơn 5,0% Tổng tạp: Không lớn hơn 10,0%	Phương pháp HPLC (Tính bằng chuẩn hoá điện tích)
6.	Độ tinh khiết sắc kí	Độ tinh khiết sắc ký của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn không được nhỏ hơn 90,0%	

Tiêu chuẩn chất lượng của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính cleisindoside A (Phụ lục 2.14) và 7',8'-dehydrocleistantoxin (Phụ lục 2.17) được gửi sang Viện KNTT để xác định độ tinh khiết sắc ký bằng HPLC/DAD. Kết quả được trình bày ở bảng 3.36 và phiếu kiểm nghiệm của NTLCC định tính cleisindoside A (Phụ lục 2.15), NTLCC định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin (Phụ lục 2.18).

Bảng 3.36. Độ tinh khiết SK của chất chuẩn cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

STT	Cleisindoside A			7',8'-dehydrocleistantoxin		
	Độ TSKK (%)	Tap đơn lớn nhất (%)	HL tổng tap (%)	Độ TSKK (%)	Tap đơn lớn nhất (%)	Tổng TCLQ (%)
1	95,81	2,93	4,19	94,44	3,48	5,56
2	95,75	3,05	4,25	94,38	3,49	5,62
3	95,79	2,99	4,21	94,36	3,49	5,64
4	96,19	2,40	3,81	94,34	3,48	5,66
5	95,35	2,36	4,65	94,37	3,48	5,63
6	95,78	2,42	4,22	94,34	3,50	5,66
TB	95,8	2,39	4,22	94,4	3,47	5,63
RSD%	0,28	0,9	6,31	0,04	0,23	0,66
Yêu cầu	≤2,0 %	≤5,3 %	≤7,3 %	≤2,0 %	≤5,3 %	≤7,3 %

Độ tinh khiết SK của NLTLCĐ định tinh cleisindoside A là Cleisindoside A-01 là 95,8% (Phụ lục 2.15) và 7',8'-dehydrocleistantoxin là 7',8'-dehydrocleistantoxin-01 là 94,4% (Phụ lục 2.18) đều lớn hơn 90,0% đạt yêu cầu làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tinh.

3.2.2.4. Dán nhãn, bảo quản

Nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tinh cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin được dán nhãn và bảo quản ở nhiệt độ 2-8°C, tránh ánh sáng được sử dụng làm chuẩn định tinh.

TÓM LẠI:

Đã thiết lập được 2 chất chuẩn gốc định lượng là cleisindoside D, đóng 76 ống chuẩn khối lượng 10 mg, giá trị ấn định trên COA là $94,2 \pm 0,8\%$ và cleistantoxin, đóng 96 ống chuẩn khối lượng 10 mg, giá trị ấn định trên COA là $99,3 \pm 0,2\%$

Đã chuẩn bị được 2 nguyên liệu thiết lập chuẩn định tinh là cleisindoside A độ tinh khiết sắc kí là 95,8% và 7',8'-dehydrocleistantoxin 94,4%.

Từ các kết quả thu được, sử dụng các chất chuẩn đã được thiết lập để xây dựng phương pháp định tinh cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin, 7',8'-dehydrocleistantoxin và định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong quả của chi Cánh hoa (*Cleistanthus*).

3.3. XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ LIGNAN TRONG QUẢ CỦA CHI CÁCH HOA

3.3.1. Xây dựng phương pháp định tính 4 lignan trong quả của chi Cách hoa bằng HPLC/DAD.

3.3.1.1. Xác định hàm ẩm của các mẫu quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*)

Phân quả của cây sau khi được làm khô tự nhiên, nghiền thành bột thô rồi xác định độ ẩm của dược liệu theo phương pháp mất khối lượng do làm khô (Phụ lục 9.6, Dược điển Việt Nam V), kết quả xác định độ ẩm của bột mẫu (Phụ lục 3.1)

3.3.1.2. Chuẩn bị mẫu

- *Mẫu trắng*: dung môi pha mẫu ACN-H₂O (1-1).
- *Dung dịch chuẩn cleistantoxin gốc*: Cân chính xác khoảng 10 mg cleistantoxin chuẩn vào bình định mức 10 ml, hoà tan và định mức vừa đủ bằng ACN-H₂O (1-1). Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.
- *Dung dịch chuẩn cleisindoside D gốc*: Cân chính xác khoảng 5 mg cleisindoside D chuẩn vào bình định mức 10 ml, hoà tan và định mức vừa đủ bằng ACN-H₂O (1-1). Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.
- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp cleistantoxin và cleisindoside D*: Hút chính xác 1,00 mL dung dịch chuẩn cleistantoxin gốc và 1,00 mL dung dịch chuẩn cleisindoside D gốc cho vào bình định mức 10 mL, định mức vừa đủ bằng ACN-H₂O (1-1).
- *Chuẩn bị các dung dịch chuẩn đơn*: cleisindoside A 0,025 mg/ml, cleisindoside D 0,05mg/ml, cleistantoxin 0,1 mg/ml và 7',8'-dehydrocleistantoxin 0,01mg/ml
- *Dung dịch phân giải gồm*: chất chuẩn cleisindoside A 0,025 mg/ml, cleisindoside D 0,05mg/ml, cleistantoxin 0,1 mg/ml và 7',8'-dehydrocleistantoxin 0,01mg/ml
- *Mẫu thử*: Cân chính xác khoảng 0,4 g bột quả cây Chà chôi (mẫu trồng tại La Bằng - Đại Từ - Thái Nguyên) (đã được nghiền mịn, rây qua rây có kích thước mắt rây 0,355 mm) vào bình nón nút mài, thêm chính xác 20,00 ml MeOH-H₂O (9-1), đậy nút bình và cân xác định khối lượng. Tiến hành siêu âm trong 45 phút, để nguội và cân lại, bổ sung dung môi khảo sát để bằng khối lượng ban đầu, lắc đều, lọc. Hút chính xác 10,00 mL dịch chiết thu được đem cô cách thủy đến cạn, hoà tan cân bằng ACN-H₂O (1-1), đưa cân vào bình định mức 10 ml và định mức vừa đủ bằng ACN-H₂O (1-1), lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

3.3.1.3. Lựa chọn điều kiện sắc kí

Hoạt chất cleistantoxin và cleisindoside D là hai hoạt chất mới chưa có nghiên cứu nào xây dựng phương pháp phân tích định tính, định lượng đồng thời cleistantoxin và cleisindoside D trong quả cây thuộc chi Cành hoa (*Cleistanthus*) bằng HPLC/DAD.

Dựa trên chương trình sắc kí định lượng tạp chất liên quan của 2 chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D, điều chỉnh chương trình gradient để được chương trình sắc kí tách, định tính đồng thời 4 chất: cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin trong quả của chi Cành hoa như sau:

- Lựa chọn cột sắc kí: Inertsil® ODS-3 C18 (250 x 4,6 mm; 5µm).
- Pha động: ACN: Nước
- Chương trình gradient như bảng 3.37

Bảng 3.37. Chương trình gradient tách hỗn hợp 4 chất

STT	Thời gian (phút)	A	B	Tốc độ dòng
1	0	30	70	1,0 mL/phút
2	12	38	62	1,5 mL/phút
3	13	38	62	1,0 mL/phút
4	30	50	50	1,0 mL/phút
5	31	30	70	1,0 mL/phút
6	Thời gian phân tích 35 phút			

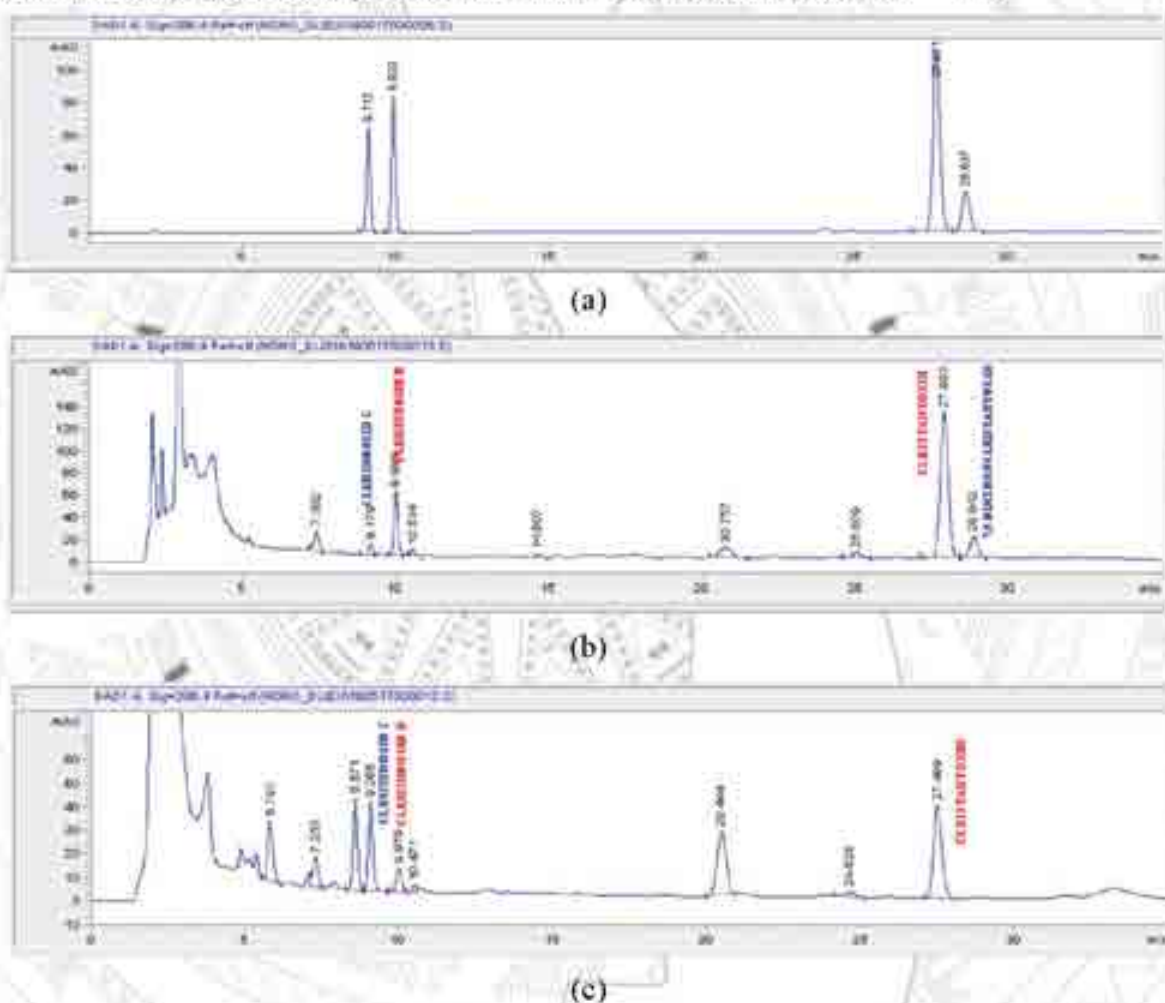
- Bước sóng: 286 nm
- Thể tích tiêm: 20 µL
- Nhiệt độ phân tích: nhiệt độ phòng.

Tiến hành SK các dung dịch chuẩn đơn, dung dịch phân giải gồm có 4 chất: cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin và 2 dung dịch thử để định tính 4 chất trên trong ĐKSK đã lựa chọn (hình 3.48). Trên SKĐ của dung dịch phân giải xuất hiện pic cleisindoside A ở 9,1 phút, cleisindoside D ở 9,9 phút, cleistantoxin 27,7 phút và 7',8'-dehydrocleistantoxin ở 28,6 phút tương ứng với các pic trên SKĐ của dd chuẩn đơn. Độ phân giải R_s giữa pic cleisindoside A và cleisindoside D là 3,49; R_s giữa pic cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin là 2,06, cho thấy các chất cần định tính đều tách hoàn toàn khỏi nhau với ĐKSK đã chọn.

Trên SKĐ của dung dịch thử chiết từ quả cây Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis*) đã định tính được 4 chất: cleisindoside A ở 9,1 phút, cleisindoside D ở

9,9 phút, cleistantoxin 27,8 phút và 7',8'-dehydrocleistantoxin ở 28,8 phút tương ứng với thời gian lưu của 4 chất chuẩn đơn. Pic cleisindoside A tách hoàn toàn khỏi cleisindoside D và chất bên phải chưa biết (unknown) với độ phân giải lần lượt là 3,06 và 1,54; pic cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin tách nhau hoàn toàn với độ phân giải là 1,83 (hình 3.47).

Trên SKD của mẫu thử quả cây Cách hoa eberhardt đã định tính được 3 chất: cleisindoside A ở 9,1 phút, cleisindoside D ở 9,9 phút, cleistantoxin 27,5 phút tương ứng với thời gian lưu của 3 chất chuẩn đơn và không xuất hiện pic 7',8'-dehydrocleistantoxin, các pic đều tách hoàn toàn khỏi nhau với $R_s > 1,5$.

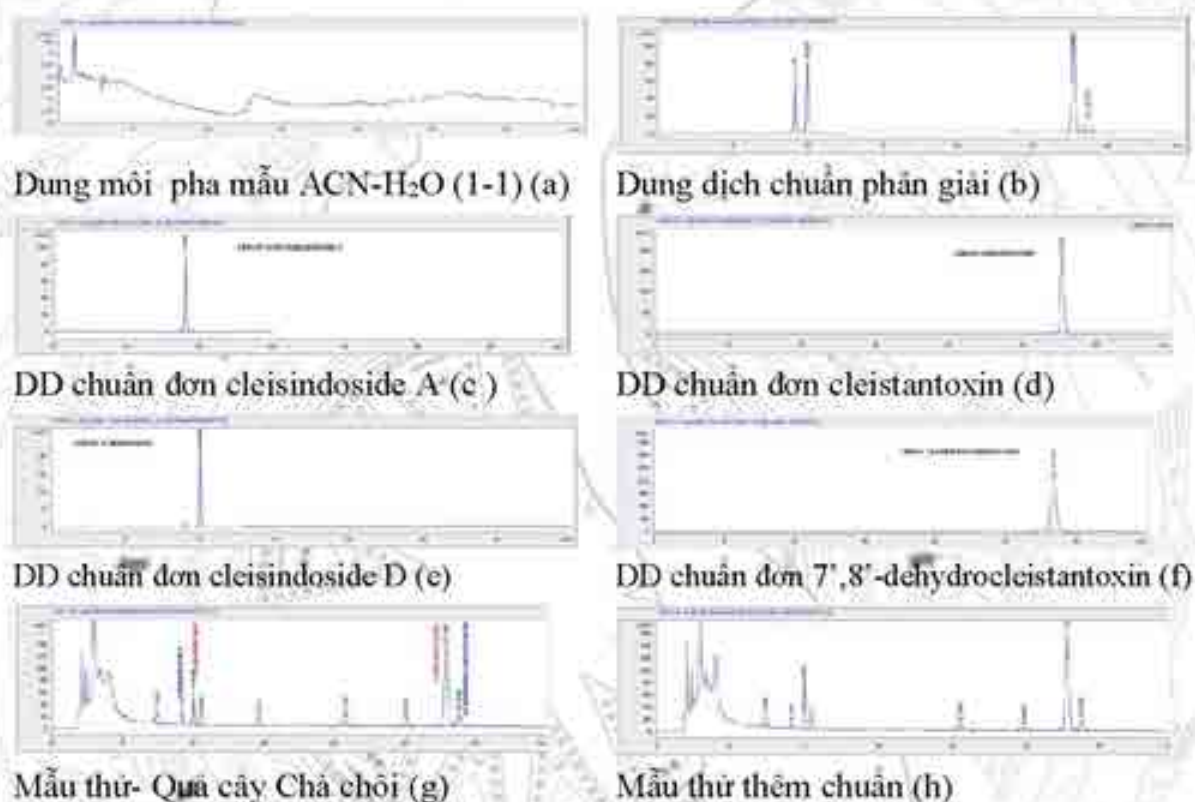


Hình 3.47. SKD dung dịch phân giải (a), mẫu thử quả cây Chà chôi (b) và mẫu thử quả cây Cách hoa eberhardt (c)

Vi vậy, đã định tính được 4 chất cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin trên SKD của mẫu thử quả cây Chà chôi và cây Cách hoa eberhardt, nhưng quả cây Cách hoa eberhardt không có chất 7',8'-dehydrocleistantoxin.

3.3.1.4. Thẩm định phương pháp định tính một số lignan trong quả của chi *Cleistanthus* bằng HPLC/DAD

Tiến hành sắc ký các dung dịch mẫu trắng ACN-H₂O (1-1), dung dịch chuẩn đơn của các chất chuẩn đã được thiết lập, dung dịch phân giải, dung dịch thử và dung dịch thử thêm chuẩn đã chuẩn bị ở mục 3.3.1.2, ghi lại SKĐ và các thông số thời gian lưu, diện tích của các pic thu được (Hình 3.48 và phụ lục 3.4).



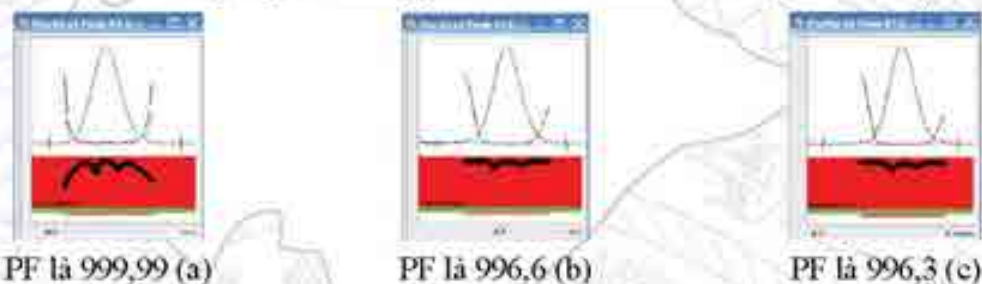
Hình 3.48. SKĐ của mẫu trắng (a), mẫu chuẩn phân giải (b), các mẫu chuẩn đơn (c, d, e, f) mẫu thử quả cây Chà chôi (g) và mẫu thử thêm chuẩn (h)

Nhận xét:

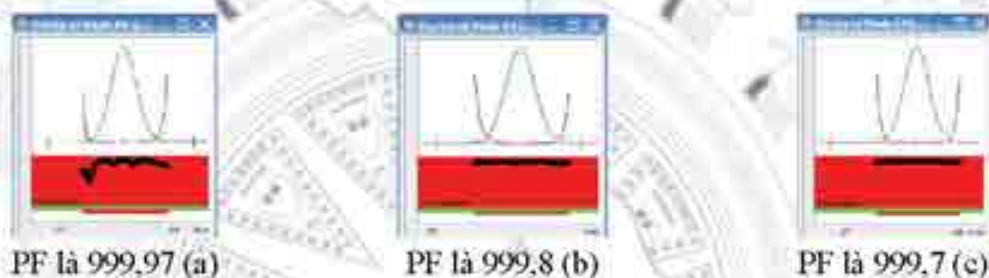
Trên SKĐ của mẫu trắng không xuất hiện 4 pic tại thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của 4 chất chuẩn đơn.

Trên SKĐ của mẫu thử quả cây Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis*) xuất hiện pic cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu pic cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin trên SKĐ của các dung dịch chuẩn đơn. Các pic tách hoàn toàn khỏi nhau với Rs nhỏ nhất là 1,7 > 1,5. Hệ số tinh khiết pic (PF) cleisindoside D và cleistantoxin của chuẩn >999,9; hệ số tinh khiết pic cleisindoside D và cleistantoxin của thử là 996,6 và 999,8 và hệ số tinh khiết pic cleisindoside D và cleistantoxin của mẫu thử thêm chuẩn là 996,3 và 999,7.

Tiến hành chồng phổ UV-VIS các pic của 4 chất cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin trong dung dịch chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn thu được hệ số chồng phổ UV-VIS lớn hơn 999 (Hình 3.51).



Hình 3.49. Hệ số tinh khiết pic cleisindoside D trong dd chuẩn (a), thử (b) và thử thêm chuẩn (c)



Hình 3.50. Hệ số tinh khiết pic cleistantoxin trong dd chuẩn (a), thử (b) và thử thêm chuẩn (c)



Hệ số chồng phổ của cleisindoside D trong mẫu thử và mẫu chuẩn là 999,20 Hệ số chồng phổ của cleistantoxin trong mẫu thử và mẫu chuẩn là 999,99
 Hình 3.51. Chồng phổ UV-Vis pic cleisindoside D và cleistantoxin trong dung dịch chuẩn và dung dịch thử

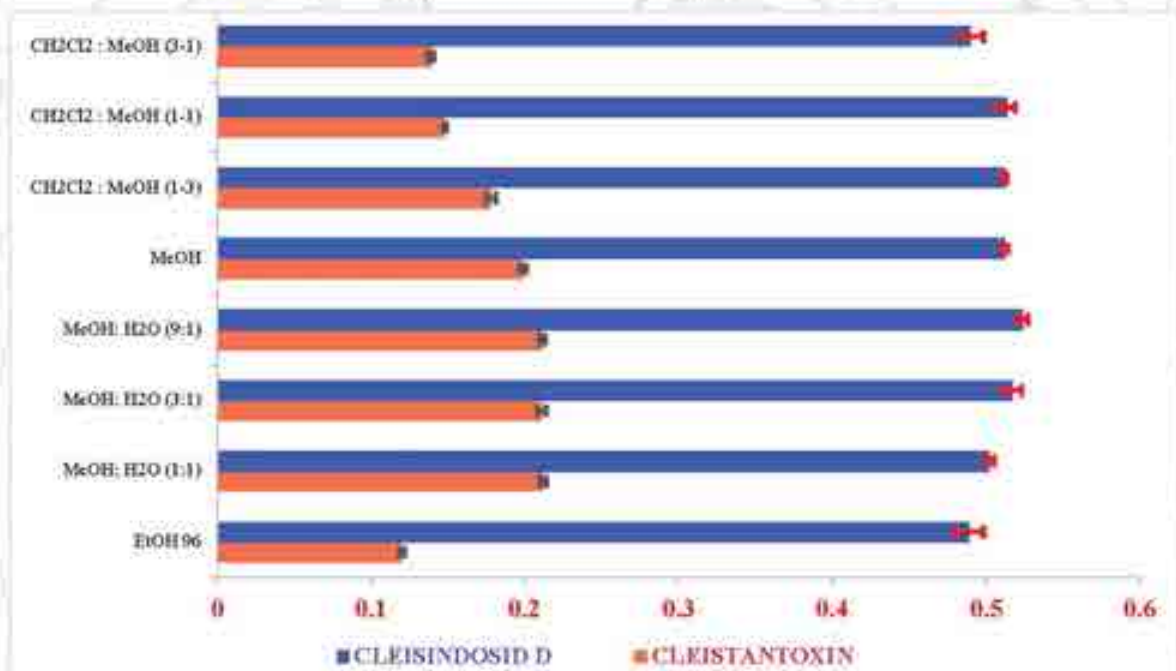
Từ các kết quả trên nhận thấy phương pháp đã xây dựng có độ đặc hiệu cao, chương trình sắc kí đã lựa chọn đảm bảo tách hoàn toàn được 4 chất có thể định tính đồng thời cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) trong quả của chi Cánh hoa. Tuy nhiên, để định lượng 2 chất chính cleisindoside D và cleistantoxin, cần khảo sát tiếp qui trình chiết xuất để chiết được hoàn toàn được 2 hoạt chất chính cleisindoside D và cleistantoxin.

3.3.2. Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong quả của chi Cách hoa bằng HPLC/DAD.

3.3.2.1. Xây dựng qui trình chiết xuất đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin từ quả Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis*).

◇ Lựa chọn dung môi chiết:

Chuẩn bị mẫu trắng mẫu chuẩn và mẫu thử: như mục 3.3.1.2. Kết quả hàm lượng cleisindoside D và cleistantoxin trong quả Chà chôi được chiết bằng các hệ dung môi khác nhau (Phụ lục 3.2 và hình 3.52).



Hình 3.52. Hàm lượng cleistantoxin và cleisindoside D được chiết bằng các hệ dung môi khác nhau (n=3)

Nhận xét:

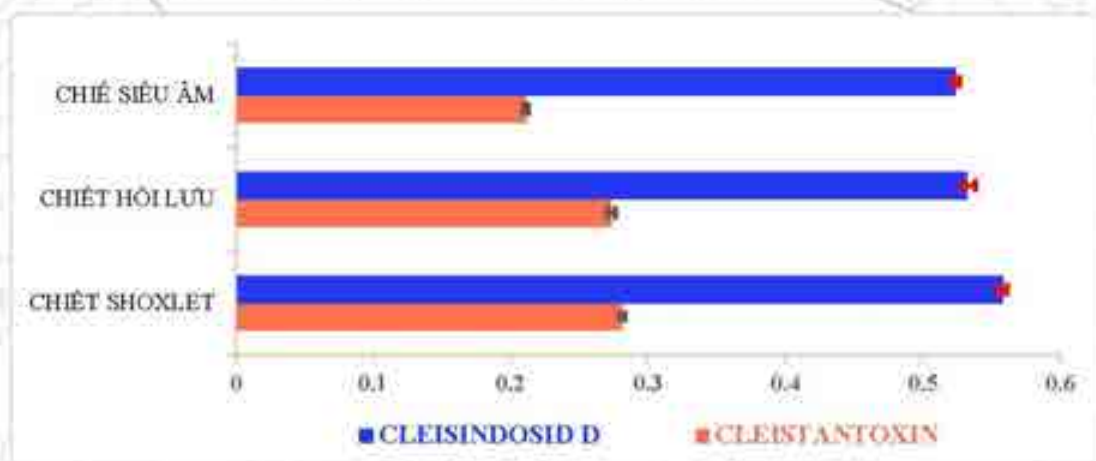
Hàm lượng cleistantoxin với các hệ dung môi này đều có hàm lượng tăng nhẹ dần trên hệ CH₂Cl₂-MeOH và chuyển sang hệ MeOH và MeOH-H₂O (9-1), nhận thấy hệ MeOH-H₂O (9-1), thì hàm lượng cleistantoxin là cao nhất.

Hàm lượng cleisindoside D khá thấp ở các hệ dung môi kèm phân cực khi CH₂Cl₂ phối hợp với MeOH ở tỉ lệ thấp, khi tỉ lệ MeOH tăng thì hàm lượng glycosid này tăng rõ rệt và lớn nhất ở hệ dung môi MeOH-H₂O (9-1), MeOH-H₂O (3-1) và MeOH-H₂O (1-1).

Vì vậy, hệ dung môi MeOH-H₂O (9-1) được lựa chọn làm dung môi chiết xuất đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong quả cây.

◇ **Lựa chọn kỹ thuật chiết:**

Khảo sát các kỹ thuật chiết xuất siêu âm, chiết hồi lưu và chiết Soxhlet bằng dung môi MeOH-H₂O (9-1) để chiết xuất đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong quả cây Chà chôi. Kết quả được trình bày ở phụ lục 3.3 và hình 3.53.



Hình 3.53. Hàm lượng cleistantoxin và cleisindoside D chiết bằng các kỹ thuật khác nhau (n=3)

Nhận xét:

Khi khảo sát trên 3 kỹ thuật chiết xuất trên thì thấy kỹ thuật chiết Soxhlet chiết được đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong quả cây bằng hệ dung môi MeOH-H₂O (9-1) có hàm lượng cao nhất. Kỹ thuật chiết Soxhlet được lựa chọn.

Sau khi tiến hành chiết 1,0 g bột quả khô với 50 ml MeOH-H₂O (9-1) cho vào túi giấy lọc, lắp bộ chiết Soxhlet, chiết trong 2,5 giờ theo qui trình trên. Bã được liệu được thêm 50 ml dung môi MeOH-H₂O (9-1) và tiến hành chiết Soxhlet tiếp trong 2,5 giờ. Dịch chiết thu được đem cô cách thủy đến cạn, thêm chính xác 1 ml dung môi ACN-H₂O (1-1), siêu âm trong 15 phút, tiến hành tiêm sắc kí để xác định hàm lượng cleisindoside D và cleistantoxin còn lại trong bã được liệu (Phụ lục 3.3).

Kết quả

Diện tích pic cleisindoside D trong dung dịch cần : $S_{\text{cleisindosid D}} = 17.838$.

Suy ra hàm lượng cleisindoside D trong bã được liệu: 0,001%.

Diện tích pic cleistantoxin trong dung dịch cần : $S_{\text{cleistantoxin}} = 0$.

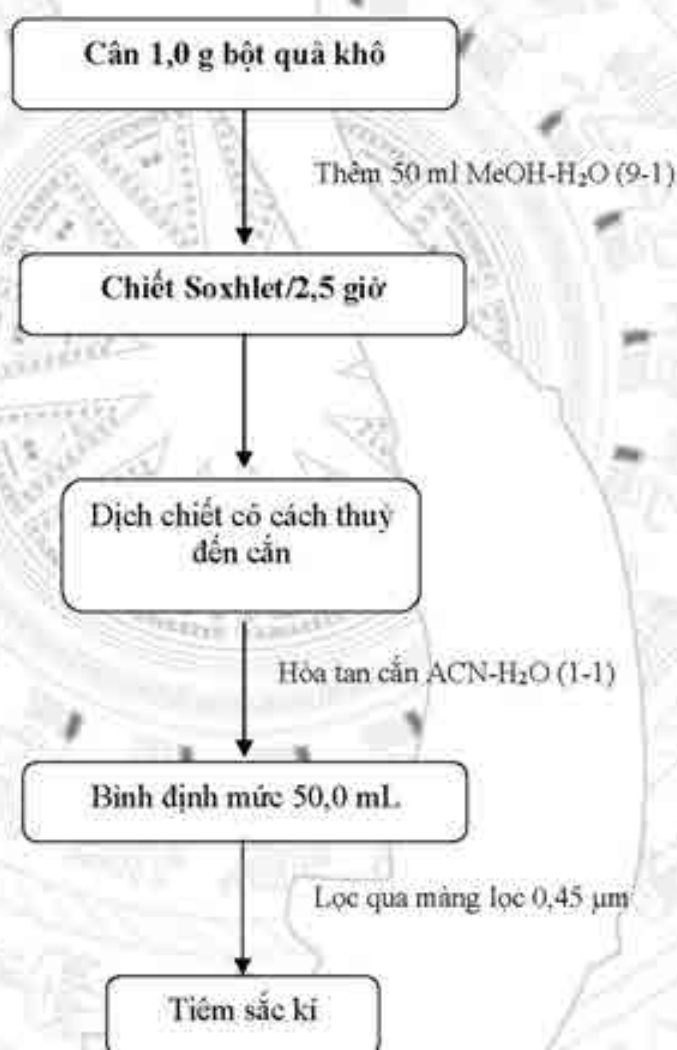
Suy ra hàm lượng cleistantoxin trong bã được liệu: 0,000%.

Như vậy qui trình chiết 1,0 g bột quả khô cây Chà chôi với 50 ml MeOH-H₂O (9-1) bằng kỹ thuật chiết Soxhlet trong 2,5 giờ đã chiết kiệt được cleisindoside D và cleistantoxin trong được liệu.

3.3.2.2. Phương pháp định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong quả Chà chôi.

- Chuẩn bị mẫu:
 - Chuẩn bị mẫu trắng và mẫu chuẩn: như mục 3.3.1.2
 - Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 1,0 g bột quả cây Chà chôi cho vào túi giấy lọc, lắp bộ chiết Soxhlet, thêm 50 ml dung môi MeOH-H₂O (9-1) vào bình cầu, chiết trong 2,5 giờ. Lấy dịch chiết đem cô trên cách thủy đến cạn, hoà tan căn bằng ACN-H₂O (1-1) cho vào bình định mức 50,0 ml và định mức vừa đủ, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm (Hình 3.54)

Quy trình chiết đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong dược liệu (Hình 3.54)



Hình 3.54. Sơ đồ quy trình chiết đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong dược liệu

- Điều kiện sắc kí như mục 3.3.1.3

3.3.2.3. Thẩm định phương pháp định lượng đồng thời cleisindoside D, cleistantoxin bằng HPLC/DAD

❖ *Tính thích hợp của hệ thống sắc kí*

Dung dịch phân giải: như mục 3.3.1.2. Tiêm SK dung dịch phân giải có độ phân giải R_s giữa pic cleisindoside A và cleisindoside D và R_s giữa pic cleisindoside D và 7',8'-dehydrocleistantoxin là $R_s > 1,5$.

Dung dịch chuẩn cleistantoxin gốc (1) và chuẩn cleisindoside D gốc (1): được pha từ lượng cân 10,11 mg cleistantoxin chuẩn HL 99,3% và 5,31 mg cleisindoside D HL 94,2% như mục 3.3.1.2. Tiến hành pha dung dịch chuẩn hỗn hợp cleistantoxin và cleisindoside D 100% (1) và tiêm SK 6 lần. Tính RSD% của thời gian lưu, diện tích pic và các thông số sắc kí như N, T....

Chuẩn bị mẫu chuẩn hỗn hợp cleistantoxin và cleisindoside D (2): như mục 2.3.4.2 và tiêm 3 lần mẫu chuẩn hỗn hợp cleistantoxin và cleisindoside D 100% (2). Tính hệ số tương đồng (HF).

Bảng 3.38. Kết quả thu được từ 6 lần tiêm của dung dịch chuẩn hỗn hợp.

STT	Cleisindoside D		Cleistantoxin	
	Thời gian lưu (phút)	Diện tích Pic (mAu.s)	Thời gian lưu (phút)	Diện tích Pic (mAu.s)
1	9,880	458,32	28,376	1977,230
2	9,877	462,66	28,295	1979,635
3	9,849	464,90	28,219	1981,820
4	9,868	462,34	28,260	1989,770
5	9,810	468,12	28,188	1997,120
6	9,784	473,96	28,099	2009,960
TB	9,840	465,05	28,240	1989,260
SD	0,04	5,43	0,10	12,52
RSD %	0,40	1,17	0,34	0,63

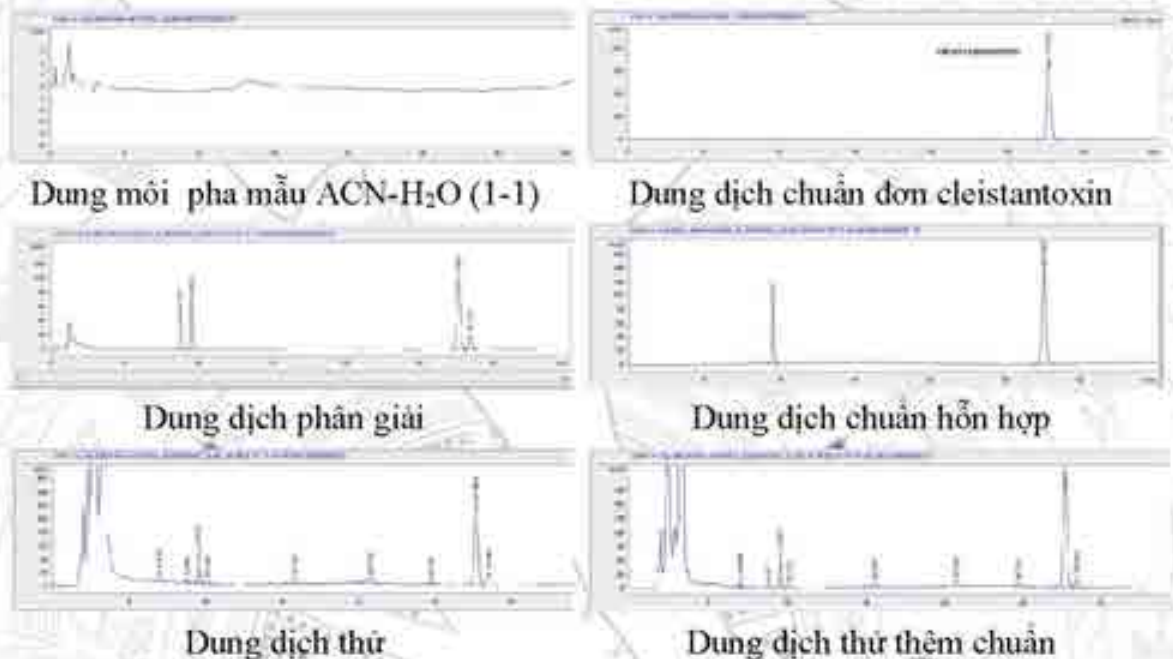
Nhận xét:

Độ lệch chuẩn tương đối của 6 lần tiêm lặp lại dung dịch chuẩn hỗn hợp 100% của cleisindoside D và cleisatntoxin có thời gian lưu ($\leq 1,0\%$) và diện tích pic ($\leq 2,0\%$) đều nằm trong khoảng cho phép.

Vì vậy, hệ thống sắc kí là ổn định để định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin với ĐKSK đã chọn.

❖ *Độ đặc hiệu*

Tiến hành tiêm SK mẫu trắng, các dung dịch chuẩn đơn, dung dịch phân giải, dung dịch chuẩn hỗn hợp, dung dịch thử, dung dịch thử thêm chuẩn vào hệ thống SK (Hình 3.55 và phụ lục 3.4).



Hình 3.55. SKĐ của mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn
Nhận xét:

Trên SKĐ của mẫu trắng không xuất hiện 2 pic tại thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của 2 chất chuẩn cleisindoside D và cleistantoxin đơn.

Trên SKĐ của dung dịch phân giải xuất hiện pic cleisindoside A ở 8,737 phút, cleisindoside D ở 9,515 phút, cleistantoxin 27,563 phút và 7',8'-dehydrocleistantoxin ở 28,374 phút, hệ số phân giải R_s giữa pic cleisindoside A và cleisindoside D là 3,49; hệ số phân giải R_s giữa pic cleisindoside D và cleistantoxin là 2,06.

Trên SKĐ của mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn xuất hiện pic cleisindoside D và cleistantoxin có thời gian lưu tương ứng là 9,329 và 27,5 phút tương ứng với pic cleisindoside D và cleistantoxin có thời gian lưu là 19,279 phút trên SKĐ của dung dịch chuẩn hỗn hợp. Hệ số tinh khiết pic cleisindoside D và cleistantoxin trong dung dịch chuẩn, dung dịch thử, dung dịch thử thêm chuẩn lớn hơn 999.

Tiến hành chồng phổ UV-VIS của các pic tương ứng nhau của cleisindoside D và cleistantoxin trong dung dịch chuẩn và mẫu thử thu được hệ số chồng phổ UV-VIS lớn hơn 999.

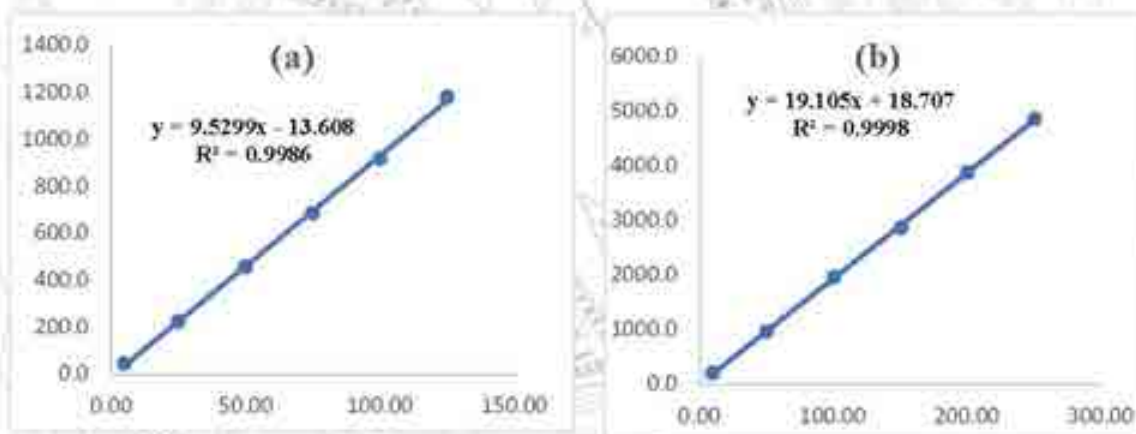
❖ *Khoảng tuyến tính*

Mẫu chuẩn cleistantoxin gốc và chuẩn cleisindoside D gốc: Chuẩn bị như dung dịch chuẩn gốc (1) ở phần độ ổn định hệ thống. Tiến hành pha dãy dung dịch

chuẩn hỗn hợp cleistantoxin và cleisindoside D để có nồng độ trong khoảng từ 10% đến 250% nồng độ định lượng. Tiến hành SK theo ĐK đã lựa chọn. Xác định mối tương quan giữa nồng độ trong dung dịch chuẩn và diện tích pic của 2 chất, kết quả được trình bày trong bảng 3.39 và hình 3.56.

Bảng 3.39. Khoảng nồng độ tuyến tính của cleisindoside D và cleistantoxin

STT	Nồng độ % so với ĐL	Nồng độ dd cleisindoside D (µg/mL)	Diện tích pic (mAU.s)	Nồng độ dd cleistantoxin (µg/mL)	Diện tích pic (mAU.s)
1	10	5,000	45,4	10,04	200,6
2	50	25,00	227,2	50,20	968,7
3	100	50,01	459,3	100,4	1967,2
4	150	75,01	688,1	150,6	2873,5
5	200	100,0	920,2	200,8	3891,1
6	250	125,0	1203,4	251,0	4787,9
Phương trình hồi qui:		$Y = 9,5299.X - 13,608$		$Y = 19,105.X + 18,707$	
Hệ số tương quan (r):		0,9993		0,9999	



Hình 3.56. Đường chuẩn của cleisindoside D (a) và cleistantoxin (b)

Nhận xét:

Kết quả khảo sát cho thấy có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ của cleisindoside D và cleistantoxin trong khoảng nồng độ khảo sát và diện tích pic với hệ số tương quan $r = 0,9993$ và $0,9999$ ($r > 0,998$).

Sử dụng phần mềm Excel tính toán giá trị P intercept (b) của 2 đường chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D lần lượt là 0,36 và 0,46 $> 0,05$, giá trị b của cả 2 đường chuẩn khác không không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95% (Phụ lục 3.4). Từ kết quả cho thấy cả 2 đường chuẩn không mắc sai số hệ thống.

❖ *Độ chính xác của phương pháp*

➤ *Độ lặp lại*

Chuẩn bị mẫu chuẩn và mẫu thử: ở mục 3.3.1.2. Tiến hành với 6 mẫu thử riêng biệt từ cùng một mẫu bột quả cây Chà chối, kết quả ở bảng 3.40 và phụ lục 3.4.

Bảng 3.40. Độ lặp lại HL cleisindoside D và cleistantoxin trong quả Chà chối

STT	Lượng cân mẫu (g)	Cleisindoside D		Cleistantoxin	
		Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (%)
1.	0,9832	460.379	0,271	1.997.190	0,563
2.	1,0091	497.752	0,286	2.038.288	0,559
3.	1,0037	488.005	0,281	2.029.773	0,560
4.	1,0025	478.326	0,276	2.024.771	0,559
5.	1,0189	492.707	0,280	2.048.646	0,557
6.	1,0163	496.861	0,283	2.010.730	0,548
TB			0,280		0,558
RSD%			1,86		0,92

Nhận xét:

Từ kết quả cho thấy RSD% của hàm lượng cleisindoside D và cleistantoxin của 6 dung dịch thử lần lượt là 1,86 và 0,92% < 2,0% nên phương pháp định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin có độ lặp lại đạt yêu cầu.

➤ *Độ tái lập*

Xác định độ tái lập bằng cách định lượng cleisindoside D và cleistantoxin trong mẫu thử bởi PTN khác nhau, với điều kiện sắc kí và PP xử lý mẫu như quy trình phân tích, lặp lại thí nghiệm 6 lần; kết quả được trình bày trong bảng 3.41.

Bảng 3.41. Kết quả độ tái lập của cleisindoside D trong mẫu thử quả Chà chối

TT	PKN 1			PKN 2		
	Lượng cân mẫu (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (%)	Lượng cân mẫu (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (%)
	Lượng cân chuẩn: 5,5 mg Diện tích pic TB mẫu chuẩn: 496.300,2 (mAu.s)			Lượng cân chuẩn: 5,37 mg Diện tích pic TB mẫu chuẩn: 430.311,67 (mAu.s)		
1	0,9832	460.379	0,271	0,97515	415.318	0,275
2	1,0091	497.752	0,286	1,06423	465.793	0,283
3	1,0037	488.005	0,281	1,00210	427.138	0,275
4	1,0025	478.326	0,276	1,04841	434.517	0,268
5	1,0189	492.707	0,280	1,02745	439.542	0,276
6	1,0163	496.861	0,283	1,00024	419.817	0,271
TB			0,280			0,275
RSD%			1,86%			1,85%

Bảng 3.42. Kết quả độ tái lập của cleistantoxin trong mẫu thử quả Chà chôi

TT	PKN 1			PKN 2		
	Lượng cân chuẩn: 10,83 mg Diện tích pic TB mẫu chuẩn: 2,134,600 (mAu.s)			Lượng cân chuẩn: 10,10 mg Diện tích pic TB mẫu chuẩn: 1,6962,70.33 (mAu.s)		
	Lượng cân mẫu (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (%)	Lượng cân mẫu (g)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (%)
1	0,9832	1,997,190	0,563	0,97515	1,684,771	0,562
2	1,0091	2,038,288	0,559	1,06423	1,806,842	0,552
3	1,0037	2,029,773	0,560	1,00210	1,738,992	0,564
4	1,0025	2,024,771	0,559	1,04841	1,839,871	0,570
5	1,0189	2,048,646	0,557	1,02745	1,715,040	0,543
6	1,0163	2,010,730	0,548	1,00024	1,749,229	0,568
TB			0,558			0,560
RSD%			0,92%			1,91%

Nhận xét:

So sánh 2 phương sai của 2 PTN về kết quả hàm lượng cleisindosid D và cleistantoxin bằng F-test: cho thấy F tính của cleisindosid D là $1,09 < F$ bảng là 5,05 ($P=0,46 > 0,05$) và của cleistantoxin là $4,09 < F$ bảng là 5,05 ($P=0,074 > 0,05$).

So sánh 2 giá trị trung bình của 2 PTN về kết quả hàm lượng cleisindosid D và cleistantoxin bằng t-test, cho thấy t tính của cleisindosid D là $1,61 < t$ bảng = 2,23 ($P=0,14 > 0,05$) và của cleistantoxin là $0,46 < t$ bảng là 2,23 ($P=0,66 > 0,05$).

Vi vậy, không có sự sai khác có ý nghĩa thống kê về phương sai và giá trị trung bình của 2 PTN với độ tin cậy 95,0%, cho thấy phương pháp định lượng cleisindosid D và cleistantoxin trong quả Chà chôi đạt yêu cầu về độ tái lập.

❖ *Độ đúng*

- *Dung dịch chuẩn cleistantoxin gốc:* Cân chính xác khoảng 25 mg cleistantoxin chuẩn vào bình định mức 10 ml, hoà tan và định mức vừa đủ bằng ACN-H₂O (1-1). Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.
- *Dung dịch chuẩn cleisindosid D gốc:* Cân chính xác khoảng 12,5 mg cleisindosid D chuẩn vào bình định mức 10 ml, hoà tan và định mức vừa đủ bằng ACN-H₂O (1-1). Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.
- *Tiến hành chuẩn bị dung dịch thử thêm chuẩn ở các nồng độ 50, 100 và 200%:* Cân chính xác khoảng 0,25 g; 0,5 g và 0,5 g bột quả cây Chà chôi cho vào túi giấy lọc, lắp bộ chiết Soxhlet, thêm chính xác 0,5; 1,0 và 3,0 mL dung dịch chuẩn cleistantoxin gốc và dung dịch chuẩn cleisindosid D gốc vào bình cầu thêm 50 ml dung môi MeOH-H₂O (9-1) chiết trong 2,5 giờ. Lấy dịch chiết đem cô trên cách thủy đến cạn, hoà tan cân bằng ACN-H₂O (1-1) cho vào bình định mức 50 ml và định mức vừa đủ, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 µm. Mỗi nồng độ tiến hành 3 mẫu theo ĐK đã chọn. Độ đúng của phương pháp được xác định bằng tỷ lệ lượng cleisindosid D và cleistantoxin thu hồi lại được so với lượng chuẩn thêm vào (Bảng 3.43 và 3.44, phụ lục 3.4).

Bảng 3.43. Kết quả đánh giá độ đúng của cleisindoside D trên mẫu quả Chà chòi

Mẫu	Diện tích pic (mAU.s)	Tổng lượng thu hồi (mg)	Lượng thử sẵn có (mg)	Lượng chất tìm lại (mg)	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	% Thu hồi
50%	235,824	1,2953	0,6393	0,6560	0,6310	104,0
50%	233,856	1,2845	0,6515	0,6330	0,6310	100,3
50%	233,249	1,2811	0,6446	0,6365	0,6310	100,9
TB						101,7
RSD%						1,93
100%	474,187	2,6045	1,3063	1,2982	1,2432	104,4
100%	473,741	2,6021	1,3109	1,2912	1,2432	103,9
100%	468,980	2,5759	1,3216	1,2543	1,2432	100,9
TB						103,1
RSD%						1,84
200%	900,886	4,9482	1,2396	3,7087	3,5600	104,2
200%	907,004	4,9818	1,3139	3,6679	3,5600	103,0
200%	904,818	4,9698	1,3468	3,6230	3,5600	101,8
TB						103,0
RSD%						1,17

Bảng 3.44. Kết quả đánh giá độ đúng của cleistantoxin trên mẫu quả Chà chòi

Mẫu	Diện tích pic (mAU.s)	Lượng chuẩn thêm vào (mg)	Lượng thu hồi (mg)	Lượng thử sẵn có (mg)	Lượng tìm lại (mg)	% Thu hồi
50%	1007,855	2,5264	1,2740	1,2534	1,2174	102,9
50%	1006,410	2,5228	1,2983	1,2244	1,2174	100,6
50%	1016,069	2,5470	1,2846	1,2624	1,2174	103,7
TB						102,4
RSD%						1,58
100%	2,033,610	5,0976	2,6033	2,4995	2,5123	99,5
100%	2,026,631	5,0802	2,6124	2,4678	2,5123	98,2
100%	2,018,517	5,0598	2,6337	2,4261	2,5123	96,6
TB						98,1
RSD%						1,49
200%	3,976,198	9,9671	2,4703	7,4968	7,6262	98,3
200%	3,993,952	10,0116	2,6185	7,3931	7,6262	96,9
200%	4,001,368	10,0302	2,6840	7,3463	7,6262	96,3
TB						97,2
RSD%						1,04

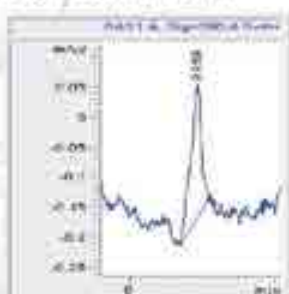
Nhận xét:

Kết quả khảo sát độ đúng của 2 chất ở 3 mức nồng độ cho thấy tỷ lệ % tìm lại chất chuẩn cleisindoside D và cleistantoxin nằm trong khoảng phép từ 95,0% đến 105,0% với $RSD \leq 2,0\%$. Phương pháp định lượng đồng thời cleisindoside D và

cleistantoxin trong mẫu quả Chà chôi đã xây dựng đạt yêu cầu về độ đúng trong khoảng nồng độ khảo sát.

❖ *Giới hạn định lượng (LOQ)*

Pha loãng dung dịch thử quả Chà chôi với nồng độ giảm dần xác định giá trị tín hiệu/nhiều (S/N) tương ứng. LOQ xác định tại nồng độ có S/N = 10-20, kết quả được trình bày ở hình 3.57.



LOQ của cleisindoside D 0,05 µg/ml
(S/N=20)



LOQ của cleistantoxin 0,1 µg/ml
(S/N=10)

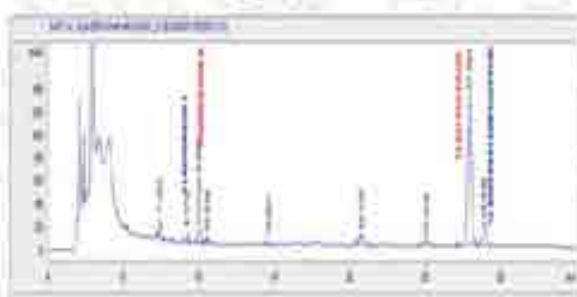
Hình 3.57. SKĐ dung dịch thử quả Chà chôi ở nồng độ LOQ

Nhận xét:

Từ SKĐ dung dịch thử có nồng độ cleisindoside D 0,05 µg/ml và cleistantoxin 0,1 µg/ml xác định được giá trị S/N lần lượt là =20 và 10. Tiến hành chuẩn bị 6 dung dịch thử ở nồng độ trên và tìm SK. RSD% của diện tích pic cleisindoside D là 15,90 % và cleistantoxin là 9,83%. Vì vậy, giới hạn định lượng của cleisindoside D 0,05 µg/ml và cleistantoxin là 0,1 µg/ml.

3.3.3. Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định tính và định lượng đồng thời một số lignan trong mẫu quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*).

3.3.3.1. Áp dụng phương pháp đã xây dựng sơ bộ định tính và định lượng đồng thời một số lignan trong mẫu quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*)



Quả cây Chà chôi



Quả cây Cách hoa eberhardt

Hình 3.58. SKĐ định tính 4 lignan trong quả một số loài thuộc chi Cách hoa

Tiến hành tìm SK các dung dịch chuẩn đơn của 4 chất trên SKĐ của dung dịch chuẩn đơn cleisindoside A có t_R ở 9,1 phút, cleisindoside D ở 9,9 phút, cleistantoxin 27,6 phút và 7',8'-dehydrocleistantoxin ở 28,5 phút.

Trên SKĐ của dung dịch thử chiết từ quả Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis*) đã định tính được 4 chất: cleisindoside A ở 9,1 phút, cleisindoside D ở 9,9 phút, cleistantoxin 27,6 phút và 7',8'-dehydrocleistantoxin ở 28,5 tương ứng với thời gian lưu của 4 chất chuẩn đơn (Hình 3.58).

Trên SKĐ của mẫu thử quả Cách hoa eberhardt (*Cleistanthus eberhardtii*) đã định tính được 3 chất: cleisindoside A ở 9,1 phút, cleisindoside D ở 9,9 phút, cleistantoxin 27,6 phút tương ứng với thời gian lưu của 3 chất chuẩn đơn. Vậy cho thấy quả Cách hoa eberhardt không có chất 7',8'-dehydrocleistantoxin. Vì vậy, chất chuẩn định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin đã được chuẩn bị rất có ý nghĩa trong nghiên cứu phân biệt quả cây Chà chôi với quả các cây khác trong chi Cách hoa.

❖ *Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong quả một số loài thuộc chi Cách hoa*

Áp dụng phương pháp đã xây dựng và thẩm định để bước đầu định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong các mẫu của quả Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis*) thu hái tại La Bằng, Thái Nguyên và quả Cách hoa eberhardt (*Cleistanthus eberhardtii*) thu hái tại Thừa Thiên Huế, kết quả được trình bày ở bảng 3.45 và phụ lục 3.5.

Bảng 3.45. Hàm lượng cleisindoside D và cleistantoxin trong quả của chi Cách hoa

STT	Lượng cân mẫu (g)	Cleisindoside D		Cleistantoxin	
		Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (%)	Diện tích pic (mAu.s)	Hàm lượng (%)
Quả cây Chà chôi (La Bằng - Thái Nguyên)					
1.	0,96015	421,191	0,283	1,624,797	0,550
2.	0,97423	424,829	0,282	1,647,634	0,550
3.	0,96297	410,138	0,275	1,682,595	0,568
TB			0,280		0,556
RSD%			1,56%		1,88%
Quả cây Cách hoa eberhardt (Phú Lộc- Thừa Thiên Huế)					
1.	0,99384	482,926	0,077	3,537,119	0,284
2.	1,00345	472,246	0,075	3,615,119	0,287
3.	1,01027	488,595	0,077	3,613,965	0,285
TB			0,076		0,285
RSD%			1,72%		0,61%

Nhận xét:

Hàm lượng cleisindoside D và cleistantoxin trong quả cây Chà chôi được thu hái ở La Bằng, Thái Nguyên lần lượt là 0,280% và 0,556%. Trong khi đó, hàm lượng cleisindoside D và cleistantoxin trong quả cây Cách hoa eberhardt là 0,076 và 0,280% thấp hơn rất nhiều so với quả cây Chà chôi (Phụ lục 3.5).

Mẫu quả Chà chôi và quả Cách hoa eberhardt cùng với tiêu chuẩn cơ sở được gửi sang Viện KNT TỰ để thẩm định và đánh giá tính khả thi của phương pháp đã xây dựng. Kết quả cho thấy, phương pháp định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin đã xây dựng có thể áp dụng để định lượng đồng thời hai hoạt chất trên trong quả một số loài cây thuộc chi Cách hoa như quả cây Chà chôi và quả cây Cách hoa eberhardt. Phiếu kiểm nghiệm hàm lượng của 2 chất trên trong quả cây Chà chôi và quả cây Cách hoa eberhardt trình bày ở phụ lục 3.6.

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. PHÂN LẬP, TINH CHẾ VÀ KHẲNG ĐỊNH CẤU TRÚC CLEISTANTOXIN VÀ CLEISINDOSIDE D LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN

4.1.1. Phân lập thô cleistantoxin và cleisindoside D trên cột silicagel

Nhằm mục đích phân lập 2 chất cleistantoxin và cleisindoside D làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng. Luận án đã dựa vào cấu trúc và tính chất của cleistantoxin tan tốt trong CH_2Cl_2 và cleisindoside D tan tốt trong CH_2Cl_2 và MeOH (Bảng 3.21 và 3.22) để lựa chọn hệ dung môi CH_2Cl_2 và MeOH với tỉ lệ tăng dần 1, 5, 10%...triển khai trên cột nhồi silica gel để phân lập cleistantoxin và cleisindoside D làm NLTLC phù hợp hơn so với chiết phân bố vi loại được các tạp chất cũng tan trong CH_2Cl_2 và MeOH [82], [83]. Để phân lập, tinh chế cleistantoxin và cleisindoside D làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn (NLTLC) gốc với độ tinh khiết cao nhất, nên chỉ gom các phân đoạn có chứa nhiều chất cần tinh chế và lẫn ít tạp chất.

4.1.2. Phân lập, tinh chế, khẳng định cấu trúc cleistantoxin làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng

Dựa trên độ tan của cleistantoxin tan tốt trong CH_2Cl_2 và kém tan trong *n*-hexan (Bảng 3.21), luận án đã chọn tinh chế cleistantoxin bằng cách kết tinh trong hệ dung môi CH_2Cl_2 : *n*-hexan. Tuy nhiên, trong 10,6916 g cân A chứa chất CT1 có cấu trúc và độ tan tương tự như cleistantoxin (Bảng 3.32) nên khi kết tinh bằng hệ CH_2Cl_2 : *n*-hexan thu được cleistantoxin lẫn với chất CT1.

Vi vậy, để tách cleistantoxin khỏi CT1, luận án sử dụng cột sắc kí silica gel với hệ dung môi CH_2Cl_2 thêm acetone từ 1, 2, 5%... để loại các PD chứa CT1 và gom các PD chứa cleistantoxin thu được cân B có độ tinh khiết của cleistantoxin là 87,8%. Sau đó, cân B được kết tinh bằng CH_2Cl_2 : *n*-hexan 4 lần thu được chất cleistantoxin có độ tinh khiết rất cao (99,9%) và không có tạp chất CT1 (Hình 3.7).

Đo phổ HRESI-MS, CD, 1D-NMR và 2D-NMR để khẳng định được chất tinh chế được là cleistantoxin. Hợp chất cleistantoxin là 1 hợp chất aryl-tetralin lignan có cấu trúc tương đối phức tạp gần giống podophyllotoxin. Phổ HRESI-MS của hợp chất cleistantoxin cho pic ion giả phân tử ở m/z 421,0902 $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Để xác định cấu trúc phẳng của hợp chất này, luận án đã sử dụng các phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, COSY, HSQC, HMBC. Phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT, cho phép xác định hợp chất có 1 nhóm methoxy, 4 nhóm methin sp^2 , 3 nhóm methylen sp^3 , 4 nhóm methin sp^3 , 1 nhóm carbonyl và 8 carbon không liên kết trực tiếp với hydro. Phổ

COSY cho phép xác định 2 chuỗi tương tác spin-spin giữa H-5'/H-6' và H-7'/H-8'/H-8, H-7/H-8/CH₂-9 (Hình 3.6). Các tương tác trên phổ HMBC giữa H-8 với C-1/C-7'/C-7; giữa H-7 với C-1/C-2/C-8 và tương tác giữa H-8' với C-8/C-7'/C-7/C-2 cho phép xác định chuỗi liên kết C-1 với C-7, C-8, C-8', C-7' và C-2. Sự có mặt của vòng lacton được xác định nhờ tương tác HMBC của proton thuộc nhóm CH₂-9 với C-9'/C-8/C-8'. Vị trí của 2 nhóm dioxymethylen cũng được xác định tại C-4/C-5 và C-3'/C-4' dựa vào tương tác HMBC giữa proton của chúng với C-4/C-5 và C-3'/C-4' (Hình 3.6). Nhóm methoxy gắn với C-6 và nhóm OH gắn với C-7 được xác định nhờ tương tác HMBC giữa proton của nhóm methoxy với C-6 và giữa proton của nhóm OH với C-7 và C-8.

Hợp chất cleistantoxin có 4 C bất đối ở vị trí C-7, C-8, C-7' và C-8'. Vì vậy, cần phải xác định cấu hình của các carbon này. Cấu hình tương đối của hợp chất được xác định bằng phân tích phổ NOESY và hằng số tương tác spin-spin. Proton H-7 có một tương tác kiểu *anti* ($J = 9,0$ Hz) với H-8 cho phép xác định H-7 có mối tương quan *pseudodistal* với H-8. Ngoài ra, H-8' có 1 tương tác kiểu *gauche* ($J = 4,5$ Hz) và 1 tương tác kiểu *anti* ($J = 15,0$ Hz) cho phép xác định H-8' chiếm giữ vị trí *pseudoaxial* trong khi H-7' ở vị trí *pseudoequatorial*. Điều này cũng phù hợp với tương tác giữa H-7 với H-8' trên phổ NOESY. Cấu hình tuyệt đối sau đó đã được thiết lập nhờ phân tích phổ CD (Circular dichroism). Theo các tài liệu đã công bố trước đây, các hợp chất aryl-tetralin lignan có hiệu ứng Cotton dương nằm trong khoảng 290-299 nm thì cấu hình của carbon tại C-7' là *R*, ngược lại nếu hợp chất có hiệu ứng Cotton âm nằm trong khoảng 292-299 nm thì cấu hình của carbon tại C-7' là *S* [49], [77]. Phổ CD của hợp chất cleistantoxin thu được cho hiệu ứng Cotton dương tại 297 nm ($\Delta\epsilon: +2,17$), cho phép kết luận cấu hình *R* của carbon C-7'. Dựa vào cấu hình tương đối nêu trên, cấu hình *R* được xác định cho các trung tâm bất đối còn lại C-7, C-8 và C-8'. Các dữ liệu phổ của chất thu được trùng khớp với dữ liệu phổ của hợp chất cleistantoxin phân lập từ loài *C. indochinensis*, cho phép xác định chất phân lập được chính là hợp chất (7*R*,8*R*,7'*R*,8'*R*)-7-hydroxy-6-methoxy-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7'-cyclo lignan-9',9'-olide có tên là cleistantoxin [82]

Đây là *đóng góp mới của luận án* đã phân lập, tinh chế lượng lớn chất cleistantoxin (4,025 g) có độ tinh khiết rất cao (99,9%) so với nghiên cứu thành phần hoá học trước đây [82]. Quy trình phân lập, tinh chế đơn giản và ổn định. Kết quả có tính thực tiễn, vì có thể áp dụng quy trình này để phân lập, tinh chế cleistantoxin làm NLTLC ở các lô khác có qui mô lớn hơn.

Bên cạnh đó, có thể áp dụng qui trình này để phân lập, tinh chế cleistantoxin làm nguyên liệu hoá dược và nguyên liệu bán tổng hợp hoá dược đang được nghiên cứu phát triển thuốc mới. Tuy nhiên, cần khảo sát các hệ dung môi kết tinh khác ít độc tính hơn phù hợp cho nguyên liệu làm thuốc.

4.1.3. Phân lập, tinh chế, khẳng định cấu trúc cleisindoside D làm NTLCC gốc định lượng

Cần tiếp tục phân lập cleisindoside D vì trong cần D có hàm lượng cleisindoside D khoảng 38% còn chứa rất nhiều tạp chất và chất màu. Dựa trên độ tan của cleisindoside D tan tốt trong CH_2Cl_2 và MeOH (Bảng 3.22), cần D được phân lập trên cột silica gel với hệ dung môi CH_2Cl_2 :MeOH (90:10) thu các PD chứa cleisindoside D thu được cần E có hàm lượng cleisindoside D là 85,8%. Quá trình phân lập cần D trên cột silica gel đã loại rất nhiều tạp chất, nên trên SKĐ cần E còn thấy xuất hiện rất nhiều tạp chất (Hình 3.8).

Để tinh chế cleisindoside D từ cần E, luận án đã lựa chọn sắc kí rây phân tử hạt sephadex LH-20 với hệ dung môi MeOH 100% vì cleisindoside D là glycoside của cleistantoxin được gắn thêm 1 phân tử đường sẽ tách các glycoside khác gắn thêm 2, 3 phân tử đường (phân tử lượng tăng thêm gần 200 Da/1 phân tử đường). Cần F thu được có độ tinh khiết SK của cleisindoside D là 94,0% (Hình 3.9) và vẫn có màu vàng chưa đủ điều kiện làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn.

Để tinh chế cleisindoside D, nếu lựa chọn phương pháp kết tinh thì các glycoside khác có cấu trúc và độ tan gần giống với cleisindoside D sẽ kết tinh cùng làm giảm độ tinh khiết của cleisindoside D. Qua tham khảo tài liệu khi tinh chế các glycoside nhiều tác giả đã lựa chọn sắc kí pha đảo. Vì vậy, luận án đã khảo sát và lựa chọn cột C18 với hệ dung môi aceton- H_2O (2-8) loại bỏ các glycoside khác, thu được các PD chứa chất cleisindoside D. Sau đó, mới kết tinh lại bằng hệ CH_2Cl_2 : *n*-butanol có độ tinh khiết SK của cleisindoside D 97,6%.

Hợp chất phân lập được dưới dạng chất bột màu trắng, điểm nóng chảy 261-262°C, $[\alpha]_D^{20}$ - 188,0 (*c*, 0,5; MeOH). Phổ khối phân giải cao HRESI-MS cho pic ion giả phân tử ở m/z 583,1409 $[\text{M}^+\text{Na}]^+$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất phân lập được rất giống với hợp chất cleistantoxin, chỉ khác là có thêm tín hiệu của 1 đường glucose. Phần đường được xác định là β -glucopyranose nhờ phân tích hằng số tương tác proton $J = 7,5$ Hz của proton anome. Giống như cleistantoxin, phổ COSY cho phép xác định 2 chuỗi tương tác spin-spin giữa H-5'/H-6' và H-7'/H-8'/H-8, H-7/H-8/ CH_2 -9, ngoài ra còn có chuỗi tương tác giữa các proton của phân tử đường. Nhóm methoxy gắn với C-6 được

xác định nhờ tương tác HMBC giữa proton của nhóm methoxy với C-6. Vị trí của đường β -glucopyranose được xác định gắn với C-7 dựa vào tương tác giữa H-1'' với C-7. Proton H-7 cho 1 hằng số tương tác *anti* với H-8 ($J = 9.5$ Hz) cho phép xác định H-7 có mối tương quan *pseudodioxial* với H-8. Ngoài ra, H-8' có 1 tương tác kiểu *gauche* ($J = 4.0$ Hz) và 1 tương tác kiểu *anti* ($J = 14.5$ Hz) cho phép xác định H-8' chiếm giữ vị trí *pseudoaxial* trong khi H-7' ở vị trí *pseudoequatorial*. Hợp chất phân lập được chính là 6-methoxy-7-(β -D-glucopyranosyloxy)-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7'-cyclo lignan-9',9'-olide (cleisindoside D), hợp chất này đã được phân lập từ quả cây Cách hoa đồng dương (*C. indochinensis*) [83].

Quy trình phân lập, tinh chế cleisindoside D khá công phu và là ***đóng góp hoàn toàn mới của luận án*** đã phân lập, tinh chế cleisindoside D với lượng lớn (3,6562 g) có độ tinh khiết SK 97,6% so với nghiên cứu thành phần hoá học trước đó. Đặc biệt, luận án đã xây dựng thêm bước tinh chế cleisindoside D bằng sắc kí pha đảo trước khi kết tinh đã loại được các glycoside khác [83]. Trên SKD xác định độ tinh khiết của cleisindoside D thấy rất ít tạp chất liên quan (Hình 3.42). Tuy nhiên, trong bước tinh chế này có sử dụng hệ dung môi aceton-H₂O, để loại dung môi đã sử dụng cô quay chân không duy trì ở nhiệt độ thấp khoảng 70°C để không ảnh hưởng đến chất chuẩn cleisindoside D. Nhưng ở nhiệt độ này vẫn tạo ra tạp chất phân hủy cleisindoside A (1,8%) và chưa loại được hoàn toàn nước, nên độ ẩm của chất chuẩn cleisindoside D còn khá lớn khoảng 3,5%.

Để cải thiện quy trình tinh chế nên sử dụng thiết bị đông khô, sau đó sấy chân không dưới áp suất giảm ở 60°C trong 48 giờ để loại được tối đa lượng nước và không tạo ra tạp chất phân hủy bởi nhiệt độ là cleisindoside A. Áp dụng quy trình cải thiện cho các lô khác có qui mô lớn hơn để phân lập, tinh chế cleisindoside D làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn, nguyên liệu hoá dược và nguyên liệu bán tổng hợp hoá dược đang nghiên cứu phát triển thuốc mới.

4.1.4. Kháng định cấu trúc cleisindoside A làm NTLCC định tính

Trong quá trình tinh chế cleisindoside D trên cột C18, tách riêng được vài lọ kết tinh dưới dạng chất rắn màu trắng, điểm nóng chảy 261-262°C, $[\alpha]_D^{20} - 50,0$ (*c*, 0,3; MeOH). Phổ HRESI-MS của hợp chất cho pic ion giả phân tử ở *m/z* 529,1416 [M-H]⁻. Phổ ¹H-NMR và của ¹³C-NMR của hợp chất phân lập được gần giống với hợp chất cleisindoside D, chỉ thấy mất đi tín hiệu của 1 nhóm methoxy và 1 carbon bậc 4, thay vào đó là tín hiệu của 1 nhóm methin sp². Giống như hợp chất cleisindoside D, phần đường được xác định là β -glucopyranose nhờ phân tích hằng số tương tác proton của

proton anome. Trên phổ HMBC cho thấy tương tác của proton anomeric H-1'' ở δ_H 4,26 với C-7 ở δ_C 71,6 chứng tỏ phần đường được liên kết với C-7. Từ các dữ liệu phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, COSY, HSQC, HMBC cho phép xác định cấu trúc phẳng của hợp chất. Giống như hợp chất cleisindoside D, hợp chất này có 4 carbon bất đối ở C-7, C-8, C-7' và C-8'. Tuy nhiên, khi phân tích hằng số tương tác và phổ NOESY cho thấy có sự khác nhau về cấu hình của 4 carbon bất đối này so với cleisindoside D. Trên phổ 1H NMR hợp chất có tín hiệu của H-7 được quan sát thấy như một doublet với giá trị hằng số tương tác *gauche* ($J = 3,0$ Hz). Trong khi đó, H-8' thể hiện 1 hằng số tương tác lớn ($J = 14,5$ Hz) và 1 hằng số tương tác nhỏ ($J = 5,5$ Hz) và H-7' xuất hiện như 1 doublet với 2 hằng số tương tác nhỏ ($J = 5,5$ Hz), chứng tỏ cả H-8 và H-8' đều ở vị trí *axial*, còn H-7' chiếm giữ vị trí *equatorial*. Các phân tích này cho thấy cấu hình của C-7', C-8' và C-8 tương tự như hợp chất của **cleisindoside D**, trong khi cấu hình của C-7 bị đảo ngược. Kết hợp các dữ liệu phổ HRESI-MS, 1D, 2D-NMR và so sánh với tài liệu tham khảo, hợp chất này được xác định là hợp chất phân lập được là **cleisindoside A** [83].

Cleisindoside A phân lập được với lượng 548,1 mg đủ lượng làm nguyên liệu thiết lập chuẩn định tính. Luận án đóng ống nguyên liệu trong lọ thủy tinh trung tính, màu nâu 10 ml để tiếp tục phân lập, tinh chế cleisindoside A lô khác với lượng lớn hơn để nghiên cứu thiết lập chuẩn gốc định lượng cleisindoside A.

Đối với chất neo-cleistantoxin phân lập với lượng khá nhỏ (khoảng 70 mg) không đủ để làm chất chuẩn định tính. Cần phân lập lượng lớn hơn từ các nguồn dược liệu khác để có thể thiết lập chất chuẩn trong các nghiên cứu tiếp theo.

4.1.5. Phân lập, tinh chế và xác định cấu trúc các chất tinh khiết mới từ quả Chà chôi.

Trong quá trình phân lập, tinh chế cleistantoxin, cleisindoside D làm NLTLC gốc định lượng, luận án đã phân lập, tinh chế được 8 chất mới **CT1, CT2, CT3, CT4, CT5, CT6, CT7, CT8**. Tiến hành đo phổ NMR, HRESI-MS, IR, UV-VIS, CD... cho thấy các hợp chất này đều thuộc lớp chất aryl-tetralin lignan, đây là lớp chất thường thấy trong các loài thuộc chi *Cleistanthus*. Các hợp chất này có cấu trúc đa dạng, dạng aglycon hoặc glycoside có thêm 1 đến 2 phân tử đường. Các hợp chất **CT3, CT4, CT8** không chứa các carbon bất đối, tuy nhiên 5 hợp chất mới còn lại đều chứa carbon bất đối. Việc xác định cấu hình của các carbon bất đối được thực hiện nhờ các phương pháp phổ NMR, phổ CD. Đặc biệt là đã áp dụng phương pháp tính toán lượng tử hóa học điện từ lưỡng sắc tròn (ECD - Electronic Circular Dichroism) dựa trên phần mềm

Gaussian 09 cho việc xác định cấu hình tuyệt đối của 3 hợp chất **CT1**, **CT5** và **CT7**. Đây là các phương pháp hiện đại trên thế giới và được đánh giá là có độ tin cậy cao, chính xác và khoa học. Hợp chất **CT1** có 2 carbon bất đối ở vị trí C-7 và C-8, việc tính toán lý thuyết cho 2 đồng phân (7*S*,8*R*)-**CT1** và (7*R*,8*S*)-**CT1** cho phép xác định cấu hình 7*S*,8*R* của hợp chất **CT1** phù hợp với mô hình tính toán. Hợp chất **CT5** có 3 carbon bất đối, từ các dữ liệu phổ 1D và 2D-NMR cho phép giả thiết 4 dạng cấu hình của hợp chất **CT5** là 7*R*,8*S*,8'*R*, 7*R*,8*R*,8'*S*, 7*S*,8*R*,8'*S* và 7*S*,8*S*,8'*R*. Sau khi tính toán lý thuyết cho 4 đồng phân trên cho phép xác định cấu hình tuyệt đối 7*R*,8*S*,8'*R* của hợp chất **CT5** phù hợp với mô hình tính toán. Giống như hợp chất **CT1**, hợp chất **CT7** có 2 carbon bất đối C-7 và C-8. Phân tích các hằng số tương tác và phổ NOESY của **CT7** cho thấy hợp chất **CT7** có cấu trúc lập thể tương đồng với **CT1**. Cấu hình tuyệt đối tại vị trí C-7 và C-8 của hợp chất **CT7** được xác định dựa vào phương pháp tính toán lượng tử hóa học điện từ lưỡng sắc tròn (ECD-Electronic Circular Dichroism) dựa trên phần mềm Gaussian 09. Tính toán lý thuyết cho 2 đồng phân (7*S*,8*R*)-**CT7** và (7*R*,8*S*)-**CT7** cho phép xác định cấu hình 7*S*,8*R* của hợp chất **CT7** phù hợp với mô hình tính toán giống như hợp chất **CT1**. Đây là các kết quả rất thú vị, vì cho đến nay chưa có nhiều công trình công bố về việc xác định cấu hình tuyệt đối của các hợp chất aryltetralin lignan bằng phương pháp toán lượng tử hóa học điện từ lưỡng sắc tròn (ECD-Electronic Circular Dichroism) dựa trên phần mềm Gaussian 09.

*Luận án là công trình đầu tiên công bố về thành phần hóa học của quả Chà chôi đã phân lập và xác định được cấu trúc 8 chất mới là: 7',8'-dehydrocleistantoxin (**CT1**), cleistonkiside A (**CT2**), cleistonkinin A (**CT3**), cleistonkinin B (**CT4**), cleistonkiside B (**CT5**), cleistonkinin (**CT6**), cleistonkinin E (**CT7**), cleistonkinin C (**CT8**). Các kết quả này góp phần làm giàu thêm cơ sở dữ liệu về các hợp chất thiên nhiên từ thực vật Việt Nam.*

Trong 8 chất mới phân lập được thì, nổi bật là chất **CT1** (7',8'-**dehydrocleistantoxin**) được phân lập với lượng chất lớn nhất khoảng 500 mg, nên được sử dụng làm chất chuẩn định tính. Phân xác định cấu trúc của chất mới **CT1** này là rất quan trọng để xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng cho nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính 7',8'-**dehydrocleistantoxin**.

Hợp chất **CT1** được phân lập dưới dạng bột màu trắng, điểm nóng chảy 328-330°C, $[\alpha]_D^{20}$: +88,1 (*c* 0,042, CHCl₃). Phổ khối phân giải cao HRESI-MS cho pic ion giả phân tử ở *m/z* 419,0749 [M+Na]⁺. Phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR của **CT1** rất giống với hợp chất **cleistantoxin**, chỉ khác thấy mất đi tín hiệu của 2 nhóm methine sp³, thay

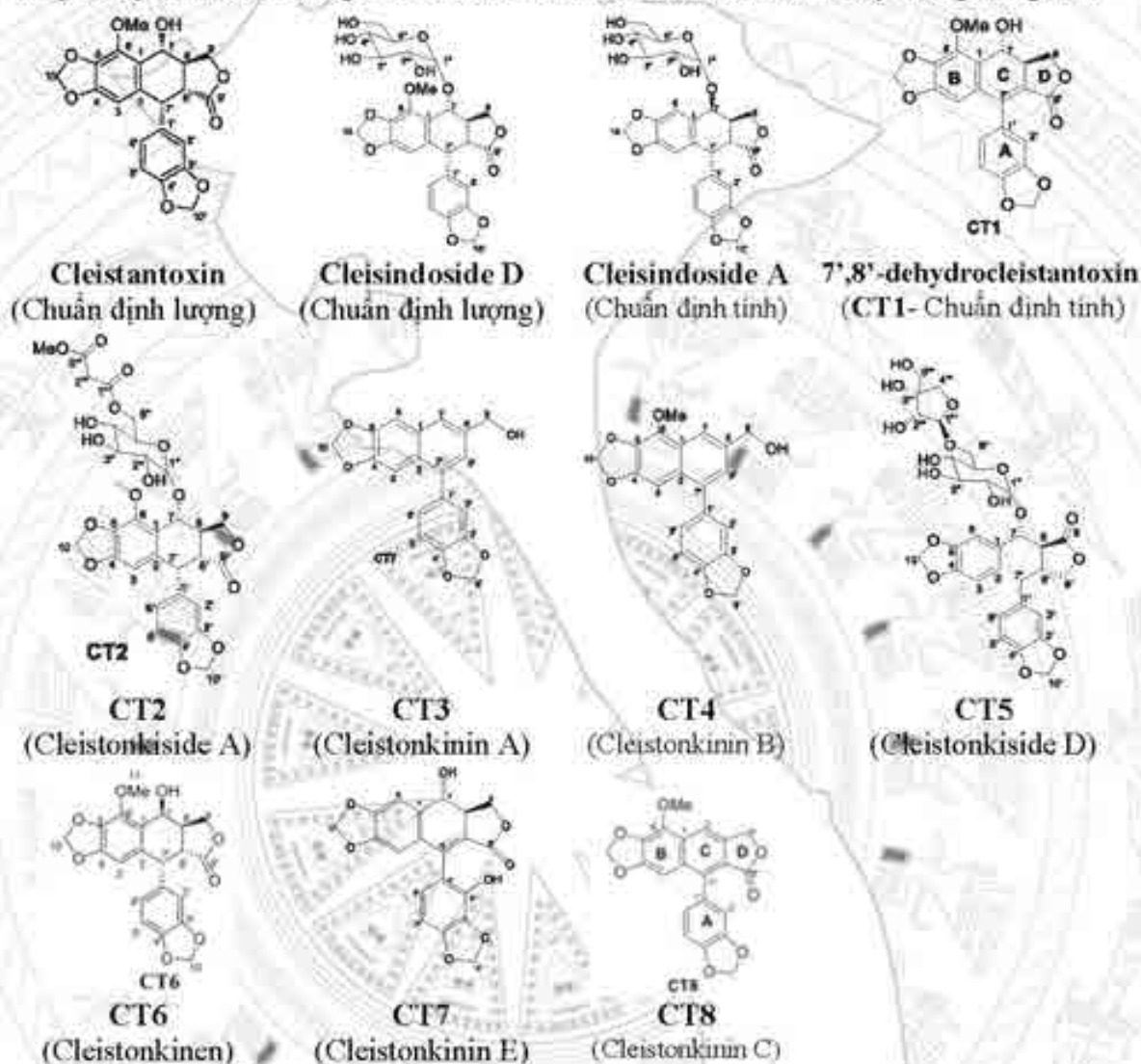
vào đó là tín hiệu của 2 carbon sp^2 không liên kết trực tiếp với hydro. Từ các dữ kiện phổ cho phép dự kiến hợp chất **CT1** có thêm 1 nối đôi tại vòng C so với hợp chất **cleistantoxin**. Phổ COSY cho phép xác định 2 chuỗi tương tác spin-spin là H-7 (δ_H 5,12)/ H-8 (δ_H 3,38)/CH₂-9 (δ_H 4,12 và 4,64) và H-5' (δ_H 6,87)/ H-6' (δ_H 6,59) (Hình 3.19). Phân tích phổ HMBC cho phép xác định vị trí của nối đôi giữa C-7' và C-8' dựa vào tương tác giữa H-6' với C-7' và proton của nhóm CH₂-9 với C-7/C-8/C-8'/C-9'. Tương tự như hợp chất **cleistantoxin**, vị trí nhóm methoxy được xác định gắn ở vị trí C-6 dựa vào tương tác giữa proton của nhóm methoxy với carbon C-6. Từ các dữ liệu phổ trên cho phép xác định cấu hình phẳng của hợp chất **CT1**. Tuy nhiên, hợp chất này có 2 carbon bất đối ở vị trí C-7 và C-8, chính vì vậy cần phải xác định cấu hình cho 2 carbon C-7 và C-8. Cấu hình tương đối của **CT1** được xác định nhờ phân tích hằng số tương tác và phổ NOESY, proton H-7 cho 1 hằng số tương tác *anti* ($J = 13,5$ Hz), chứng tỏ H-7 có mối tương quan *trans*-pseudodiaxial với H-8. Điều này được khẳng định trên phổ NOESY khi xuất hiện tương tác giữa H-7 (δ_H 5,12) và H_b-9 (δ_H 4,12). Cấu hình tuyệt đối tại vị trí C-7 và C-8 của hợp chất **CT1** được xác định dựa vào phương pháp tính toán lượng tử hóa học điện từ lưỡng sắc tròn (ECD - Electronic Circular Dichroism) dựa trên phần mềm Gaussian 09. Tính toán lý thuyết cho 2 đồng phân (7*S*,8*R*)-**CT1** và (7*R*,8*S*)-**CT1** cho phép xác định cấu hình 7*S*,8*R* của hợp chất **CT1** phù hợp với mô hình tính toán. Chất **CT1** được đặt tên là 7',8'-**dehydrocleistantoxin**.

Vì đây là hợp chất mới 7',8'-dehydrocleistantoxin chỉ có trong quả cây Chà chôi với lượng chất thu được khoảng 500 mg (Hình 3.7). Nên chất 7',8'-dehydrocleistantoxin được dùng làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính để phân biệt quả cây Chà chôi với các loài khác trong chi. Cần tiếp tục nghiên cứu phân lập, tinh chế 7',8'-dehydrocleistantoxin ở lô lớn hơn và tinh chế để có độ tinh khiết cao hơn để thiết lập chất chuẩn định lượng. Luận án *đóng góp bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn định tính mới 7',8'-dehydrocleistantoxin* từ 1 chất tinh khiết mới phân lập được từ tự nhiên.

TÓM LẠI

Đã phân lập, tinh chế được 2 chất **cleistantoxin** và **cleisindoside D** làm nguyên liệu chất chuẩn gốc định lượng, 2 chất **cleisindoside A** và 7',8'-**dehydrocleistantoxin**

(CT1) làm nguyên liệu chất chuẩn định tính và 8 chất mới từ CT1-CT8 phân lập được từ quả cây Chà chôi, công thức cấu tạo của các chất được trình bày trong bảng 4.1.



Hình 4.1. Công thức cấu tạo của các chất chuẩn và chất mới phân lập được từ quả Chà chôi

4.2. THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN GỐC

4.2.1. Thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D

Trong quá trình thiết lập chất chuẩn gốc theo hướng dẫn của ISO GUIDE 35, sau khi chuẩn bị nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc, cần xây dựng tiêu chuẩn để đánh giá chất lượng nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D. Theo hướng dẫn của IP, USP và WHO [22], [86], [91], [94], luận án đã xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho chất chuẩn gốc định lượng bao gồm: bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn gốc như tính chất, nhiệt độ nóng chảy, góc quay cực riêng, bộ phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HR-MS, IR và UV-VIS và xác định độ tinh khiết (hàm lượng) của chất chuẩn gốc

bằng phương pháp cân bằng khối lượng, được tinh qua độ tinh khiết sắc kí và hàm lượng TCLQ trong cleistantoxin/cleisindoside D bằng HPLC/DAD, hàm lượng tạp chất bay hơi và tạp chất vô cơ (Hình 2.5).

4.2.1.1. Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D

Khi thiết lập chất chuẩn gốc theo hướng dẫn của IP, WHO, USP [22], [86], [91], [94] thì xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn gốc có vai trò rất quan trọng (Hình 2.5). Từ kết quả khẳng định cấu trúc các chất cleistantoxin và cleisindoside D bằng 1D-NMR, 2D-NMR, HRESI-MS, IR, UV-VIS, CD... cho thấy bộ phổ của 2 chất phân lập được trùng với bộ dữ liệu đã công bố của 2 chất cleistantoxin và cleisindoside D [82], [83]. Từ đó, xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D gồm: tinh chất, nhiệt độ nóng chảy, góc quay cực riêng, bộ phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRESI-MS, IR và UV-VIS dựa trên các tài liệu đã công bố [82], [83] và các kết quả thực nghiệm của luận án (Phụ lục 1.3 và 1.4).

