

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP. HỒ CHÍ MINH

PHẠM VĂN SƠN

**THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU HYPOPHYLLANTHIN,
NIRANTHIN VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ THÔNG SỐ
DƯỢC ĐỘNG HỌC CỦA CAO CHUẨN HÓA ĐIỀU CHẾ TỪ
DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG (*PHYLLANTHUS AMARUS* SCHUM.
ET THONN., EUPHORBIACEAE)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH, NĂM 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP. HỒ CHÍ MINH

PHẠM VĂN SƠN

**THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU HYPOPHYLLANTHIN,
NIRANTHIN VÀ XÁC ĐỊNH MỘT SỐ THÔNG SỐ
DƯỢC ĐỘNG HỌC CỦA CAO CHUẨN HÓA ĐIỀU CHẾ TỪ
DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG (*PHYLLANTHUS AMARUS* SCHUM.
ET THONN., EUPHORBIACEAE)**

NGÀNH: KIỂM NGHIỆM THUỐC VÀ ĐỘC CHẤT

MÃ SỐ: 62720410

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

PGS. TS. NGUYỄN NGỌC VINH

TP. HỒ CHÍ MINH, NĂM 2021

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được công bố ở bất kỳ nơi nào.

Tác giả luận án

Phạm Văn Sơn

MỤC LỤC

MỤC LỤC	i
DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT	iii
DANH MỤC BẢNG	vii
DANH MỤC HÌNH, ĐỒ THỊ	x
DANH MỤC SƠ ĐỒ.....	xii
MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. TỔNG QUAN DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG	3
1.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VỀ CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP, TINH CHẾ HỢP CHẤT LIGNAN TỪ DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG.....	9
1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG CÁC HỢP CHẤT LIGNAN TRONG DIỆP HẠ CHÂU	17
1.4. CAO ĐỐI CHIẾU.....	25
1.5. TỔNG QUAN VỀ ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG CỦA THUỐC	25
CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	34
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	34
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	36
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	62
3.1. CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP, TINH CHẾ VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC, ĐỘ TINH KHIẾT CỦA CÁC CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC	62
3.2. XÁC ĐỊNH CHẤT LƯỢNG VÀ THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU	80
3.3. ĐIỀU CHẾ VÀ TIÊU CHUẨN HÓA CAO DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG.....	84
3.4. ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ THÔNG SỐ DƯỢC ĐỘNG HỌC CỦA CAO CHUẨN HÓA ĐIỀU CHẾ TỪ DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG	101
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN	117
4.1. CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP, TINH CHẾ VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC, ĐỘ TINH KHIẾT CỦA CÁC CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC	117
4.2. XÁC ĐỊNH CHẤT LƯỢNG VÀ THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU	122
4.3. ĐIỀU CHẾ VÀ TIÊU CHUẨN HÓA CAO DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG....	123

4.4. ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ THÔNG SỐ DƯỢC ĐỘNG HỌC CỦA CAO CHUẨN HÓA ĐIỀU CHẾ TỪ DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG	134
ĐIỂM MỚI CỦA ĐỀ TÀI	145
KẾT LUẬN	146
KIẾN NGHỊ	149
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	150
TÀI LIỆU THAM KHẢO	151
DANH MỤC PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Từ nguyên	Nghĩa tiếng Việt
ACN	Acetonitrile	
As	Asymetry	Hệ số đối xứng
AUC	Area under the plasma drug concentration - time curve	Diện tích dưới đường cong thời gian - nồng độ thuốc trong huyết tương
C _{max}	Maximum plasma concentration	Nồng độ đỉnh trong huyết tương
COSY	Correlated Spectroscopy	Phổ tương quan proton - proton
CV	Coefficient of Variation	Hệ số phân tán
<i>d</i>	Doublet	Đỉnh đôi
DAZ	Diazepam	
DCM	Dichloromethan	
<i>dd</i>	Doublets of doublet	Đỉnh đôi kép
DĐVN		Dược điển Việt Nam
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	
DHCD		Diệp hạ châu đắng
DNA	Deoxyribonucleic acid	
DSC	Differential Scanning Calorimetry	Phân tích nhiệt vi sai
EA	Ethyl acetate	
ECD	Electrochemical detection	Đầu dò điện hóa
EMA	European Medicines Agency	Cơ quan Dược phẩm Châu Âu
ESI	Electrospray ionization	Ion hóa phun điện
EtOAc	Ethyl acetate	

EtOH	Ethanol	
FL	Fluorescence	Huỳnh quang
GC	Gas chromatography	Sắc ký khí
GC-MS	Gas chromatography–mass spectrometry	Sắc ký khí ghép nối khối phổ
GLP	Good Laboratory Practices	Thực hành tốt phòng kiểm nghiệm thuốc
GMP	Good Manufacturing Practices	Thực hành tốt sản xuất thuốc
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation	Phổ tương tác dị nhân qua nhiều nối
HPL	Hypophyllanthin	
HPTLC	High Performance Thin Layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao
HQC	High quality control	Mẫu kiểm chứng nồng độ cao
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation	Phổ tương tác dị nhân qua một lượng tử
ICH	The International Council for Harmonisation	Hội nghị quốc tế về hòa hợp
IR	Infrared	Hồng ngoại
IS	Internal standard	Chuẩn nội
ISO	International Organization for Standardization	Tổ chức quốc tế về tiêu chuẩn hóa
<i>J</i>	Coupling constant	Hằng số ghép
LC-MS/MS	Liquid chromatography - Tandem mass spectrometry	Sắc ký lỏng ghép nối khối phổ
LLOQ	Lower limit of quantitation	Giới hạn định lượng dưới
LOD	Limit of detection	Giới hạn phát hiện

LOQ	Limit of quantitation	Giới hạn định lượng
LQC	Low quality control	Mẫu kiểm chứng nồng độ thấp
<i>m</i>	Multiplet	Đỉnh đa
MAE	Microwave Assisted Extraction	Chiết xuất với sự hỗ trợ của vi sóng
MeOH	Methanol	
MF	Matrix factor	Hệ số ảnh hưởng nền mẫu
MQC	Medium quality control	Mẫu kiểm chứng nồng độ trung bình
MRM	Multiple Reaction Monitoring	
MS	Mass Spectrum	Phổ khối
NCBI	National Center for Biotechnology Information	Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia
NLDC		Nguyên liệu đối chiếu
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy	Phổ hiệu ứng hạt nhân overhauser
NRT	Niranthin	
NTT	Nirtetralin	
PA	Purify analysis	Tinh khiết phân tích
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PDA	Photo Diode Array	Dãy diod quang
PLE	Pressurized Liquid Extraction	Chiết dưới áp suất cao
PLT	Phyllanthin	
ppm	Parts per million	Một phần triệu
PTN		Phòng thí nghiệm
PTT	Phyltetralin	
QC	Quality Control	Mẫu kiểm chứng

R_s	Resolution	Độ phân giải
RSD	Relative standard deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
SD	Standard deviation	Độ lệch chuẩn
SFE	Super-critical Fluid Extraction	Chiết xuất bằng chất lỏng siêu tới hạn
SKC		Sắc ký cột
SKD		Sinh khả dụng
SKĐ		Sắc ký đồ
SKĐC		Sắc ký điều chế
SKLM		Sắc ký lớp mỏng
t	Triplet	Đỉnh ba
$T_{1/2}$	Terminal half-life	Nửa đời thải trừ
TB		Trung bình
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TLTK		Tài liệu tham khảo
T_{max}	Time to maximum plasma concentration	Thời gian nồng độ trong huyết tương đạt mức tối đa
t_R	Retention time	Thời gian lưu
TT		Thuốc thử
ULOQ	Upper limit of quantitation	Giới hạn định lượng trên
US-FDA	United States - Food and drug administration	Cơ quan Quản lý Thuốc và Thực phẩm Hoa Kỳ
USP	United States Pharmacopeia	Dược điển Mỹ
UV	Ultraviolet	Tử ngoại
UV-Vis	Ultraviolet - Visible	Tử ngoại - Khả kiến
VLC	Vacuum liquid chromatography	Sắc ký lỏng chân không