Khi thử góc quay cực riêng theo phụ lục 6.4 ĐĐVN V, từ các kết quả thực nghiệm đưa ra giới hạn cho phép của chỉ tiêu góc quay cực riêng $[\alpha]_{\text{D}}^{20}$ của chất chuẩn cleistantoxin là $-130,0^\circ$ đến $-135,0^\circ$ và chất chuẩn cleisindoside D là $-150,0^\circ$ đến $-157,0^\circ$ (Bảng 3.6) lệch so với tài liệu đã được công bố $[\alpha]_{\text{D}}^{30}$ là $-148,0^\circ$ [82] và $-188,0^\circ$ [83]. Do luận án thực hiện theo hướng dẫn của ĐĐVN V-phụ lục 6.4 góc quay cực riêng được đo ở nhiệt độ 20°C , trong khi đó TLTK đo ở 30°C và chất chuẩn có độ tinh khiết cao hơn so với chất tinh khiết đã được công bố trước đó.

Khi xây dựng chỉ tiêu và phương pháp thử nhiệt độ nóng chảy và độ tinh khiết DSC của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D bằng kỹ thuật quét nhiệt vi sai theo chương trình gia nhiệt (Bảng 3.7). Từ kết quả thu được đưa ra giới hạn cho phép của nhiệt độ nóng chảy của 2 chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D lần lượt là $199-202^\circ\text{C}$ và $225-228^\circ\text{C}$ và độ tinh khiết DSC là không nhỏ hơn $99,0\%$ và $95,0\%$ (Bảng 3.8).

Từ bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D đã xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin kết quả trình bày ở mục 3.2.1.3, bảng 3.21 và cleisindoside D (Bảng 3.22 và phụ lục 2.9).

4.2.1.2. Xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết của chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D

❖ *Xây dựng và thẩm định phương pháp xác định hàm lượng TCLQ trong chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D bằng HPLC/DAD*

Hoạt chất cleistantoxin và cleisindoside D là hai hoạt chất mới chưa có nghiên cứu nào xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí và định lượng các TCLQ của cleistantoxin và cleisindoside D bằng HPLC/DAD.

Dựa trên cấu trúc hoá học và độ tan của chất nghiên cứu, sắc kí phân bố pha đảo được lựa chọn phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm là: cột phenyl (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) và cột C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) và nhiều hệ pha động (mục 3.3.1.2) và chương trình gradient 1 (Bảng 3.11) từ tỉ lệ dung môi ACN: H₂O (1:99) đến ACN: H₂O (99:1) có ưu điểm tách hoàn toàn được các TCLQ khỏi hai chất này.

Qua kết quả khảo sát cho thấy tất cả các chương trình SK đều phát hiện và định lượng được 5 TCLQ trong cleistantoxin và độ tinh khiết SK của cleistantoxin 99,9% (Phụ lục 2.1), 3 TCLQ trong cleisindoside D và độ tinh khiết SK của cleisindoside D 97,6% (Phụ lục 2.2), như vậy có thể thấy trong chất chuẩn cleistantoxin chỉ có 5 TCLQ và cleisindoside D có 3 TCLQ.

Luận án đã lựa chọn cột C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) và hệ pha động ACN-H₂O để xác định hàm lượng TCLQ trong cleistantoxin và cleisindoside D bằng HPLC/DAD, vì cột C18 thông dụng tại các PKN và pha động là ACN-H₂O ít độc và đỡ tốn kém, đơn giản hơn khi phân tích mà vẫn đảm bảo tách hoàn toàn các TCLQ khỏi hoạt chất cleistantoxin và cleisindoside D như các điều kiện sắc kí khác.

Luận án đã tham khảo ĐKSK xác định hàm lượng TCLQ của etoposid là thuốc điều trị ung thư có cấu trúc gần tương tự với cleistantoxin và cleisindoside D. Trong USP 40 sử dụng ĐKSK là: cột phenyl (3,9 x 300 mm, <5 μ m) và hệ pha động gồm ACN và dung dịch đệm acetat pH 4,0 [84], thì cột phenyl ít thông dụng và khi triển khai với pha động đệm acetat thì nhiễu đường nên nên khó phát hiện và định lượng được TCLQ trong cleistantoxin. ĐKSK của BP 2018 sử dụng cột C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μ m) với hệ pha động phối hợp giữa pha động A: Acid formic: triethylamin: ACN (1, 1, 998) và pha động B: Acid formic: triethylamin: nước (1, 1, 998) [19] thì cột C18 thông dụng nhưng pha động có acid formic và triethylamin tồn dung môi hoá chất, chuẩn bị chạy SK và rửa cột phức tạp hơn (Phụ lục 2.1).

Tuy nhiên, khi triển khai chương trình gradient 1 (Bảng 3.11) để đảm bảo tách hoàn toàn các tạp chất khỏi cleistantoxin, nhưng thời gian phân tích khá dài khoảng 36 phút, nên luận án đã tối ưu được chương trình gradient 2 (Bảng 3.12) có thời gian lưu của cleistantoxin khoảng 20 phút và thời gian phân tích tiến hành chạy gấp 3 thời gian lưu để xác định được hết TCLQ có trong cleistantoxin.

Lựa chọn bước sóng phát hiện, quét phổ UV-VIS của cleistantoxin, cleisindoside D và các TCLQ có phổ hấp thụ giống nhau và có 2 đỉnh cực đại là 203 và 286 nm (Hình 3.35 và 3.36), nên đã khảo sát 2 bước sóng này làm bước sóng phát hiện. Tuy nhiên, khi phát hiện và định lượng TCLQ tại cả 2 bước sóng này đều có độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin là 99,9% và cleisindoside D là 97,6%, nhưng khi lựa chọn bước sóng 203 nm là bước sóng thấp nên gần với cut-off của dung môi, nên mẫu khi chạy gradient hay xuất hiện pic dung môi gây khó khăn cho phát hiện và định lượng TCLQ. Vì vậy, bước sóng 286 nm được lựa chọn (Phụ lục 2.1 và 2.2).

Một điểm nổi bật của luận án là nghiên cứu từ phân lập nên xác định được các chất phân lập gần với chất nghiên cứu và sử dụng chất này để đánh giá khả năng tách của cleistantoxin và cleisindoside D khỏi các TCLQ với chương trình SK được lựa chọn. Đối với hoạt chất cleistantoxin sử dụng 2 chất cleistonkinen (CT6) và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1), vì khi phân lập hoạt chất cleistantoxin, tìm thấy 2 chất cleistonkinen (CT6) và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) được rửa giải ngay trước và sau cleistantoxin. Trên SKĐ của dung dịch có chứa 3 chất trên, pic cleistantoxin tách hoàn toàn khỏi các pic cleistonkinen (CT6) và 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) với độ phân giải R_s lần lượt là 4,28 và 1,68 ($R_s \geq 1,5$). Kết quả này, có thể xác định được chương trình SK đã xây dựng tách hoàn toàn cleistantoxin khỏi các TCLQ.

Tuy nhiên, do chất cleistonkinen (CT6) tách khá xa so với pic cleistantoxin với R_s là 4,28 và lượng chất phân lập được khá ít khoảng 35 mg, nên không đủ để làm chất chuẩn phân giải. Chất 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) tách khá gần so với pic cleistantoxin với R_s là 1,68 và lượng chất phân lập được khá lớn khoảng 500 mg. Vì vậy, chất 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1) sử dụng làm chất chuẩn phân giải và lựa chọn dung dịch phân giải là cleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ và 7',8'-dehydrocleistantoxin 50 $\mu\text{g/ml}$ để đánh giá khả năng tách của chương trình SK và đánh giá độ phù hợp của hệ thống SK.

Tương tự như vậy, đã sử dụng chất cleisindoside A làm chuẩn phân giải khi xác định độ tinh khiết SK của chất chuẩn gốc định lượng cleisindoside D và chọn dung dịch phân giải là cleisindoside A 50 $\mu\text{g/ml}$ và cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí và hàm lượng TCLQ bằng HPLC/DAD của chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D đã xây dựng là đóng góp mới của luận án. Phương pháp được xây dựng khoa học, công phu, khảo sát trên nhiều cột pha đảo và hệ dung môi pha động kết quả của luận án so với các tài liệu tham khảo là trùng lặp [19], [84]. Phương pháp đã xây dựng được thẩm định đầy đủ các chỉ tiêu theo hướng dẫn ICH Q2B: độ đặc hiệu, giới hạn định lượng (LOQ), đường chuẩn, độ lặp lại, độ chính xác trung gian.

- Độ phù hợp hệ thống sắc kí

Tiêm SK dung dịch phân giải đã xác định ở phần xây dựng phương pháp định lượng tạp chất liên quan của cleistantoxin và cleisindoside D để đánh giá độ phù hợp của hệ thống sắc kí.

Do giới hạn tổng TCLQ của cleistantoxin là 0,5% và của cleisindoside D là 5,0%, nên dung dịch cleistantoxin 5 µg/ml và cleisindoside D 50 µg/ml được lựa chọn để tiêm lặp lại 6 lần khi xác định độ ổn định của hệ thống SK ở khoảng nồng độ định lượng TCLQ. Tiến hành pha dung dịch cleistantoxin 5 µg/ml và cleisindoside D 50 µg/ml từ lượng chuẩn thứ 2 để tính hệ số tương đồng.

- Độ đặc hiệu

Khi thẩm định độ đặc hiệu đã tiến hành SK mẫu trắng, dung dịch chuẩn đơn, dung dịch phân giải, dung dịch thử và dung dịch thử phân hủy ở các điều kiện khác nhau để kiểm tra cho thấy các TCLQ và TCPH đã tách được hoàn toàn khỏi cleistantoxin và cleisindoside D trong DKSK đã xây dựng theo đúng hướng dẫn của ICH, cho thấy phương pháp đã xây dựng có độ đặc hiệu cao.

Khi đánh giá độ đặc hiệu phương pháp xác định độ tinh khiết SK của cleistantoxin, tiến hành SK dung dịch thử cleistantoxin 1000 µg/ml phân hủy bằng H₂SO₄ 0,1N sau 15 phút và NaOH 0,1N sau 15 phút, thấy xuất hiện 1 số TCPH, nhưng các TCPH tách hoàn toàn khỏi cleistantoxin với Rs=2,45 và 3,61. Hệ số tinh khiết (purity factor) của pic cleistantoxin còn lại khi phân hủy ở 2 môi trường lần lượt là 997 và 999,93. Tạp chất phân hủy (thời gian lưu 19,242') ở môi trường acid và 1 TCPH (19,003') ở môi trường kiềm tách khỏi cleistantoxin với Rs=2,45 (xem phụ lục 2.3), tạp này có thời gian lưu gần với thời gian lưu của chất cleistonkinen (CT6) (t_R = 19,290'). Tiến hành chồng phổ của pic tạp chất này với chất tinh khiết cleistonkinen (CT6) phân lập được cho hệ số match là 999. Vì vậy, chất cleistonkinen (CT6) có thể là TCPH của cleistantoxin trong môi trường acid và môi trường kiềm. Cần tiếp tục nghiên cứu để khẳng định cleistonkinen (CT6) là TCPH của cleistantoxin trong 2 môi trường trên (Phụ lục 2.3).

Khi thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp thấy chất cleistantoxin tương đối bền với tia UV, nhiệt độ và môi trường H₂O₂ 30%, nhưng phân hủy trong môi trường acid và kiềm đặc biệt là môi trường kiềm phân hủy rất nhanh thành TCPH tách hoàn toàn khỏi cleistantoxin với Rs là 2,45 > 1,5, đặc biệt TCPH này có thời gian lưu và phổ trùng với cleistonkinen (CT6) là một chất phân lập được trong quả cây rất ít. Vì vậy, cần đóng ống chất chuẩn cleistantoxin trong ống thủy tinh trung tính. Trong quá trình kiểm soát độ ổn định của chất chuẩn chưa thấy hàm lượng tạp chất phân hủy này tăng lên trong thời gian bảo quản 18 tháng.

Khi đánh giá độ đặc hiệu của phương pháp xác định độ tinh khiết SK của cleisindoside D, tiến hành đun cách thủy dung dịch cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$ ở 80°C sau 2 giờ và phân hủy bằng NaOH 0,1N/15 phút, xuất hiện thêm các tạp phân hủy nhưng các tạp này tách khỏi cleisindoside D với $R_s > 1,5$ (xem phụ lục 2.4). Đặc biệt 1 tạp phân hủy có thời gian lưu tương đối so với cleisindoside D là 0,9, trùng với có thời gian lưu tương đối 0,89 của chất cleisindoside A. Tiến hành chồng phổ của TCPH này với phổ của chất chuẩn cleisindoside A cho hệ số match 999,971. Vậy tạp 1 có trong chất chuẩn cleisindoside D là TCPH bởi nhiệt độ trong quá trình cô quay chân không loại nước sau khi tinh chế cleisindoside D trên cột C18 với hệ dung môi pha động Aceton- H_2O vì kết quả này trùng với kết quả quá trình tinh chế trên cột pha đảo C18 đã hứng phân đoạn chứa TCPH này đem đo phổ $^1\text{H-NMR}$ trùng với phổ của chất cleisindoside A. Hàm lượng của tạp chất 1 (cleisindoside A) tăng không đáng kể từ 1,79% lên 3,75% khi đun cách thủy ở 80°C sau 2 giờ nhưng tăng mạnh lên 40,16% trong môi trường NaOH 0,1N (Phụ lục 2.4).

SKD dung dịch cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$ khi chiếu tia UV trong 24 giờ và phân hủy bởi H_2SO_4 0,1N trong 15 phút, xung quanh cleisindoside D vẫn chỉ xuất hiện 3 tạp chất và các tạp chất 1 và 2 đã tách hoàn toàn ra khỏi pic cleisindoside D với hệ số phân giải lần lượt là 5,06; 5,71 và 1,92; 2,10. Hệ số tinh khiết pic của cleisindoside D còn lại lớn hơn 999, cho thấy pic tinh khiết không lẫn tạp chất nào. Ngoài 3 pic tạp chất cơ bản, khi chiếu tia UV 254 nm dung dịch cleisindoside D 1000 $\mu\text{g/ml}$ xuất hiện thêm các pic tạp chất khác, trong đó tạp có thời gian lưu 35,10 phút sau khi chiếu UV/24 giờ và phân hủy bởi H_2SO_4 0,1N. Tiến hành chồng phổ của tạp chất này với chất chuẩn cleistantoxin cho thấy phổ của tạp chất này trùng khít với phổ của chất chuẩn cleistantoxin với hệ số match 999,971 và 999,68.

Cleisindoside D (glycosid) bị phân hủy bằng tia UV 254 nm và dung dịch acid sulfuric 0,1 N thành TCPH là cleistantoxin (aglycon) và cleisindoside D bị phân hủy thành tạp chất 1 là cleisindoside A khi đun cách thủy ở 80°C sau 2 giờ và phân hủy trong môi trường NaOH 0,1N. Từ kết quả nghiên cứu độ ổn định của cleisindoside D trong điều kiện khắc nghiệt, đề xuất đóng ống chất chuẩn cleisindoside D trong lọ thủy tinh trung tính, màu nâu và bảo quản tránh ánh sáng. Luận án đang nghiên cứu độ ổn định của ống chuẩn cleisindoside D được 12 tháng chưa thấy xuất hiện thêm TCPH nào khác kể cả cleistantoxin và hàm lượng tạp chất cleisindoside A vẫn ổn định chưa thấy tăng lên trong điều kiện đóng ống và bảo quản.

- Khoảng tuyến tính

Phương pháp xác định độ tinh khiết SK và TCLQ trong cleistantoxin và cleisindoside D được xây dựng bằng phương pháp chuẩn hoá điện tích, nên khoảng

tuyến tính được xây dựng từ hàm lượng tạp nhỏ nhất đến nồng độ dung dịch thử cleistantoxin và cleisindoside D 1000 µg/ml có tương quan chặt chẽ với diện tích pic cleistantoxin và cleisindoside D với hệ số tương quan $0,9997 > 0,999$.

Qua tổng quan tài liệu, không tìm thấy tài liệu hướng dẫn giới hạn hệ số chặn $Y\%$ cho định lượng TCLQ, nên luận án đã sử dụng phần mềm Excel để xác định giá trị $P=0,922$ và $0,622 > 0,05$ (Phụ lục 2.3 và 2.4), nghĩa là hệ số chặn (b) của đường chuẩn khác không không có ý nghĩa thống kê ở độ tin cậy 95%. Từ đó xác định được trong khoảng nồng độ tuyến tính được xây dựng từ hàm lượng tạp nhỏ nhất đến 1000 µg/ml, đường chuẩn không mắc sai số hệ thống.

- Độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Khi thẩm định độ lặp lại và độ chính xác trung gian đo hàm lượng tạp đơn của chất chuẩn cleistantoxin quá nhỏ khoảng 0,01%, khi xác định tạp đơn $< 0,1\%$ không yêu cầu tính RSD%. Vì vậy, luận án chỉ tiến hành xác định RSD% độ tinh khiết sắc kí của cleistantoxin kết quả cho RSD% $< 2,0\%$. Tham khảo hướng dẫn của AOAC 2016 [13] để đưa ra giới hạn cho phép RSD% của hàm lượng từng tạp chất liên quan phụ thuộc hàm lượng tạp chất có trong chất chuẩn cleisindoside D (Bảng 3.16).

- Độ đúng

Độ phương pháp được xây dựng để xác định độ tinh khiết của chất chuẩn gốc, nên không có chất chuẩn có độ tinh khiết xác định để thêm chuẩn vào nền mẫu hay mẫu tự tạo tính độ thu hồi của phương pháp. Vì vậy, độ đúng của phương pháp được xác định bằng cách mẫu chất chuẩn được gửi đến 3 PKN đạt GLP hoặc ISO-IEC 17025 để kiểm tra xem có mắc sai số hệ thống không. Đánh giá bằng test ANOVA 1 yếu tố, cho thấy kết quả phân tích trung bình của 3 PKN khác nhau không có ý nghĩa thống kê nghĩa ở mức tin cậy 95% (Bảng 3.24 và 3.25, phụ lục 2.8 và 2.12) khi xác định giá trị ấn định.

Từ các kết quả xây dựng và thẩm định phương pháp đưa ra giới hạn cho phép của tạp chất liên quan không được lớn hơn 0,5% đối với chất chuẩn gốc cleistantoxin và 5,0% chất chuẩn gốc cleisindoside D. Giới hạn cho phép về độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn gốc cleistantoxin không được nhỏ hơn 99,5% và chất chuẩn gốc cleisindoside D không được nhỏ hơn 95,0%.

❖ *Phương pháp xác định hàm lượng tạp chất bay hơi trong chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D bằng kỹ thuật phân tích nhiệt lượng (TGA).*

Theo hướng dẫn DDVN V- Phụ lục 9.6 tiến hành chỉ tiêu mất khối lượng do làm khô là đem sấy ở nhiệt độ 105°C trong vòng 4 giờ, để xác định tổng lượng tạp chất bay hơi nhưng lượng mẫu sử dụng khoảng 1g không phù hợp cho nguyên liệu thiết lập chất chuẩn. Luận án sử dụng kỹ thuật TGA để xác định tạp chất bay hơi theo hướng

dẫn của USP 40 [84], giảm lượng chất sử dụng (10-20 mg) và điều kiện phân tích trên kỹ thuật này giống với điều kiện phân tích bằng mất khối lượng do làm khô.

Tiến hành trên thiết bị TGA đặt chương trình ở nhiệt độ 105°C trong vòng 4 giờ, cho kết quả tổng tạp chất bay hơi của 2 chất chuẩn gốc cleistantoxin và cleisindoside D lần lượt là 0,56% và 3,50%. Từ đó đưa ra, giới hạn cho phép của tạp chất bay hơi không được lớn hơn 1,0% đối với chất chuẩn gốc cleistantoxin và 5,0% chất chuẩn gốc cleisindoside D (Bảng 3.19).

❖ *Phương pháp xác định hàm lượng tạp chất vô cơ trong chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D bằng phép thử tro sulfat*

Để định lượng tổng lượng tạp chất vô cơ, theo các hướng dẫn của IP, WHO và USP [22], [86], [91], [94] khi thiết lập chất chuẩn gốc sử dụng kỹ thuật tro sulfat (Sulfat Ash) hoặc cân sau nung (ROI) hoặc có thể sử dụng ICP/MS khi qui trình tổng hợp hay phân lập từ tự nhiên không sử dụng nhiều tác nhân vô cơ.

Nếu sử dụng ICP/MS chỉ định lượng đồng thời được các cation kim loại trong muối vô cơ, không xác định được hàm lượng ion kim loại nằm dưới dạng muối hữu cơ và các anion như: Cl^- , SO_4^{2-} , CO_3^{2-} , ... nên không định lượng được tổng tạp chất vô cơ. Nếu sử dụng phương pháp cân sau nung, dùng nhiệt độ 600°C để vô cơ hoá mẫu đến khối lượng không đổi, lượng cân còn lại là tổng tạp chất vô cơ. Tuy nhiên, nếu mẫu không được vô cơ hoá hết ở nhiệt độ 600°C, lượng cân thu được có thể mắc sai số. Vì vậy, sử dụng phương pháp tro sulfat dùng acid sulfuric để vô cơ hoá mẫu trước sau đó đem nung ở 800°C đến khối lượng không đổi, ở nhiệt độ này acid sulfuric đã phân huỷ hết thành SO_2 bay hơi, nên cân thu được là tổng tạp chất vô cơ. Tuy nhiên, khi xác định tạp chất vô cơ trong chất chuẩn gốc bằng phương pháp tro sulfat (Sulfat Ash) tồn một lượng mẫu khá lớn. Do quá trình thiết lập chất chuẩn gốc cleistantoxin và cleisindoside D đang ở giai đoạn nghiên cứu phát triển thuốc và chưa được thương mại hoá, nên luận án đã tiến hành xác định tạp chất vô cơ trong chất chuẩn gốc cleistantoxin và cleisindoside D bằng phương pháp tro sulfat.

Kết quả hàm lượng tổng tạp chất vô cơ trong cả 2 chất chuẩn gốc nhỏ khoảng 0,07%, cho thấy qui trình phân lập và tinh chế cleistantoxin và cleisindoside D tạo ra tạp chất vô cơ không đáng kể, chủ yếu có thể chỉ là các ion kim loại nặng có trong dung môi hữu cơ, nên các lần thiết lập chuẩn tiếp theo không cần làm lại phép thử này. Từ đó đưa ra, giới hạn cho phép của tạp chất vô cơ không được lớn hơn 0,1% (Bảng 3.20). Đây là giới hạn tro sulfat thường được qui định cho các nguyên liệu hoá dược trong các dược điển [19], [84], [86], [91], [94].

4.2.1.3. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D

Từ bộ dữ liệu nhận dạng và phương pháp xác định độ tinh khiết của chất chuẩn gốc bằng phương pháp cân bằng khối lượng đã xây dựng tiêu chuẩn cho nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D gồm yêu cầu kỹ thuật và phương pháp thử của đây đủ các chỉ tiêu: tính chất, nhiệt độ nóng chảy, góc quay cực riêng, bộ phổ IR và UV-VIS, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRESI-MS, độ tinh khiết sắc kí và hàm lượng TCLQ trong cleistantoxin/cleisindoside D bằng HPLC/DAD, hàm lượng tạp chất bay hơi và tạp chất vô cơ. Trong những bước đầu thiết lập chất chuẩn gốc, theo hướng dẫn của USP và IP nên đo phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HRESI-MS để nhận dạng được chính xác chất chuẩn gốc.

Tiêu chuẩn chất lượng của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin (Mục 3.2.1.3, bảng 3.21) và cleisindoside D (Bảng 3.22 và phụ lục 2.9) là **công bố hoàn toàn mới của luận án**. Tiêu chuẩn và nguyên liệu thiết lập chất chuẩn được gửi sang Viện kiểm nghiệm đánh giá chất lượng của NTLCC gốc cho thấy tiêu chuẩn chất lượng này có khả năng áp dụng thực tế để đánh giá chất lượng của NTLCC ở các lô tiếp theo. Áp dụng phương pháp thử cho nguyên liệu hoá dược và nguyên liệu bán tổng hợp hoá dược đang được nghiên cứu phát triển thuốc nhưng cần điều chỉnh yêu cầu kỹ thuật cho phù hợp.

Để xác định giá trị ấn định trên COA và nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn gốc chỉ cần đánh giá 2 chỉ tiêu: độ tinh khiết sắc kí, hàm lượng TCLQ bằng HPLC/DAD và hàm lượng tạp chất bay hơi bằng TGA trong cleistantoxin/cleisindoside D không cần xác định lại tạp chất vô cơ, vì tạp này không biến đổi theo thời gian.

4.2.1.4. Thiết lập chất chuẩn gốc định lượng

❖ Đánh giá độ đồng nhất quá trình đóng ống

Được thực hiện theo đúng hướng dẫn của ISO GUIDE 35 về lấy mẫu ngẫu nhiên có hệ thống (systematic randomized sample) để kiểm tra độ đồng nhất giữa các ống chuẩn. Số ống chuẩn được dùng để đánh giá độ đồng nhất là 10 ống chuẩn được lấy ngẫu nhiên có hệ thống chọn ống số 8 (cleistantoxin) là ống đầu tiên, khoảng cách giữa các ống là 10, mỗi ống được cân và phân tích 3 mẫu trên cùng phương pháp xác định độ tinh khiết của chất chuẩn đã xây dựng và thẩm định. Tính hàm lượng phần trăm nguyên trạng của mỗi lần tiêm mẫu. Lấy ống chuẩn số 8 làm đối chiếu với hàm lượng là 100% tính hàm lượng các ống khác bằng cách so sánh $F_{tn} < F$ bằng thi kết quả xác định hàm lượng cleistantoxin giữa các ống khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($P=0,05$) (Phụ lục 2.6).

Vì vậy, theo qui định ISO GUIDE 35, giữa các ống chất chuẩn trong cùng một lô chất chuẩn Cleistantoxin-01 có hàm lượng đồng nhất [44].

Tiến hành tương tự với ống chuẩn cleisindoside D (ống số 5 là ống đầu tiên)

❖ *Xác định giá trị ấn định của chất chuẩn gốc trên COA*

Sau khi đóng ống chuẩn, luận án sẽ xác định giá trị ấn định của chất chuẩn gốc trên nhãn bằng phương pháp cân bằng khối lượng theo hướng dẫn IP, WHO [22], [86], [91], [94]. Do đó, cần tiến hành xác định độ tinh khiết sắc kí bằng HPLC/DAD và hàm lượng tạp chất bay hơi bằng TGA tại 3 PKN đạt tiêu chuẩn GLP hoặc ISO, các kết quả được đánh giá bằng test ANOVA 1 yếu tố, cho thấy giá trị trung bình giữa 3 PKN khác nhau không có ý nghĩa thống kê nghĩa ở độ tin cậy 95,0% (Phụ lục 2.8 và 2.12). Vì vậy, độ tinh khiết sắc kí và hàm lượng tạp chất bay hơi được lấy giá trị trung bình của 3 PKN.

Mặt khác, hàm lượng tạp chất vô cơ không thay đổi trong quá trình từ nguyên liệu thiết lập chất chuẩn đến khi đóng ống chuẩn nên hàm lượng tạp chất vô cơ xác định khi đánh giá nguyên liệu thiết lập chuẩn được sử dụng để xác định giá trị ấn định trên COA.

❖ *Nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn gốc định lượng*

Độ tinh khiết của chất chuẩn gốc được xác định bằng phương pháp cân bằng khối lượng phụ thuộc vào độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn, hàm lượng tạp chất bay hơi và tạp chất vô cơ nhưng tạp chất vô cơ thường không thay đổi theo thời gian. Vì vậy, khi nghiên cứu độ ổn định cần theo dõi các chỉ tiêu độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn bằng HPLC/DAD và hàm lượng tạp chất bay hơi bằng TGA.

4.2.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho NTLCC định tính cleisindoside A 7',8'-dehydrocleistantoxin (CTI)

Bên cạnh mục tiêu ban đầu là thiết lập 2 chất làm chất chuẩn định lượng trên, luận án đã phân lập được khoảng 500 mg cleisindoside A và chất mới 7',8'-dehydrocleistantoxin. Hơn thế nữa, chất 7',8'-dehydrocleistantoxin chỉ có trong quả Chà chôi, nên cần xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho chất chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin để làm nguyên liệu thiết lập chuẩn định tính, phân biệt quả Chà chôi với các quả cây khác trong chi và làm chất chuẩn phân giải khi phân tích độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn cleistantoxin và hàm lượng cleistantoxin trong quả Chà chôi.

Tiêu chuẩn chất lượng của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính cleisindoside A (Phụ lục 2.14) và 7',8'-dehydrocleistantoxin (Phụ lục 2.17) cũng được xây dựng theo hướng dẫn của IP, USP và WHO gồm: xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng

chất chuẩn định tính và xác định được độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn bằng HPLC/DAD (yêu cầu độ tinh khiết sắc kí >90% đối với chuẩn định tính).

4.2.2.1. Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng cho chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

Bộ dữ liệu nhận dạng của chất chuẩn định tính cleisindoside A gồm: tinh chất, nhiệt độ nóng chảy, góc quay cực riêng, bộ phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HR-MS, IR và UV-VIS dựa trên các dữ liệu đầy đủ của tài liệu đã được công bố [83] trùng với dữ liệu phổ kháng định cấu trúc chất phân lập được là cleisindoside A.

Đối với nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin, đây là chất lần đầu tiên được phân lập từ tự nhiên nên chưa có công bố nào về bộ dữ liệu tinh chất, nhiệt độ nóng chảy, góc quay cực riêng, bộ phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HR-MS, IR và UV-VIS của chất 7',8'-dehydrocleistantoxin. *Luận án là công trình đầu tiên đã xây dựng toàn bộ các dữ liệu nhận dạng chất chuẩn mới này.*

4.2.2.2. Xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

Phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn định tính cleisindoside A dựa trên chương trình SK định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong quả Chà chôi và chất chuẩn định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin theo chương trình SK xác định độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn cleistantoxin. Phương pháp được thẩm định: độ đặc hiệu, LOD và độ lặp lại (Phụ lục 2.13 và 2.16).

Giới hạn cho phép về độ tinh khiết SK của chất chuẩn cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin không được nhỏ hơn 90% và hàm lượng tổng tạp chất liên quan của chất chuẩn cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin là không được lớn hơn 10% đáp ứng điều kiện làm chuẩn định tính và chuẩn phân giải.

4.2.2.3. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin

Yêu cầu kĩ thuật và phương pháp thử của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin được xây dựng dựa trên bộ dữ liệu nhận dạng và phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí của hai chất chuẩn bằng HPLC/DAD. *Tiêu chuẩn chất lượng của nguyên liệu thiết lập chuẩn định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin (Phụ lục 2.17) và cleisindoside A (Phụ lục 2.14) là đóng góp mới của luận án và đáp ứng được yêu cầu thực tiễn.*

Tiêu chuẩn chất lượng và NLTLC định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin, cleisindoside A được gửi sang Viện KNT TU để xác định độ tinh khiết sắc kí của NLTLC định tính cleisindoside A là 95,8% (Phụ lục 2.15) và 7',8'-

dehydrocleistantoxin là 94,4% (Phụ lục 2.18), đáp ứng được yêu cầu lớn hơn 90% để làm chuẩn định tính và chuẩn phân giải.

Nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin và cleisindoside A được đóng ống thủy tinh trung tính 10 ml, màu nâu, tránh ánh sáng. Bảo quản từ 2-8°C, để tiếp tục nghiên cứu phân lập, tinh chế ở lô lớn hơn để thiết lập chất chuẩn định lượng.

TÓM LẠI

Thiết lập chất chuẩn gốc định lượng là nhu cầu rất cần thiết của chuyên ngành kiểm nghiệm thuốc trong nghiên cứu và phát triển thuốc mới và đặc biệt là chủ động nguồn chất chuẩn khi không có chuẩn đối chiếu, đặc biệt là chuẩn dược liệu rất hiếm trên thị trường. *Luận án đã lần đầu tiên thiết lập được chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D phân lập từ quả Cà chôi*, có qui trình phân lập, tinh chế được lượng chất lớn (4,0235 g và 3,6562 g từ 168 g cao khô) với độ tinh khiết sắc kí cao 99,9 và 97,6%. Các chất chuẩn gốc được xây dựng đầy đủ bộ dữ liệu nhận dạng và xác định độ tinh khiết của chất chuẩn bằng phương pháp cân bằng khối lượng theo hướng dẫn của IP, USP và WHO. Luận án đã đóng được 76 và 96 ống chuẩn 10mg có giá trị ấn định trên nhãn của cleisindoside D là $94,2 \pm 0,8\%$; cleistantoxin là $99,3 \pm 0,2\%$ và là công trình khoa học đầu tiên ở Việt Nam công bố độ tinh khiết (hàm lượng) của chất chuẩn gốc bằng cách xác định cả 3 loại tạp chất trên theo hướng dẫn IP, USP và WHO. So với các nghiên cứu trước đây, các chất chuẩn được phân lập từ tự nhiên thường chỉ được xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng và xác định độ tinh khiết sắc kí, mà không xác định hàm lượng tạp chất bay hơi và tạp chất vô cơ vì lượng chất phân lập được rất ít [15], [16].

Xuất phát từ mục tiêu ban đầu thiết lập được 2 chất chuẩn gốc định lượng, luận án đã phân lập thêm được 2 chất chuẩn định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin và cleisindoside A bảo quản dưới dạng nguyên liệu dùng để định tính 2 chất này trong quả của chi *Cleistanthus* và phân biệt quả Cà chôi với các cây khác trong chi. Kết quả này có giá trị khoa học và thực tiễn cao, vì quả Cà chôi là nguồn dược liệu quý để chiết xuất cao khô đang nghiên cứu, phát triển làm nguyên liệu thuốc điều trị ung thư. Đây là một đóng góp rất có ý nghĩa của luận án, vì chất chuẩn định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin là chất mới lần đầu tiên được luận án công bố bộ dữ liệu nhận dạng chất 7',8'-dehydrocleistantoxin để làm nguyên liệu thiết lập chuẩn định tính.

Bên cạnh đó, khi xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết SK của chất chuẩn gốc định lượng cleisindoside D, cleistantoxin và định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin là trong quả của chi Cà chôi, cần có dung dịch phân giải để đánh giá khả năng tách của cleisindoside D, cleistantoxin khỏi các TCLQ. Nên

luận án đã đóng ống chuẩn phân giải gồm 4 chất chuẩn: cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin để đánh giá độ phù hợp của hệ thống sắc kí khi tiến hành xác định độ tinh khiết SK của chất chuẩn gốc định lượng cleisindoside D, cleistantoxin và khi định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin là trong quả cây chi Cách hoa.

4.3. XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH, ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI MỘT SỐ LIGNAN TRONG QUẢ CỦA CHI CÁCH HOA

4.3.1. Xây dựng, thẩm định phương pháp định tính đồng thời 4 chất chuẩn đã được thiết lập quả của chi Cách hoa

Hoạt chất cleistantoxin và cleisindoside D là hai hoạt chất mới chưa có nghiên cứu nào xây dựng phương pháp phân tích định tính, định lượng đồng thời cleistantoxin và cleisindoside D trong quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*) bằng HPLC/DAD. Luận án đã sử dụng chiết siêu âm là kĩ thuật thường được sử dụng trong các dược điển chiết nhanh, đơn giản để xây dựng phương pháp định tính đồng thời 4 chất cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin trong mẫu thử quả của chi Cách hoa.

Từ nghiên cứu phân lập và xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside D và cleistantoxin trong NLTLC đều có 2 cặp chất là cleisindoside A và cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin tách rất gần nhau. Vì vậy, khi xây dựng phương pháp định tính 4 chất trên cần lựa chọn được chương trình sắc kí tách được 4 chất. Dựa vào kết quả xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn cleistantoxin và cleisindoside D, luận án đã lựa chọn cột C18 với pha động ACN-H₂O và điều chỉnh chương trình gradient để tách được 4 chất trên (mục 3.3.1.3). Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trước đó phân tích một số aryltetralyl lignan cùng cấu trúc trong dược liệu [15], [16], [83].

Để đánh giá khả năng tách của 4 chất trong ĐKSK đã lựa chọn sử dụng dung dịch phân giải chứa 4 chất chuẩn: cleisindoside A, cleisindoside D và cleistantoxin, 7',8'-dehydrocleistantoxin và các dung dịch thử quả của chi Cách hoa. Trên SKĐ của dung dịch phân giải và dung dịch thử quả Chà chối và quả Cách hoa eberhardt, 4 pic cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin đều tách hoàn toàn khỏi nhau với Rs > 1,5. Xác định hệ số tinh khiết pic của 4 chất trong mẫu thử và thử thêm chuẩn giống nhau đều lớn hơn 996, cho thấy các chất đã tách hoàn toàn khỏi nhau và pic sắc kí tinh khiết không còn lẫn tạp chất. Phương pháp đã xây dựng có độ đặc hiệu cao.

Từ chương trình SK lựa chọn đã tách được 4 chất trên hoàn toàn khỏi nhau, để tiếp tục xây dựng phương pháp định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin, cần khảo sát điều kiện chiết kiệt được 2 hoạt chất này khỏi dược liệu.

4.3.2. Xây dựng, thẩm định phương pháp định lượng đồng thời cleistantoxin và cleisindoside D trong quả của chi Cà chôi

4.3.2.1. Xây dựng qui trình chiết xuất đồng thời cleistantoxin và cleisindoside D trong quả của chi Cà chôi

◇ Khảo sát dung môi chiết

Cho tới nay, chưa có công trình nào công bố về qui trình chiết xuất cleisindoside D và cleistantoxin trong dược liệu. Dựa vào cấu trúc và độ tan của cleistantoxin tan tốt trong CH_2Cl_2 và cleisindoside D tan tốt trong CH_2Cl_2 và MeOH (Bảng 3.21 và 3.22), luận án tiến hành khảo sát hệ dung môi CH_2Cl_2 và MeOH với tỉ lệ khác nhau (3:1), (1:1), (1:3), MeOH 100% và hệ dung môi MeOH- H_2O với các tỉ lệ khác nhau (9:1), (3:1) và (1:1).

MeOH là dung môi được lựa chọn vì đây là dung môi chiết tốt các hoạt chất trong dược liệu vì tính thấm tốt qua màng tế bào thực vật và bên cạnh đó cleisindoside D (glycosid) tan tốt trong MeOH (Bảng 3.22). Tuy nhiên, chất tinh khiết cleistantoxin (aglycon) rất khó tan trong MeOH (Bảng 3.21). Theo qui định của DDVN V, một chất rất khó tan trong dung môi, thì 1 g chất đó tan được từ >1.000 đến 10.000 ml dung môi. Mặt khác, hàm lượng cleistantoxin cao nhất trong quả của chi Cà chôi là 0,558%, nên nếu lựa chọn lượng dược liệu 1 g, thì trong 1 g dược liệu sẽ chứa khoảng 0,00558 g chất cleistantoxin, nên cần lựa chọn lượng dung môi MeOH tối đa là 50 ml để chiết xuất.

Hàm lượng (%) của cleistantoxin thay đổi không nhiều trong khoảng dung môi khảo sát, nhưng hàm lượng (%) của cleisindoside D thấp ở hệ dung môi kém phân cực CH_2Cl_2 -MeOH tăng dần đến hệ MeOH 100% và hàm lượng cả 2 chất đều cao nhất ở hệ MeOH- H_2O (9:1) và MeOH- H_2O (3:1). Kết quả khảo sát thu được hoàn toàn phù hợp với các tài liệu tham khảo, khi chiết xuất các dược liệu có màng tế bào cứng như quả, thân, rễ dược liệu, nên thêm nước vào làm tăng tính trương nở của màng tế bào dược liệu giúp cho chiết xuất hoạt chất được tốt hơn.

Khi chiết xuất cleisindoside D và cleistantoxin trong mẫu dược liệu bằng MeOH- H_2O (9-1) và MeOH- H_2O (3-1) được dung dịch thử, nếu tiêm thẳng mẫu thử vào hệ thống SK thì mẫu chuẩn cũng phải chuẩn bị trong cùng điều kiện là pha mẫu trong dung môi MeOH- H_2O (9-1) hoặc MeOH- H_2O (9-1). Trong quá trình thực nghiệm thấy chất cleistantoxin hay bị tủa trong cột làm tắc cột là do chất chuẩn cleistantoxin khó tan trong MeOH, nước. Để khắc phục tình trạng trên, luận án đã tiến hành thêm bước cô cách thủy dịch chiết đến cạn rồi pha vào dung môi pha động ACN- H_2O (1-1). Luận án đã tiến hành tiêm SK cả dung dịch thử trước và sau khi cô cách thủy thì thấy

có nồng độ và thành phần các chất trong như mẫu thử trước khi cô và sau khi cô không khác nhau đáng kể. Vì vậy, qui trình chiết xuất thêm bước cô dịch chiết bằng cách thủy đến cạn, sau đó hoà tan cần vào dung môi pha mẫu là ACN-H₂O (1-1). Đây là bước phát triển phương pháp phân tích so với luận văn Thạc sĩ “*Xây dựng phương pháp định lượng cleistantoxin trong quả của một số loài thuộc chi Cách hoa*”.

Luận án đã khảo sát được hệ dung môi MeOH-H₂O (9:1) và MeOH-H₂O (3:1) cho hiệu suất chiết cleisindoside D và cleistantoxin trong mẫu dược liệu cao nhất, nhưng qui trình chiết xuất cần cô đến cạn nên hệ dung môi MeOH-H₂O (9:1) được lựa chọn vì có tỉ lệ nước thấp sẽ nhanh cô đến cạn hơn (Hình 3.52 và phụ lục 3.2).

❖ **Khảo sát kỹ thuật chiết**

Khảo sát các kỹ thuật chiết xuất siêu âm, chiết hồi lưu và chiết Soxhlet bằng dung môi MeOH-H₂O (9-1), kết quả cho thấy chiết Soxhlet trong 2,5 giờ có hiệu suất chiết cao nhất. Để kiểm tra sau 2,5 giờ chiết Soxhlet đã chiết kiệt được 2 chất trên, tiến hành lấy bã dược liệu được thêm 50 ml dung môi MeOH-H₂O (9-1) và chiết Soxhlet tiếp trong 2,5 giờ và xác định hàm lượng cleisindoside D và cleistantoxin còn lại trong bã dược liệu. Kết quả cho thấy diện tích pic cleisindoside D còn lại là 17.838 và diện tích pic cleistantoxin bằng 0, cho thấy hàm lượng 2 chất này sau khi chiết xuất còn lại xấp xỉ 0%. Vì vậy, kỹ thuật chiết Soxhlet đã chiết kiệt được 2 hoạt chất này (Hình 3.53 và phụ lục 3.3). *Qui trình chiết xuất đã được nghiên cứu khoa học, công phu và là đóng góp mới và có ý nghĩa thực tiễn của luận án.*

4.3.3. Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định tính và định lượng một số lignan trong quả của chi Cách hoa bằng HPLC/DAD

Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định tính 4 lignan: cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin trong quả của chi Cách hoa từ 4 chất chuẩn đã được thiết lập. Trên SKĐ của dung dịch thử chiết từ quả Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis*) có thêm chất 7',8'-dehydrocleistantoxin mà trong quả Cách hoa eberhardt không có. Điều này khẳng định việc chuẩn bị nguyên liệu chuẩn định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin là cần thiết để phân biệt quả Chà chôi với các quả cây khác trong chi. Hơn thế nữa, kết quả này có giá trị khoa học và thực tiễn cao, vì quả Chà chôi là nguồn dược liệu quý để chiết xuất cao khô đang nghiên cứu, phát triển làm nguyên liệu thuốc điều trị ung thư.

Bên cạnh đó, trên SKĐ của cả 2 mẫu quả cây còn xuất hiện một pic tại thời gian lưu 20 phút trùng với thời gian lưu của chất tinh khiết neo-cleistantoxin và chồng phổ sơ bộ xác định được pic tại vị trí 20 phút này là neo-cleistantoxin. Chất này đã được

phân lập từ quả Chà chôi nhưng lượng chất ít nên chưa đủ làm NLTCC, nhưng lại có hàm lượng khá cao trong quả Cách hoa eberhardt. Nên sẽ tiếp tục tiến hành phân lập, tinh chế, thiết lập chất chuẩn neo-cleistantoxin từ quả cây Cách hoa eberhardt.

Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong các mẫu của quả Chà chôi (*Cleistanthus tonkinensis*) và quả Cách hoa eberhardt (*Cleistanthus eberhardtii*) thu hái năm 2018. Sơ bộ xác định hàm lượng hoạt chất cleisindoside D và cleistantoxin trong mẫu quả Chà chôi là 0,28 và 0,556% và quả Cách hoa eberhardt thấp hơn là 0,076 và 0,285%. Kết quả này định hướng các nhà khoa học Viện HL KH&CN VN lựa chọn quả Chà chôi có hàm lượng 2 hoạt chất chính cao hơn để làm nguyên liệu chiết xuất cao khô để thử hoạt tính trên chuột Nude. Cần áp dụng phương pháp định tính, định lượng một số lignan đã được xây dựng để xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu và cao dược liệu đang được tiếp tục nghiên cứu hoạt tính kháng ung thư phổi.

Vì vậy, phương pháp định tính và định lượng đồng thời 4 lignan từ 2 chất chuẩn gốc định lượng cleisindoside D, cleistantoxin và 2 chất chuẩn gốc định tính cleisindoside A, 7',8'-dehydrocleistantoxin đã được thiết lập là những đóng góp có tính khoa học và thực tiễn của luận án.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

1. Về mặt hoá học

Lần đầu tiên đã phân lập, tinh chế và xác định cấu trúc 8 chất mới từ quả Chà chôi là: 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1), cleistonkiside A (CT2), cleistonkinin A (CT3), cleistonkinin B (CT4), cleistonkiside B (CT5), cleistonkinen (CT6), cleistonkinin E (CT7), cleistonkinin C (CT8).

2. Về mặt thiết lập chất chuẩn

Lần đầu tiên công bố:

Tiêu chuẩn chất lượng của nguyên liệu thiết lập chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D theo hướng dẫn của tổ chức y tế thế giới (WHO) và thiết lập chất chuẩn theo hướng dẫn của ISO GUIDE 35.

Đồng được 96 ống chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin có giá trị ổn định trên COA là 99,3%, độ không đảm bảo đo là 0,1%, nghiên cứu độ ổn định được 18 tháng và 76 ống chất chuẩn gốc định lượng cleisindoside D có giá trị trên COA là 94,2%, độ không đảm bảo đo là 0,4%, nghiên cứu độ ổn định được 12 tháng.

Tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin và cleisindoside A. Trong đó, chất 7',8'-dehydrocleistantoxin là chất mới phân lập được từ quả Chà chôi và phân xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng chất chuẩn định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin là công bố hoàn toàn mới của luận án.

Đồng ống chuẩn phân giải gồm 4 chất chuẩn: cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin để đánh giá độ phù hợp hệ thống sắc kí.

3. Về mặt kiểm nghiệm dược liệu và thuốc dược liệu

Lần đầu tiên ứng dụng 2 chất chuẩn gốc định lượng và 2 chất chuẩn gốc định tính để xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin và định tính được 4 lignan: cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin trong quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*) và chưa có công trình nào công bố về kết quả này.

Từ kết quả của luận án cho thấy hướng nghiên cứu phát triển thuốc mới từ thực vật, dược liệu đang được các nhà khoa học quan tâm rất cần có sự song hành của các nghiên cứu của chuyên ngành kiểm nghiệm thuốc về thiết lập chất chuẩn gốc để xây dựng tiêu chuẩn cơ sở, kiểm tra, giám sát chất lượng dược liệu và cao dược liệu.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Luận án đã đạt được các mục tiêu đã đề ra.

1. PHÂN LẬP, TINH CHẾ VÀ KHÁNG ĐỊNH CẤU TRÚC CỦA CLEISTANTOXIN VÀ CLEISINDOSIDE D LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN

Với mục tiêu ban đầu chuẩn bị nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D, từ 168 g cao cồn khô chiết xuất từ quả Chà chôi đã phân lập, tinh chế được 4,0235 g cleistantoxin có độ tinh khiết sắc kí 99,9% và 3,6562 g cleisindoside D có độ tinh khiết sắc kí 97,6% để thiết lập chất chuẩn gốc định lượng.

Trong quá trình phân lập, tinh chế 2 chất cleistantoxin và cleisindoside D làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng, đã phân lập, tinh chế được 0,5481 g cleisindoside A có độ tinh khiết trên 95,8% và 0,5615 g CT1 xác định được chất CT1 là chất mới được đặt tên là 7',8'-dehydrocleistantoxin có độ tinh khiết 94,4%. Hai chất cleisindoside A và 7',8'-dehydrocleistantoxin sử dụng làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính và chuẩn phân giải.

Bên cạnh đó, đã phân lập, tinh chế và xác định được cấu trúc của 8 chất mới từ quả cây Chà chôi là: 7',8'-dehydrocleistantoxin (CT1), cleistonkiside A (CT2), cleistonkinin A (CT3), cleistonkinin B (CT4), cleistonkiside B (CT5), cleistonkinin (CT6), cleistonkinin-E (CT7), cleistonkinin C (CT8). Trong đó, có chất CT1 là 7',8'-dehydrocleistantoxin đã được xây dựng tiêu chuẩn làm nguyên liệu chất chuẩn định tính và chuẩn phân giải.

2. THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN GỐC

Lần đầu tiên công bố:

Phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí và hàm lượng TCLQ trong nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin và cleisindoside D. Phương pháp được xây dựng và thẩm định đầy đủ các chỉ tiêu theo hướng dẫn của ICH.

Tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin, cleisindoside D và đã được Viện KNT TỰ thẩm định và đánh giá chất lượng của 2 nguyên liệu này, xác định giá trị ấn định trên phiếu phân tích và nghiên cứu độ ổn định của ống chuẩn theo đúng hướng dẫn của ISO GUIDE 35.

Đóng được 96 ống chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin 10 mg, lô Cleistantoxin-01, xác định giá trị trên COA là 99,3%, độ không đảm bảo đo là 0,1% và nghiên cứu độ ổn định được 18 tháng.

Đóng được 76 ống chất chuẩn gốc cleisindoside D 10 mg, lô Cleisindoside D-01, xác định giá trị trên COA là 94,2%, độ không đảm bảo đo là 0,4% và nghiên cứu độ ổn định được 12 tháng.

Phương pháp xác định độ tinh khiết sắc kí và tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu thiết lập chất chuẩn định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin và cleisindoside A.

Đồng lọ chất chuẩn gốc định tính 7',8'-dehydrocleistantoxin và cleisindoside A ở dạng nguyên liệu chất chuẩn để tiếp tục nghiên cứu thiết lập chuẩn định lượng.

Đồng ống chuẩn phân giải gồm 4 chất chuẩn: cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin.

3. XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ LIGNAN TRONG QUẢ CỦA CHI CÁCH HOA BẰNG HPLC/DAD

Đây là nghiên cứu đầu tiên công bố phương pháp định tính 4 lignan: cleisindoside A, cleisindoside D, cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin và định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin trong quả của chi Cách hoa (*Cleistanthus*) bằng HPLC/DAD.

Áp dụng phương pháp đã xây dựng để bước đầu định tính và định lượng một số lignan trong quả của một số loài cây thuộc chi Cách hoa (*Cleistanthus*).

KIẾN NGHỊ

Tiếp tục nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin là Cleistantoxin-01 và cleisindoside D là Cleisindoside D-01.

Áp dụng qui trình phân lập, tinh chế và thiết lập chất chuẩn gốc định lượng cleistantoxin cho các lọ lớn hơn.

Cải thiện qui trình phân lập, tinh chế nguyên liệu thiết lập chất chuẩn cleisindoside D có độ tinh khiết cao hơn để thiết lập chất chuẩn cho các lọ lớn hơn.

Tiếp tục nghiên cứu qui trình phân lập, tinh chế chất 7',8'-dehydrocleistantoxin ở qui mô lớn để thu được lượng lớn hơn có độ tinh khiết sắc kí >95% để làm NTLCC gốc định lượng.

Cải thiện qui trình phân lập, tinh chế cleisindoside A để thu được lượng chất lớn có độ tinh khiết sắc kí >95% đủ điều kiện để làm chuẩn gốc định lượng.

Nghiên cứu qui trình phân lập, tinh chế neo-cleistantoxin làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn từ quả Cách hoa eberhardt.

Áp dụng phương pháp đã xây dựng để định tính 4 lignan và định lượng đồng thời cleisindoside D và cleistantoxin ở nhiều loại quả cây thuộc chi Cách hoa khác thu hái ở nhiều địa điểm và thời điểm thu hái khác nhau...

Áp dụng phương pháp phân tích đã xây dựng để xây dựng tiêu chuẩn cho dược liệu và cao khô chiết xuất từ quả Chà chôi đang được nghiên cứu, phát triển thành thuốc điều trị ung thư.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

Các công trình liên quan đến luận án đã công bố: 03 công trình

1. **Nguyễn Lâm Hồng**, Đào Tú Anh, Lê Công Vinh, Phạm Văn Cường, Đoàn Thị Mai Hương, Trần Việt Hùng (2018), "*Nghiên cứu phân lập, nhận dạng cleistantoxin từ quả cây Chà chôi (Cleistanthus tonkinensis Jabl., Euphorbiaceae) làm nguyên liệu thiết lập chất chuẩn*", Tạp chí Dược học, Số 512, năm 58, Số 12/2018, 21-24
2. **Nguyễn Lâm Hồng**, Đào Tú Anh, Lê Công Vinh, Phạm Văn Cường, Đoàn Thị Mai Hương, Nguyễn Thị Hằng, Trần Việt Hùng (2019), "*Xác định độ tinh khiết của nguyên liệu thiết lập chất chuẩn cleistantoxin được phân lập từ quả cây chà chôi (Cleistanthus tonkinensis Jabl. Euphorbiaceae) bằng phương pháp cân bằng khối lượng (Mass-balance)*", Tạp chí Dược học, Số 514, năm 59, Số 2/2019, 69-74
3. **Lam Hong Nguyen**, Van Nam Vu, Dao Phi Thi, Viet Hung Tran, Marc Litaudon, Fanny Roussi, Van Hung Nguyen, Minh Chau Van, Huong Doan-Thi-Mai, Van Cuong Pham (2019), "*Cytotoxic Lignans from Fruits of Cleistanthus tonkinensis*", Fitoterapia (online), DOI: 10.1016/j.fitote.2019.10443
Impact factor: 2.642

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt:

1. Trần Từ An (2012), *Hóa phân tích II*, Bộ môn hóa phân tích và độc chất, Trường đại học Dược Hà Nội, Hà Nội.
2. Võ Văn Chi (2004), *Từ điển thực vật thông dụng*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.
3. Võ Văn Chi (1999), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học.
4. Nguyễn Minh Đức (2013), "Điều chế và thiết lập chất chuẩn từ thiên nhiên để phục vụ công tác nghiên cứu, kiểm nghiệm và tiêu chuẩn hóa Dược liệu, Đông dược", Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ, TP HCM, tr4-43, pp. 4-43.
5. Nam H. Đ. D. Đ. V., Trung Tâm Dược Điển-Dược Thư Việt Nam Bộ Y Tế (2017), "*Dược điển Việt Nam tái bản lần thứ 5*", Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, I, II(V).
6. Phạm Hoàng Hộ (1998), *Cây cỏ Việt Nam*, Nhà xuất bản Trẻ.
7. Trần Thu Hương (2016), *Giáo trình hoá học các hợp chất tự nhiên*, Nhà xuất bản Bách khoa Hà Nội.
8. Vũ Văn Lợi N. L. H., Đoàn Thị Mai Hương, (2017,), "*Các dẫn xuất của acid ellagic và acid benzoic từ lá cây Cọc rào Cleistanthus tonkinensis Jabl*", Tạp chí Hoá học,, T. 55, số 4E23 - 2017, pp. 66-69.
9. Nguyễn Đình Thành (2011), *Cơ sở các phương pháp phổ ứng dụng trong hóa học*, Nhà xuất bản khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.
10. Trung Tâm Thông Tin Khoa Học & Công Nghệ Tp.Hcm (2013), "*Phân tích xu hướng nghiên cứu điều chế và thiết lập chất chuẩn để phục vụ công tác nghiên cứu và kiểm nghiệm trên cơ sở số liệu sáng chế quốc tế*".

Tiếng Anh:

11. Ahuja S., Alsante K. M. (2003), *Handbook of isolation and characterization of impurities in pharmaceuticals*, Academic press.
12. Anjaneyulu A., Ramaiah P. A., Row L. R., et al. (1981), "*New lignans from the heartwood of Cleistanthus collinus*", Tetrahedron, 37(21), pp. 3641-3652.
13. International A., George Jr W. (2016), *Official methods of analysis of AOAC INTERNATIONAL*, AOAC international.

14. B.F. Issell F. M. M., S.K. Carter (1985), "*Etoposide (VP-16): Current Status and New Developments*", J R Soc Med, 78(5), p. 428.
15. Bastos J. K., Burandt C. L., Nanayakkara N. D., et al. (1996), "*Quantitation of aryltetralin lignans in plant parts and among different populations of Podophyllum peltatum by reversed-phase high-performance liquid chromatography*", Journal of natural products, 59(4), pp. 406-408.
16. Bastos J. K., Kopycki W. J., Burandt Jr C. L., et al. (1995), "*Quantitative determination of podophyllotoxin and related compounds in Podophyllum species by reverse phase high performance liquid chromatography*", Phytochemical Analysis, 6(2), pp. 101-105.
17. Blaine R. L. R., John E. (2009), *Validation of Thermogravimetric Analysis Performance Using Mass Loss Reference Materials*.
18. Borsche W N. J. (1932), "*Podophyllin*", Justus Liebigs Ann Chem, 494, pp. 126-142.
19. British Pharmacopoeia Commission (2018), *British Pharmacopoeia 2018*, Stationery Office Books (TSO).
20. Broomhead Aj D. P. (1990), "*Tumor-inhibitory aryltetralin lignans in Podophyllum versipelle*", Phytochemistry, 29, pp. 3831-3837.
21. Brown M. (1979), "*Determination of purity by differential scanning calorimetry (DSC)*", Journal of chemical education, 56(5), p. 310.
22. Browne D. (2009), "*Reference-standard material qualification*", Pharmaceutical Technology, 33(4), pp. 66-73.
23. Canel C., Moraes R., Dayan E., et al. (2000), "*Molecules of interest: podophyllotoxin, Phytochem. 54: 115-120*", CrossRef Google Scholar.
24. Canel C. M., R.M.; Dayan, F.E.; Ferreira, D. (2000), "*Molecules of interest: Podophyllotoxin*", Phytochemistry (Oxford), 54(2):, pp. 115-120.
25. Chan C. C., Lee Y., Lam H., et al. (2004), *Analytical method validation and instrument performance verification*, John Wiley & Sons.
26. Charde M., Kumar J., Welankiwar A., et al. (2013), "*Review: Development of forced degradation studies of drugs*", International Journal of Advances in Pharmaceutics, 2(3), pp. 34-39.
27. Committee on Asean Reference Substance (2005), *Guidelines for the establishment, handling, storage and use of Asean reference substances*, pp. 2-12.
28. David E.Jackson P. M. D. (1984), "*Aryltetralin lignans from Podophyllum hexandrum and Podophyllum peltatum*", Phytochemistry, 23(5), pp. 1147-1152.

29. Denicourt C., Dowdy S. F. J. S. (2004), "*Targeting apoptotic pathways in cancer cells*", 305(5689), pp. 1411-1413.
30. European Directorate for the Quality of Medicines & Healthcare (Edqm) (2017), *European Pharmacopoeia 9th Edition*.
31. Food, Drug Administration (2015), "*Q3D Elemental Impurities Guidance for Industry*", FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, Silver Spring, USA.
32. Gensler Wj G. C. (1966), "*Synthesis of podophyllotoxin.* ", Journal Org Chem, 31, pp. 4004-4008.
33. Gensler Wj G. C. (1962), "*Synthesis of podophyllotoxin.* ", J Am Chem Soc(84), pp. 1748-1749.
34. Gong N., Zhang B., Hu F., et al. (2014), "*Development of a new certified reference material of diosgenin using mass balance approach and Coulometric titration method*", Steroids, 92, pp. 25-31.
35. Görög S. (2000), *Identification and determination of impurities in drugs*, Elsevier.
36. Holthuis J. (1988), "*Etoposide and teniposide*", Pharmaceutisch Weekblad, 10(3), pp. 101-116.
37. Hotha K. K., Reddy S., Raju V., et al. (2013), "*Forced degradation studies: Practical approach-overview of regulatory guidance and literature for the drug products and drug substances*", International Research Journal of Pharmacy, 4, pp. 78-85.
38. Jj1. H. (1988), "*Etoposide and teniposide. Bioanalysis, metabolism and clinical pharmacokinetics.*", Holthuis JJ1, 10(3), pp. 101-116.
39. Usp Reference Standards Committee; Hauck W. W. (2012), "*Primary and secondary reference materials for procedures to test the quality of medicines and foods*", Pharmaceutical research, 29(4), pp. 922-931.
40. 17034 I. (2016), "*General requirements for the competence of reference material producers BS*", 17034.
41. Ich Harmonised Tripartite Guideline (2016), "*Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients*", Q7A, Current Step, 4, pp. 1-52.
42. Ich Harmonised Tripartite Guideline (2006), "*Impurities in New Drug Products-Q3B (R2)*", Commission of the European Communities, Geneva, pp. 1-11.

43. International Laboratory Accreditation Cooperation (Ilac) G9 (2005), "Guidelines for the selection and use of reference materials", International Laboratory Accreditation Cooperation, NSW, Australia, pp. 4-15.
44. International Organization for Standardization (2017), "Guide 35: Reference materials—Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability", International Organization for Standardization (ISO), Geneva, 114.
45. International Organization for Standardization (2015), "Reference materials—Selected terms and definitions", International Organization for Standardization, Geneva.
46. Issell B. F., Muggia F. M., Carter S. K. (1984), *Etoposide (VP-16): current status and new developments*, Academic press.
47. Jackson D. E., Dewick P. M. (1984), "Aryltetralin lignans from *Podophyllum hexandrum* and *Podophyllum peltatum*", *Phytochemistry*, 23(5), pp. 1147-1152.
48. Jackson D. E. a. D., P.M. (1984), "Aryltetralin lignans from *Podophyllum hexandrum* and *Podophyllum peltatum* ". *Phytochemistry*, 23, pp. 1147–1152.
49. Jian-Qiao Gu†, E. J. P., Stephen Totura†, Soedarsono Riswan‡, Harry H. S. Fong†, John M. Pezzuto†, and A. Douglas Kinghorn*† (2002), "Constituents of the twigs of *Hernandia ovigera* that inhibit the trans-formation of JB6 murine epidermal cells", *J Nat Prod.*, 65(7), pp. pp 1065–1068.
50. Jouyban A., Kenndler E. (2008), "Impurity analysis of pharmaceuticals using capillary electromigration methods", *Electrophoresis*, 29(17), pp. 3531-3551.
51. Kelly Mg H. J. (1954), "The biological effects and the chemical composition of podophyllin. J", *Journal Natl Cancer Inst* 14, pp. 967- 1010.
52. Klyne W., Stevenson R., Swan R, J. J. O. T. C. S. C. O. (1966), "Optical rotatory dispersion. Part XXVIII. The absolute configuration of otobain and derivatives", pp. 893-896.
53. Kohl S. (2018), *European directorate for the quality of medicines & healthcare (EDQM): final report of the pharmaceutical care quality indicators project published.*
54. Lee T.-H., Chiang Y.-H., Chen C.-H., et al. (2009), "A new flavonol galloylrhamnoside and a new lignan glucoside from the leaves of *Koelreuteria henryi* Dummer", 63(2), pp. 209-214.

55. Lgc Standards (2014), "*Pharmaceutical impurities and primary reference standards 2014*", pp. 1-10.
56. Lgc Standards (2013), "*Primary/secondary standards in pharmaceutical QC*", pp. 1-40.
57. Liang Z., Zhang J., Zhang X., et al. (2015), "*Endophytic fungus from *Sinopodophyllum emodi* (Wall.) Ying that produces Podophyllotoxin*", 54(2), pp. 175-178.
58. Lommen A., Schilt R., Weseman J., et al. (2002), "*Application of 1D 1H NMR for fast non-targeted screening and compositional analysis of steroid cocktails and veterinary drug formulations administered to livestock*", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 28(1), pp. 87-96.
59. Mathkar S., Kumar S., Bystol A., et al. (2009), "*The use of differential scanning calorimetry for the purity verification of pharmaceutical reference standards*", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 49(3), pp. 627-631.
60. Neidigh K. A., Kingston D. G., Lewis N. G. J. J. O. N. P. (1994), "*Synthesis of stereospecifically deuterated matairesinol, podorhizol, epipodorhizol, and yatein*", 57(6), pp. 791-800.
61. Nguyen Nghia Thin (2007), "*Taxonomy of Euphorbiaceae in Vietnam*", pp. 50-56.
62. Nguyen L. H., Doan T. M. H., Tran V. H., et al. (2017), "*In silico Study of The Pharmacologic Properties of Bioactive Compounds Isolated from The Fruits of Three Species of *Gleistanthus* genus (Euphorbiaceae)*," The 2nd international conference on pharmacy education and research network of Asean (Asean pharmnet 2017), pp. 306-316.
63. Parasuraman S. (2016), "*Computer-aided prediction of biological activity spectra, pharmacological and toxicological properties of cleistanthin A and B*", International Journal of Research in Pharmaceutical Sciences, 1(3), pp. 333-337.
64. Parasuraman S., Raveendran R., Vijayakumar B., et al. (2012), "*Molecular docking and ex vivo pharmacological evaluation of constituents of the leaves of *Cleistanthus collinus* (Roxb.)(Euphorbiaceae)*", Indian journal of pharmacology, 44(2), p. 197.
65. Podwyssotzki V. (1882), "*On the active constituents of podophyllin.* ", Am Journal Pharm, 12, pp. 102-115.

66. Podwyssotzki V. (1881), " *The active constituent of podophyllin.* ", Pharm Journal Transl, 12, pp. 217-218.
67. Podwyssotzki V. (1880), " *Pharmakologische studien über Podophyllum peltatum.* ", Arch Exp Pathol Pharmacol, 13, pp. 29-52.
68. Pradheepkumar C. P., Shanmugam G. (1999), " *Anticancer potential of cleistanthin A isolated from the tropical plant Cleistanthus collinus*", Oncol Res, 11(5), pp. 225-232.
69. Pradheepkumar C. P., Shanmugam G. (1999), " *Anticancer potential of cleistanthin A isolated from the tropical plant Cleistanthus collinus*", Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics, 11(5), pp. 225-232.
70. I. G. (2017), " *Reference materials-Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*" (Fourth edition), pp. 1-105.
71. Ramesh C., Ravindranath N., Ram T. S., et al. (2003), " *Arylnaphthalide lignans from Cleistanthus collinus*", Chemical and pharmaceutical bulletin, 51(11), pp. 1299-1300.
72. Sastry K., Rao E. V., Buchanan J., et al. (1987), " *Cleistanthoside ba diphyllin glycoside from cleistanthus patulus heartwood*", Phytochemistry, 26(4), pp. 1153-1154.
73. Schönberger T., Monakhova Y., Lachenmeier D., et al. (2014), " *Guide to NMR method development and validation-Part I: Identification and quantification*", Eurolab Technical Report(01/2014).
74. Sichina W. (2000), " *Purity Measurements of Pharmaceuticals and Organics by DSC*", Thermal Analysis, Application Note.
75. Suman T., Elangomathavan R., Ilavenil S., et al. (2014), " *In vitro cytotoxic effect of Cleistanthus collinus extracts and fractions on mouse cell line*", Journal of Applied Pharmaceutical Science Vol, 4(10), pp. 044-046.
76. Sun Y.-J., Li Z.-L., Chen H., et al. (2011), " *Three new cytotoxic aryltetralin lignans from Sinopodophyllum emodi*", 21(12), pp. 3794-3797.
77. Sun Yj L. Z., Chen H , Liu Xq , Zhou W , Hua Hm (2011), " *Three new cytotoxic aryltetralin lignans from Sinopodophyllum emodi*", Bioorg Med Chem Lett, 21(12), pp. 3794-3797.
78. Suzuki S., Umezawa T. (2007), " *Biosynthesis of lignans and norlignans*", Journal of Wood Science, 53(4), p. 273.

79. Slanina J., Táborská E., Lojtková L. (1997), "*Lignans in the seeds and fruits of Schisandra chinensis cultured in Europe*", *Planta medica*, 63(03), pp. 277-280.
80. Teponno R. B., Kusari S., Spiteller M. (2016), "*Recent advances in research on lignans and neolignans*", *Natural product reports*, 33(9), pp. 1044-1092.
81. Thummar V. R., Parasuraman S., Basu D., et al. (2016), "*Evaluation of in vivo antitumor activity of cleistanthin B in Swiss albino mice*", *Journal of traditional and complementary medicine*, 6(4), pp. 383-388.
82. Trinh Thi Thanh V., Cuong Pham V., Doan Thi Mai H., et al. (2012), "*Cytotoxic lignans from fruits of Cleistanthus indochinensis: synthesis of cleistantoxin derivatives*", *Journal of natural products*, 75(9), pp. 1578-1583.
83. Trinh Thi Thanh V. P., Van Cuong, Mai H. D. T., Litaudon M., et al. (2014), "*Cytotoxic aryltetralin lignans from fruits of Cleistanthus indochinensis*", *Planta medica*, 80(08/09), pp. 695-702.
84. United States Pharmacopeial Convention Inc (2017), *USP 40-NF 35 The United States Pharmacopoeia and National Formulary 2017*, Deutscher Apotheker Verlag.
85. Wang D., Bădăraș A. S., Swamy M. K., et al. (2019), "*Arctium Species Secondary Metabolites Chemodiversity and Bioactivities*", 10.
86. World Health Organization (2017), *The International Pharmacopoeia*, World Health Organization.
87. World Health Organization (2007), "*General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances*", WHO technical report series, annex 3(943), pp. 61-82.
88. Yang M., Wu J., Cheng F., et al. (2006), "*Complete assignments of 1H and 13C NMR data for seven aryl-naphthalide lignans from Justicia procumbens*", *Magnetic Resonance in Chemistry*, 44(7), pp. 727-730.
89. Yip Y.-C., Wong S.-K., Choi S.-M. (2011), "*Assessment of the chemical and enantiomeric purity of organic reference materials*", *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(4), pp. 628-640.
90. Yixi Liu K. Y., † L. Harinantenaina Rakotondraibe, (2015), "*Antiproliferative Compounds from Cleistanthus boivinianus from the Madagascar Dry Forest*", *Journal of Natural Products*, 78(7), pp. 1543-1547.
91. Zöllner T., Schwarz M. (2013), "*Herbal Reference Standards: applications, definitions and regulatory requirements*", *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(1), pp. 1-21.

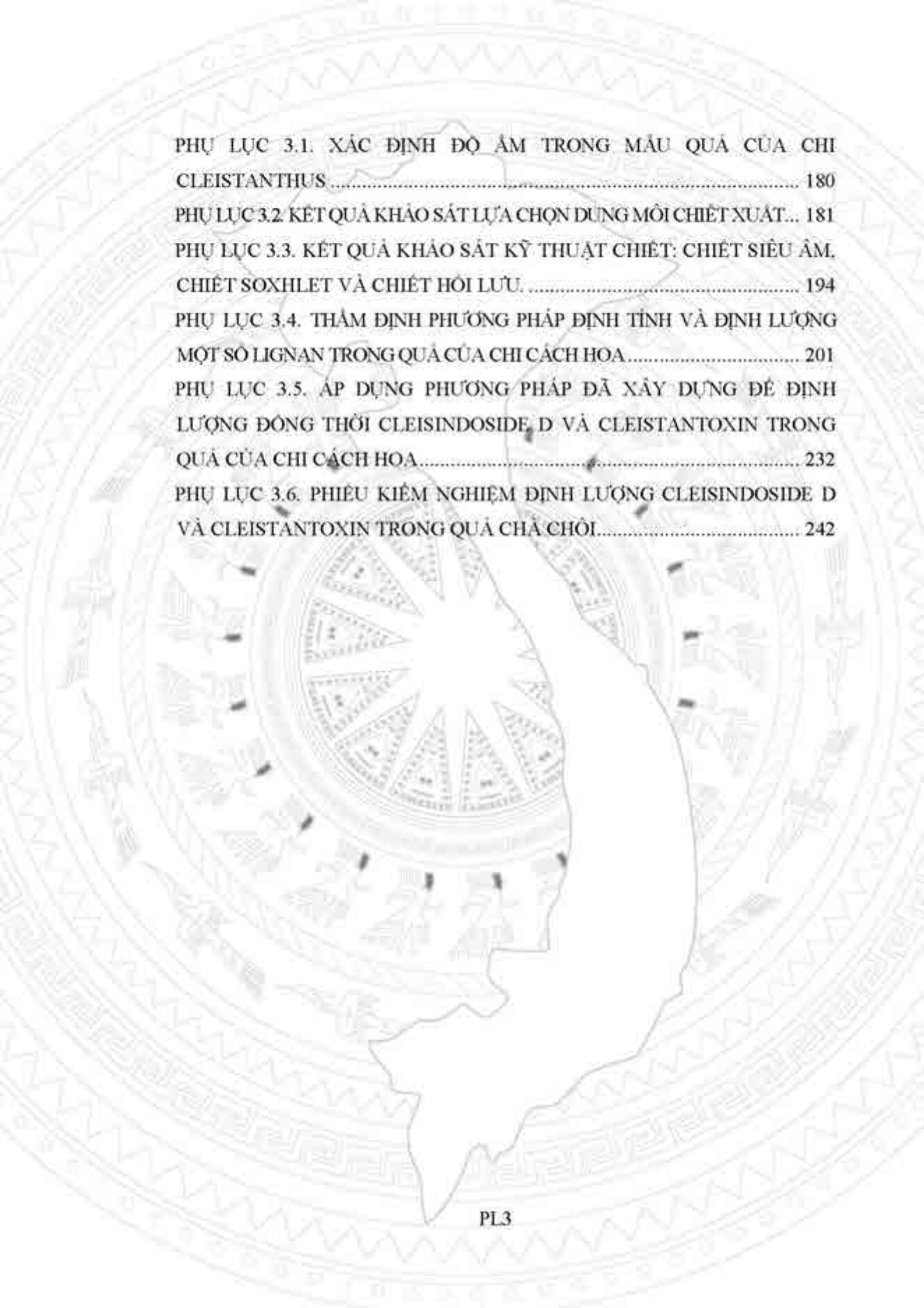
Trang web:

92. Edqm Council of Europe (2018), updated 2018, available from: <https://www.edqm.eu/en/news/reference-standards>.
93. Harley E. Wilcox, *The ABC's of reference standard management*, cited 2018 5th September,, available from: <https://www.eag.com/resources/whitepapers/abcs-reference-standard-management/>.
94. International Pharmacopoeia (2016), "*Supplementary information: Reference Substances and Reference Spectra: Reference substances and reference spectra*."
95. The United States Pharmacopeial Convention (2018), *Reference Standards*, updated 2018, cited 2018 1st May, available from: <http://www.usp.org/reference-standards/reference-standards-catalog>.
96. Sandor Gorog (2000), *Identification and Determination of Impurities in Drugs*, Elsevier.

DANH MỤC PHỤ LỤC

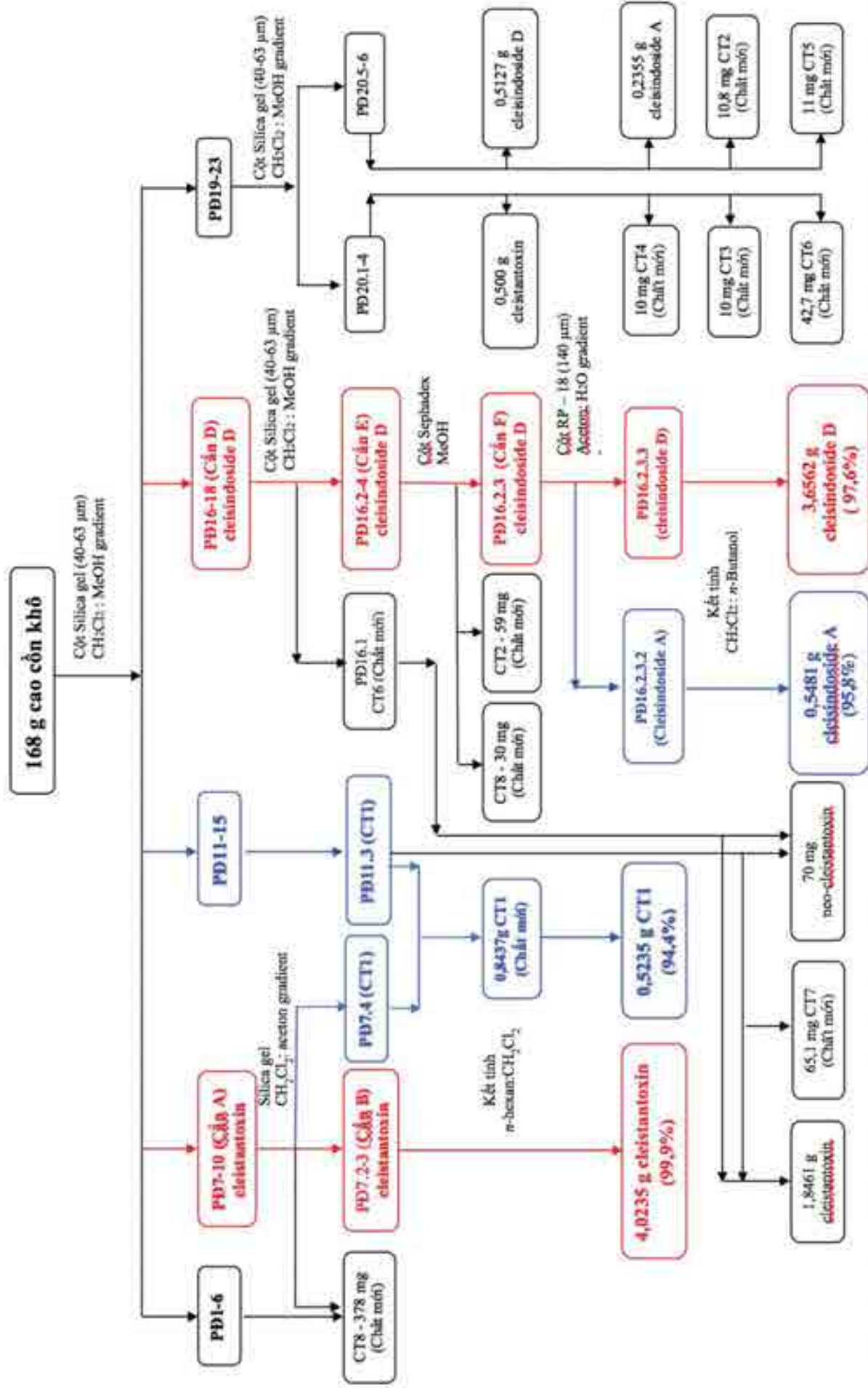
PHỤ LỤC 1. PHÂN LẬP, TINH CHẾ CHẤT TINH KHIẾT LIGNAN LÀM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN.....	4
PHỤ LỤC 1.1. GIẤY ĐỊNH DANH LOẠI.....	4
PHỤ LỤC 1.2. CÁC PHÂN ĐOẠN TÁCH TRÊN CỘT SILICA GEL TỔNG...	4
SƠ ĐỒ PHÂN LẬP, TINH CHẾ CÁC CHẤT TINH KHIẾT NHÓM LIGNAN TỬ QUẢ CHÀ CHỐI.....	5
PHỤ LỤC 1.3- PHỔ CỦA CHẤT CLEISTANTOXIN.....	6
PHỤ LỤC 1.4- PHỔ CỦA CHẤT CLEISINDOSIDE D.....	11
PHỤ LỤC 1.5- PHỔ CỦA CHẤT CLEISINDOSIDE A.....	15
PHỤ LỤC 1.6- PHỔ CỦA CHẤT NEO-CLEISTANTOXIN.....	19
PHỤ LỤC 1.7-PHỔ CỦA CHẤT CT1 (7'.8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN).....	24
PHỤ LỤC 1.8. PHỔ CỦA CHẤT CT2 (CLEISTONKISIDE A).....	29
PHỤ LỤC 1.9. PHỔ CỦA CHẤT CT3 (CLEISTONKININ A).....	35
PHỤ LỤC 1.10. PHỔ CỦA CHẤT CT4 (CLEISTONKININ B).....	40
PHỤ LỤC 1.11. PHỔ CỦA CHẤT CT5 (CLEISTONKISIDE B).....	44
PHỤ LỤC 1.12. PHỔ CỦA CHẤT CT6 (CLEISTONKINEN).....	50
PHỤ LỤC 1.13-PHỔ CỦA CHẤT CT7 (CLEISTONKININ E).....	56
PHỤ LỤC 1.14. PHỔ CỦA CHẤT CT8 (CLEISTONKININ C).....	62
PHỤ LỤC 2. THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN GỐC.....	67
PHỤ LỤC 2.1. XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA CLEISTANTOXIN.....	67
PHỤ LỤC 2.2. XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA CLEISINDOSIDE D.....	83
PHỤ LỤC 2.3. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT CỦA CLEISTANTOXIN.....	87
PHỤ LỤC 2.4. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA CLEISINDOSIDE D.....	111

PHỤ LỤC 2.5. PHIẾU KIỂM NGHIỆM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN GỐC ĐỊNH LƯỢNG CLEISTANTOXIN.....	132
PHỤ LỤC 2.6. ĐÁNH GIÁ ĐỘ ĐỒNG NHẤT QUÁ TRÌNH ĐÓNG ONG CHẤT CHUẨN BẰNG TEST ANOVA MỘT YẾU TỐ.....	134
PHỤ LỤC 2.7. PHIẾU KIỂM NGHIỆM ONG CHUẨN GỐC ĐỊNH LƯỢNG CLEISTANTOXIN.....	135
PHỤ LỤC 2.8. XÁC ĐỊNH GIÁ TRỊ AN ĐỊNH TRÊN COA CỦA ONG CHUẨN GỐC ĐỊNH LƯỢNG CLEISTANTOXIN.....	139
PHỤ LỤC 2.9. TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG CỦA CHẤT CHUẨN GỐC ĐỊNH LƯỢNG CLEISINDOSIDE D.....	140
PHỤ LỤC 2.10. PHIẾU KIỂM NGHIỆM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN GỐC CLEISINDOSIDE D.....	144
PHỤ LỤC 2.11. PHIẾU KIỂM NGHIỆM ONG CHUẨN GỐC CLEISINDOSIDE D LÒ CLEISINDOSIDE D-01.....	146
PHỤ LỤC 2.12. XÁC ĐỊNH GIÁ TRỊ AN ĐỊNH TRÊN COA CỦA ONG CHUẨN CLEISINDOSIDE D.....	149
PHỤ LỤC 2.13. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA CLEISINDOSIDE A.....	150
PHỤ LỤC 2.14. TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG CHO CHẤT CHUẨN ĐỊNH TÍNH CLEISINDOSIDE A.....	158
PHỤ LỤC 2.15. PHIẾU KIỂM NGHIỆM ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA NTLCC ĐỊNH TÍNH CLEISINDOSIDE A.....	161
PHỤ LỤC 2.16. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN.....	162
PHỤ LỤC 2.17. TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG CHO CHẤT CHUẨN ĐỊNH TÍNH 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN.....	176
PHỤ LỤC 2.18. PHIẾU KIỂM NGHIỆM ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA NTLCC ĐỊNH TÍNH 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN.....	179
PHỤ LỤC 3. XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ LIGNAN TRONG QUẢ CHÀ CHÔI.....	180



PHỤ LỤC 3.1. XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM TRONG MẪU QUẢ CỦA CHI CLEISTANTHUS.....	180
PHỤ LỤC 3.2. KẾT QUẢ KHẢO SÁT LỰA CHỌN DUNG MÔI CHIẾT XUẤT...	181
PHỤ LỤC 3.3. KẾT QUẢ KHẢO SÁT KỸ THUẬT CHIẾT: CHIẾT SIÊU ẨM, CHIẾT SOXHLET VÀ CHIẾT HỒI LƯU.	194
PHỤ LỤC 3.4. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ LIGNAN TRONG QUẢ CỦA CHI CÁCH HOA.....	201
PHỤ LỤC 3.5. ÁP DỤNG PHƯƠNG PHÁP ĐÃ XÂY DỰNG ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI CLEISINDOSIDE D VÀ CLEISTANTOXIN TRONG QUẢ CỦA CHI CÁCH HOA.....	232
PHỤ LỤC 3.6. PHIẾU KIỂM NGHIỆM ĐỊNH LƯỢNG CLEISINDOSIDE D VÀ CLEISTANTOXIN TRONG QUẢ CHÀ CHÔI.....	242

SƠ ĐỒ PHÂN LẬP, TÍNH CHỆ CÁC CHẤT TINH KHIẾT NHÓM LIGNAN TỪ QUẢ CHÀ CHỐI

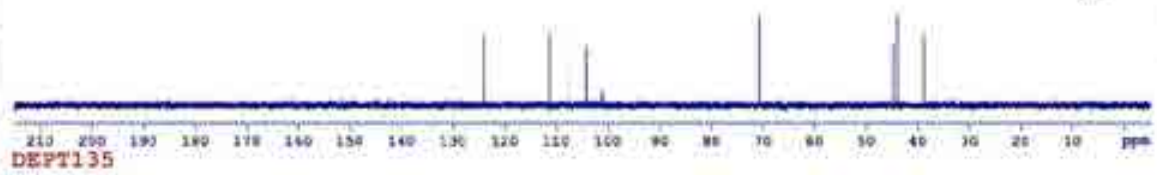


Phổ DEPT của chất cleistantoxin

CLEISTANTOXIN-CDCl₃-C13CPD&DEPT

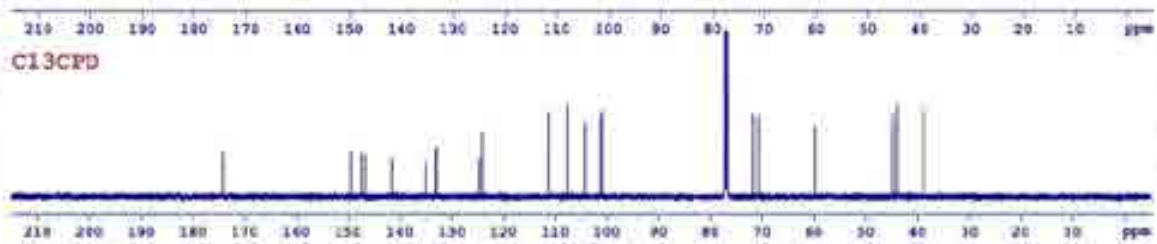


DEPT90

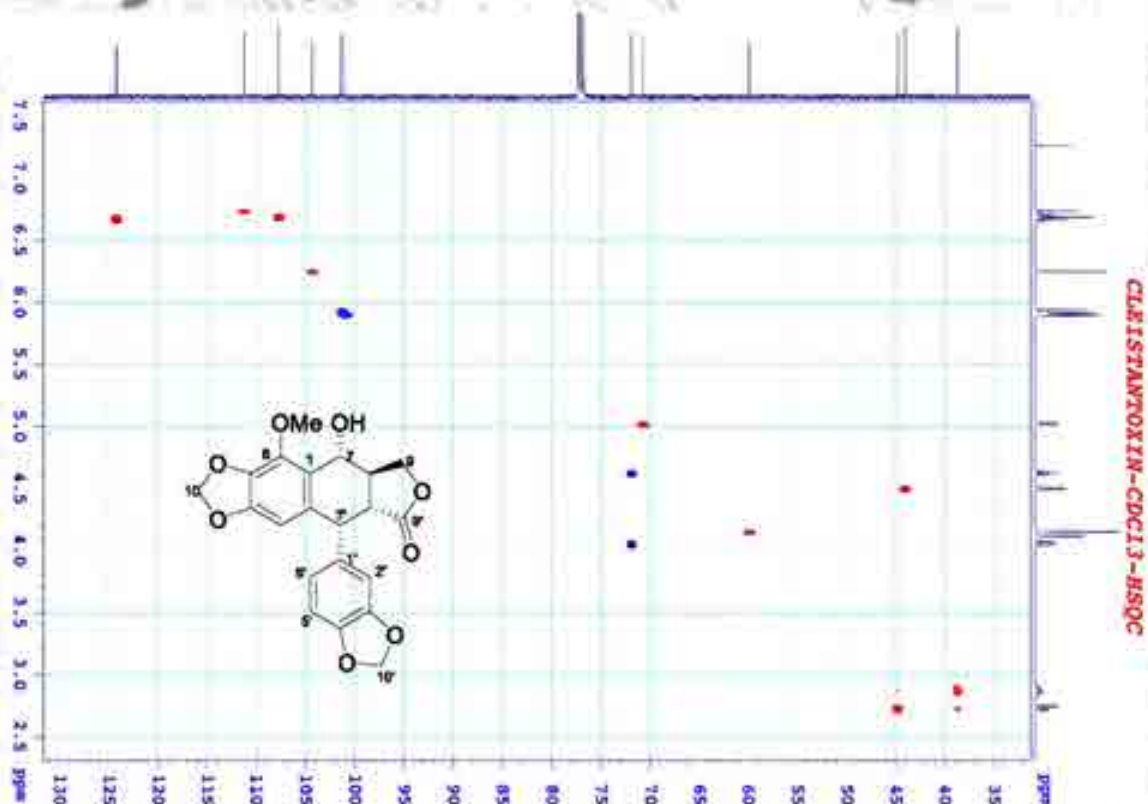


CHSUD3

CH2



Phổ HSQC của chất cleistantoxin

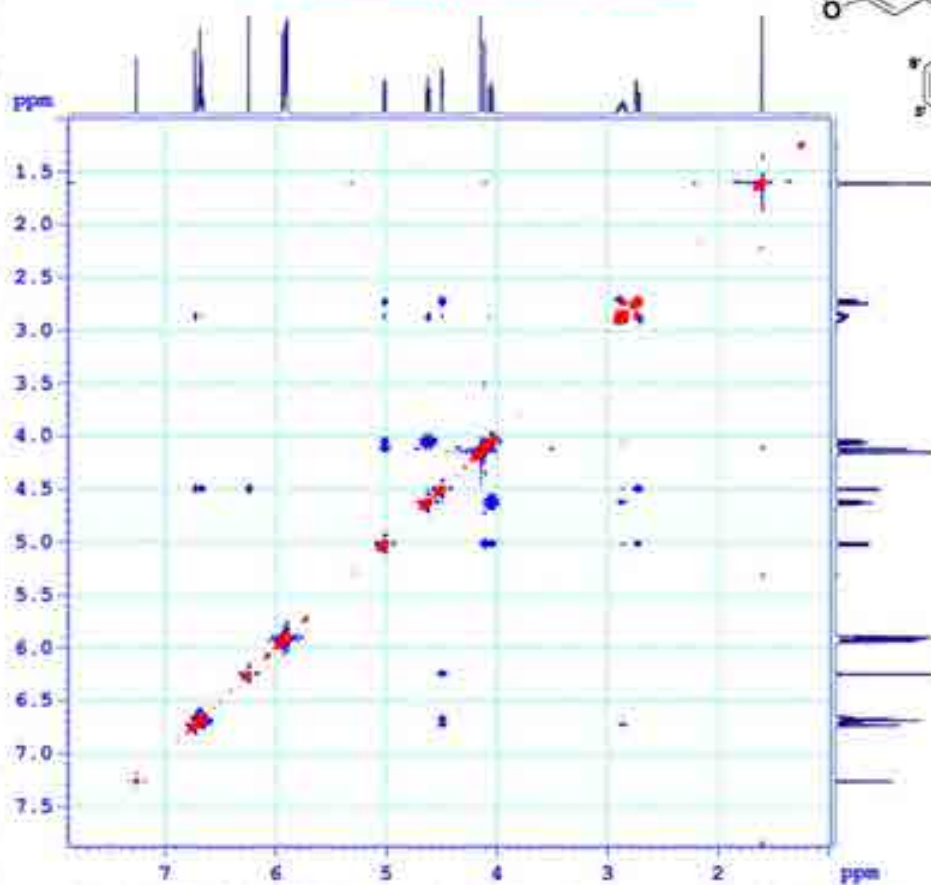


CLEISTANTOXIN-CDCl₃-HSQC

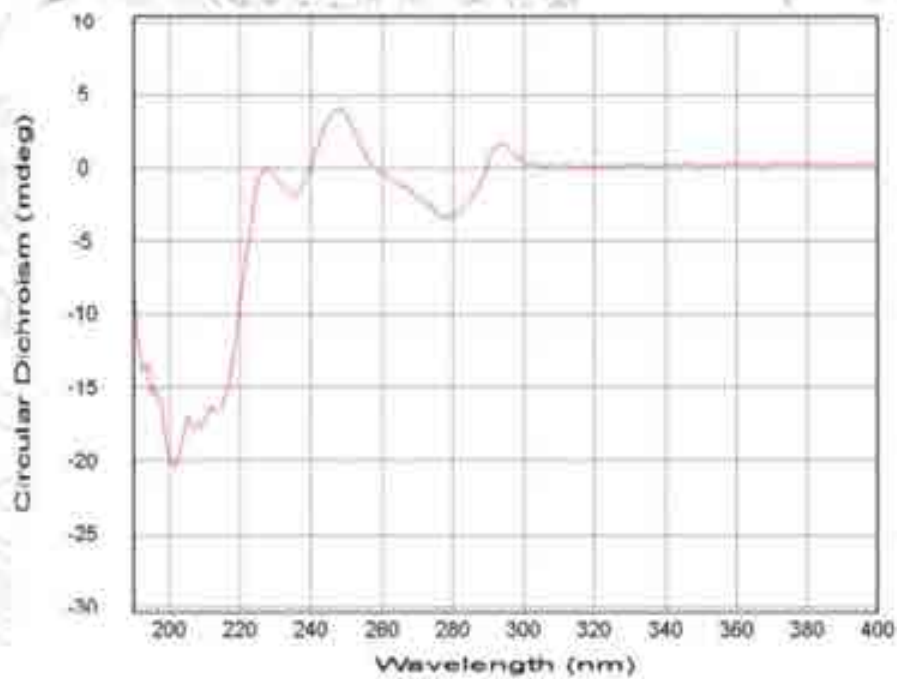
PL7

Phổ NOESY của chất cleistantoxin

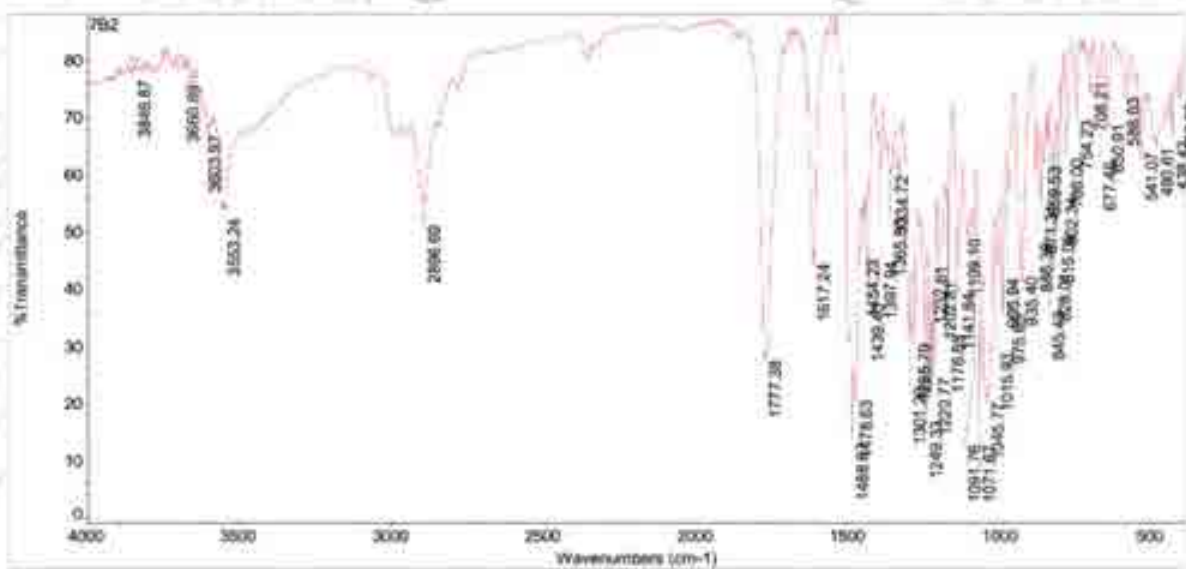
CLEISTANTOXIN-CDC13-NOESY



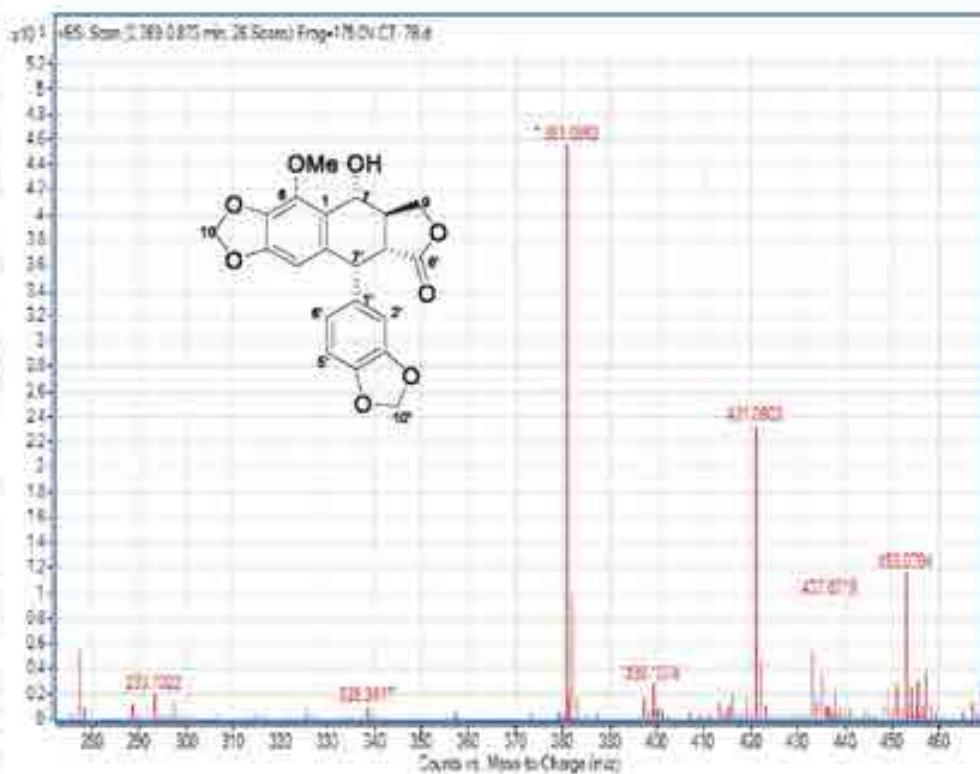
Phổ CD của chất cleistantoxin



Phổ IR của chất cleistantoxin

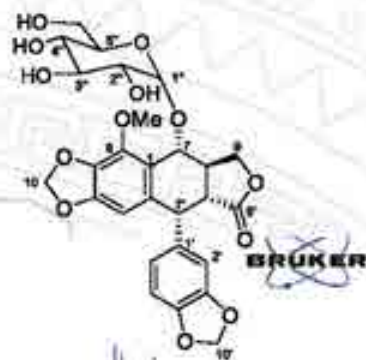


Phổ HRESI-MS của chất cleistantoxin

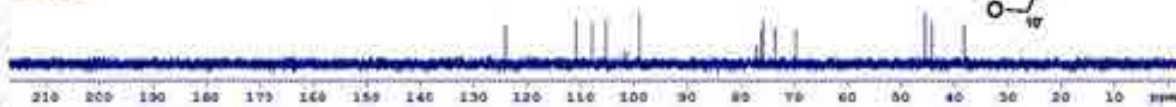


Phổ DEPT của chất cleisindoside D

HONGCT16A-CDCl3-C13CPD &DEPT



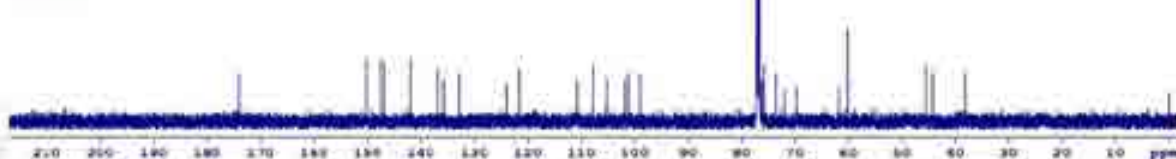
DEPT90



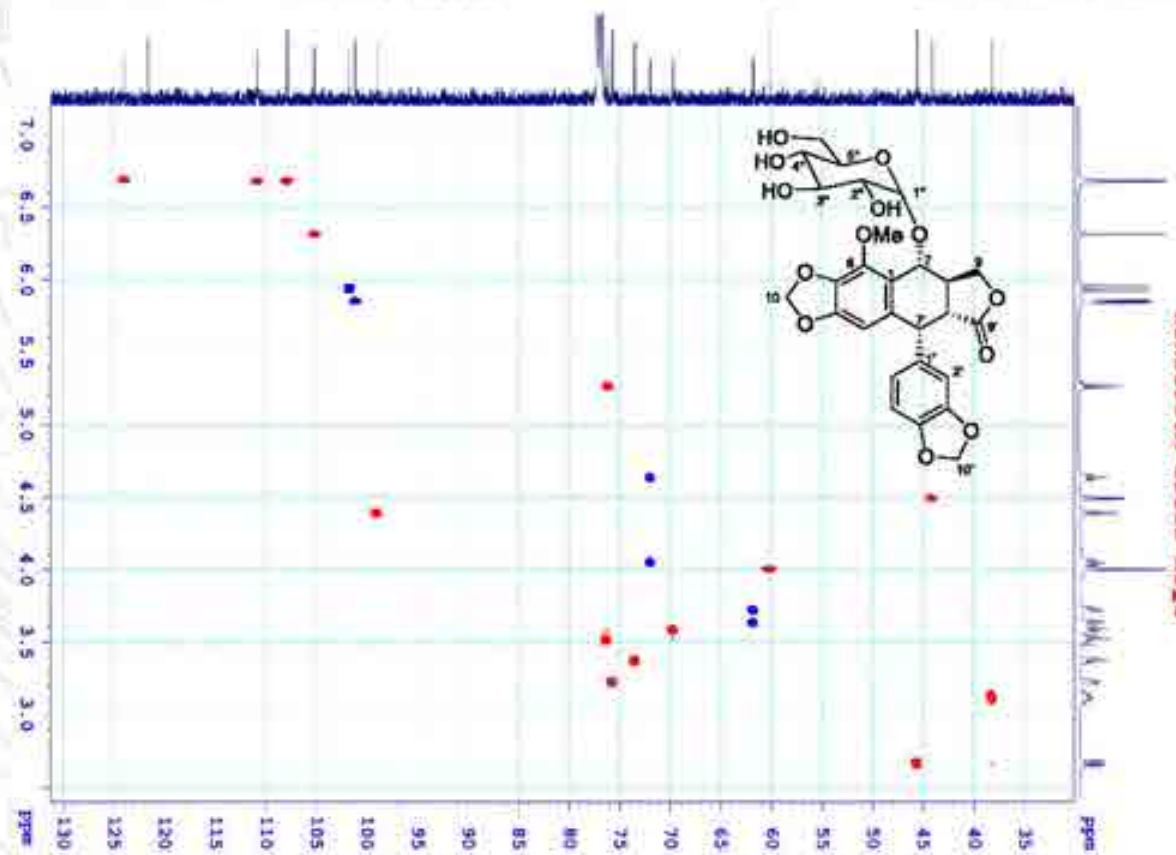
DEPT135



13CPD

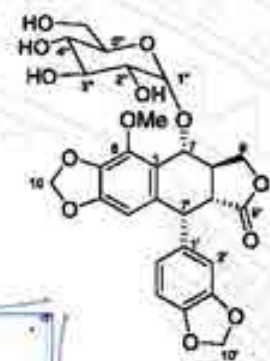
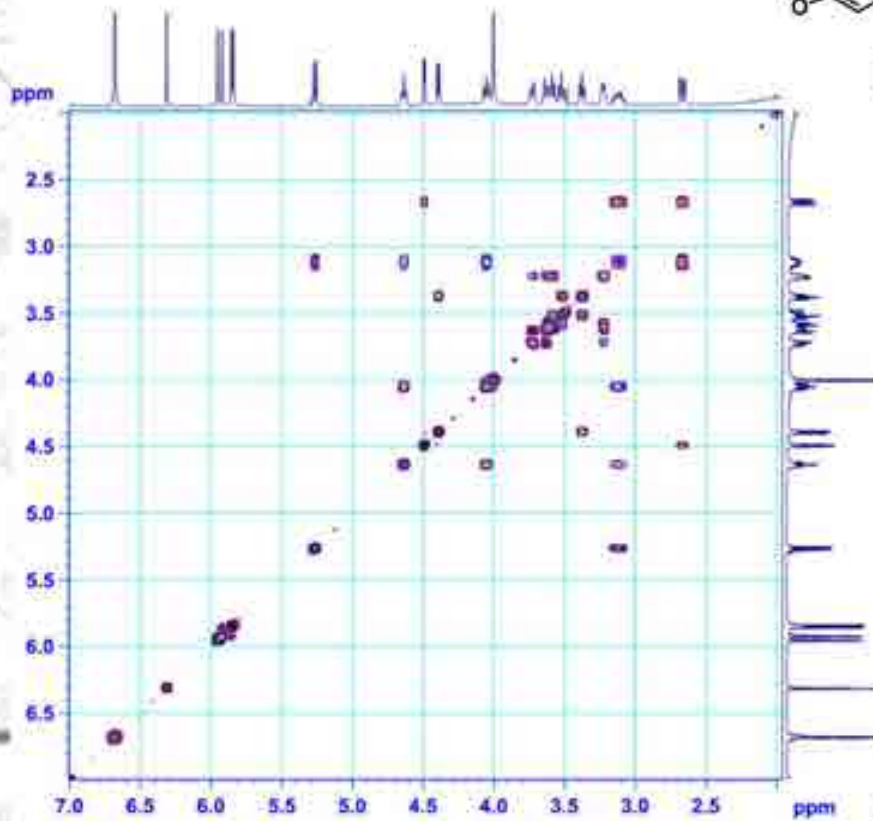


Phổ HSQC của chất cleisindoside D

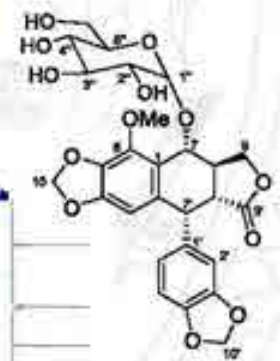
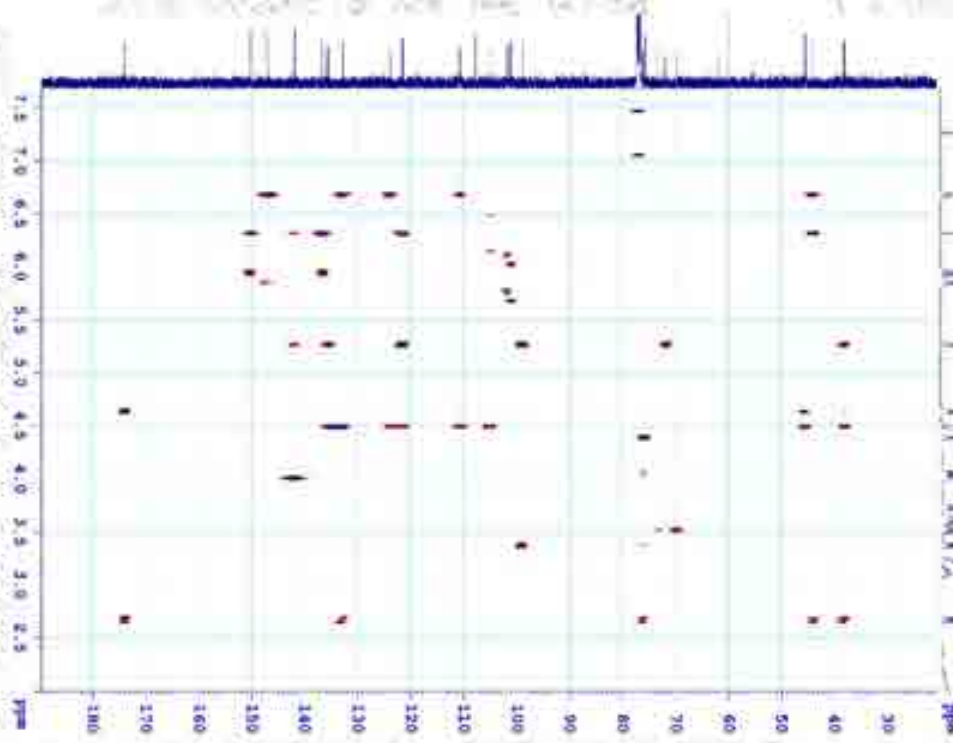


Phổ COSY của chất cleisindoside D

HONGCT16A-CDC13-COSYGP

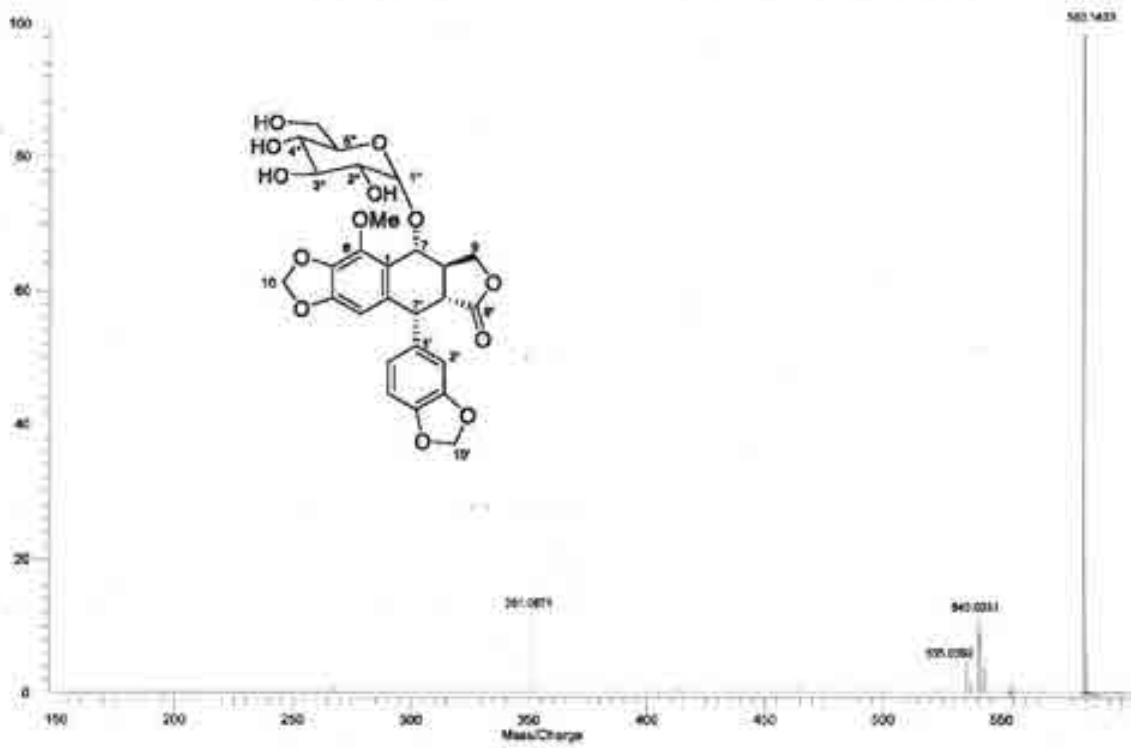


Phổ HMBC của chất cleisindoside D



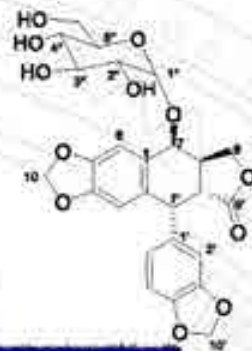
HONGCT16A-CDC13-ANBOC

Phổ HRESI-MS của chất cleisindoside D

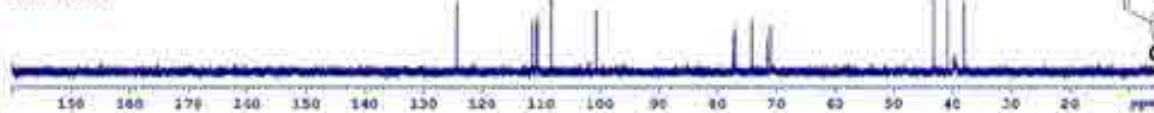


Phổ DEPT của hợp chất cleisindoside A

10M16CT18A-DMSO-C13CPD & DEPT

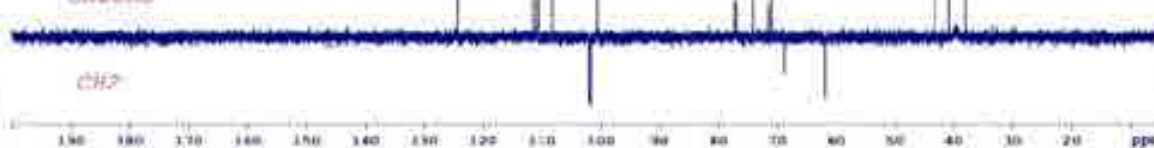


DEPT90

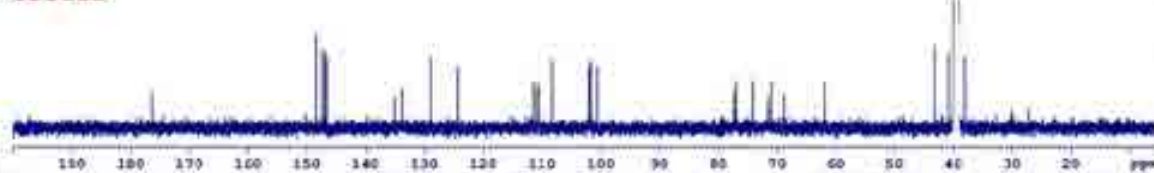


DEPT135

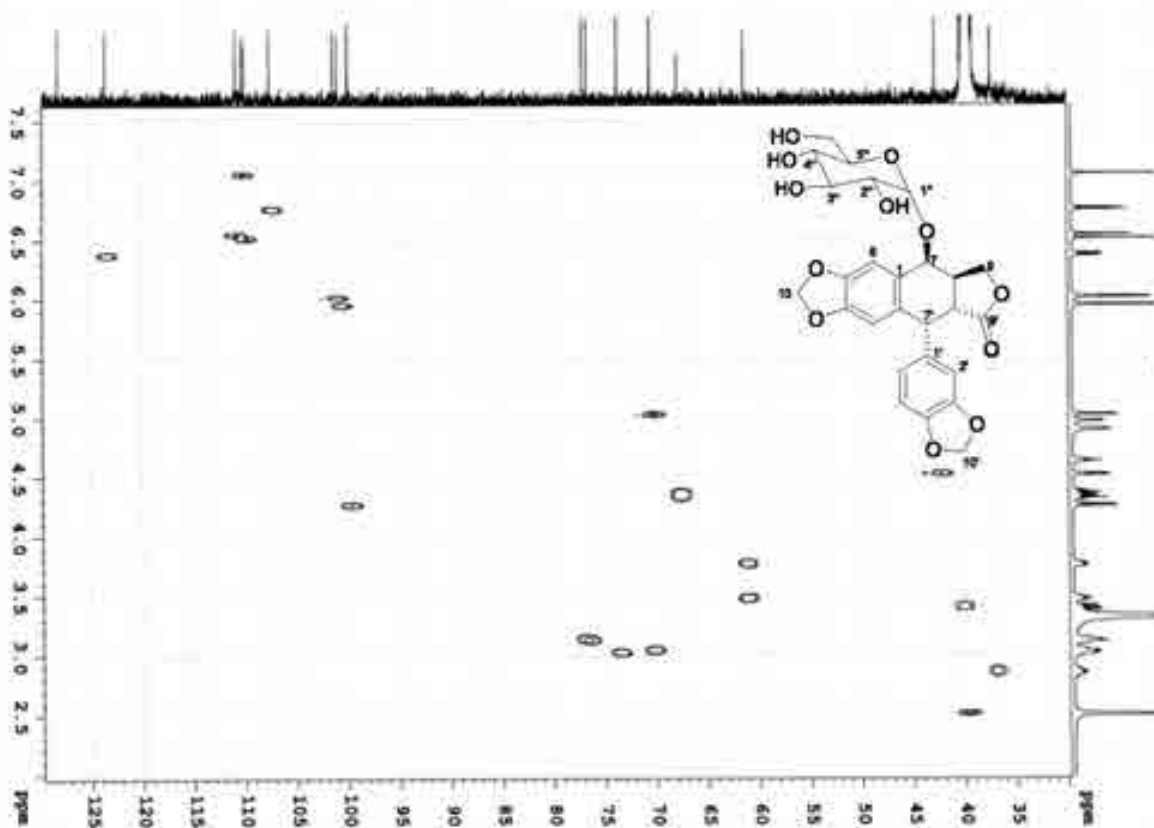
CH₃/CH



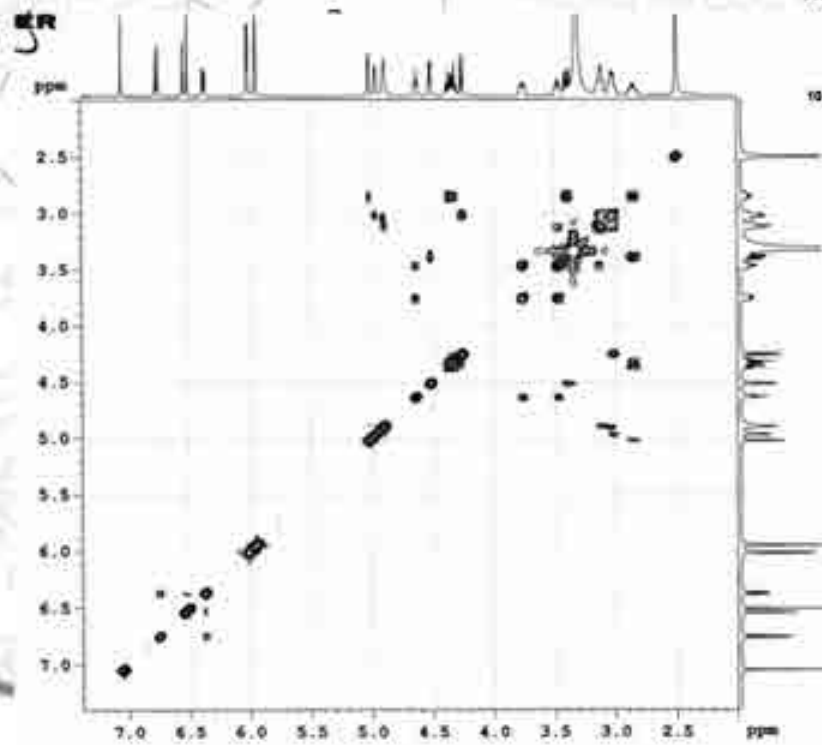
C13CPD



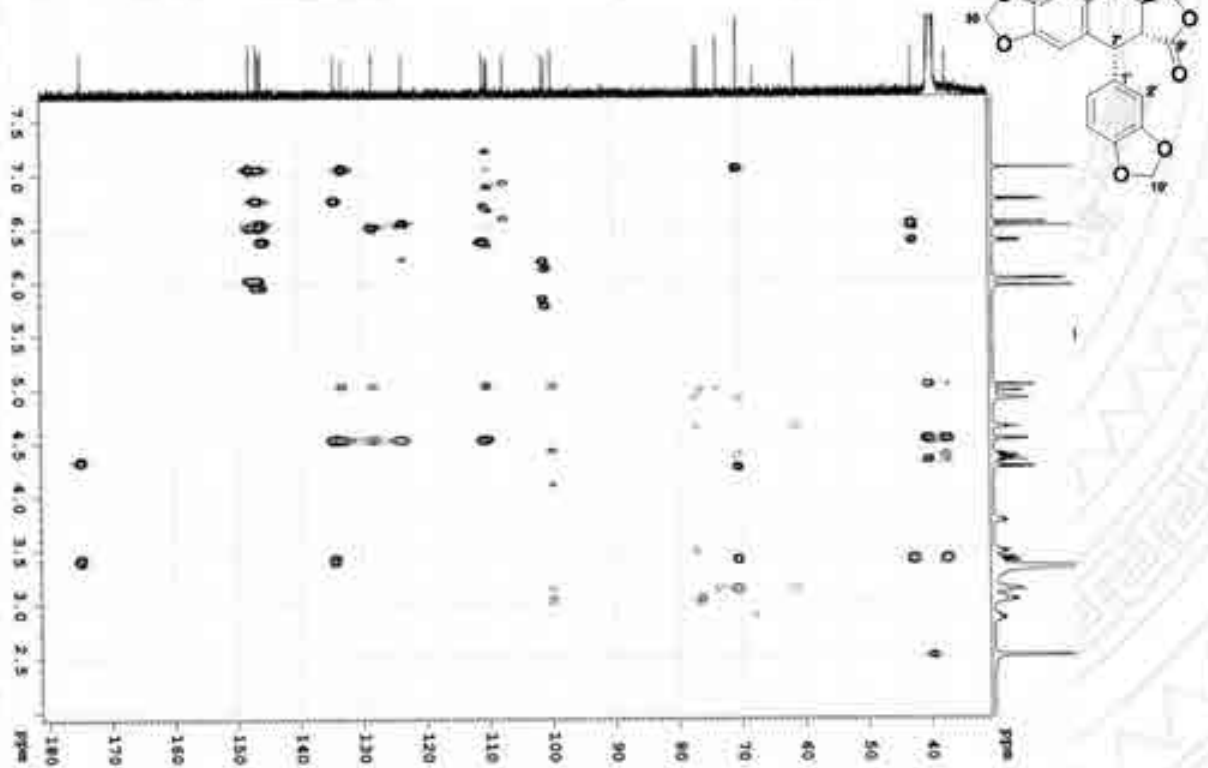
Phổ HSQC của chất cleisindoside A



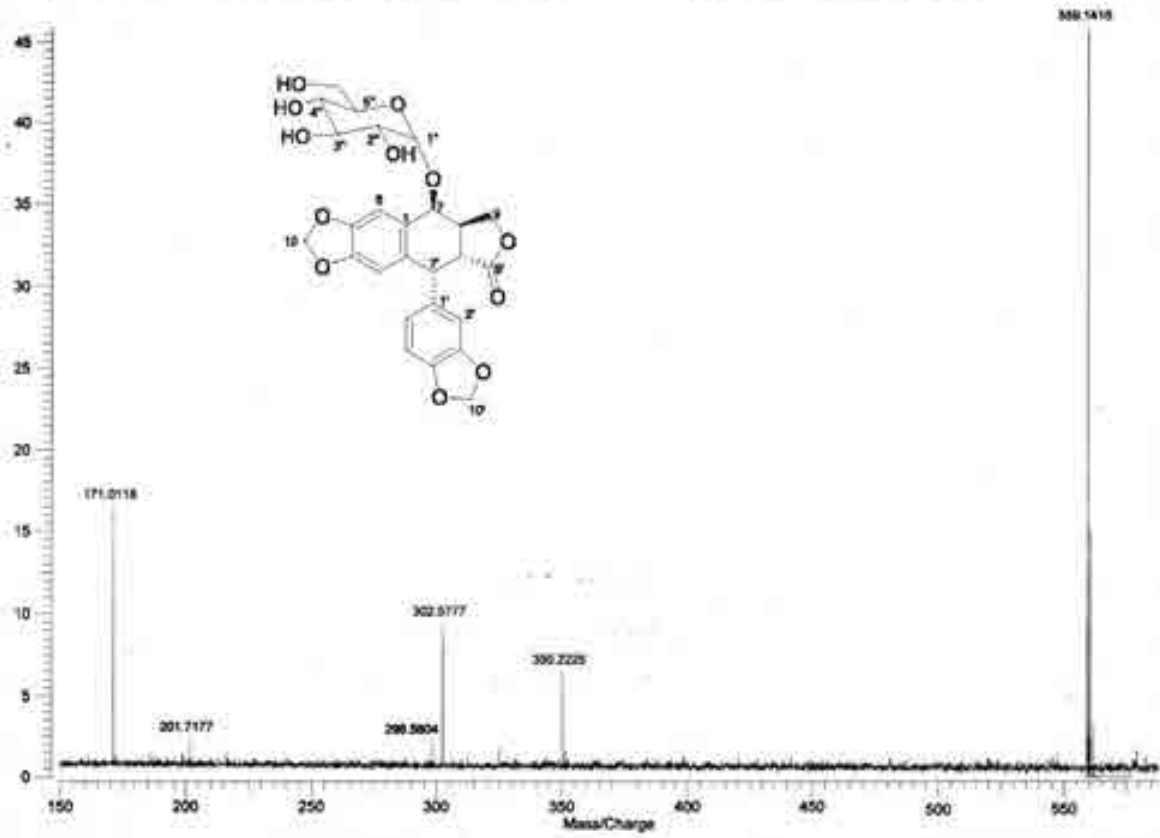
Phổ COSY của chất cleisindoside A



Phổ HMBC của chất cleisindoside A



Phổ HRESI-MS của chất cleisindoside A

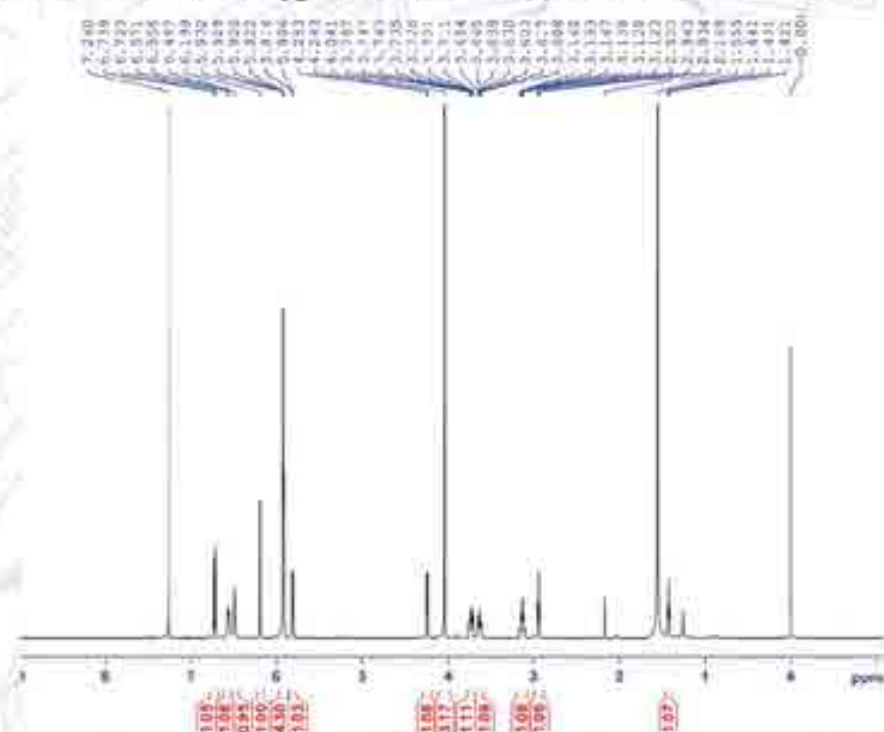


PHỤ LỤC 1.6- PHỔ CỦA CHẤT NEO-CLEISTANTOXIN
Dữ liệu phổ NMR của chất neo-cleistantoxin [79]

STT	CT4				Neo-cleistantoxin [79]		
	C	$\delta_c^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J, Hz)	HMBC (H→C)	$\delta_c^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J, Hz)
1		119,7	C	-	-	119,7	-
2		131,6	C	-	-	131,6	-
3		104,4	CH	6,20 s	C5, C-7'	104,4	6,20 s
4		150,1	C	-	-	150,1	-
5		135,2	C	-	-	135,2	-
6		140,5	CH	-	-	140,5	-
7		72,1	CH	5,81 d (5,0)	C6, C-9'	72,1	5,81 br. d (5,0)
8		46,6	CH	3,16 m	C1	46,6	3,13 m
9		59,4	CH ₂	3,73 m, 3,63 m	C-8	59,4	3,62 br. dd (8,0, 10,5) 3,71 br. dd (7,5, 10,5)
10		101,3	CH ₂	5,93 br s	C4, C-5	101,3	5,92 d (1,0), 5,93 d (1,0)
1'		135,2	C	-	-	135,2	-
2'		109,8	CH	6,49 br s	C-7'	109,8	6,49 br s
3'		147,7	C	-	-	147,7	-
4'		147,0	C	-	-	147,0	-
5'		108,2	CH	6,73 d (8,0) ^a	C-1', C-3'	108,2	6,73 d (9,0)
6'		122,7	CH	6,56 d (8,0)	C-4', C-7'	122,7	6,56 br d (9,0)
7'		43,2	CH	4,24 d (5,0)	C-9'	43,2	4,24 d (4,5)
8'		47,2	CH	2,94 t (5,0)	C2	47,2	2,94 ddd (1,0, 4,5; 4,5)
9'		175,7	C=O	-	-	175,7	-
10'		101,1	CH ₂	5,92 br s	C-4', C-3'	101,1	5,93 br s
OMe-6		60,3	-	4,04 s	C6	60,3	4,04 s

^aCDCl₃, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Phổ ¹H-NMR của hợp chất Neo-cleistantoxin

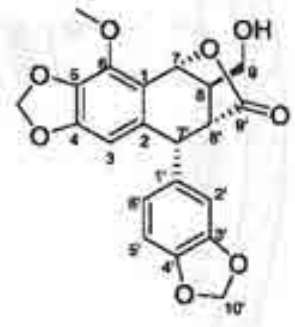
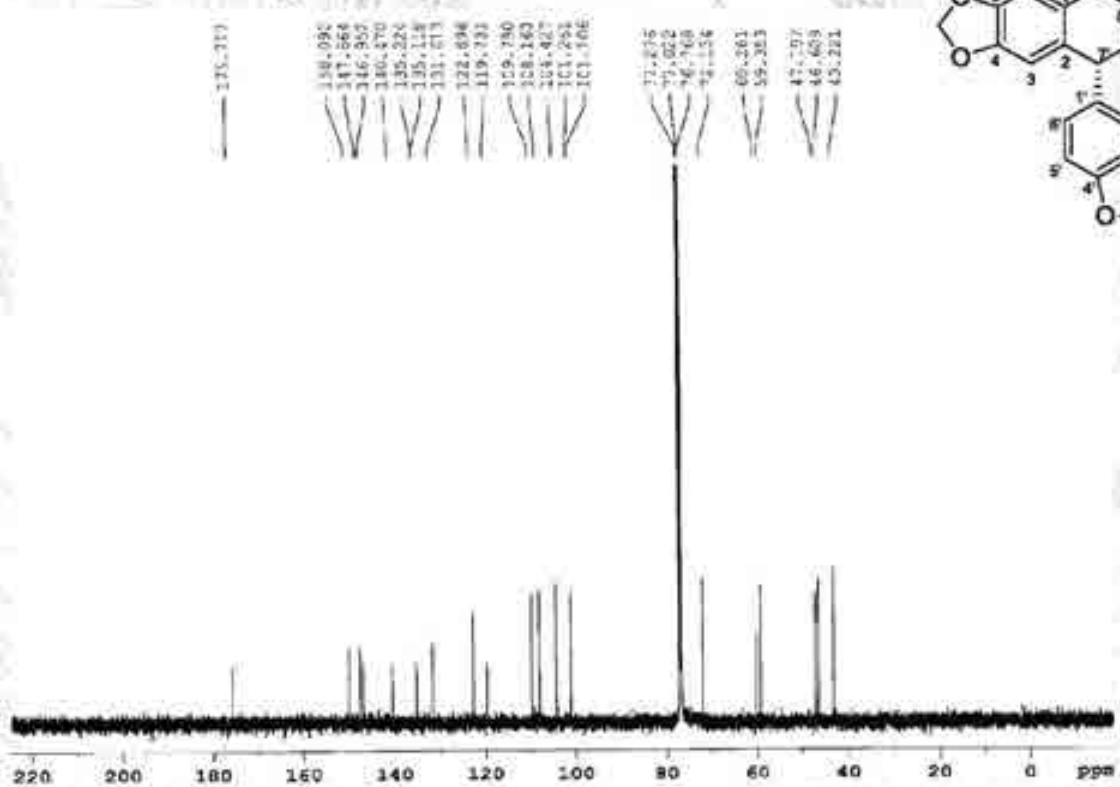


```

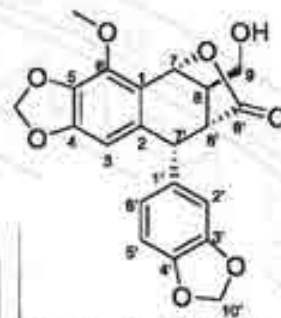
===== CHANNEL f1 =====
NAME: 04_1300047
PROC: 14
PR: 11.90 MHz
PULP: (1.0000000) 0
--- Processing parameters ---
SI: 613.26
SF: 500.136277 MHz
AQ: 0.50
RG: 1
RG2: 1.32 Hz
RG3: 1.00
  
```



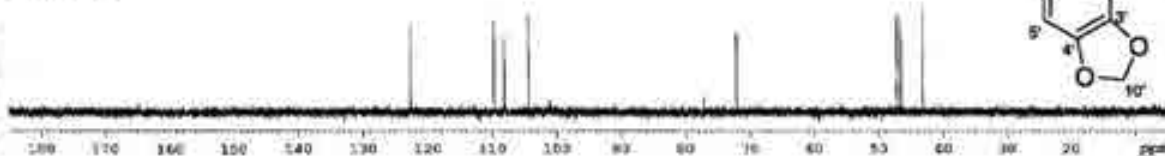
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất Neo-cleistantoxin



Phổ DEPT của hợp chất Neo-cleistantoxin



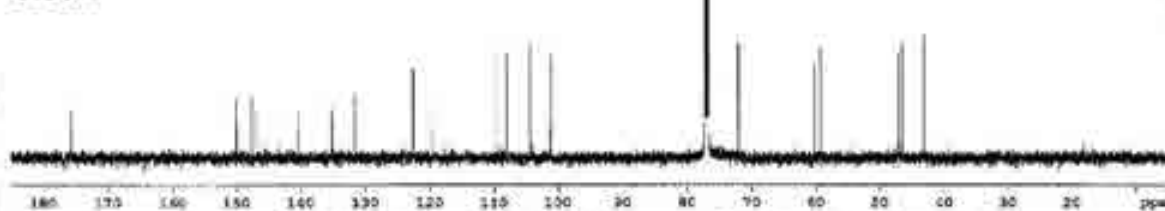
DEPT90



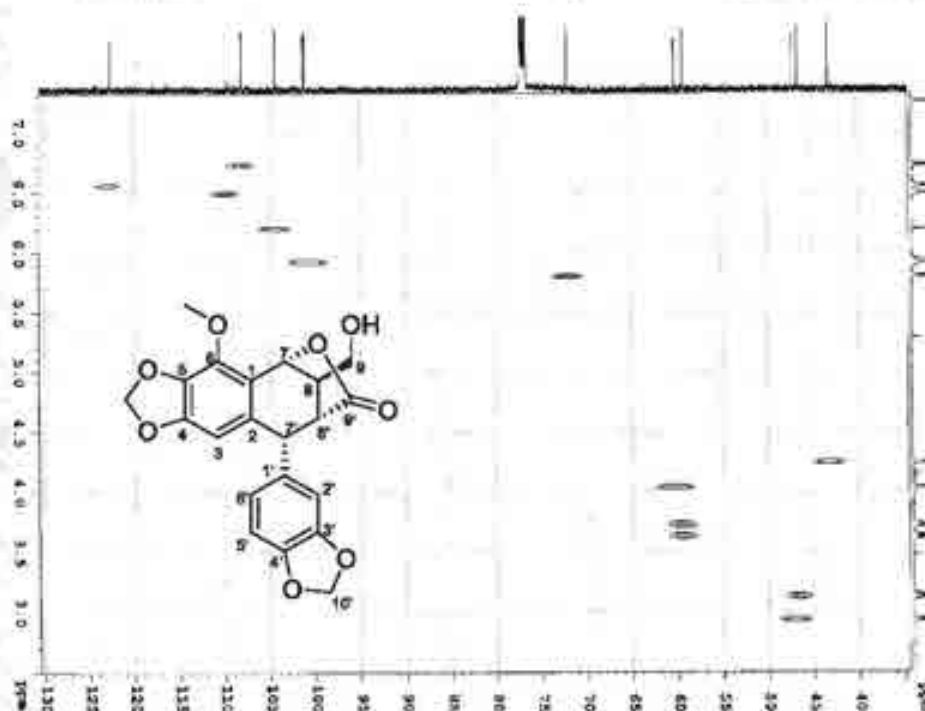
DEPT135



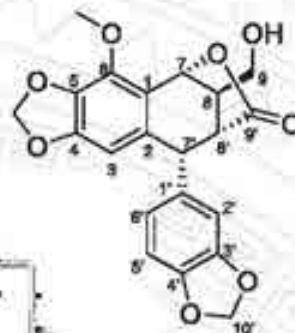
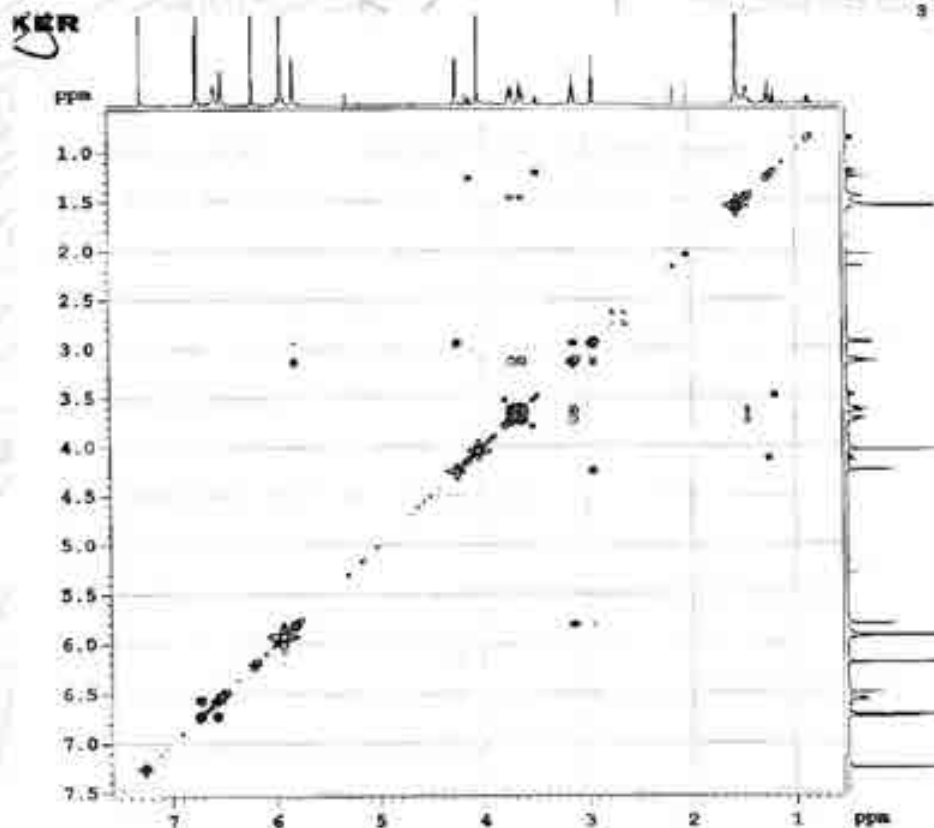
C13CPD



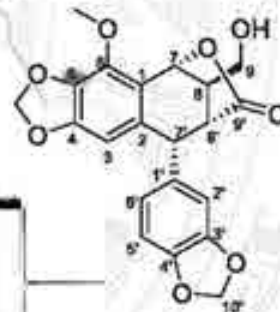
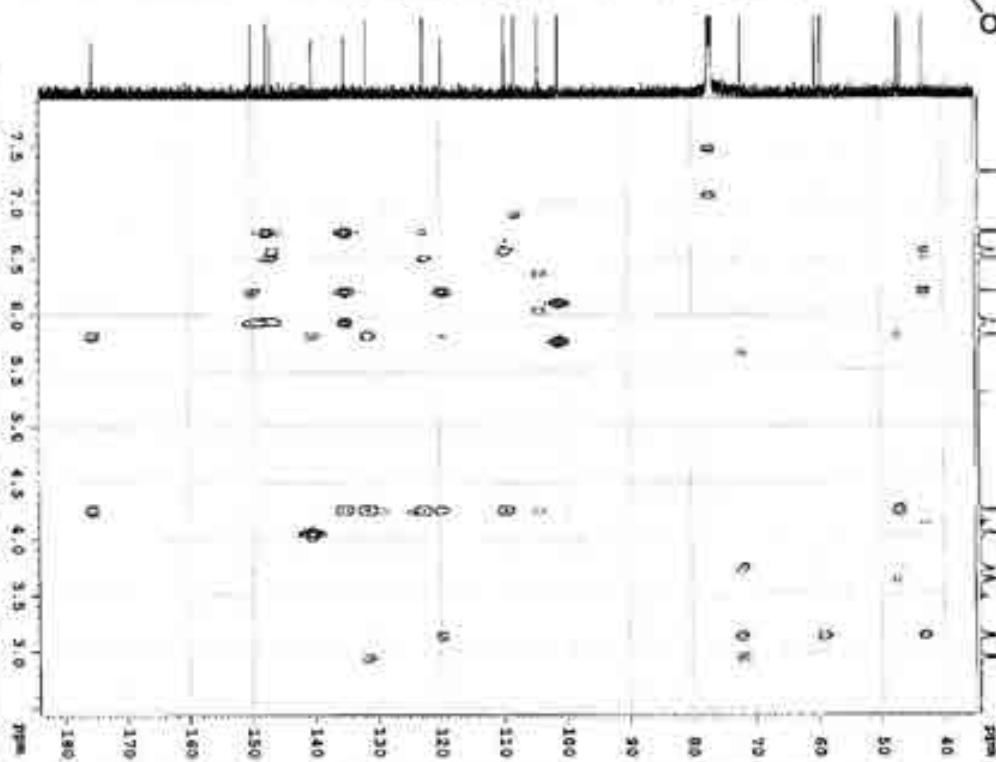
Phổ HSQC của hợp chất Neo-cleistantoxin



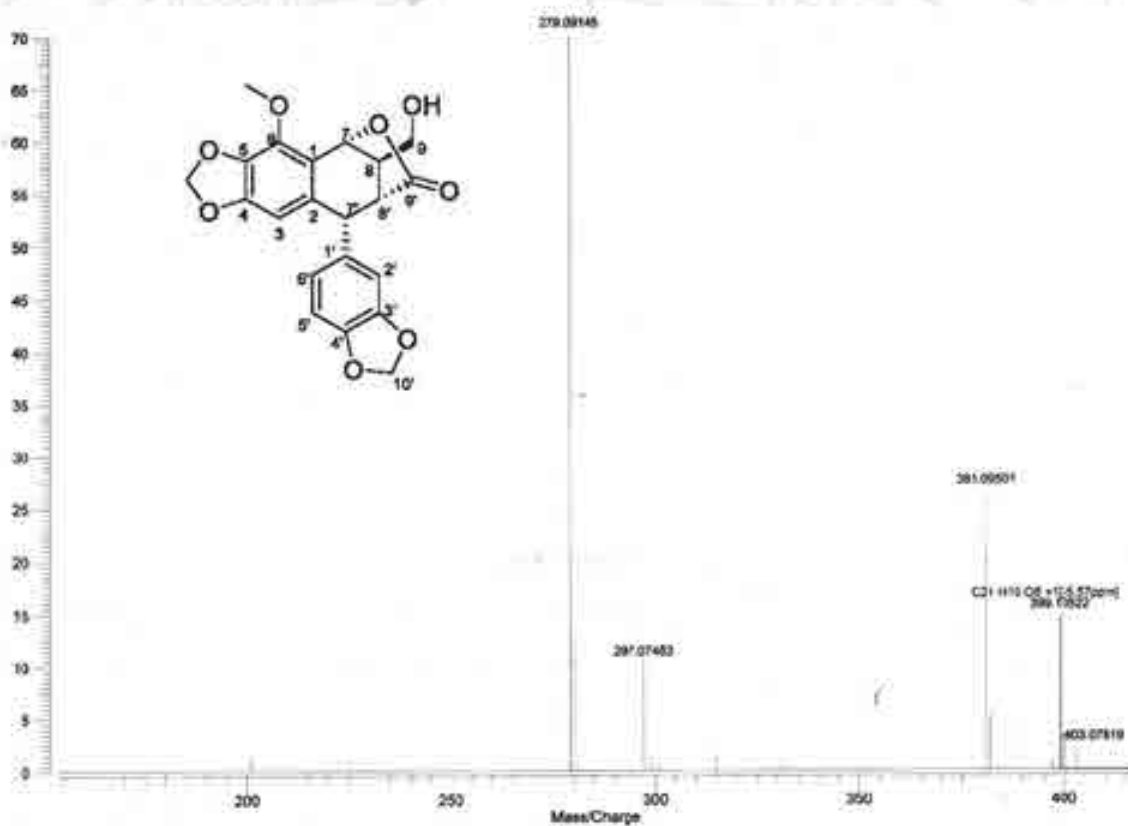
Phổ COSY của hợp chất Neo-cleistantoxin



Phổ HMBC của hợp chất Neo-cleistantoxin

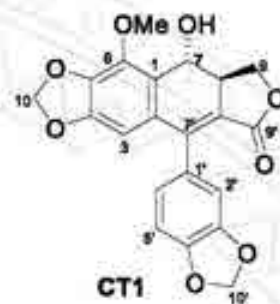


Phổ HRESI-MS của chất Neo-cleistantoxin

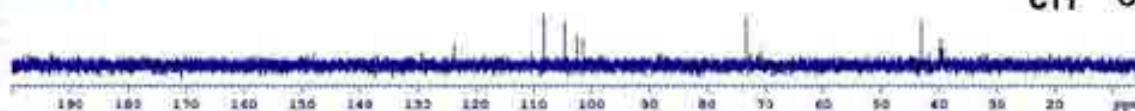


Phổ DEPT của chất CT1 (7',8'-dehydrocleistanxin)

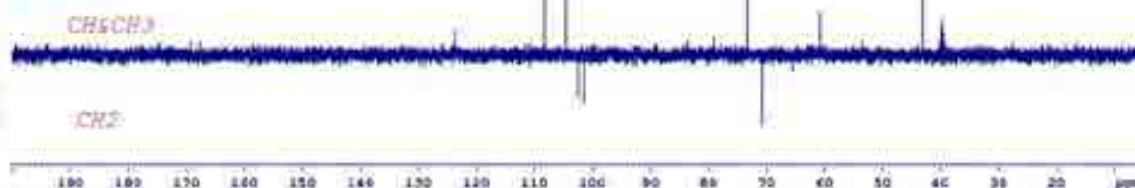
HONGI 7D15CT8A1 - DMSO - C13CPD & DEPT



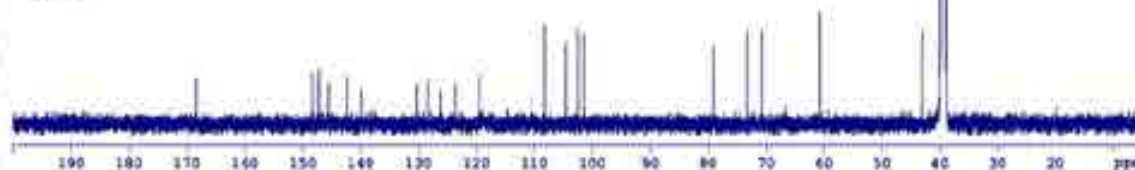
DEPT90



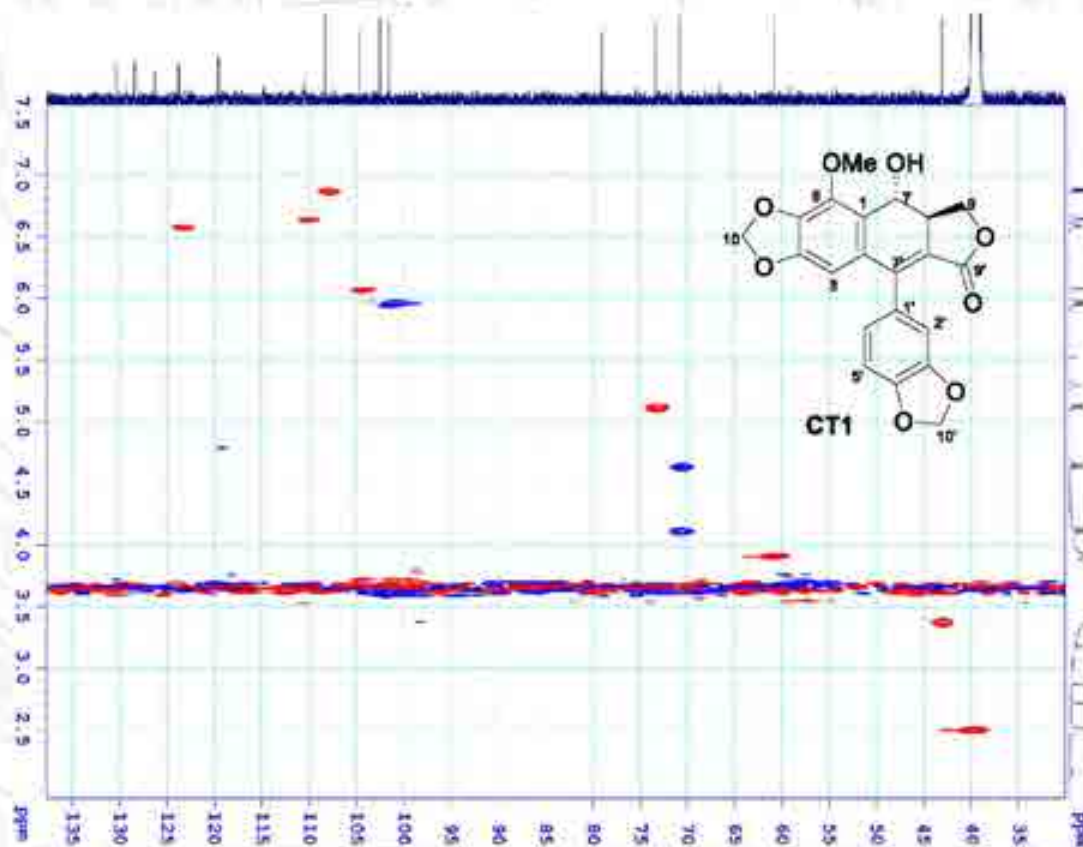
DEPT135



C13CPD

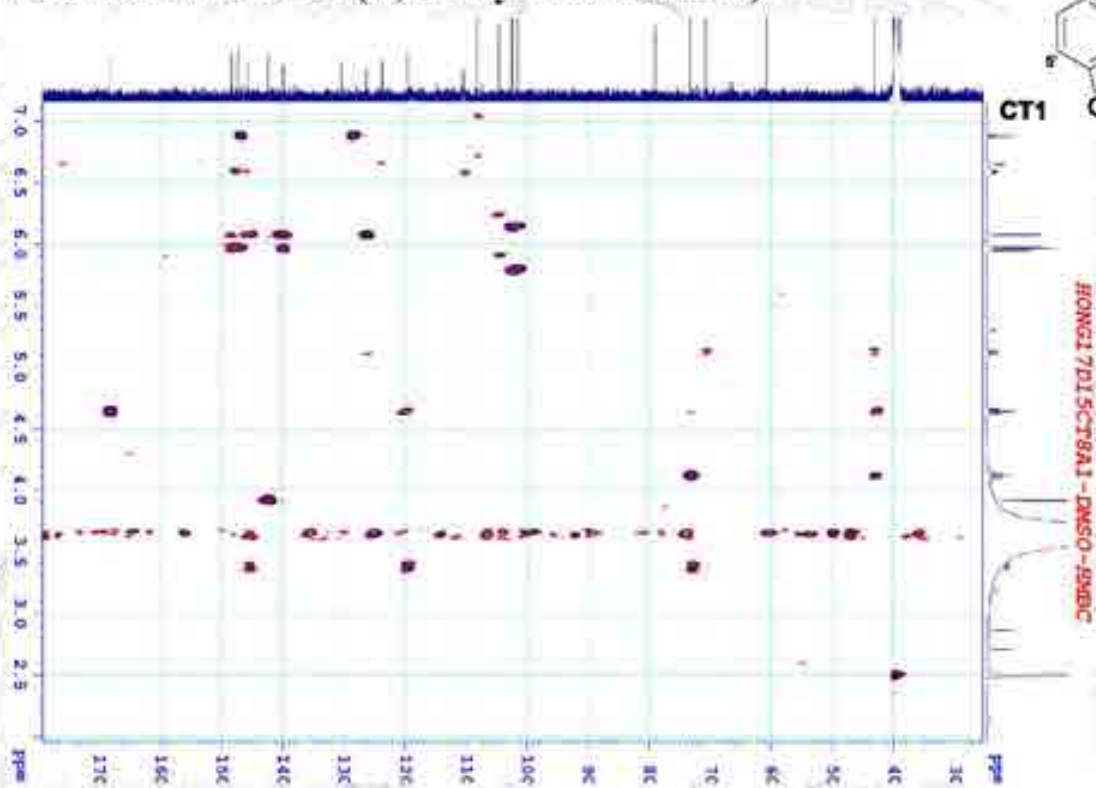


Phổ HSQC của chất CT1 (7',8'-dehydrocleistanxin)



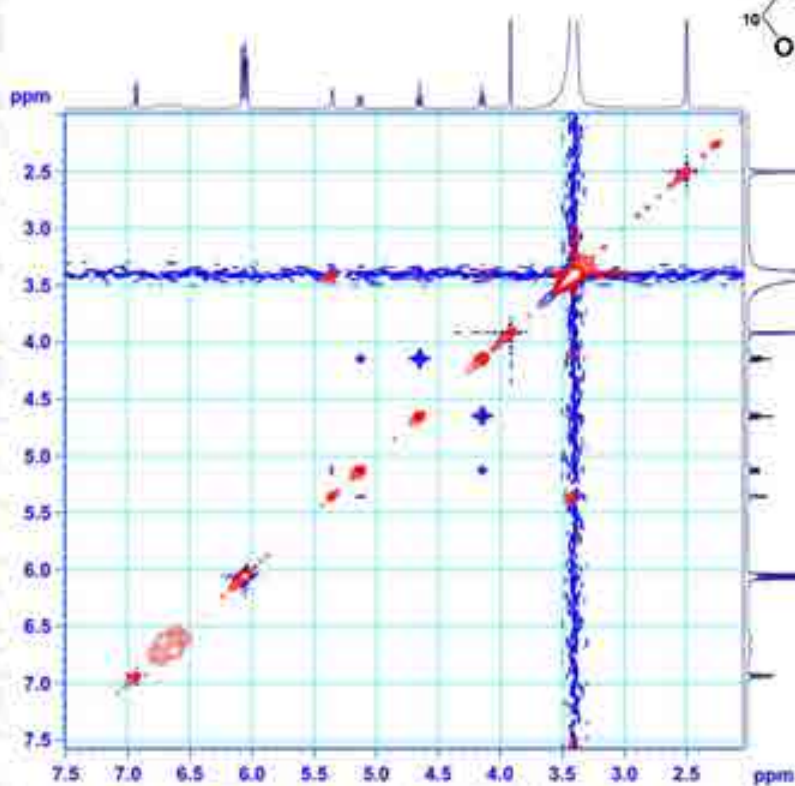
HONGI 7D15CT8A1 - DMSO - HSQC

Phổ HMBC của chất CT1 (7',8'-dehydrocleistantoxin)



Phổ NOESY của chất CT1 (7',8'-dehydrocleistantoxin)

17D15CT8A1 - DMSO-NOESY



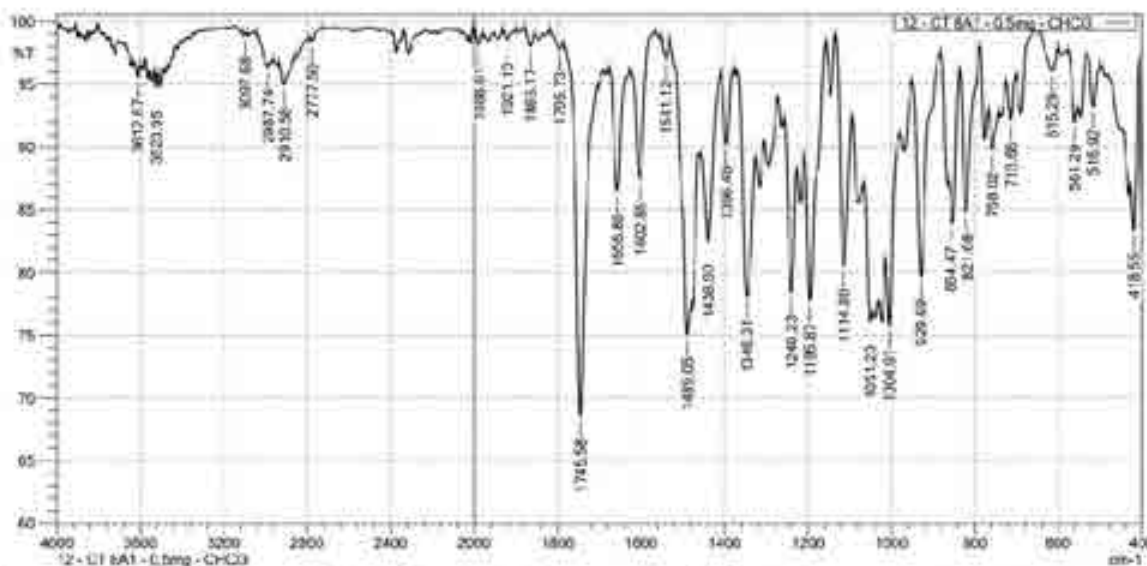
Phổ IR của chất CT1 (7',8'-dehydrocleistan toxin)

8/1/2018 2:24:41 PM

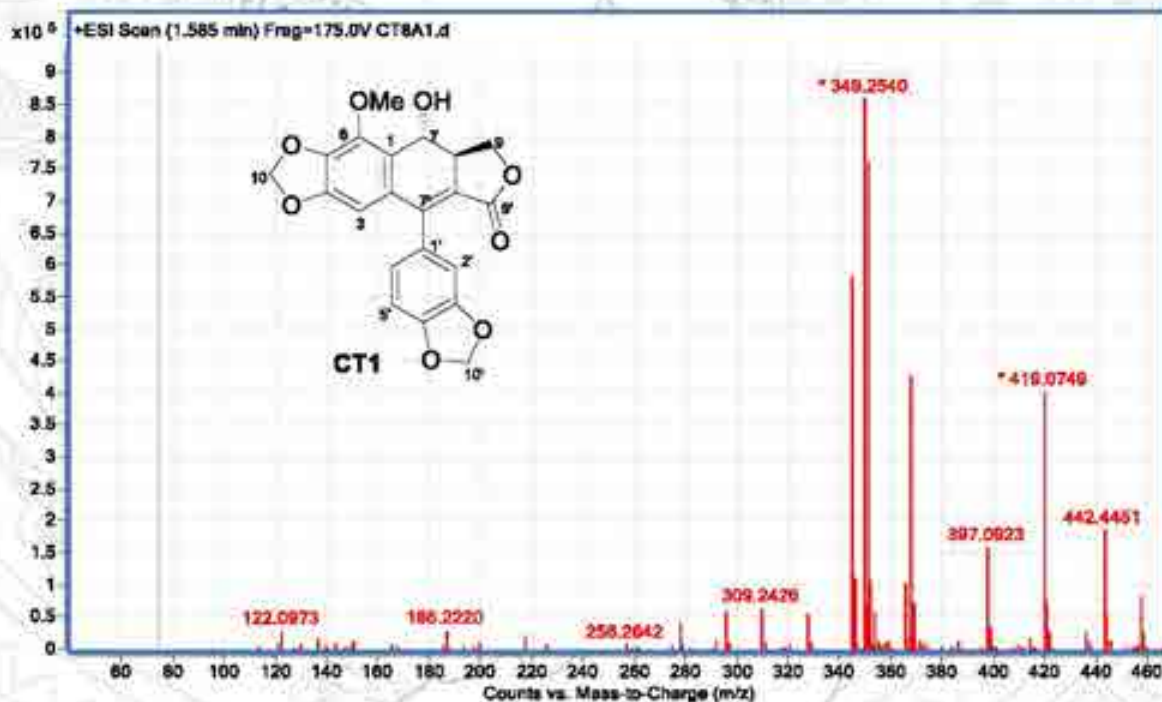
Instrument: FTIR Affinity - 1R

Department of Inorganic Chemistry, HUS-VNUJ

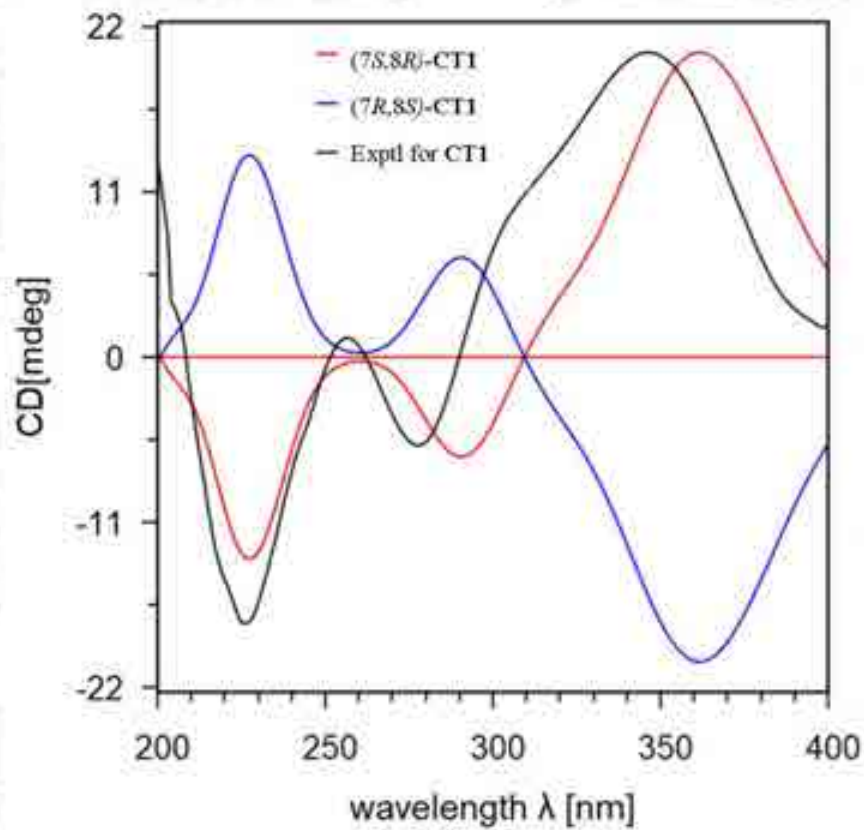
SHIMADZU



Phổ HRESI-MS của chất CT1 (7',8'-dehydrocleistan toxin)



Phổ CD và phổ ECD tính toán của 2 đồng phân 7S,8R và 7R,8S



PHỤ LỤC 1.8. PHỔ CỦA CHẤT CT2 (CLEISTONKISIDE A)

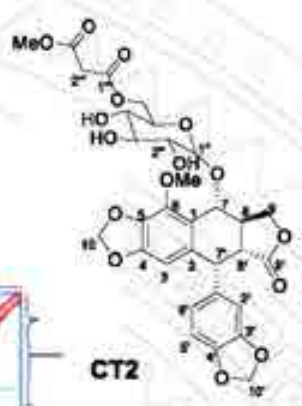
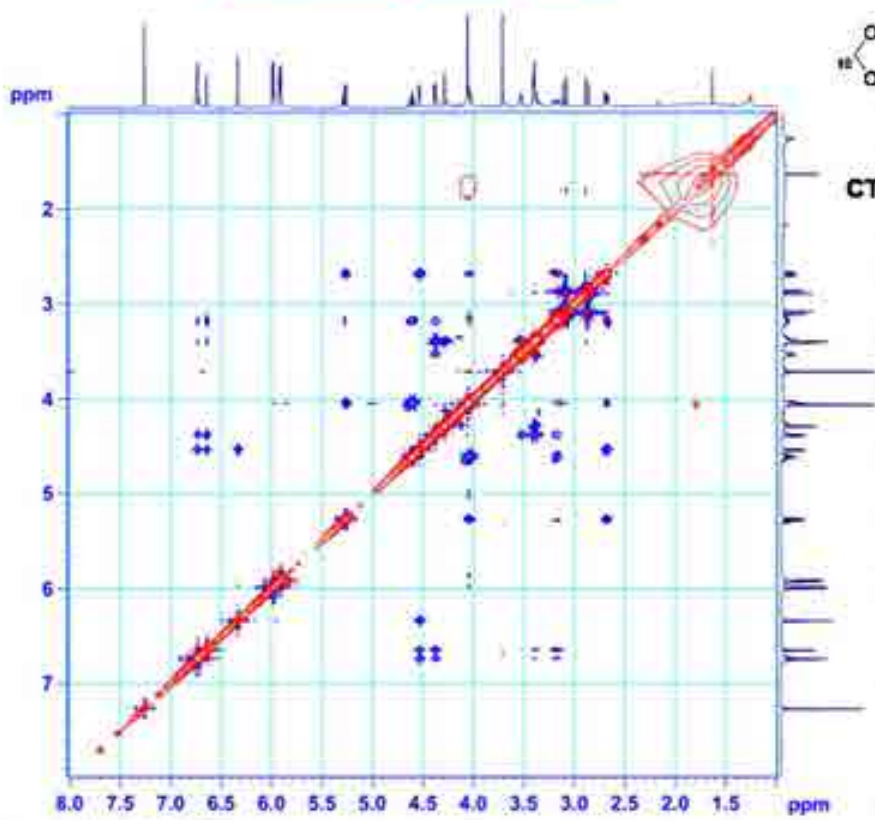
Dữ liệu phổ NMR của CT2: (Cleistonkaside A)

C	δ_c	DEPT	δ_H^{*c} (mult., J, Hz)	HMBC (H→C)
1	121,5	C	-	-
2	135,9	C	-	-
3	105,4	CH	6,34 s	C-1, C-4, C-5, C-7
4	150,4	C	-	-
5	137,0	C	-	-
6	141,9	C	-	-
7	76,4	CH	5,28 d (10,0)	C-1, C-2, C-6, C-8, C-9, C-1'
8	37,5	CH	3,15 m	C-7, C-7', C-9
9	71,9	CH ₂	4,61 dd (8,0; 8,0), 4,06 dd (8,0; 9,0)	C-7, C-8, C-8'
10	101,8	CH ₂	5,99 br s; 5,98 br s	C-4, C-5
1'	132,9	C	-	-
2'	110,7	CH	6,64 br s	C-4', C-6', C-7'
3'	147,5	C	-	-
4'	146,9	C	-	-
5'	107,9	CH	6,73 d (8,0)	C-1', C-3', C-4'
6'	124,0	CH	6,74 d (8,0)	C-2', C-4', C-7'
7'	44,3	CH	4,53 d (4,5)	C-1, C-3, C-8, C-2', C-8'
8'	45,5	CH	2,68 dd (4,5, 14,5)	C-8, C-7, C-1', C-7', C-9'
9'	173,9	C=O	-	-
10'	101,3	CH ₂	5,92 br s; 5,91 br s	C-3', C-4'
1''	98,1	CH	4,38 d (7,5)	C-7
2''	73,3	CH ₂	3,35 m	C-4'', C-8''
3''	76,8	CH	3,53 m	C-4'', C-8''
4''	68,8	CH	3,37 m	C-2'', C-3''
5''	73,8	CH	3,40 m	C-3''
6''	64,2	CH	4,28 m	C-1''
1'''	166,6	C=O	-	-
2'''	40,4	CH ₂	2,87 d (15,5); 3,10 d (15,5)	C-1'''
3'''	166,8	C=O	-	-
OCH ₃ -6	60,2	CH ₃	4,06 s	C-7
OCH ₃ -3'''	52,6	CH ₃	3,71 s	C-3'''

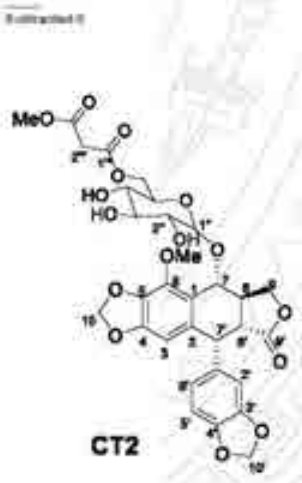
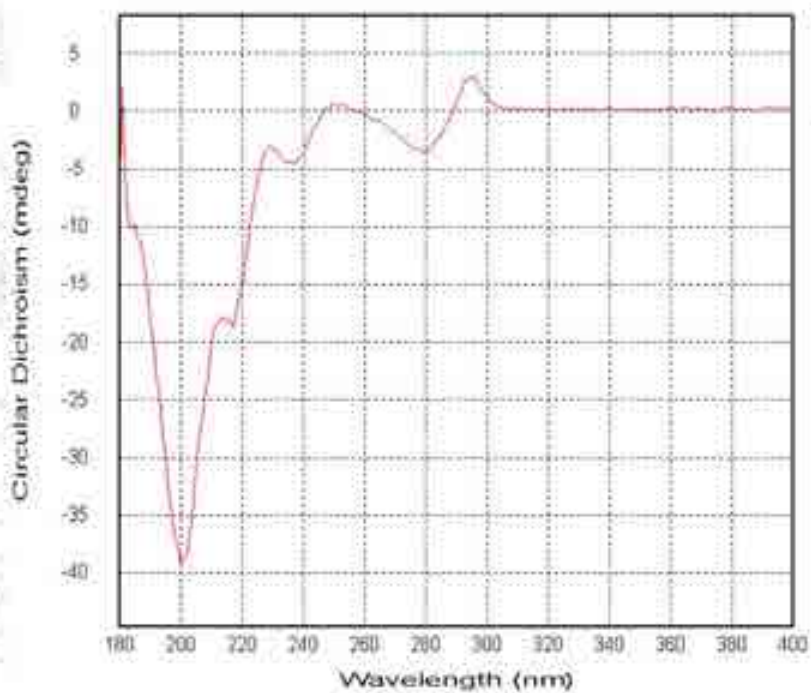
(¹H: 500MHz, ¹³C: 125MHz, CDCl₃)

Phổ NOESY của chất CT2: (Cleistonkaside A)

18M16CT18B-CDCl3-NOESY



Phổ CD của chất CT2: (Cleistonkaside A)

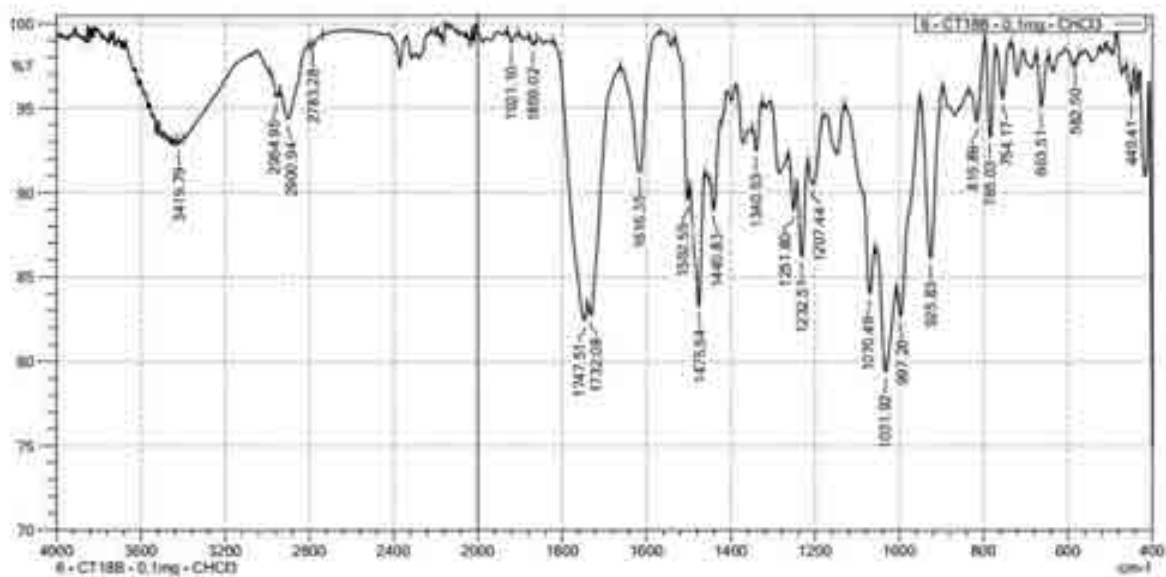


Phổ IR của chất CT2: (Cleistonkaside A)

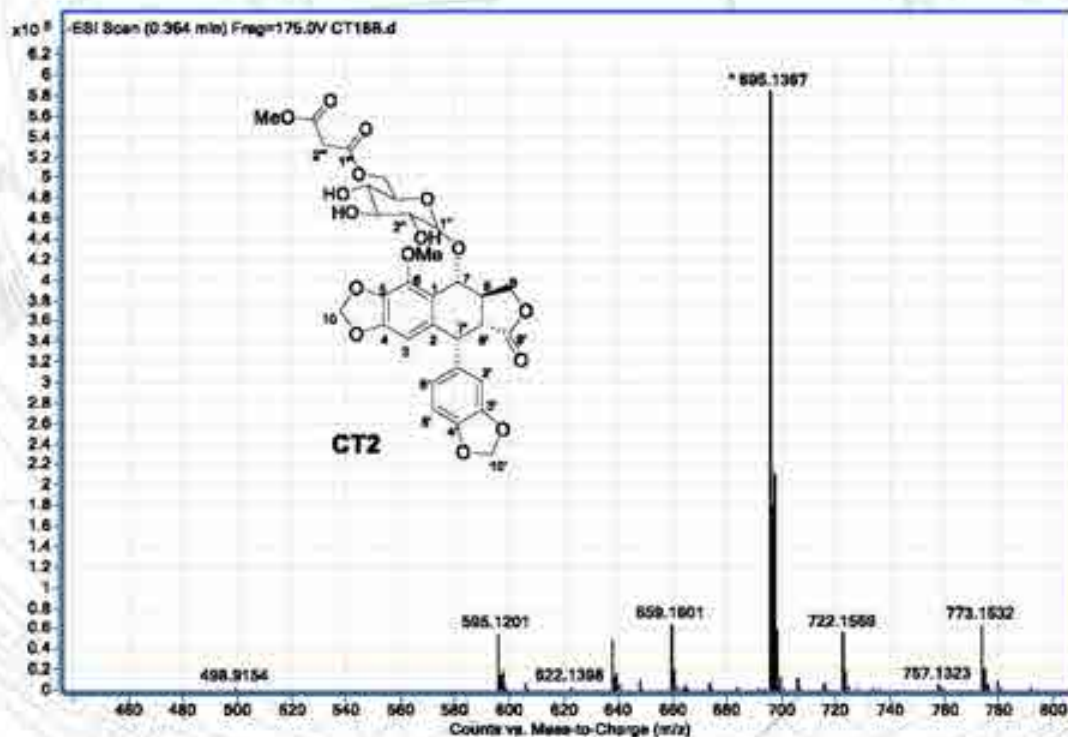
8/11/2018 1:53:35 PM
Instrument: FTIR Affinity - JIS

Department of Inorganic Chemistry, HUS-VNU

SHIMADZU



Phổ HRESI-MS của chất CT2: (Cleistonkaside A)



PHỤ LỤC 1.9. PHỔ CỦA CHẤT CT3 (CLEISTONKININ A)

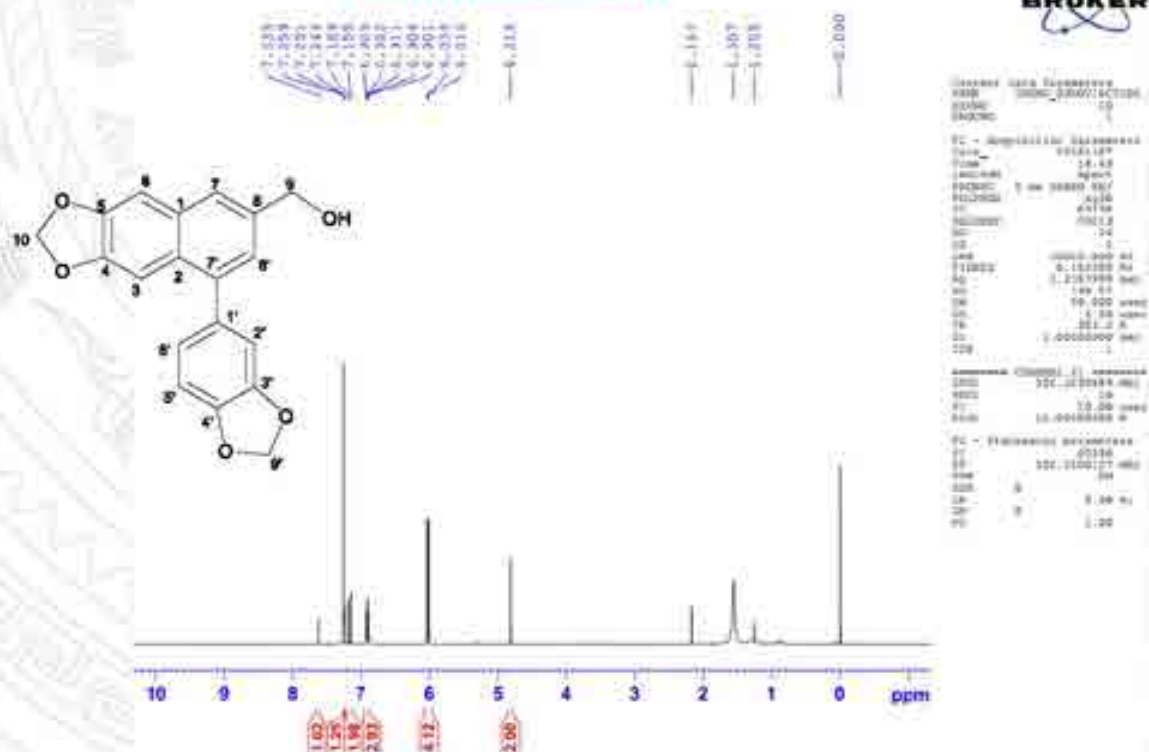
Dữ liệu phổ NMR của CT3: (cleistonkinin A)

C	δ_c	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J, Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
1	131,1	C	-	-
2	128,4	C	-	-
3	102,4	CH	7,19 s	C-1, C-5, C-7
4	148,0	C	-	-
5	147,7	C	-	-
6	104,2	CH	7,16 s	C-2, C-4, C-7
7	124,5	CH	7,64 br. s.	C-2, C-6, C-9, C-8'
8	136,4	C	-	-
9	65,5	CH	4,82 s	C-8, C-8'
10	101,1	CH	6,04 s	C-4, C-5
1'	134,8	C	-	-
2'	110,4	CH	6,92 d (1,0)	C-4', C-6'
3'	147,6	C	-	-
4'	147,0	C	-	-
5'	108,3	CH	6,91 d (8,0)	C-1'
6'	123,2	CH	6,89 dd (1,5; 8,0)	C-7'
7'	139,6	C	-	-
8'	124,9	CH	7,25 d (1,5)	C-2, C-7, C-1'
9'	101,1	CH	6,02 s	C-3', C-4'

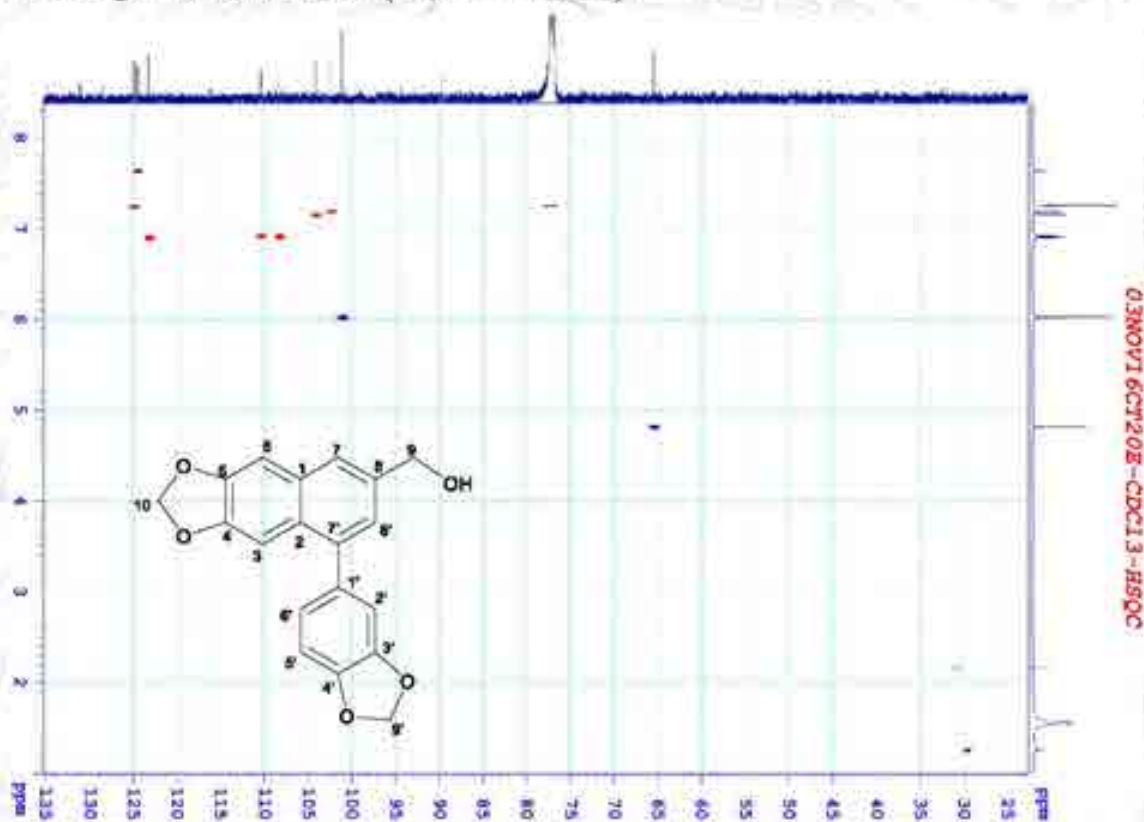
¹³CDCl₃, ¹³C 125 MHz, ¹H 500 MHz.