DANH MỤC CÁC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1. Thành phần hóa học trong Diệp hạ châu đắng.....	5
Bảng 1.2. Tác dụng sinh học cây Diệp hạ châu đắng	8
Bảng 1.3. Các công trình chiết xuất, phân lập các hợp chất lignan.....	16
Bảng 1.4. Các phương pháp định lượng các hợp chất lignan.....	24
Bảng 1.5. So sánh hướng dẫn của US-FDA và EMA	31
Bảng 2.1. Danh sách các trang thiết bị, vật tư sử dụng	35
Bảng 2.2. Trình tự các cặp mồi dùng cho phản ứng PCR.....	37
Bảng 2.3. Chương trình chạy PCR.....	37
Bảng 2.4. Điều kiện sắc ký điều chế ban đầu	40
Bảng 2.5. Liều uống thuốc cho từng thỏ	60
Bảng 3.1. Kết quả kiểm tra chất lượng dược liệu nghiên cứu	62
Bảng 3.2. Kết quả search blast NCBI cặp mồi ITS1 – ITS4	63
Bảng 3.3. Kết quả khảo sát các dung môi chiết.....	64
Bảng 3.4. Kết quả sắc ký cột của 3 loại cao	64
Bảng 3.5. Kết quả phân lập sắc ký cột cao DCM	65
Bảng 3.6. Kết quả chạy sắc ký cột phân đoạn IV	66
Bảng 3.7. Khảo sát điều kiện SKĐC phân đoạn VII.....	67
Bảng 3.8. Khảo sát điều kiện SKĐC phân đoạn XII.....	68
Bảng 3.9. Kết quả kiểm tra độ tinh khiết chất phân lập bằng SKLM.....	70
Bảng 3.10. Kết quả kiểm tra độ tinh khiết chất phân lập bằng HPLC.....	71
Bảng 3.11. Kết quả kiểm tra độ tinh khiết các chất phân lập bằng DSC	71
Bảng 3.12. So sánh các dữ liệu phổ NMR của chất PA ₂ và niranthin	72
Bảng 3.13. So sánh các dữ liệu phổ NMR của chất PA ₃ và nirtetralin.....	74
Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của chất PA ₄ và hypophyllanthin	76
Bảng 3.15. So sánh các dữ liệu phổ NMR của chất PA ₅ và phyltetralin	78

Bảng 3.16. Dữ liệu phổ NMR của chất PA ₆ và phyllanthin.....	79
Bảng 3.17. Kết quả thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết hypophyllanthin	80
Bảng 3.18. Kết quả đánh giá liên PTN chất đối chiếu hypophyllanthin.....	81
Bảng 3.19. Xác định giá trị ấn định chất đối chiếu hypophyllanthin	81
Bảng 3.20. Kết quả thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết niranthin	82
Bảng 3.21. Kết quả đánh giá liên PTN chất đối chiếu niranthin	82
Bảng 3.22. Xác định giá trị ấn định chất đối chiếu niranthin.....	83
Bảng 3.23. Kết quả thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết nirtetralin	84
Bảng 3.24. Kết quả xác định độ tinh khiết nirtetralin	84
Bảng 3.25. Khảo sát điều kiện sắc ký định lượng đồng thời 4 lignan	85
Bảng 3.26. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống (n = 6)	88
Bảng 3.27. Kết quả giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.....	89
Bảng 3.28. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính	89
Bảng 3.29. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian	89
Bảng 3.30. Kết quả đánh giá độ đúng	90
Bảng 3.31. Kết quả khối lượng cần và lượng hoạt chất trong cần chiết từ Diệp hạ châu đẳng với các dung môi khác nhau.....	90
Bảng 3.32. Kết quả khối lượng cần và lượng hoạt chất trong cần Diệp hạ châu đẳng theo thời gian ngâm.....	91
Bảng 3.33. Kết quả khối lượng cần và lượng hoạt chất trong cần Diệp hạ châu đẳng theo tỉ lệ dược liệu : dung môi	92
Bảng 3.34. Kết quả lượng hoạt chất trong cần Diệp hạ châu đẳng theo số lần chiết	92
Bảng 3.35. Khối lượng cao thu được	93
Bảng 3.36. Kết quả khảo sát dung môi chiết ở quy mô phòng thí nghiệm	94
Bảng 3.37. Kết quả khảo sát dung môi chiết ở quy mô pilot	95
Bảng 3.38. Kết quả mất khối lượng do làm khô của các mẫu cao.....	97
Bảng 3.39. Kết quả tro toàn phần của các mẫu cao	97
Bảng 3.40. Kết quả giới hạn kim loại nặng của mẫu cao.....	97

Bảng 3.41. Hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin trong mẫu cao	98
Bảng 3.42. Kết quả giới hạn nhiễm khuẩn của các mẫu cao	98
Bảng 3.43. Kết quả kiểm nghiệm cao khô Diệp hạ châu đắng.....	99
Bảng 3.44. Tóm tắt kết quả hàm lượng (%) 4 hợp chất lignan trong mẫu dược liệu	101
Bảng 3.45. Tóm tắt kết quả hàm lượng (%) 4 hợp chất lignan trong các loại cao khô	101
Bảng 3.46. Thể phân mảnh của các chất khảo sát	102
Bảng 3.47. Hiệu suất chiết của các chất chuẩn nội đã khảo sát.....	102
Bảng 3.48. Kết quả khảo sát cột sắc ký.....	103
Bảng 3.49. Kết quả khảo sát hệ pha động chứa methanol hoặc acetonitril.....	104
Bảng 3.50. Kết quả so sánh loại đệm trong pha động.....	104
Bảng 3.51. Kết quả khảo sát nồng độ đệm amoni format	105
Bảng 3.52. Kết quả khảo sát pH dung dịch đệm amoni format 5 mM	106
Bảng 3.53. Thông số sắc ký của chất phân tích, chuẩn nội với nhiệt độ cột khảo sát	106
Bảng 3.54. Thông số sắc ký của hỗn hợp chuẩn tương ứng với tốc độ dòng	107
Bảng 3.55. Thông số sắc ký của chất phân tích, chuẩn nội với thể tích tiêm khảo sát	108
Bảng 3.56. Hiệu suất chiết các chất từ huyết tương thỏ với 2 dung môi tủa (n = 6)	109
Bảng 3.57. Kết quả khảo sát dung môi chiết (n = 6).....	109
Bảng 3.58. Kết quả khảo sát thể tích dung môi chiết n-hexan (n = 6).....	110
Bảng 3.59. Kết quả khảo sát số lần chiết (n = 6)	110
Bảng 3.60. Nồng độ của các hoạt chất trong huyết tương thỏ.....	111
Bảng 3.61. Tóm tắt kết quả thẩm định phương pháp.....	114
Bảng 3.62. Các thông số dược động học trung bình của các chất phân tích.....	116

DANH MỤC CÁC HÌNH, ĐỒ THỊ

	Trang
Hình 1.1. Cây Diệp hạ châu đắng <i>Phyllanthus amarus</i> Schum. et Thonn., Euphorbiacea (trái) và hoa (phải) Diệp hạ châu đắng.....	4
Hình 1.2. Mặt dưới của lá (trái) và các quả (phải) Diệp hạ châu đắng.....	4
Hình 1.3. Công thức hóa học của một số lignan.....	7
Hình 1.4. Đồ thị biểu diễn nồng độ thuốc trong máu theo thời gian.....	26
Hình 2.1. Cho thỏ uống thuốc.....	61
Hình 2.2. Lấy máu tai thỏ.....	61
Hình 3.1. Toàn cây, mặt lá trên, mặt lá dưới và quả của Diệp hạ châu đắng.....	62
Hình 3.2. Sắc ký đồ SKLM khảo sát dung môi chiết.....	64
Hình 3.3. Sắc ký đồ SKLM các phân đoạn của cao DCM.....	66
Hình 3.4. Sắc ký đồ HPLC phân đoạn VII.....	67
Hình 3.5. SKLM phân đoạn VII, PA ₂ và PA ₃	67
Hình 3.6. Sắc ký đồ phân đoạn XII bằng HPLC.....	68
Hình 3.7. Sắc ký đồ HPLC phân đoạn XII bằng SKĐC (ĐK XII-6).....	68
Hình 3.8. SKLM phân đoạn XII, PA ₅ và PA ₆	69
Hình 3.9. Cấu trúc hóa học của niranthin.....	73
Hình 3.10. Cấu trúc hóa học của nirtetralin.....	75
Hình 3.11. Cấu trúc hóa học của hypophyllanthin.....	76
Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của phyltetralin.....	77
Hình 3.13. Công thức hóa học của phyllanthin.....	79
Hình 3.14. Sắc ký đồ tính đặc hiệu xác định độ tinh khiết hypophyllanthin.....	80
Hình 3.15. Sắc ký đồ tính đặc hiệu xác định độ tinh khiết niranthin.....	82
Hình 3.16. Sắc ký đồ tính đặc hiệu xác định độ tinh khiết nirtetralin.....	83
Hình 3.17. Sắc ký đồ HPLC với điều kiện sắc ký trong USP.....	85
Hình 3.18. Sắc ký đồ khảo sát điều kiện HPLC.....	86
Hình 3.19. Sắc ký đồ dịch chiết lần 1, 2, 3, 4 và 5.....	87
Hình 3.20. Sắc ký đồ mẫu trắng (a), mẫu chuẩn (b), mẫu thử (c).....	88