Phổ ¹H-NMR của chất CT3: (cleistonkinin A)

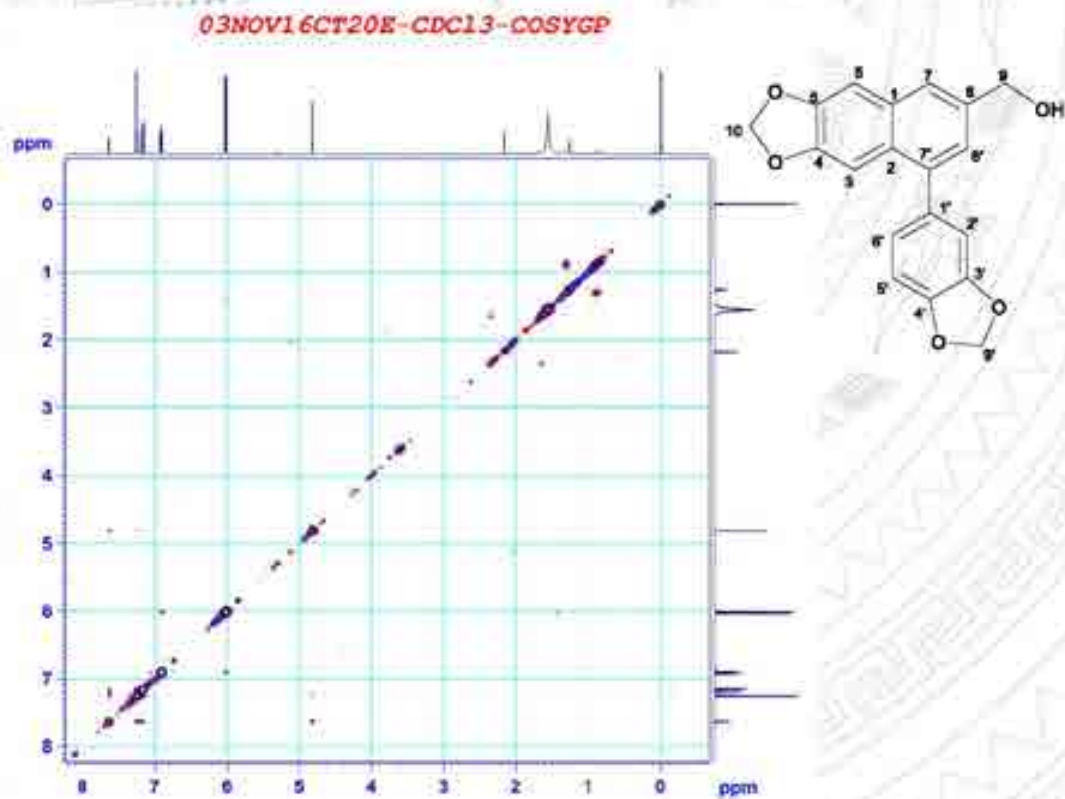
03NOV16CT20E-CDC13-1H



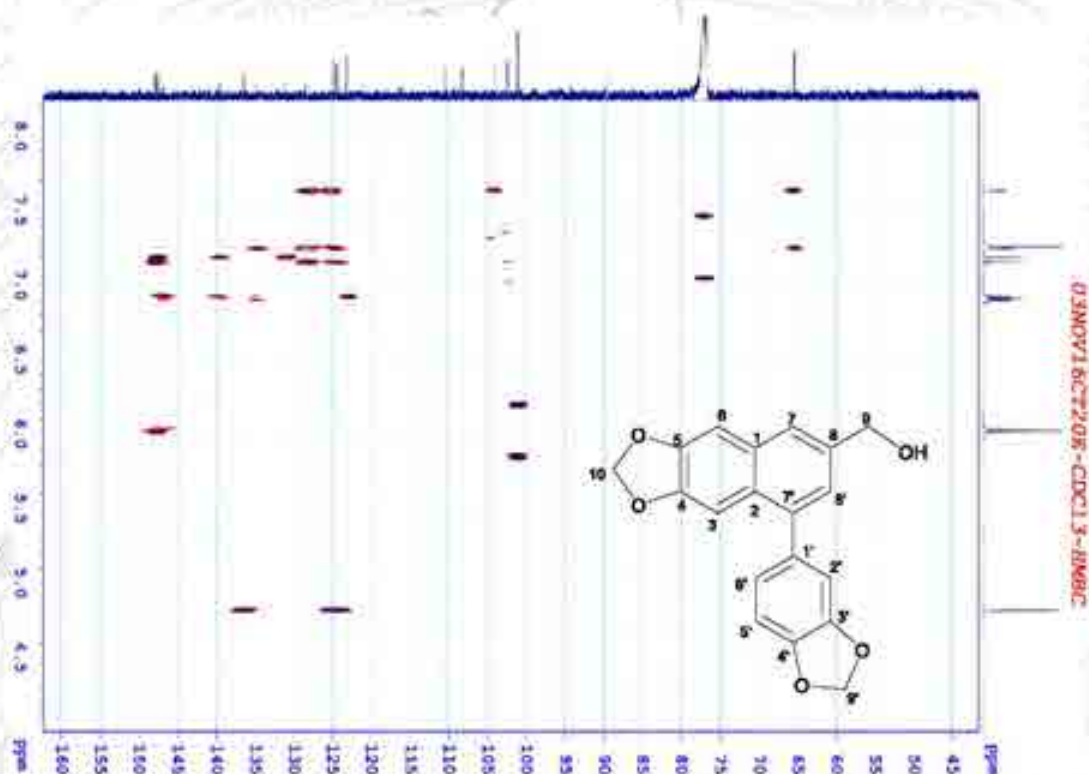
Phổ HSQC của chất CT3: (cleistonkinin A)



Phổ COSY của chất CT3: (cleistonkinin A)



Phổ HMBC của chất CT3: (cleistonkinin A)

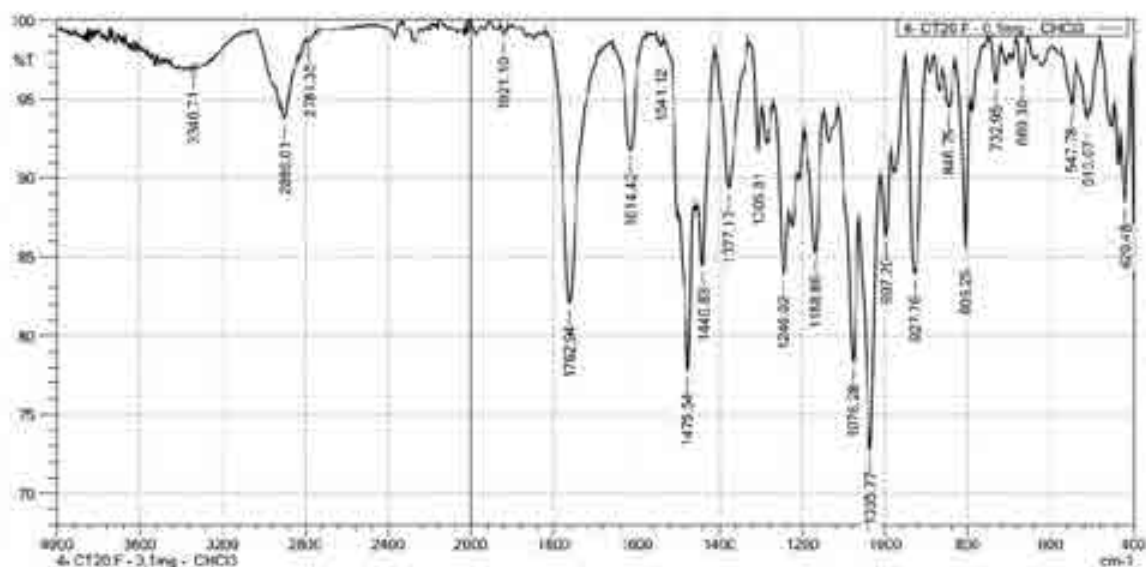


Phổ IR của chất CT3: (cleistonkinin A)

2/11/2018 1:44:14 PM
Instrument: FTIR Affinity - 15

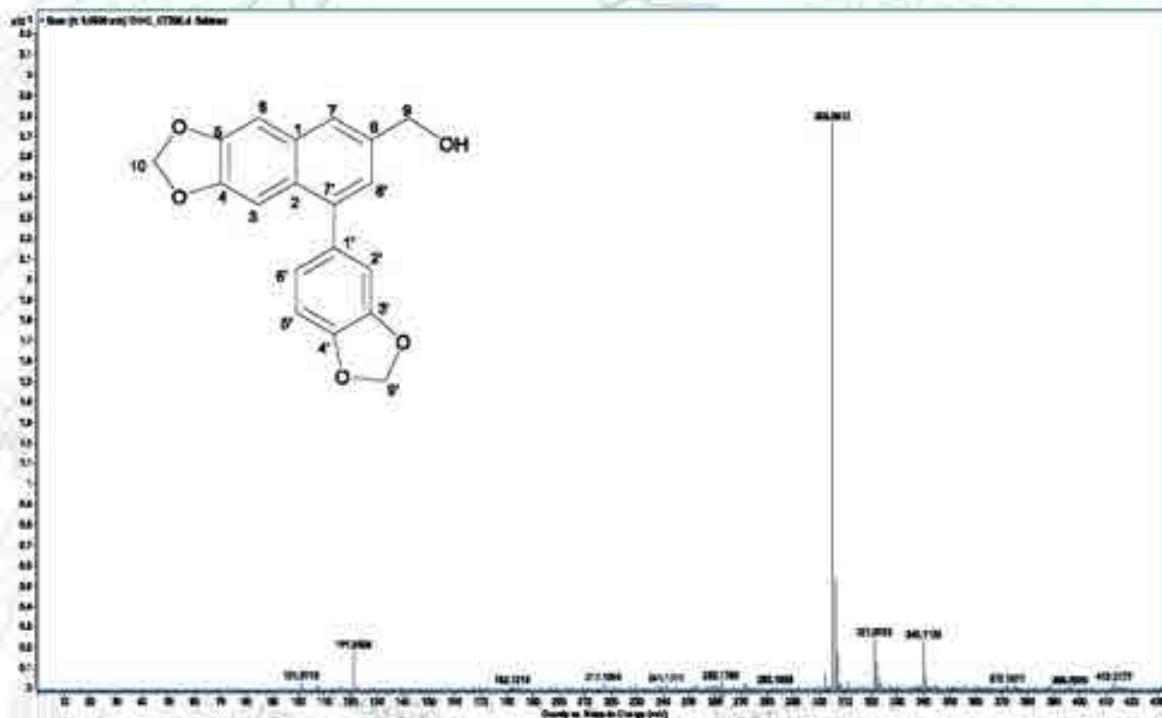
Department of Inorganic Chemistry, HUS-VNU

SHIMADZU



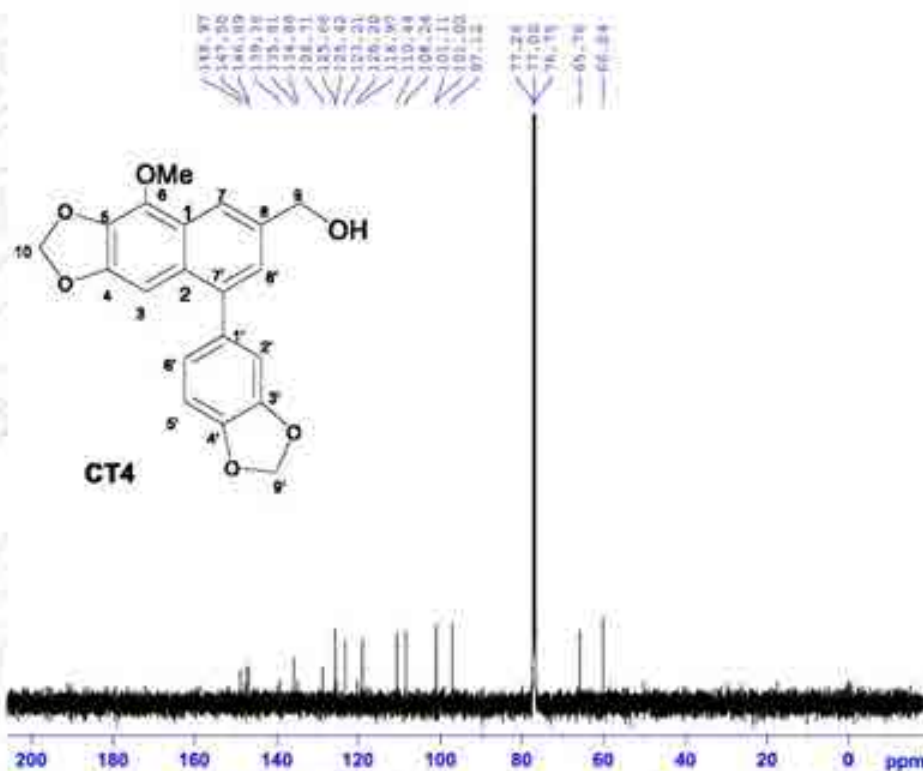
Comment:
File name: C:\Program Files\LabSolutions\JKData\DR\Doc\Line Bmg\4-CT20 F - 0.1mg -
CHCl3.lsp
No of Scan: 20
Intensity Mod. % Transmittance
Max: 400 (204) Min: 4000 (204)
Resolution: 4 [cm-1]
Atmosphere Correction: OFF

Phổ HRESI-MS của chất CT3: (cleistonkinin A)

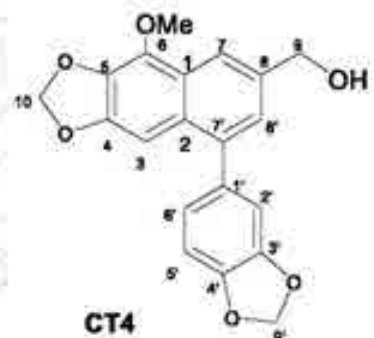


Phổ ^{13}C -NMR của chất CT4: (Cleistonkinin B)

01NOV16CT20D-CDC13-C13CPD



Current Data Parameters
 NAME 200016CT20D
 EXPNO 1
 PROCNO 5
 F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20141119
 Time 18:12
 INSTRUM spect
 PROCRS 5 sw HSWC 80/
 PULPROG zgpg30
 TD 45226
 SOLVENT dms-d
 NS 1024
 DS 4
 SWH 33362.404 Hz
 FIDRES 0.454121 Hz
 AQ 1.1012944 sec
 RG 384.00
 CW 12.820 uA
 DE 4.50 uA
 DC 300.4 E
 DI 2.0000000 sec
 D11 0.2100000 sec
 D12 1



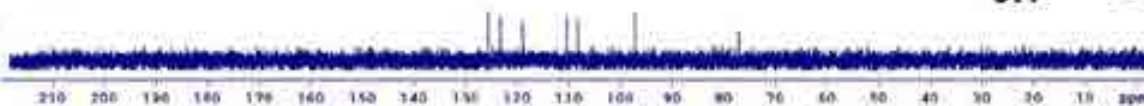
===== CHANNEL f1 =====
 NUCL1 13C
 P1 12.00 uA
 PCAL 88.91000000 W
 ===== CHANNEL f2 =====
 DP02 000.711000000 MHz
 SFO2 125.761375 MHz
 CPDPRG2 zgpg30
 P2 12.00 uA
 PCAL2 88.91000000 W
 F2 - Processing parameters
 GC 32748
 GP 125.7613750 MHz
 SFO 125.761375 MHz
 LB 1.00 Hz
 GB 0
 PC 1.00

Phổ DEPT của chất CT4: (Cleistonkinin B)

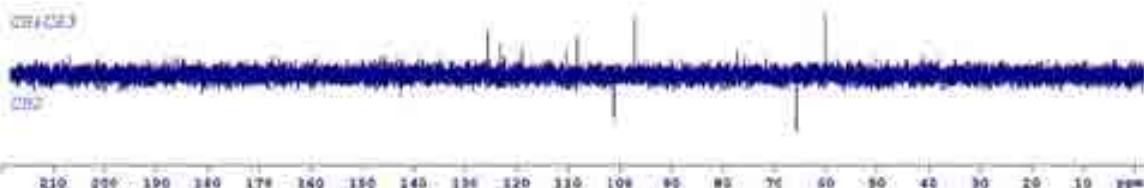
01NOV16CT20D-CDC13-C13CPD & DEPT



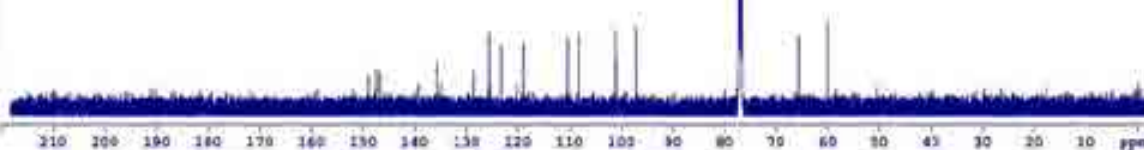
DEPT90

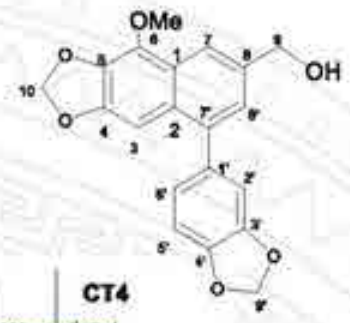


DEPT135

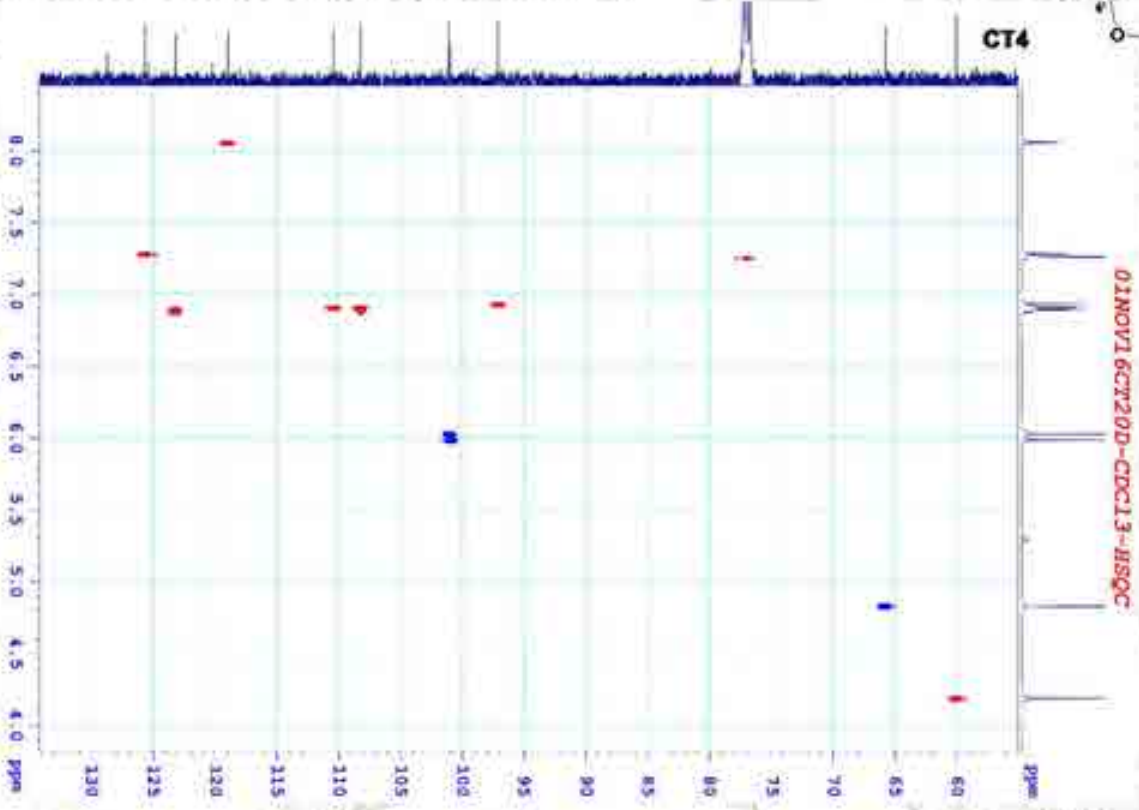


C13CPD

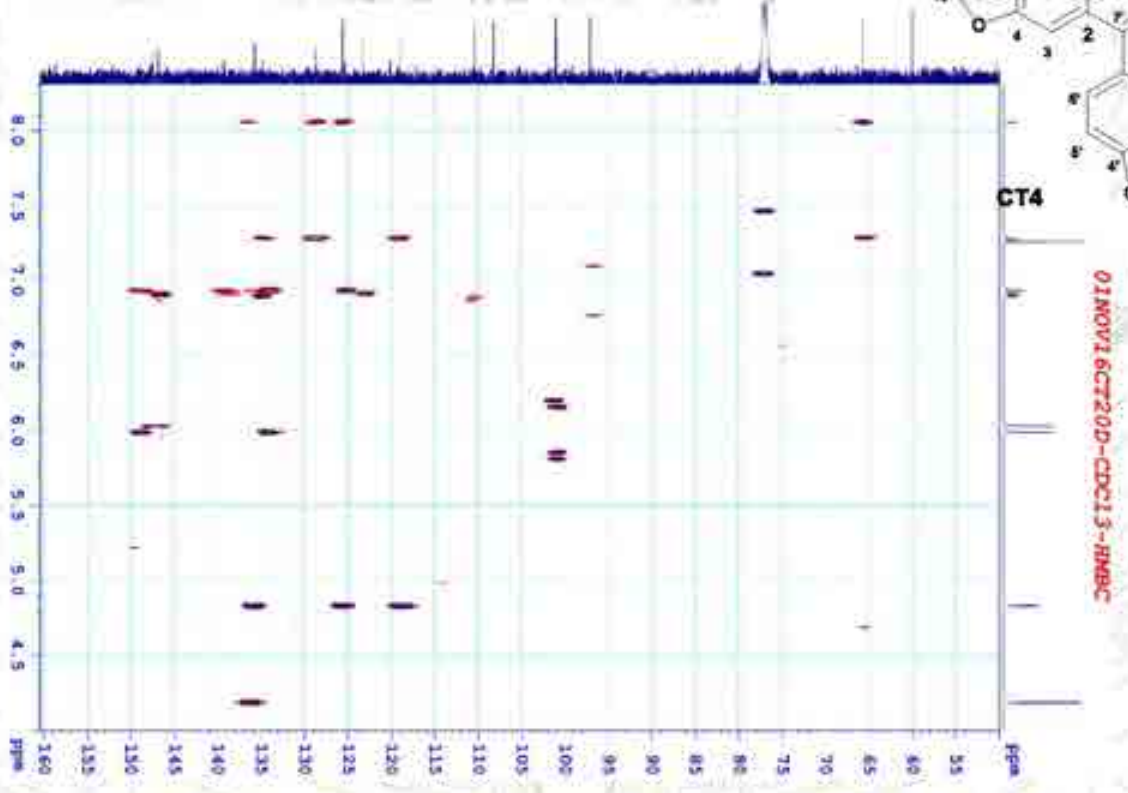




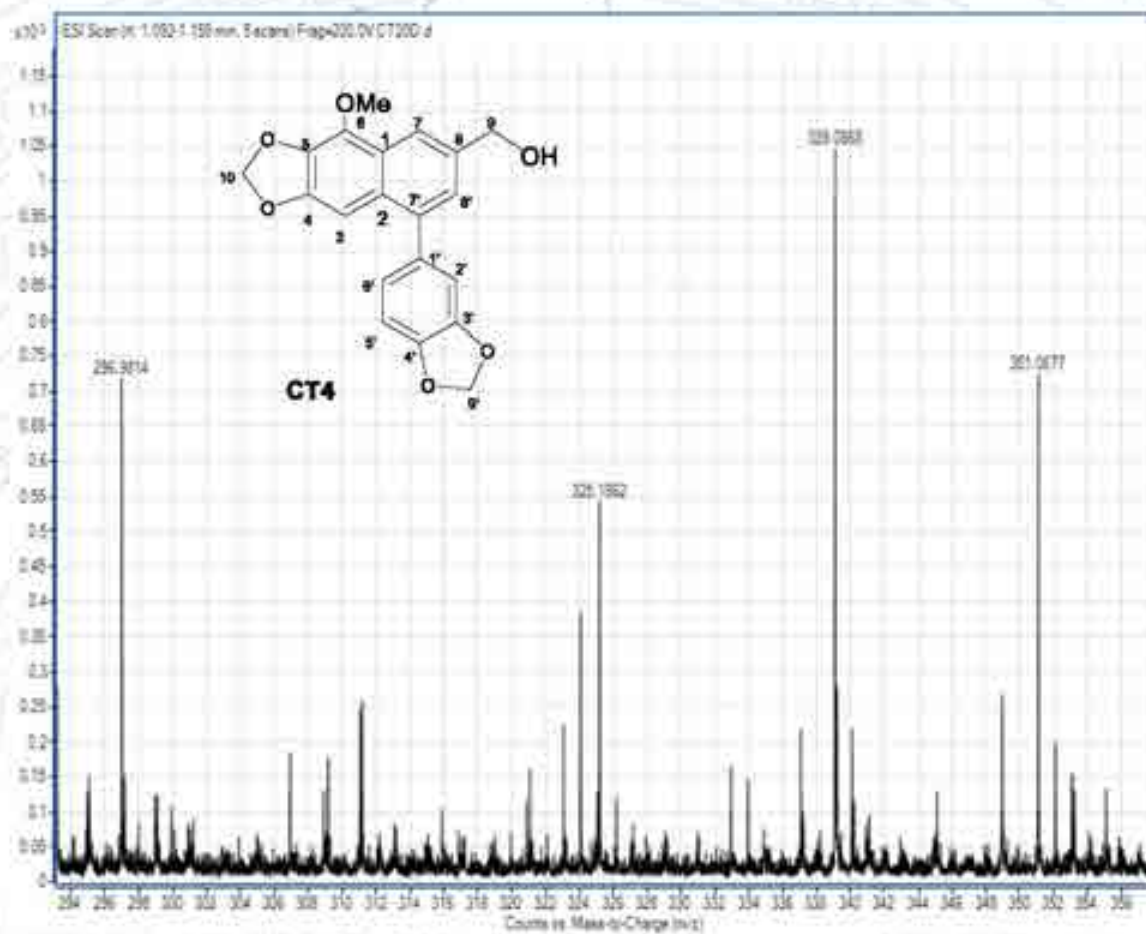
Phổ HSQC của chất CT4: (Cleistonkinin B)



Phổ HMBC của chất CT4: (Cleistonkinin B)



Phổ HRESI-MS của chất CT4: (Cleistonkinin B)



PHỤ LỤC 1.11. PHỔ CỦA CHẤT CT5 (CLEISTONKISIDE B)

Dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C - NMR của chất CT5: (Cleistonkaside B)

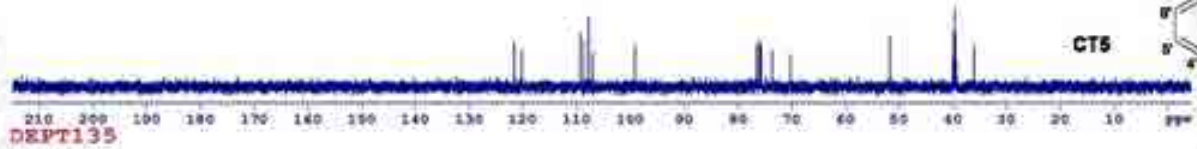
C	δ_c	DEPT	δ_H^{*a} (mult., J, Hz)	HMBC (H \rightarrow C)
1	132,1	C	-	-
2	107,1	CH	6,94 br. s	C-6, C-1, C-3, C-4
3	147,2	CH	-	-
4	146,6	C	-	-
5	107,9	C	6,79 br. d (8,0)	C-6, C-1, C-4
6	120,2	CH	6,76 br. d (8,0)	C-2, C-1, C-4
7	75,6	CH	5,21 d (3,5)	C-1, C-2, C-6, C-8, C-9, C-8', C-1''
8	51,7	CH	2,53 m	C-9, C-7, C-7'
9	176,4	C=O	-	-
10	101,6	CH ₂	5,98 s, 5,99 s	C-3, C-4
1'	132,2	C	-	-
2'	108,7	CH	6,44 br s	C-7
3'	146,6	C	-	-
4'	145,5	C	-	-
5'	107,9	CH	6,66 d (8,0)	C-1', C-3'
6'	121,6	CH	6,41 dd (1,0, 8,5)	C-7
7'	38,5	CH ₂	2,24 dd (7,5, 13,5), 2,48 m	C-2', C-6', C-1', C-9'
8'	36,2	CH	2,88 m	C-9'
9'	71,9	CH ₂	3,93 dd (5,0, 8,5) 4,28 dd (8,5, 8,5)	C-9, C-7, C-8'
10'	101,0	CH	5,92 s	C-3', C-4'
1''	99,1	CH	3,98 d (7,0)	C-7
2''	73,6	CH	3,04 m	-
3''	75,8	CH	3,03 m	-
4''	70,2	CH	3,02 m	-
5''	76,5	CH	3,04 m	-
6''	67,4	CH ₂	3,35 m, 3,77 d (10,5)	C-5'', C-4''
1'''	109,4	CH	4,90 d (3,0)	C-6'', C-3''', C-4'''
2'''	76,0	CH	3,73 d (3,0)	C-1'''
3'''	78,8	C	-	-
4'''	73,3	CH ₂	3,81 d (9,0); 3,54 d (9,0)	C-1''', C-2''', C-3''', C-5'''
5'''	63,4	CH	3,32 m	C-3''', C-4'''
2''-OH	-	-	5,26 d (4,0)	C-1'', C-2'', C-3''
2'''-OH	-	-	4,98 d (6,5)	C-2''', C-3'''
3''-OH	-	-	4,94 d (5,0)	C-3'', C-5''
3'''-OH	-	-	4,46 s	C-2''', C-3''', C-4''', C-5'''
5'''-OH	-	-	4,74 t (5,5)	C-3''', C-5'''

^aDMSO, ^b125 MHz, ^c500 MHz

Phổ DEPT của chất CT5: (Cleistonkaside B)

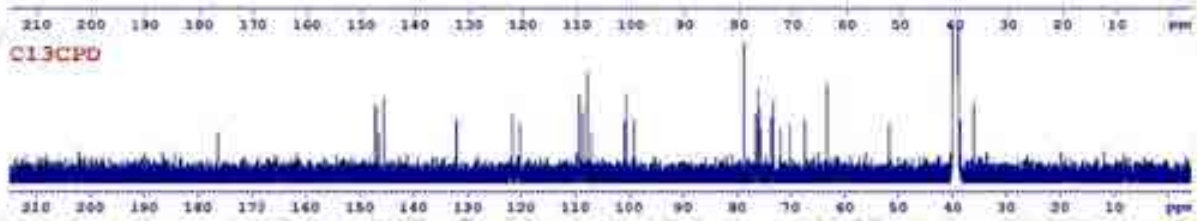
070317CT2OH2-DMSO-C13CPD & DEPT

DEPT90

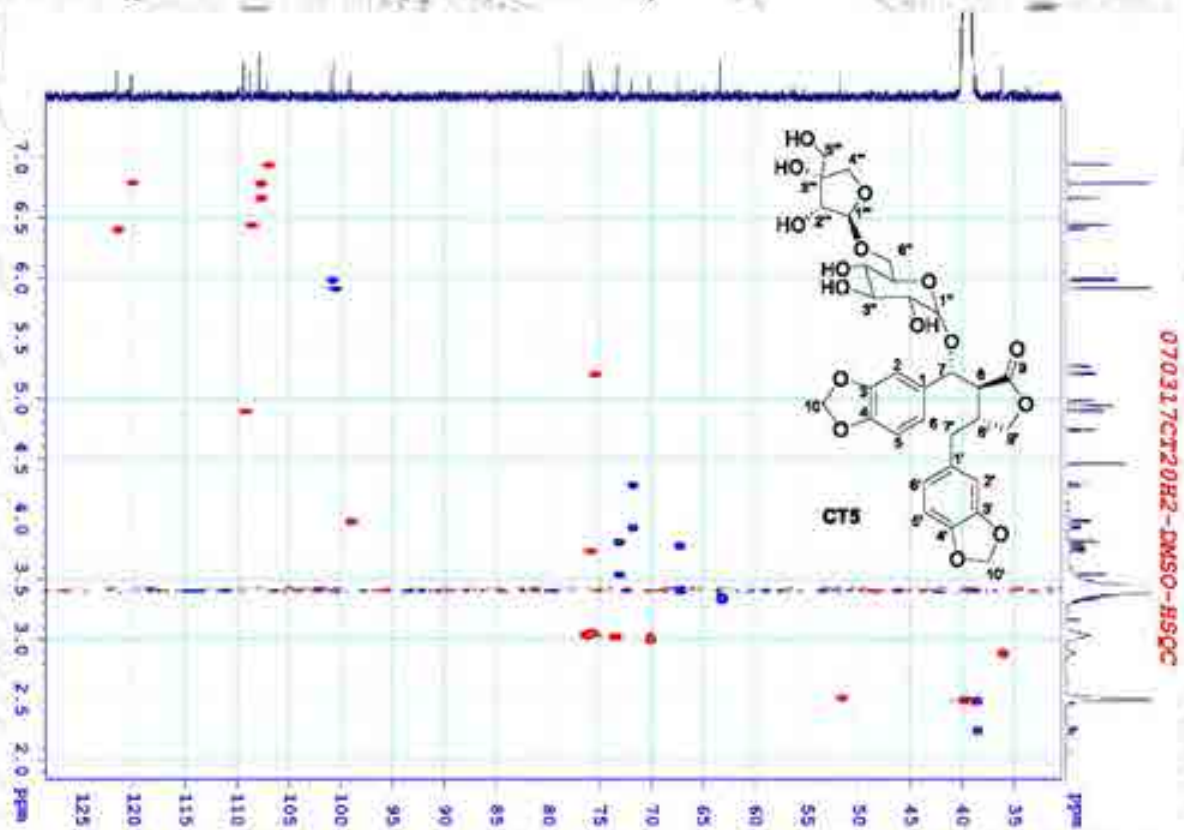


CH&CH3

CH2

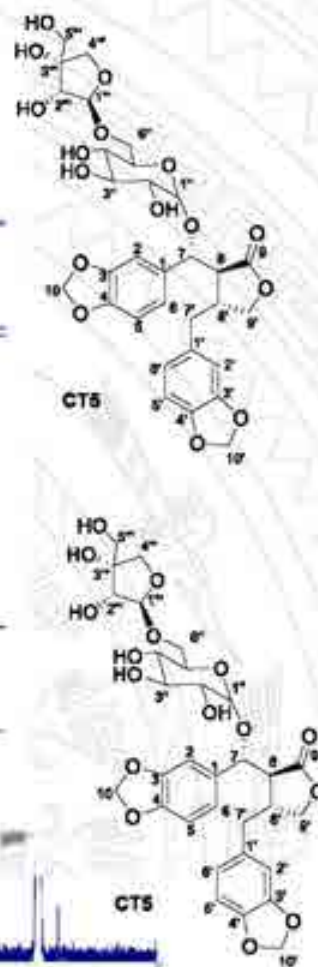
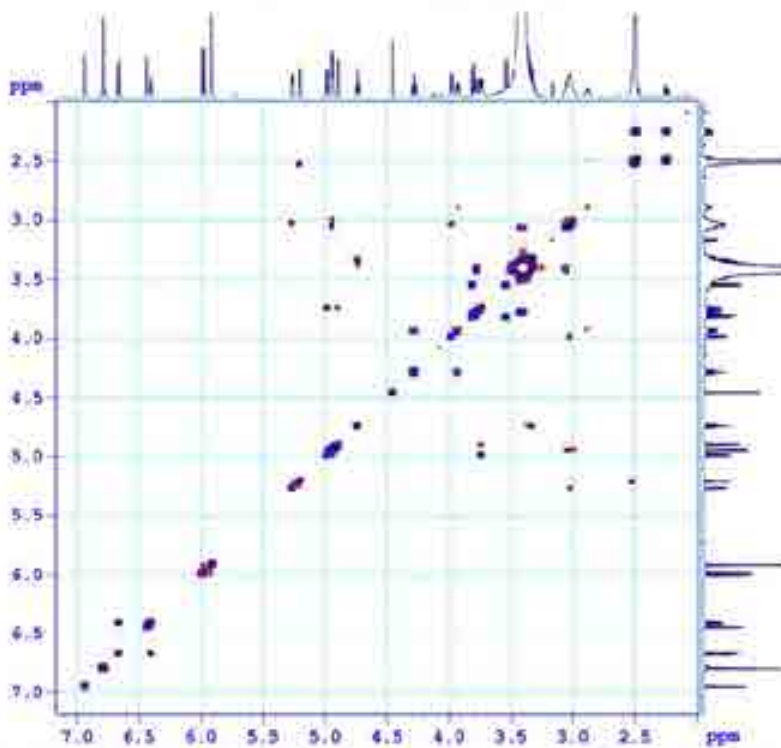


Phổ HSQC của chất CT5: (Cleistonkaside B)

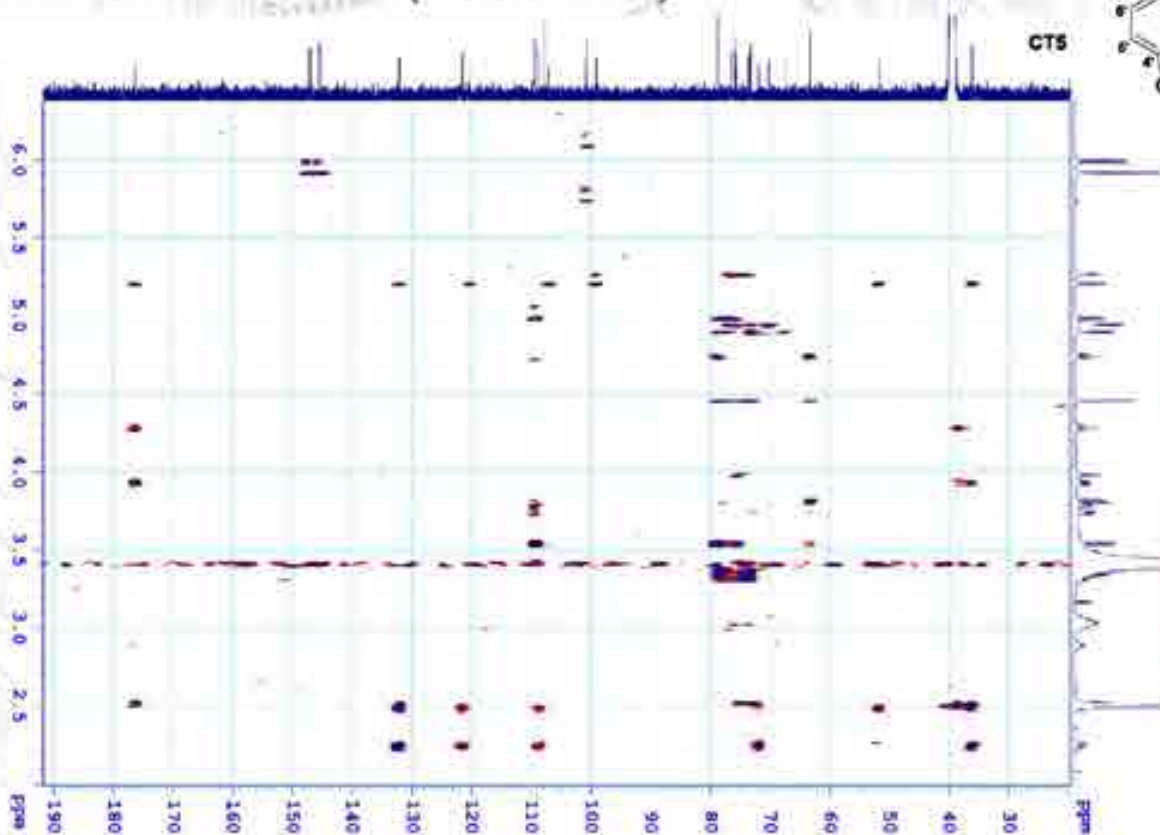


Phổ COSY của chất CT5: (Cleistonkaside B)

070317CT20H2-DMSO-COSYGP



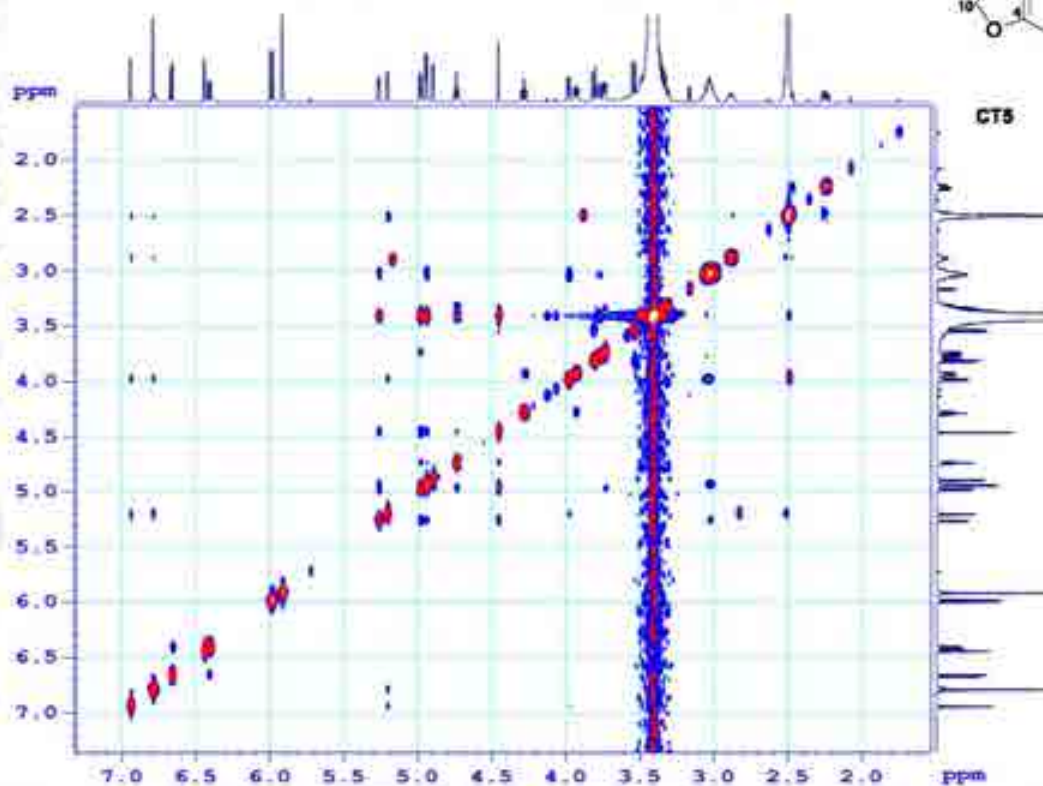
Phổ HMBC của chất CT5: (Cleistonkaside B)



070317CT20H2-DMSO-HMBC

Phổ NOESY của chất CT5: (Cleistonkaside B)

070317CT20H2-DMSO-NOESY

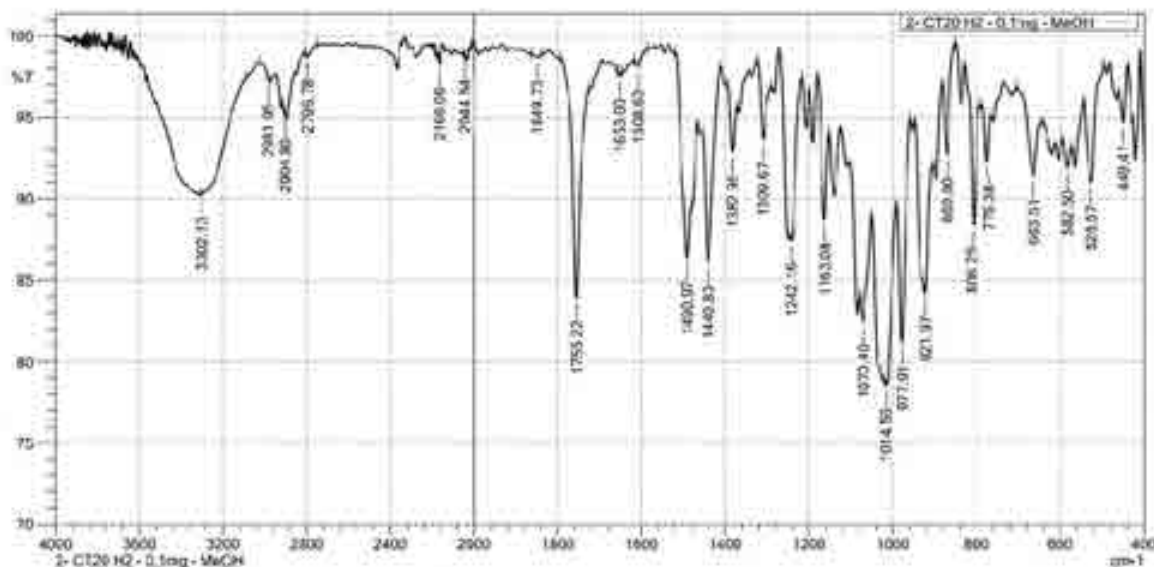


Phổ IR của chất CT5: (Cleistonkaside B)

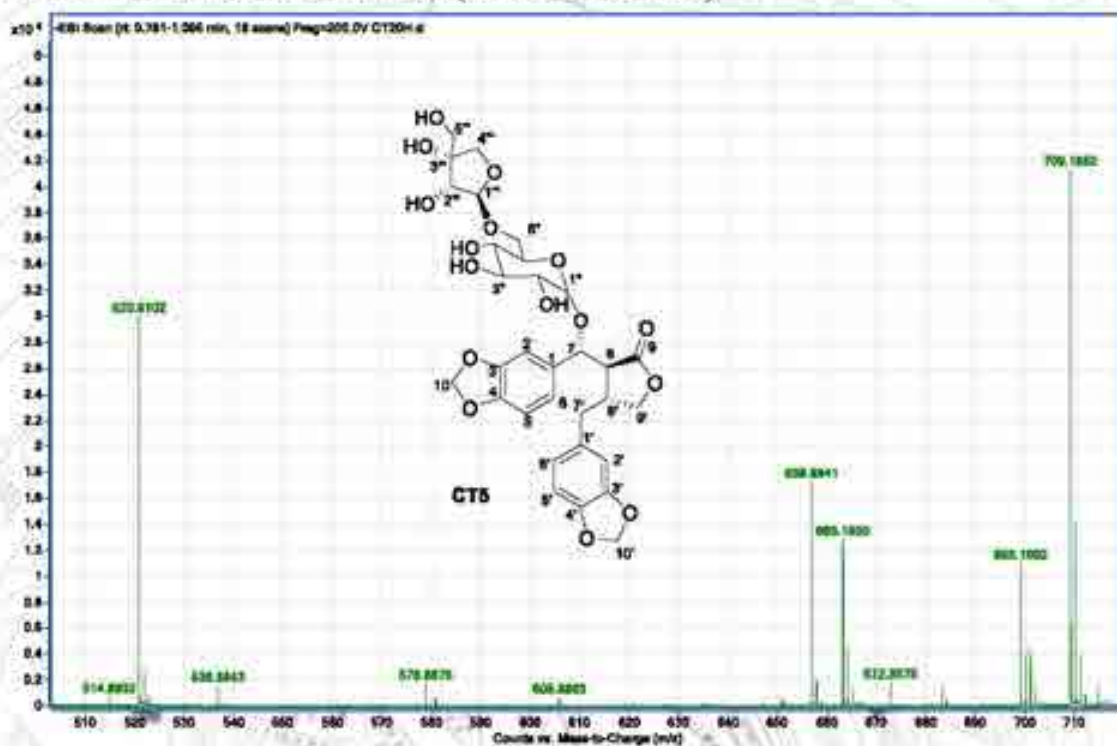
8/11/2018 1:34:05 PM
Instrument: FTIR Affinity - 1S

Department of Inorganic Chemistry, HUS-VNUJ

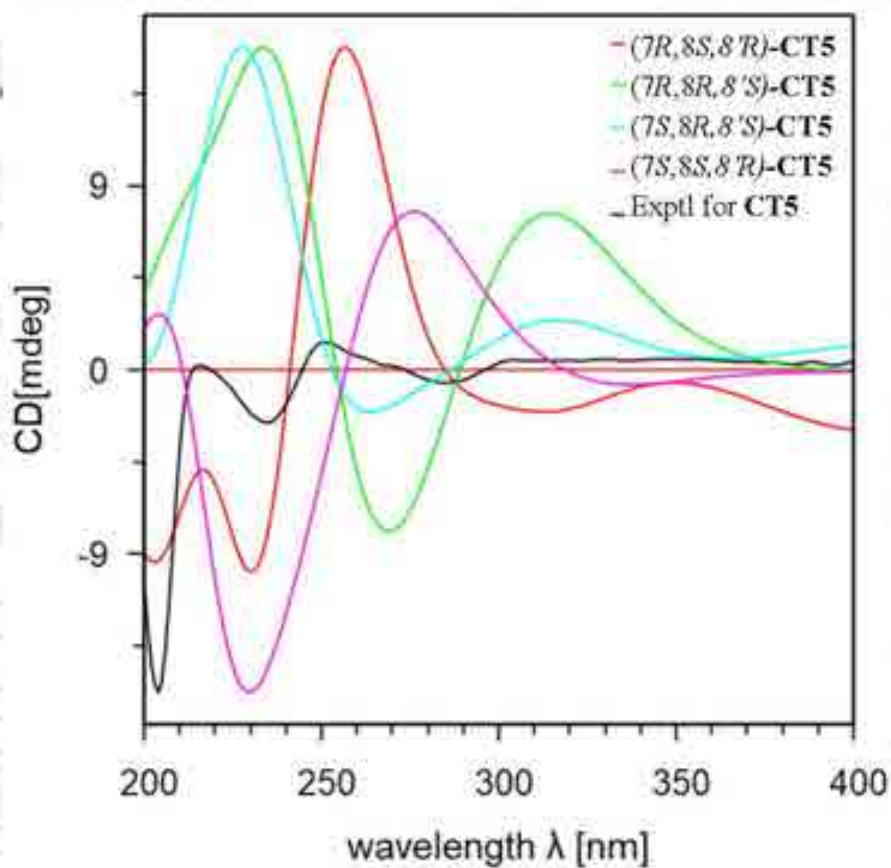
SHIMADZU



Phổ HRESI-MS của chất CT5: (Cleistonkaside B)



Phổ CD và phổ ECD tính toán lý thuyết của 4 đồng phân $7R,8S,8'R$; $7R,8R,8'S$; $7S,8R,8'S$; $7S,8S,8'R$



PHỤ LỤC 1.12. PHỔ CỦA CHẤT CT6 (CLEISTONKINEN)

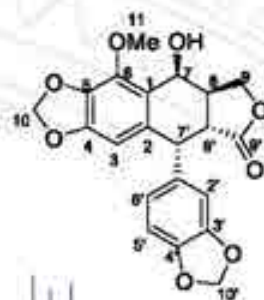
Dữ liệu phổ NMR của chất CT6: (cleistonkinen)

C	δ_C	DEPT	δ_H dạng pic (<i>J</i> in Hz)	HMBC (H → C)
1	124,4	C	-	-
2	133,3	C	-	-
3	104,3	CH	6,24 s	C-1, C-4, C-5, C-7
4	150,0	C	-	-
5	134,7	C	-	-
6	141,1	C	-	-
7	61,6	CH	5,15 t (3,0)	-
8	37,2	CH	2,76 m	-
9	67,5	CH ₂	4,45 dd (8,0, 11,0) 4,31 t (8,0)	C-7, C-8, C-8', C-9'
10	101,3	CH ₂	5,92 d (1,0) 5,93 d (1,0)	C-4, C-5
1'	133,3	C	-	-
2'	111,0	CH	6,54 d (1,0)	C-6', C-7'
3'	147,3	C	-	-
4'	146,6	C	-	-
5'	107,8	CH	6,67 d (8,0)	C-1', C-3'
6'	124,1	CH	6,58 dd (1,0, 8,0)	C-2', C-4', C-7'
7'	43,6	CH	4,54 d (5,5)	C-1, C-3, C-8, C-2', C-6', C-8'
8'	40,8	CH	3,23 dd (5,5, 14,0)	C-7, C-8, C-1', C-7', C-9'
9'	175,0	C	-	-
10'	101,0	CH ₂	5,88 d (1,5) 5,89 d (1,5)	C-3', C-4'
6-OMe	59,8	CH ₃	4,15 s	C-6
7-OH	-	-	2,42 d (2,0)	C-8

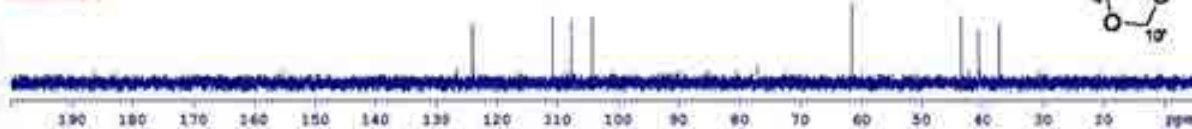
(¹H: 500MHz, ¹³C: 125MHz, CDCl₃)

Phổ DEPT của chất CT6: (cleistonkinen)

9J16CT17B-CDCl3-C13CPD&DEPT

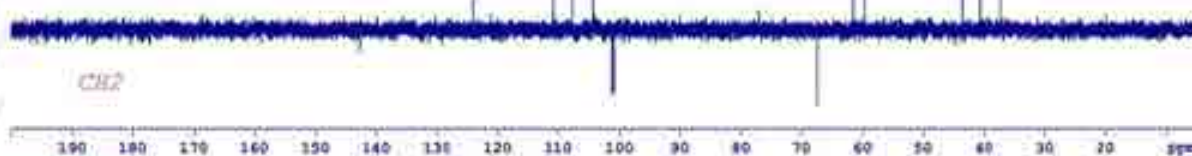


DEPT90



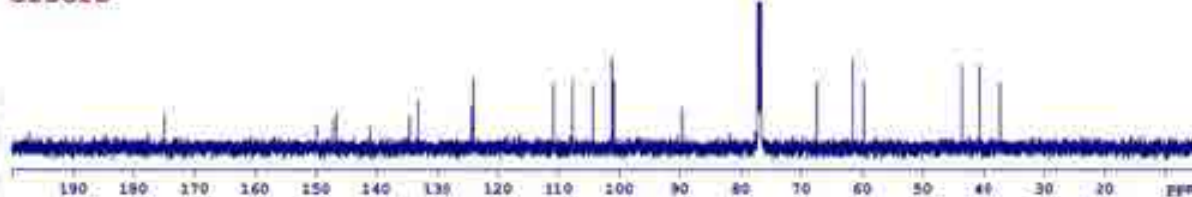
DEPT135

CH&CH3

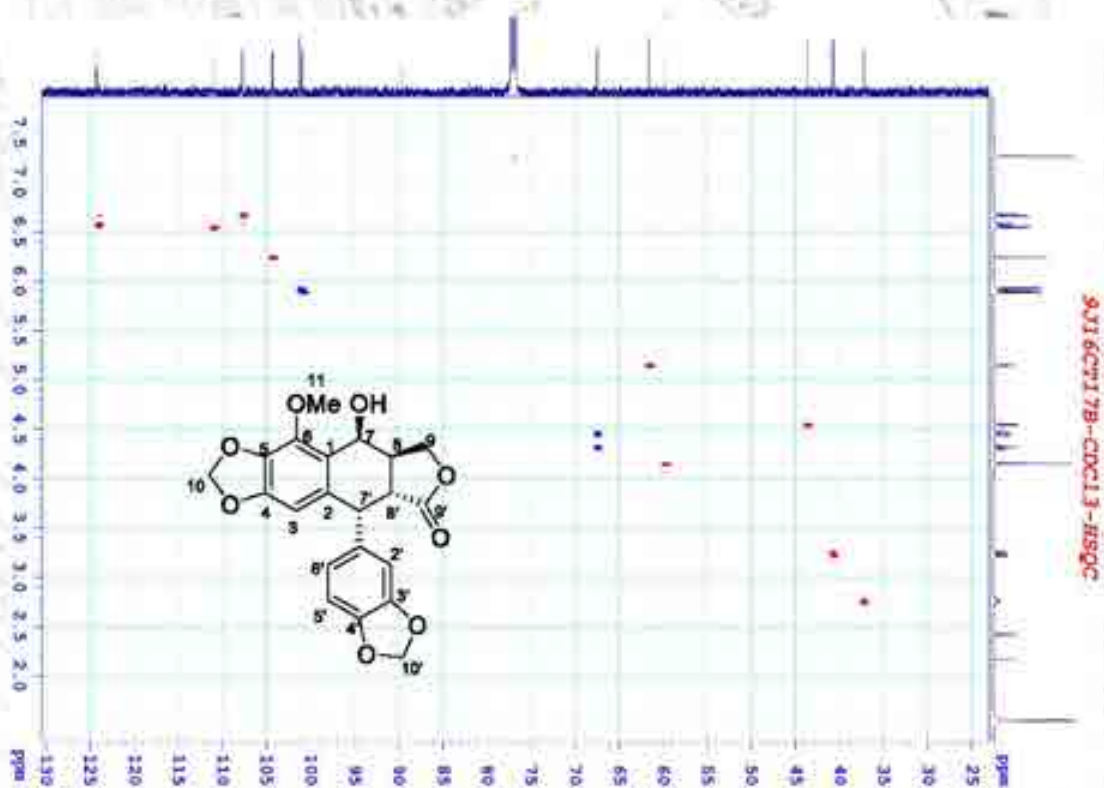


CH2

C13CPD

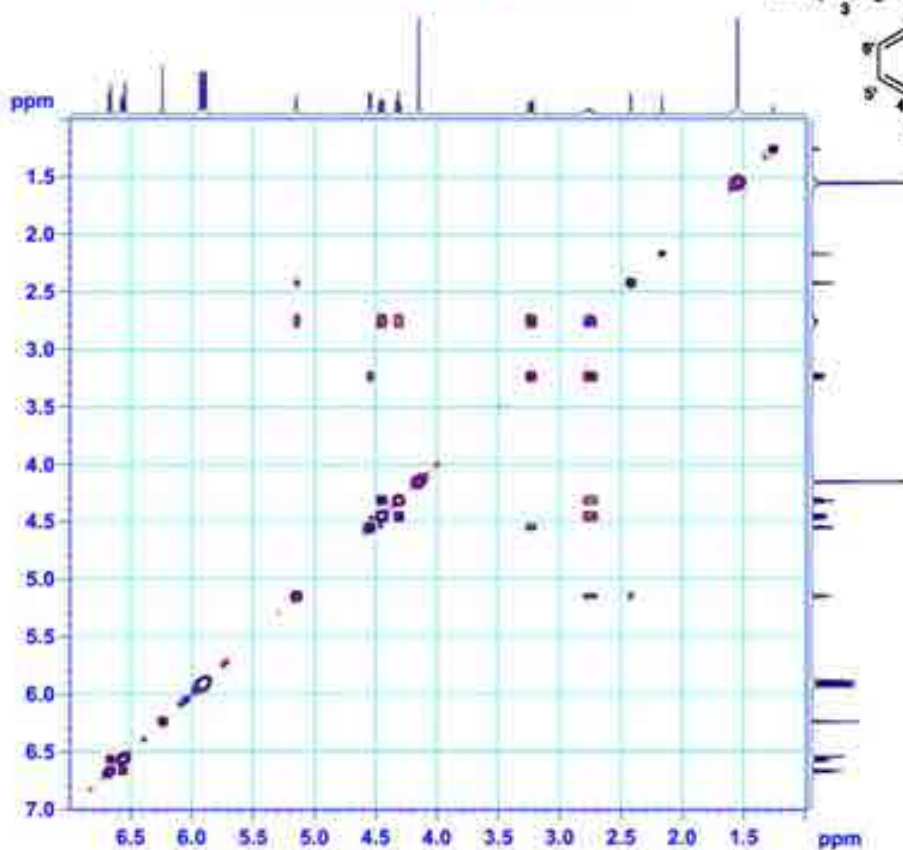


Phổ HSQC của chất CT6: (cleistonkinen)

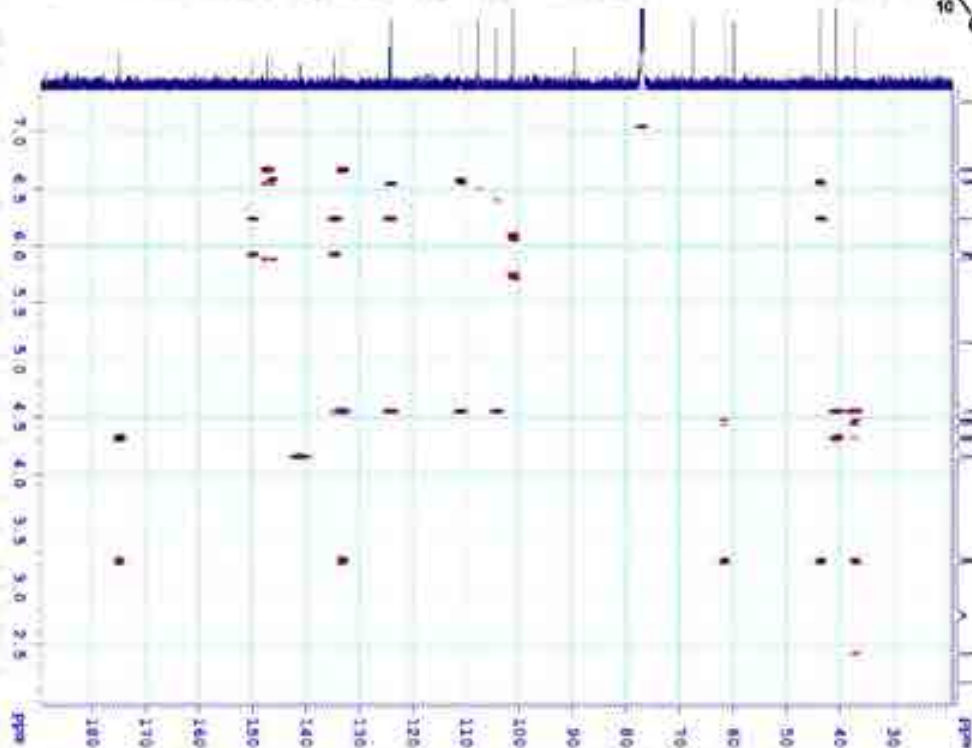


Phổ COSY của chất CT6: (cleistonkinen)

9J16CT17B-CDC13-COSYGP



Phổ HMBC của chất CT6: (cleistonkinen)

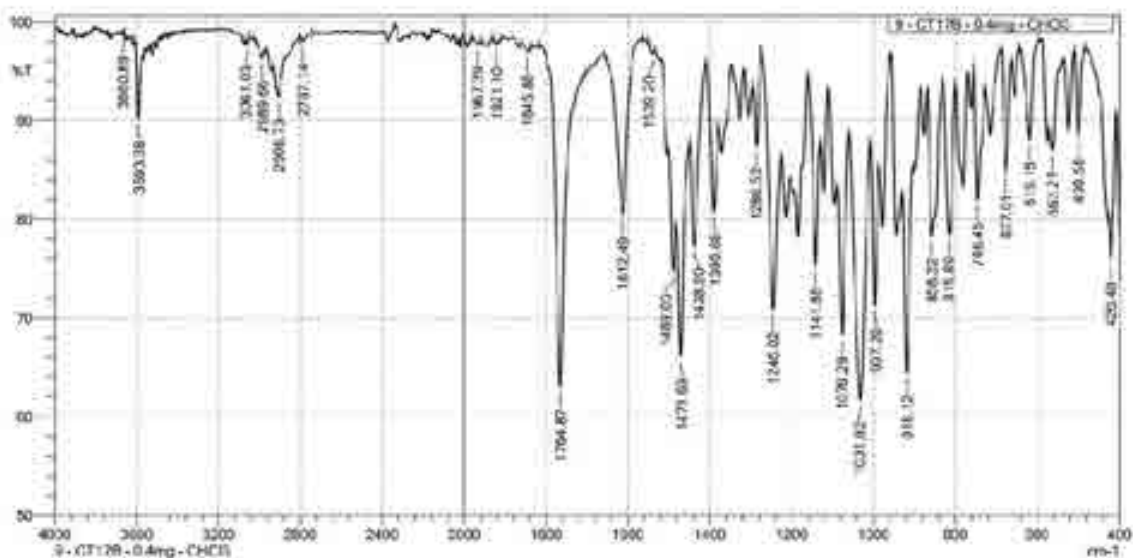


Phổ IR của chất CT6: (cleistonkinen)

8/11/2018 2:09:34 PM
Attachment: FTIR Affinity - 15

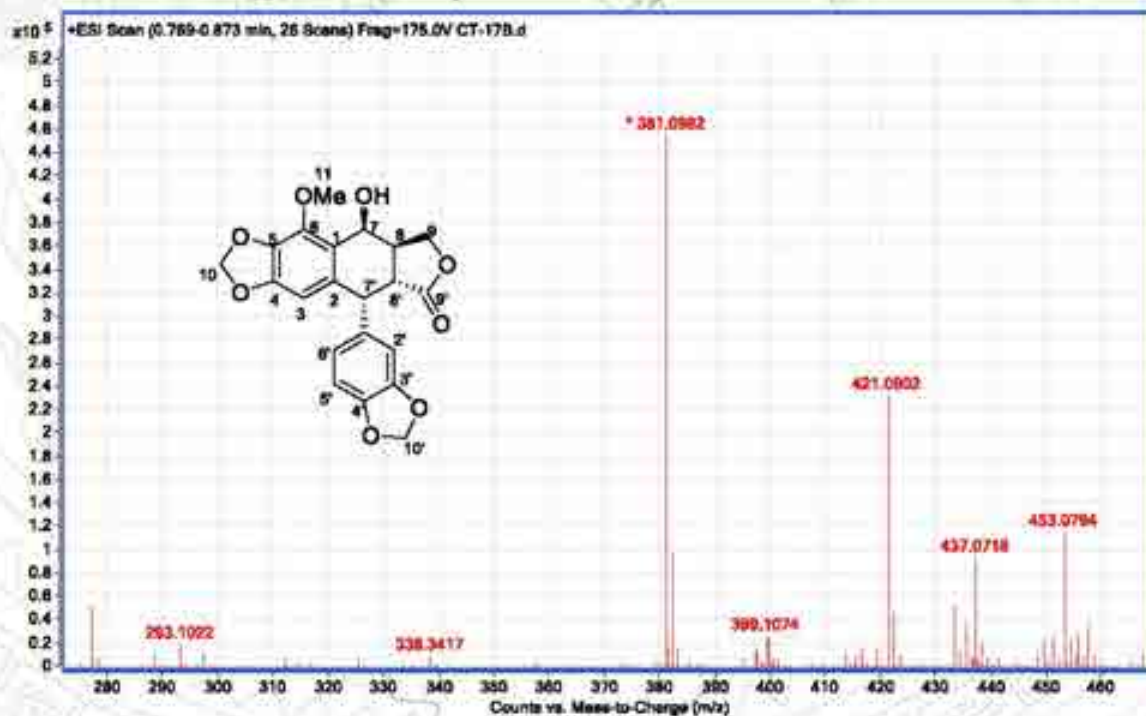
Department of Inorganic Chemistry, HUS-VNU

SHIMADZU

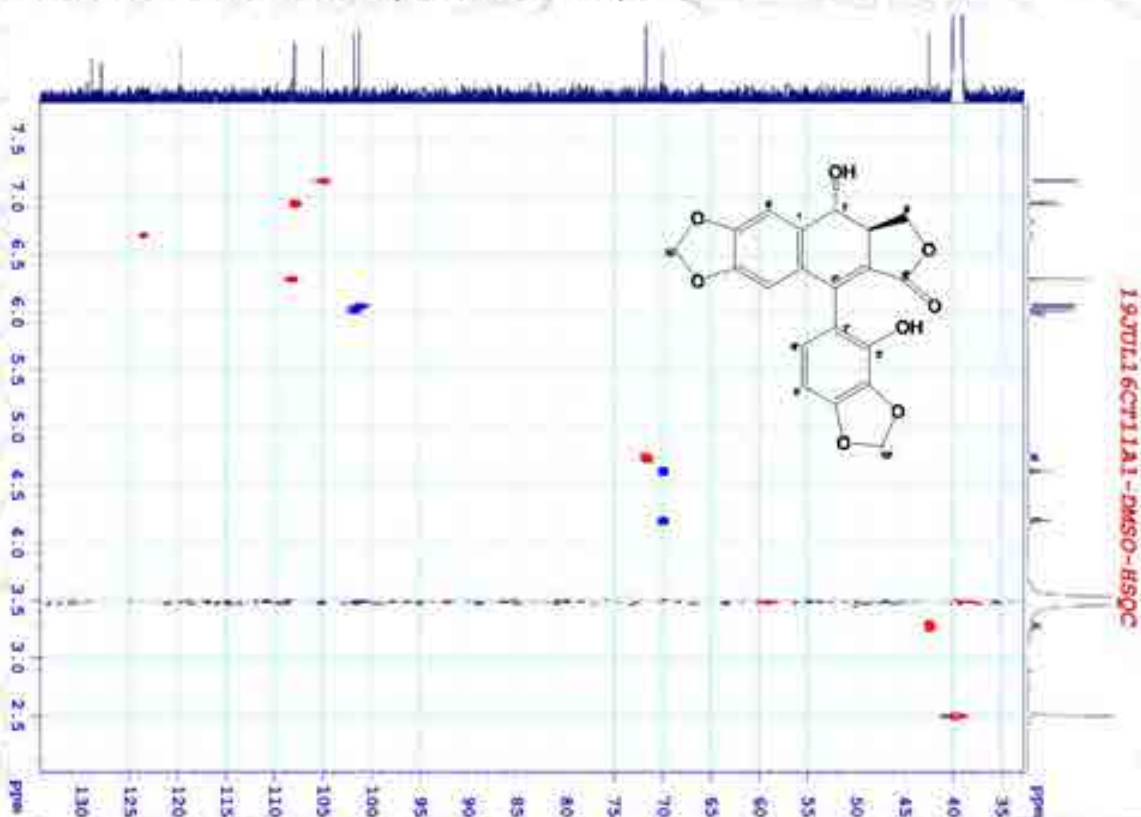


Comment:
File name: C:\Program File\LabSolution\IR\Data\H Dong\Las Hong\ CT178 - 0.4mg
C:\L11.mpd
No of Scans: 20
Intensity Mode: %Transmittance
Min: 400 cm⁻¹ Scan: 4000 cm⁻¹
Resolution: 4 cm⁻¹
Atmosphere Correction: OFF

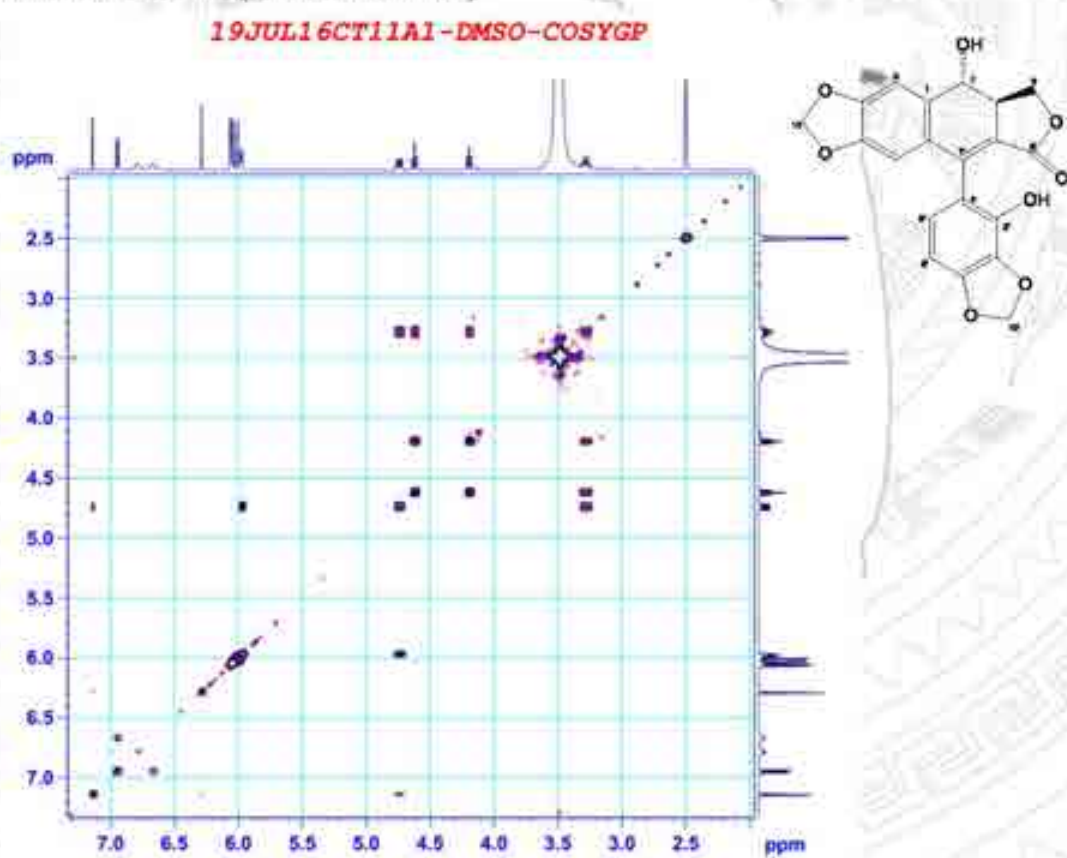
Phổ HRESI-MS của chất CT6: (cleistonkinen)



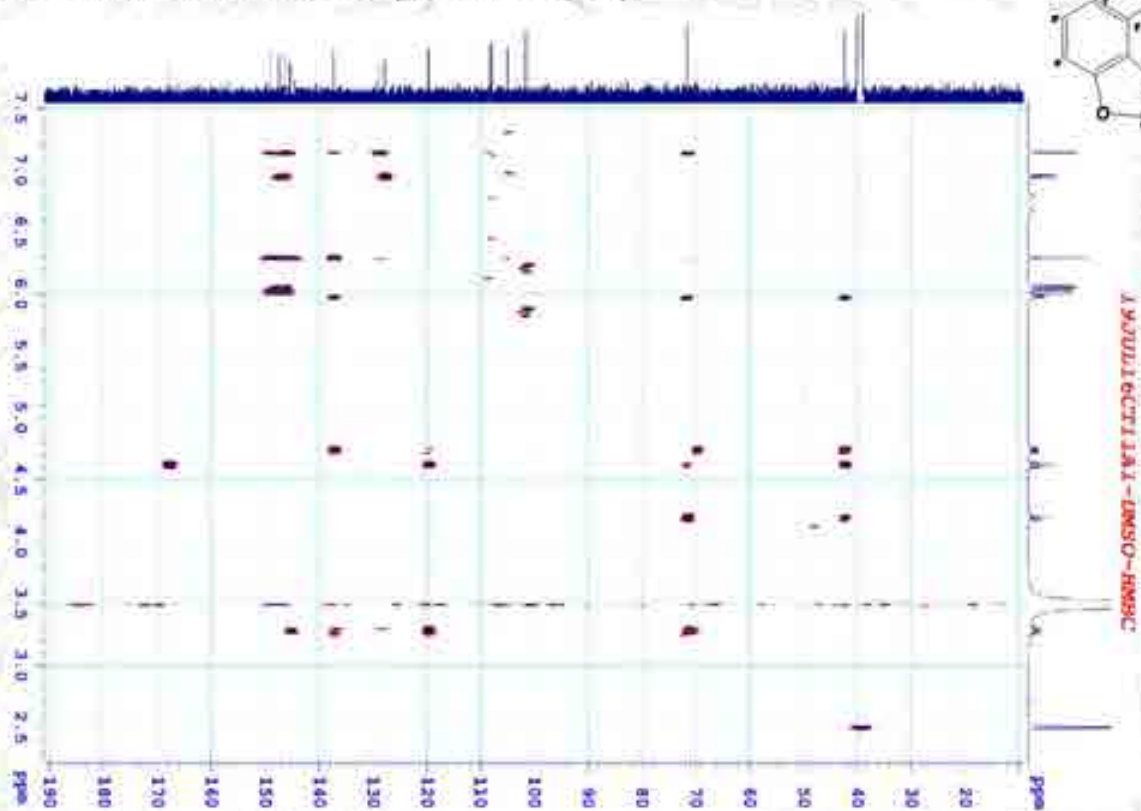
Phổ HSQC của chất CT7: (cleistonkinin E)



Phổ COSY của chất CT7: (cleistonkinin E)

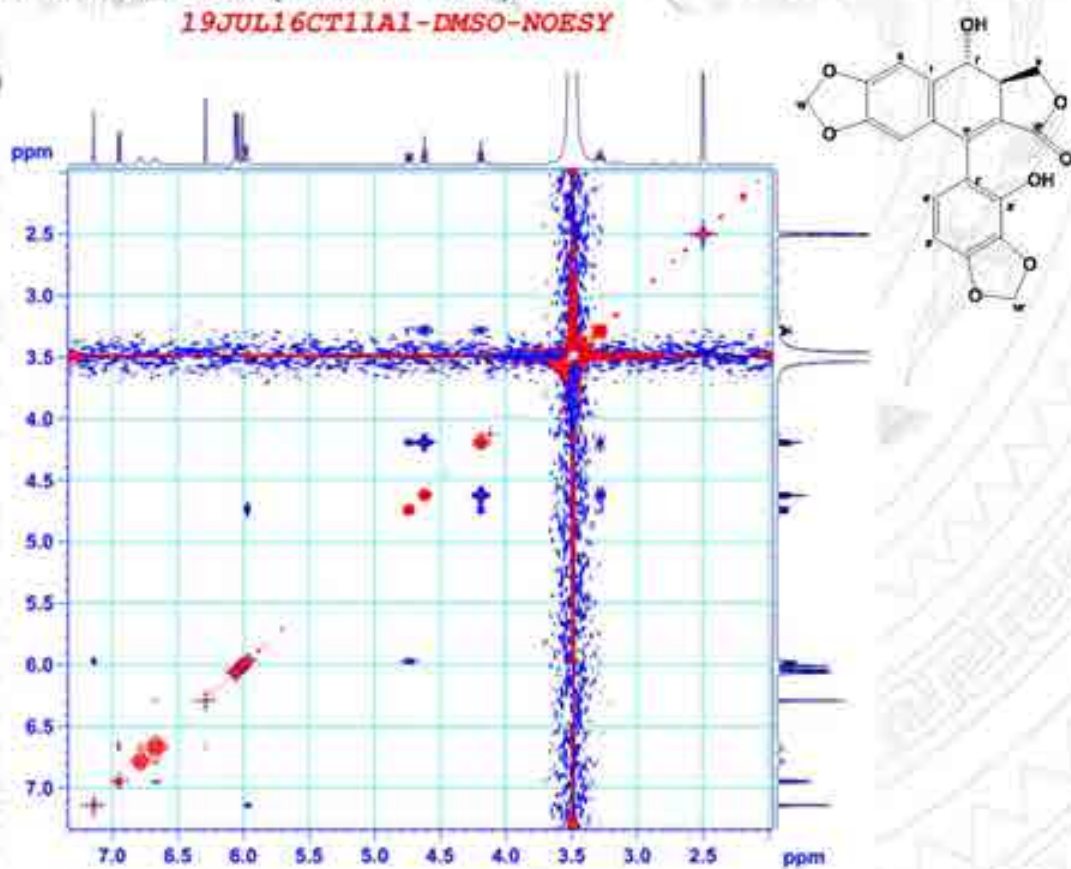


Phổ HMBC của chất CT7: (cleistonkinin E)



Phổ NOESY của chất CT7: (cleistonkinin E)

19JUL16CT11A1-DMSO-NOESY

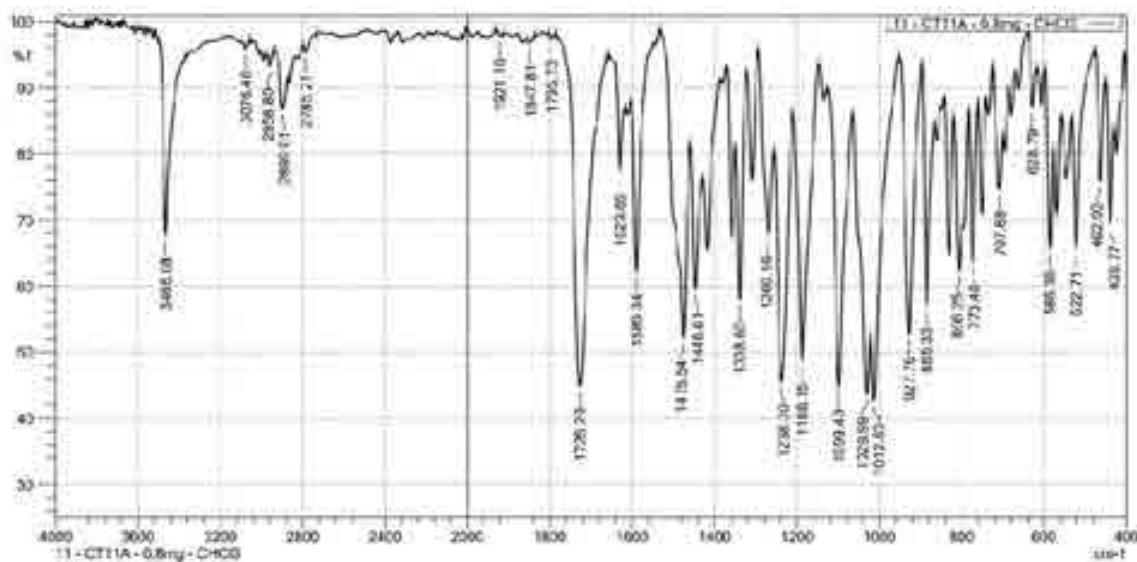


Phổ IR của chất CT7: (cleistonkinin E)

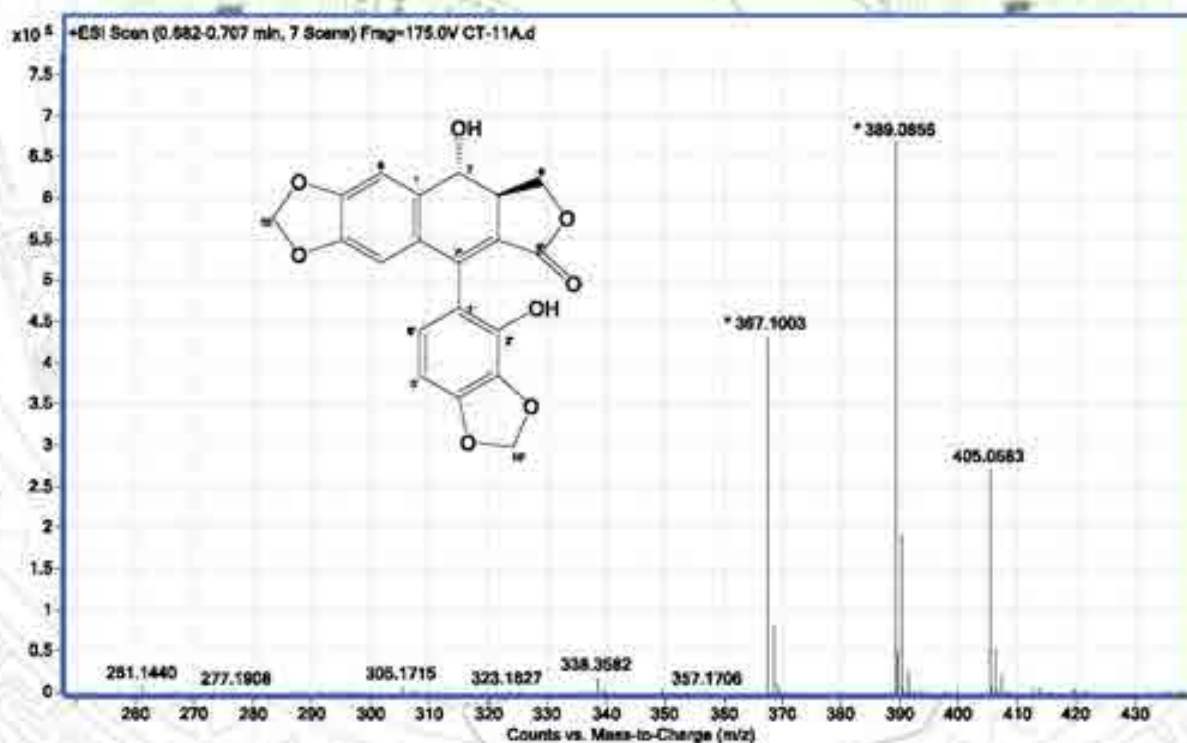
8/11/2019 2:18:50 PM
Features: FTIR Affinity - 15

Department of Inorganic Chemistry, HUST-VNU

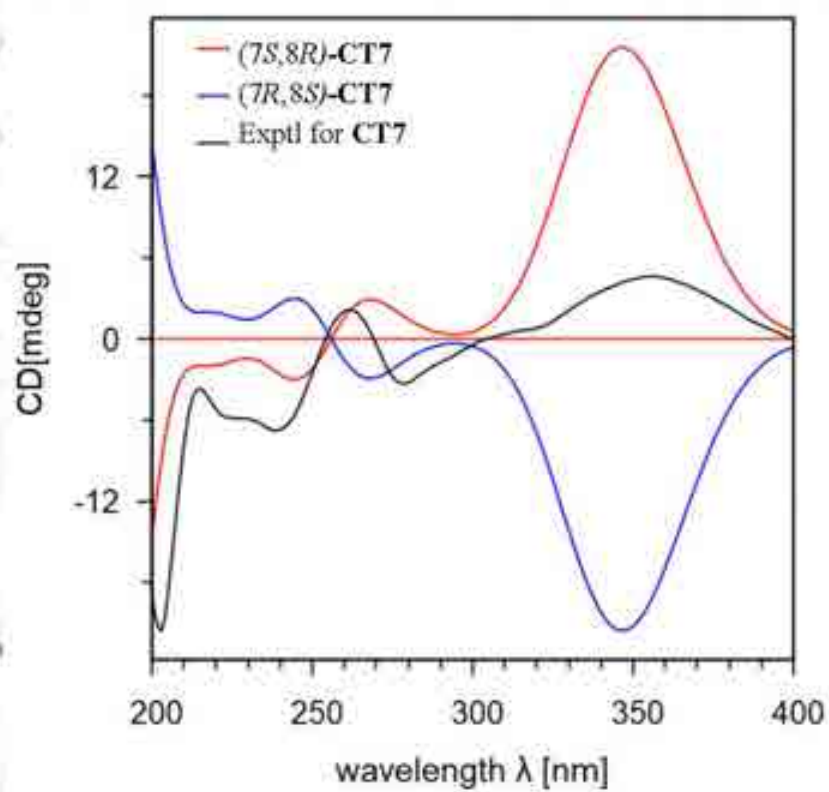
SHIMADZU



Phổ HRESI-MS của chất CT7: (cleistonkinin E)



Phổ CD và phổ ECD tính toán lý thuyết của 2 đồng phân 7*S*,8*R*; 7*R*,8*S*



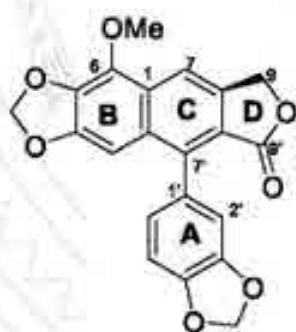
PHỤ LỤC 1.14. PHỔ CỦA CHẤT CT8 (CLEISTONKININ C)
Dữ liệu phổ NMR của chất CT8: (cleistonkinin C)

TT	δ_C	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J, Hz)	HMBC (H→C)
1	129,0	C	-	-
2	130,7	C	-	-
3	98,4	CH	6,86 s	C-5, C-1, C-4, C-7'
4	149,6	C	-	-
5	136,1	C	-	-
6	135,7	C	-	-
7	113,9	CH	8,14 s	C-2, C-6, C-9, C-8'
8	139,1	C	-	-
9	68,3	CH ₂	5,37 s	C-7, C-8, C-8', C-9'
10	101,7	CH ₂	6,05 s	C-4, C-5
1'	128,5	C	-	-
2'	110,6	CH	6,78 br s	C-6', C-7'
3'	147,6	C	-	-
4'	147,5	C	-	-
5'	108,2	CH	6,94 d (8,0)	C-1', C-3', C-4'
6'	123,5	CH	6,76 dd (1,5, 8,0)	C-2', C-5', C-4', C-7'
7'	139,8	C	-	-
8'	119,5	C	-	-
9'	169,9	C	-	-
10'	101,2	CH ₂	6,05 s; 6,07 d (1,0)	C-3', C-4'
6-OMe	60,1	CH ₃	4,21 s	C-6

^aCDCl₃, ^b125 MHz, ^c500 MHz.

Phổ ¹H-NMR của chất CT8: (cleistonkinin C)

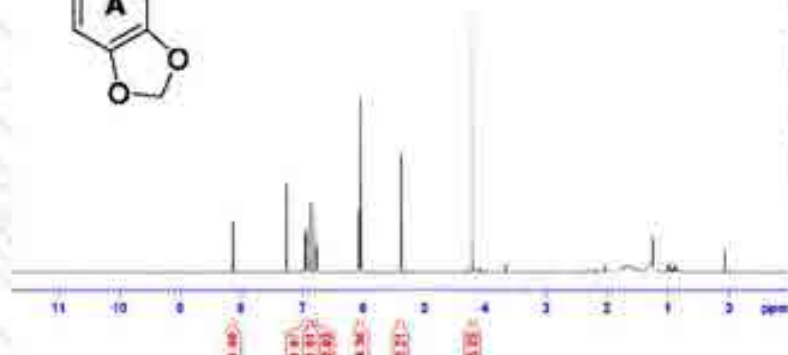
1Apr16CT7A-CDC13-1H



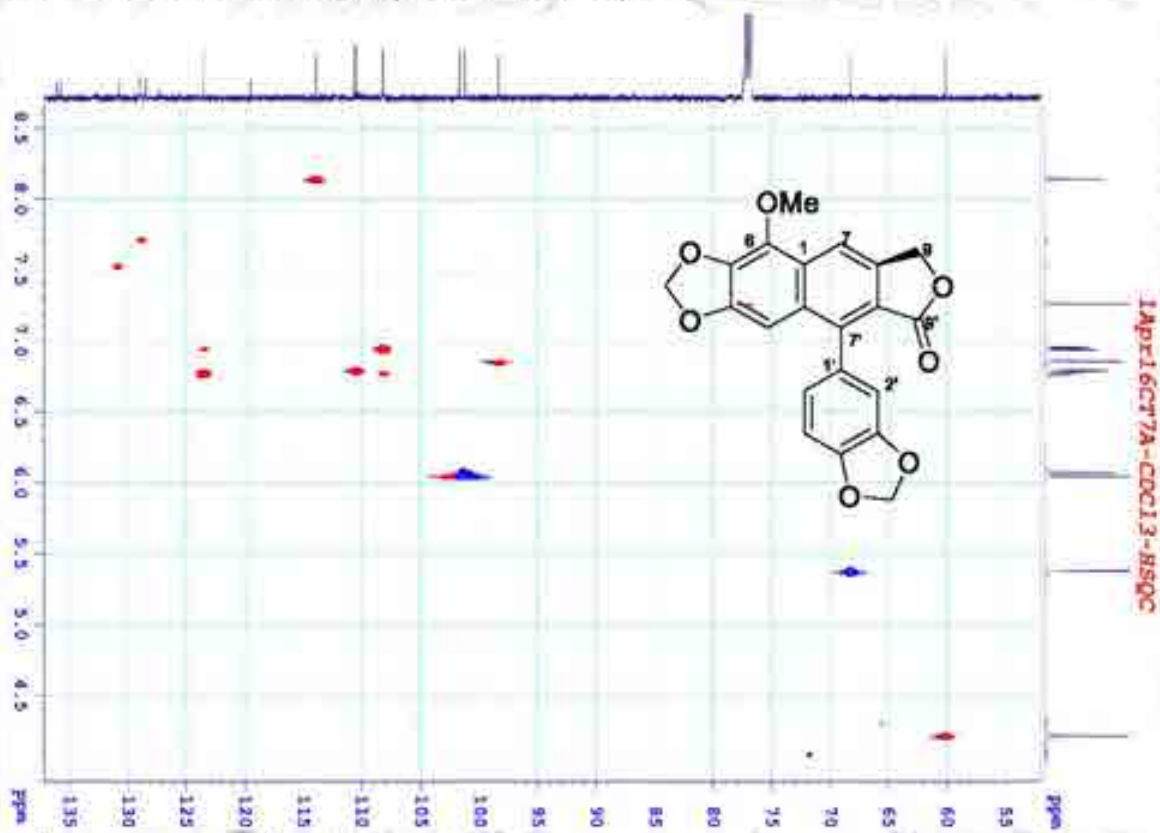
```

=====
Name: 1Apr16CT7A-CDC13-1H
Date_ Time: 16-Apr-2016 10:11:11
F1 - Acquisition Parameters
Date_ Time: 16-Apr-2016 10:11:11
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm QNP1H
PULPROG: zgpg30
AQ: 0.12480000
RG: 655.36
AQ (s): 0.12480000
SFO: 500.136199
SF (MHz): 500.136199
NUC1: 13C
NUC2: 1H
=====
Name: 1Apr16CT7A-CDC13-1H
Date_ Time: 16-Apr-2016 10:11:11
F2 - Processing parameters
Date_ Time: 16-Apr-2016 10:11:11
INSTRUM: spect
PROBHD: 5 mm QNP1H
PULPROG: zgpg30
AQ: 0.12480000
RG: 655.36
AQ (s): 0.12480000
SFO: 500.136199
SF (MHz): 500.136199
=====

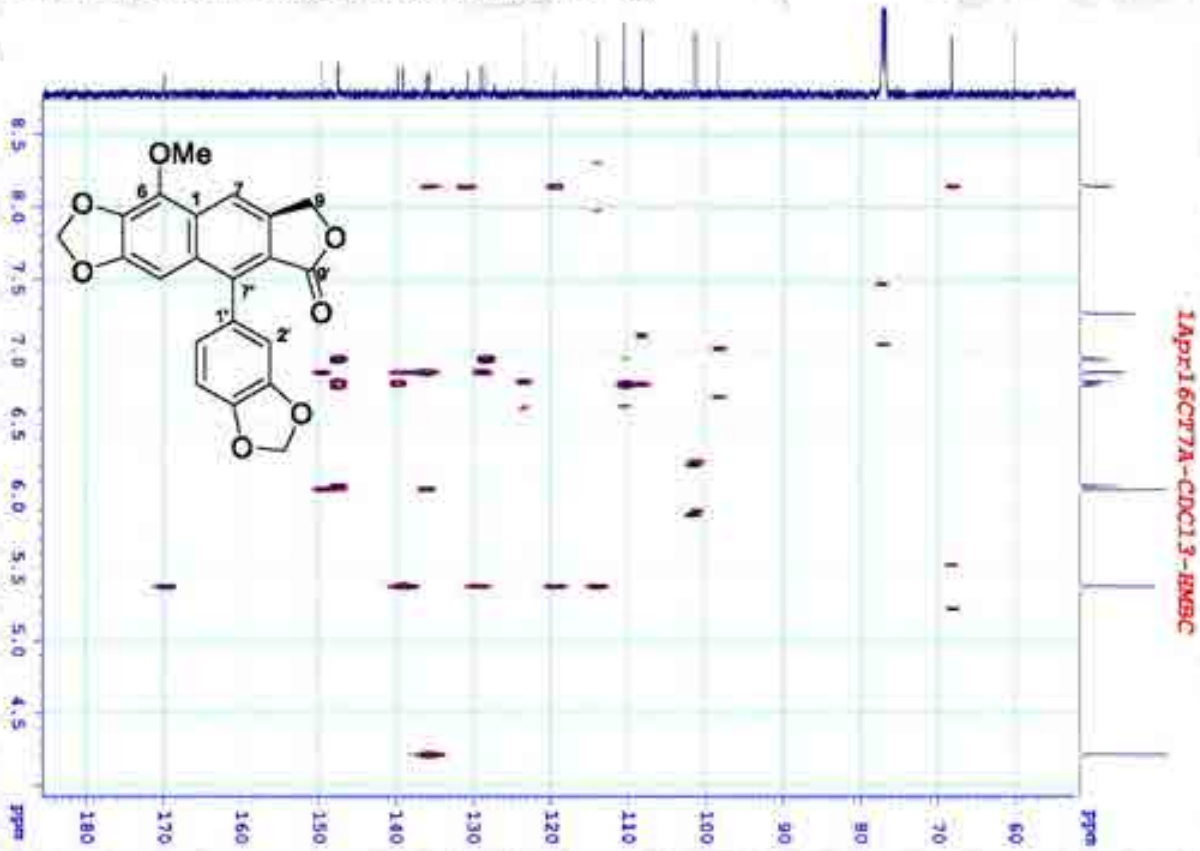
```



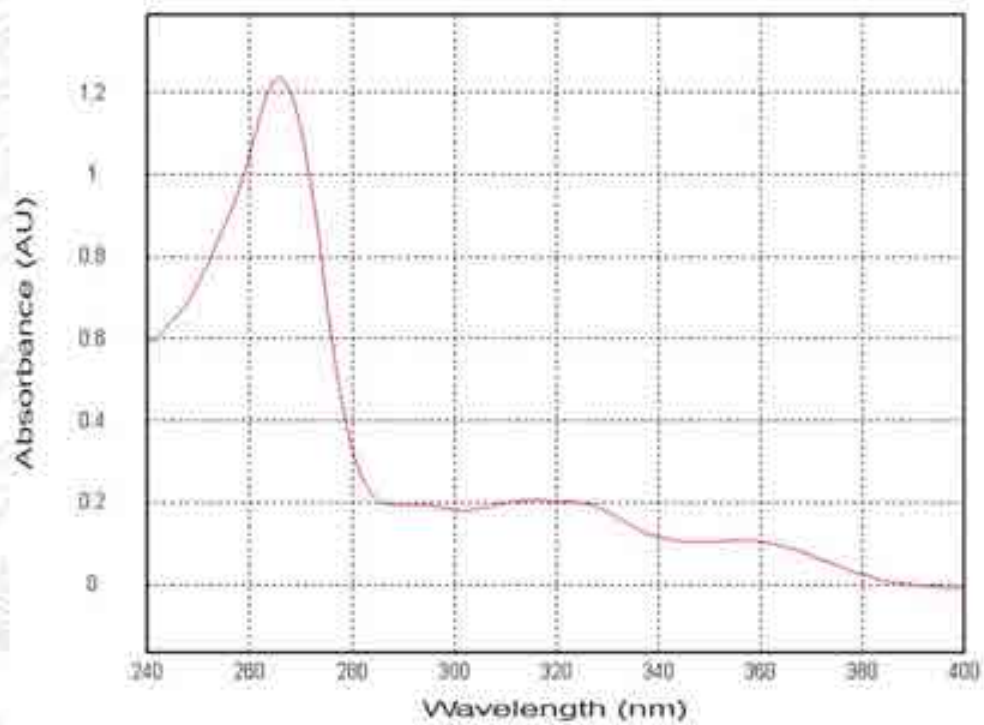
Phổ HSQC của chất CT8: (cleistonkinin C)



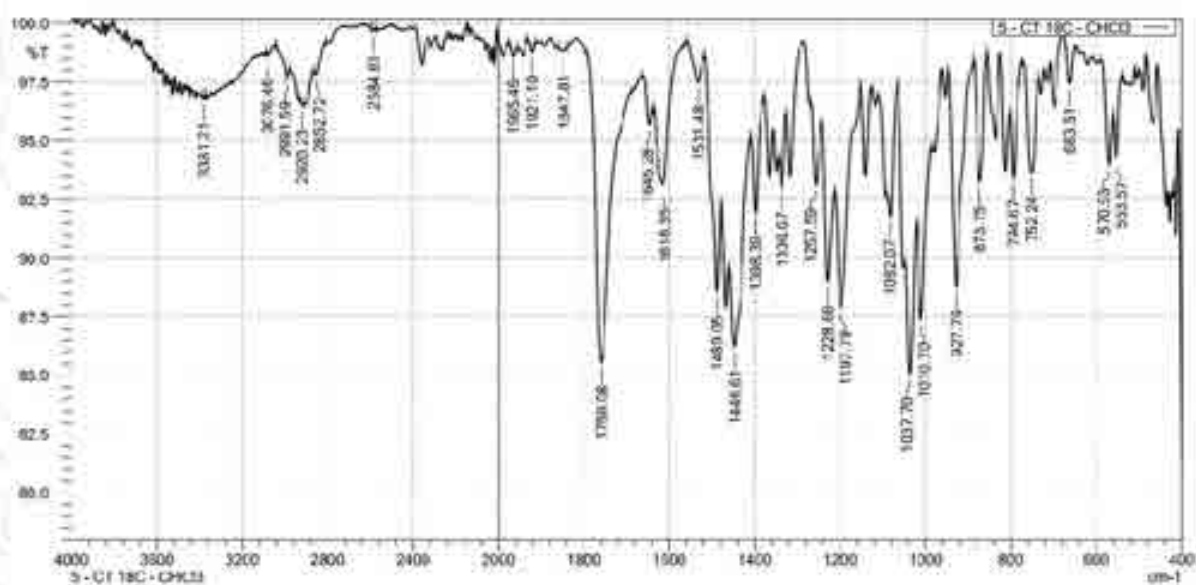
Phổ HMBC của chất CT8: (cleistonkinin C)



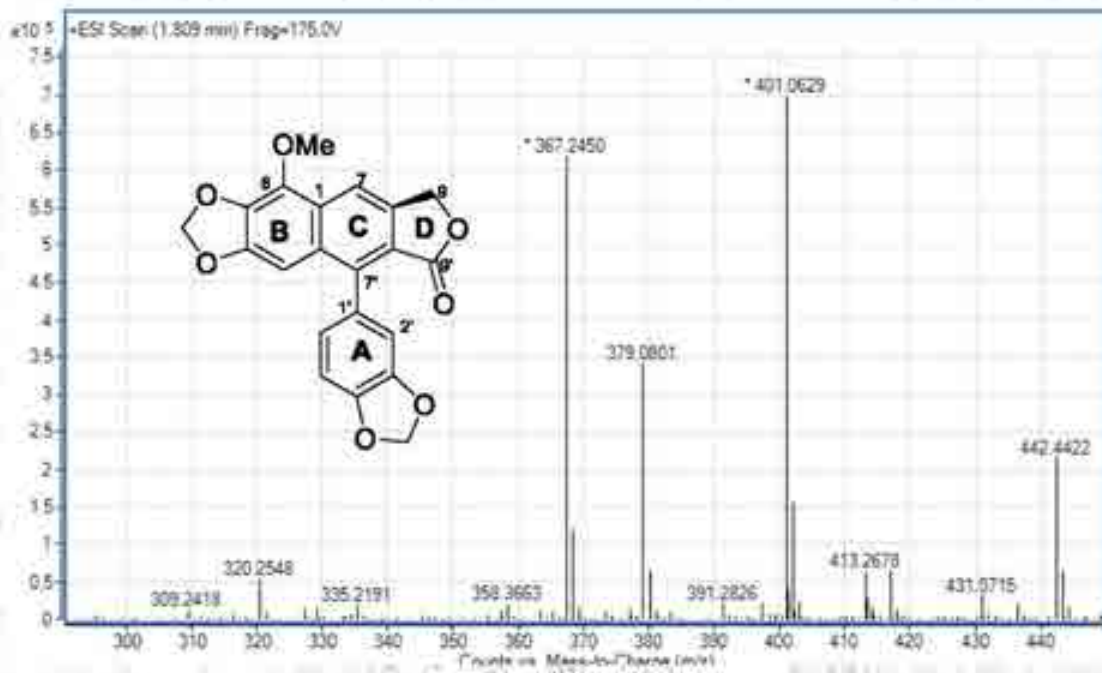
Phổ CD của chất CT8: (cleistonkinin C)



Phổ IR của chất CT8: (cleistonkinin C)



Phổ HRESI-MS của chất CT8: (cleistonkinin C)



PHỤ LỤC 2. THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN GỐC

PHỤ LỤC 2.1. XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA CLEISTANTOXIN

CHƯƠNG TRÌNH SK THAM KHẢO USP 40

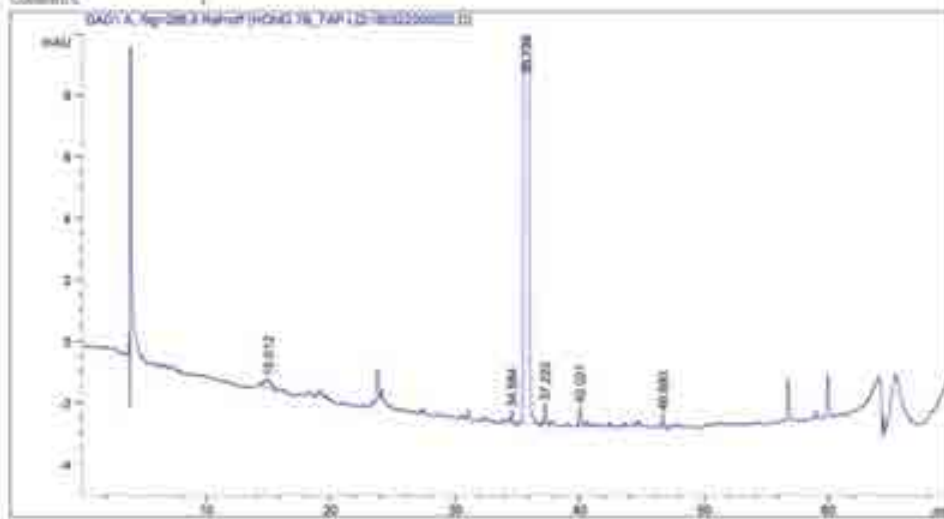
Data File D:\CHROM32\1\DATA\HONG THAP LO\100222000003.D
 Sample Name: Cleistantoxins 1000ppm/ACN (9.8ug)

Acq. Operator : Hseng
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 2
 Injection Date : 3/22/2018 10:30:07 AM Inj Volume : 20.0 ul
 Acq. Method : D:\CHROM32\1\METHODS\002_16A-TAP LO.M
 Last changed : 3/22/2018 10:23:53 AM by Hseng
 (modified after loading)
 Analyze Method : D:\CHROM32\1\METHODS\002_16A-TAP LO.M
 Last changed : 9/25/2017 2:41:00 PM by SIANG
 (modified after loading)
 Sample Info : Cleistantoxins 1000ppm/ACN (9.8ug), V=10 ucl, w=1.0 ucl/g
 Mx: ACN- den pH: 5' 1-99, 60' 99-1, 65' 1-99, end: 70'
 col: phenyl phenonax,

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : C18 phenonax
 Serial# : phenyl
 Product# :
 Diameter : 4.6 mm length : 250.0 mm
 Particle size : 3.5 um Void volume : 60.0 ml
 # injections : 1221
 Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 7.0
 Minimum pH : 3.0
 Maximum Temperature : 60.0 °C
 Comment :



Area Percent Report with Performance

Instrument 1 9/25/2017 2:40:00 PM SIANG

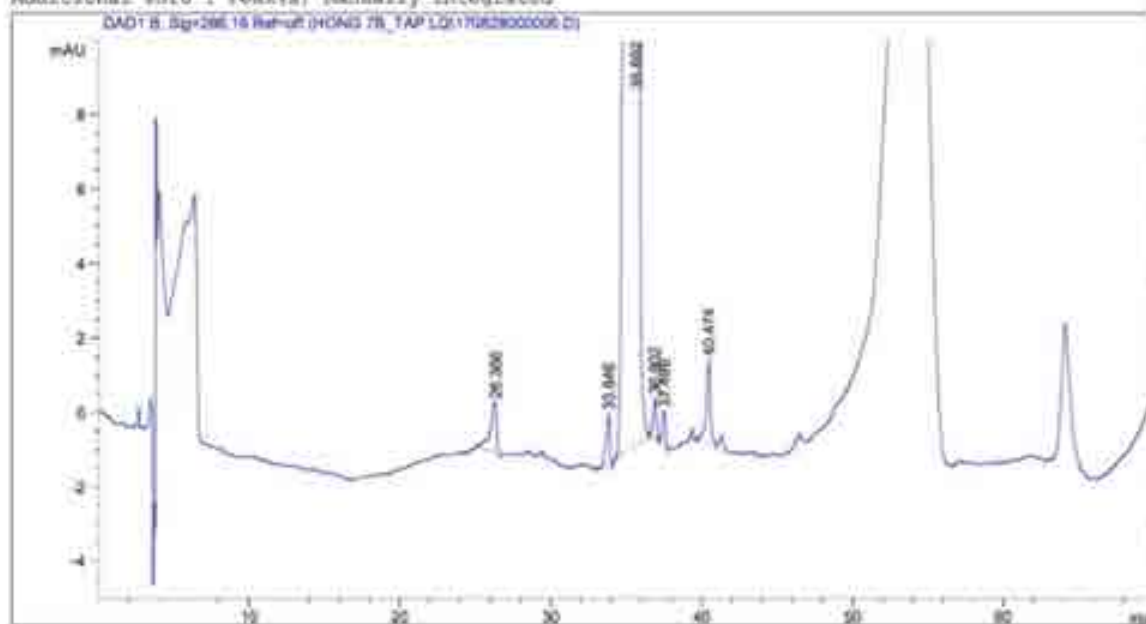
Page 1 of 2

CHƯƠNG TRÌNH SK THAM KHẢO BP 2018

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 7B_TAP LO\170828000003.D
Sample Name: T92 (ACN 100%)

Acq. Operator : HOANG
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 2
Injection Date : 8/28/2017 2:49:57 PM Inj Volume : 70.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG7B.X\HONG7B_TAP_LQ.M
Last changed : 8/28/2017 2:21:15 PM by HOANG
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HINHERO2.M
Last changed : 5/23/2019 9:34:14 AM by GIANG
(modified after loading)
Sample Info : T92 (ACN 100%)
v=ml/p, V=70ml
MP: (ACN: a.Yermis 0.1%) 0° 5:55: 60° 45:5; 65° 35:3; w
nd: 70°
Col Inertail ODS, 4,6x250mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Data File D:\CHEM32\1\DATA\NONG TB_CAP IQ\170828000005.D
Sample Name: TB2 (ACH 100%)

Signal 1: DAD1 B, Sig=286,16 Ref=off

Peak #	Retention [min]	Type	Width [min]	Area [nAU*s]	Height [nAU]	Area %
1	26.366	BB	0.3681	19.39018	1.35105	0.0433
2	33.846	BB	0.2530	25.14672	1.40369	0.0264
3	39.692	BB	0.3959	9.52430e4	3104.63867	99.8558
4	36.902	BB	0.2101	15.50550	1.07615	0.0163
5	37.495	BB	0.2236	13.34114	9.17910e-1	0.0140
6	40.474	BB	0.2862	44.13300	2.23694	0.0443

Totals : 9.53805e4 3111.62431

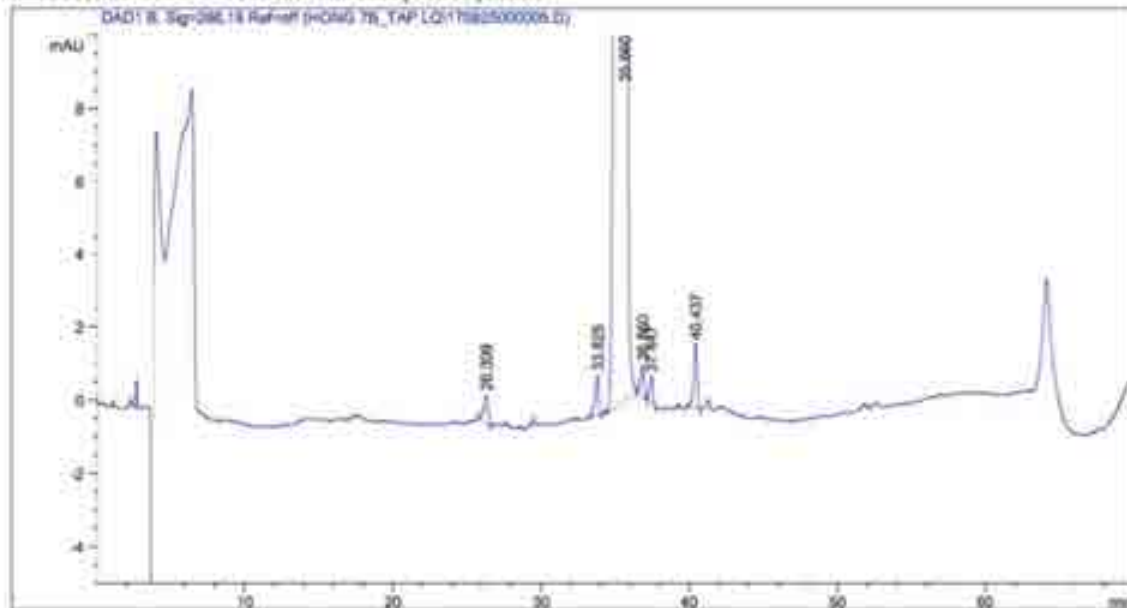
*** End of Report ***

CHƯƠNG TRÌNH SK ĐƯỢC LỰA CHỌN

Date File: D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB_TAP LO\170825000005.D
Sample Name: TB2 1000ppm (ACN)

Acq. Operator : HONG
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 21
Injection Date : 8/25/2017 3:20:32 AM Inj Volume : 70.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTB.X\HONG TB- TAP LO.M
Last changed : 8/25/2017 3:08:01 AM by HONG
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\IMINGER02.M
Last changed : 5/23/2019 9:36:16 AM by GIANG
(modified after loading)
Sample Info : TB2 1000ppm (ACN),
V=1.0 ml/p, V=70µl,
MFi: (ACN:H2O) 0' 3:95; 40' 95:5; 45' 5:95; end: 70',
col Inertail ODS, 4.6x250mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HUNG_TB_TAP_LQ\170825000005.D
Sample Name: TMS 1000ppm (ACN)

Signal 1: MS01 B, Sig=266,16 Wet-off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [aAU*s]	Height [aAU]	Area %
1	26.309	BB	0.2819	16.61502	7.72570e-1	0.0195
2	33.823	BB	0.2449	13.73801	1.14674	0.0235
3	35.660	BB	0.4102	8.39895e4	3285.37534	99.8345
4	36.860	BB	0.2173	12.65152	8.64931e-1	0.0153
5	37.447	BB	0.2155	10.78205	7.59885e-1	0.0128
6	40.437	BB	0.2823	28.92666	2.77356	0.0346

Totals : 8.40782e4 3291.23303

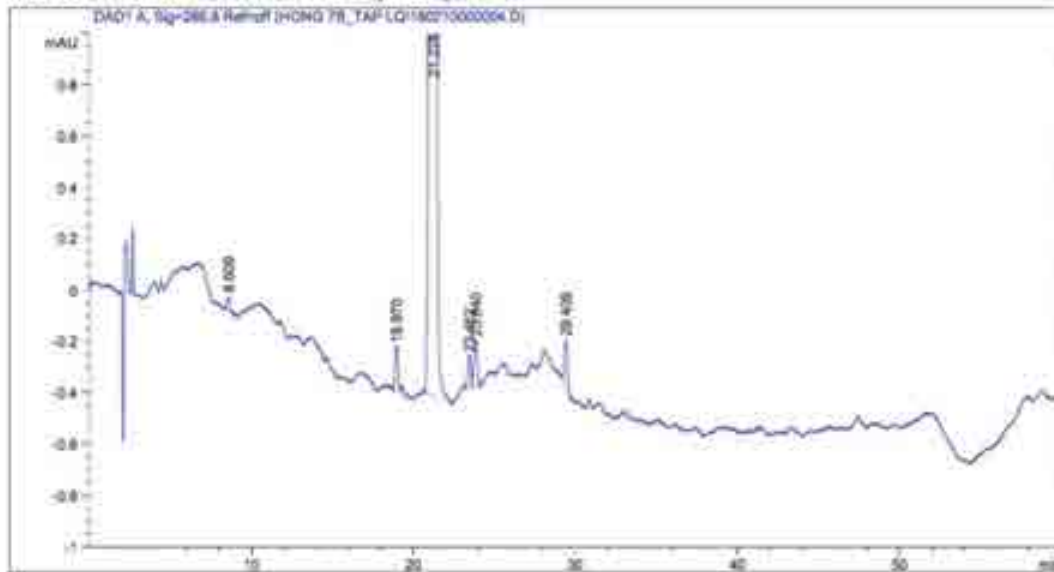
*** End of Report ***

SKD DUNG DỊCH CLEISTANTOXIN 1000 µg/mL Ở BƯỚC SÓNG 286 nm

Date File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_TB_TAP_LQ\180210000004.D
Sample Name: CLEISTANTOXIN 9.6MG

Acq. Operator : Hong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 12
Injection Date : 2/10/2018 12:12:00 PM Inj Volume : 15.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTB.X\HONG_TB_TAP_LQ.M
Last changed : 2/10/2018 12:10:59 PM by Hong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_TB_TAP_LQ.M
Last changed : 3/1/2018 10:52:02 AM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : CLEISTANTOXIN 9.6MG V=10ml, v=1,5ml/p (CHON 88 28E
MF: ACS-1120) 0' 10-10, 10' 30-50, 30' 10-30, 55' 30-10,
60' end
Col Inertsil CDS-3, 4.6x250mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,8 Ref=off

Instrument : 3/1/2018 11:54:41 AM HONG

Page : 1 of 2

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 7B_YAP_LQ\180210000004.D
Sample Name) CLEINTANTOXIN 9.892

RetTime [min]	K'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
8.608	-	7.34043e-1	5.40647e-2	0.98	0.2183	8606	-	-
18.970	-	1.91736	1.71239e-1	1.10	0.1783	62701	30.83	1.20
21.228	-	1.18923e4	1034.03479	1.10	0.1797	77290	7.41	1.12
23.452	-	1.72545	1.25023e-1	1.08	0.2173	64509	6.58	1.10
23.840	-	2.52007	1.80894e-1	1.07	0.2130	68108	1.05	1.02
29.409	-	2.37923	1.81117e-1	0.74	0.2083	110369	15.46	1.23

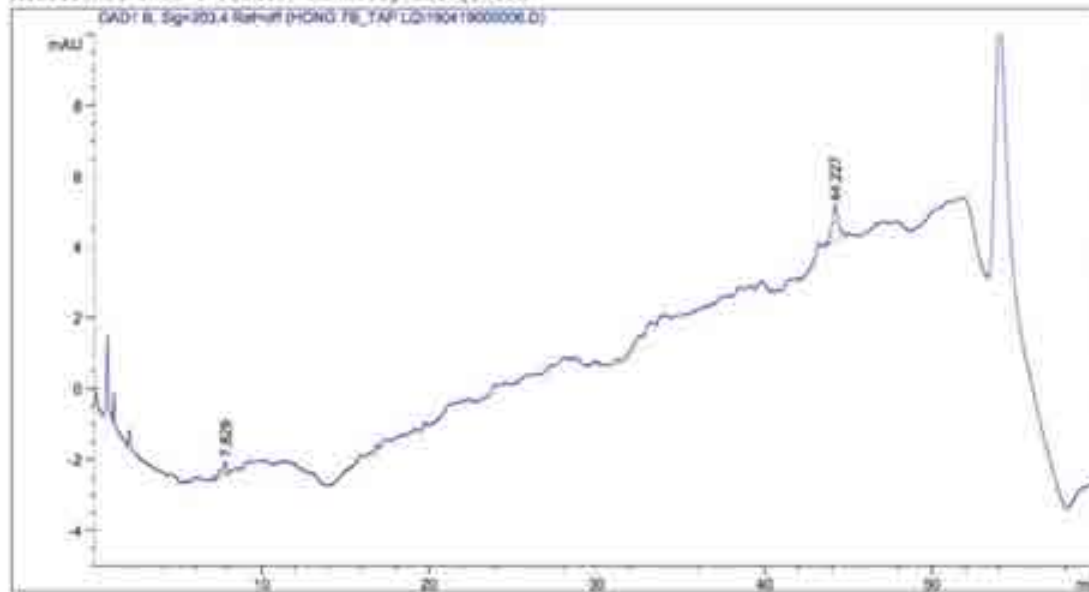
*** End of Report ***

SKD MÀU TRẮNG TẠI BƯỚC SÓNG 203 nm

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB_TAP LO\190419000006.D
Sample Name: MAU TRANG ACM

Acq. Operator : Hong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 4/19/2019 2:41:01 PM Inj Volume : 5.0 ul
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB - TAP LO.M
Last changed : 4/19/2019 2:34:30 PM by Hong
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB- TAP LO.M
Last changed : 6/3/2019 8:34:45 AM by Huang
(modified after loading)
Sample Info : MAU TRANG ACM
MP: ACM-H2O: 0° 30-70, 30° 30-50, 50° 70-30, 55° 30-70,
end 40°
Col Inertail C18 250x4.6 mm, 5um

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Instrument : 6/3/2019 8:35:19 AM Huang

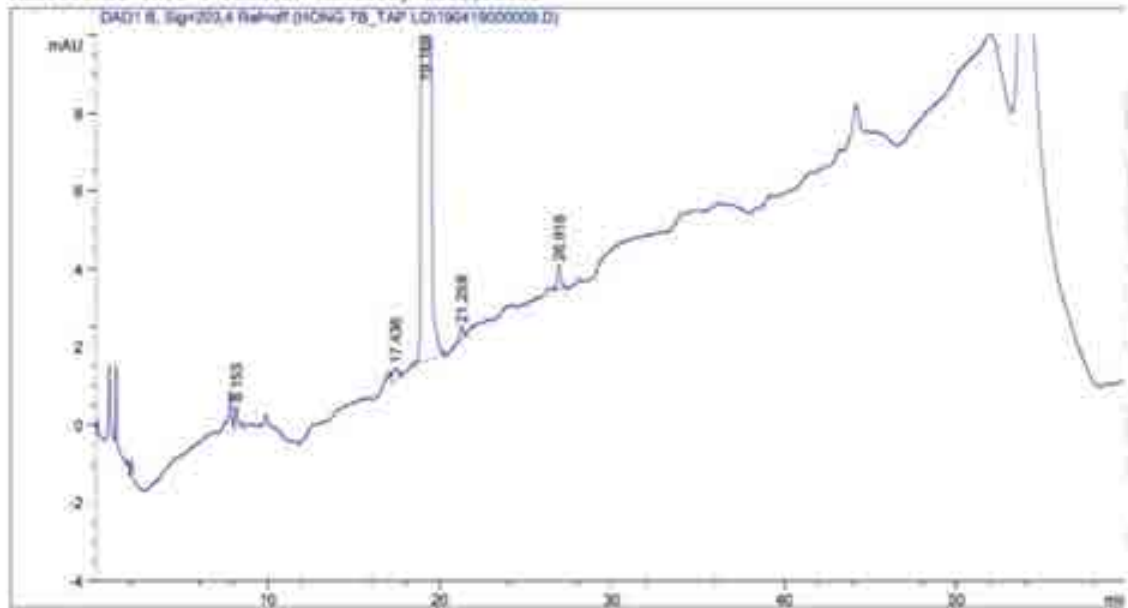
Page 1 of 2

SKD DUNG DỊCH CLEISTANTOXIN 1000 µg/mL TẠI BƯỚC SÓNG 203 nm

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TH_TAP IQ\190419000009.D
Sample Name: TB 1000ppm/ACM

Acq. Operator : Hong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 3
Injection Date : 4/19/2019 6:55:56 PM Inj Volume : 5.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TH - TAP IQ.M
Last changed : 4/19/2019 6:47:38 PM by Hong
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TH - TAP IQ.M
Last changed : 6/3/2019 8:43:00 AM by Hong
(modified after loading)
Sample Info : TB 1000ppm/ACM
MP: ACN-H2O: 0' 30-70, 20' 50-50, 50' 70-30, 55' 30-70,
and 60'
Col: Inertsil C18 250x4.6 mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TM_TAP IQ\190419000009.D
Sample Name: TB 1000ppm/ACH

Signal 1: DAD1 B, Sig=203,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.153	VB	0.1879	7.20671	9.60952e-1	0.0167
2	17.436	VB	0.2799	6.73541	2.92932e-1	0.0175
3	19.169	BB	0.2109	3.84273e4	2838.22266	99.9276
4	21.259	BB	0.1731	4.41628	3.28047e-1	0.0115
5	26.918	BB	0.2299	9.49268	6.36935e-1	0.0247

Totals : 3.84551e4 2860.04152

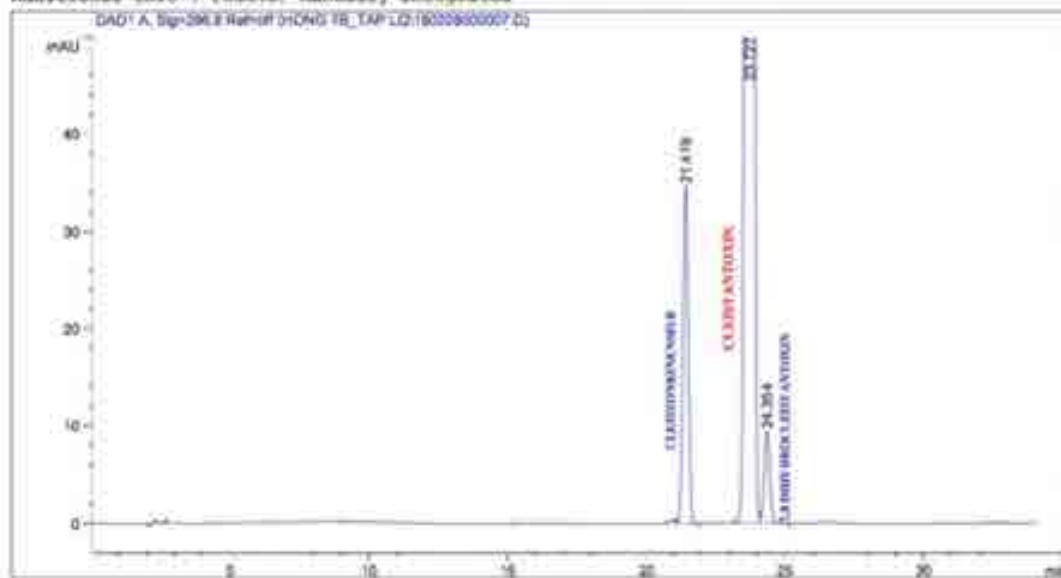
*** End of Report ***

SKD ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG TÁCH CỦA CLEISTANTOXIN 1000 µg/mL VỚI CLEISTONKINEN (CT6) VÀ 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN (CT1)

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TR_TAP LQ\18020800007.D
Sample Name: CHUAN HOK HOP TR, 17B, 2A/ ACE

Acq. Operator : Hoang
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 2
Injection Date : 2/9/2018 6:29:51 PM Inj Volume : 10.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TR, 17B, 2A\HONG TR - TAP LQ.M
Last changed : 2/6/2018 6:16:57 PM by Hoang
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TR - TAP LQ.M
Last changed : 6/28/2019 11:19:04 AM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : CHUAN HOK HOP TR, 17B, 2A/ ACM, V=10µl, v=1.5µl/p
MP: ACM-HOP 0' 30-70, 25' 50-50, 50' 70-30, 53' 30-70,
60' end
Col Inertall CDS-3, 4.6x250mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1.A, Sig=286,8 Ref=off

Instrument 1 6/28/2019 11:29:30 AM HONG

Page 1 of 2

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 78_TAP IQ\180208000007.D
Sample Name: CHUAN SUN RCP 78,178,BA/ ACM

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
21.418	-	450.28883	34.64751	0.99	0.2030	61663	-	-
23.727	-	1.04638e6	777.88428	1.08	0.2106	70465	6.56	1.11
24.354	-	129.44763	9.43338	0.99	0.2134	72149	1.74	1.03

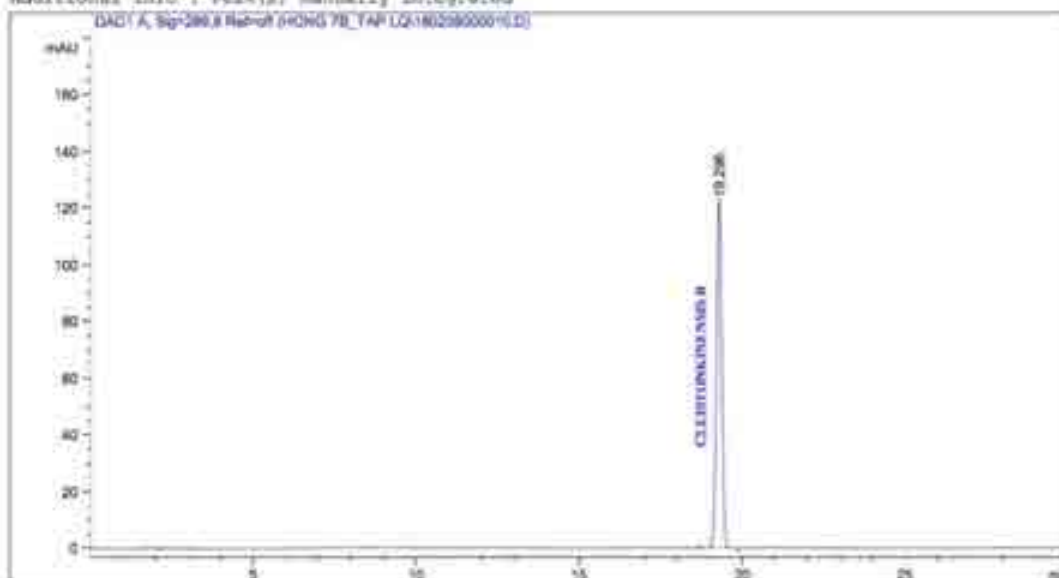
*** End of Report ***

DUNG DỊCH CLEISTONKINEN (CT6)

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB_TAP LQ\180208000010.D
Sample Name: CHUAN 17B/ ACN

Acq. Operator : HONG
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 3
Injection Date : 2/8/2018 6:53:19 PM Inj Volume : 10.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTB.M\HONG TB- TAP LQ.M
Last changed : 2/8/2018 6:49:58 PM by HONG
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB - TAP LQ.M
Last changed : 2/11/2018 8:37:04 AM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : CHUAN 17B/ ACN, V=10µl, v=1,5ml/p
MP: ACN-H2O: 0' 30-70, 20' 30-50, 50' 70-30, 55' 30-70,
60' and
Col Inertail CDS-3, 4.6x150mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal : DAD1 A, Sig=286.8 Ref=off

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TR TAP LQ\180208000010.D
Sample Name: CRUAN 17B/ ACN

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resolution	Selectivity
19.296	-	1399.96692	122.47324	0.99	0.6790	64402	-	-

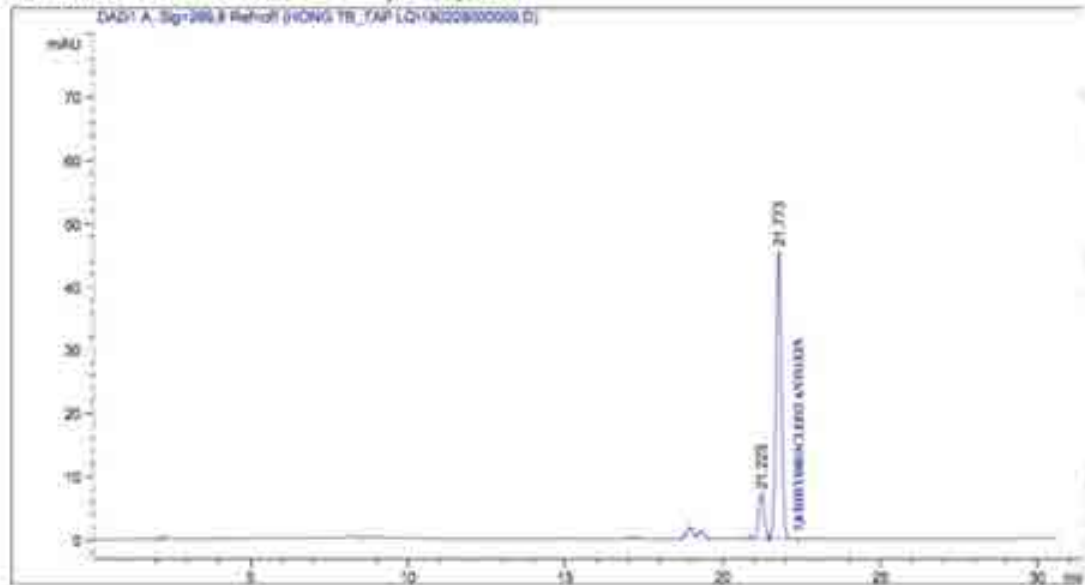
*** End of Report ***

DUNG DỊCH 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN (CT1)

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB TAP LQ\180308000000.D
Sample Name: CHUAN 8A/ ACN

Acq. Operator : Hoang
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 4
Injection Date : 2/8/2018 8:27:04 PM Inj Volume : 50.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTB.X\HONG TB- TAP LQ.M
Last changed : 2/8/2018 8:11:21 PM by Hoang
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB - TAP LQ.M
Last changed : 2/11/2018 8:32:57 AM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : CHUAN 8A/ ACN, V=10ml, w=1.5ml/p
MP: ACN-R20: 0' 30-70, 20' 30-80, 30' 70-90, 55' 30-70,
60' end
Col Install: GDS-3, 4.6x250mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 [ng/ul] not used in calc.
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,8 Ref=off

Data File Dr:\CHEM32\1\DATA\HONG TB_TAP IQ\180208000009.D
Sample Name: CHUAN 8A/ ACB

RetTime (min)	k'	Area (mAU*s)	Height (mAU)	Symm.	Width (min)	Plates	Resol	Select
								ivity
21.223	-	85.66545	7.21040	0.98	0.1861	71618	-	-
21.773	-	544.37122	45.68202	0.99	0.1878	74414	1.72	1.03

*** End of Report ***

Data File D:\CHECK2\1\DATA\HONG 16A- ZAP Iq\160410000008.D
Sample Name: MUI CHIAN 16A

Signal 1: GAD1 A, Sig-226, 8 Ref-off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	14.291	BR	0.2134	286.89178	20.73580	1.8248
2	16.077	SV	0.2150	1.33519e4	1098.82104	97.6550
3	16.976	VB	0.2594	49.52583	4.04850	0.4423
4	18.020	BR	0.2841	12.22258	6.03886e-1	0.0771

Totals: 1.57206e4 1126.22923

*** End of Report ***

DUNG DỊCH CLEISINDOSIDE D 1000 µg/mL ĐO TẠI 203 nm

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 16A - TAP 1Q - 2019\190409000003.D
Sample Name: MAU CHUAN 16A - 5 mL (3)

Acq. Operator : GIANG
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 2
Injection Date : 6/9/2019 2:08:21 PM Inj. Volume : 5.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP 1Q.M
Last changed : 6/9/2019 1:59:28 PM by GIANG
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP 1Q.M
Last changed : 6/11/2019 11:27:08 AM by GIANG
(modified after loading)
Sample Info : MAU CHUAN 16A - 5 mL (3)
COT INVERSIL C18 (250x4.6 mm, 5µm)
VNA DONG ACH-820 CHUONG TRINH GRADIENT: 0': 25-73, V=1,
0 mL/ phút, 40': 50-50, V=1,0mL/ phút, 45': 73-27, V=1,
0mL/ phút, 50': 27-73, V=1,0 mL/ phút, STOP TIME: 55 PHU
T.

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: 1.0000
Dilution: 1.0000
Sample Amount: 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Instrument 1 6/11/2019 11:28:33 AM GIANG

Page 1 of 2

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 16A - TAP LQ - 2019\190409002005.D
Sample Name: MAU CHUAN 16A - 5 mL (2)

Signal 1: DMSI 9, Sig=203,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	14.298	VV	0.1771	339.12701	29.71551	1.8704
2	16.073	BV	0.1847	1.77034e4	1489.60400	97.6387
3	16.971	VB	0.2194	78.20300	5.81613	0.4313
4	18.000	BV	0.1994	10.80562	7.53273e-1	0.0596

Totals: 1.81316e4 1525.58932

*** End of Report ***

PHỤ LỤC 2.3. THĂM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT CỦA CLEISTANTOXIN

ĐỘ ĐẶC HIỆU MÀU TRẮNG-DUNG MÔI PHA MÀU ACN

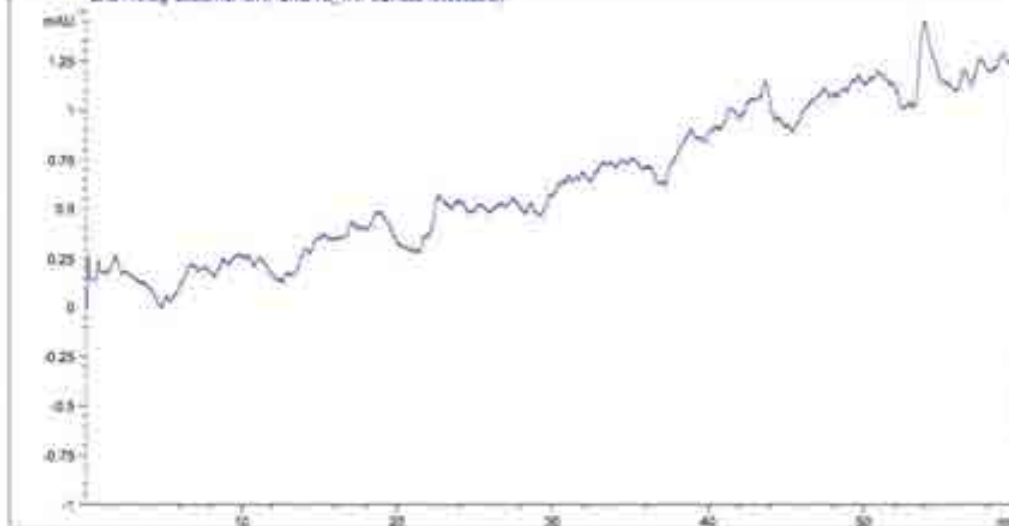
Data File D:\CHROM32\1\DATA\HONG_TB_TAP_LQ\180210000002.D
Sample Name: MAU TRANG ACN

Acq. Operator : HONG
Acq. Instrument : Instrument 1 Injection : Vial 11
Injection Date : 2/10/2018 10:03:48 AM Inj Volume : 30.0 µl

Acq. Method : D:\CHROM32\1\METHODS\HONG_TB_TAP_LQ.M
Last changed : 2/10/2018 10:04:32 AM by ADMIN
Analysis Method : D:\CHROM32\1\METHODS\HONG_TB_TAP_LQ.M
Last changed : 2/10/2018 10:10:50 AM by HONG
(modified after loading)

Sample Info : MAU TRANG (ACN),
V=300ul, w=1.5ml/g, CHROM MS 299
MP: ACN-H2O: 0' 30-70, 25' 50-50, 50' 70-30, 55' 30-70,
60' end
Col Inertail GSD-3, 4.6x250mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated
DATA: Signal: HONG_TB_TAP_LQ\180210000002.D



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 [ng/ml] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTD

No peaks found

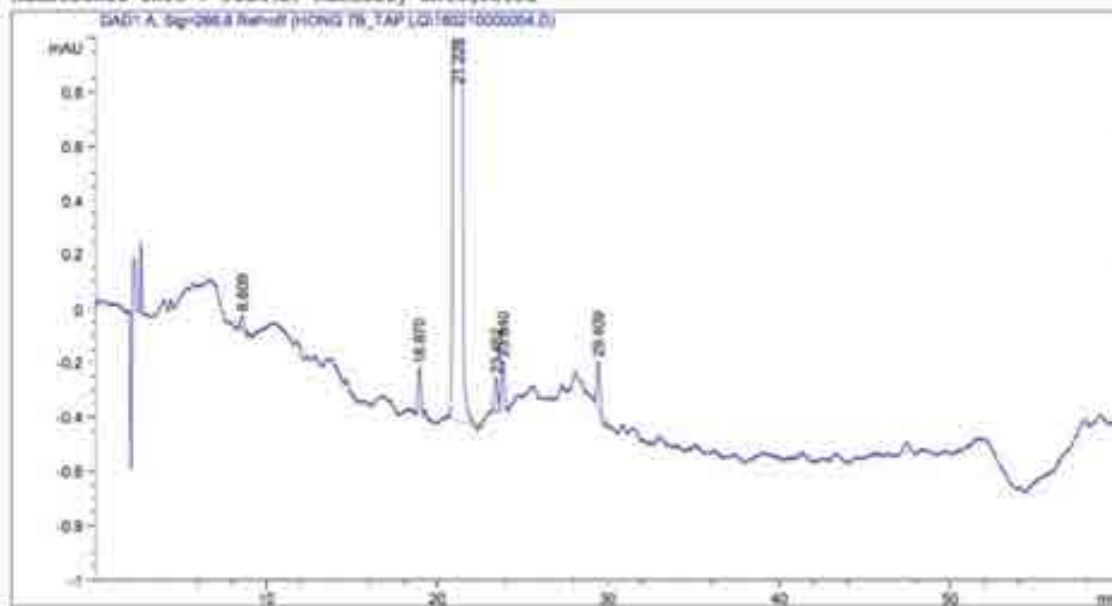
*** End of Report ***

DUNG DỊCH CLEISTANTOXIN 1000 µg/mL

Data File: D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB_TAP LO\180210000004.D
Sample Name: CLEISTANTOXIN 9.8MG

Acq. Operator : Hong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 12
Injection Date : 2/10/2018 12:12:00 PM Inj Volume : 15.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB.M\HONG TB- TAP LO.M
Last changed : 2/10/2018 12:10:55 PM by Hong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB - TAP LO.M
Last changed : 3/1/2018 10:52:02 AM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : CLEISTANTOXIN 9.8MG V=10µl, v=1.5ml/p CHON BE JBE
MP: ACM-H2O: 5' 30-70, 20' 50-50, 30' 70-30, 35' 30-70,
40' end
Col Inertail ODS-3, 4.6x250mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=266,8 Ref=off

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 7B_YAP_LQ\180210000004.D
Sample Name) CLEINTANTOXIN 9.892

RetTime [min]	K'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
8.608	-	7.34043e-1	5.40647e-2	0.98	0.2183	8606	-	-
18.970	-	1.91736	1.71239e-1	1.10	0.1783	62701	30.83	1.20
21.228	-	1.18923e4	1034.03479	1.10	0.1797	77290	7.41	1.12
23.452	-	1.72545	1.25023e-1	1.08	0.2173	64509	6.58	1.10
23.840	-	2.52007	1.80894e-1	1.07	0.2130	68108	1.05	1.02
29.409	-	2.37923	1.81117e-1	0.74	0.2083	110369	15.46	1.23

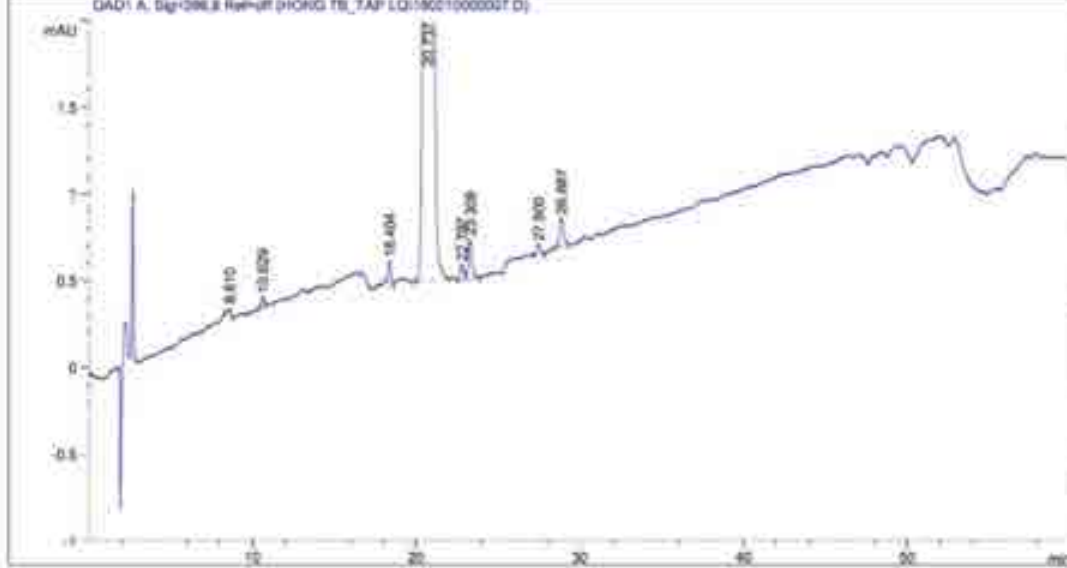
*** End of Report ***

DD CLEISTANTOXIN 1000 µg/mL PHÂN HỦY TRONG H₂O₂ 30%/3 GIỜ

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 79_TAP LQ\180210000007.D
Sample Name: Cleistantokin 1000 ppm

Acq. Operator : huong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 11
Injection Date : 2/10/2018 3:44:28 PM Inj Volume : 30.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG79_TAP LQ.M
Last changed : 2/10/2018 3:28:50 PM by huong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 79 - TAP LQ.M
Last changed : 3/1/2018 10:45:22 AM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : Cleistantokin 1000 ppm 2' ACN:W20 30:70 20' 50:50 30'
70:30 55' 30:70 50:50 60' v= 1.5ML/P V=30UL (200)

Additional Info : Peak(s) manually integrated
DAD1 A, Sig=286,0 Met=off



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 11.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 ng/ul (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,0 Met=off

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TS_TAP 1Q\180219000007.D
Sample Name: Clostrantoxin 1000 ppm

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
8.610	-	7.91188e-1	4.89630e-2	2.08	0.2889	4921	-	-
10.629	-	7.63389e-1	6.07553e-2	1.23	0.2217	12723	4.45	1.23
18.404	-	1.64165	1.30830e-1	1.20	0.2089	63001	21.22	1.73
20.737	-	1.71572e4	1201.54004	1.01	0.2221	48295	4.36	1.13
22.797	-	1.30897	9.33633e-2	0.81	0.2283	54711	3.26	1.10
23.309	-	3.91831	2.27007e-1	1.05	0.2422	43779	1.22	1.02
27.500	-	1.15271	8.41470e-2	1.36	0.2911	69450	8.90	1.14
28.887	-	3.00813	1.70524e-1	0.90	0.2689	63954	1.91	1.05

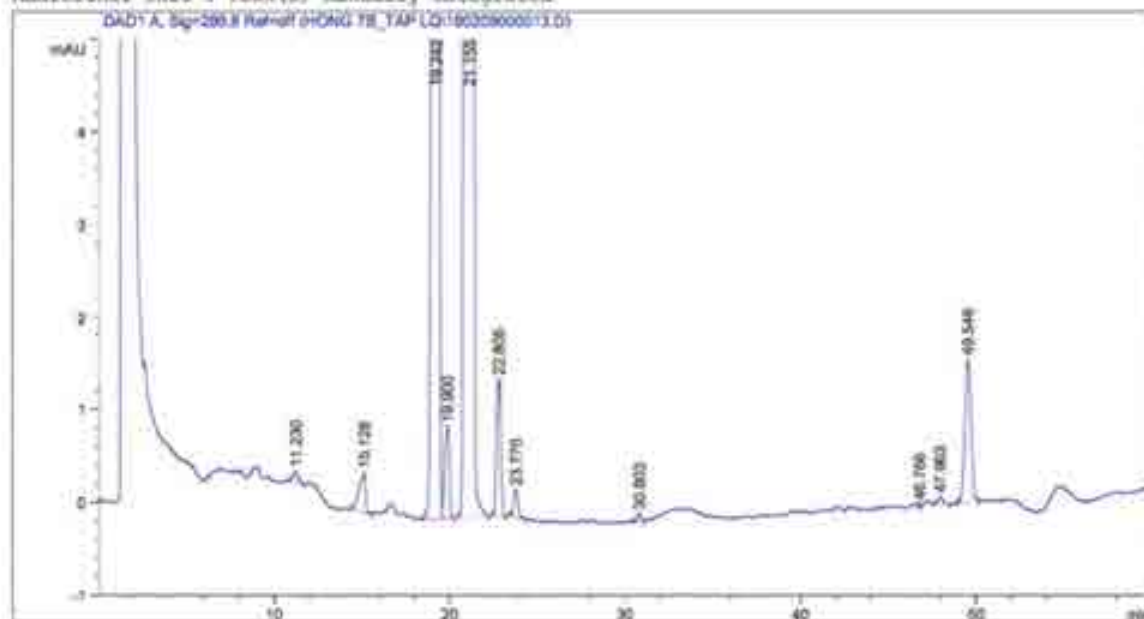
*** End of Report ***

DD CLEISTANTOXIN 1000 µg/mL PHÂN HỦY TRONG H₂SO₄ 0,1N/30 PHÚT

Date File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB TAP LO\160309000013.D
Sample Name: CLEISTANTOXIN PHAN HUY/H2SO4 0.1M

Acq. Operator : Hong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 7
Injection Date : 2/9/2018 7:37:55 PM Inj Volume : 50.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTB.M\HONG TB- TAP LO.M
Last changed : 2/9/2018 7:30:03 PM by Hong
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTB.M\HONG TB- TAP LO.M
Last changed : 2/10/2018 12:12:56 PM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : CLEISTANTOXIN PHAN HUY/H2SO4 0.1M, V=10µl, v=1.5ml/p C
HON BB 286
MP: ACN-H2O: 0' 10-70, 20' 50-50, 50' 70-30, 55' 30-70,
60' end
Cot Inertail ODS-3, 4.6x250mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,0 Ref=off

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 78_TAP LG\140209000013.D
Sample Name: CLEISTANTOXIN PHAN HUY/H2S04 0.1N

RetTime [min]	X'	Area [HAU*s]	Height [HAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ution ivity
11.230	-	2.62403	1.17011e-1	0.80	0.3367	6168	-	-
15.128	-	10.96916	4.29735e-1	3.21	0.4133	7420	6.13	1.35
19.242	-	1322.60376	68.82401	1.55	0.3145	20733	6.64	1.37
19.900	-	18.93408	9.96191e-1	1.44	0.3150	22310	1.23	1.03
21.155	-	1.35719e4	769.28870	1.40	0.2867	30148	2.45	1.06
22.805	-	23.39233	1.47485	1.12	0.2511	45698	3.61	1.06
23.770	-	4.90379	2.97673e-1	0.98	0.2578	47118	2.23	1.04
30.803	-	1.42041	8.80679e-2	1.37	0.2533	81888	14.17	1.30
44.766	-	3.18799e-2	2.07323e-2	0.85	0.0422	6786673	63.48	1.52
47.963	-	1.71332	8.65735e-2	0.80	0.2867	155064	4.28	1.03
49.546	-	37.12416	1.53725	1.02	0.3749	96757	2.81	1.03

*** End of Report ***

GIỚI HẠN ĐỊNH LƯỢNG-LOQ

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB_TAP LO\180314000002.D
Sample Name: CLEISTANTOXIN 0,0522M

Acq. Operator : huong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 2
Injection Date : 3/14/2018 9:42:36 AM Inj Volume : 30.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTB.M\HONG TB- TAP LO.M
Last changed : 3/14/2018 9:28:42 AM by huong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB_TAP LO.M
Last changed : 3/28/2019 4:15:58 PM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : CLEISTANTOXIN 0* ACS:H2O 30:70 20* 50:50 50* 70:30 35*
30:70 STOP 60* w= 1,3ML/Y V=30ul (W)

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 (mg/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.8 Ref=off

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 78 YAF LQ\180314000009.D
Sample Name: CISTRANTOXIN 0.052PM

Peak #	Retention Time [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	20.706	SM	0.1694	1.55172	1.09485e-1	100.0000

Totals : 1.55172 1.09485e-1

*** End of Report ***

ĐƯỜNG CHUẨN

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB_TAP LO\180314000003.D
Sample Name: CLERISTANTOXIN 1PPM

Acq. Operator : huuong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 3
Injection Date : 3/14/2018 10:14:06 AM Inj Volume : 30.0 ul
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB_M\HONG TB- TAP.LQ.M
Last changed : 3/14/2018 10:10:22 AM by huuong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB_TAP.LQ.M
Last changed : 5/28/2019 4:33:34 PM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : CLERISTANTOXIN 1PPM 0' ACN:R20 30:70 20' 50:50 50' 70:30
55' 30:70 STOP 60' v= 1.5ML/P V=30ul (DC)

Additional Info : 2peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,8 Ref=off

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TS_ZAP LQ\180314000003.D
Sample Name: CLKISTANTOXIN 197M

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	20.739	DR	0.2262	23.36836	1.60157	100.0000

Totals : 23.36836 1.60157

*** End of Report ***

Data File D:\CHEM32\1\DATA\BONG TB_TAP LQ\180314000004.D
Sample Name: CLEISTANTOXIN 5PPM

Acq. Operator : huong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 4
Injection Date : 3/14/2018 10:47:15 AM Inj Volume : 30.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\BONG TB_TAP LQ.M
Last changed : 3/14/2018 10:41:38 AM by huong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\BONG TB_TAP LQ.M
Last changed : 5/28/2019 4:36:38 PM by NONG
(modified after loading)
Sample Info : CLEISTANTOXIN 5PPM 0' ACN:H2O 30:70 20' 90:50 50' 70:30
55' 30:70 60' v= 1.5mL/M v=30uL (DC)

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 [µg/µl] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD: A, Sig=286.8 Ref=off

Data File D:\CHEK32\1\DATA\MONG 79_TAP LQ\180314000004.D
Sample Name: CLEISTANTOXIN 5PPM

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [HAU*s]	Height [HAU]	Area %
1	20.759	SH	2.2277	101.28584	6.98217	100.0003
Totals :				101.28584	6.98217	

*** End of Report ***

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB_TAP LQ\180314000005.D
Sample Name: CLEISTANTOXIN 10PIM

Acq. Operator : huong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 5
Injection Date : 3/14/2018 11:19:30 AM Inj Volume : 30.0 ul
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTB.M\HONG TB_TAP LQ.M
Last changed : 3/14/2018 11:14:49 AM by huong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB_TAP LQ.M
Last changed : 3/28/2019 4:39:15 PM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : CLEISTANTOXIN 10PIM 0' ACN:H2O 30:70 30' 50:50-50' 70:30
0 55' 30:70 STOP 60' v= 1.5ML/M V=30ul (DC)

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 (ug/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAQ# A. Sig=286.8 Ref=off

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB_TAP EQ\180314000005.D
Sample Name: CISTRANTOXIN 10PPM

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	20.758	BH	0.2331	200.74104	13.33210	100.0000

Totals : 200.74104 13.33210

*** End of Report ***

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 78_TAP LQ\190314000007.D
Sample Name: Cloistantoxin 500 ppm

Acq. Operator : huong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 7
Injection Date : 3/14/2019 12:24:52 PM Inj Volume : 30.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG78.M\HONG 78- TAP LQ.M
Last changed : 3/14/2019 12:19:46 PM by huong
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 78_TAP LQ.M
Last changed : 5/28/2019 4:46:12 PM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : 1 Cloistantoxin 500 ppm 0' ACS:H2O 30:70 20' 50:50 50' 7
0:30 53' 30:70 STOP 60' v= 1.5ML/P V=30ul (DPHST)

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 [ug/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.8 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	20.704	SB	0.2365	7110.02100	464.71616	100.0000

Data File U:\CHEM32\1\DATA\HONG 7B_TAP 1Q\180314000007.D
Sample Name: Clostrantoxin 505 ppm

Totals : 7110.02100 464.71814

*** End of Report ***

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB_TAP LQ\180314000009.D
Sample Name: Clostrantoxin 750 ppm

Acq. Operator : huong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 8
Injection Date : 3/14/2018 12:57:10 PM Inj Volume : 35.0 ul

Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTB.X\HONG TB- TAP LQ.M
Last changed : 3/14/2018 12:52:24 PM by huong
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB _ TAP LQ.M
Last changed : 5/28/2019 4:47:59 PM by HONG
(modified after loading)
Sample Info : Clostrantoxin 750 ppm 0' ACH:20 30:70 20' 50:50 50' 7
0:30 55' 30:70 5T02' 60' v= 1.5ML/P V=30ul (DPH02)

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD: A, Sig=286,8 Ref-off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	20.717	BB	0.2343	1.11177e4	735.81879	100.0000

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 78_TAP 1Q\190314000009.D
Sample Name: Cloisstantoxin 750 ppm

Totals : 1.11177e6 735.81879

*** End of Report ***

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 7B_YAP LQ\180314000009.D
Sample Name: Cloisstantoxin 1000 ppm

Acq. Operator : j.huong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 9
Injection Date : 3/14/2018 1:30:54 PM Inj Volume : 30.0 uL
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG7B_X\HONG 7B_YAP LQ.M
Last changed : 3/14/2018 1:29:29 PM by huong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 7B_YAP LQ.M
Last changed : 5/29/2019 4:49:57 PM by WONG
(modified after loading)
Sample Info : Cloisstantoxin 1000 ppm 0' ACH:120 30:70 20' 50:50 50'
70:30 55' 30:70 STOP 60' v= 1.5ML/P V=30uL (DPHBT)

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 ug/uL (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.8 Ref=off

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB TA> 10\160314000009.D
Sample Name: Clostritoxin 1000 ppm

Peak #	Retention Time [min]	Type	Width [min]	Area [aAU*s]	Height [aAU]	Area %
1	20.740	SM	0.2250	1.49707e1	1033.18811	100.0000
Totals :				1.49707e1	1033.18811	

*** End of Report ***

**ĐÁNH GIÁ HỆ SỐ CHẴN (INTERCEPT) CỦA ĐƯỜNG CHUẨN
CLEISTANTOXIN BẰNG PHẦN MỀM EXCEL**

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.99968247
R Square	0.99936505
Adjusted R Square	0.99923806
Standard Error	164.702159
Observations	7

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	213478138	213478138	7869.63924	3.4501E-09
Residual	5	135634.005	27126.801		
Total	6	213613772			

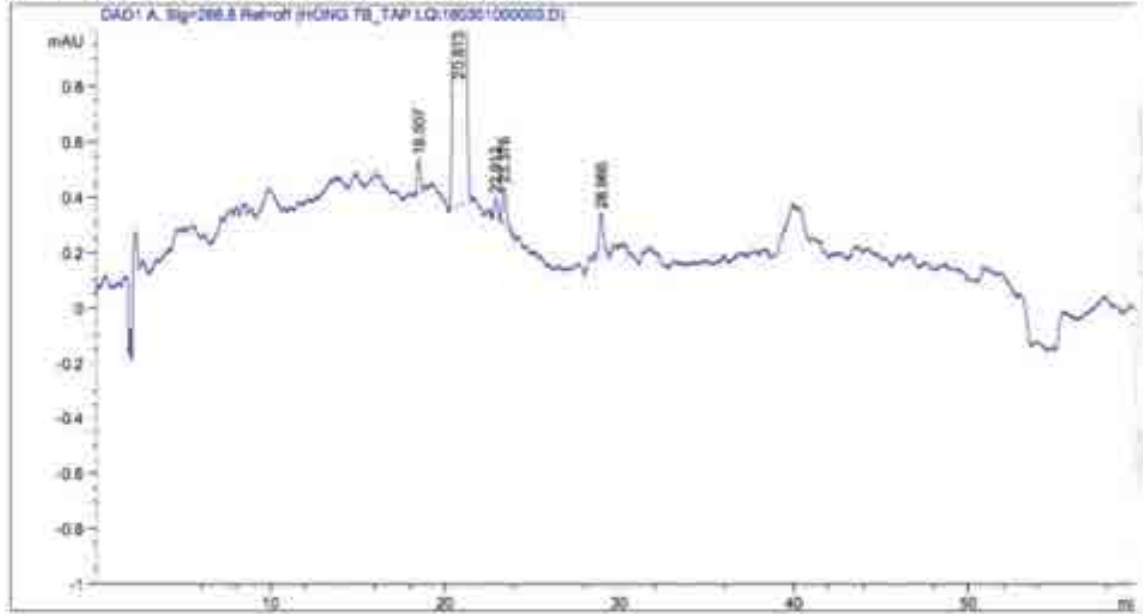
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	8.87	86.5	0.102	0.922	-214	231	-214	231
X Variable 1	14.1	0.159	88.7	3.451E-09	13.7	14.6	13.7	14.6

ĐỘ LẶP LẠI

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG TB_TAP LQ\180301000003.D
Sample Name: Cleistantoxin 1000ppm (10.1mg)

Acq. Operator : Hong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 3
Injection Date : 3/1/2018 10:44:09 AM Inj Volume : 30.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB_TAP LQ.M
Last changed : 3/1/2018 10:36:18 AM by Hong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG TB_TAP LQ.M
Last changed : 5/29/2019 2:35:38 PM by HONG
Sample Info : Cleistantoxin 1000 ppm (10.1 mg), V=10ml, vvl.5ml/p
MP: ACN-H2O: 0' 30-70, 20' 30-90, 50' 70-30, 15' 30-70,
60' end
Cot Inertail ODS-3, 4.6x250mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Data file D:\CHIM32\1\DATA\HONG 78_TAP LG\100301000003.D
Sample Name: Clostridotoxin 1000ppm (10.Lmg)

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,8 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	18.307	BB	0.1762	1.66693	1.19337e-1	0.0114
2	20.813	BB	0.2206	1.45796e6	1009.71960	99.9481
3	22.912	BB	0.1361	8.93402e-3	7.33638e-2	6.125e-3
4	23.376	BB	0.2175	2.16409	1.29160e-1	0.0148
5	28.966	BB	0.2264	2.84820	1.56525e-1	0.0195

Totals : 1.45872e6 1009.19857

*** End of Report ***

PHỤ LỤC 2.4. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA CLEISINDOSIDE D ĐỘ ĐẶC HIỆU DUNG DỊCH CLEISINDOSIDE D 1000 µg/mL

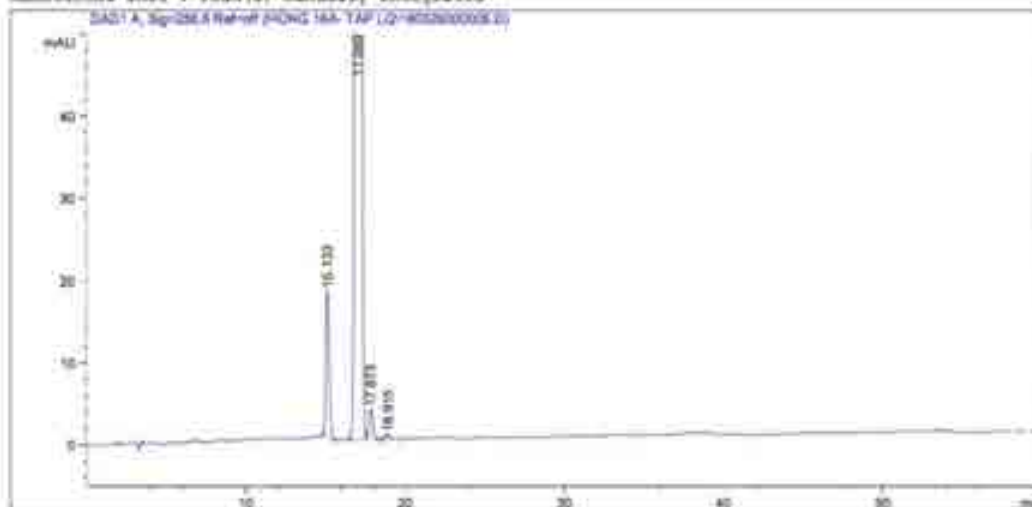
Data File: D:\CHROM32\1\DATA\H000 16A- TAP 1Q\180326000006.D
Sample Name: 16A 1000ppm/ ACB-H2O

```

-----
Acq. Operator   : hoang
Acq. Instrument : Instrument 1          Injection : Vial 2
Injection Date  : 3/26/2018 4:46:22 PM          Inj Volume : 20.0 ul

Acq. Method    : D:\CHROM32\1\METHODS\H000 16A- TAP 1Q.M
Last changed   : 3/26/2018 4:29:07 PM by hoang
                (modified after loading)
Analysis Method: D:\CHROM32\1\METHODS\H000 16A- TAP 1Q.M
Last changed   : 4/27/2018 11:02:36 AM by hoang
                (modified after loading)
Sample Info    : 16A 1000ppm/ ACB-H2O, V=200ul, v=1ml/g
                MP: ACB - H2O: 0' 21-73, 40' 50-50, 50' 33-27, 55' 23-7
                3, wed 40'
                Col Inertail GDE-3, 4.6x250mm, 5um
    
```