Hình 3.21. Sắc ký đồ mẫu cao chiết từ các loại dung môi	91
Hình 3.22. SKLM khảo sát dung môi chiết ở quy mô phòng thí nghiệm.....	93
Hình 3.23. Biểu đồ khảo sát dung môi chiết ở quy mô phòng thí nghiệm.....	94
Hình 3.24. SKLM khảo sát dung môi chiết ở quy mô pilot	95
Hình 3.25. Biểu đồ khảo sát dung môi chiết ở quy mô pilot.....	95
Hình 3.26. Cao khô Diệp hạ châu đẳng.....	96
Hình 3.27. Sắc ký đồ SKLM định tính cao chuẩn USP	96
Hình 3.28. Sắc ký đồ SKLM định tính các mẫu cao.....	96
Hình 3.29. Biểu đồ thể hiện hàm lượng (%) các lignan trong các mẫu dược liệu .	100
Hình 3.30. Sắc ký đồ mẫu giả lập chứa các chất phân tích và các chuẩn nội khảo sát ở cùng nồng độ 1 µg/mL	102
Hình 3.31. Sắc ký đồ khảo sát cột với các kích thước khác nhau	103
Hình 3.32. Sắc ký đồ khảo sát hệ pha động chứa methanol hoặc acetonitril	103
Hình 3.33. Sắc ký đồ khảo sát loại đệm trong pha động.....	104
Hình 3.34. Sắc ký đồ khảo sát pH của dung dịch đệm amoni format 5 mM	105
Hình 3.35. Sắc ký đồ khảo sát tỉ lệ pha động	106
Hình 3.36. Sắc ký đồ khảo sát nhiệt độ cột	107
Hình 3.37. Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn tương ứng với các tốc độ dòng khảo sát	107
Hình 3.38. Sắc ký đồ tương ứng với các thể tích tiêm khảo sát	108
Hình 3.39. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng	111
Hình 3.40. Sắc ký đồ mẫu huyết tương giả lập ở nồng độ LLOQ.....	112
Hình 3.41. Sắc ký đồ mẫu huyết tương ở nồng độ MQC.....	112
Hình 3.42. Công thức phân tử và phổ khối (ion phân tử và ion phân mảnh) của PLT, HPL, NRT và IS ở cùng nồng độ 1 µg/mL	113
Hình 3.43. Đồ thị biểu diễn nồng độ phyllanthin trung bình theo thời gian	115
Hình 3.44. Đồ thị biểu diễn nồng độ hypophyllanthin trung bình theo thời gian ..	115
Hình 3.45. Đồ thị biểu diễn nồng độ niranthin trung bình theo thời gian.....	116
Hình 4.1. Cấu trúc hóa học các lignan phân lập được	121
Hình 4.2. Sắc ký đồ SKLM đại diện cao chuẩn <i>Phyllanthus amarus</i> USP.....	132
Hình 4.3. Sắc ký đồ HPLC đại diện cao chuẩn <i>Phyllanthus amarus</i> USP	132

DANH MỤC CÁC SƠ ĐỒ

	Trang
Sơ đồ 2.1. Sơ đồ trình tự các nội dung nghiên cứu.....	36
Sơ đồ 2.2. Quy trình chiết xuất cao toàn phần dược liệu	38
Sơ đồ 2.3. Sơ đồ điều chế cao giàu lignan <i>Phyllanthus amarus</i>	50
Sơ đồ 3.1. Quy trình chiết xuất cao toàn phần.....	63
Sơ đồ 3.2. Quy trình chiết cao toàn phần DCM.....	65
Sơ đồ 3.3. Sơ đồ phân lập cao DCM bằng sắc ký cột	66
Sơ đồ 3.4. Phân lập và tinh chế các chất PA ₄ và PA ₇	69
Sơ đồ 3.5. Sơ đồ phân lập và tinh chế các phân đoạn của cao DCM.....	70
Sơ đồ 3.6. Quy trình điều chế cao giàu lignan.....	100

MỞ ĐẦU

Việt Nam có kinh nghiệm từ lâu đời về việc sử dụng dược liệu và chế phẩm có nguồn gốc dược liệu để điều trị bệnh. Nhiều dược liệu đã được sử dụng từ rất lâu qua kinh nghiệm dân gian, kiến thức y học cổ truyền, bài thuốc gia truyền,... Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn., Euphorbiaceae) là một trong những dược liệu được sử dụng rất phổ biến và đã được công nhận sử dụng chẳng những theo Y học Việt Nam mà còn khắp nơi trên thế giới với tác dụng chính là cải thiện chức năng gan ở các đối tượng viêm gan do nhiều nguyên nhân khác nhau, đặc biệt là viêm gan B [4], [21], [53], [56], [76], [100].

Tổ chức y tế thế giới và Dược điển các nước đều đã đưa ra các yêu cầu kiểm tra chất lượng các thuốc từ dược liệu phải dựa trên các kỹ thuật phân tích hiện đại, với việc sử dụng các chất đối chiếu phù hợp [103]. Dược điển Việt Nam V đã có chuyên luận Diệp hạ châu đắng và cao đặc Diệp hạ châu đắng [2]. Dược điển Mỹ hiện hành cũng đã có các chuyên luận dược liệu Diệp hạ châu đắng, bột Diệp hạ châu đắng [98]. Các chuyên luận trên đều có các chỉ tiêu định tính, định lượng sử dụng chất chuẩn đối chiếu là chất điểm chỉ phyllanthin.

Hiện nay, trên thị trường nhiều sản phẩm từ Diệp hạ châu đắng, chủ yếu được bào chế từ nguyên liệu là cao toàn phần, với công dụng là có hiệu quả trong tác dụng bảo vệ gan. Tất cả những sản phẩm này đều công bố chất lượng dựa trên tiêu chuẩn cơ sở tự xây dựng. Đa số, các tiêu chuẩn cơ sở của các thành phẩm được xây dựng chỉ dựa trên việc định lượng hỗn hợp toàn phần bằng phương pháp không đặc hiệu, không đưa được chỉ tiêu định lượng các hợp chất có hoạt tính sinh học cũng như chưa xác định mức hàm lượng cho các chất có hoạt tính trong liều điều trị do thiếu chất chuẩn đối chiếu và chưa có nghiên cứu về dược động học của các chất có hoạt tính sinh học cho các sản phẩm từ dược liệu này. Trong khi tác dụng sinh học của Diệp hạ châu đắng không chỉ do phyllanthin mà còn có hypophyllanthin và niranthin. Các chất này có vai trò hết sức quan trọng trong tác dụng bảo vệ gan, kháng viêm, chống ung thư [30], [67].

Bên cạnh đó, công tác tiêu chuẩn hóa dược liệu hay sản phẩm từ dược liệu còn tương đối khó khăn và đang còn bỏ ngõ trong lĩnh vực kiểm nghiệm do thiếu phương pháp thử, chất chuẩn đối chiếu, cao chuẩn đối chiếu,... Mặt khác, các chất chuẩn đối chiếu chưa sẵn có và giá thành rất cao; phương pháp thử cũng cần xây dựng cho phù hợp với trình độ khoa học kỹ thuật chung của cả thế giới để nâng cao chất lượng các sản phẩm trên. Ngoài ra, nghiên cứu sinh khả dụng nhằm đánh giá các thông số dược động học của chế phẩm từ Diệp hạ châu đắng sẽ giúp minh chứng hỗ trợ điều trị bảo vệ gan hiệu quả hơn.

Do đó, việc phân lập các chất có hoạt tính sinh học làm chất đối chiếu, tiêu chuẩn hóa cao Diệp hạ châu đắng cũng như xác định sinh khả dụng của chế phẩm để làm cơ sở cho việc kiểm tra chất lượng và ước định liều dùng cho các sản phẩm từ Diệp hạ châu đắng là hết sức cần thiết. Từ các lý do trên, đề tài “Thiết lập chất đối chiếu hypophyllanthin, niranthin và đánh giá một số thông số dược động học của cao chuẩn hóa điều chế từ Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn., Euphorbiaceae)” được thực hiện với các mục tiêu cụ thể như sau:

- Chiết xuất, phân lập, tinh chế hypophyllanthin, niranthin từ Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.).
- Thiết lập chất đối chiếu hypophyllanthin, niranthin từ Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.).
- Điều chế và tiêu chuẩn hóa cao Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.).
- Đánh giá một số thông số dược động học của cao chuẩn hóa điều chế từ Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.).

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN DIỆP HẠ CHÂU ĐẮNG

1.1.1. Tên gọi, phân loại [1], [4]

Tên thực vật: Diệp hạ châu đắng.

Tên khác: Chó đẻ răng cưa, chó đẻ thân xanh, cam kiềm, kiền đắng, cỏ trâu châu, rút đất, trâu châu thảo, lão nha châu, diệp hòa thái.

Tên khoa học: *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn., Euphorbiaceae.

Theo hệ thống phân loại của Takhtajan A. năm 2009 [94], cây Diệp hạ châu đắng có vị trí phân loại thực vật như sau:

Giới (regnum)	Plantae
Ngành (division)	Magnoliophyta (ngọc lan)
Lớp (class)	Magnoliopsida (ngọc lan)
Bộ (ordo)	Euphorbiales (thầu dầu)
Họ (familia)	Euphorbiaceae (thầu dầu)
Chi (genus)	<i>Phyllanthus</i>
Loài (species)	<i>Phyllanthus amarus</i> Schum. et Thonn.

1.1.2. Phân bố - sinh thái

Euphorbiaceae là một họ thực vật lớn bao gồm khoảng 6.500 loài trong 300 chi. *Phyllanthus* cũng là một chi lớn, có khoảng 200 loài ở Mỹ, 100 loài ở Châu Phi, 70 loài ở Madagascar, phần còn lại ở châu Á và châu Úc. Diệp hạ châu đắng là cây ưa sáng, ưa ẩm nhưng không chịu được ngập úng. Cây sống được trên nhiều loại đất (đất bazan, đất pha cát, đất cát, đất phù sa...) pH từ 5,0 đến 6,5. Biên độ nhiệt thích hợp cho cây sinh trưởng là 25-30 °C. Cây ra hoa quả nhiều, tái sinh tốt từ hạt, vòng đời kéo dài 3-5 tháng. Trong tự nhiên, cây thường mọc trên đất ẩm ở ven đồi, trên nương rẫy, bãi hoang hay ven đường đi và quanh làng bản, ở cả miền núi lẫn trung du và đồng bằng [21].

1.1.3. Đặc điểm thực vật

Cây thảo cao 40-80 cm, thân tròn, bóng, màu xanh, phân nhánh đều, nhiều. Lá mọc so le xếp thành hai dãy sát nhau trông như lá kép hình lông chim. Phiến lá hình bầu dục, dài từ 5 mm đến 10 mm, rộng 3 mm đến 6 mm, màu xanh thẫm ở mặt trên,

màu xanh nhạt ở mặt dưới. Hoa đực và hoa cái mọc thành cụm. Hoa đực có cuống ngắn 1 mm đến 2 mm, đài 5, có tuyến mật, nhị 3, chỉ nhị dính nhau. Hoa cái có cuống dài hơn hoa đực. Quả nang, nhẵn, hình cầu, đường kính 1,8 mm đến 2 mm, có đài tồn tại. Quả chứa 6 hạt hình tam giác, đường kính 1 mm, hạt có sọc dọc ở lưng [1].



Hình 1.1. Cây Diệp hạ châu đẳng *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn., Euphorbiaceae (trái) và hoa (phải) Diệp hạ châu đẳng



Hình 1.2. Mặt dưới của lá (trái) và các quả (phải) Diệp hạ châu đẳng

1.1.4. Bộ phận dùng, gieo trồng, thu hái [4].

Bộ phận dùng: Toàn cây - *Herba Phyllanthi amari*

Gieo trồng: Gieo hạt ở vườn ươm: tháng 1-2, trồng cây con: tháng 2-3, thu hoạch: tháng 4-5 (sau khi trồng 45-50 ngày). Nhìn chung, thời vụ trồng Diệp hạ châu đẳng kéo dài cả mùa khô, tận dụng trời nắng để phơi.

Thu hái: Sau khi trồng khoảng 45-50 ngày, cây Diệp hạ châu đẳng cao 60-70 cm là thu hoạch. Năng suất đạt 10-12 tấn tươi/ha/vụ. Một năm có thể trồng 2 vụ. Diệp hạ châu đẳng là cây thuốc dễ trồng, cây không kén đất.

1.1.5. Thành phần hóa học trong Diệp hạ châu đẳng

Thành phần hóa học của *Phyllanthus amarus* bao gồm: lignan, alkaloid, flavonoid, tannin thủy phân (Ellagitannin), polyphenol, triterpen, sterol và tinh dầu, như bảng liệt kê trong Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Thành phần hóa học trong Diệp hạ châu đắng

Nhóm	Hoạt chất	Tài liệu
Alkaloid	Epibubbialin, isobubbialin, norsecurinin, securinin, securinol, 4-methoxy-nor-securinin, dihydrosecurinin, allo-securin, tetrahydrosecurinin, 4-methoxy dihydrosecurinin, 4-hydrosecurinin, 4-methoxy tetrahydrosecurinin	[8], [46]
Flavonoid	Quercetin, rhamnocitrin, rutin, apigenin, luteolin, kaempferol, allocatechin, astragalin, quercetin-3-O-glucosid, quercitrin, 4',5,7-triethoxy-3,3',6-trimethoxy flavon, phyllanthusiin	[5], [47], [89]
Lignan	Phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin, phyltetralin, nirtetralin, isonirtetralin, hinokinin, lintetralin, isolintetralin, demethylenedioxy niranthin, 5-demethoxy-niranthin, 7'-oxocubebin dimethyl ether, (3-(3,4-dimethoxybenzyl)-4-(7-methoxybenzo[1,3]dioxol-5-yl-methyl)-dihydrofuran-2-on, và 4-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-(7-methoxybenzo[1,3]dioxol-5-yl)-2,3-bismethoxymethylbutan-1-ol.	[10], [53], [54], [81], [84], [85], [90], [91].
Sterol	Amarosterol A, amarosterol B, cycloeucalenyl acetat, macdougallin, ergosta-5,7,22-trien-3-ol acetat, 17-(1,5-dimethylhexyl)-6-hydroxy-5-methylestr-9-en-3-yl acetat, stigmasterol, β -sitosterol, daucosterol, stigmast-5-en-3-ol oleat, 6,7-epoxypregn-4-en-9,11,18-triol-3,20-dion, 11,18-diacetat, bufalin, 3-acetoxy-7,8-epoxylanostan-11-ol	[47]
Tannin và phenol	Amariin, acid amariinic, amarulon, corilagin, geraniin, acid geranic, furosin, phyllanthusiin A, B, C và D, acid ellagic, acid repandusinic, elaeocarpusin, acid 4-galloyl quinic, acid gallic, galocatechin, 1,6-digalloylglucopyranose, acid 4-O-galloylquinic, acid quinic, acid geraniinic B, cidrepandusinic A, isocorilagin, melatonin.	[47]
Terpenoid	Phyllanosid, 2Z, 6Z, 10Z, 14E, 18E, 22E-farnesyl farnesol, linalool, phytol, olean-13(18)-en, methyl ursolat, barringenol R1, Phenazin và dẫn chất phenazin 2Z, 6Z, 10Z, 14E, 18E, 22E-farnesyl farnesol, lupeol, phyllanthenol, phyllanthenon, phyllantheol, acid oleanolic, acid ursolic	[47], [56]
Nhóm khác	Acid cinnamic, acid 4-hydroxy-3-methoxy-benzoic, acid brevifolin carboxylic, rhodopin	[47]

1.1.6. Tính chất lý hóa một số hợp chất lignan

1.1.6.1. Phyllanthin [105]

Công thức phân tử: $C_{24}H_{34}O_6$

Phyllanthin (IUPAC): 4-[(2S,3S)-3-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-4-methoxy-2-(methoxymethyl)butyl]-1,2-dimethoxybenzen

CAS: 10351-88-9

Khối lượng phân tử: 418,5 g/mol

Hệ số log P_{ow} : 3,2

Tính tan: tan trong dung môi hữu cơ như cloroform, methanol, ethanol, kém tan trong nước

Điểm chảy: 96 °C

1.1.6.2. Hypophyllanthin [105]

Công thức phân tử: $C_{24}H_{30}O_7$

Hypophyllanthin (IUPAC): (7*R*,8*R*,9*S*)-9-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methoxy-7,8-bis(methoxymethyl)-6,7,8,9-tetrahydrobenzo[*g*][1,3]benzodioxol

CAS: 33676-00-5

Khối lượng phân tử: 430,5 g/mol

Hệ số log P_{ow} : 3,6

Tính tan: Tan trong dung môi hữu cơ như cloroform, dicloromethan, ethyl acetat, dimethylsulfoxid, aceton ~ 0,2 trong ethanol, ~10 mg/mL trong dimethylsulfoxid, ~ 30 mg/mL trong dimethylformamid.

1.1.6.3. Niranthin [105]

Công thức phân tử: $C_{24}H_{32}O_7$.

Niranthin (IUPAC): 6-[(2*R*,3*R*)-3-[(3,4-dimethoxyphenyl)methyl]-4-methoxy-2-(methoxymethyl)butyl]-4-methoxy-1,3-benzodioxol.

CAS: 50656-77-4

Khối lượng phân tử: 432,5 g/mol

Hệ số log P_{ow} : 4,1

Tính tan: Tan trong dung môi cloroform, dicloromethan, ethyl acetat, dimethylsulfoxid, aceton.

1.1.6.4. Nirtetralin [105]

Công thức phân tử: $C_{24}H_{30}O_7$

Nirtetralin (IUPAC): (5*R*,6*S*,7*S*)-5-(3,4-dimethoxyphenyl)-4-methoxy-6,7-bis(methoxymethyl)-5,6,7,8-tetrahydrobenzo[*f*][1,3]benzodioxol

CAS: 50656-78-5

Khối lượng phân tử: 430,5 g/mol

Hệ số log P_{ow} : 3,6

Tính tan: Tan trong dung môi cloroform, dicloromethan, ethyl acetat, dimethylsulfoxid, aceton.