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

```

-----
Sorted by      :      Signal
Multiplier     :      1.0000
Dilution       :      1.0000
Sample Amounts :      1.00000 (ug/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier * Dilution Factor with ISTDs
    
```

Instrument 1: 4/27/2018 11:02:36 AM hoang

Page 1 of 2

Data File D:\CHEM32\1\DATA\RMW\16A-TAP LC\180326000006.D
Sample Name: 16A 1000ppm/ ACS-H2O

Signal: 1: DAD1 A, Sig=289, # Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	15.133	BB	0.2301	266.64877	17.88596	1.8087
2	17.049	BV	0.2326	1.64190e4	961.97211	97.6883
3	17.873	VB	0.2570	63.14891	3.70248	0.4279
4	18.915	BB	0.2644	11.36756	5.90966e-1	0.0772

Totals: 1.47592e4 964.13132

*** End of Report ***

DD CLEISINDOSIDE D 1000 µg/mL PHÂN HUY TRONG H₂O₂ 30%/3 GIỜ

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 16A- TAP 1Q\180328000006.0

Sample Name: 16A 1000ppm/ACN -H2O +H2O2 3% (3h)

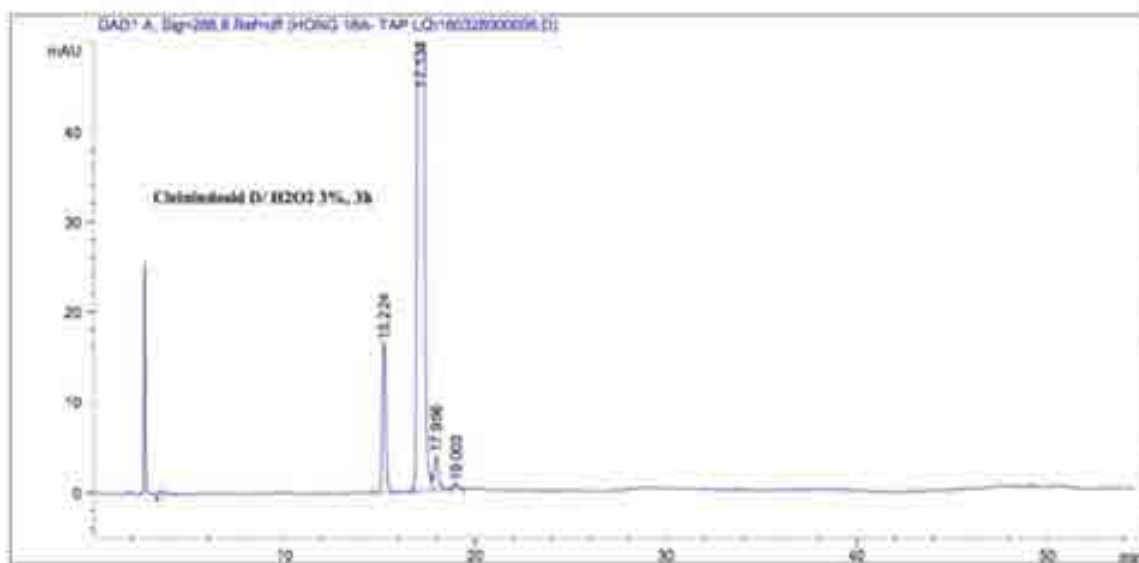
Acq. Operator : Hoang
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 3
Injection Date : 3/28/2018 2:16:30 PM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP 1Q.M
Last changed : 3/28/2018 2:12:12 PM by Hoang
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP 1Q.M
Last changed : 4/9/2018 11:35:22 AM by Hoang
(modified after loading)
Sample Info : 16A 1000ppm/ACN -H2O +H2O2 3% (3h), V=20µl, v=1ml/p
MP: ACN- H2O: 0' 27-73, 40' 50-50, 45' 73-27, 50' 27-73
end 55'
Col Inertail ODS-3, 4.6x250mm, 5µm
pha 9h30'

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertail ODS-3-C18 Column, 4.6 x 250mm, 5µm
Serial# : autoID-15
Product# : 993967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 250.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 80.0 µl
Injections : 22
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 16A- TAP LO\180328000006.D
 Sample Name: 16A 1000ppm/ACN -H2O +K2O2 3h (3h)



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Sample Amount: 1.00000 (ug/ul) (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,8 Ref=off

RetTime [min]	K'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
15.224	5.11	206.70128	16.56697	0.93	0.1935	34307	-	-
17.134	5.87	1.16387e4	907.02924	0.94	0.1984	41313	5.73	1.15
17.936	6.20	64.80447	3.89136	0.86	0.2400	31018	2.20	1.06
19.003	6.42	7.21512	5.45160e-1	0.81	0.2067	46849	2.75	1.07

*** End of Report ***

DD CLEISINDOSIDE D 1000 µg/mL CÁCH HUỖ 80°C/2 GIỜ

Data File D:\CHEM32\1\DATA\NONG 16A- TAP LO\180510000008.D
Sample Name: Cleisindosid , cach thuy 80c, 2h

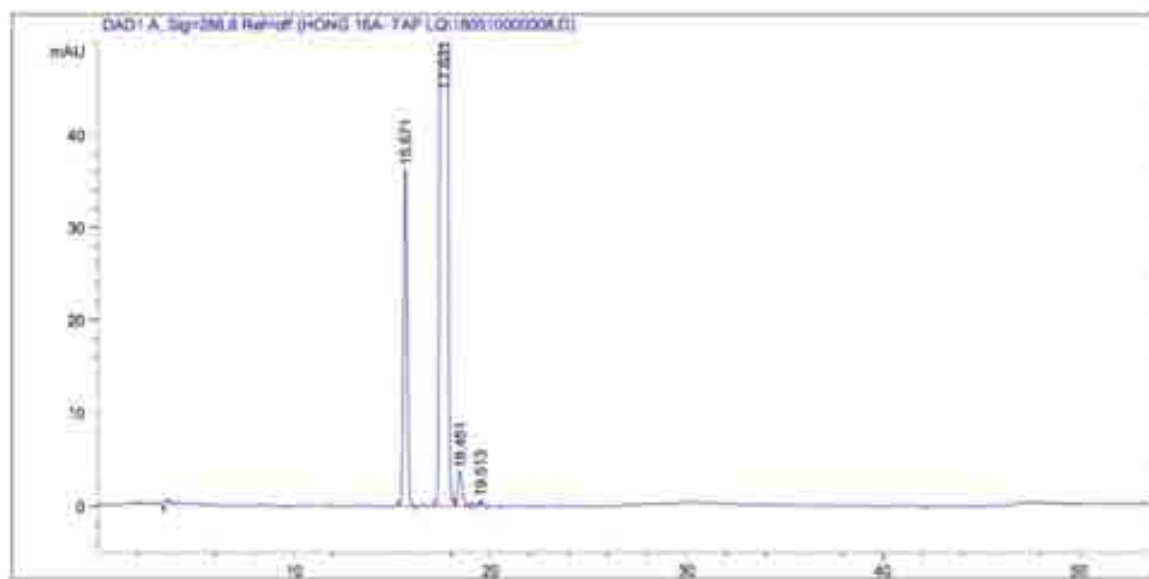
Acq. Operator : Hoang
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 11
Injection Date : 5/10/2018 8:14:27 PM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\NONG 16A- TAP LO.M
Last changed : 5/10/2018 4:06:24 PM by Hoang
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\NONG 16A- TAP LO.M
Last changed : 5/10/2018 6:55:01 PM by DUNG
(modified after loading)
Sample Info : Cleisindosid , cach thuy 80c, 2h, V=20µl, v=1.0 ml/p
MP: ACM- R20: 0' 27-73, 40' 50-50, 45' 73-27, 30' 27-73
, end: 33'
Col Inertail ODS-3, 4,6x250mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Hyperall 5i
Serial# : autoID-15
Product# : Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 200.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
Injections : 304
Maximum Pressure : 900.0 bar Maximum pH : 8.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :

Data File D:\CHEN32\1\DATA\WORK 16A-YAP LO\180510000008.D
Sample Name: Cloisidoxid , each buy 80°C, 2h



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
Dilution: 1.0000
Sample Amount: 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A: Sig=286.8 Ref=off

RetTime [min]	K'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Peak Select	Quality
15.671	6.86	476.37082	36.34039	0.99	0.2036	32802	-	-
17.631	7.86	1.21570e4	916.84637	1.00	0.2061	40591	5.62	1.14
18.451	8.25	57.84960	3.66565	0.89	0.2313	35246	2.20	1.05
19.513	8.78	8.34150	5.84414e-1	1.15	0.2089	48323	2.83	1.06

*** End of Report ***

DD CLEISINDOSIDE D 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PHÂN HUỶ TRONG NaOH 0,1N/15 PHÚT

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 16A- TAP 1Q\180329000010.D
Sample Name: 16A 1000ppm/ ACN-H2O+1gi NaOH 0.1N

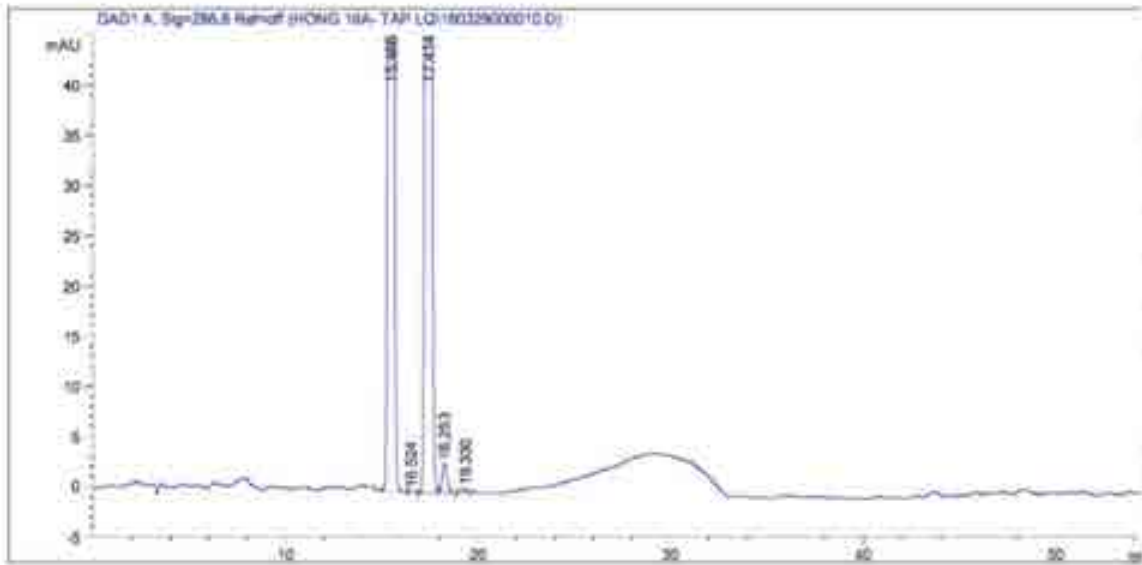
Acq. Operator : Hoang
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 12
Injection Date : 3/29/2018 5:45:23 PM Inj Volume : 20.0 μl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP 1Q.M
Last changed : 3/29/2018 5:40:55 PM by Hoang
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP 1Q.M
Last changed : 4/27/2018 10:46:08 AM by Hoang
(modified after loading)
Sample Info : 16A 1000ppm/ ACN-H2O+1gi NaOH 0.1N, c=1.0ml/gEac, V=60
ml
MP: ACN-H2O, 5' 21-73, 40' 50-50, 45' 73-27, 50' 21-73,
wd: 55'
col Inertail ODS-3, 250x4.6 mm, 5um

Additional info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertail ODS-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5um
Serial# : autoID-13
Product# : 993947-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 μm Void volume : 60.0 μl
Injections : 327
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature : 60.0 $^{\circ}\text{C}$
Comment :

Data File D:\CHECK32\1\DATA\NONE 16A- TAP LO\180329000010.D
 Sample Name: 16A 1000ppm/ ACN-H2O+lg1 NaOH 0.1M



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Sample Amount: 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.8 Ref=off

Retention [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
15.468	5.20	4176.95898	285.45615	0.93	0.2290	25272	-	-
16.524	5.63	1.55611	1.11827e-1	0.65	0.2253	29778	2.73	1.08
17.614	5.99	6164.03764	409.65472	0.94	0.3355	30300	2.27	1.06
18.253	6.32	52.43869	3.03089	0.89	0.2622	26845	1.98	1.06
19.330	6.75	5.20592	3.48352e-1	1.21	0.2289	39526	2.58	1.07

*** End of Report ***

DD CLEISINDOSIDE D 1000 µg/mL PHÂN HUỶ TRONG H₂SO₄ 0,1N/30 PHÚT

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 16A- TAP LQ\180328000008.D
Sample Name: 16A 1000ppm/ACH -H2O+ H2SO4 0.1N 30'

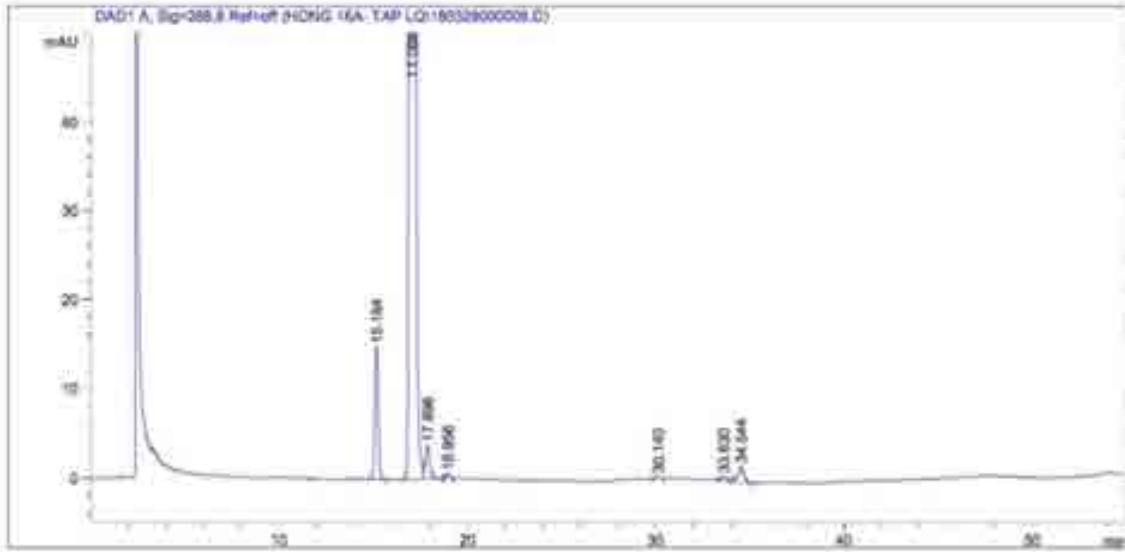
Acq. Operator : Hoang
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 5
Injection Date : 3/28/2018 4:17:29 PM Inj. Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP LQ.M
Last changed : 3/28/2018 4:14:02 PM by Hoang
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP LQ.M
Last changed : 4/18/2018 4:44:20 PM by Phuong
(modified after loading)
Sample Info : 16A 1000ppm/ACH -H2O+ 1 µlot H2SO4 0.1N 30', V=20µl, v
=1ml/p
MR: ACS- H2O: 0' 27-73, 60' 90-90, 45' 73-27, 90' 27-73
and 55'
Col: Inertsil ODS-3, 4.6x250mm, 5µm
pH: 0n30'

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertsil ODS-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial : autoID-15
Product# : 993967-922 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 µl
Injections : 24
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature : 60.0 °C
Comment :

Data File D:\CHEM32\1\DATA\BOWC 16A- YAP 10\180328500006.D
 Sample Name: 16A 1000ppm/ACH -H2O+ H2204 0.1% 30'



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
 Dilution: 1 1.0000
 Sample Amount: 1 1.00000 [ng/vl] (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,8 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
								ivity
15.184	5.09	187.60288	14.93044	0.92	0.1833	34156	-	-
17.896	5.85	1.13581e4	892.16719	0.95	0.1987	40977	5.71	1.15
17.896	6.18	63.34534	3.72885	0.88	0.2523	27639	2.10	1.06
18.950	8.60	6.22630	5.04326e-1	0.95	0.1933	53246	2.78	1.07
30.140	11.09	3.78342	2.33687e-1	1.15	0.2622	73193	28.85	1.68
33.630	12.49	10.54163	4.69773e-1	0.88	0.3222	60360	7.02	1.13
34.544	12.80	38.09599	1.68580	1.14	0.3367	58335	2.63	1.03

*** End of Report ***

DD CLEISINDOSIDE D 1000 µg/mL PHÂN HUỶ TRONG H₂SO₄ 0,1N/50 NGÀY

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 16A- TAP LO\190517000002.D
Sample Name: cleisindosid D 1000 ppm. H2SO4 0.1N, lau

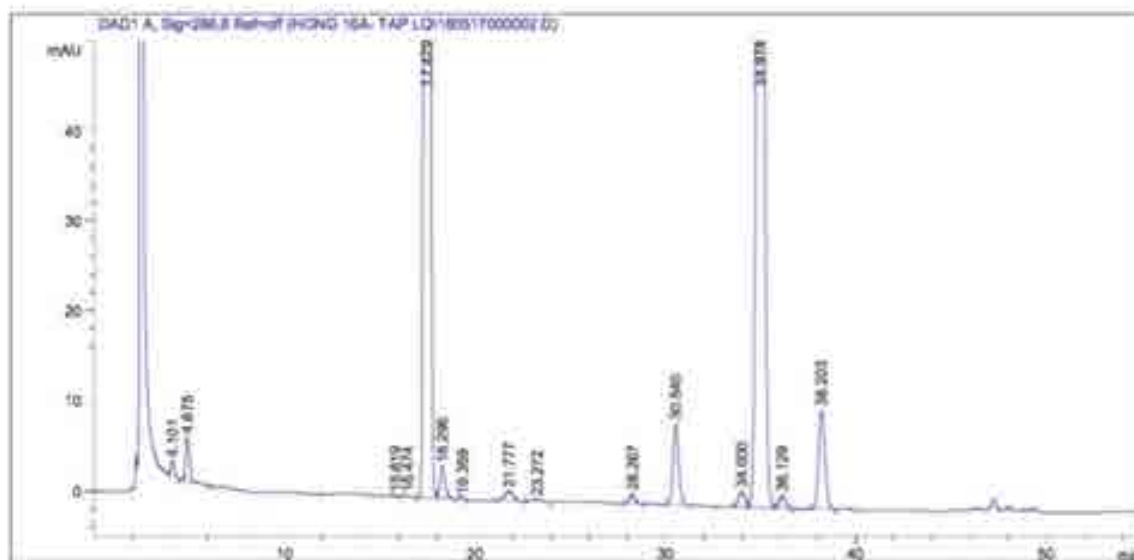
Acq. Operator : Hoang
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 2
Injection Date : 5/17/2018 10:54:11 AM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHOD\HONG 16A- TAP LO.M
Last changed : 5/17/2018 10:28:22 AM by Hoang
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHOD\HONG 16A- TAP LO.M
Last changed : 5/11/2018 10:47:34 AM by Hoang
(modified after loading)
Sample Info : cleisindosid D 1000 ppm, H2SO4(0.1N, thu 26/3), v=1ml/g
, V=20µl
MR: ACM-N2O: 0° 21-33, 40° 30-53, 45° 19-27, 50° 23-73,
and: 55°
Cot C18 Inertail ODS-3, 250x4, 5µm, Secr

Additional info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertail ODS-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : autoID-15
Product# : 993947-302 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 250.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 50.0 %
Injections : 012
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :

Data File D:\CHEM371\DATA\HOMO I6A- TAP LO\180517000002.D
 Sample Name: cisindosid D 1000 ppm, (K2904 0.1N, 1au)



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Sample Amount: 1.00000 [ng/ul] foot used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,8 Ref=off

RetTime [min]	K'	Area [mAU*min]	Height [mAU]	Sym.	Width [min]	Plates	Resol	Select
								ivity
4.101	0.65	20.83828	1.70027	0.50	0.1983	2370	-	-
4.875	0.94	74.10287	4.95466	0.49	0.2333	2418	2.11	1.48
15.819	5.35	1.42794	1.10263e-1	0.66	0.2213	28262	28.28	5.59
16.474	5.61	2.09017	1.42579e-1	0.85	0.2283	28819	1.71	2.05
17.478	6.01	1.04221e4	712.88995	0.90	0.2282	32518	2.58	1.07
18.296	6.34	83.26103	3.56328	0.78	0.2667	26076	1.94	1.05
19.359	6.77	2.00176	1.59844e-1	0.78	0.2156	44699	2.59	1.07
21.777	7.74	33.39178	1.10718	0.88	0.4533	12790	4.25	1.14
23.272	8.34	7.69138	2.73727e-1	0.96	0.3967	19074	2.07	1.08
28.267	10.34	20.90569	1.05565	0.84	0.3067	47074	8.34	1.24
30.340	11.25	189.79187	8.98815	0.81	0.3233	49431	4.28	1.09
34.000	12.64	37.56826	1.68957	0.82	0.3667	53296	6.07	1.12
34.574	13.03	3617.92871	157.31827	0.87	0.3533	54283	1.63	1.03
36.129	13.49	33.22335	1.41782	0.85	0.3533	57922	1.92	1.04

DD CLEISINDOSIDE D 1000 µg/mL SOI UV TRONG 1 NGÀY

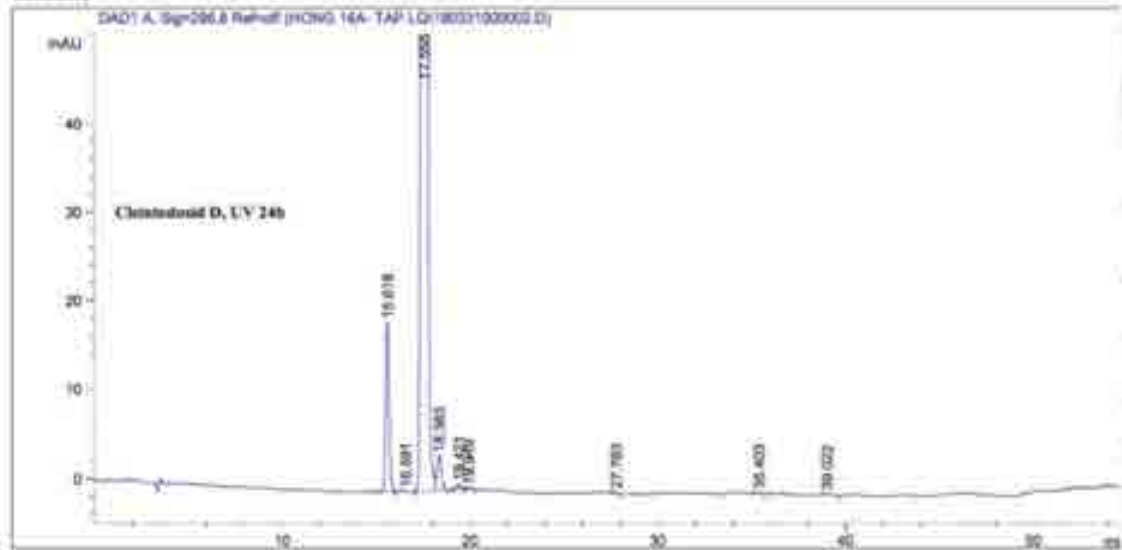
Data File D:\CHEM32\1\DATA\NONG 16A- TAP LO\180331000002.D
Sample Name: 16A/ ACN-H2O, UV 240

Acq. Operator : Hoang
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 2
Injection Date : 3/31/2018 9:55:08 AM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\NONG 16A- TAP LO.M
Last changed : 3/31/2018 9:51:34 AM by Hoang
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\NONG 16A- TAP LO.M
Last changed : 4/6/2018 12:02:28 PM by Hoang
(modified after loading)
Sample Info : 16A/ ACN-H2O, UV 240, V=20µl, v=1ml/p
MP: ACN-H2O: 0' 27-73, 40' 30-50, 45' 33-27, 50' 23-33,
end 55'
Col: Inertsil ODS-3 250x4.6 mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertsil ODS-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : aucold-15
Product# : 993967-002 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 250.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 µl
Injections : 78
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :



Instrument 1 4/6/2018 12:03:40 PM Hoang

Page 1 of 2

Data File D:\UHDM32\F1\DATA\HOND 16A- YAP IQ\180331000002.D
Sample Name: 16A/ ACN-H2O, UV 240

Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 (ug/ml) (not used in calc.)
See Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal: DAD1 A, Sig=266.8 Ref=off

RetTime (min)	k'	Area (mAU*s)	Height (mAU)	Symm.	Width (min)	Plates	Resol	Select
								ivity
15.618	5.26	250.74394	19.16358	0.91	0.2000	33777	-	-
16.591	5.64	2.07853	1.20009e-1	1.00	0.2756	30065	2.41	1.07
17.555	6.04	1.21954e4	903.27002	0.93	0.2074	35636	2.34	1.07
18.383	6.37	64.38223	3.93931	0.97	0.2489	30224	2.13	1.05
19.421	6.79	7.64553	6.09375e-1	1.03	0.1387	52955	2.72	1.07
19.949	7.00	3.88650	2.24634e-1	1.14	0.2356	25225	1.24	1.03
27.783	10.15	1.25237	1.17146e-1	0.78	0.2383	64080	16.62	1.45
35.403	13.20	2.84538	1.75599e-1	0.91	0.2579	108498	17.25	2.30
39.022	14.63	2.65541	1.12559e-1	0.40	0.3133	85930	7.45	1.11

*** End of Report ***

DD CLEISINDOSIDE D 1000 µg/mL SOI UV TRONG 7 NGÀY

Date File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 16A- TAP LQ\180517000001.D
Sample Name: cleisindosid D 1000 ppm, UV 7 ngay

Acq. Operator : Hsong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
Injection Date : 3/17/2018 9:31:43 AM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP LQ.M
Last changed : 3/17/2018 9:19:21 AM by Hsong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP LQ.M
Last changed : 3/11/2018 10:47:34 AM by Hsong
(modified after loading)
Sample Info : cleisindosid D 1000 ppm, UV 7 ngay, v=1ml/p, V=20mVL
MP: ACN:H2O: 0' 21-73, 40' 30-50, 60' 73-27, 80' 27-73,
end: 31'
Col: C18 Inertsil ODS-3, 250x4,6mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated

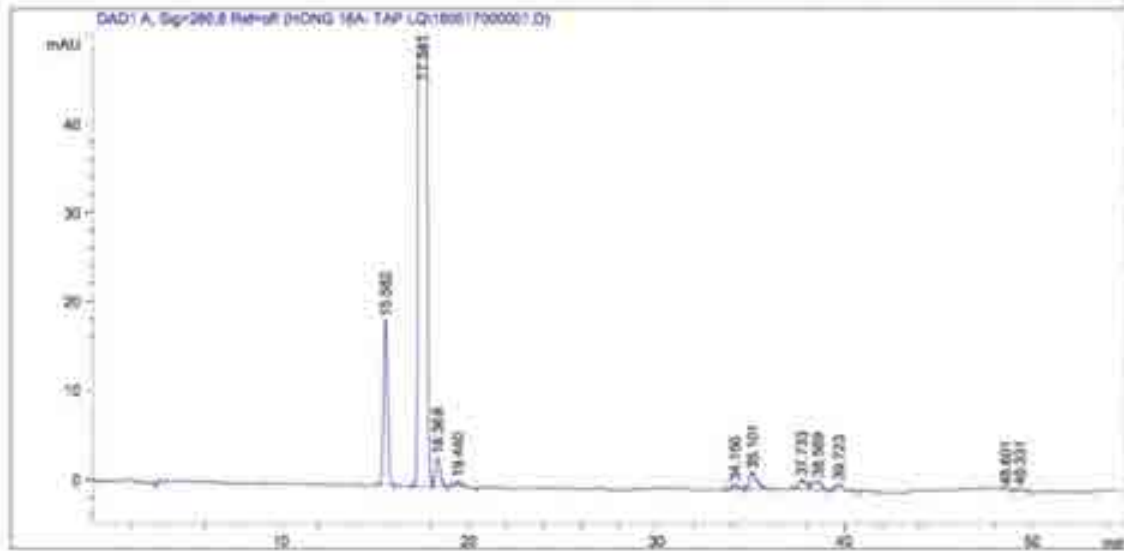
Column(s)

Column Description : Inertsil ODS-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : autolD-15
Product# : 983967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 40.0 %
Injections : 111
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :

Instrument : 3/11/2018 10:49:24 AM Hsong

Page 1 of 2

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 16A-TAP LQ180517000001.D
 Sample Name: cisixindosid D 1000 ppm, UV 7 ngay



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
 Dilution: 1 1.0000
 Sample Amount: 1 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.8 Ref=off

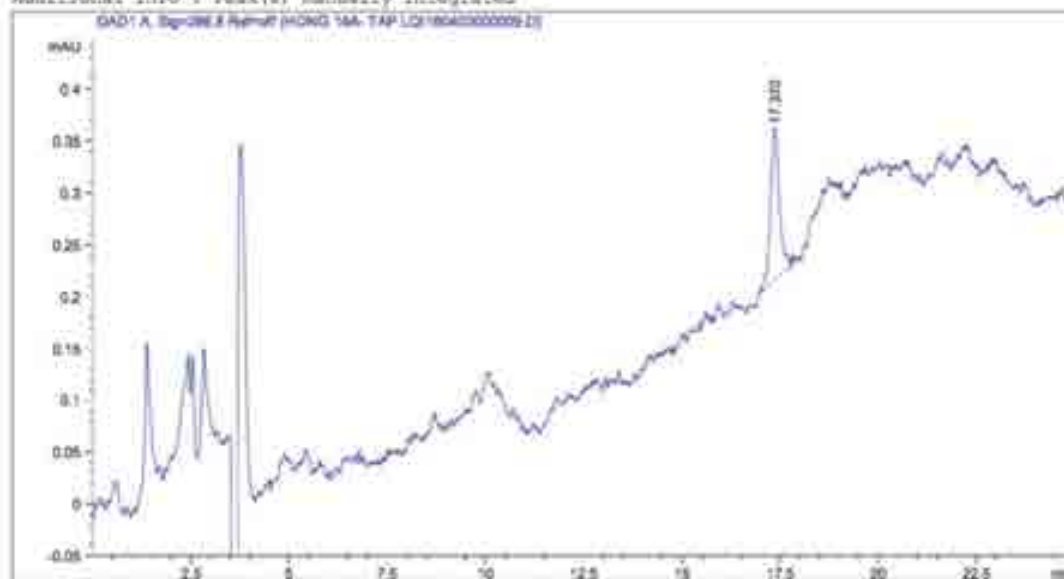
RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Sym.	Width [min]	Plates	Resol	Selectivity
15.582	5.25	269.93188	19.57711	0.87	0.2244	26700	-	-
17.341	6.04	1.35269e4	310.17419	0.91	0.2308	32005	5.06	1.15
18.368	6.37	58.44499	3.26782	0.87	0.2753	24716	1.92	1.05
19.440	6.80	12.41655	6.19271e-1	0.83	0.2600	30976	2.35	1.07
34.156	12.70	13.30543	5.29089e-1	0.80	0.3844	43727	26.83	1.87
35.101	13.06	94.40134	1.93743	0.60	0.3800	47271	1.45	1.03
37.733	14.14	28.72558	1.06250	0.88	0.4489	39149	3.73	1.08
39.569	14.47	34.22140	1.09486	1.21	0.5556	26700	0.98	1.02
39.723	14.93	19.05479	7.47255e-1	0.69	0.3633	66214	1.48	1.03
49.601	18.50	3.75285	1.20479e-1	0.47	0.2817	164945	18.17	1.24
49.531	18.79	3.20463	1.21935e-1	0.40	0.3178	133691	1.43	1.02

GIỚI HẠN ĐỊNH LƯỢNG-LOQ CỦA CLEISINDOSIDE D (16A)

Data File D:\CHEM32\1\DATA\SCHE 16A- TAP LO\180403000009.D
Sample Name: 16A 0.1ppm/ACN:820

Acq. Operator : Huang
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 2
Injection Date : 4/3/2018 12:07:40 PM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\METHOD 16A- TAP LO.M
Last changed : 4/3/2018 12:06:20 PM by Huang
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\METHOD 16A- TAP LO.M
Last changed : 4/3/2018 6:37:11 PM by Huang
(modified after loading)
Sample Info : 16A 0.1ppm/ACN:820, V=20µl, w=1ml/g
MP: ACN:H2O: 0' 27-73, 40' 53-50, 45' 13-27, 50' 27-73,
end 55'
Col Inertasil CDS-3 250x4.6 mm, 5µm

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 [ng/µl] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Instrument : 4/3/2018 6:37:18 PM Huang

Page 1 of 2

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 18A- TAP LC\180403000009.D
Sample Name: 18A 0.1ppm/ACN:120

Signal 1: CDD1 A, Sig-286, 0 Ref-off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	17.370	RM	0.2011	2.30007	1.46540e-1	100.0000

Totals 1: 2.30007 1.46540e-1

*** End of Report ***

**ĐÁNH GIÁ HỆ SỐ CHẴN (INTERCEPT) CỦA ĐƯỜNG CHUẨN
CLEISINDOSIDE D BẰNG PHẦN MỀM EXCEL**

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.99971353
R Square	0.99942713
Adjusted R Square	0.99933166
Standard Error	122.882148
Observations	8

ANOVA					
	df	SS	MS	F	Significance F
Regression	1	158061898	158061898	10467.6599	5.88E-11
Residual	6	90600.1339	15100.0223		
Total	7	158152498			

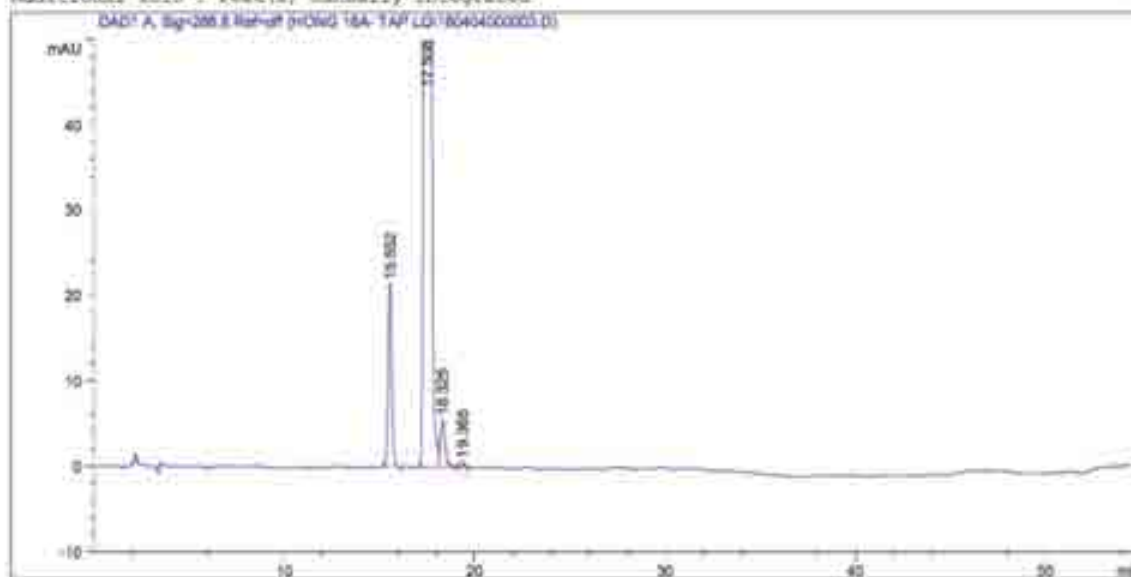
	Coefficients	Standard Error	t Stat	P-value	Lower 95%	Upper 95%	Lower 95.0%	Upper 95.0%
Intercept	30.067	57.885	0.5194	0.622	-111.6	171.71	-111.57	171.71
X Variable 1	11.985	0.117	102.312	5.9E-11	11.70	12.271	11.70	12.27

ĐỘ LẠP LẠI

Data File D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP LOI\80404000003.D
Sample Name: 16A/ ACN-H2O, 11.91 mg

Acq. Operator : Hoang
Acq. Instrument : Instrument 1 Localism : Vial 3
Injection Date : 4/4/2018 12:05:19 PM Inj Volume : 20.0 ul
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG 16A- TAP LOI.M
Last changed : 4/4/2018 12:03:22 PM by Hoang
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG78.N\HONG 78- TAP LOI.M
Last changed : 4/3/2018 10:33:05 AM by Hoang
(modified after loading)
Sample Info : 16A/ ACN-H2O, 11.91 mg, V=20ul, v/vml/p
MP: ACN-H2O: 0° 27-73, 40° 30-50, 45° 73-27, 50° 27-73,
and 55°
Col Inertall ODS-3 200x4.6 mm, 5um

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 (ug/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG 16A- TAF LQ\180404000003.D
Sample Name: 16A/ ACN-H2O, 11.91 mg

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,0 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [aAU*s]	Height [aAU]	Area %
1	15.552	BB	0.2078	287.56580	21.53470	1.7383
2	17.508	BV	0.2110	1.61676e4	1186.51648	97.6069
3	18.325	VV	0.2574	88.01838	6.61544	0.5925
4	19.365	VB	0.2097	10.32058	7.53984e-1	0.0624

Totals : 1.65433e4 1212.42960

*** End of Report ***

PHỤ LỤC 2.5. PHIẾU KIỂM NGHIỆM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN GÓC ĐỊNH LƯỢNG CLEISTANTOXIN



HỒ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG
48 Hai Bà Trưng - Hà Nội - Việt Nam
ĐT: 84.4.38253791 - Fax: 84.4.38255911

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



PHIẾU PHÂN TÍCH

(Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị khi mẫu được thử)

Số: 47C/05

Mẫu để kiểm nghiệm: Cleistantoxin
Nơi sản xuất: Đại học Dược Hà Nội (13-15 Lê Thánh Tông, Quận Kiến, Hà Nội)
Số lô, ngày SX: Không có thông tin Ngày DK: Không có thông tin
Hạn dùng: Không có thông tin Số DK: Không có
Người và nơi gửi mẫu: Bà Nguyễn Lâm Hồng
Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung, số, ngày, tháng, năm của công văn ủy quyền từ bên thuê): mẫu UV, phổ hồng ngoại, góc quay cực
Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 12/10/2017 **Số đăng ký KN:** 47C/05
Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quy
Thu theo: Dự án điện Việt Nam IV - Phụ lục 4.1) Phụ lục 4.2) Phụ lục 4.4

Tình trạng mẫu khi nhận và mở niêm phong để kiểm nghiệm:
 Mẫu được gói trong lọ nút kín, nhãn rõ ràng.

CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG	KẾT QUẢ
1. Tính chất	Đạt kết quả màu trắng, dễ tan trong dimethylforman, acetonitril và aceton, hơi tan trong ethyl acetat, rất khó tan trong methanol, ethanol, 96% và nước.
2. Phổ UV - VIS	Phổ hấp thụ tử ngoại của dung dịch thử 0,02 mg/ml acetonitril trong khoảng bước sóng từ 200 nm đến 400 nm có hai cực đại hấp thụ ở bước sóng 286,80 nm và 203,40 nm; có hai cực tiểu hấp thụ ở bước sóng 309,00 nm và 259,40 nm.
3. Phổ hồng ngoại (IR)	Phổ IR của mẫu thử trong khoảng số sóng từ 4000 cm ⁻¹ đến 400 cm ⁻¹ có các đỉnh đặc trưng là: 1071,47; 1091,76; 1285,79; 1301,20; 1397,94; 1479,40; 1484,43; 1478,43; 1498,67; 1617,24; 1777,36; 2896,69; 3551,24 cm ⁻¹ .
4. Góc quay cực	[α] _D ²⁰ = - 133,4° (Dung dịch 0,5% trong chloroform).

Hà Nội, ngày 11 tháng 11 năm 2017

VIỆN TRƯỞNG
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG

(Chữ ký và dấu)



VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG
 48 Đại Bô Trưng - Hồ Nội - Việt Nam
 ĐT: 84.4.38252791 - Fax: 84.4.38252911

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
 Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



PHIẾU KIỂM NGHIỆM

(Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

Số: 47G/307

Mẫu để kiểm nghiệm: Cloistantoxin
Nơi sản xuất: Trường Đại học Dược Hà Nội
 113-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội)
Số lô, ngày SX: Cloistantoxin-Đ1 Ngày SX: 01/2017
Hạn dùng: Không có thông tin **Số DK:** Không có
Người và nơi gửi mẫu: Bà Nguyễn Lâm Hằng
Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung, số, ngày, tháng, năm của công văn ủy gửi từ kèm theo):
 Độ ẩm, tro sulphat, nhiệt độ nóng chảy, tạp chất liên quan, định lượng
Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 01/11/2017 **Số đăng ký KN:** 47G/199
Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quy
Theo theo: Tiêu chuẩn cơ sở gửi kèm
Tình trạng mẫu khi nhận và mở niêm phong để kiểm nghiệm:
 Mẫu đóng gói trong lọ nút kín, nhãn tạo.

CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG	KẾT QUẢ	YÊU CẦU
1. Tính chất	Đạt kết quả mẫu trắng	
2. Độ ẩm Phương pháp sấy	Đạt (0,6%)	Không quá 1,0%
3. Tro sulphat	Đạt (0,1%)	Không quá 0,1%
4. Nhiệt độ nóng chảy	Đạt (201,5°C)	Từ 199°C đến 202°C
5. Tạp chất liên quan Phương pháp HPLC Tổng tạp đơn	Đạt (Max = 0,24%)	Không quá 0,1%
Tổng tạp	Đạt (0,07%)	Không quá 0,3%
6. Định lượng Phương pháp HPLC	Đạt (99,9%)	Hàm lượng cloistantoxin trong chế phẩm phải đạt từ 99,5% đến 101,5%, tính theo chế phẩm đã làm khô

PHỤ LỤC 2.6. ĐÁNH GIÁ ĐỘ ĐỒNG NHẤT QUÁ TRÌNH ĐÔNG ÔNG CHẤT CHUẨN BẰNG TEST ANOVA MỘT YẾU TỐ

ĐÁNH GIÁ ĐỘ ĐỒNG NHẤT GIỮA CÁC ÔNG CHUẨN CLEISTANTOXN

Nguồn gây sai số	Tổng số bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F _{tn}	F _{lt}
Giữa các lọ	1,1321	9	0,0147	1,424	2,393
Trong từng lọ	0,2062	27	0,0103		
Tổng cộng	0,3383	36			

ĐÁNH GIÁ ĐỘ ĐỒNG NHẤT GIỮA CÁC ÔNG CHUẨN CLEISINDOSIDE D

Nguồn gây sai số	Tổng số bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F _{tn}	F _{lt}
Giữa các lọ	0,00338	2	0,0169	0,022018	3,354
Trong từng lọ	2,07242	27	0,076756		
Tổng cộng	2,0758	29			

PHỤ LỤC 2.7. PHIẾU KIỂM NGHIỆM ỚNG CHUẨN GÓC ĐINH LƯỢNG CLEISTANTOXIN



VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG
 49 Hai Bà Trưng - Hà Nội - Việt Nam
 ĐT: 84.4.38252701 - Fax: 84.4.38256911

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
 Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



PHIẾU KIỂM NGHIỆM

(Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

Số 480 *KT*

Mẫu để kiểm nghiệm: Cleistantoxin
Nơi sản xuất: Bộ môn hóa phân tích- độc chất- Đại học Dược Hà Nội
Số lô, ngày sản xuất: Lô SX: Cleistantoxin -01 Ngày SX: 01/2018
Họ dùng: Không có thông tin **Số DK:** không có thông tin
Người và nơi gửi mẫu: Bộ môn hóa phân tích- độc chất- Đại học Dược Hà Nội
Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung số, ngày, tháng, năm của công văn hay giấy tờ kèm theo): Nhiệt độ nóng chảy, Độ tinh khiết, Độ đồng nhất hàm lượng, Tạp chất bay hơi
Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 29/01/2018 **Số đăng ký KN:** 480 184
Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quy
Thư theo: Tiêu chuẩn cơ sở gửi kèm
Tình trạng mẫu khi nhận và mở niêm phong để kiểm nghiệm:
 Mẫu đóng gói trong lọ nút kín, nhãn bìa.

CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG	KẾT QUẢ	YÊU CẦU
1. Tính chất	Đạt kết tinh màu trắng	
2. Nhiệt độ nóng chảy Phương pháp ĐQC	Đạt (199,5°C)	Từ 199°C đến 202°C
3. Độ tinh khiết Phương pháp ĐQC	Đạt (99,2%)	Không ít hơn 99,0%
4. Tạp chất bay hơi Phương pháp TGA	Đạt (0,54%)	Không được quá 1,0%
5. Độ đồng nhất hàm lượng Phương pháp HPLC	Đạt ($V_{100} = 1,428$ < $V_{10} = 2,303$)	Hàm lượng Cleistantoxin xác định trên 10 lọ mẫu thử phải đồng nhất

Kết luận: Mẫu gửi kiểm nghiệm đạt yêu cầu chất lượng các chỉ tiêu đã thử theo Tiêu chuẩn cơ sở gửi kèm.

Hà Nội, ngày 30 tháng 05 năm 2018
VIỆN TRƯỞNG
TRƯỚC
TRƯỞNG
Nguyễn Đình Lâm



HỖ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG
 48 Hai Bà Trưng - Hà Nội - Việt Nam
 ĐT: 84.4.38252791 - Fax: 84.4.38258911

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
 Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



PHIẾU KIỂM NGHIỆM

(Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đơn này)

Số: 48G/H91

Mẫu để kiểm nghiệm: Chất chuẩn Cloistantoxin
Nơi sản xuất: Bộ môn hóa phân tích- độc chất- Đại học Dược Hà Nội
Số lô, ngày sản xuất: Không có thông tin Ngày SX: Không có thông tin
Hạn dùng: Không có thông tin Số DK: Không có thông tin
Người và nơi gửi mẫu: Bộ môn hóa phân tích- độc chất- Đại học Dược Hà Nội
Yêu cầu KN (ghi rõ môi dùng, số, ngày, tháng, năm của công văn ủy quyền từ bên thụ): Tạp chất liên quan, độ tinh khiết sắc ký
Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 15/01/2018 Số đăng ký KN: 48G/134
Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quý
Thư theo: Tiêu chuẩn cơ sở gửi kèm
Tình trạng mẫu khi nhận và mở niêm phong để kiểm nghiệm:
 Mẫu đóng gói trong lọ nút kín, nắp tap.

	CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG	KẾT QUẢ	YÊU CẦU
1.	Tính chất	Bột kết tinh màu trắng	
2.	Tạp chất liên quan Phương pháp HPLC		
	Từng tap đơn	Đạt (Tạp lớn nhất: 0,05%)	Không được quá 0,1%
	Tổng tap	Đạt (0,07%)	Không được quá 0,5%
3.	Độ tinh khiết sắc ký Phương pháp HPLC	Đạt (99,94% RPD = 0,01%)	Độ tinh khiết sắc ký phải đạt từ 99,5% đến 101,5%

Kết luận: Mẫu gửi kiểm nghiệm đạt yêu cầu chất lượng các chỉ tiêu đã thử theo Tiêu chuẩn cơ sở gửi kèm.

Hà Nội, ngày 21 tháng 05 năm 2018

KI VIỆN TRƯỞNG

PHÓ VIỆN TRƯỞNG



VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG
 ĐỒ Y TẾ
 48 Hai Bà Trưng - Hà Nội - Việt Nam
 ĐT: 84.4.38252791 - Fax: 84.4.38256911

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
 Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



PHIẾU KIỂM NGHIỆM
(Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

Số: 480/515

Mẫu để kiểm nghiệm: Ông chuẩn Cloistantoxin
Nơi sản xuất: Trường Đại học Dược Hà Nội
Số lô, ngày sản xuất: Lô SX: Cloistantoxin-01 Ngày SX: Không có thông tin
Hạn dùng: Không có thông tin Số ĐK: Không có thông tin
Người và nơi gửi mẫu: Trường Đại học Dược Hà Nội
Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung, số, ngày, tháng, năm của công văn hay giấy tờ kèm theo):
 Tạp chất liên quan, Độ tinh khiết sắc ký
Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 13/03/2018 Số đăng ký KN: 480 286
Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quy
Thư theo: Tiêu chuẩn cơ sở gửi kèm
Tình trạng mẫu khi nhận và môi trường phòng để kiểm nghiệm:
 Mẫu đóng gói trong lọ kín, nhãn rõ ràng.

	CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG	KẾT QUẢ	YÊU CẦU
1.	Tính chất	Đạt kết Tinh màu trắng	
2.	Tạp chất liên quan Phương pháp HPLC		
	Từng tạp đơn	Đạt (Tạp lớn nhất 0,02%)	Không được quá 0,1%
	Tổng tạp	Đạt (0,06%)	Không được quá 0,5%
3.	Độ tinh khiết sắc ký Phương pháp HPLC	Đạt (99,94% RSD = 0,064%)	Độ tinh khiết sắc ký của pic cloistantoxin phải đạt từ 99,5% đến 101,5%

Kết luận: Mẫu gửi kiểm nghiệm đạt yêu cầu chất lượng các chỉ tiêu đã thử theo tiêu chuẩn cơ sở gửi kèm.

Hà Nội, ngày 28 tháng 05 năm 2018

TRƯỞNG
 VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG
 Nguyễn Đình Lâm



QUỐC TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM QUỐC GIA
TỰ DO CHỊU MINH
Số 1A Hồ - 2/1 - TP. HCM
M: 26260411 - Fax: 65147988

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập - Tự Do - Hạnh Phúc

Mã số: DCIP-QA-03/P02



PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số : 0295/VKN-NB2018

Mẫu kiểm nghiệm : Ông chuẩn Cleistantoxin
Nơi sản xuất : Trường Đại Học Dược Hà Nội
Số lô : Cleistantoxin-01 Hạn dùng : Không có
Số đăng ký kiểm nghiệm : 37NB0295 Số đăng ký :
Đơn vị gửi mẫu : Trường Đại Học Dược Hà Nội
Người giao mẫu : Trịnh Hoàng Dương
Người nhận mẫu : Nguyễn Thị Phương Uyên
Ngày giao nhận mẫu : 09/05/2018
Yêu cầu kiểm nghiệm : Tạp chất liên quan, độ tinh khiết sắc ký, tạp chất bay hơi
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : TCCS
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đựng trong lọ thủy tinh nâu, hàn kín, dán nhãn tạm. Bảo quản 2 °C - 8 °C.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất	Bột trắng	Đạt
Tạp chất liên quan		
Tạp đơn	Không quá 1,0 %	Đạt (0,06 %)
Tổng tạp	Không quá 0,5 %	Đạt (0,06 %)
Độ tinh khiết sắc ký		
Cleistantoxin	Không ít hơn 99,5 %	Đạt (99,92 %); RSD = 0,03 %
Chất bay hơi	Không quá 1,0 %	Đạt (0,57 %)

Ngày 11 tháng 05 năm 2018

Viện Trưởng

Trần Việt Hùng

Tr. 1/1 - 37NB0295

PHỤ LỤC 2.8. XÁC ĐỊNH GIÁ TRỊ ẮN ĐỊNH TRÊN COA CỦA ỔNG CHUẨN GỐC ĐỊNH LƯỢNG CLEISTANTOXIN

Kết quả xác định độ tinh khiết SK bằng HPLC/DAD tại 3 PKN được đánh giá bằng phép thống kê ANOVA một yếu tố trên phần mềm Excel, cho giá trị $P = 0,116 > 0,05$.

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Column 1	6	585.74	97.62333333	0.00182667		
Column 2	6	585.87	97.645	0.00047		
Column 3	6	585.61	97.6016667	0.00109667		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.0056333	2	0.0028167	2.49017	0.116	3.68232
Within Groups	0.0169666	15	0.0011311			
Total	0.0226	17				

Nguồn gây sai số	Tổng số bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F _{tn}	F _{lt}	P
Giữa các PTN	0,00563	2	0,00282	2,490	3,682	0,116
Trong từng PTN	0,01697	15	0,00113			
Tổng cộng	0,0226	17				

XÁC ĐỊNH HL TẠP CHẤT BAY HƠI CỦA CLEISTANTOXIN TẠI 3 PKN

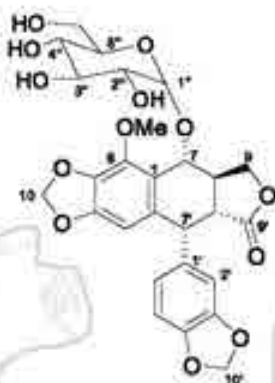
Kết quả xác định hàm lượng tạp chất bay hơi bằng TGA tại 3 PKN đánh giá bằng phép thống kê ANOVA một yếu tố trên phần mềm Excel, cho giá trị $P = 0,156 > 0,05$.

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Column 1	6	19.78	3.29666667	0.06566667		
Column 2	6	20.93	3.48833333	0.03117667		
Column 3	6	21.31	3.55166667	0.05349667		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.211544	2	0.1057722	2.1106603	0.156	3.682320
Within Groups	0.7517	15	0.0501133			
Total	0.963244	17				

Nguồn gây sai số	Tổng số bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F _{tn}	F _{lt}	P
Giữa các PTN	0,212	2	0,106	2,111	3,682	0,156
Trong từng PTN	0,752	15	0,050			
Tổng cộng	0,963	17				

PHỤ LỤC 2.9. TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG CỦA CHẤT CHUẨN GỐC ĐỊNH LƯỢNG CLEISINDOSIDE D

1. Yêu cầu kỹ thuật



Cấu trúc hoá học của cleisindoside D

- Danh pháp IUPAC: 6-methoxy-7-(β-D-glucopyranosyloxy)-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7'-cycloolignan-9',9'-olide.
- Công thức phân tử: C₂₇H₂₈O₁₃. Khối lượng phân tử: 560,0 Da
- Cleisindoside D được phân lập từ cao cồn khô chiết xuất từ quả cây Chà chôi (*C. tonkinensis*, Jabl) phải chứa từ 95,0% đến 102,0% (C₂₇H₂₈O₁₃) tính trên chế phẩm khan

1.1. Mục đích sử dụng

Chất chuẩn gốc cleisindoside D được dùng cho mục đích phân tích định tính và định lượng

1.2. Tính chất

Bột kết tinh màu trắng. Dễ tan trong dicloromethan, ACN, MeOH và acetone.

1.3. Định tính

- Phổ hồng ngoại-IR: cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng là 3419, 2932, 1772, 1619, 1475, 1235, 1073, 1035 cm⁻¹ ± 20 cm⁻¹
- Phổ UV-VIS: dung dịch cleisindoside D 0,02 mg/ml pha trong ACN-H₂O (1:1) cho cực đại tại 203,4 nm, 286,8 nm ± 2 nm
- Góc quay cực riêng: [α]_D²⁰ = -150,0 đến -157,0
- Nhiệt độ nóng chảy: t_{nc} = 225 đến 228°C.
- Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR: trong dung môi CDCl₃+CD₃OD.
- ¹H-NMR (CDCl₃+CD₃OD, 500 MHz), δ_H ppm: 2,70; 3,04; 3,18; 3,28; 3,39; 3,41; 3,67; 3,99; 4,07; 4,34; 4,45; 4,64; 5,28 5,83; 5,84; 5,89; 5,93; 6,26; 6,65; 6,69.
- ¹³C-NMR (CDCl₃+CD₃OD 125 MHz), δ_C ppm: 38,4; 44,0; 45,5; 59,9; 61,5; 69,8; 72,0; 73,5; 75,2; 76,0; 76,3; 99,4; 100,9; 101,5; 104,8; 107,6; 110,7; 122; 123,8; 132,8; 135,3; 136,8; 142,1; 146,6; 147,3; 149,9; 174,2.
- Phổ khối HRESI-MS: có pic [M⁺Na]⁺ cho tín hiệu m/z 583,1409 phù hợp với công thức phân tử C₂₇H₂₈O₁₃Na

1.4. Tạp chất liên quan

- Hàm lượng % của từng tạp đơn không được lớn hơn 3,0%
- Hàm lượng % của tổng tạp chất liên quan không được lớn hơn 5,0%

1.5. Độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside D

- Độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn cleisindoside D không được nhỏ hơn 95,0%

1.6. TGA $\leq 5,0\%$

1.7. Tro sulfat $\leq 0,1\%$

1.8. Độ tinh khiết DSC của cleisindoside D

- Độ tinh khiết DSC của cleisindoside D không được nhỏ hơn 95,0%

2. Phương pháp thử

2.1. Tính chất

bằng cảm quan mẫu phải đạt yêu cầu đã nêu.

2.2. Định tính

- Phổ hồng ngoại-IR của chất chuẩn cleisindoside D phải có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của cleisindoside D $\pm 20 \text{ cm}^{-1}$
- Phổ UV-VIS của chất chuẩn cleisindoside D pha trong dung môi ACN-H₂O (1:1), quét phổ ở bước sóng 200-400 nm, có các bước sóng cực đại trùng với dữ liệu phổ UV chuẩn của cleisindoside D $\pm 2 \text{ nm}$.
- Góc quay cực riêng: chất chuẩn cleisindoside D pha trong CHCl₃ được nồng độ 0,5% α , tinh theo chế phẩm đã làm khô (DDVN V-Phụ lục 6.7)
- Nhiệt độ nóng chảy: kỹ thuật đo mao quản (DDVN V-Phụ lục 6.4) hoặc kỹ thuật DSC với chương trình gia nhiệt từ 25-220°C: 10°C/ phút, sau đó từ 220-235°C: 2°C/ phút.
- Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của chất chuẩn cleisindoside D trùng với dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR chuẩn của cleisindoside D $\pm 0,5 \text{ ppm}$ (đo trong dung môi CDCl₃+CD₃OD)
- Phổ khối HRESI-MS: chất chuẩn cleisindoside D có có pic [M+Na]⁺ cho tín hiệu m/z 583,1409 phù hợp với công thức phân tử C₂₇H₂₈O₁₃Na

2.3. Tạp chất liên quan

Phương pháp HPLC (DDVN V-Phụ lục 5.3), thực hiện theo phần độ tinh khiết sắc kí bằng HPLC sử dụng phương pháp chuẩn hoá diện tích.

- **Giới hạn tạp:**
Xác định số lượng tạp chất và diện tích của mỗi pic tạp và tổng TCLQ trong từng mẫu thử. Ngoại trừ tất cả các pic có S/N < 2
- Hàm lượng phần trăm tạp đơn bằng diện tích của từng pic phụ trên SKD dung dịch thử (trừ pic cleisindoside D và pic dung môi) trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKD (trừ pic dung môi) (% tạp đơn $\leq 3,0\%$).
- Hàm lượng phần trăm tổng TCLQ bằng tổng diện tích của tất cả các pic phụ trong SKD của dung dịch thử (trừ pic cleisindoside D và pic dung môi) trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKD (trừ pic dung môi) (% tổng tạp $\leq 5,0\%$).

2.4. Độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside D

Phương pháp HPLC (DDVN V, phụ lục 5.3), sử dụng phương pháp chuẩn hoá diện tích.

- **Chuẩn bị mẫu:**
- Mẫu trắng: Dung môi pha mẫu ACN-H₂O (1:1).

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 mg chất chuẩn cleisindoside D vào bình định mức 10 mL, thêm 5 mL ACN-H₂O (1:1). Siêu âm 15 phút và định mức vừa đủ bằng ACN-H₂O (1:1). Lọc qua màng lọc 0,45 µm. Chuẩn bị 06 dung dịch thử để tiến hành sắc kí.
- Dung dịch phân giải: cleisindoside D 1000 µg/ml và cleisindoside A 50 µg/ml.
- Điều kiện sắc kí:
 - Pha động: Acetonitril: Nước
 - Pha tĩnh: Cột C18 (250 mm x 4,6 mm; 5µm)
 - Chương trình gradient

Bảng 3.18. Chương trình gradient xác định độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside D

STT	Thời gian (phút)	% ACN	%H ₂ O
1.	0	27	73
2.	40	50	50
3.	45	73	27
3.	50	27	73
4.	Thời gian phân tích 55 phút		

- Detector DAD: bước sóng 286 nm
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Thể tích tiêm mẫu: 20 µL.
- Cách tiến hành:
 - Kiểm tra độ ổn định của hệ thống sắc kí: Tiến hành sắc kí dung dịch phân giải: cleisindoside D 1000 µg/ml và cleisindoside A 50 µg/ml, độ phân giải giữa pic cleisindoside D và cleisindoside A ($R_s > 3,0$).
 - Tiến hành sắc kí dung dịch chuẩn cleisindoside D 50 µg/ml lặp lại 6 lần, xác định các thông số thời gian lưu, diện tích pic, số đĩa lý thuyết, hệ số đối xứng của pic chính, tính giá trị trung bình và RSD% của các thông số thời gian lưu và diện tích pic phải không quá 2%, T phải nằm trong khoảng 0,8 đến 1,5.
 - Tiến hành sắc kí 6 dung dịch thử cleisindoside D 1000 µg/ml, ghi SKĐ.
 - Độ tinh khiết SK của cleisindoside D bằng diện tích pic của cleisindoside D trong SKĐ của dung dịch thử trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKĐ (trừ pic dung môi và tất cả các pic có $S/N < 2$).

2.5. Hàm lượng tạp chất bay hơi bằng phân tích nhiệt lượng-TGA

- Hàm lượng tạp chất bay hơi được xác định bằng TGA (10 mg, 105°C, 4 giờ)
- Hàm lượng tạp chất bay hơi được xác định trên thiết bị TGA được cài đặt nhiệt độ theo chương trình: từ 25-105°C: tốc độ gia nhiệt 2°C/phút, duy trì ở 105°C trong vòng 4 giờ, hạ nhiệt độ từ 105-25°C: tốc độ gia nhiệt 10°C/phút. Xác định khối lượng mẫu trước và sau khi sấy.

2.6. Tro sulfat

- Tạp chất vô cơ được xác định bằng tro sulfat (ĐDVN V phụ lục 9.12, PP 2).

- Dùng 1 g chế phẩm

2.7. Độ tinh khiết DSC của cleisindoside D

- Độ tinh khiết DSC của cleisindoside D được xác định bằng quét nhiệt vi sai với chương trình gia nhiệt từ 25-220°C: 10°C/ phút, sau đó từ 220-235°C: 2°C/ phút

3. Đánh giá chất lượng chất chuẩn gốc cleisindoside D

• *Đánh giá chất lượng nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindoside D*

Nguyên liệu thiết lập chất chuẩn gốc cleisindoside D được đánh giá theo các chỉ tiêu:

- Tính chất và định tính
- Độ tinh khiết sắc kí và tạp chất liên quan
- Tạp chất bay hơi bằng TGA
- Tạp chất vô cơ bằng tro sulfat
- Độ tinh khiết DSC

• *Xác định giá trị ấn định trên COA của ống chuẩn gốc cleisindoside D*

Giá trị ấn định trên COA của chất chuẩn gốc cleisindoside D được đánh giá theo các chỉ tiêu sau:

- Độ tinh khiết sắc kí và tạp chất liên quan
- Tạp chất bay hơi bằng TGA

• *Nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn gốc cleisindoside D*

Nghiên cứu độ ổn định của chất chuẩn gốc của cleisindoside D định kỳ kiểm tra mỗi 3 tháng theo các chỉ tiêu sau:

- Độ tinh khiết sắc kí và tạp chất liên quan
- Tạp chất bay hơi bằng TGA

4. Bảo quản

Chất chuẩn gốc cleisindoside D được đóng ống thủy tinh trung tính, màu nâu 2 mL. Tránh ánh sáng. Bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C

PHỤ LỤC 2.10. PHIẾU KIỂM NGHIỆM NGUYÊN LIỆU THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN GỐC CLEISINDOSIDE D



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



PHIẾU KIỂM NGHIỆM

(Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đơn thử)

Số: 480/276

Mẫu để kiểm nghiệm: Nguyên liệu Thiết lập chất chuẩn Cleisindosid-D
Nơi sản xuất: Bộ môn Hóa phân tích- Đại học Dược Hà Nội
Số lô, ngày sản xuất: Lô SX: Cleisindosid-01 Ngày SX: Không có thông tin
Hạn dùng: Không có thông tin Số ĐK: Không có thông tin
Người và nơi gửi mẫu: Bộ môn Hóa phân tích- Đại học Dược Hà Nội
Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung số, ngày, tháng, năm của công văn hay giấy tờ kèm theo):
Tính chất, phổ UV-VIS, phổ IR, góc quay cực, tro sunfat, độ tinh khiết sắc ký, tạp đơn và tổng tạp
Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 19/09/2018 Số đăng ký KN: 100.898
Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quy
Thư theo: Tiêu chuẩn gửi kèm

Tình trạng mẫu khi nhận và số niêm phong để kiểm nghiệm:
 Mẫu đóng gói trung lọ nắp kín, nhãn số 2808

CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG	KẾT QUẢ	YÊU CẦU
1. Tính chất	Đạt	Đạt
2. Phổ UV - VIS	Đạt (λ_{max} = 202,7nm và 286,6nm)	Phổ hấp thụ của dung dịch thử phải cho 2 cực đại ở bước sóng khoảng 202nm và 286nm
3. Phổ hồng ngoại (Phương pháp IR)	Đạt (3419,83 cm ⁻¹ , 2899,19 cm ⁻¹ , 1771,56 cm ⁻¹ , 1611,77 cm ⁻¹ , 1477,23 cm ⁻¹ , 1233,67 cm ⁻¹ , 1072,15 cm ⁻¹ và 1037,31 cm ⁻¹)	Phổ hồng ngoại của mẫu thử phải có các đỉnh đặc trưng khoảng: 3419 cm ⁻¹ , 2900 cm ⁻¹ , 1772 cm ⁻¹ , 1613 cm ⁻¹ , 1475 cm ⁻¹ , 1235 cm ⁻¹ , 1073 cm ⁻¹ và 1035 cm ⁻¹
4. Góc quay cực	Đạt (-1,154°)	Từ -150° đến +157°
5. Tro sunphat	Đạt (0,07%)	Không quá 0,1%
6. Độ tinh khiết sắc ký (Phương pháp HPLC)	Đạt (97,97%)	Không thấp hơn 95,0%
7. Tạp đơn và tổng tạp (Phương pháp HPLC)	Đạt (Tạp đơn lớn nhất = 1,88%)	Không được quá 3,0%
Tổng tạp	Đạt (2,1%)	Không được quá 3,0%

Các đơn vị: see Mũi que lấy không có giá trị nếu không có sự đồng ý của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương
 VKN/0M/25.02 - Trang 1/2

Kết luận: Mẫu gói kiểm nghiệm (480 gói) đạt yêu cầu chất lượng các chỉ tiêu đã thử theo Tiêu chuẩn gói kèm.

Hà Nội, ngày 19 tháng 10 năm 2018



Nguyễn Đình Lâm

PHỤ LỤC 2.11. PHIẾU KIỂM NGHIỆM ỚNG CHUẨN GÓC CLEISINDOSIDE D LÔ CLEISINDOSIDE D-01



ĐO Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG
Số Hai Ba Trưng - Nam Kiên - Thị trấn - Vụ Sơn
ĐT: +84 24 38232791 - Fax: +84 24 38238811

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



PHIẾU KIỂM NGHIỆM

(Khi quá kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đơn thử)

Số: 480/2018

Mẫu để tiến hành: Ống chuẩn Cleisindosid-D
Nơi sản xuất: Bộ môn Hóa phân tích- Đại học Dược Hà Nội
Số lô, ngày sản xuất: Lô SX: Cleisindosid-01 Ngày SX: Không có thông tin
Hạn dùng: Không có thông tin **Số ĐK:** Không có thông tin
Người và nơi gửi mẫu: Bộ môn Hóa phân tích- Đại học Dược Hà Nội
Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung, số, ngày, tháng, năm của công văn hay giấy tờ kèm theo):
Tập chất bay hơi và tinh độ không đảm bảo đo bằng TGA, độ đồng nhất của ống chuẩn, độ tinh khiết sắc ký, tạp đơn và tổng tạp
Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 19/09/2018 **Số đăng ký KN:** 480/899
Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quy
Thủ theo: Tiêu chuẩn gửi kèm
Tình trạng mẫu khi nhận và mở niêm phong để tiến hành:
mẫu đóng gói lọ nắp kín, nhãn rõ ràng.

CHỈ ĐỀU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG	KẾT QUẢ	YÊU CẦU
1. Tinh chất	Đạt 100%	
2. Tạp chất bay hơi và tinh độ Phương pháp TGA	Đạt (2,30%) $U_{\text{đạt}} = 2 \cdot 0,218$	Không được quá 5,0%
3. Xác định độ đồng nhất hàm lượng Phương pháp HPLC	Đạt ($F_{1,2} = 0,022$ $\times F_{1,3} = 2,354$)	Phải đạt theo quy định.
4. Độ tinh-khiết sắc ký (Tiến hành trên 2 phòng thí nghiệm) Phương pháp HPLC		
Kết quả của PTN 1	Đạt (97,45%)	Không thấp hơn 95,0%
Kết quả của PTN 2	Đạt (97,62%)	
5. Tạp chất liên quan (Tiến hành trên 2 phòng thí nghiệm) Phương pháp HPLC		
Kết quả của PTN 1		
Tạp đơn	Đạt (Tạp đơn 1= 1,81%; Tạp đơn 2= 0,49%; Tạp đơn 3= 0,05%)	Không quá 3,0%
Tổng tạp	Đạt (2,35%)	Không được quá 5,0%

Các lưu ý khác, sau khi quá trình có thông tin gửi về nếu không có sự đồng ý của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương
VKNUM/23-02 - Trang 1/3

CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG	KẾT QUẢ	YÊU CẦU
Kết quả của PIN 2 Tập đơn	Đạt (Tập đơn 1= 1,81%; Tập đơn 2= 0,51%; Tập đơn 3= 0,06%)	Không quá 3,0%
Tổng tập	Đạt (2,38%)	Không được quá 3,0%

Kết luận: Mẫu gửi kiểm nghiệm (48G 899) đạt yêu cầu chất lượng các chỉ tiêu đề thờ theo Tiêu chuẩn gửi kèm.

Hà Nội, ngày 06 tháng 11 năm 2018

VIỆN TRƯỞNG



Nguyễn Đình Bình



BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
TƯ. HỒ CHÍ MINH
209 CÔ ĐÌNH - QUẬN TÂY HỒ
M. 0438423 - Fax: 0438790

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập - Tự Do - Hạnh Phúc

Mã số: DCP-QA-03/P02



PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số: 0820/VKN-NB2018

Mẫu kiểm nghiệm : Ông chuẩn Cleisindosid D
Nơi sản xuất : Trường Đại học Dược Hà Nội
Số lô : Cleisindosid D-01 Hạn dùng: Không có
Số đăng ký kiểm nghiệm : 37NB0820 Số đăng ký: Không có
Đơn vị gửi mẫu : Trường Đại học Dược Hà Nội
Người giao mẫu : Trịnh Hoàng Dương
Người nhận mẫu : Nguyễn Thị Phương Uyên
Ngày giao nhận mẫu : 09/11/2018
Yêu cầu kiểm nghiệm : Tạp chất liên quan, độ tinh khiết sắc ký bằng HPLC/DAD, tạp chất bay hơi bằng TGA, nhiệt độ nóng chảy và độ tinh khiết DSC
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : Tiêu chuẩn cơ sở
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đựng trong lọ thủy tinh nâu, nắp vận kín, dán nhãn tạm.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất	Bột màu trắng	Đạt
Tạp chất liên quan (HPLC)	Không quá 3,0 %	Đạt (Tạp đơn 1= 1,85 % Tạp đơn 2= 0,50 % Tạp đơn 3= 0,05 %)
Tổng tạp	Không được quá 5,0 %	Đạt (2,40 %)
Độ tinh khiết sắc ký (HPLC) Cleisindosid D	Không ít hơn 95,0 %	Đạt (97,60 %), RSD = 0,034 %
Tạp chất bay hơi (TGA)	Không quá 5,0 %	Đạt (3,49 %)
Nhiệt độ nóng chảy (DSC)	225-228°C	226,1°C
Độ tinh khiết DSC	Không ít hơn 95,0 %	Đạt (97,3 %)

Ngày 4 tháng 11 năm 2018
Viện Trưởng



Trần Việt Hùng

PHỤ LỤC 2.12. XÁC ĐỊNH GIÁ TRỊ ẢN ĐỊNH TRÊN COA CỦA ỚNG CHUẨN CLEISINDOSIDE D

Kết quả xác định độ tinh khiết SK bằng HPLC/DAD tại 3 PKN đánh giá bằng phép thống kê ANOVA một yếu tố trên phần mềm Excel, cho giá trị $P = 0,066 > 0,05$.

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Column 1	6	599.65	99.9416667	1.6667E-05		
Column 2	6	599.61	99.935	0.00011		
Column 3	6	599.54	99.9233333	0.00034667		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.0010333	2	0.00051667	3.275	0.066	3.682
Within Groups	0.0023667	15	0.00015778			
Total	0.0034	17				

Nguồn gây sai số	Tổng số bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F _{tn}	F _{lt}	P
Giữa các PTN	0,00103	2	0,000117	3,275	3,682	0,066
Trong từng PTN	0,00237	15	0,0000644			
Tổng cộng	0,0034	17				

Kết quả xác định HI, tạp chất bay hơi bằng TGA tại 3 PKN được đánh giá bằng phép thống kê ANOVA một yếu tố sử trên phần mềm Excel, cho giá trị $P = 0,247 > 0,05$

Anova: Single Factor						
SUMMARY						
Groups	Count	Sum	Average	Variance		
Column 1	6	3.466	0.57766667	0.00441947		
Column 2	6	3.11	0.51833333	0.00448467		
Column 3	6	3.421	0.57016667	0.00331337		
ANOVA						
Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	0.01253	2	0.0062633	1.538	0.247	3.682
Within Groups	0.06108	15	0.0040725			
Total	0.07361	17				

Nguồn gây sai số	Tổng số bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F _{tn}	F _{lt}	P
Giữa các PTN	0,01253	2	0,0062633	1,538	3,682	0,247
Trong từng PTN	0,06108	15	0,0040725			
Tổng cộng	0,07361	17				

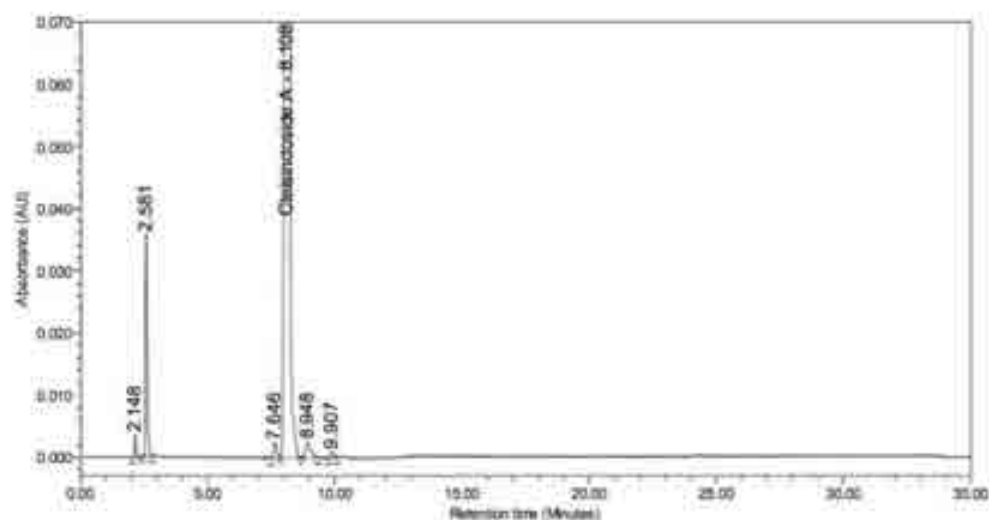
**PHỤ LỤC 2.13. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH
ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA CLEISINDOSIDE A
ĐỘ ĐẶC HIỆU
DUNG DỊCH CLEISINDOSIDE A 1000 µg/mL CÁCH THUY 100°C/ 2GIỜ**

Empower 3

0Standard Report Method_DTKSK

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	DTKSK Cleisindoside A_cach thuy	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	DTKSK Cleisindoside A
Vial:	1.E.1	Acq. Method Set:	DTKSK_Cleisindoside A
Injection #:	1	Processing Method:	DTKSK_Cleisindoside A
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	2996 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	9/13/2019 5:27:11 PM ICT		
Date Processed:	9/16/2019 10:37:20 AM ICT		



Peak Name	RT	Area	% Area	Resolution	Height (µV)
1	2.148	15241	0.27		3449
2	2.581	184722	2.87	3.95	35808
3	7.646	21873	0.38	29.80	2405
4 Cleisindoside A	8.108	5502715	95.72	2.03	620803
5	8.948	35447	0.62	3.04	2502
6	9.907	8672	0.15	3.38	943

Reported by User: System
Report Method: 0Standard Report Method_1
Report Method ID: 2347
Page: 1 of 1

Job Name: Nghiem_cuu/2019/07_Cleisintoxin_Cleisindosid
Date Printed: 9/16/2019
10:37:21 AM Asia/Saigon

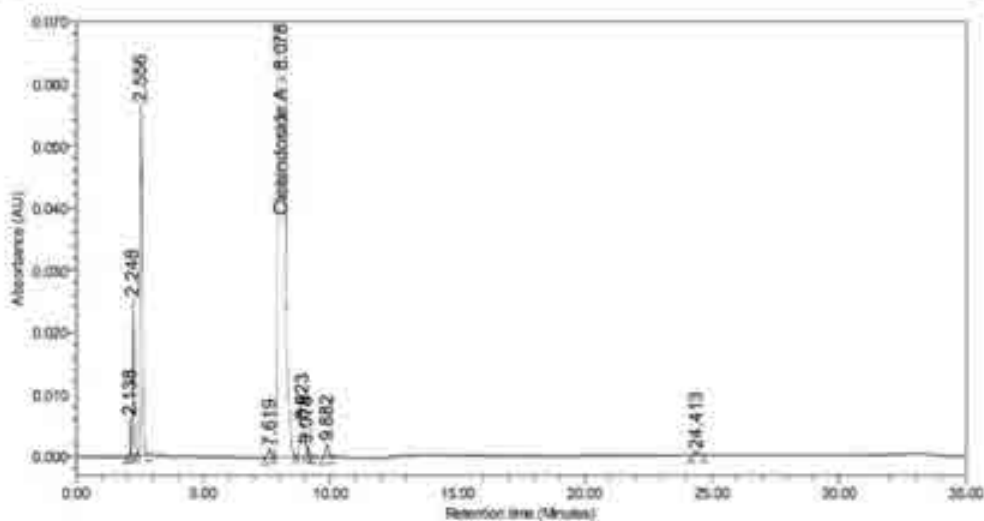
DUNG DỊCH CLEISINDOSIDE A 1000 µg/mL PHÂN HỦY H₂O₂ 3%/ 3GIỜ

Empower 3

0Standard Report Method_DTKSK

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	DTKSK Cleisindoside A_H2O2	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	DTKSK Cleisindoside A
Vial:	1-D.8	Acq. Method Set:	DTKSK Cleisindoside A
Injection #:	1	Processing Method:	DTKSK Cleisindoside A
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	9/13/2019 6:02:54 PM ICT		
Date Processed:	9/16/2019 10:37:26 AM ICT		



Peak Name	RT	Area	% Area	Resolution	Height (µV)
1	2.138	24255	0.20		6010
2	2.248	103099	0.85	1.03	25254
3	2.556	317579	2.61	2.49	56492
4	7.619	12647	0.11	25.73	1356
5 Cleisindoside A	8.076	11593938	95.38	1.85	1221377
6	8.923	86120	0.54	2.98	5490
7	9.078	10328	0.08		1787

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_1
 Report Method ID: 2347
 Page: 1 of 2

act Name: Nghien cuu/2019/07_Cleisindoside_Cleisindosid
 Date Printed: 9/16/2019
 10:37:26 AM Asia/Saigon

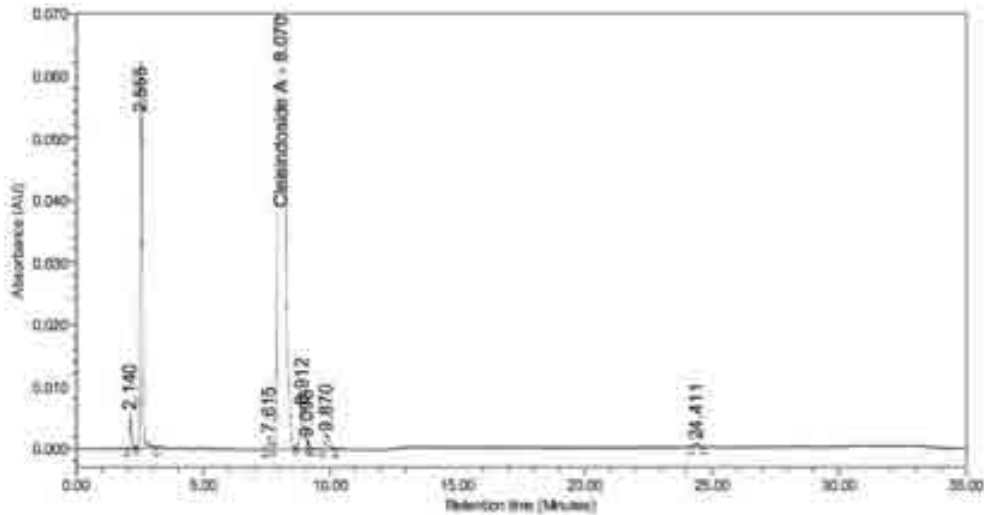
DUNG DỊCH CLEISINDOSIDE A 1000 µg/mL SOI UV 6 GIỜ

Empower 3

0Standard Report Method DTKSK

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	DTKSK Cleisindoside A_Sol LV	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	DTKSK Cleisindoside A
Vial:	1 E.3	Acq. Method Set:	DTKSK Cleisindoside A
Injection #:	1	Processing Method:	DTKSK Cleisindoside A
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	9/13/2019 6:38:44 PM ICT		
Date Processed:	9/16/2019 10:37:33 AM ICT		



Peak Name	RT	Area	% Area	Resolution	Height (µV)
1	2.140	28193	0.21		5698
2	2.556	371020	2.83	3.11	62116
3	7.615	20973	0.16	25.16	2197
4 Cleisindoside A	8.070	12579208	95.84	1.81	1310145
5	8.912	82540	0.63	2.97	6675
6	9.098	6568	0.05		1560
7	9.870	26862	0.20		2524

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_1
 Report Method ID 2347
 Page: 1 of 2

act Name: Nghiencuu/2019/07_Cleisindosid
 Date Printed: 9/16/2019
 10:37:33 AM Asia/Saigon

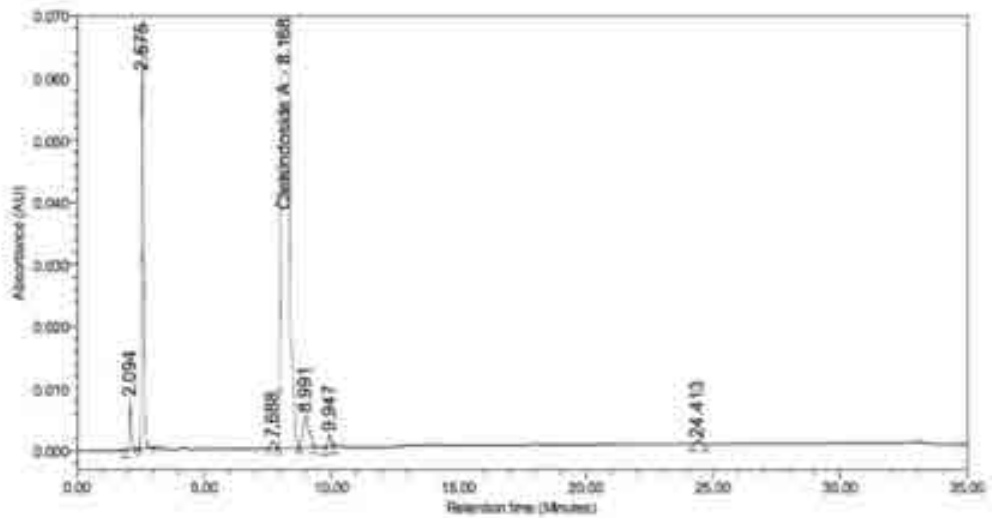
DUNG DỊCH CLEISINDOSIDE A 1000 µg/mL PHÂN HUỶ H₂SO₄ 0,1N/ 30 PHÚT

Empower 3

0Standard Report Method_DTKSK

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	DTKSK Cleisindoside A_H2SO4	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	DTKSK Cleisindoside A
Vial:	1.E.2	Acq. Method Set:	DTKSK Cleisindoside A
Injection #:	1	Processing Method:	DTKSK Cleisindoside A
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	9/13/2019 4:51:23 PM ICT		
Date Processed:	9/16/2019 10:37:14 AM ICT		



Peak Name	RT	Area	% Area	Resolution	Height (µV)
1	2.094	42952	0.33		8010
2	2.575	414178	3.18	3.40	69009
3	7.688	14010	0.11	21.54	1150
4 Cleisindoside A	8.168	12441272	95.55	1.57	1264783
5	8.991	82099	0.63	2.40	5072
6	9.947	18122	0.14	2.83	1991
7	24.413	7862	0.06	48.96	554

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_1
 Report Method ID 2347
 Page: 1 of 1

Set Name: Nghiencuo/2019/07_Cleisintoxin_Cleisindosid
 Date Printed: 9/16/2019
 10:37:14 AM Asia/Saigon

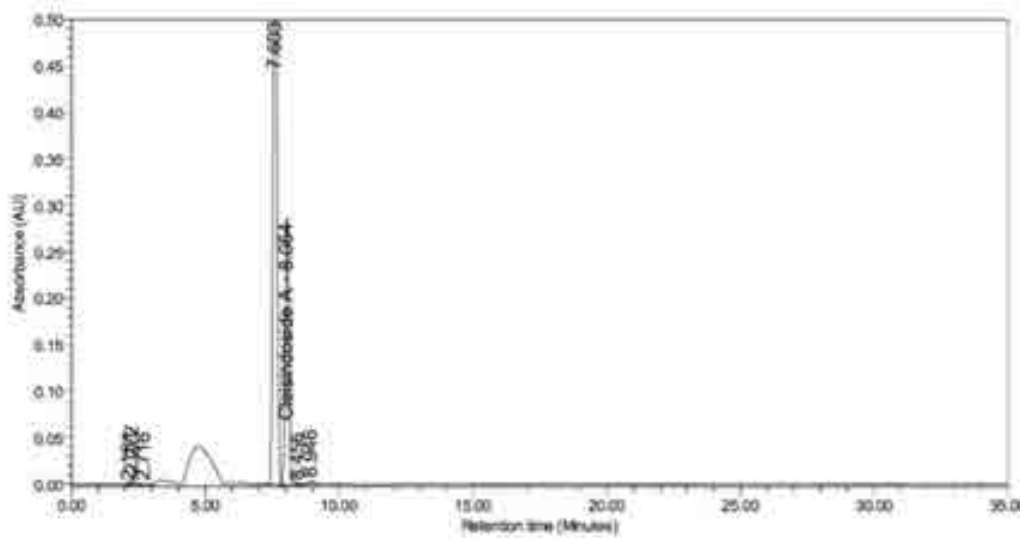
DUNG DỊCH CLEISINDOSIDE A 1000 µg/mL PHÂN HỦY NaOH 0,1N/ 2,5 GIỜ

Empower 3

0Standard Report Method DTKSK

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	DTKSK Cleisindoside A_NaOH	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	DTKSK Cleisindoside A
Vial:	1:E,4	Acq. Method Set:	DTKSK Cleisindoside A
Injection #:	1	Processing Method:	DTKSK Cleisindoside A
Injection Volume:	20.00 µl	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	9/13/2019 7:14:35 PM ICT		
Date Processed:	9/16/2019 10:37:38 AM ICT		



Peak Name	RT	Area	% Area	Resolution	Height (µV)
1	2.151	7036	0.07		1090
2	2.272	38445	0.38		7661
3	2.716	5648	0.06		363
4	7.603	7193590	71.62		767378
5 Cleisindoside A	8.054	2756867	27.45	1.81	285929
6	8.456	3592	0.04		886
7	8.946	38351	0.38		3158

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_
 Report Method ID: 2364
 Page: 1 of 1

ect Name: Nghien cuu/2019/07_Cleisintoxin_Cleisindosid
 Date Printed: 9/16/2019
 10:44:15 AM Asia/Saigon

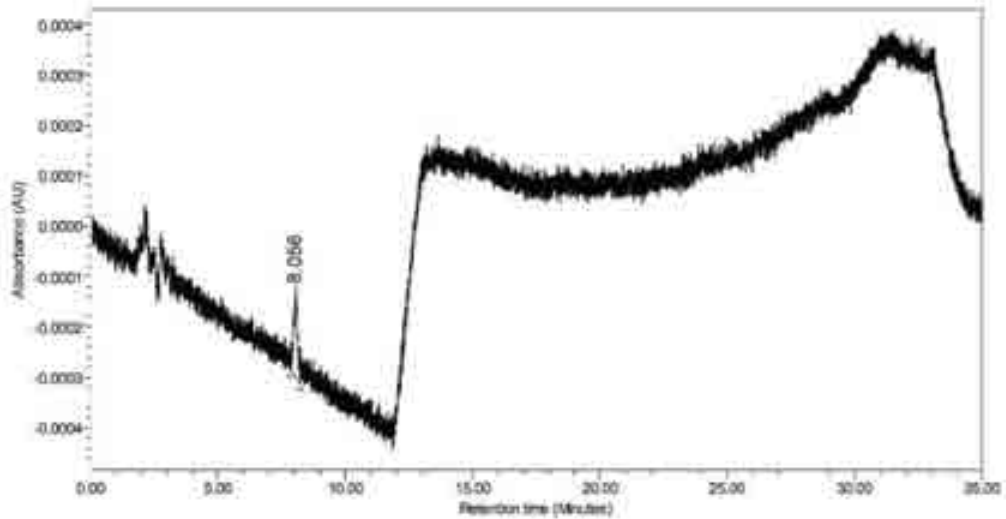
GIỚI HẠN PHÁT HIỆN-LOD

Empower 3

0Standard Report Method Sys

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	LOQ_Cleisindoside A	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	DTKSK Cleisindoside A
Vial:	1.E.8	Acq. Method Set:	DTKSK Cleisindoside A
Injection #:	2	Processing Method:	DTKSK Cleisindoside A_LOQ
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	9/13/2019 8:26:01 PM ICT		
Date Processed:	9/16/2019 10:51:55 AM ICT		



	RT	Area	% Area	Sym. Factor	Plate Count	sh
1	8.056	1835	100.00	0.88	1271121.39	2.02

Reported by User: System
Report Method: 0Standard Report Method_1
Report Method ID: 1040
Page: 1 of 1

act Name: Nghien cui/2019/07_Cleisantoxin_Cleisindosid
Date Printed: 9/16/2019
10:51:55 AM Asia/Saigon

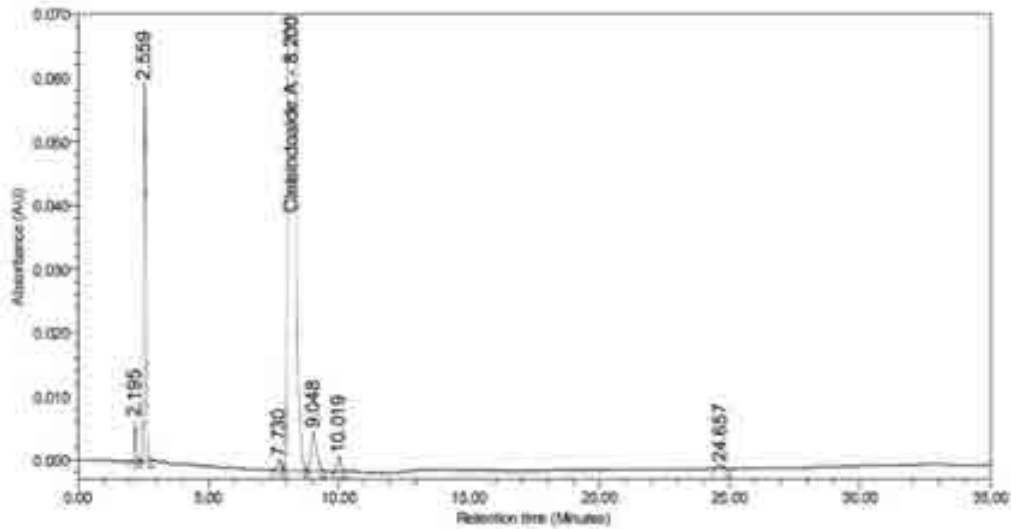
ĐỘ LẶP LẠI

Empower 3

0Standard Report Method DTKSK

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	DTKSK Cleisindoside A_01	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	DTKSK Cleisindoside A
Vial:	1-D.2	Acq. Method Set:	DTKSK Cleisindoside A
Injection #:	1	Processing Method:	DTKSK Cleisindoside A
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	9/13/2019 12:41:03 PM ICT		
Date Processed:	9/16/2019 10:28:37 AM ICT		



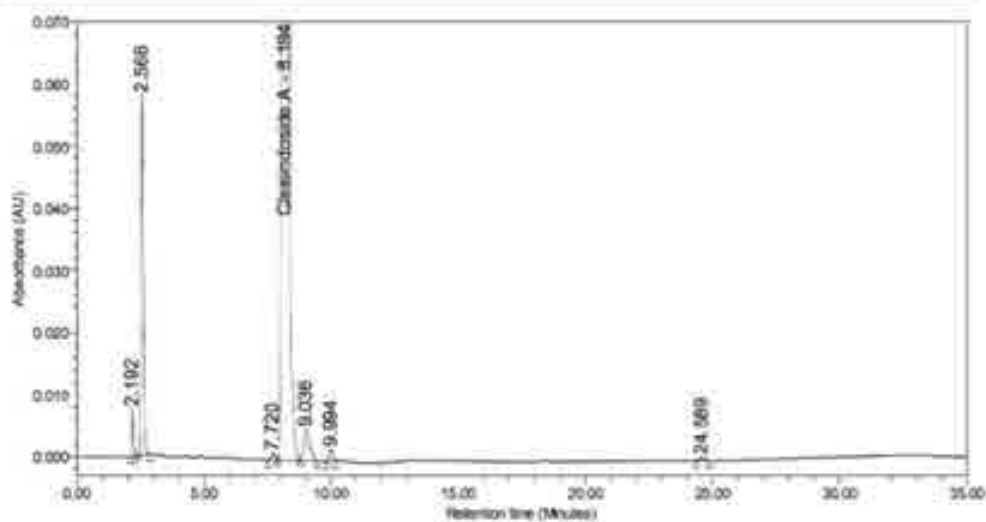
Peak Name	RT	Area	% Area	Resolution	Height (µV)
1	2.195	26080	0.20		6482
2	2.559	377742	2.93	2.74	59337
3	7.730	17498	0.14	23.78	1708
4 Cleisindoside A	8.200	12337047	95.81	1.77	1215085
5	9.048	87014	0.68	2.81	6212
6	10.019	22620	0.18	3.25	2328
7	24.657	8915	0.07	45.19	822

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_1
 Report Method ID: 2347
 Page: 1 of 1

sci Name: Nghiên cứu/2019/07_Cleisindoside_Cleisindoside
 Date Printed: 9/16/2019
 10:28:37 AM Asia/Saigon

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	DTKSK Cloisindoside A_02	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	DTKSK Cloisindoside A
Vial:	1-DJ3	Acq. Method Set:	DTKSK Cloisindoside A
Injection #:	1	Processing Method:	DTKSK Cloisindoside A
Injection Volume:	20.00 μ l	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	9/13/2019 1:16:46 PM ICT		
Date Processed:	9/16/2019 10:28:46 AM ICT		



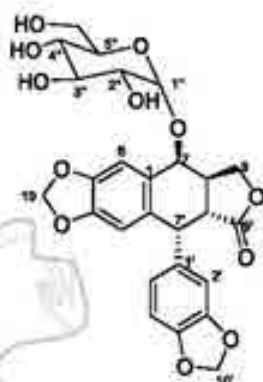
Peak Name	RT	Area	% Area	Resolution	Height (μ V)
1	2.192	31382	0.26		7678
2	2.568	372540	3.05	2.79	57875
3	7.720	12710	0.10	22.94	1185
4 Cloisindoside A	8.194	11685362	95.75	1.74	1153732
5	9.036	76646	0.63	2.54	4930
6	9.994	18148	0.15	3.03	1912
7	24.589	7371	0.06	46.29	524

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_1
 Report Method ID: 2347
 Page: 1 of 1

act Name: Nghien cur/2019/07_Cloisindoside Cloisindoside
 Date Printed: 9/16/2019
 10:28:46 AM Asia/Saigon

PHỤ LỤC 2.14. TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG CHO CHẤT CHUẨN ĐỊNH TÍNH CLEISINDOSIDE A

1. Yêu cầu kỹ thuật



Cấu trúc hoá học cleisindoside A

- Danh pháp IUPAC: 7-(β -D-glucopyranosyloxy)-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7'-cyclo lignan-9,9-olide
- Công thức phân tử: $C_{26}H_{26}O_{12}$ Khối lượng phân tử: 530,0 Da
- Cleisindoside A được phân lập từ cao còn khô chiết xuất từ quả cây Chà chôi (*C.tonkinensis*, Jabl) phải chứa từ 90,0% đến 102,0% ($C_{26}H_{26}O_{12}$) tính trên nguyên trạng.

1.1. Mục đích sử dụng

Chất chuẩn gốc cleisindoside A được dùng cho mục đích phân tích định tính và xác định độ phân giải

1.2. Tính chất

Bột kết tinh màu trắng. Dễ tan trong dicloromethan, ACN, MeOH và aceton.

1.3. Định tính

- Phổ hồng ngoại-IR: cho các đỉnh hấp thụ đặc trưng là 3444, 2910, 1773, 1626, 1491, 1244, 1382, 1080, 1034 $cm^{-1} \pm 20 cm^{-1}$
- Phổ UV-VIS: dung dịch cleisindoside A 0,02 mg/ml pha trong ACN-H₂O (1:1) cho cực đại tại 203,4 nm, 286,8 nm $\pm 2 nm$
- Góc quay cực riêng: $[\alpha]_D^{20} = -48,0$ đến $-53,0$
- Nhiệt độ nóng chảy: $t_m = 230$ đến $233^\circ C$.
- Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR: trong dung môi DMSO.
¹H-NMR (DMSO, 500 MHz), δ_H ppm 7,04; 6,75; 6,54; 6,50; 6,37; 6,01; 6,02; 5,95; 5,94; 5,02; 4,97; 4,89; 4,89; 4,63; 4,52 ; 4,36; 4,32; 4,25; 3,76; 3,46; 3,39; 3,12; 3,11; 3,03; 3,01; $2,85 \pm 0,5 ppm$
¹³C-NMR (DMSO, 125 MHz), δ_C ppm: 37,2; 40,1; 42,6; 61,3; 67,8; 70,4; 73,6; 70,4; 77,0; 76,6; 99,8; 100,8; 101,3; 110,2; 109,9; 110,8; 123,5; 128,2; 133,0; 134,3; 145,9; 146,1; 146,6; 147,8; $174,8 \pm 0,5 ppm$
- Phổ khối HRESI-MS: có pic đặc trưng m/z là 553,1323 $[M+Na]^+$ tính toán cho công thức phân tử $C_{26}H_{26}NaO_{12}$

1.4. Tạp chất liên quan

- Hàm lượng % của từng tạp đơn không được lớn hơn 5,0%
- Hàm lượng % của tổng tạp chất liên quan không được lớn hơn 10,0%

1.5. Độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside A

- Độ tinh khiết sắc kí của NLTLC cleisindoside A không được nhỏ hơn 90,0%

2. Phương pháp thử

2.1. *Tính chất*: bằng cảm quan mẫu phải đạt yêu cầu đã nêu.

2.2. Định tính

- *Phổ hồng ngoại-IR*: chất chuẩn cleisindoside A (ĐĐVN V- Phụ lục 4.2) phải có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của cleisindoside A $\pm 20 \text{ cm}^{-1}$
- *Phổ UV-VIS*: chất chuẩn cleisindoside A pha trong dung môi ACN-H₂O (1:1), quét phổ ở bước sóng 200-400 nm, có các bước sóng cực đại trùng với dữ liệu phổ UV chuẩn của cleisindoside A $\pm 2 \text{ nm}$.
- *Góc quay cực riêng*: chất chuẩn cleisindoside A pha trong CHCl₃ được nồng độ 0,5%, tính theo chế phẩm đã làm khô (ĐĐVN V- Phụ lục 6.7)
- *Nhiệt độ nóng chảy*: kỹ thuật DSC với chương trình gia nhiệt từ 25-225°C: 10°C/ phút, sau đó từ 225-240°C: 2°C/ phút hoặc đo mao quan theo (ĐĐVN V- Phụ lục 6.4)
- *Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR* của chất chuẩn cleisindoside A trùng với dữ liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR chuẩn của cleisindoside A $\pm 0,5 \text{ ppm}$ (DMSO)
- *Phổ khối HRESI-MS* của chất chuẩn cleisindoside A có mảnh m/z : 529,1416 [M+Na]⁺ tính toán cho công thức phân tử C₂₆H₂₆NaO₁₂

2.3. Tạp chất liên quan

Phương pháp HPLC (ĐĐVN V, phụ lục 5.3), thực hiện theo phần độ tinh khiết sắc kí bằng HPLC sử dụng phương pháp chuẩn hoá diện tích.

• Giới hạn tạp:

- Xác định số lượng tạp chất và diện tích của mỗi pic tạp và tổng TCLQ trong từng mẫu thử.
- Hàm lượng phần trăm tạp đơn bằng diện tích của từng pic phụ trên SKD dung dịch thử (trừ pic cleisindoside A và pic dung môi) trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKD (trừ pic dung môi) (% tạp đơn $\leq 5,0\%$).
- Hàm lượng phần trăm tổng TCLQ bằng tổng diện tích của tất cả các pic phụ trong SKD của dung dịch thử (trừ pic cleisindoside A và pic dung môi) trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKD (trừ pic dung môi) (% tổng tạp $\leq 10,0\%$)
- Ngoại trừ tất cả các pic có S/N < 2

2.4. Độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside A

Phương pháp HPLC, sử dụng phương pháp chuẩn hoá diện tích.

• Chuẩn bị mẫu:

- Mẫu trắng: Dung môi pha mẫu ACN-H₂O (1:1).

- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 5 mg cleisindoside A nguyên liệu thiết lập chất chuẩn vào bình định mức 5 ml, thêm 3 mL ACN-H₂O (1:1). Siêu âm 15 phút và định mức vừa đủ bằng ACN-H₂O (1:1). Lọc qua màng lọc 0,45 µm. Chuẩn bị 06 dung dịch thử để tiến hành sắc kí.
- Dung dịch phân giải: cleisindoside A 1000 µg/ml và cleisindoside D 50 µg/ml.
- Điều kiện sắc kí:
 - Pha tĩnh: Cột C18 (250 mm x 4,6 mm; 5µm)
 - Pha động: Acetonitril; Nước
 - Chương trình gradient xác định độ tinh khiết sắc kí của cleisindoside A

STT	Thời gian (phút)	A	B	Tốc độ dòng
1.	0	30	70	1,0 mL/phút
2.	12	38	62	1,5 mL/phút
3.	13	38	62	1,0 mL/phút
4.	30	50	50	1,0 mL/phút
5.	31	30	70	1,0 mL/phút
6.	Thời gian phân tích 35 phút			

- Detector DAD: bước sóng 286 nm
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
- Thể tích tiêm mẫu: 20 µL.
- Cách tiến hành:
 - Kiểm tra độ ổn định của hệ thống sắc kí: Tiến hành sắc kí dung dịch phân giải: cleisindoside A 1000 µg/ml và cleisindoside D 50 µg/ml, độ phân giải giữa pic cleisindoside A và cleisindoside D ($R_s \geq 3,0$).
 - Tiến hành sắc kí dung dịch chuẩn cleisindoside A 100 µg/ml lặp lại 6 lần, xác định các thông số thời gian lưu, diện tích pic, số đĩa lý thuyết, hệ số đối xứng của pic chính, tính giá trị trung bình và RSD% của các thông số thời gian lưu và diện tích pic phải không quá 2%. T phải nằm trong khoảng 0,8 đến 1,5.
 - Tiến hành sắc kí 6 dung dịch thử cleisindoside A 1000 µg/ml, ghi SKĐ.
 - Độ tinh khiết SK của cleisindoside A bằng diện tích pic của cleisindoside A trong SKĐ của dung dịch thử trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKĐ (trừ pic dung môi và tất cả các pic có S/N < 2).

2.5. Bảo quản

NLTLC cleisindoside A được đóng ống thủy tinh trung tính, màu nâu 10 mL. Tránh ánh sáng. Bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C

PHỤ LỤC 2.15. PHIẾU KIỂM NGHIỆM ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA NTLCC ĐỊNH TÍNH CLEISINDOSIDE A



BỘ S T T
VIỆN KIỂM NGHIỆM THỐNG TRUNG ƯƠNG
Số 140 Đường Hoàng Diệu - Hồ Chí Minh - Quận 4 - TP. HCM
ĐT: +84.8.35111791 - Fax: +84.8.35118807

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



PHIẾU KIỂM NGHIỆM

(Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đơn lẻ)

Số: 190/2019

Mẫu để kiểm nghiệm: Nguyên liệu thiết lập chuẩn Cleisindoside A
Nơi sản xuất: Trường Đại học Dược Hà Nội
Số lô, ngày SX: Lô SX: Cleisindosime A-01 Ngày SX: Không có thông tin
Hạn dùng: Không có thông tin Số ĐK: Không có thông tin
Người và nơi gửi mẫu: Trường Đại học Dược Hà Nội
Yêu cầu KN (ghi rõ nơi dùng, số ngày dùng, năm cung cấp và họ tên người gửi mẫu):
Dinh tinh, tạp chất liên quan, độ tinh khiết sắc ký
Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 16/09/2018 **Số đăng ký KN:** 400.1024
Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quy
Tham theo: Tiêu chuẩn cơ sở gửi kèm

Tình trạng mẫu khi nhận và mô tả kèm phong để kiểm nghiệm:

Mẫu đóng gói trong lọ nắp kín, nhãn rõ ràng.

CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG		KẾT QUẢ	YÊU CẦU
1.	Tinh chất	Đúng	Hạt kết tinh màu trắng, dễ tan trong dichloromethan, acetonitril, methanol và aceton
2.	Độ tinh khiết Phương pháp HPLC	Đúng	Sắc ký độ hòa dung dịch thu phải cho pic rõ thời gian lưu và phổ UV-VIS tương ứng với thời gian lưu và phổ UV-VIS của pic cleisindoside A thu được từ sắc ký độ hòa dung dịch chuẩn
3.	Tạp chất liên quan Phương pháp HPLC	Hạt (Tạp đơn lẻ nhất = 3,0%)	Không quá 5,0%
	Tổng tạp		Không quá 10,0%
4.	Độ tinh khiết sắc ký Phương pháp HPLC	Hạt (99,8%)	Không thấp hơn 90,0%

Kết luận: Mẫu gửi kiểm nghiệm đạt yêu cầu chất lượng các chỉ tiêu đề xuất theo Tiêu chuẩn cơ sở gửi kèm.

Hà Nội, ngày 16 tháng 09 năm 2019
TC VIỆN TRƯỞNG
PHÓ VIỆN TRƯỞNG

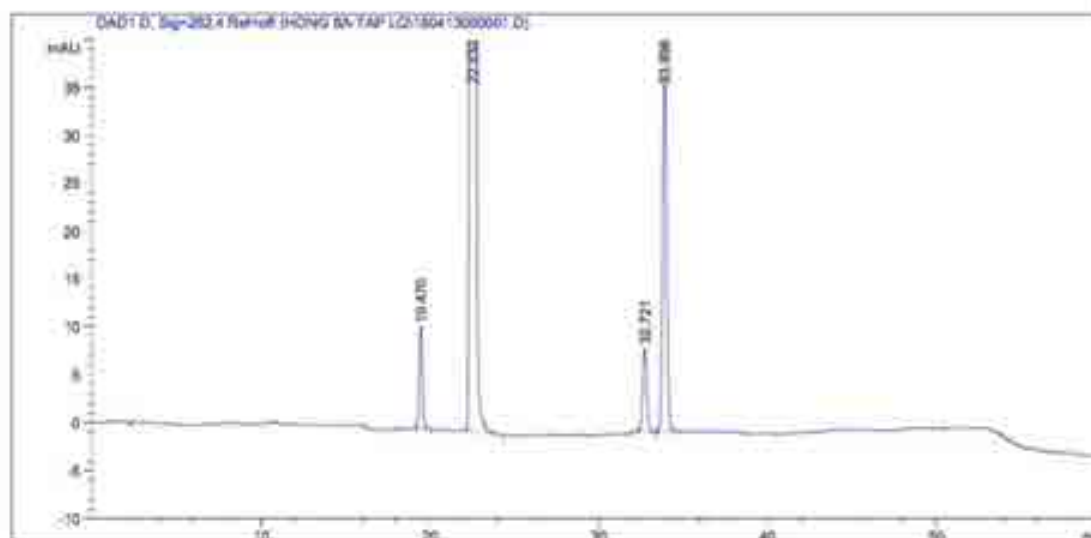
**PHỤ LỤC 2.16. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH ĐỘ
TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN
ĐỘ ĐẶC HIỆU
DUNG DỊCH 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN 1000 µg/mL**

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG BA-TAP 50\180413050001.D
Sample Name: Cleistanbinoside A 1000ppm/ACB

```

-----
Acq. Operator   : Phuong
Acq. Instrument : Instrument 1          Location : Vial 1
Injection Date  : 4/13/2018 9:07:24 AM      Inj Volume : 15.0 µl

Acq. Method    : D:\CHEM32\1\DATA\HONG BA-TAP 50.M
Last changed   : 4/13/2018 9:02:18 AM by Phuong
                (modified after loading)
Analysis Method: D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTR.M
Last changed   : 7/3/2018 1:55:20 PM by Thu Ba
                (modified after loading)
Sample Info     : Cleistanbinoside A 1000ppm/ACB, v=1.35 ml/g, V=15µl
                MP: ACB-H2O; 0' 50-70, 20' 50-50, 50' 70-80, 55' 50-70
                and 60'
                Col Inertsil ODS-3, 250x4, 6mm, 5µm
    
```



Area Percent Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Date Modified : Tuesday, March 21, 2017 4:59:44 PM
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 [ng/ul]  (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```


Data File D:\CHEM32\1\DATA\NORM SA-TAP LQ\180413000001.D
Sample Name: Clintonkinensis A 1000ppm/ACN

Signal 1: DAD1 D, Sig=262.4 Ref-off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [NAU*s]	Area %	Name
1	19.470	BB	0.2045	140.16433	0.9960	?
2	22.532	BB	0.2090	1.31541e4	93.4879	?
3	32.721	BB	0.2854	149.70494	1.0639	?
4	33.898	BB	0.2671	626.47711	4.4522	?

Totals : 1.40711e4

Signal 2: DAD1 C, Sig=286.8 Ref-off not found

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [NAU*s]	Area %	Name
1	8.419		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals : 0.00000

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see Calibration Table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found

*** End of Report ***

**DUNG DỊCH PHÂN GIẢI 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN 1000
 $\mu\text{g}/\text{mL}$ VÀ CLEISTANTOXIN 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.**

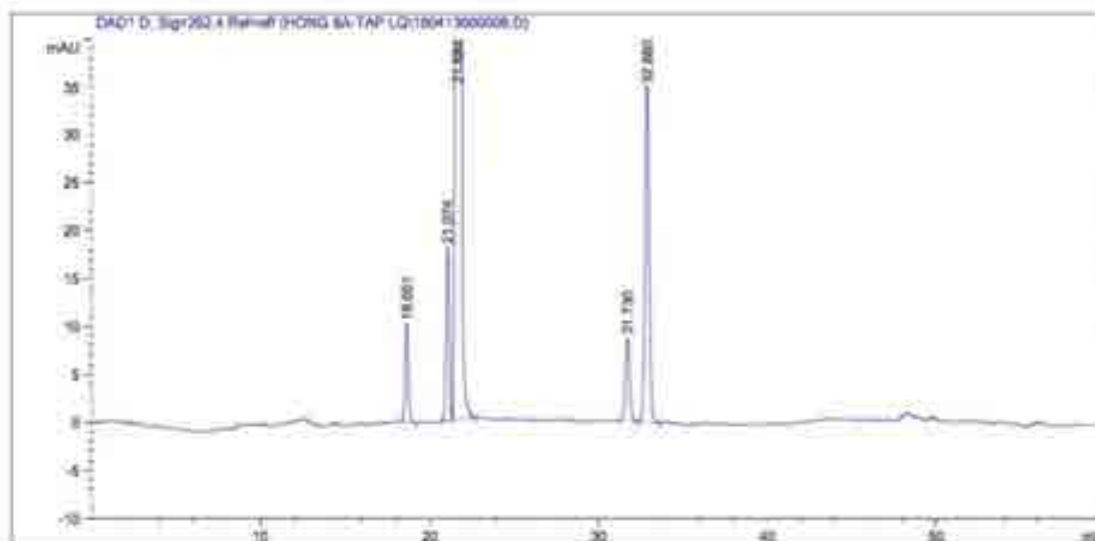
Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG BA-TAP LQ\19041300008.D

Sample Name: BA 1000ppm/ACB phân giải + TH

```

=====
Acq. Operator   : Thuong
Acq. Instrument : Instrument 1           Location : Vial 2
Injection Date  : 4/13/2018 3:22:52 PM      Inj Volume : 15.0 ul

Acq. Method     : D:\CHEM32\1\DATA\HONG BA-TAP LQ.M
Last changed    : 4/13/2018 3:11:19 PM by Thuong
                 (modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTB.M
Last changed    : 7/3/2018 2:48:24 PM by Thu Ba
                 (modified after loading)
Sample Info     : Cleistonkinensis A 1000ppm/ACB phân giải + TH, v=1.5 ml/
                 p, v=15ml
                 MP: ACB-IGD: 0' 30-70, 20' 50-30, 50' 70-30, 55' 30-70
                 and 60'
                 Cot Inertall GDS-3, 250x4.6mm, 5micr.
=====
    
```



Area Percent Report

```

=====
Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Tuesday, March 21, 2017 4:49:44 PM
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 3.0000
Sample Amount  : 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
=====
    
```

Instrument 1 7/3/2018 3:01:13 PM Thu Ba

Page 1 of 2

Data File D:\CHROM32\1\DATA\HONG SA-TAP LO\185413000006.D
Sample Name: SA 1000ppm/ACH pkan yial - 78

Signal 1: DAD1 C, Sig=262,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	18.651	BB	0.2022	132.37219	0.9740	?
2	21.074	BB	0.2031	233.68394	1.7198	?
3	21.884	BB	0.2078	1,2470064	91.7508	?
4	31.730	BB	0.2643	149.28798	1.0886	?
5	32.890	BB	0.2468	405.94772	4.4376	?

Totals : 1.3381261

Signal 2: DAD1 C, Sig=266,8 Ref=off not found.

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	8.418		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals : 0.00000

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found

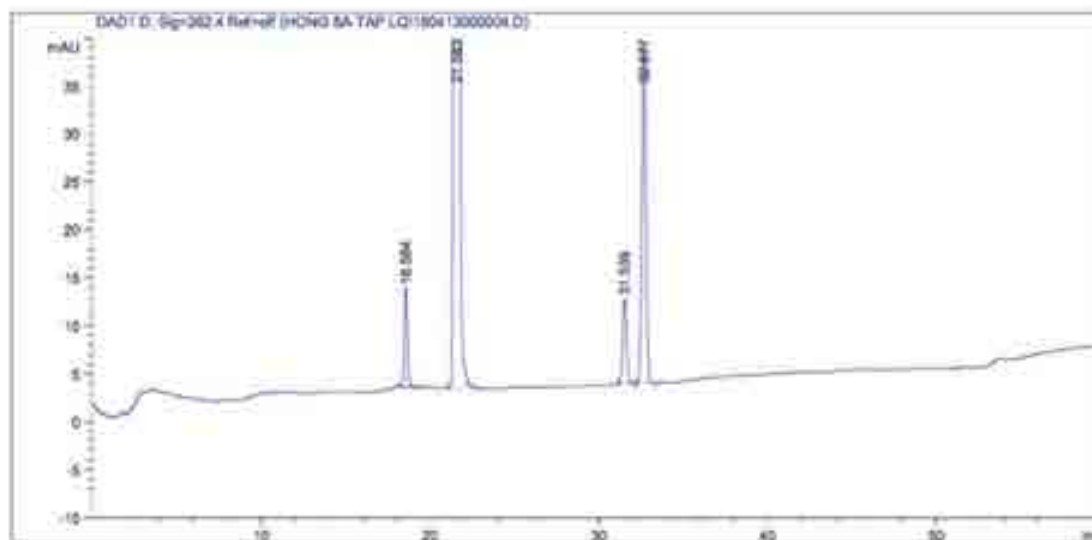
*** End of Report ***

DUNG DỊCH 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN 1000 µg/ml, CÁCH THUỶ 100°C/ 2GIỜ

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG SA-TAP LQ\180413000004.D
 Sample Name: SA 1000ppm/ACN cach thuy 90oC 1h30'

```

-----
Acq. Operator   : PhuocG
Acq. Instrument : Instrument 1           Location : Vial 2
Injection Date  : 4/13/2018 1:04:58 PM
                                           Inj Volume : 15.0 µl
Acq. Method    : D:\CHEM32\1\DATA\HONG SA-TAP LQ.M
Last changed   : 4/13/2018 12:52:38 PM by PhuocG
                (modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG379.M
Last changed   : 7/3/2018 2:48:04 PM by Thu Ba
                (modified after loading)
Sample Info    : Cleitonkinensis A 1000ppm/ACN cach thuy 90oC 1h30', v=
                .3 ml/p, V=15ml
                M2: ACS-H2O; 0' 30-70, 20' 50-50, 30' 70-90, 55' 30-70
                end 60'
                Col Inertail ODS-3, 250x4.6mm, 5µm
    
```



Area Percent Report

```

-----
Sorted By      : Signal
Calib. Date Modified : Tuesday, March 21, 2017 4:49:44 PM
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Instrument 1 7/3/2018 2:56:41 PM Thu Ba

Page 1 of 3

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HMSI SA-DAY LG\180413000004.D
Sample Name: SA 1000ppm/ACH each thuy 9Doc 1830'

Signal 1: DAD1 D; Sig=262.8 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	18.388	HM	0.2014	131.43218	0.3928	T
2	21.583	HM	0.2062	1.23687e4	93.3934	T
3	31.539	HM	0.2585	147.95294	1.1172	T
4	32.477	HM	0.2413	595.54344	4.4998	T

Totals : 1.32436e4

Signal 2: DAD1 C; Sig=286.8 Ref=off: not found

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	8.419		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals : 0.00000

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found

*** End of Report ***

DUNG DỊCH 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN 1000 µg/mL PHÂN HUỠY TRONG H₂SO₄ 10%/30 PHÚT

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG SA-TAP LO\180413000003.D
 Sample Name: Cleistococcinensis A 1000ppm/ACN+H2SO4 10%

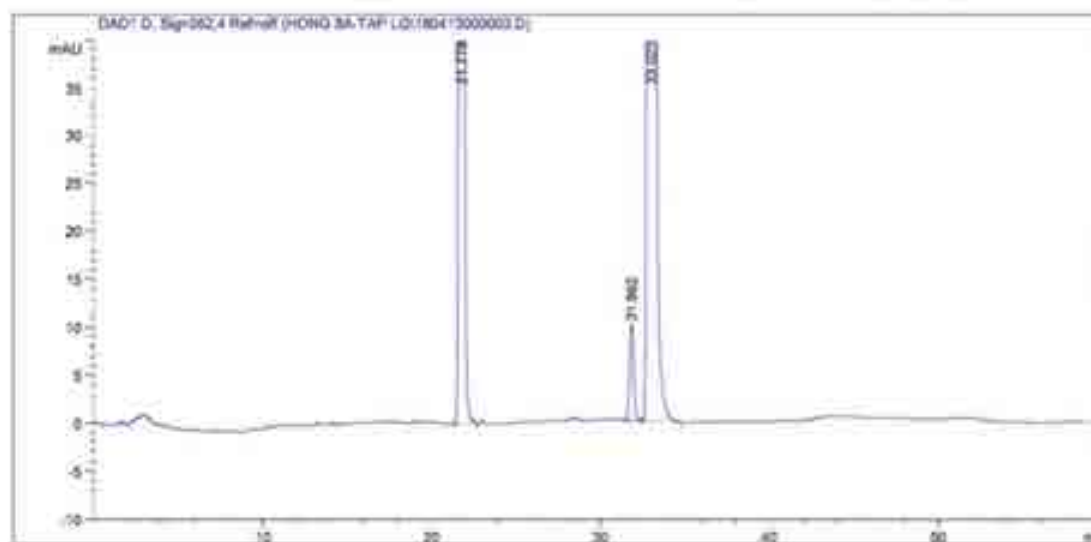
```

Acq. Operator   : Phuong
Acq. Instrument : Instrument 1           Location : Vial 1
Injection Date  : 4/13/2018 11:51:53 AM Inj Volume : 15.0 µl

Acq. Method    : D:\CHEM32\1\DATA\HONG SA-TAP LO.M
Last changed   : 4/13/2018 11:51:56 AM by Phuong
               : (modified after loading)

Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\ACN00379.M
Last changed   : 7/3/2018 2:49:04 PM by Thu Ba
               : (modified after loading)

Sample Info    : Cleistococcinensis A 1000ppm/ACN+H2SO4 10%, v=1.5 µl/p, V=
               : 15µl
               : M2: ACN-H2O: 5' 30-70, 20' 55-50, 30' 70-30, 55' 30-70
               : and 60'
               : Col: Inertsil ODS-3, 250x4.6mm, 5µm
  
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Data Modified : Tuesday, March 21, 2017 4:49:04 PM
Multiplier:    : 1.0000
Dilution:      : 1.0000
Sample Amount: : 1.50000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
  
```


Data File D:\CRM3\1\1\DATA\COMP BA-TAP LO1180413000003.D
Sample Name: C18contaminants X 1000ppm/ACH+ H2SO4 10%

Signal 1: DAD1 D, Sig=262,8 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	21.778	SH	0.2070	6917.64893	17.4929	F
2	31.862	SH	0.2652	170.95766	0.4372	F
3	33.023	SH	0.2651	3.20098e4	81.8699	F

Totals : 3.92986e4

Signal 2: DAD1 C, Sig=286,8 Ref=off not found

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	8.419		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals : 0.00000

2 Warnings or Errors :

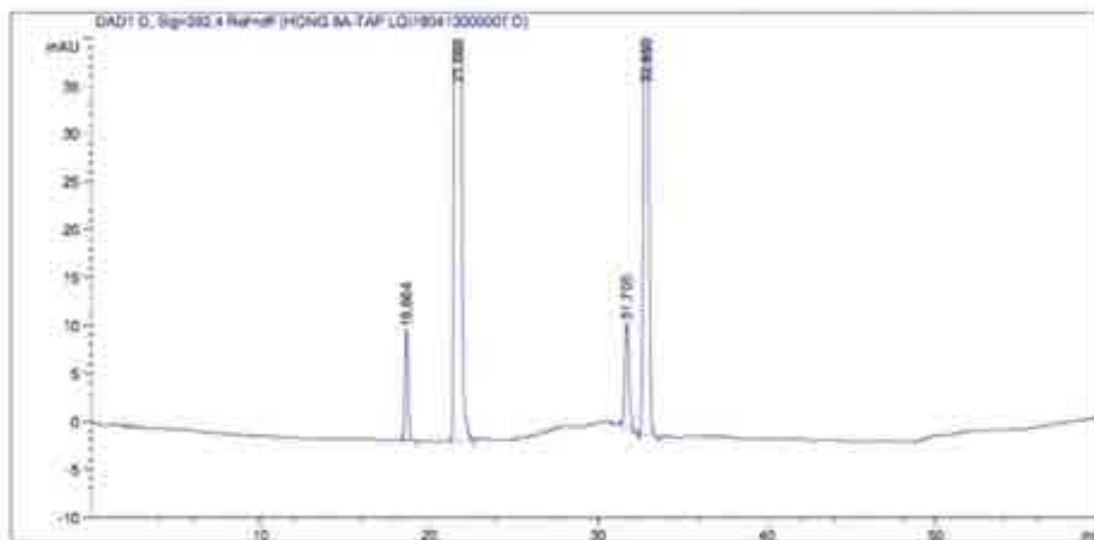
Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found

*** End of Report ***

DUNG DỊCH 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN 1000 µg/mL PHÂN HUỶ TRONG NaOH 0,1N/15 PHÚT

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG BA-TAP LO\190413000007.D
Sample Name: BA 1000ppm/ACN+ 1g NaOH 0.1 N 15'

Acq. Operator : Phuong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 4
Injection Date : 4/13/2018 4:24:51 PM Inj Volume : 15.0 µL
Acq. Method : D:\CHEM32\1\DATA\HONG BA-TAP LO.M
Last changed : 4/13/2018 4:14:07 PM by Phuong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGTH.M
Last changed : 7/5/2018 2:48:04 PM by Thu Ba
(modified after loading)
Sample Info : Cliftonkinesis A 1000ppm/ACN+ 1g NaOH 0.1 N 15', v=1.5
ml/p, V=10ml
MP: ACN-H2O: 2' 30-10, 20' 10-50, 50' 70-90, 55' 30-70
end 60'
Col Inertial: C08-3, 250x4.6mm, 5µm



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Date Modified : Tuesday, March 21, 2017 4:49:44 PM
Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 (ng/µl) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Data File D:\CROD32\1\DATA\NMR\BA-TAP 10\180413000007.D
Sample Name: BA 1000ppm/ACN+ 1g NaOH 0.1 X 15'

Signal 1: DAD1 D, Sig=262.4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [NAU*s]	Area %	Name
1	18.664	SB	0.2063	150.56343	0.9971	?
2	21.683	SB	0.2123	1.80769e4	89.6370	?
3	31.705	SB	0.2746	193.59608	1.1536	?
4	32.650	SB	0.2672	1361.45520	8.1123	?

Totals : 1.67825e4

Signal 2: DAD1 C, Sig=286.6 Ref=off not found

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [NAU*s]	Area %	Name
1	8.419		0.0002	0.00000	0.0000	

Totals : 0.00000

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found

*** End of Report ***

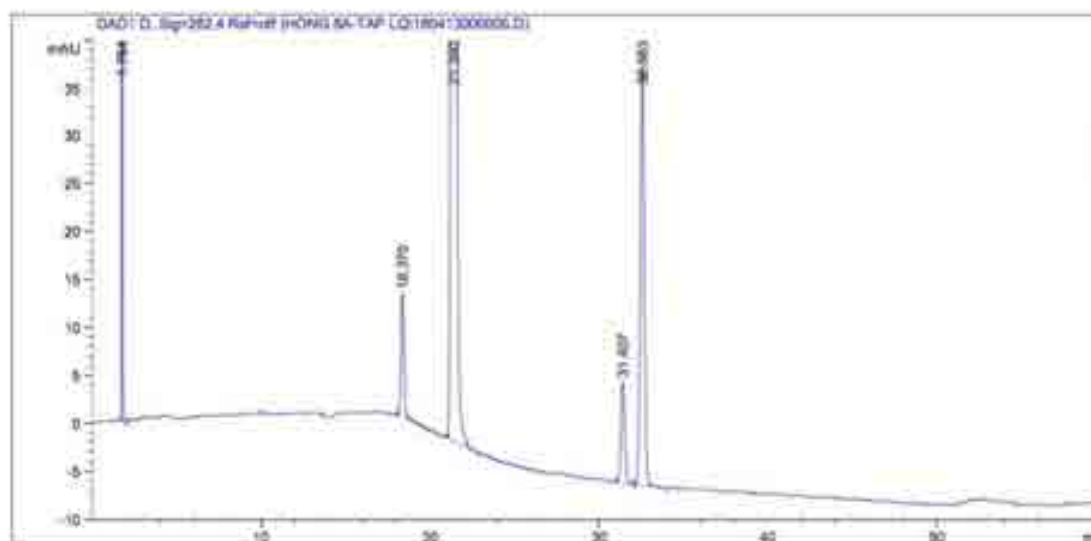
**DUNG DỊCH 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN 1000 µg/mL PHÂN
HUỠ TRONG H₂O₂ 3%/2 giờ**

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HUNG SA-TAP LO\180413000005.D
Sample Name: SA 1000ppm/ACN+H2O2 3% 2h

```

Acq. Operator   : Phuong
Acq. Instrument : Instrument 1           Location : Vial 3
Injection Date  : 4/13/2018 2:10:04 PM Inj Volume : 15.0 µl

Acq. Method    : D:\CHEM32\1\DATA\HUNG SA-TAP LO.M
Last changed   : 4/13/2018 2:06:27 PM by Phuong
                (modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HUNG7B.M
Last changed   : 7/3/2018 2:48:04 PM by Thu Ba
                (modified after loading)
Sample Info    : Cleitonkinensin A 1000ppm/ACN+H2O2 3% 2h, v=1.5 ml/p, V
                =1hour
                MP: ACN-H2O: 0' 30-70, 20' 30-50, 50' 10-30, 55' 30-70
                end 60'
                Col Inertall ODS-3, 250x4.6mm, 5µm
    
```



Area Percent Report

```

Sorted By      : Signal
Calib. Date Modified : Tuesday, March 21, 2017 4:49:44 PM
Multiplier    : 1.0000
Dilution      : 1.0000
Sample Amount  : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs
    