1.1.6.5. Phylltetralin [105]

Công thức phân tử: $C_{24}H_{32}O_6$

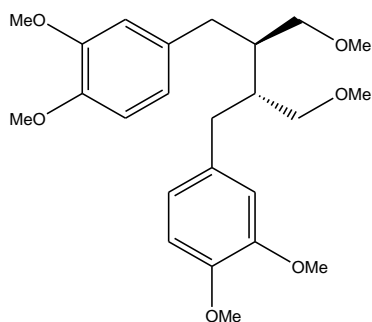
Phylltetralin (IUPAC): ((1*R*,2*S*,3*S*)-1-(3,4-dimethoxyphenyl)-6,7-dimethoxy-2,3-bis(methoxymethyl)-1,2,3,4-tetrahydronaphthalen

CAS: 123048-17-9

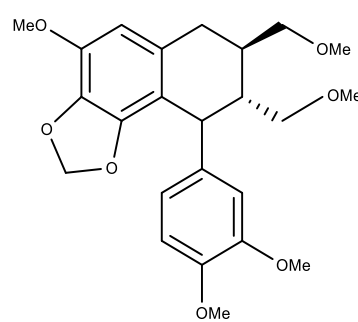
Khối lượng phân tử: 416,5 g/mol

Hệ số log P_{ow} : 3,8

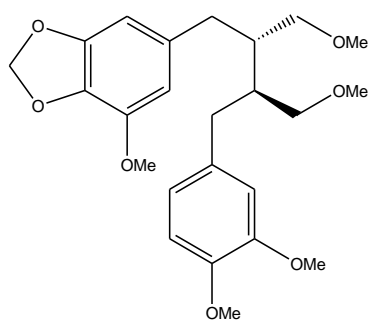
Tính tan: Tan trong: cloroform, dicloromethan, ethyl acetat, dimethylsulfoxid, aceton.



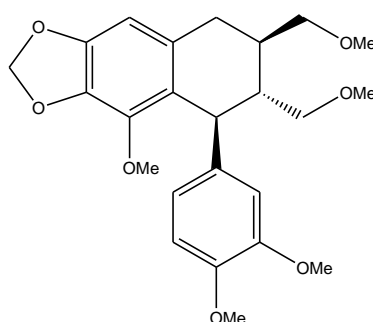
Phyllanthin



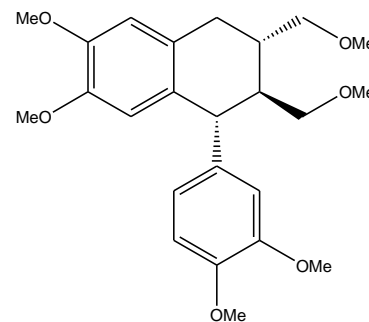
Hypophyllanthin



Niranthin



Nirtetralin



Phylltetralin

Hình 1.3. Công thức hóa học của một số lignan

1.1.7. Tác dụng sinh học

Diệp hạ châu đáng là một thảo dược đã được sử dụng làm thuốc từ lâu đời. Thành phần hóa học của cây rất phong phú, đa dạng, có chứa nhiều nhóm chất như alkaloid, flavonoid, lignan, tannin thủy phân (ellagitannin), polyphenol, triterpen,

sterol và tinh dầu. Diệp hạ châu đắng có nhiều tác dụng dược lý có ích trong điều trị bệnh, đã có rất nhiều công trình khoa học nghiên cứu về tác dụng dược lý của cây Diệp hạ châu đắng như tác dụng bảo vệ tế bào gan, trị viêm gan, hoạt tính kháng khối u, tác dụng kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm và ký sinh trùng. Ngoài ra, còn có hoạt tính kháng HIV, chống oxy hóa, hạ đường huyết và cholesterol trong máu.

Nhiều công trình nghiên cứu về tác dụng của *Phyllanthus amarus* trong nước cũng như trên thế giới, có thể liệt kê trong bảng sau:

Bảng 1.2. Tác dụng sinh học cây Diệp hạ châu đắng

Tác dụng sinh học	Tài liệu tham khảo
Bảo vệ tế bào gan, trị viêm gan	[36], [50], [56], [60], [68], [79], [83], [93], [96], [100]
Hoạt tính kháng khối u	[11], [35], [37], [45], [49], [68]
Chống oxy hóa	[39], [51], [104], [64], [65], [66], [87]
Hoạt tính kháng HIV	[32], [42], [57], [73]
Tác dụng kháng khuẩn, kháng nấm và ký sinh trùng	[14], [16], [70], [69], [71], [77], [86], [99], [104]
Kháng viêm, giảm đau	[21], [30], [41], [42], [55], [68], [88]
Tiểu đường	[12], [13], [27], [72], [95]
Tim mạch, hạ huyết áp	[24], [33], [80]

1.1.8. Độc tính và chống chỉ định

Diệp hạ châu đắng không có độc tính được ghi nhận. Kushwaha S.K. và cộng sự đã thực hiện thử nghiệm độc tính cấp với liều 300, 600, 2000 và 5000 mg/kg trọng lượng cơ thể trên chuột của dịch chiết *Phyllanthus amarus* bằng đường uống. Kết quả xác nhận không có trường hợp tử vong nào được ghi nhận và nghiên cứu cho thấy không có thay đổi đáng kể về hành vi chung, trọng lượng cơ thể, hình dáng tổng thể của các cơ quan nội tạng, các chỉ số huyết học và sinh hóa cũng như cấu trúc mô học của gan cũng cho thấy bản chất không độc hại của chế phẩm này. Các nghiên cứu sinh hóa cho thấy không có sự thay đổi đáng kể về nồng độ ALT, AST, albumin, triglycerid, cholesterol và albumin. Không có bằng chứng nào được tìm thấy về xuất huyết, tổn thương tế bào gan, biến đổi mỡ, hoại tử trung tâm hay thay đổi số lượng tế

bào Kupffer trong gan. Không có tăng huyết áp, không gây độc cấp tính cho thận hay nhiễm độc gan [48].

1.2. CÁC PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VỀ CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP, TINH CHẾ HỢP CHẤT LIGNAN TỪ DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG

1.2.1. Các nghiên cứu về quy trình chiết xuất

1.2.1.1. Chiết xuất bằng dung môi hữu cơ

Dung môi hữu cơ là dung môi đầu tay trong các nghiên cứu chiết xuất hoạt chất từ dược liệu. Tùy vào nhóm hoạt chất mong muốn chiết xuất, bộ phận, loại dược liệu mà nhà nghiên cứu lựa chọn loại dung môi, kỹ thuật thích hợp. Một số tác giả nghiên cứu chiết bằng Soxhlet, đa số thì chiết bằng phương pháp ngâm ở nhiệt độ thường, áp suất thường. Có một số tác giả ứng dụng biện pháp kỹ thuật đặc biệt có thể làm rút ngắn thời gian chiết như: siêu âm, phương pháp tạo dòng xoáy và phương pháp mạch nhịp [7].

1.2.1.2. Chiết xuất bằng chất lỏng siêu tới hạn

Những năm gần đây, phương pháp chiết xuất bằng chất lỏng siêu tới hạn (*super-critical fluid extraction*, SFE) thường được áp dụng để chiết xuất các hợp chất tự nhiên quý có trong các loài thực vật có chứa nhiều các hợp chất trong đó.

Tác giả Pereira R. G. và cộng sự đã dùng CO₂ lỏng siêu tới hạn để chiết xuất phyllanthin và niranthin ở các áp suất khác nhau (10, 20, 30 MPa) và nhiệt độ (30, 40, 50 °C) và có so sánh với điều kiện có bổ sung 10 % kết hợp dung môi ethanol - nước (50: 50) nhận thấy rằng ở điều kiện có bổ sung kết hợp dung môi làm tăng tốc độ thu hồi các lignan nhưng tính chọn lọc giảm (nhiều tạp khác) và nhiệt độ, áp suất không ảnh hưởng đáng kể đến năng suất chiết trong trường hợp kết hợp dung môi [78].

1.2.1.3. Chiết hỗ trợ vi sóng

Chiết xuất có hỗ trợ vi sóng (*Microwave Assisted Extraction*, MAE) ngày càng nhận được sự quan tâm như một phương pháp thay thế tiềm năng cho các phương pháp chiết lỏng - rắn truyền thống, chủ yếu do tiết kiệm đáng kể thời gian xử lý và lượng dung môi tiêu thụ. Chiết xuất dưới hỗ trợ vi sóng (MAE) hay đơn giản là chiết xuất bằng vi sóng là một kỹ thuật chiết xuất tương đối mới kết hợp chiết xuất bằng vi

sóng và dung môi. Trong quá trình gia nhiệt bằng vi sóng, sự truyền năng lượng xảy ra theo hai cơ chế: quay lưỡng cực và dẫn ion thông qua sự đảo ngược của các lưỡng cực và sự dịch chuyển của các ion tích điện có trong chất tan và dung môi.

MAE là một quá trình sử dụng năng lượng vi sóng để làm nóng dung môi tiếp xúc với mẫu nhằm phân tách các chất phân tích từ nền mẫu vào dung môi. Trong chiết xuất, chiếu xạ vi sóng vào môi trường có chứa các tiểu phân dược liệu và dung môi phân cực, các phân tử dung môi và các chất phân cực sẽ dao động và nóng lên nhanh chóng làm tăng khả năng hòa tan các chất vào dung môi. Thêm vào đó, vi sóng cũng làm phá hủy cấu trúc vách tế bào thực vật làm các chất tan giải phóng trực tiếp vào dung môi chiết làm cho quá trình chiết chuyển thành hòa tan đơn giản. Điều này làm cho việc chiết xuất nhanh hơn nhưng cũng làm dịch chiết nhiều tạp chất hơn [27].

Gần đây, nhiều báo cáo đã được thực hiện về việc áp dụng MAE trong việc chiết xuất các sản phẩm tự nhiên, chẳng hạn như sennosid từ lá muồng trâu, chất chống oxy hóa từ vỏ khoai tây, pectin từ bã táo, flavonoid từ rễ hoàng kỳ, phyllanthin từ *Phyllanthus amarus*.