```

Data File D:\CHROM32\1\DATA\N000 BA-7AP 10\180413000000.D
Sample Name: BA 1000ppm\ACB-H202 36 2h

Signal 1: DMI D, Sig=262, A Ref=off

Peak #	RetTime (min)	Type	Width (min)	Area (mAU*s)	Area %	Name
1	1.766	SM	0.0627	192.53362	1.1823	1
2	18.330	SM	0.2060	172.84889	1.0413	2
3	21.393	SM	0.2076	1,3015564	82.1693	3
4	31.407	SM	0.2591	176.39309	1.0831	4
5	32.383	SM	0.2586	128.80261	6.4750	5

Totals : 1.42901e4

Signal 2: DMI C, Sig=266, A Ref=off not found

Peak #	RetTime (min)	Type	Width (min)	Area (mAU*s)	Area %	Name
1	8.419		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals : 0.00000

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)
Warning : Calibrated compound(s) not found.

*** End of Report ***

Instrument: I 7/3/2018 2:38:57 PM Thu No

Page : 2 of 3

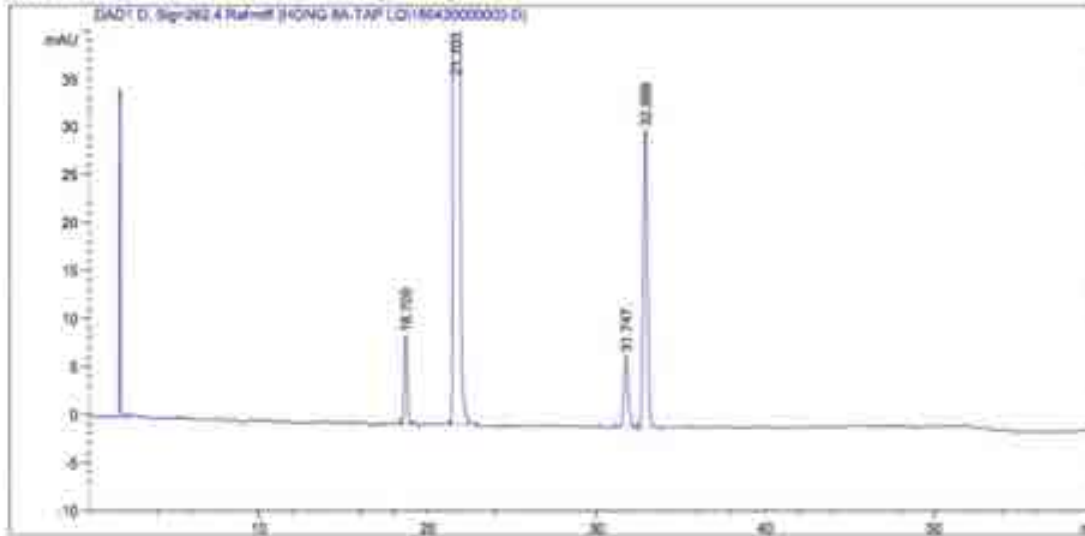
PL173

ĐỘ LẶP LẠI

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG SA-TAP IQ\180430000003.D
Sample Name: Cleitonkinensis A/ACH (9.81mg)

Acq. Operator : Thuong
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 2
Injection Date : 4/20/2018 11:44:54 AM Inj Volume : 10.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\DATA\HONG SA-TAP IQ.M
Last changed : 4/20/2018 11:38:35 AM by Thuong
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONGYH.M
Last changed : 7/3/2018 4:10:38 PM by Thu Ha
(modified after loading)
Sample Info : Cleitonkinensis A/ACH (9.81mg), v=1.5 ml/phut, V=10 µl
MP: ACH-K2C, 0' 30-70, 20' 50-50, 30' 70-30, 35' 30-70,
end 60'
col Inertsil ODS-3, 250x4.6 mm, 5µm

Additional Info : Peaks manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Calib. Date Modified : Tuesday, March 21, 2017 4:49:44 PM
Multiplier : 1.0000
Dilution : 1.0000
Sample Amount : 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Data File D:\CHEM33\1\DATA\0000 8A-TAP LQ\180420000003.D
Sample Name: Cleistokinensia A/ACE (9.8mg)

Signal 1: DAD1 D, Sig=262,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	18.700	VB	0.1986	118.93613	1.0384	?
2	21.701	WB	0.2010	1.06893e4	93.3262	?
3	31.747	WB	0.2475	127.85892	1.1163	?
4	32.888	WB	0.2589	517.60443	4.5191	?

Totals 1 1.14537e4

Signal 2: DAD1 C, Sig=184,8 Ref=off not found

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Area %	Name
1	8.419		0.0000	0.00000	0.0000	

Totals 2 0.00000

2 Warnings or Errors :

Warning : Calibration warnings (see calibration table listing)

Warning : Calibrated compound(s) not found

*** End of Report ***

PHỤ LỤC 2.17. TIÊU CHUẨN CHẤT LƯỢNG CHO CHẤT CHUẨN ĐỊNH TÍNH 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN

1. Yêu cầu kỹ thuật



Cấu trúc hoá học của 7',8'-dehydrocleistantoxin

- **Danh pháp IUPAC:** (7R,8R,7'R,8'R)-7-hydroxy-6-methoxy-3',4':4,5-bis(methylenedioxy)-2,7-cyclo lignan-9,9-olid
- **Công thức phân tử:** $C_{21}H_{16}O_8$. **Khối lượng phân tử:** 396,0749 Da.
- 7',8'-dehydrocleistantoxin được phân lập từ cao cồn khô chiết xuất từ quả cây Chà chôi (*C.tonkinensis*, Jabl) phải từ 90,0% đến 102,0% ($C_{21}H_{16}O_8$) tính trên nguyên trạng.

1.1. Mục đích sử dụng

Chất chuẩn gốc 7',8'-dehydrocleistantoxin được dùng cho mục đích phân tích định tính và xác định độ phân giải.

1.2. Tính chất

Bột kết tinh màu trắng. Dễ tan trong CH_2Cl_2 , $CHCl_3$ và ACN. Rất khó tan trong MeOH và nước.

1.3. Định tính

- **Phổ hồng ngoại-IR** của chất chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin có các dao động đặc trưng của nhóm hydroxyl ở số sóng cực đại (ν_{max}) là: 3547 cm^{-1} , nhóm carbonyl ở 1745 cm^{-1} , nối đôi C=C vòng thơm ở $1656, 1489\text{ cm}^{-1} \pm 20\text{ cm}^{-1}$
- **Phổ UV-VIS** của chất chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin pha trong dung môi ACN, quét phổ từ bước sóng 200-400 nm, có các bước sóng cực đại 203; 251 và 344 nm trùng với dữ liệu phổ chuẩn của 7',8'-dehydrocleistantoxin $\pm 2\text{ nm}$.
- **Góc quay cực riêng:** $[\alpha]_D^{20} = +86,0$ đến $+90,0$
- **Nhiệt độ nóng chảy:** $t_{nc} = 328$ đến 330°C .
- **Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ trong dung môi DMSO**
- $^1\text{H-NMR}$ (DMSO, 500 MHz), δ_{H} ppm: 6,87; 6,64; 6,59; 6,07; 5,96; 5,95; 5,29; 5,12; 4,64; 4,12; 3,91; $3,38 \pm 0,5\text{ ppm}$
- $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO, 125 MHz), δ_{C} ppm: 43,1; 60,9; 70,8; 73,4; 101,6; 102,5; 104,7; 108,3; 110,5; 119,6; 123,8; 126,3; 128,4; 130,4; 139,9; 142,5; 145,6; 147,2; 147,7; $148,5; 168,4 \pm 0,5\text{ ppm}$

- *Phổ khối phân giải cao-HRESI-MS: m/z 419,0749 [M+Na]⁺* (tính toán lý thuyết cho công thức phân tử C₂₁H₁₆O₃Na, 419,0743)

1.4. Tạp chất liên quan

- Hàm lượng % của từng tạp đơn không được lớn hơn 5,0%
- Hàm lượng % của tổng tạp chất liên quan không được lớn hơn 10,0%

1.5. Độ tinh khiết sắc kí của 7',8'-dehydrocleistantoxin

- Độ tinh khiết sắc kí của chất chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin không được nhỏ hơn 90,0%

2. Phương pháp thử

- #### 2.1. Tính chất: bằng cảm quan mẫu phải đạt yêu cầu đã nêu.

2.2. Định tính

- *Phổ hồng ngoại-IR:* chất chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin ((ĐDVN V-Phụ lục 4.2) phải có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của 7',8'-dehydrocleistantoxin ± 20 cm⁻¹
- *Phổ UV-VIS:* chất chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin pha trong dung môi ACN, quét phổ từ bước sóng 200-400 nm, có các bước sóng cực đại trùng dữ liệu phổ UV chuẩn của 7',8'-dehydrocleistantoxin ± 2 nm.
- *Góc quay cực riêng:* chất chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin pha trong CHCl₃ được nồng độ 0,042%_{v/v}, tính theo chế phẩm đã làm khô (ĐDVN V-Phụ lục 6.7)
- *Nhiệt độ nóng chảy:* kỹ thuật DSC với chương trình gia nhiệt từ 25-320°C: 10°C/ phút, sau đó từ 320-340°C: 2°C/ phút hoặc kỹ thuật đo mao quan (ĐDVN V-Phụ lục 6.4)
- *Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR:* NLTLC 7',8'-dehydrocleistantoxin trùng dữ liệu phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR chuẩn của 7',8'-dehydrocleistantoxin $\pm 0,5$ ppm (đo trong dung môi DMSO)
- *Phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS:* chất chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin có m/z 419,0749 [M+Na]⁺

2.3. Tạp chất liên quan

Phương pháp HPLC (ĐDVN V, phụ lục 5.3), thực hiện theo phần độ tinh khiết sắc kí bằng HPLC sử dụng phương pháp chuẩn hoá diện tích.

• Giới hạn tạp:

- Xác định số lượng tạp chất và diện tích của mỗi pic tạp và tổng TCLQ trong từng mẫu thử.
- Hàm lượng phần trăm tạp đơn bằng diện tích của từng pic phụ trên SKĐ dung dịch thử (trừ pic 7',8'-dehydrocleistantoxin và pic dung môi) trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKĐ (trừ pic dung môi) (% tạp đơn $\leq 5,0\%$).
- Hàm lượng phần trăm tổng TCLQ bằng tổng diện tích của tất cả các pic phụ trong SKĐ của dung dịch thử (trừ pic 7',8'-dehydrocleistantoxin và pic dung môi) trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKĐ (trừ pic dung môi) (% tổng tạp $\leq 10,0\%$).
- Ngoại trừ tất cả các pic có S/N < 2

2.4. Độ tinh khiết sắc kí của 7',8'-dehydrocleistantoxin

Phương pháp HPLC (ĐDVN V, phụ lục 5.3), sử dụng phương pháp chuẩn hoá diện tích.

- Chuẩn bị mẫu:

- Mẫu trắng: Dung môi pha mẫu ACN.
- Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 mg chất chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin vào bình định mức 10 ml, thêm 5 mL ACN. Siêu âm 15 phút và định mức vừa đủ bằng ACN. Lọc qua màng lọc 0,45 μm . Chuẩn bị 06 dung dịch thử để tiến hành sắc kí.
- Dung dịch phân giải: cleistantoxin 50 $\mu\text{g/ml}$ và 7',8'-dehydrocleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$.

- Điều kiện sắc kí:

- Pha tĩnh: Cột C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μm)
- Pha động: Acetonitril: Nước
- Chương trình gradient

STT	Thời gian	ACN (%)	H ₂ O (%)
1.	0 phút	30	70
2.	20 phút	50	50
3.	50 phút	70	30
3.	55 phút	30	70
4.	Thời gian phân tích 60 phút		

- Detector DAD: bước sóng 262 và 286 nm
- Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút
- Thể tích tiêm mẫu: 30 μL .
- Cách tiến hành:
 - Kiểm tra độ ổn định của hệ thống sắc kí: Tiến hành sắc kí dung dịch phân giải: cleistantoxin 50 $\mu\text{g/ml}$ và 7',8'-dehydrocleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$, độ phân giải giữa pic cleistantoxin và 7',8'-dehydrocleistantoxin ($R_s \geq 1,5$).
 - Tiến hành sắc kí dung dịch chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$ lặp lại 6 lần, xác định các thông số thời gian lưu, diện tích pic, số đĩa lý thuyết, hệ số đối xứng của pic chính, tính giá trị trung bình và RSD% của các thông số thời gian lưu và diện tích pic phải không quá 2%, T phải nằm trong khoảng 0,8 đến 1,5.
 - Tiến hành sắc kí 6 dung dịch thử 7',8'-dehydrocleistantoxin 1000 $\mu\text{g/ml}$, ghi SKĐ.
 - Độ tinh khiết SK của 7',8'-dehydrocleistantoxin bằng diện tích pic của 7',8'-dehydrocleistantoxin trong SKĐ của dung dịch thử trên tổng diện tích của tất cả các pic trên SKĐ (trừ pic dung môi và tất cả các pic có S/N < 2).

2.5. Bảo quản

NLTLC được đóng ống thủy tinh trung tính màu nâu 10 mL.
Bảo quản ở nhiệt độ từ 2-8°C. Tránh ánh sáng.

PHỤ LỤC 2.18. PHIẾU KIỂM NGHIỆM ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÍ CỦA NTLCC ĐỊNH TÍNH 7',8'-DEHYDROCLEISTANTOXIN



CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc



PHIẾU KIỂM NGHIỆM

(Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đơn này)

Số: 440.043

Mẫu để kiểm nghiệm: Nguyên liệu thiết lập chuẩn 7',8'-dehydrocleistantoxin
Nơi sản xuất: Trường Đại học Dược Hà Nội
Số lô, ngày SX: Lô SX: 7',8'-dehydrocleistantoxin
 Ngày SX: Không có thông tin
Hạng dùng: Không có thông tin Số BK: Không có thông tin
Người và nơi gửi mẫu: Trường Đại học Dược Hà Nội
Yêu cầu KN (ghi rõ nội dung, số, ngày, tháng, năm của công văn hay giấy cơ bản theo Định tính, tạp chất liên quan, độ tinh khiết sắc ký)
Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 16/09/2018 Số đăng ký KN: 490.1027
Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quy
Thử theo: Tiêu chuẩn m số 99, kén
Tình trạng mẫu khi nhận và mở niêm phong để kiểm nghiệm:
 Mẫu đóng gói trong lọ nắp kín, nhãn rõ ràng.

	CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG	KẾT QUẢ	YÊU CẦU
1.	Tinh chất	Đúng	Đạt sắc tinh màu trắng, dễ tan trong dimethylmethen, chloroform, acetoneitoli; rất khó tan trong methanol và nước.
2.	Định tính Phương pháp HPLC	Đúng	Sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho pic rõ thời gian lưu và phổ UV-VIS tương ứng với thời gian lưu và phổ UV-VIS của pic 7',8'-dehydrocleistantoxin thu được từ sắc ký đồ dung dịch chuẩn
3.	Tạp chất liên quan Phương pháp HPLC Tổng tạp đơn tại bước sóng 267 nm	Đạt (Tạp đơn lớn nhất = 3,5%)	Không quá 5,0%
	Tổng tạp đơn tại bước sóng 286 nm	Đạt (Tạp đơn lớn nhất = 3,0%)	
	Tổng tạp tại bước sóng 267 nm	Đạt (5,6%)	
	Tổng tạp tại bước sóng 286 nm	Đạt (8,0%)	
4.	Độ tinh khiết sắc ký Phương pháp HPLC Tại bước sóng 267 nm	Đạt (94,4%)	Không thấp hơn 90,0%

Các hệ thống, các kết quả này chỉ không có giá trị nếu không có sự đồng ý của Văn Phòng Kiểm nghiệm Dược Trung ương

NYN/ĐM/03.02 - Trang 1/2

PHỤ LỤC 3. XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ LIGNAN TRONG QUẢ CHÀ CHÔI

PHỤ LỤC 3.1. XÁC ĐỊNH ĐỘ ẨM TRONG MẪU QUẢ CỦA CHI CLEISTANTHUS

Tên	Mẫu	Khối lượng bi (g)	Khối lượng chế phẩm (g)	Khối lượng bi + CP (g) trước sấy	Khối lượng bi + CP (g) sau sấy	% hàm ẩm	
Quả cây 1	Thử 1	53,4862	0,5044	53,9906	53,9453	8,98	
	Thử 2	50,3071	0,5005	50,8076	50,7621	9,09	
	Thử 3	37,3604	0,5024	37,8628	37,8174	9,04	
	TB						9,04
	RSD (%)						0,61
Quả cây 2	Thử 1	49,4254	0,5005	49,9259	49,8816	8,85	
	Thử 2	51,2886	0,5027	51,7913	51,746	9,01	
	Thử 3	38,8290	0,5033	39,3323	39,2871	8,98	
	TB						8,95
	RSD (%)						0,95

Quả cây 1: Quả cây Chà chôi hay Cọc rào (*Cleistanthus tonkinensis*, Jabl. Euphorbiaceae) có tên đồng vật là: Cách hoa dạng Chanh châu (*Cleistanthus sageretoides* Merr. Euphorbiaceae) được thu hái ngày 16/06/2018, tại Đại từ-La Bằng-Thái Nguyên, kí hiệu ĐL 2338 (L.B-TN).

Quả cây 2: Quả cây Cách hoa *eberhardtii* (*Cleistanthus eberhardtii*, Gagn. Euphorbiaceae), được thu hái ngày 08/06/2018 tại Phú lộc-Thừa Thiên Huế, kí hiệu ĐL 2151 (PL-TTH)

PHỤ LỤC 3.2. KẾT QUẢ KHẢO SÁT LỰA CHỌN DUNG MÔI CHIẾT XUẤT

Dung môi		Khối lượng DL (g)	Thể tích d. môi	Diện tích pic Cleisindoside D	HL Cleisindoside D (%)	Diện tích pic Cleistantoxin	HL Cleistantoxin (%)
CH ₂ Cl ₂ -Me (3-1)	T1	11	20	233.304	0,136	1.497.776	0,483
CH ₂ Cl ₂ -Me (3-1)	T2	0,4039	20	236.855	0,139	1.499.065	0,488
CH ₂ Cl ₂ -Me (3-1)	T3	0,3995	20	235.152	0,140	1.514.328	0,498
	TB				0,139		0,490
	SD				0,002		0,008
	RSD%				1,498		1,579
CH ₂ Cl ₂ -Me (1-1)	T1	0,4186	20	261.068	0,148	1.633.222	0,513
CH ₂ Cl ₂ -Me (1-1)	T2	0,4125	20	254.515	0,147	1.588.960	0,506
CH ₂ Cl ₂ -Me (1-1)	T3	0,4147	20	258.619	0,148	1.635.411	0,518
	TB				0,148		0,513
	SD				0,001		0,006
	RSD%				0,617		1,176
CH ₂ Cl ₂ -Me (1-3)	T1	0,3981	20	294.493	0,176	1.551.557	0,512
CH ₂ Cl ₂ -Me (1-3)	T2	0,3907	20	297.870	0,181	1.517.405	0,511
CH ₂ Cl ₂ -Me (1-3)	T3	0,3984	20	298.061	0,178	1.552.057	0,512
	TB				0,178		0,512
	SD				0,003		0,001
	RSD%				1,527		0,19
MeOH	T1	0,3996	20	338.810	0,202	1.562.234	0,514
MeOH	T2	0,3942	20	326.593	0,197	1.534.411	0,512
MeOH	T3	0,3957	20	329.128	0,198	1.534.186	0,510
	TB				0,199		0,512
	SD				0,002		0,002
	RSD%				1,240		0,42
MeOH:H ₂ O(9-1)	T1	0,3933	20	347.753	0,211	1.852.683	0,524
MeOH:H ₂ O(9-1)	T2	0,3901	20	347.477	0,213	1.847.337	0,527
MeOH:H ₂ O(9-1)	T3	0,3965	20	345.536	0,208	1.859.502	0,522
	TB				0,211		0,524
	SD				0,002		0,003
	RSD%				1,111		0,486
MeOH-H ₂ O (3-1)	T1	0,3903	20	348.491	0,213	1.839.051	0,524
MeOH-H ₂ O (3-1)	T2	0,4090	20	363.830	0,212	1.896.664	0,516
MeOH-H ₂ O (3-1)	T3	0,4002	20	349.367	0,208	1.840.146	0,512
	TB				0,211		0,517
	SD				0,003		0,006
	RSD%				1,204		1,244
MeOH-H ₂ O (1-1)	T1	0,4073	20	360.090	0,211	1.835.736	0,502
MeOH-H ₂ O (1-1)	T2	0,4064	20	358.376	0,211	1.835.741	0,503
MeOH-H ₂ O (1-1)	T3	0,4058	20	363.473	0,214	1.851.288	0,508
	TB				0,212		0,504
	SD				0,002		0,003
	RSD%				0,838		0,647
EtOH 96 ^o	T1	0,4012	20	205.069	0,122	1.381.813	0,453
EtOH 96 ^o	T2	0,3873	20	190.887	0,117	1.384.626	0,470
EtOH 96 ^o	T3	0,4023	20	204.395	0,121	1.406.545	0,460
	TB				0,120		0,461
	SD				0,002		0,009
	RSD%				1,941		1,877

SKD KHẢO SÁT DUNG MÔI CH₂Cl₂-MeOH (3-1)

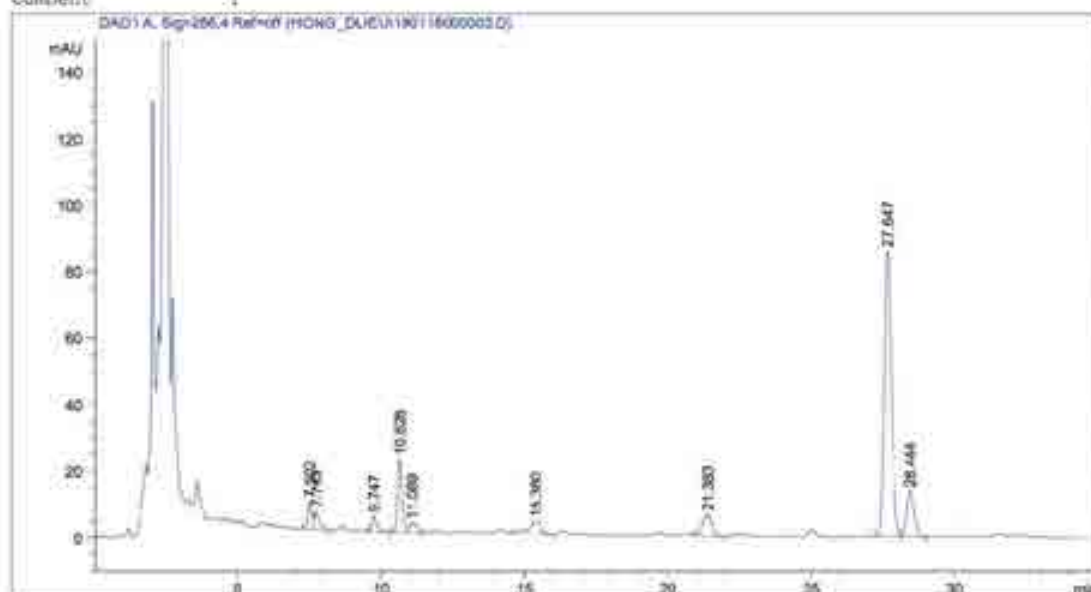
Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIEU\16000003.D
Sample Name: QUA SIEU AM CH2Cl2-MeOH 3-1 THU 2

Acq. Operator : HONG PT
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 3
Injection Date : 1/16/2019 2:36:23 PM Inj Volume : 20.0 µl
Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 1/14/2019 11:49:03 AM
Method Info. : Nguyen Lam Hong

Sample Info : QUA SIEU AM CH2Cl2-MeOH 3-1 THU 2
COT C18 (250 X4,6 mm) 5 µm)
GRA COMG: ACN-H2O 0' 30-70 V=1,0 mL/phut; 12' 38-62 V=
1,5 mL/phut; 13' 38-62 V=1,2 mL/phut; 30' 50-50 V=1
,2 mL/phut; 31' 30-70 V=1,0 mL/phut; STOPTIM 39' v=20
mL.

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column (#)
Column Description : Inertsil ODS-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : autoID-1A
Product# : 993967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 250.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 65.0 µL
Injections : 1317
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :



Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG DLIRU\190116000003.D
Sample Name: QUA SIEU AM CH2CL2-MUGH 3-1 THU 2

Area Percent Report with Performance

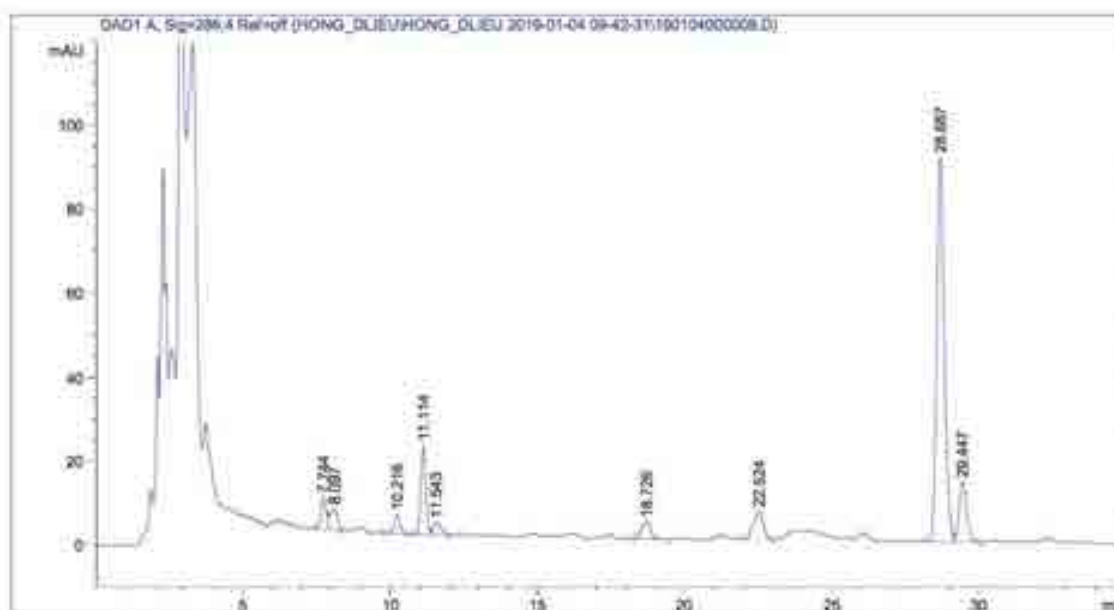
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.4 Ref-off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ivity
7.502	2.61	84.13652	8.41152	0.89	0.1656	11372	-	-
7.743	2.73	78.40336	5.83718	0.60	0.2081	7668	0.76	1.04
9.747	3.69	63.27024	4.93874	0.64	0.1711	17978	6.21	1.35
10.626	4.12	236.85451	22.38741	0.83	0.1600	24442	3.12	1.11
11.089	4.34	54.90538	2.98037	0.63	0.3067	7242	1.17	1.05
15.380	5.40	114.16827	3.84830	1.49	0.3967	8329	7.17	1.48
21.383	9.29	140.23268	6.23898	1.29	0.3600	19541	9.32	1.45
27.647	12.31	1499.06583	85.94164	0.82	0.2676	59114	11.73	1.32
28.444	12.69	240.74583	13.74960	0.82	0.2711	60968	1.74	1.03

*** End of Report ***

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DIEU\HONG_DIEU 2019-01-04 09-42-31\190104000008.D
 Sample Name: QUA/SA CH2Cl2-MeOH 1-1 THU 3



Area Percent Report with Performance

Multipliers: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Sym.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
1.744	2.11	102.14489	3.72786	0.78	0.2120	7394	-	-
8.097	2.25	74.49727	5.09006	1.20	0.2702	4976	0.86	1.07
10.216	3.10	66.56590	4.66578	1.02	0.2067	13543	5.22	1.38
11.114	3.46	258.61917	21.35507	0.94	0.1893	19081	2.67	1.12
11.543	3.63	50.83429	2.84694	0.56	0.3089	7739	1.01	1.05
18.726	6.51	98.90070	4.30667	1.27	0.3333	17482	13.14	1.79
22.524	8.04	150.26970	6.75810	1.35	0.3600	21688	6.44	1.23
28.687	10.91	1635.41101	91.60767	0.80	0.2733	61014	11.43	1.31
29.447	10.81	260.50043	14.46026	0.81	0.2756	63257	1.63	1.03

*** End of Report ***

SKD KHẢO SÁT DUNG MÔI MeOH

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIEU\190122000006.5

Sample Name: QUA SIEU AM MeOH THU 2

Acq. Operator : HONG PT
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 5
Injection Date : 1/22/2019 12:00:57 PM

Inj Volume : 20.0 µl

Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M

Last changed : 1/22/2019 11:50:08 AM by HONG PT
(modified after loading)

Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M

Last changed : 3/4/2019 2:37:46 PM by HUONG
(modified after loading)

Method Info : nguyen lam hong

Sample Info : QUA SIEU AM MeOH THU 2

COT C18 (250 X4,6 mm, 5µm)

0': 30-70, V 1,0 mL/PHUT; 12': 38-62, V 1,5 mL/PHUT; 13':

38-62, V 1,2mL/PHUT; 30': 50-50, V 1,2mL/PHUT; 31': 30-7

0, V 1,0mL/PHUT;

val: 20mL; 286 mm

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertsil ODS-3-C18 Column, 4,6 x 150mm, Sun

Serial# : autoID-15

Product# : 993967-902 Batch# :

Diameter : 4,6 mm Length : 250,0 mm

Particle size : 5,0 µm Void volume : 60,0 %

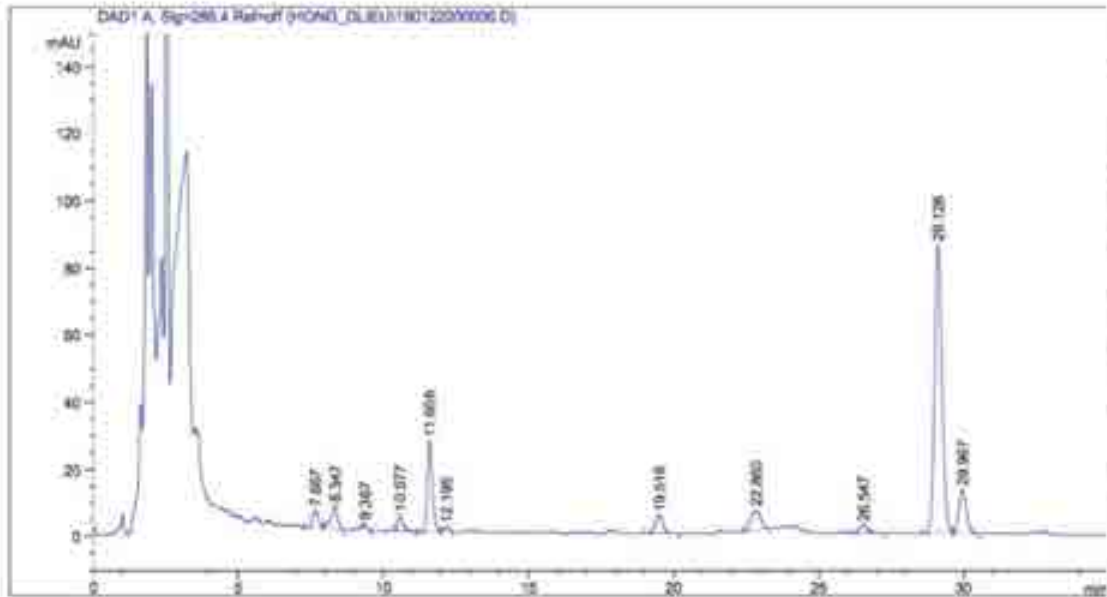
Injections : 1360

Maximum Pressure : 400,0 bar Maximum pH : 9,0

Minimum pH : 2,0

Maximum Temperature: 60,0 °C

Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Sample Amount: : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.4 Ref=off

RetTime [min]	X*	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
7.667	2.68	65.07550	4.95763	0.78	0.2150	7050	-	-
8.347	3.00	104.39816	4.46125	1.49	0.2156	8312	1.98	1.12
9.367	3.31	19.53335	1.87964	0.73	0.1693	17164	3.12	1.16
10.577	4.09	85.55846	4.88786	0.56	0.1778	19607	4.11	1.17
11.608	4.59	326.59354	27.12564	0.83	0.1850	21817	3.34	1.12
12.195	4.87	14.62156	1.34484	0.94	0.1717	27963	1.93	1.08
19.518	8.40	105.51369	5.32079	1.16	0.3033	22933	18.12	1.72
22.860	10.00	138.36592	5.82412	1.27	0.3900	19038	5.68	1.18
26.547	11.78	53.48342	2.56470	0.87	0.3033	42441	6.25	1.18
29.126	13.02	1534.41089	85.74902	0.84	0.2778	60923	5.22	1.11
29.967	13.43	229.62238	13.07067	0.82	0.2733	66602	1.78	1.03

*** End of Report ***

Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAPI A, Sig=266,4 Ref=off

RetTime [min]	N*	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Flates	Resol	Select	
								ion	ivity
7.029	1.82	184.08356	15.74332	0.95	0.1856	11311	-	-	
7.853	2.15	20.04833	1.93236	0.62	0.1500	15194	3.17	1.18	
8.896	2.57	80.48286	6.70203	0.68	0.1756	14224	3.76	1.19	
9.677	2.88	367.47714	31.19768	0.83	0.1653	18973	2.69	1.12	
10.276	3.12	34.80471	3.62210	0.68	0.2444	9789	1.72	1.08	
14.358	4.76	207.47562	6.77439	1.38	0.4667	5242	6.74	1.52	
21.268	7.53	169.47060	6.76768	1.08	0.4000	15663	9.37	1.58	
25.221	9.12	45.61749	2.34458	0.86	0.3067	37475	6.57	1.21	
28.110	10.28	1847.33752	89.69514	0.80	0.3222	43158	3.40	1.13	
28.902	10.59	291.66107	13.93985	0.80	0.3244	43963	1.44	1.03	

*** End of Report ***

Data File D:\CRM2019\1\DATA\HONG ULISU\HONG ULISU 2019-01-24 12-24-21\1901340000009.D
Sample Name: CQA/SA MOON-H2O 2-1 THU 2

Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAPI A. Sig=286,4 Ref=off

RetTime [min]	K'	Area (mAU*s)	Height (mAU)	Symm.	Width (min)	Plates	Resolution	Selectivity
7.027	1.82	182.17477	19.51141	0.97	0.1578	10988	-	-
7.850	2.15	21.03577	1.96361	0.60	0.1500	15186	3.14	1.18
8.889	2.57	78.79247	6.69213	0.71	0.1733	14562	3.78	1.19
8.671	3.88	349.36694	33.34332	0.84	0.1660	19278	2.72	1.12
10.262	3.12	23.42688	2.56138	0.65	0.2422	8940	1.75	1.08
14.227	4.71	208.60014	6.48940	1.40	0.5167	4300	6.14	1.51
21.217	7.51	169.26060	6.83224	1.09	0.3933	16014	9.02	1.60
28.073	10.24	1840.14612	86.90855	0.81	0.3264	61478	11.22	2.37
28.864	10.58	288.70308	12.70570	0.80	0.3267	43261	1.43	1.03

*** End of Report ***

Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
Dilution: 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=288,4 Ref=off

RetTime (min)	k'	Area (nAU*s)	Height (nAU)	Symm.	Width (min)	Plates	Resol ution	Select ivity
6.847	1.75	21.55155	2.43300	2.96	0.1381	14423	-	-
7.049	1.83	190.89537	16.50549	0.72	0.1600	10760	0.81	1.05
7.878	2.16	26.67403	2.21102	0.71	0.1600	13631	3.04	1.18
8.922	2.58	89.17869	8.87641	0.83	0.1750	14409	3.46	1.19
9.703	2.89	338.37595	33.98252	0.85	0.1640	19400	2.71	1.12
10.291	3.13	73.30223	4.10639	0.74	0.2733	7856	1.58	1.08
13.305	5.14	208.04506	8.97860	0.88	0.4500	6408	8.14	1.64
21.298	7.54	168.60733	6.83405	1.10	0.3933	16243	8.35	1.47
25.242	9.13	46.23222	2.41706	0.86	0.3000	33229	6.68	1.21
28.123	10.28	1835.74121	90.10338	0.81	0.3178	43395	5.48	1.13
28.911	10.60	292.01385	14.09471	0.81	0.3200	43222	1.45	1.03

*** End of Report ***

**PHỤ LỤC 3.3. KẾT QUẢ KHẢO SÁT KỸ THUẬT CHIẾT:
CHIẾT SIÊU ÂM, CHIẾT SOXHLET VÀ CHIẾT HỒI LƯU.**

Kỹ thuật chiết		Khối lượng DL (g)	Thể tích d.môi	Diện tích pic Cleisindoside D	HL Cleisindoside D (%)	Diện tích pic Cleistan	HL Cleistantoxin (%)
Chiết siêu âm	T1	0,3933	20	347.753	0,211	1.852.683	0,524
	T2	0,3901	20	347.477	0,213	1.847.337	0,527
	T3	0,3965	20	345.536	0,208	1.859.502	0,522
	TB				0,211		0,524
	SD				0,002		0,003
	RSD%				1,111		
Chiết hồi lưu	T1	1,0092	50	465.699	0,275	1944.700	0,536
	T2	0,9983	50	459.893	0,275	1914.902	0,534
	T3	0,9905	50	448.070	0,270	1867.276	0,525
	TB				0,273		0,532
	SD				0,003		0,006
	RSD%				1,099		1,153
Chiết Soxhlet	T1	1,0163	50	474.311	0,279	2.042.098	0,559
	T2	1,0056	50	474.970	0,282	2.007.980	0,556
	T3	1,0097	50	475.667	0,281	2.034.151	0,561
	TB				0,281		0,558
	SD				0,002		0,003
	RSD%				0,63		0,46

Data File D:\CHECK3\1\DATA\HONG OLIGO\HONG OLIGO 2019-01-29 09-42-43\190125000008.D
Sample Name: QUA HSI 10U MeCN-H2O 9-1 INU 2

Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
See Multiplier & Dilution Factor with ISSTM

Signal 1: DAD1 A, Sig=298, & Ref=off

RetTime (min)	k'	Area (mAU*s)	Height (mAU)	Symm.	Width (min)	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
7.037	1.82	178.03323	13.34668	1.11	0.1778	8672	-	-
8.900	2.57	97.09113	6.56407	0.95	0.1956	11477	5.87	1.41
9.678	2.88	439.89368	40.75335	0.99	0.1760	16761	2.48	1.12
10.261	3.12	75.32028	4.04962	0.76	0.2867	7098	7.48	1.08
14.348	4.74	70.50042	2.73180	1.82	0.3154	11453	7.97	1.53
15.376	5.17	220.47386	7.95890	1.15	0.4367	6867	1.61	1.08
21.251	7.33	174.96890	7.16996	1.10	0.3867	16697	8.38	1.45
25.186	9.10	56.87923	2.87322	0.88	0.3100	36373	6.67	1.21
28.073	10.26	1914.90173	93.52044	0.82	0.3200	42641	5.38	1.13
28.862	10.98	301.05952	14.44397	0.82	0.3244	43838	1.44	1.03

*** End of Report ***

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_OLEU\HONG_OLEU_2019-01-25 18-27-04\1901250000023.D
Sample Name: QUA EXHLET MeOH-H2O 9-1 TMU 3

Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
Dilution: 1.0000
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A. Sig786.4 Ref-off

RetTime (min)	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Revol	Select ion	ivity
7.033	1.82	208.03709	14.73944	1.07	0.1800	8454	-	-	
8.902	2.37	101.37848	6.88840	0.85	0.1978	11231	5.81	1.41	
9.683	2.88	475.66748	42.23715	0.84	0.1750	16968	2.46	1.12	
10.273	3.12	75.29588	4.19901	0.77	0.2800	7455	1.52	1.08	
15.020	5.03	219.71716	7.85543	1.16	0.4467	6263	7.68	1.61	
21.209	7.51	184.93202	7.34633	1.06	0.4000	15578	8.58	1.69	
25.165	9.09	55.20704	2.77680	0.80	0.3133	35735	6.52	1.21	
26.050	10.25	2034.15063	96.61336	0.78	0.3289	40302	3.28	1.13	
26.843	10.57	318.07697	14.39262	0.78	0.3289	42614	1.42	1.03	

*** End of Report ***

SKĐ CÁN SAU CHIẾT SOXHLET

Data File: D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIEU\190305000002.D
Sample Name: DICH SAU CHIET 1

Acq. Operator : HONG DLIEU
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 2
Injection Date : 3/5/2019 10:12:20 AM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 3/5/2019 8:23:21 AM by HONG DLIEU
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 3/4/2019 2:37:46 PM by HUONG
(modified after loading)
Method Info : Nguyen Lam Hong

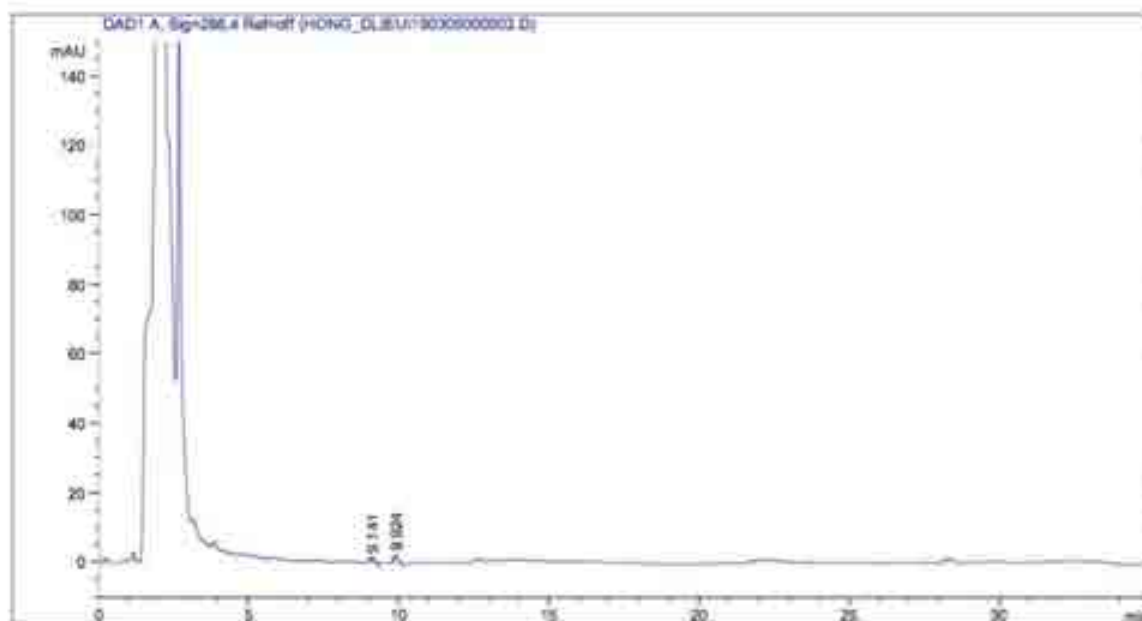
Sample Info : DICH SAU CHIET 1
COT INHERSIL C18 (250x4,6 mm, Secom)
PRA DUNG ACH-S20 THUONG TRINH GRADIENT: 2': 30-70, V=1,
0 mL/ phút, 12': 38-62, V=1, 5mL/ phút, 13': 38-62, V=1,
0mL/ phút, 30': 50-50, V=1, 0 mL/ phút, 31': 30-70, V=1,
0 mL/ phút, SLOPTIME 55 PHUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Install 008-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : 40010-15
Product# : 993967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
Injections : 1578
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DL12U\180303000002.D
Sample Name: DICH BAN CHUY 1



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.4 Ref=off

RetTime [min]	X'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
9.141	2.67	12.84332	1.60859	0.82	0.1293	27662	-	-
9.924	2.98	17.03810	2.12930	0.86	0.1350	25947	3.48	1.12

*** End of Report ***

PHỤ LỤC 3.4. THẨM ĐỊNH PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG MỘT SỐ LIGNAN TRONG QUẢ CỦA CHI CÁCH HOA

ĐỘ ĐẶC HIỆU MẪU TRẮNG

Data File D:\CHENH2\1\DATA\HONG_CLIYU1190517000003.D
Sample Name: MAU TRANG

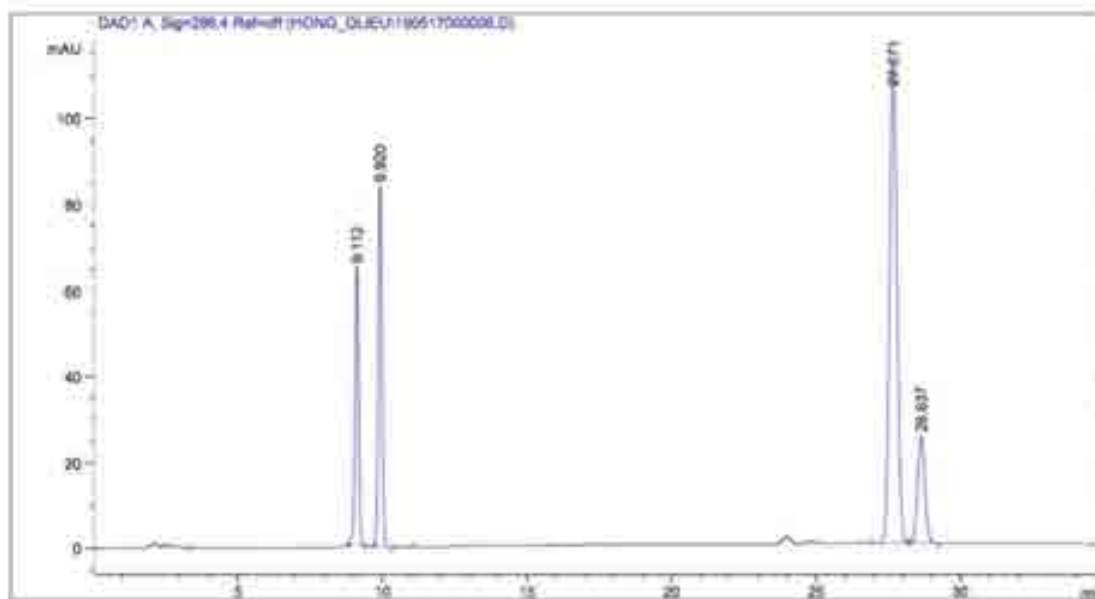


Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
See Multiplier & Dilution Factors with ISYDe

Signal: L1 DAD1 A, Sig=286.4 Ref=off

*** End of Report ***



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Sample Amount: 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with 15706

Signal 1: DAD A, Sig=286,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*w]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Revol	Select
							ution	ivity
9.112	2.47	562.31849	64.66356	0.98	3.1350	28222	-	-
9.920	2.78	736.00812	84.11299	0.90	0.1367	29204	3.49	1.12
27.671	9.35	1969.24805	111.37077	0.94	0.2767	53410	80.46	3.43
28.637	9.91	436.17421	24.82578	0.92	0.2756	58629	2.06	1.04

*** End of Report ***

DUNG DỊCH CHUẨN ĐƠN CLEISINDOSIDE D

Date File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DIEU\190517000007.D
Sample Name: CHUAN DON CLEISINDOSID.D

Acq. Operator : HONG
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 16
Injection Date : 5/17/2019 1:03:27 PM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DIEU.M
Last changed : 5/17/2019 1:00:59 PM by HONG
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DIEU.M
Last changed : 5/17/2019 1:02:10 PM by HONG
(modified after loading)
Method Info : nguyen lam hong

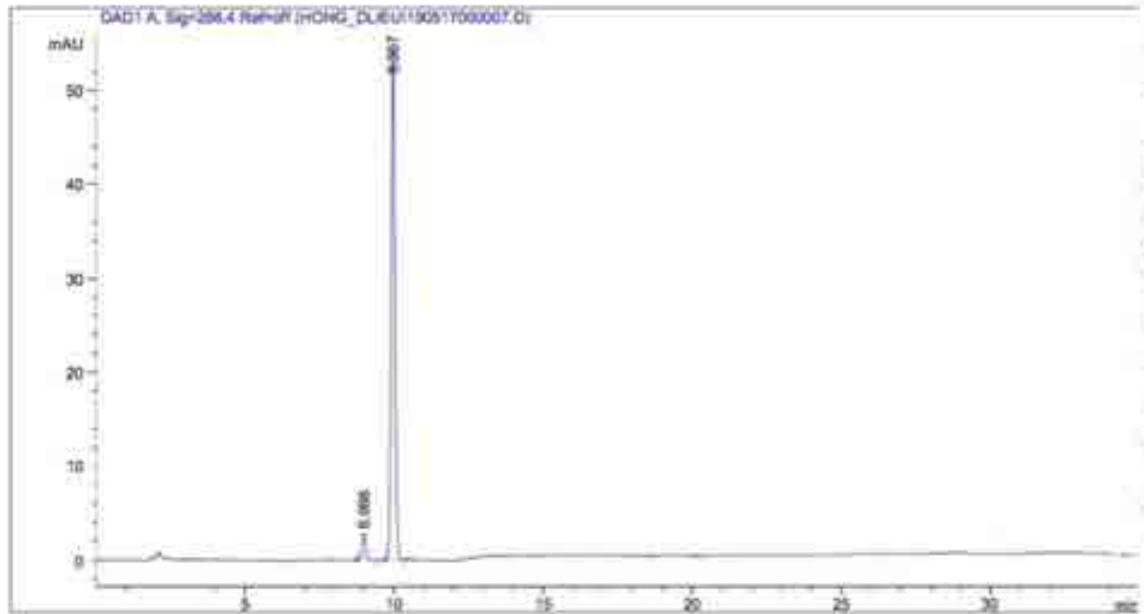
Sample Info : CHUAM DON CLEISINDOSID D
COT INNERDIL C18 (250x4.6 mm, 5µm)
PMA DONG ACK-R20 CHUONG TRINH GRADIENT: 0': 30-70, V=1,
0 ml/ phut, 12': 38-62, V=1, 5ml/ phut, 13': 38-62, V=1,
0ml/ phut, 30': 50-50, V=2.0 ml

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertail ODB-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : autoID-15
Product# : 993967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 250.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 µl
Injections : 2439
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIN\190517000001.D
Sample Name: CHUAN DON CLEISTODOSID D



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Selectivity
9.988	2.43	25.37041	2.92026	0.87	0.1367	24669	-	-
9.967	2.80	472.04062	53.26180	0.91	0.1375	29123	4.23	1.15

*** End of Report ***

DUNG DỊCH CHUẨN ĐƠN CLEISTANTOXIN

Date File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_D\120\190517000008.D
Sample Name: CHUAN CLEISTANTOXIN 100 PPM

Acq. Operator : HONG
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 17
Injection Date : 5/17/2019 2:32:33 PM Inj Volume : 20.0 µl

Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_01120.M
Last changed : 5/17/2019 2:29:11 PM by HONG
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_01120.M
Last changed : 5/17/2019 4:57:20 PM by HONG
(modified after loading)
Method Info : nguyen.lam.hong

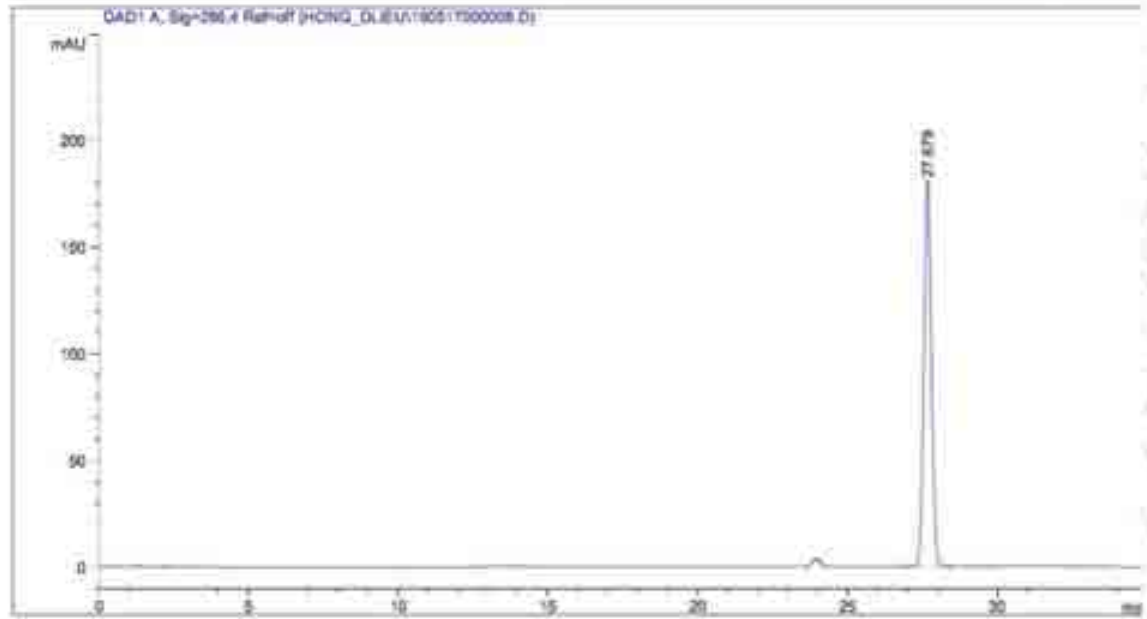
Sample Info : CHUAN CLEISTANTOXIN 100 PPM
COT INNEREIL C18 (250x4,6 mm, 5µm)
PHA DONG ACM-R20 CHUONG TRINH GRADIENT: 0': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, 12': 38-62, V=1,0mL/ phut, 13': 38-62, V=1,
0mL/ phut, 30': 50-50, V=1,0 mL

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertsil C18-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : autoID-15
Product# : 993967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 80.0 %
Injections : 2436
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLEU\190517000008.D
Sample Name: CHUAN CHRISTANTOXIN 100 PPM



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
27.679	8.55	3144.44897	180.87939	0.94	0.2638	58285	-	-

*** End of Report ***

DUNG DỊCH CHUẨN ĐƠN CLEISINDOSIDE A

Date File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIEU\190337000010.D
Sample Name: CHUAN CLEISINDOSID C

Acq. Operator :
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 14
Injection Date : 5/17/2019 3:49:38 PM Inj Volume : 8.0 µl

Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 5/17/2019 3:46:48 PM
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 5/17/2019 3:09:03 PM by HONG
(modified after loading)
Method Info : nguyen lam hong

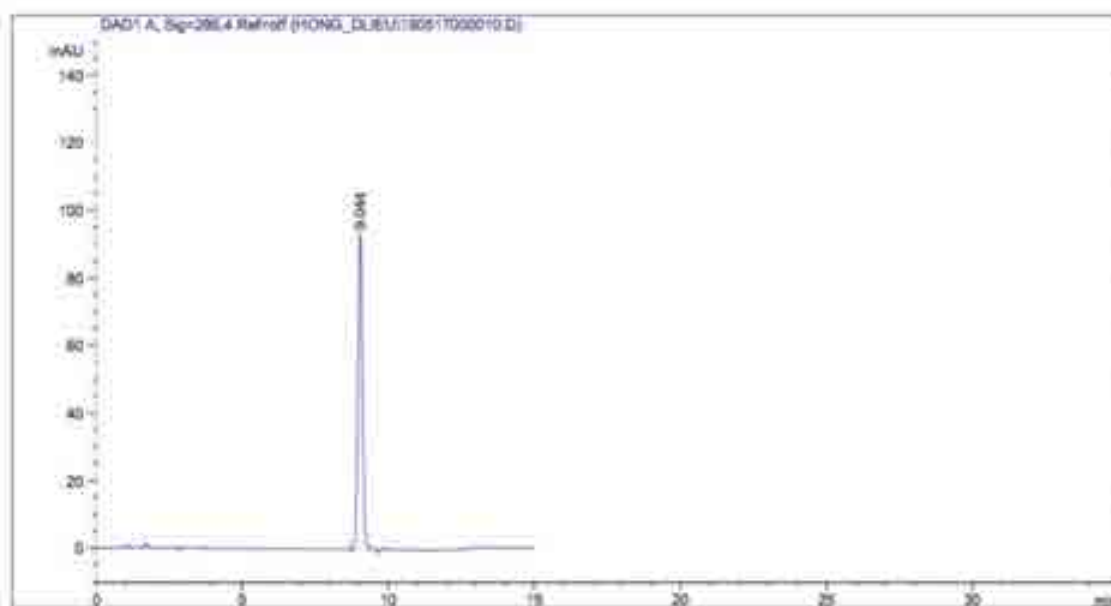
Sample Info : CHUAN CLEISINDOSID C
COT INHERIBIL C18 (250x4,6 mm, 5µm)
PRA DONG ACS-R20 CHONG TRINH GRADIENT: 0': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, 12': 38-62, V=1, 5mL/ phut, 13': 38-62, V=1,
0mL/ phut, 30': 50-50, V=1, 0 mL/ phut, 31': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, STOP TIME 35 PHUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertsil ODS-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : autoID-15
Product# : 993967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 250.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
Injections : 2352
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :

Data File D:\CHEM35\1\DATA\HONG_DLIEU\190517000010.D
Sample Name: CHEM CLS131NCO010 C



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 (ug/ul) (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sp=286.4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area (mAU*s)	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Repl ation	Select ivity
9.044	2.83	994.00236	93.69262	0.95	0.1610	17488	-	-

*** End of Report ***

DUNG DỊCH CHUẨN ĐƠN 7',8'- DEHYDROCLEISTANTOXIN

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIKH\190517000011.D
Sample Name: CHUAN 7,8-DIHYDRO CLEISTANTOXIN

Acq. Operator :
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 15
Injection Date : 5/17/2019 4:09:45 PM Inj Volume : 20.0 µl

Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIKH.M
Last changed : 5/17/2019 4:09:30 PM
(modified after loading)

Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIKH.M
Last changed : 5/17/2019 3:53:53 PM by HONG
(modified after loading)

Method Info : nguyen lam hong

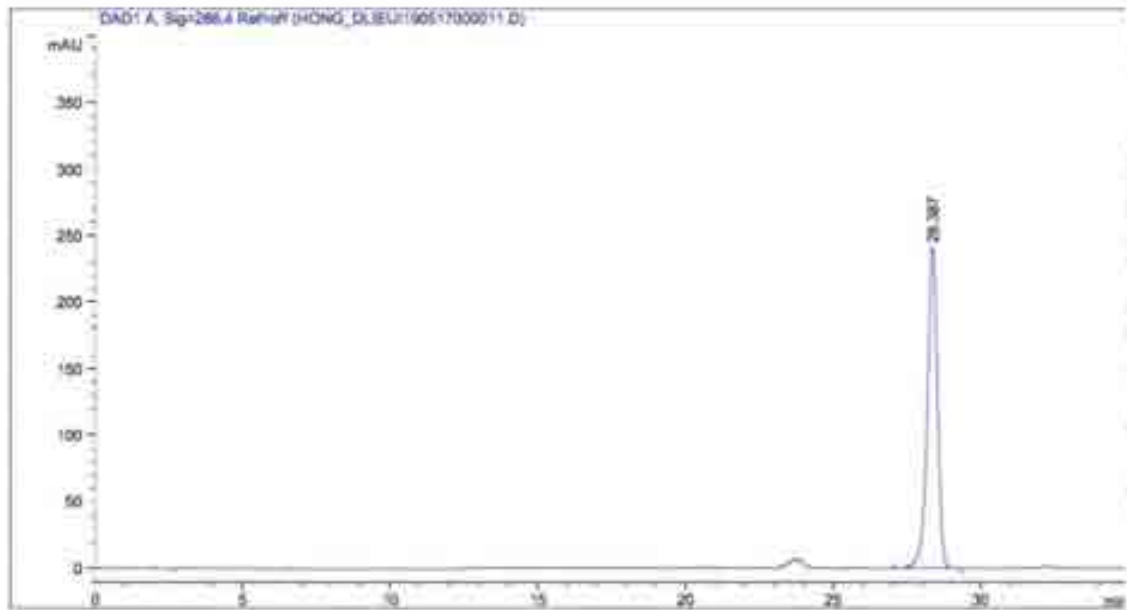
Sample Info : CHUAN 7,8-DIHYDRO CLEISTANTOXIN
COT INVERSIL C18 (250x4,6 mm, 5µm)
PXA COSY ACN-H2O CHUNG TRINH GRADIENT: 0': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, 12': 35-62, V=1,3mL/ phut, 13': 35-62, V=1,
0mL/ phut, 30': 50-50, V=1,0 mL/ phut, 31': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, STOP TIME 35 PHUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertail C18-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : autoID-13
Product# : 993967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 230.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 µl
Injections : 2393
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :

Data File D:\CHRM32\1\DATA\HONG_OLEU\190517000011.D
Sample Name: CHUAN 7, 8-DIHYDRO CLEISTANTOXIN



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.6 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Revol	Select
								ivity
28.387	10.39	5722.52734	241.52139	1.16	0.3494	36570	-	-

*** End of Report ***

SKD ĐỊNH TÍNH QUẢ CÂY C. EBERDHARDT

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIEU\190517000012.D
Sample Name: MAU QUA XANH CAY 2 2018

Acq. Operator :
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 3
Injection Date : 5/17/2019 6:49:54 PM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 5/17/2019 6:45:56 PM
(modified after loading)
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 5/17/2019 6:45:41 PM by HONG
(modified after loading)
Method Info : nguyen iam hong

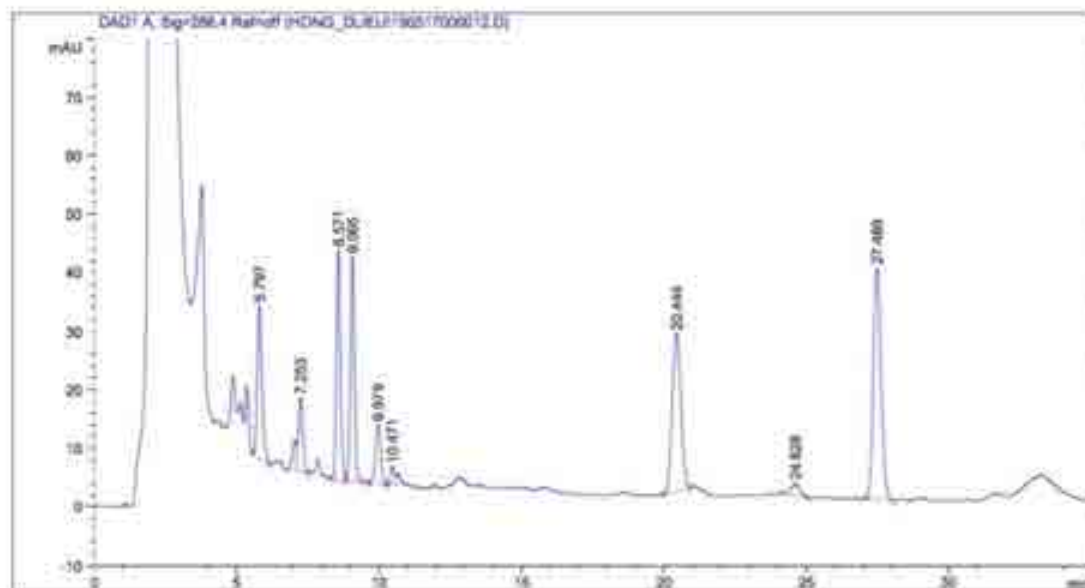
Sample Info : MAU QUA XANH CAY 2 2018
COT IMMERSED C18 (250x4.6 mm, 5um)
PWA DONG ACN-H2O CHUONG TRINH GRADIENT: 0': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, 12': 30-62, V=1,3mL/ phut, 13': 30-62, V=1,
0mL/ phut, 30': 30-30, V=1,0 mL/ phut, 31': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, STOP TIME 35 PHUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertsil C18-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5um
Serial# : autoID-15
Product# : 993967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 80.0 %
Injections : 2194
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum psi : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :

Data File D:\CHEM12\1\DATA\NONG\LINK1192117000012.D
 Sample Name: MAU OJA XANH CAY 2 2018



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
 Dilution: 1 1.0000
 Sample Amount: 1 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
5.797	1.33	309.16583	25.97827	0.78	0.1844	5474	-	-
7.253	1.91	148.05933	12.69959	1.06	0.2888	8167	4.58	1.44
8.071	2.84	389.15402	39.35687	0.89	0.3333	17319	4.93	1.28
9.065	2.64	392.74677	38.32435	0.87	0.1567	18550	1.87	1.08
9.979	3.00	133.22468	10.20331	1.05	0.2080	12751	2.95	1.14
10.471	3.20	32.21904	3.14651	0.87	0.1994	15287	1.42	1.07
20.444	7.30	875.04504	27.01743	0.97	0.3367	20432	21.88	2.25
24.628	8.88	46.48991	2.10122	1.01	0.3567	24609	7.09	1.23
27.489	10.03	747.34955	39.51800	0.85	0.2967	47571	5.15	1.13

*** End of Report ***

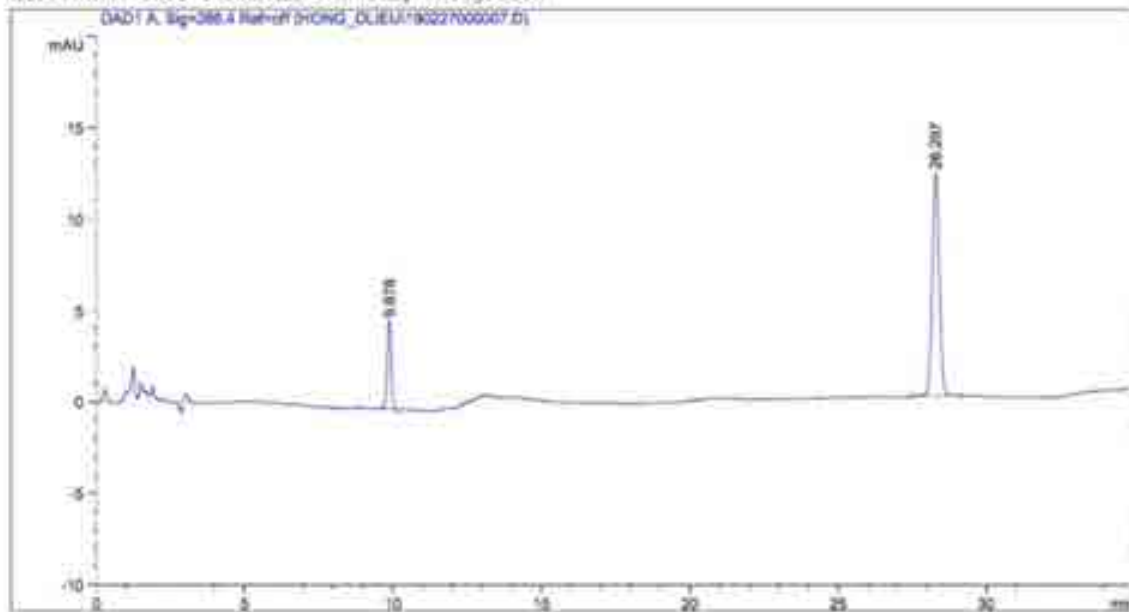
ĐƯỜNG CHUẨN

Date File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_ULIEU\190227000007.D
Sample Name: C CHUAN NH 10,04

Acq. Operator : HONG ULIEU
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 15
Injection Date : 2/27/2019 2:16:24 PM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_ULIEU.M
Last changed : 2/27/2019 2:15:05 PM by HONG ULIEU
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_ULIEU.M
Last changed : 2/27/2019 6:02:36 PM by HONG
(modified after loading)
Method Info : nguyen lam hong

Sample Info : C CHUAN NH 10,04
COT INORGANIC C18 (250x4,6 mm, 5µm)
PHA DONG ACH-H2O CHUONG TRAIN GRADIENT, 2': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, 12': 38-62, V=1, 5mL/ phut, 13': 38-62, V=1,
0 mL/ phut, 30': 50-50, V=1,0 mL/ phut, 31': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, STOPPING 35 PHUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: 1: 1.0000
Dilution: 1: 1.0000
Sample Amount: 1: 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLISU\190227000007.D
Sample Name: C CHAN BB 10,08

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	9.878	BB	0.1481	43.36085	4.80615	18.4414
2	28.297	BB	0.2555	200.61240	12.19673	81.5586

Totals : 245.97325 17.00288

*** End of Report ***

Date File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIEU\190227005008.D
Sample Name: C CHUAN HH 50,0%

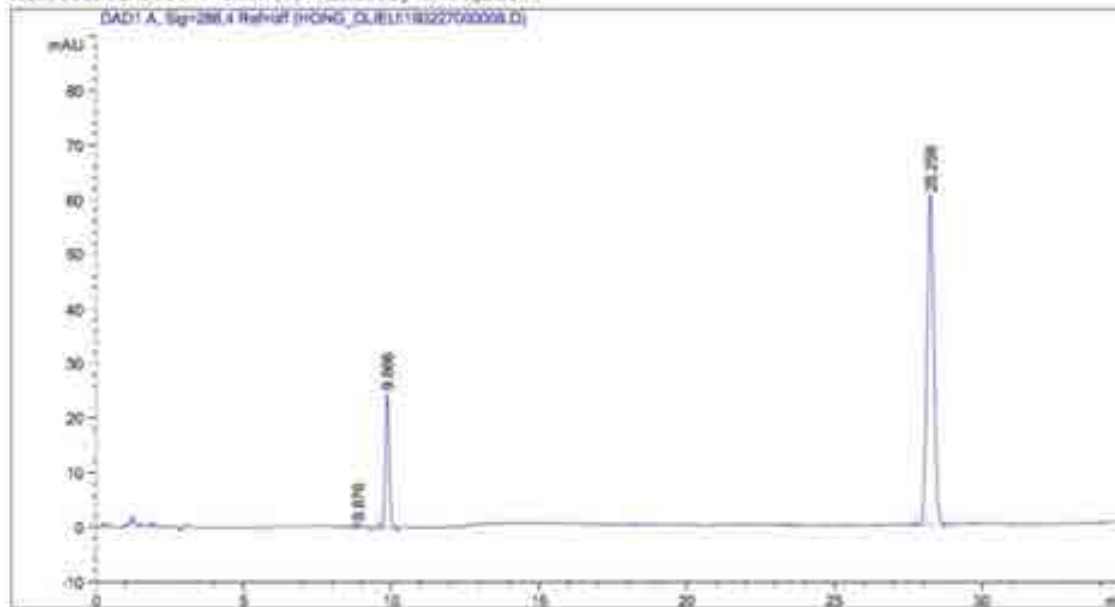
Acq. Operator : HONG ELIEU
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 16
Injection Date : 2/27/2019 2:54:04 PM Inj Volume : 20.0 µl

Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 2/27/2019 2:52:42 PM by HONG ELIEU
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 2/27/2019 6:03:55 PM by HONG

(modified after loading)
Method Info : Nguyen lam hong

Sample Info : C CHUAN HH 50,0%
COT INHIBASIL C18 (250x4,6 mm, 5µm)
PNA DONU ACS-H2O CHONG TRINH GRADIENT: 0': 30-70. V=1,
0 mL/ phut. 12': 30-62. V=1,5mL/ phut. 13': 30-62. V=1,
0mL/ phut. 30': 50-50. V=1,5 mL/ phut. 31': 30-70. V=1,
0 mL/ phut. STOP TIME 35 PHUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: 1 1.0000
Dilution: 1 1.0000
Sample Amount: 1 1.00000 [ug/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with IRTM

Data File D:\CHEM32\1\DATA\NONG_DLIEN\190227000008.D
Sample Name: C-CHEAN HH 50,01

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [nAU*s]	Height [nAU]	Area %
1	8.876	BB	0.1608	4.86298	4.47442e-1	0.4050
2	9.866	BB	0.1470	227.24167	24.33182	19.9249
3	28.258	BB	0.2518	968.64917	60.18538	80.6701

Totals : 1200.75381 84.94864

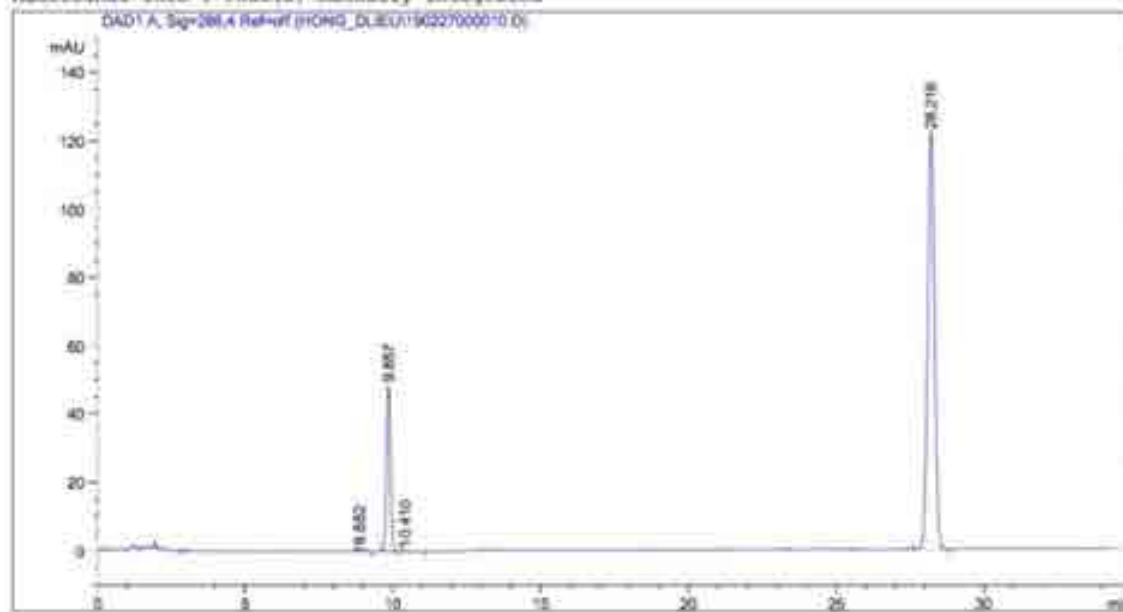
*** End of Report ***

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIEU\190227000010.D
Sample Name: C CHUAN NH 100,04

Acq. Operator : HONG DLIEU
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 17
Injection Date : 2/27/2019 9:09:44 PM Inj Volume : 25.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 2/27/2019 9:08:55 PM by HONG DLIEU
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 2/27/2019 5:35:30 PM by HONG
(modified after loading)
Method Info : Nguyen Lam Hong

Sample Info : C CHUAN NH 100,04
COT INNOVARSIL C18 (250x4.6 mm, 5µm)
PXA DONG ACH-220 CHUONG TRINH GRADIENT: 0': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, 12': 38-62, V=1, 5mL/ phut, 13': 38-62, V=1,
0mL/ phut, 30': 50-50, V=1, 0 mL/ phut, 31': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, STOP TIME 35 PHUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By	:	Signal	
Multiplier:	:	1.0000	
Dilution:	:	1.0000	
Sample Amount:	:	1.00000	(ng/µl) (not used in calc.)

Use Multiplier & Dilution Factor with ISIDE

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIEU\130227000010.D
Sample Name: C CHDAM BH 100.0%

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.862	BH	0.1773	11.24439	9.27222e-1	0.4607
2	9.857	BH	0.1483	459.28000	48.87478	18.8171
3	10.410	BH	0.2008	3.04649	2.18259e-1	0.1248
4	28.216	BH	0.2520	1967.18323	122.04766	80.5974

Totals : 2440.75411 171.78770

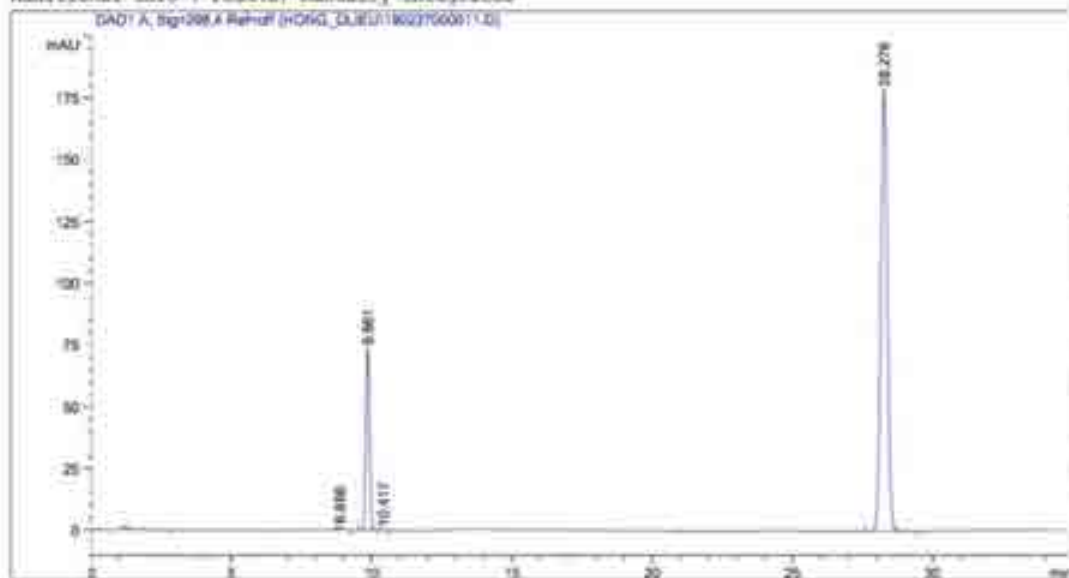
*** End of Report ***

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLEU\1602766001.D
Sample Name: U CHUAN NH 150,01

Acq. Operator : HONG DLEU
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 18
Injection Date : 2/27/2019 4:47:28 PM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLEU.M
Last changed : 2/27/2019 4:48:01 PM by HONG DLEU
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLEU.M
Last changed : 2/27/2019 5:54:51 PM by HONG
(modified after loading)
Method Info : nguyen lam hong

Sample Info : U CHUAN NH 150,01
COT INHERSIL C18 (250µm, 4 µm, 5mm)
PMA DONG ACH-H2O CHUONG TRINH GRADIENT: 0': 30-70. V=1,
0 mL/ phut, 12': 38-62. V=1,5mL/ phut, 13': 38-62. V=1,
5mL/ phut, 32': 50-50. V=1,0 mL/ phut, 31': 30-70. V=1,
0 mL/ phut, STOP TIME 35 PHUT

Additional Info : Peaks manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with IRTDs

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_ULISE\190227000011.D
Sample Name: C CHUAN HM 150,0%

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.866	HR	0.1496	13.06858	1.36607	0.3654
2	9.861	HR	0.1470	488.05017	73.61286	19.2382
3	10.417	HR	0.1324	1.87931	2.32224e-1	0.0525
4	28.276	HR	0.2519	2873.47461	178.45878	80.3438

Totals : 3576.47267 253.66894

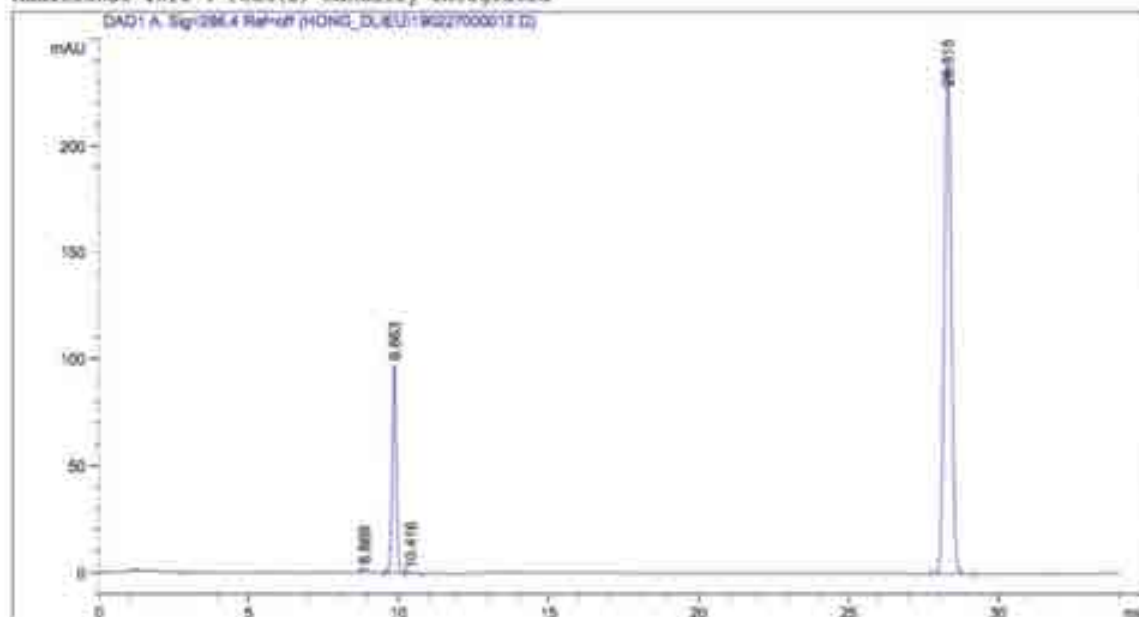
*** End of Report ***

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIU\190227000012.D
Sample Name: C CHUAN NH 300,04

Acq. Operator : HONG DLIU
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 19
Injection Date : 2/27/2019 5:25:06 PM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIU.M
Last changed : 2/27/2019 5:23:46 PM by HONG DLIU
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIU.M
Last changed : 2/27/2019 5:35:57 PM by HUONG
(modified after loading)
Method Info : nguyen lam hong

Sample Info : C CHUAN NH 300,04
COT INHERSIL C18 (250x4,6 mm, 5µm)
PHA DONG ACK-H2O CHROMO TRINH GRADIENT: 0': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, 12': 38-62, V=1,5mL/ phut, 13': 38-62, V=1,
0mL/ phut, 30': 50-50, V=1,0 mL/ phut, 31': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, STOP TIME 35 PRUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated



Area Percent Report

Sorted By : Signal
Multiplier: : 1.0000
Dilution: : 1.0000
Sample Amount: : 1.00000 [ng/µl] (not used in calc.)
Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Data File G:\CHEM32\1\DATA\HBMU_PL18U\190227000012.D
Sample Name: C CHUAN 4H 200.0%

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,4 Ref=off

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	8.869	BB	0.1509	18.68020	1.89791	0.3667
2	9.863	BB	0.1461	920.23866	97.48922	19.0373
3	10.416	BB	0.1396	3.86760	3.65121e-1	0.0800
4	29.315	BB	0.2539	3891.06787	239.09576	80.4960

Totals : 4833.86414 338.82801

*** End of Report ***

ĐỘ LẶP LẠI

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIEU\190304000010.D
Sample Name: MAU THU 3

Acq. Operator : HONG DLIEU
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 15
Injection Date : 3/4/2019 3:46:56 PM Inj Volume : 20.0 µl

Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 3/4/2019 3:44:33 PM by HONG DLIEU
(modified after loading)

Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 5/17/2019 2:09:25 PM by HONG
(modified after loading)

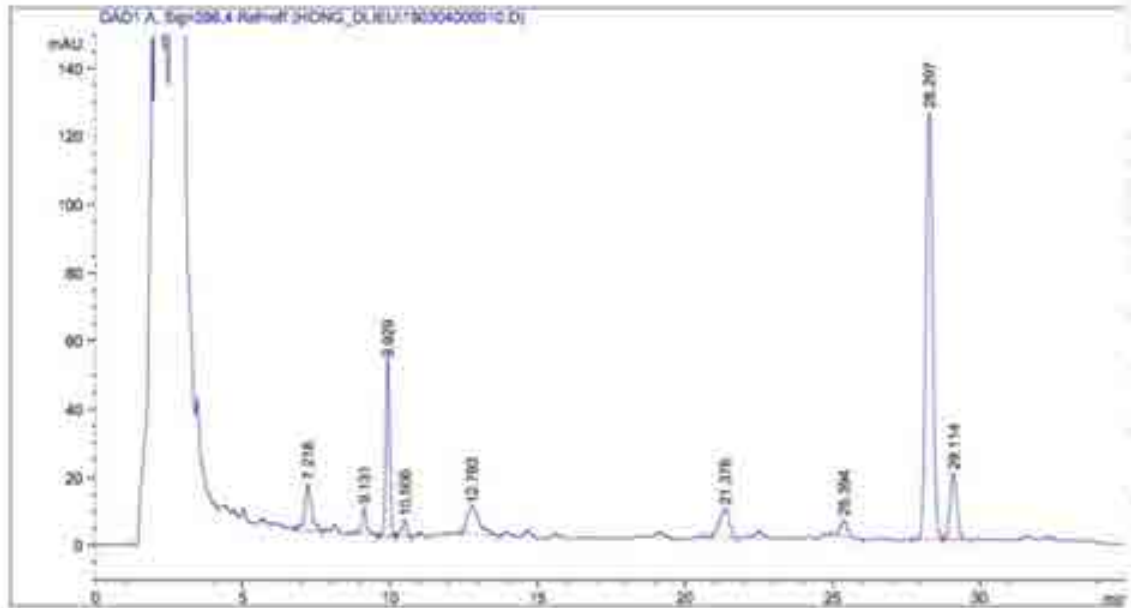
Method Info : nguyen lam hong

Sample Info : MAU THU 3
COT INVERSIL C18 (250x4,6 mm, 5µm)
PXA BONG ACN-H2O CHUONG TRINH GRADIENT: 0': 30-70. V=1,
0 mL/ phut, 12': 30-62. V=1,5mL/ phut, 13': 30-62. V=1,
0mL/ phut, 30': 50-50, V=1,0 mL/ phut, 31': 30-70. V=1,
0 mL/ phut. STOP TIME 35 PHUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertsil ODS-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : AutoID-15
Product# : 993967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 65.0 %
Injections : 1573
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Sample Amount: : 1.00000 [ng/ul] (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286,4 Ref=off

RetTime [min]	K'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select
							ution	ivity
7.218	1.90	221.28265	13.77552	0.75	0.2133	6336	-	-
9.131	2.66	97.38283	8.19848	0.80	0.1500	20515	6.19	1.40
9.929	2.99	488.00467	31.45529	0.98	0.1680	24923	3.15	1.12
10.500	3.21	61.80995	4.78678	1.54	0.1822	18422	2.08	1.08
12.793	4.13	235.72588	8.02311	0.63	0.4367	4756	4.34	1.29
21.376	7.58	199.57742	8.64213	1.57	0.3800	17528	12.35	1.83
25.394	9.19	85.96401	4.76050	1.08	0.2767	46674	7.19	1.21
28.297	10.35	2029.77319	125.74637	0.97	0.2533	69109	6.44	1.13
29.114	10.88	309.67947	19.32859	0.95	0.2533	73172	1.90	1.03

*** End of Report ***

ĐỘ ĐÚNG DUNG DỊCH THÊM CHUẨN 50%

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DIEU\190308000010.D
Sample Name: THEM CHUAN 50% (1)

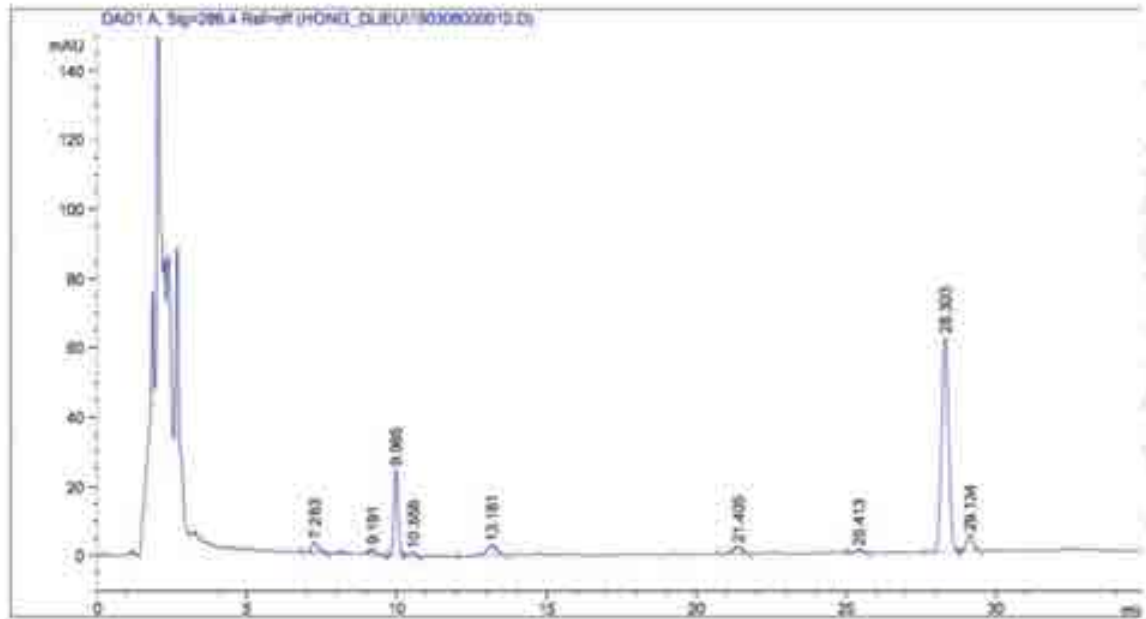
Acq. Operator : HONG DIEU
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 11
Injection Date : 3/8/2019 3:42:07 PM Inj Volume : 20.0 µl
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DIEU.M
Last changed : 3/8/2019 3:17:00 PM by HONG DIEU
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DIEU.M
Last changed : 6/24/2019 10:54:54 AM by HONG
(modified after loading)
Method Info : nguyen lam hong

Sample Info : THEM CHUAN 50% (1)
COT INVERSIL C18 (250x4,6 mm, 5um)
PRA DONG ACH-H2O CHUONG TRINH GRADIENT: 0': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, 12': 38-62, V=1,5mL/ phut, 13': 58-42, V=1,
0mL/ phut, 30': 50-50, V=1,0 mL/ phut, 31': 30-70, V=1
,0 mL/ phut, STOP TIME 35 PHUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Install ODS-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5um
Serial# : autoID-13
Product# : 993967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 150.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 80.0 %
Injections : 1609
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment : 1



Area Percent Report with Performance

Multiplier: : 1.0000
 Dilution: : 1.0000
 Sample Amount: : 1.00000 [mg/ul] (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Recol	Select
							ation	ivity
7.263	1.91	56.25378	3.31525	0.71	0.0289	5375	-	-
9.191	2.69	24.05269	2.01962	0.64	0.1533	19918	5.93	1.40
9.985	3.01	235.82364	26.07193	0.97	0.1447	26383	3.13	1.12
10.558	3.24	16.40667	1.26552	1.49	0.1689	21661	2.15	1.08
13.181	4.29	73.02528	3.53016	1.95	0.3433	8165	6.02	1.33
21.405	7.59	49.08161	2.13162	1.49	0.3747	17894	13.42	1.77
25.413	9.19	17.91265	1.08859	1.02	0.2578	93847	7.42	1.21
28.303	10.35	1007.85498	61.95692	0.96	0.2556	67941	6.61	1.13
29.134	10.69	75.87286	4.71548	0.94	0.2556	72001	1.91	1.03

*** End of Report ***

ĐỘ ĐÚNG DUNG DỊCH THÊM CHUẨN 100%

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIEU\190308000008.D
Sample Name: THEM CHUAN 100% (3)

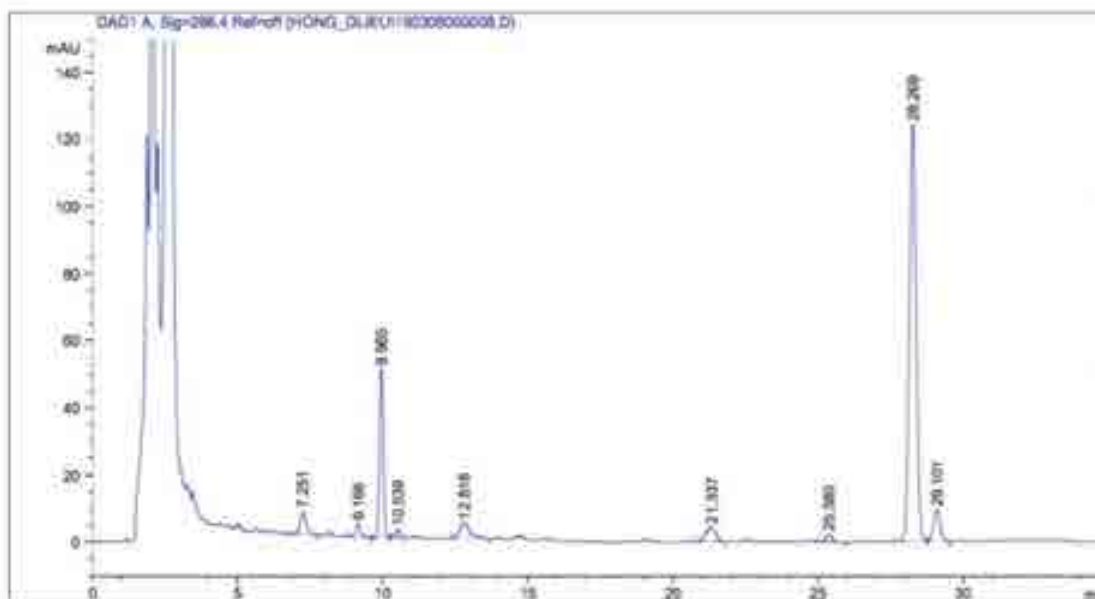
Acq. Operator : HONG DLIEU
Acq. Instrument : Instrument 1
Injection Date : 3/8/2019 2:40:05 PM
Injection Volume : 20.0 µL
Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 3/8/2019 2:34:42 PM by HONG DLIEU
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 8/26/2019 12:15:23 PM by HONG
(modified after loading)
Method Info : nguyen lam hong

Sample Info : THEM CHUAN 100% (3)
COT INVERSIL C18 (250x4.6 mm, 5µm)
PWA DONG AMO-N2C CHOCNG TRAIN GRADIENT: 0': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, 12': 38-62, V=1,5mL/ phut, 13': 38-62, V=1,
0mL/ phut, 30': 50-50, V=1,0 mL/ phut, 31': 30-70, V=1,
0 mL/ phut, STOPTIME 35 MINUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertsil C08-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : autoID-15
Product# : 955967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 250.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 µL
Injections : 1608
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Content :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1 1.0000
 Dilution: 1 1.0000
 Sample Amount: 1 1.00000 [ug/ul] (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol	Select ion	ivity
7.251	1.91	106.70004	6.74562	0.79	0.2156	6274	-	-	-
9.166	2.68	34.39900	4.17982	0.90	0.2517	20239	4.13	1.40	
9.985	3.00	466.97986	50.30637	0.97	0.1467	25565	3.15	1.12	
10.539	3.23	30.87801	2.45724	1.51	0.1689	22579	2.14	1.08	
12.818	4.14	125.76204	4.58361	0.67	0.3867	6766	5.00	1.28	
21.337	7.56	102.64758	4.37196	1.47	0.3867	16464	13.29	1.83	
25.380	9.18	38.03329	2.24667	0.99	0.2600	52791	7.35	1.21	
28.269	10.34	1018.51746	124.30706	0.96	0.2535	68907	8.61	1.13	
29.101	10.67	151.68066	9.44993	0.94	0.2533	73101	1.92	1.03	

*** End of Report ***

ĐỘ ĐÚNG DUNG DỊCH THÊM CHUẨN 200%

Data File D:\CHEM32\1\DATA\HONG_DLIEU\180209000009.0
Sample Name: MAU THEM CHUAN 200% (3)

Acq. Operator : HONG DLIEU
Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 13
Injection Date : 3/9/2019 3:27:32 PM Inj Volume : 20.0 µl

Acq. Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 3/9/2019 3:22:03 PM by HONG DLIEU
Analysis Method : D:\CHEM32\1\METHODS\HONG_DLIEU.M
Last changed : 6/22/2019 10:03:13 AM by HONG
(modified after loading)

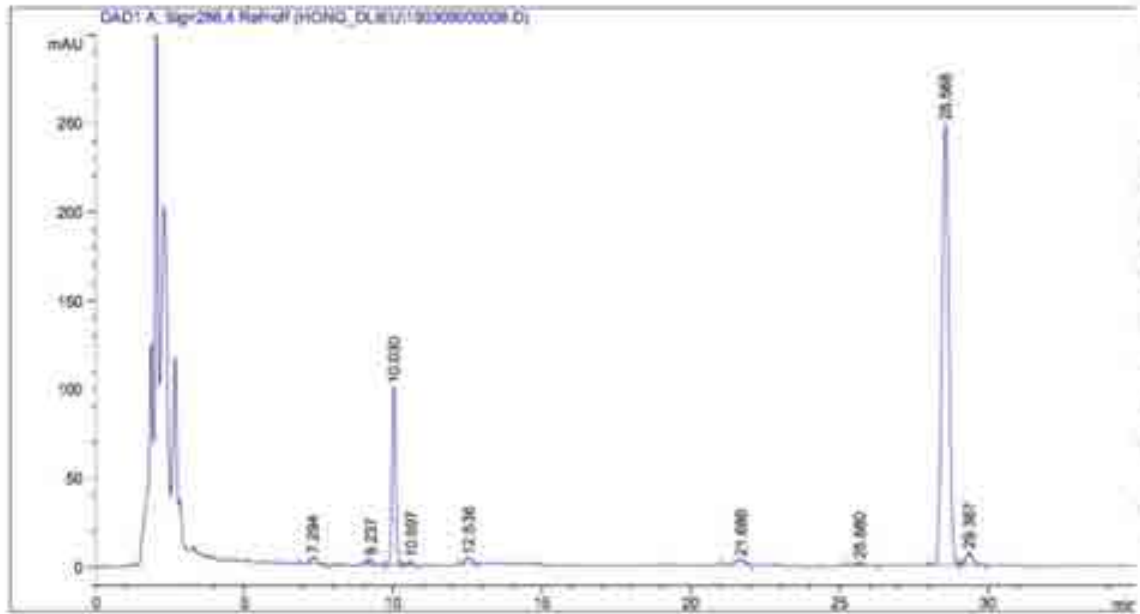
Method Info : nguyen lam hong

Sample Info : MAU THEM CHUAN 200% (3)
COT INVERSIL C18 (230x4.6 mm, 5µm)
PRA DONG ACS-R2C CHUONG TRINH GRADIENT: 0': 30-70, V=1,
0 ml/ phút, 12': 38-62, V=1,5ml/ phút, 13': 38-62, V=1,
5ml/ phút, 30': 80-90, V=1,0 ml/ phút, 31': 30-70, V=1,
0 ml/ phút, STOP TIME: 35 PHUT

Additional Info : Peak(s) manually integrated

Column(s)

Column Description : Inertsil C18-3-C18 Column, 4.6 x 150mm, 5µm
Serial# : 61010-13
Product# : 993967-902 Batch# :
Diameter : 4.6 mm Length : 250.0 mm
Particle size : 5.0 µm Void volume : 60.0 %
Injections : 1620
Maximum Pressure : 400.0 bar Maximum pH : 9.0
Minimum pH : 2.0
Maximum Temperature: 60.0 °C
Comment :



Area Percent Report with Performance

Multiplier: 1.0000
 Dilution: 1.0000
 Sample Amount: 1.00000 (ng/ul) (not used in calc.)
 Use Multiplier & Dilution Factor with ISTDs

Signal 1: DAD1 A, Sig=286.4 Ref=off

RetTime [min]	k'	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Symm.	Width [min]	Plates	Resol.	Selectivity
7.294	1.93	75.80700	4.37558	0.65	0.2422	3028	-	-
9.237	2.71	34.86894	1.10788	0.62	0.1896	13151	5.29	1.40
10.030	3.02	904.81750	100.55394	0.96	0.1412	27945	2.82	1.12
10.897	3.25	26.23689	1.15308	1.49	0.1731	20709	2.12	1.09
12.536	4.03	56.28864	3.58090	1.01	0.2600	12882	5.26	1.24
21.686	7.70	71.30078	3.14394	1.57	0.3733	16690	16.96	1.91
25.680	9.30	28.74295	1.65489	1.04	0.2622	53122	7.38	1.21
28.368	10.46	4001.36768	248.27174	0.99	0.2520	71191	6.60	1.12
29.387	10.78	113.71407	6.92098	0.97	0.2554	73143	1.85	1.03

*** End of Report ***

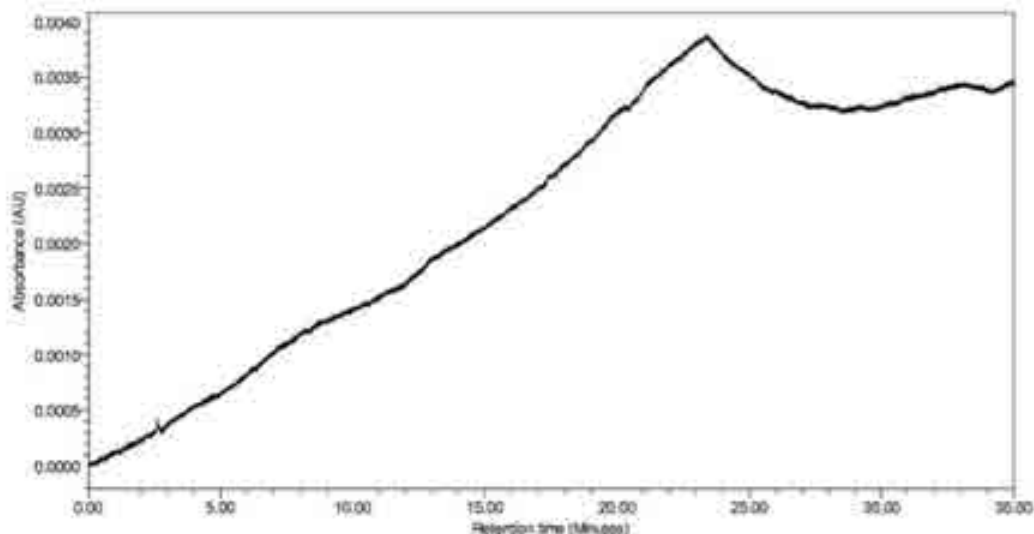
PHỤ LỤC 3.5. ÁP DỤNG PHƯƠNG PHÁP ĐÃ XÂY DỰNG ĐỂ ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI CLEISINDOSIDE D VÀ CLEISTANTOXIN TRONG QUẢ CỦA CHI CÁCH HOA

Empower 3

0Standard Report Method

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Blank	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	DTL DL MAU CT18
Vial:	1-A.1	Acq. Method Set:	D Cleistantoxin_Cleisindosid D
Injection #:	1	Processing Method:	DL CE_CT1
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	7/25/2019 9:48:34 AM ICT		
Date Processed:	7/25/2019 7:47:06 PM ICT		



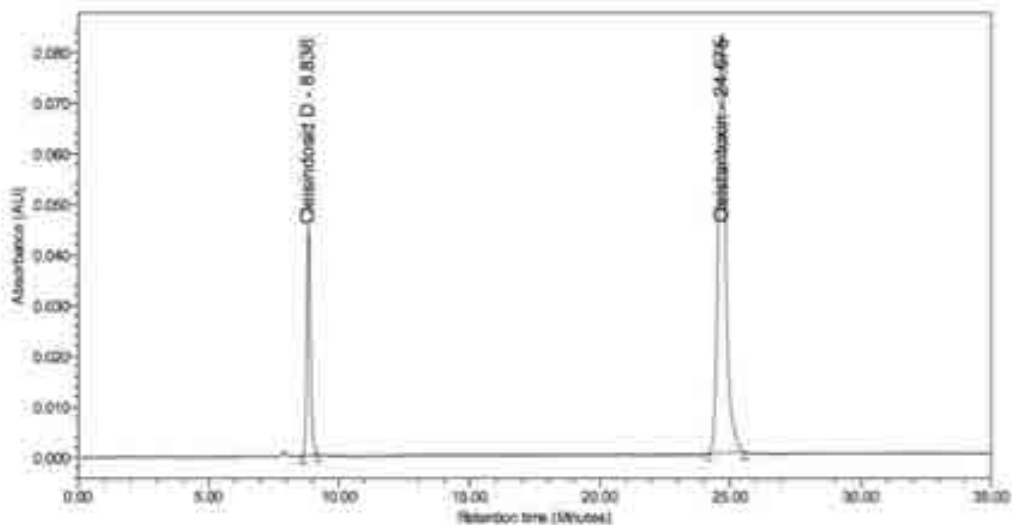
	Peak Name	RT	Area	% Area
1	Cleisindosid A	8.003		
2	Cleisindosid D	8.824		
3	Cleistantoxin	23.398		
4	7,8 dihydrocleistantoxin	25.660		

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method
 Report Method ID: 1043
 Page: 1 of 1

act Name: Nghien cuu/2019/07_Cleistantoxin_Cleisindosid
 Date Printed: 7/25/2019
 7:47:06 PM Asia/Saigon

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Chuan hh	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	DTL DL MAU CT18
Vial:	1A2	Acq. Method Set:	D Cleisantoxin_Cleisindosid D
Injection #:	1	Processing Method:	DL CE_CT1
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 288nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 288nm@1.2nm
Date Acquired:	7/25/2019 10:24:21 AM ICT		
Data Processed:	7/25/2019 6:24:24 PM ICT		



Peak Name	RT	Area	% Area	Sym. Factor	Plate Count	Resolution	Selectivity
1 Cleisindosid A	8.003						
2 Cleisindosid D	8.836	430383	20.21	1.19	20662.94		
3 Cleisantoxin	24.675	1699478	79.79	1.26	37285.34	42.85	3.02
4 7,8 dihydrocleisantoxin	25.680						

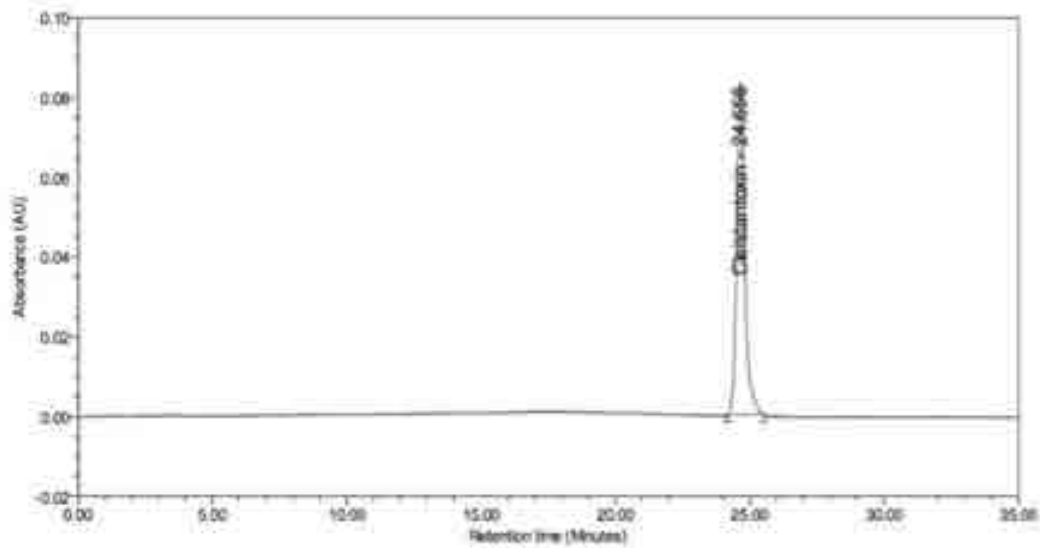
1	s/n	4	s/n
2	598.41		
3	1099.58		

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_1
 Report Method ID: 1040
 Page: 1 of 1

act Name: Nghien.cuu/2019/07_Cleisantoxin_Cleisindosid
 Date Printed: 7/25/2019
 6:24:24 PM Asia/Saigon

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Chuan Cloistantoin	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	OTL DL MAU CT18
Val:	1:A.4	Acq. Method Set:	D Cloistantoin_Cleisindosid D
Injection #:	1	Processing Method:	DL CE_CT1
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	7/25/2019 2:35:00 PM ICT		
Date Processed:	7/26/2019 9:39:13 AM ICT		



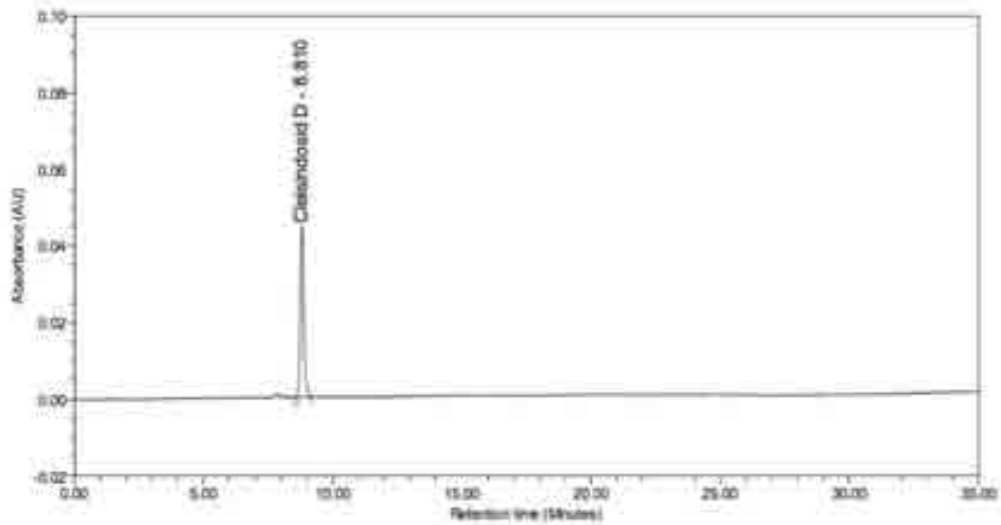
	Peak Name	RT	Area	% Area
1	Cleisindosid A	8.003		
2	Cleisindosid D	8.824		
3	Cloistantoin	24.656	1729460	100.00
4	7,8 dihydrocloistantoin	25.660		

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_C
 Report Method ID: 1520
 Page: 1 of 1

Set Name: Nghiem cuu/2019/07_Cloistantoin_Cleisindosid
 Date Printed:
 7/26/2019
 9:39:13 AM Asia/Saigon

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Chuan Cloisindoid D	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	DTL DL MAU CT18
Vial:	1.A.5	Acq. Method Set:	D Cloisintoxin Cloisindoid D
Injection #:	1	Processing Method:	DL CE_CT 1
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 296nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 296nm@1.2nm
Date Acquired:	7/25/2019 3:10:49 PM ICT		
Date Processed:	7/25/2019 9:39:20 AM ICT		



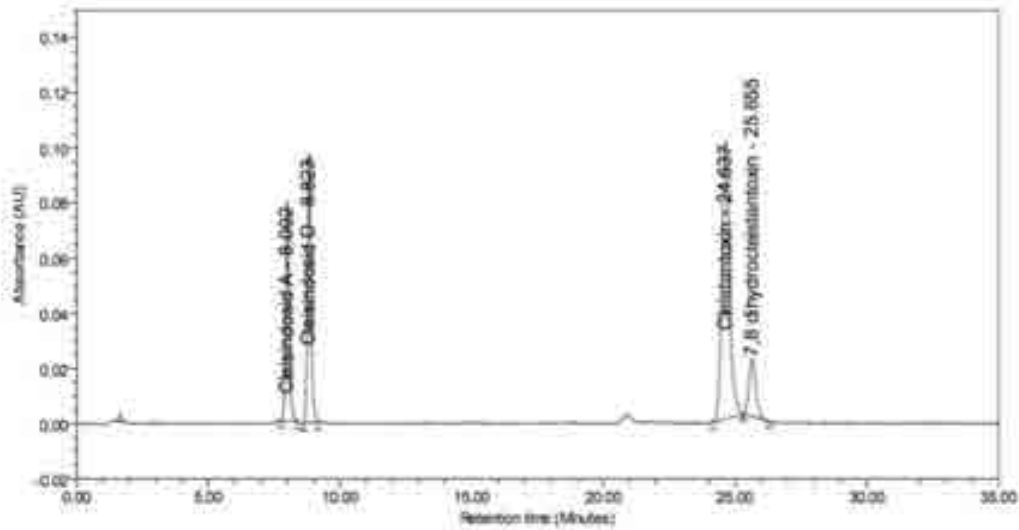
	Peak Name	RT	Area	% Area
1	Cloisindoid A	8.003		
2	Cloisindoid D	8.810	426282	100.00
3	Cloisintoxin	24.092		
4	7,8 dihydrocloisintoxin	25.660		

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_1
 Report Method ID: 1520
 Page: 1 of 1

act Name: Nghiem cui/2019/07_Cloisintoxin_Cloisindoid
 Date Printed:
 7/26/2019
 9:39:20 AM Asia/Saigon

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	DDPG	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	DTL DL MAU CT18
Vial:	1:A.3	Acq. Method Set:	D Cleistanxin_Cleisindosid D
Injection #:	1	Processing Method:	DL CE_CT1
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	7/25/2019 1:59:11 PM ICT		
Date Processed:	7/26/2019 9:44:37 AM ICT		



Peak Name	RT	Area	% Area
1 Cleisindosid A	8.002	730971	18.22
2 Cleisindosid D	8.823	890100	22.19
3 Cleistanxin	24.637	2006402	50.02
4 7,8 dihydrocleistanxin	25.655	383792	9.57

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_f
 Report Method ID: 1546
 Page: 1 of 1

sci Name: Nghien cui/2019/07_Cleistanxin_Cleisindosid
 Date Printed:
 7/26/2019
 9:44:37 AM Asia/Seigon

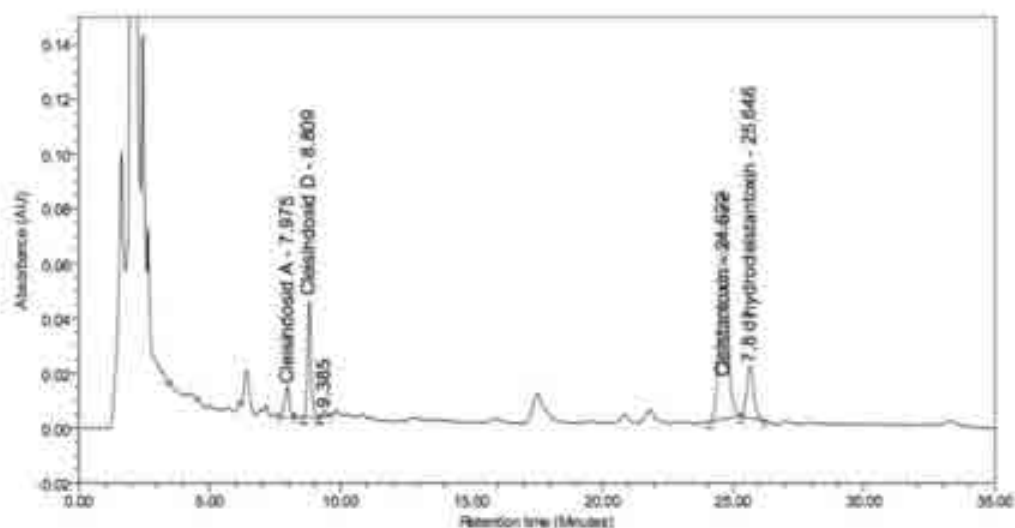
ĐỊNH LƯỢNG QUẢ CÂY *CLEISTANTHUS TONKINENSIS*

Empower 3

0Standard Report Method CT

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CAY 1-C.TONK-THU 1	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	DTL_DL_MAU_CT18
Vial:	1.B.9	Acq. Method Set:	D_Cleistanxin_Cleisindosid D
Injection #:	1	Processing Method:	DL_CE_CT1
Injection Volume:	20.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	7/25/2019 9:44:51 PM ICT		
Date Processed:	7/26/2019 6:20:13 PM ICT		



Peak Name	RT	Area	% Area
1 Cleisindosid A	7.975	110091	4.55
2 Cleisindosid D	8.809	421191	17.42
3	9.385	28992	1.20
4 Cleistanxin	24.622	1624797	67.19
5 7,8 dihydrocleistanxin	25.646	233168	9.64

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_c
 Report Method ID: 1546
 Page: 1 of 1

ect Name: Nghiên cứu/2019/07_Cleistanxin_Cleisindosid
 Date Printed: 7/26/2019
 6:20:13 PM Asia/Saigon

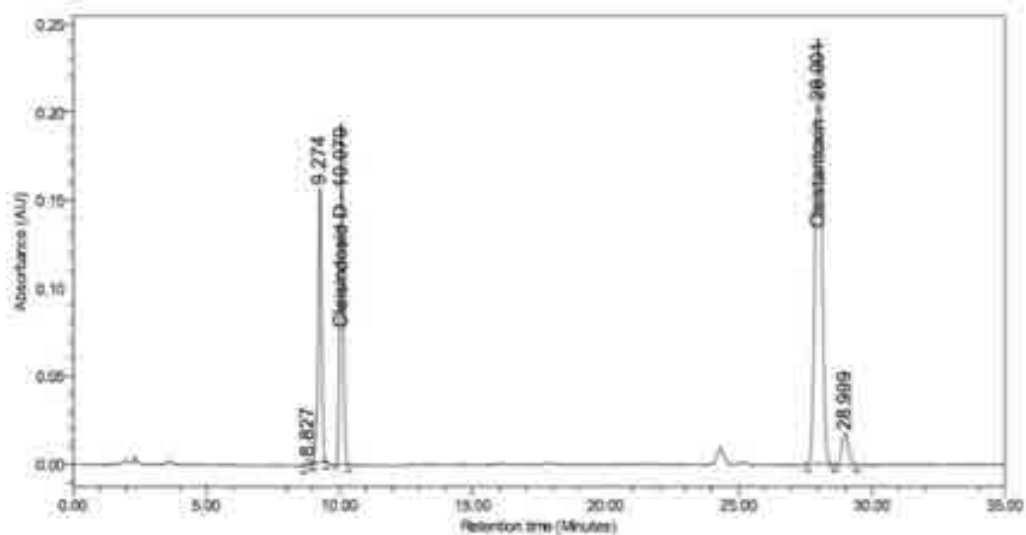
ĐỊNH LƯỢNG QUẢ CÂY *CLEISTANTHUS EBERHARDT*

Empower 3

0Standard Report Method

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CAY 2-C EBER DOPG	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	MAU CE18
Vial:	1-A3	Acq. Method Set:	DL Cleistanxin_Cleisindosid
Injection #:	1	Processing Method:	DL CE CT1
Injection Volume:	40.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	8/5/2019 7:27:52 PM ICT		
Date Processed:	8/7/2019 3:53:14 PM ICT		



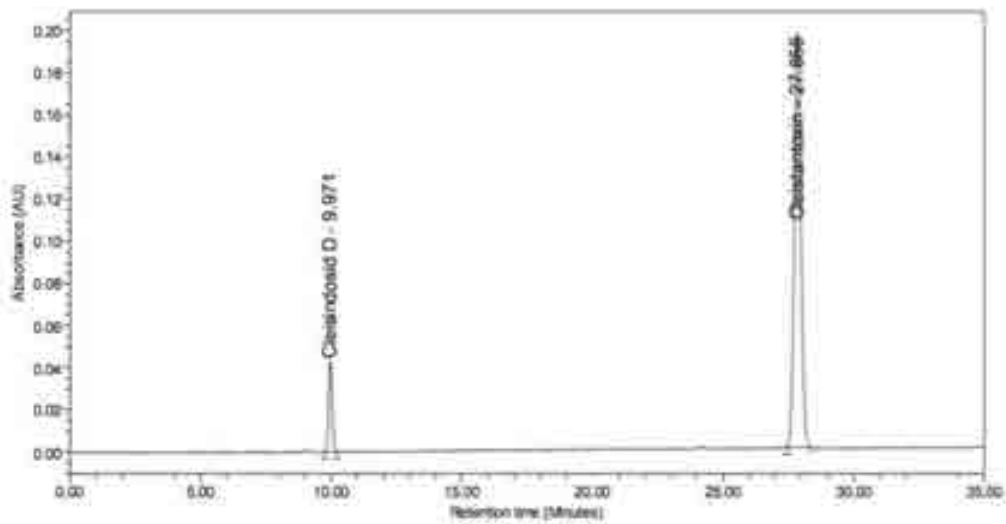
Peak Name	RT	Area	% Area
1	8.827	30107	0.39
2	9.274	1422450	18.48
3 Cleisindosid D	10.079	1709862	22.22
4 Cleistanxin	26.001	4225549	54.90
5	28.999	308537	4.01

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method
 Report Method ID: 2010
 Page: 1 of 1

ict Name: Nghiien cuu/2019/07_Cleistanxin_Cleisindosid
 Date Printed: 8/7/2019
 3:53:14 PM Asia/Saigon

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	Chuan hh	Acquired By:	System
Sample Type:	Unknown	Sample Set Name:	MAJ CE18
Vial:	1/C,1	Acq. Method Set:	DL_Cleistanxin_Cleisindosid
Injection #:	1	Processing Method:	DL_CE_CT1
Injection Volume:	40.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	8/5/2019 3:52:42 PM ICT		
Date Processed:	8/7/2019 3:52:42 PM ICT		



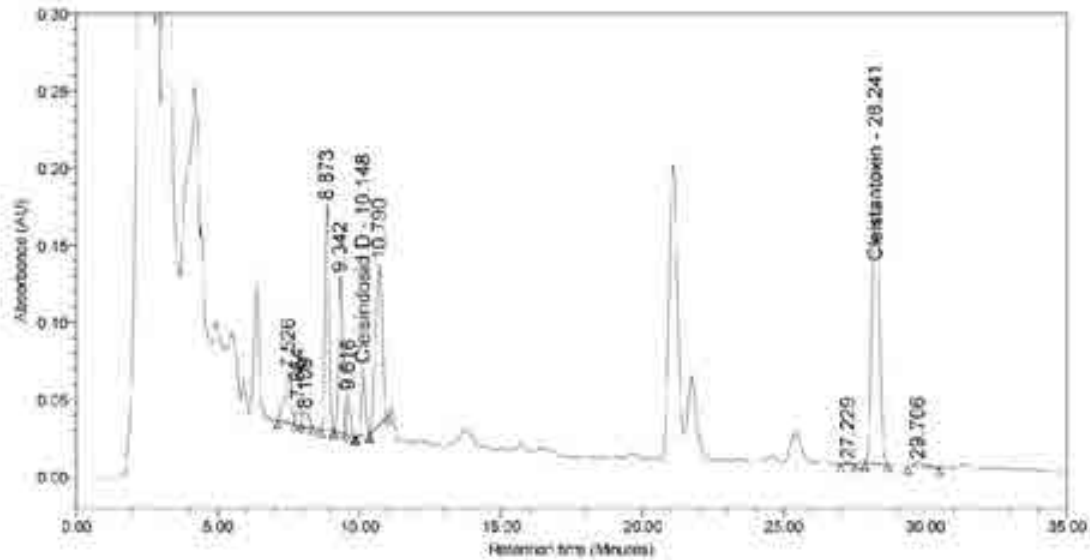
Peak Name	RT	Area	% Area	Sym. Factor	Plate Count	Resolution	Selectivity	s/n
1 Cleisindosid D	9.971	420969	10.67	1.06	23117.94			251.02
2 Cleistanxin	27.856	3450539	89.13	1.05	56263.35	49.80	2.99	1147.78

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method_1
 Report Method ID: 1040
 Page: 1 of 1

act Name: Nghien.cuu/2019/07_Cleistanxin_Cleisindosid
 Date Printed: 8/7/2019
 3:52:42 PM Asia/Seigon

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CAY 2-C EBER T2	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	MAU CE18
Vial:	1.D.6	Acq. Method Set:	DL Cleistantoxin_Cleisindosid
Injection #:	1	Processing Method:	DL CE CT1
Injection Volume:	40.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 286nm@1.2nm
Date Acquired:	8/5/2019 11:03:54 PM ICT		
Date Processed:	8/7/2019 3:53:34 PM ICT		



Peak Name	RT	Area	% Area
1	7.526	535469	5.64
2	7.864	135487	1.43
3	8.109	149454	1.58
4	8.873	1402168	14.78
5	9.342	1075989	11.34
6	9.616	251268	2.55
7 Cleisindosid D	10.148	472246	4.98
8	10.790	1754125	18.49

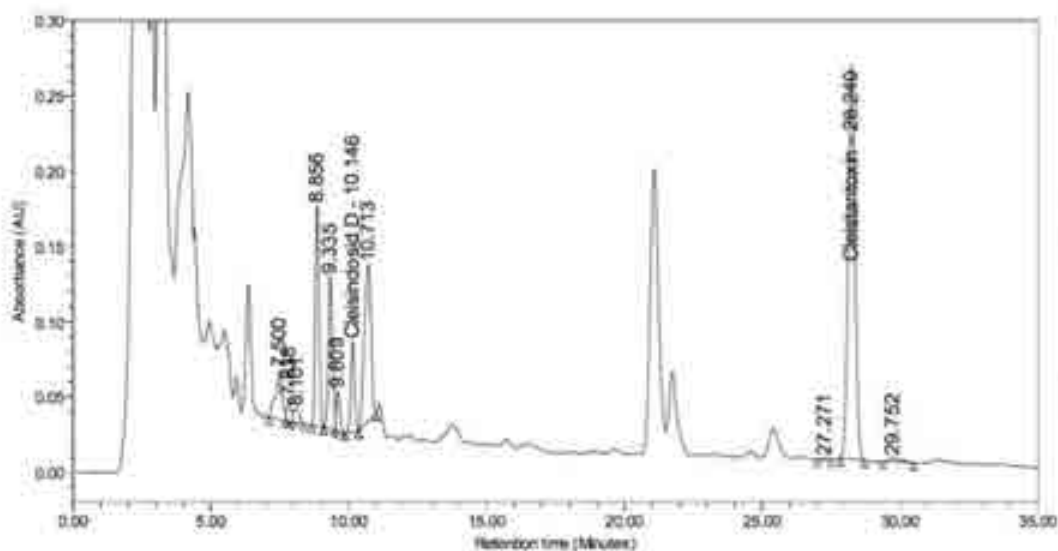
Peak Name	RT	Area	% Area
9	27.229	15781	0.17
10 Cleistantoxin	28.241	3615119	38.11
11	29.706	80364	0.85

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method
 Report Method ID: 1040
 Page: 1 of 1

ect Name: Nghien cuu\2019\07_Cleistantoxin_Cleisindosid
 Date Printed: 8/7/2019
 3:53:34 PM Asia/Saigon

SAMPLE INFORMATION

Sample Name:	CAY 2-C.EBER T Them C	Acquired By:	System
Sample Type:	Standard	Sample Set Name:	MAU CE16
Vial:	1:0,4	Acq. Method Set:	DL Cleistanxin_Cleisindosid
Injection #:	1	Processing Method:	DL CE CT1
Injection Volume:	40.00 ul	Channel Name:	2998 Ch1 266nm@1.2nm
Run Time:	35.0 Minutes	Proc. Chnl. Descr.:	2998 Ch1 266nm@1.2nm
Date Acquired:	8/5/2019 8:04:33 PM ICT		
Date Processed:	8/7/2019 3:53:19 PM ICT		



Peak Name	RT	Area	% Area	
1	7.500	549968	5.21	
2	7.838	148928	1.41	
3	8.101	151624	1.44	
4	8.856	1426481	13.50	
5	9.335	1045368	9.89	
6	9.609	258439	2.45	
7	Cleisindosid D	10.146	582926	5.52
8	10.713	1754875	16.70	

Peak Name	RT	Area	% Area	
9	27.271	16002	0.15	
10	Cleistanxin	28.240	4537119	42.94
11	29.752	83546	0.79	

Reported by User: System
 Report Method: 0Standard Report Method
 Report Method ID: 1040
 Page: 1 of 1

act Name: Nghien cui/2019/07_Cleistanxin_Cleisindosid
 Date Printed: 8/7/2019
 3:53:19 PM Asia/Saigon

PHỤ LỤC 3.6. PHIẾU KIỂM NGHIỆM ĐỊNH LƯỢNG CLEISINDOSIDE D VÀ CLEISTANTOXIN TRONG QUẢ CHÀ CHỐI



VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TRUNG ƯƠNG
Số 10 Lê Đình - Thành Phố - Vinh - Nghệ An
ĐT: 043.34.32.11.01 - Fax: 043.34.32.11.02

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc



PHIẾU PHÂN TÍCH

Kết quả kiểm nghiệm chỉ có giá trị với mẫu đơn như sau:

Số: 432.0195

Mẫu để kiểm nghiệm: Mẫu bột quả cây Chà Chối (*Cleistanthus tomentosus*)
Nơi sản xuất: Không có thông tin
Số 01, ngày XX: Lô SX: CT-21 Ngày SX: thu hái 06/2018
Hạn dùng: Không có thông tin Số ĐK: không có thông tin
Người và nơi gửi mẫu: Trường Đại học Dược Hà Nội
Yêu cầu KN (gọi rõ nội dung, số ngày, tháng, năm của công việc hay giấy tờ liên quan):
 Định tính, mắt khối lượng cho làm khô,
 định lượng cleistanxin & cleisindoside D
Ngày, tháng, năm nhận mẫu: 18/09/2018 Số đăng ký KN: 497-2023
Người nhận mẫu: Trịnh Thị Quy
Thủ theo: Tiêu chuẩn = số gọi tên
Tình trạng mẫu khi nhận và số niêm phong để kiểm nghiệm:
 Mẫu đóng gói trong lọ nắp kín, niêm -封 - ràng.

CHỈ TIÊU VÀ TIÊU CHUẨN ÁP DỤNG		KẾT QUẢ
1.	Mô tả	Bột màu mịn màu nâu nhạt, mùi thơm
2.	Định tính cleistanxin & cleisindoside D Phương pháp HPLC	Sắc ký đồ của dung dịch thử cho các pic có thời gian lưu và phổ UV-VIS tương ứng với thời gian lưu và phổ UV-VIS của pic cleistanxin và pic cleisindoside D thu được từ sắc ký đồ dung dịch chuẩn
3.	Mất khối lượng cho làm khô Phương pháp sấy (lấy 105°C)	9,04%
4.	Định lượng Phương pháp HPLC Cleistanxin ($C_{21}H_{32}O_4$)	0,56%, tính theo chế phẩm đã làm khô
	Cleisindoside D ($C_{22}H_{34}O_5$)	0,26%, tính theo chế phẩm đã làm khô

Hà Nội, ngày 18 tháng 09 năm 2018

VIỆN TRƯỞNG



Cây học hành, anh Mĩ nhất ngũ (Mẫu) (số gọi tên Mẫu) (phần đóng 2 của Phiếu Kiểm nghiệm Mẫu Trung ương)
 VJH08A21.04 - Trang 1/1