1.2.1.4. Chiết dưới áp suất cao

Một kỹ thuật chiết hiện nay cũng được sử dụng trong chiết xuất hiện đại là chiết dưới áp suất cao (*Pressurized Liquid Extraction – PLE*). Khả năng hòa tan của các chất trong dung môi phụ thuộc nhiều vào nhiệt độ. Khi nhiệt độ tăng, khả năng hòa tan các chất tăng nên có thể giảm lượng dung môi sử dụng và giảm thời gian chiết. Tuy nhiên, trong điều kiện bình thường, việc tăng nhiệt độ để chiết phụ thuộc vào nhiệt độ sôi của dung môi và khi dung môi hóa hơi thì khả năng hòa tan các chất không còn nữa. Để khắc phục điều này, người ta tiến hành chiết các chất dưới áp suất cao dựa vào nguyên tắc: nhiệt độ sôi của chất lỏng tăng khi áp suất tăng. Nhiệt độ và áp suất cao làm tăng khả năng hòa tan và khuếch tán của dung môi để cho việc chiết xuất hiệu quả hơn [68].

Ngoài dung môi, phương pháp chiết xuất ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình chiết và lượng hoạt chất mong muốn cần lấy, phương pháp thu hoạch và sơ chế dược liệu trước khi chiết xuất cũng ảnh hưởng lớn đến hiệu quả của quá trình.

1.2.2. Các quy trình tinh sạch, tinh khiết hóa

Thông thường sau khi phân lập, độ tinh khiết của chất thường đạt được trên 80 %. Quá trình tinh chế làm sạch nhằm tăng độ tinh khiết, loại tiếp các vết tạp hoặc phần chất phân lập kèm theo, chưa thể hoặc không thể loại hết trong điều kiện phân lập. Các nhà nghiên cứu thường muốn phân lập được các chất ở dạng tinh khiết để có thể xác định cấu trúc hóa học bằng các phương pháp hóa lý hiện đại. Do đó, độ tinh khiết của các chất cần phải đạt trên 95 %, độ tinh khiết này càng cao kết quả xác định cấu trúc càng chính xác. Tuy nhiên, trong quá trình phân lập, có rất nhiều trường hợp dù đã qua rất nhiều công đoạn, thậm chí thực hiện sắc ký cột nhiều lần vẫn chưa thu được chất tinh khiết. Để đáp ứng yêu cầu về độ tinh khiết cần phải tinh chế lại các hợp chất này. Tùy thuộc vào bản chất lý hóa của các hợp chất cần phân lập mà lựa chọn phương pháp tinh chế phù hợp. Các phương pháp tinh chế có thể thực hiện:

- Đơn giản nhất là áp dụng tính tan và kết tinh sử dụng các dung môi ở điều kiện nóng để hòa tan chọn lọc tạp và loại bỏ tạp bằng cách lọc lấy chất; hoặc có thể hòa tan chất, lọc loại bỏ tạp ít tan, sau đó kết tinh lại chất. Kỹ thuật này cũng là kỹ thuật cơ bản và thường được áp dụng.

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

- Tiến hành sắc ký cột như giai đoạn phân lập, nhưng thay đổi kiểu sắc ký, ví dụ như giai đoạn phân lập sử dụng sắc ký hấp phụ pha thuận trên silica gel, giai đoạn tinh chế sử dụng sắc ký phân bố pha đảo trên C8, C18 hoặc sử dụng sắc ký thấm qua gel.

- Tiến hành phương pháp sắc ký hệ thống sắc ký bán điều chế/ điều chế tự động và cột bán điều chế/ điều chế loại hiệu năng cao chuyên dụng.

1.2.3. Các công trình nghiên cứu chiết xuất, phân lập hợp chất lignan từ cây Diệp hạ châu đắng

Công trình nghiên cứu ngoài nước

Năm 2003, Kassuya C. A. L. và cộng sự đã dùng dung môi n-hexan chiết 1 kg bột lá *Phyllanthus amarus* bằng cách ngâm và cô dưới áp suất giảm thu được 55 g

cao chiết n-hexan. Lấy 20 g cao chiết n-hexan cho hấp phụ qua cột silica gel 60, pha động là n-hexan – ethyl acetat (70 : 30) thu được 5 phân đoạn. Phân đoạn 4 và 5 giàu lignan được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh (5 cm), sử dụng silica gel 60 (0,04 - 0,063 mm) và rửa giải bằng hỗn hợp dung môi n-hexan – ethyl acetat với tỉ lệ tăng dần (90 : 10), (89 : 11), (88 : 12) và (85 : 15), xác định bằng SKLM thu được 5 lignan gồm: nirtetralin, niranthin, hypophyllanthin, phyltetralin và phyllanthin [40].

Năm 2007, Maciel M. A. M. và cộng sự đã chiết toàn cây *Phyllanthus amarus* (124,5 g) bằng phương pháp ngâm kiệt với methanol, cô chân không dịch chiết thu được cao methanol 13,6 % (16,9 g) và cho qua cột silica gel (230-280 mesh) thu được tổng cộng 43 phân đoạn. Phân đoạn 36-43 giàu lignan sẽ được rửa giải bằng hỗn hợp hexan - ethylacetat với tỉ lệ (50:50 - 0:100) và thu được 6 lignan: isolintetralin (2,3-demethoxy-seco-isolintetralin diacetat), demethylenedioxy-niranthin, 5-demethoxy-niranthin, niranthin, phyllanthin and hypophyllanthin [52].

Năm 2008, Srivastava V. và cộng sự đã xây dựng quy trình chiết xuất các lignan từ *Phyllanthin amarus* như sau: Lấy 4,0 kg phần cây trên mặt đất đã phơi khô và nghiền thành bột mịn đem chiết ở nhiệt độ phòng (25 ± 3 °C) với ethanol (10 L \times 3) bằng phương pháp ngâm kiệt; dịch chiết ethanol được cô chân không để thu được cặn (804 g). Thêm nước, sau đó chiết phân đoạn với n-hexan, cloroform và n-butanol. Cao phân đoạn n-hexan (290 g) được tiến hành sắc ký cột trên silica gel (1,5 kg; 60-120 mesh). Quá trình rửa giải được thực hiện với nhiều tỷ lệ n-hexan và ethyl acetat. Phân đoạn 312 – 318 và phân đoạn 337 – 341 được rửa giải bằng n-hexan – ethyl acetat (90 : 10, tt/tt), lần lượt thu được các hợp chất C (300 mg) và D (200 mg). Các phân đoạn 373 – 439 của n-hexan – ethyl acetat (90 : 10 và 85 : 15) thu được hợp chất B (1,60 g), trong khi các phân đoạn 454 – 529 của n-hexan – etyl axetat (80) thu được hợp chất A (6,10 g). Các chất A và B được tinh chế bằng sự kết tinh của hỗn hợp cloroform – methanol. Các hợp chất C và D không kết tinh và được tinh chế bằng sắc ký lỏng điều chế: Shimadzu LC-8A; Detector PDA, cột: 25 cm \times 21,2 mm (Supelcosil™ L-18, 12 μ m), dung môi pha động: methanol – nước (70 : 30), tốc độ dòng: 15 mL/phút, phát hiện 220 nm; hợp chất C ($R_t = 20,18$ phút) và hợp chất D ($R_t = 18,97$ phút). Cấu trúc của các hợp chất A – D đã được chứng minh bằng cách so

sánh dữ liệu phổ với dữ liệu phổ đã công bố của phyllanthin (A), hypophyllanthin (B), niranthin (C), and nirtetralin (D) [92].

Năm 2010, Hamrapurkar P. và cộng sự đã chiết xuất phyllanthin từ *Phyllanthus amarus* bằng phương pháp Soxhlet: Nguyên liệu bột của toàn cây được chiết với methanol bằng thiết bị Soxhlet và dịch chiết được pha loãng thích hợp với methanol; và bằng phương pháp chiết xuất lỏng siêu tới hạn (SFE): Nguyên liệu bột toàn cây qua rây 40 mesh (1,0 g) được chuyển vào bình trích ly của SFE. Nguyên liệu được chiết xuất bằng CO₂ siêu tới hạn với các điều kiện tối ưu hóa là: khí CO₂, áp suất 150 bar và tốc độ dòng 2,5 mL/ phút, nhiệt độ 45 °C, dung môi methanol, tốc độ dòng 0,2 mL/ phút [29].

Năm 2013, Parvathaneni M. và cộng sự đã chiết bột toàn cây *Phyllanthus amarus* (5 kg) bằng phương pháp Soxhlet với n-hexan. Dịch chiết được cô chân không ở 40 °C đến cạn. Cao n-hexan (25 g) được phân đoạn qua sắc ký cột silica gel (100 x 3,5 cm) với dung môi rửa giải lần lượt n-hexan (100 %), n-hexan – ethyl acetat (95 : 5) và n-hexan – ethyl acetat (90 : 10). Kiểm tra các phân đoạn bằng SKLM. Gộp các phân đoạn giống nhau đem cô và tinh chế bằng sắc ký lỏng điều chế, thu được phyllanthin và hypophyllanthin với độ tinh khiết > 95 % [74].

Năm 2013, Yuandani và cộng sự đã ngâm bột toàn cây *Phyllanthus amarus* (500 g) với methanol tỉ lệ (1 : 10), chiết 3 lần. Cô các dịch chiết dưới áp suất giảm thu được cao. Phân đoạn cao bằng sắc ký cột chân không trên cột silica gel H (30 x 7 cm, 10-40 μ m) với hệ pha động n-hexan – cloroform (10 : 0 \rightarrow 1 : 9) và cloroform – methanol (10 : 0 \rightarrow 0 : 10). Tiếp tục phân lập cao phân đoạn thu được bằng sắc ký cột (60 x 3 cm, 40-63 μ m) với hệ pha động n-hexan – ethyl acetat (10 : 0 \rightarrow 1 : 9). Tinh chế bằng kết tinh dung môi với ethyl acetat - n-hexan thu được 115 mg phyllanthin và 235,5 mg hypophyllanthin với độ tinh khiết > 98 % [102].

Năm 2014, Liu S. và cộng sự đã dùng ethanol 80 % (300 L x 3) để chiết xuất toàn cây *Phyllanthus niruri* (100 kg bột khô) trong hai ngày. Dịch chiết được cô dung môi dưới chân không thu được (10,2 kg). Hòa cồn trong nước và chiết bằng ether dầu hỏa. Cô thu hồi ether dầu hỏa, thu được (3,1 kg), hòa cồn với ethanol – nước (3 : 2). Loại dung môi thu được 450 g cồn, dùng cồn này để tiến hành sắc ký cột (10 kg silica

gel, 200-300 mesh) với pha động là ether dầu hỏa – ethyl acetat, thu được 6 phân đoạn. Lấy 5 g ở phân đoạn 6 được tiếp tục cho qua sắc ký cột (2 kg silicagel, 200-300 mesh) với hệ dung môi ether dầu hỏa – ethyl acetat (2 : 1) để phân lập được niranthin. Thực hiện tương tự 5 lần và thu được 4,1 g niranthin có độ tinh khiết 99 % [50].

Năm 2016, Garg C. và cộng sự đã nghiên cứu dự đoán các điều kiện tối ưu để chiết xuất phyllanthin dưới hỗ trợ vi sóng (MAE) từ *Phyllanthus amarus* bằng cách sử dụng phương pháp đáp ứng bề mặt (RSM). Áp dụng thiết kế mô hình lập tâm để xác định ảnh hưởng của thời gian chiết xuất, công suất chiếu xạ và nồng độ methanol đến lượng phyllanthin. Các điều kiện chiết xuất tối ưu đã được dự đoán là nồng độ methanol 65 %, công suất chiếu xạ 60 % và thời gian chiết 3 phút. Hàm lượng phyllanthin 0,063 % thu được cao hơn so với chiết xuất Soxhlet và chiết ngâm dầm (marceration) [27].

Năm 2019, Noor M.A.N. và cộng sự đã chiết xuất, phân lập hypophyllanthin, niranthin và lintetralin từ *Phyllanthus amarus* như sau: Toàn cây *Phyllanthus amarus* khô (2,01 kg) được nghiền thành bột. Chiết liên tục bằng ethanol trong 3 ngày và lặp lại ba lần ở nhiệt độ phòng và lọc. Dịch chiết ethanol thu được (95,8 g) sau đó được chiết phân đoạn qua các dung môi hexan, ethyl acetat và methanol. Cô loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm và thu được cao. Cao hexan và ethanol đã được kiểm tra hàm lượng thành phần hóa học bằng cách sử dụng SKLM và phát hiện vết bằng acid sulfuric 10 %. Sau đó, các cao được sắc ký cột trên silica gel sử dụng hỗn hợp n-hexan, n-hexan - diclometan, diclometan và diclometan - methanol làm dung môi rửa giải. Tinh chế bằng sắc ký điều chế pha đảo thu được ba hợp chất. Hợp chất hypophyllanthin thu được từ cao hexan, hợp chất niranthin và lintetralin thu được từ cao ethanol [67].

Công trình nghiên cứu trong nước

Năm 2008, tác giả Huỳnh Ngọc Thụy đã xây dựng quy trình chiết cao toàn phần từ Diệp hạ châu đáng có tác dụng hạ enzym gan và được dùng để tách các phân đoạn theo định hướng tác dụng sinh học như sau: từ 10 kg dược liệu thân và lá chiết xuất với dung môi ethanol thu được 1,2 kg cao chiết A (hiệu suất 12 %). Từ cao chiết A thu được 0,55 kg cao chiết B (phần tan trong ethanol - nước) và 0,45 kg cao chiết

C (phần không tan trong ethanol - nước). Định tính thành phần cao chiết B cho thấy có sự hiện diện của các alkaloid. Từ cao chiết toàn phần B được tách các phân đoạn và đã phân lập được 6 hợp chất tinh khiết gồm: 500 mg nirurin, 10 mg epibubbialin, 30 mg phyllanthin, 6 mg acid *p*-coumaric, 1000 mg acid galic và 15 mg uracil [8].

Năm 2010, nhóm tác giả Trần Anh Tuấn đã nghiên cứu thành phần hóa học có hoạt tính sinh học từ dịch chiết methanol của *Phyllanthus amarus* và phân lập được 7 hợp chất gồm: 75 mg quercetin, 21 mg astragalin, 14 mg quercitrin, 17 mg isoquercitrin, 6,5 mg pinosresinol, 10 mg syringaresinol và 24 mg hypophyllanthin [10].

Năm 2012, nhóm tác giả Lữ Thị Kim Chi và Nguyễn Ngọc Vinh đã nghiên cứu khảo sát chiết xuất từ cây Diệp hạ châu bằng phương pháp chiết nóng với dung môi dicloromethan trên qui mô lớn từ 9,0 kg dược liệu thu được 110,36 g cao đặc dicloromethan. Tiến hành sắc ký cột của 60 g cao đặc dicloromethan, thu được phân đoạn 9 và 10, cô loại dung môi xuất hiện tủa kết tinh hình kim. Sau đó, tinh chế tủa nhiều lần bằng methanol và thu được 890 mg hợp chất phyllanthin tinh sạch và thiết lập đánh giá dùng làm chất chuẩn [3].

Nhận xét: *Phyllanthus amarus* có lịch sử sử dụng lâu đời trong y học cổ truyền và phyllanthin là một trong những hợp chất có tác dụng mạnh của nó. Đa số các công trình nghiên cứu dùng bột toàn cây *Phyllanthus amarus* để chiết xuất cao giàu lignan bằng phương pháp ngâm hoặc ngấm kiệt hoặc Soxhlet với dung môi n-hexan, methanol, ethanol. Phân lập các hợp chất lignan từ cao phân đoạn qua sắc ký cột. Tinh chế các chất phân lập bằng một trong các phương pháp: kết tinh dung môi, sắc ký cột, sắc ký lỏng điều chế thu được các hợp chất lignan chính của *Phyllanthus amarus* như: phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin, nirtetralin, phyltetralin với độ tinh khiết > 95 %.

Bảng 1.3. Các công trình chiết xuất, phân lập các hợp chất lignan

Tác giả, năm công bố	Hợp chất lignan phân lập được	Dung môi chiết	Phương pháp phân lập, tinh chế	TLTK
Kassuya và cộng sự (2003)	Nirtetralin Niranthin Hypophyllanthin Phyltetralin Phyllanthin	n-hexan	Sắc ký cột nhanh bằng hỗn hợp dung môi n-hexan – ethyl acetat	[40]
Maciel M. A. M. và cộng sự (2007)	Phyllanthin Hypophyllanthin Niranthin Isolintetralin Demethylenedioxy-niranthin 5-demethoxy-niranthin	Methanol	Sắc ký cột bằng hỗn hợp dung môi n-hexan – ethyl acetat	[52]
Srivastava V. và cộng sự (2008)	Phyllanthin Hypophyllanthin Niranthin Nirtetralin	Ethanol	Sắc ký cột bằng hỗn hợp dung môi n-hexan – ethyl acetat Tinh chế bằng kết tinh dung môi với hỗn hợp cloroform – methanol và sắc ký lỏng điều chế.	[92]
Hamrapurkar P. và cộng sự (2010)	Phyllanthin	Methanol	Soxhlet CO ₂ siêu tới hạn	[29]
Lữ Thị Kim Chi và cộng sự (2012)	Phyllanthin	Dicloromethan	Sắc ký cột Tinh chế bằng kết tinh dung môi	[3]
Parvathaneni M. và cộng sự (2013)	Phyllanthin Hypophyllanthin	n-hexan	Soxhlet Phân lập bằng sắc ký cột với hỗn hợp dung môi n-hexan – ethyl acetat Tinh chế bằng sắc ký lỏng điều chế	[74]
Yuandani và cộng sự (2013)	Phyllanthin Hypophyllanthin	Methanol	Phân lập bằng sắc ký cột chân không, sắc ký cột Tinh chế kết tinh dung môi với ethyl acetat – n-hexan	[102]
Liu S. và cộng sự (2014)	Niranthin	Ethanol 80 %	Phân lập và tinh chế bằng sắc ký cột với hệ dung môi ether dầu hòa – ethyl acetat	[50]
Garg C. và cộng sự (2016)	Phyllanthin	Methanol	Hỗ trợ vi sóng (MAE)	[27]
Noor M.A.N. và cộng sự (2019)	Hypophyllanthin Niranthin Lintetralin	n-hexan Ethanol	Sắc ký cột với dung môi n-hexan và methanol Tinh chế bằng sắc ký điều chế	[67]

1.3. CÁC PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG CÁC HỢP CHẤT LIGNAN TRONG DIỆP HẠ CHÂU

1.3.1. Trong mẫu dược liệu

Công trình nghiên cứu ngoài nước

Năm 2006, Arvind K. T. và cộng sự đã khảo sát phương pháp HPTLC để khả năng phân tách tốt giữa phyllanthin và hypophyllanthin từ các hợp chất khác ở các loài *Phyllanthus* khác nhau. Việc tách phyllanthin và hypophyllanthin được thực hiện trên silica gel 60 F₂₅₄, rửa giải bằng hệ dung môi khai triển n-hexan – acetone – ethyl acetat (74 : 12 : 8), phát hiện bằng phun thuốc thử vanilin trong acid sulfuric đậm đặc và ethanol. Quá trình quét và định lượng các vết (spots) được thực hiện ở bước sóng 580 nm. Tỷ lệ thu hồi của phyllanthin và hypophyllanthin lần lượt là 98,7 % và 97,3 %. Phương pháp này đã được thẩm định xác định độ tinh khiết đỉnh, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng [17].

Năm 2006, Dhalwal K. và cộng sự đã xây dựng phương pháp HPTLC để định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin, acid gallic và acid ellagic trong cây *Phyllanthus amarus* và hàm lượng các chất tìm thấy lần lượt tương ứng là 0,37 %; 1,16 %; 0,36 % và 0,17 %. Phương pháp đã được thẩm định về độ chính xác, độ lặp lại và độ đúng. Độ chính xác của phương pháp lần lượt tương ứng là 1,01 %; 0,79 %; 0,98 % và 1,06 % đối với phyllanthin, hypophyllanthin, acid gallic và acid ellagic. Độ đúng của phương pháp lần lượt tương ứng là 99,09 %; 99,27 %; 98,69 % và 100,49 % đối với phyllanthin, hypophyllanthin, acid gallic và acid ellagic. Phương pháp HPTLC được đề xuất đơn giản, chính xác, đặc hiệu, nhạy và đúng. Phương pháp này có thể được sử dụng để kiểm tra chất lượng thường quy đối với nguyên liệu thô *Phyllanthus amarus* và các chế phẩm chứa *Phyllanthus amarus* [22].

Năm 2007, Murugaiyah V. và cộng sự đã phát triển phương pháp phân tích mới bằng kỹ thuật HPLC với đầu dò huỳnh quang để xác định đồng thời bốn lignan là phyllanthin, hypophyllanthin, phylltetralin và niranthin trong các mẫu dược liệu *Phyllanthus niruri* L.. Phương pháp có giới hạn phát hiện đối với phyllanthin ở 0,61 ng/mL, hypophyllanthin ở 6,02 ng/mL, phylltetralin ở 0,61 ng/mL và niranthin ở 1,22 ng/mL cho thấy thấp hơn 80, 8, 80 và 40 lần tương ứng khi so sánh với bằng phương

pháp HPLC-UV. Giới hạn định lượng là 4,88 ng/mL đối với phyllanthin và phyltetralin, 9,76 ng/mL đối với niranthin và 24,4 ng/mL đối với hypophyllanthin cho thấy thấp hơn 40, 8 và 20 lần tương ứng khi so sánh với bằng phương pháp HPLC-UV. Độ lặp lại và độ chính xác trung gian của bốn lignan là từ 98,1 % đến 102,9 % và độ chính xác đều nhỏ hơn 2,2 %. Độ đúng từ 92,5 % đến 110,1 % [58], [59].

Năm 2008, Srivastava V. và cộng sự đã triển khai phương pháp HPTLC sử dụng bản mỏng bất đối để phân tích định tính và định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin, là các lignan chính có tác dụng sinh học của loài *Phyllanthus*. Nhóm nghiên cứu đã khảo sát các pha tĩnh khác nhau gồm silica gel 60 F₂₅₄, HPTLC silica gel 60 F₂₅₄ và các bản mỏng bất đối trong định lượng đã được đánh giá khả năng phân tách. Để đạt được sự phân tách tốt, pha động tối ưu là n-hexan – aceton – 1,4-dioxan (9 : 1 : 0,5) đã được sử dụng, giá trị R_f lần lượt tương ứng là 0,30; 0,36; 0,41 và 0,48 cho các hợp chất phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin được phát hiện ở bước sóng 620 nm. Các đường chuẩn được tìm thấy tuyến tính trong dải nồng độ 100-500 ng/dải. Độ phục hồi phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin lần lượt là 99,98 %; 100,51 %; 99,22 % và 98,74 %. Phương pháp đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH và được áp dụng để phân tích định lượng các lignan trên trong lá của bốn loài Diệp hạ châu *Phyllanthus amarus*, *Phyllanthus maderaspatensis*, *Phyllanthus urinaria* và *Phyllanthus virgatus* [92].

Năm 2009, Rai P. và cộng sự đã xây dựng hai phương pháp đơn giản, có độ đúng cao dùng để định lượng phyllanthin và hypophyllanthin trong chế phẩm chứa *Phyllanthus niruri* bằng phương pháp quang phổ đạo hàm và sắc ký lỏng pha đảo. Phyllanthin và hypophyllanthin trong chế phẩm viên nén được định lượng bằng phương pháp quang phổ đạo hàm ở bước sóng 259,2 nm (phyllanthin) và 252,4 nm (hypophyllanthin) khi pha trong methanol. Đường chuẩn tuyến tính với hệ số r = 0,9983 (phyllanthin) và r = 0,9977 (hypophyllanthin) trong khoảng 10-50 µg/mL (phyllanthin) và 4-20 µg/mL (hypophyllanthin). Ở phương pháp HPLC, điều kiện sắc ký với cột Phenomenex C-18 (250 × 4,6 mm; 5 µm); pha động: tetrahydrofuran – nước – acetonitril (10 : 50 : 40); tốc độ dòng: 1 mL/phút; phát hiện bước sóng UV

230 nm. Các chất tách tốt, có thời gian lưu lần lượt là 16,05 phút (phyllanthin) và 17,61 phút (hypophyllanthin). Đường chuẩn tuyến tính trong khoảng 10-100 $\mu\text{g/mL}$ (phyllanthin), $r = 0,9978$ và 5-50 $\mu\text{g/mL}$ (hypophyllanthin), $r = 0,9996$. Các phương pháp đã được thẩm định và so sánh thống kê; cho thấy cả hai phương pháp đều đạt độ đúng, độ chính xác và đặc hiệu. Phương pháp đã được áp dụng để định lượng phyllanthin và hypophyllanthin trong chế phẩm chứa cao chiết *Phyllanthus niruri* [82].

Năm 2010, Nayak S. P. và cộng sự đã phát triển phương pháp HPTLC để định lượng phyllanthin của *Phyllanthus amarus* trên silica gel 60 F₂₅₄ rửa giải bằng n-hexan - ethyl acetat (2 : 1) và phát hiện bằng hiện màu với acid sulfuric 10 % trong ethanol. Quá trình quét và định lượng các điểm được thực hiện ở bước sóng 200 nm. Phương pháp được đề xuất chính xác và nhạy có thể được sử dụng để phát hiện, theo dõi và định lượng phyllanthin từ *Phyllanthus amarus* [61].

Năm 2011, Alvari A. và cộng sự đã triển khai phương pháp HPLC với pha động ethanol – nước (66 : 34), rất đơn giản và hiệu quả về chi phí, phát hiện bằng đầu dò UV-Vis ở bước sóng 229 nm. Độ tuyến tính của phương pháp trong khoảng nồng độ 1-50 $\mu\text{g/mL}$ với hệ số tương quan là 0,999. Phương pháp đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH và phù hợp để định lượng nhanh phyllanthin trong cao chiết từ dược liệu [15].

Năm 2011, Patel J. R. và cộng sự cũng đã phát triển và thẩm định phương pháp HPLC để chuẩn hóa cao ethanol của *Phyllanthus amarus* và acid ellagic. Cao ethanol của toàn cây *Phyllanthus amarus* được hòa tan trong dimethylsulfoxid, siêu âm trong 15 phút và pha loãng với methanol 50 %. Phân tích được thực hiện bằng sử dụng pha động là nước và methanol chứa 0,06 % acid trifluoroacetic và các đỉnh được phát hiện ở bước sóng 254 nm [76].

Năm 2013, Nguyễn Đức Hạnh và cộng sự đã xác định độ tinh khiết của tinh thể phyllanthin phân lập được và nồng độ của dung dịch phyllanthin bằng phương pháp HPLC. Điều kiện sắc ký với cột Hypersil GOLD C18 (250 mm x 4,6 mm; 5 μm) trong điều kiện đẳng dòng với hai tỷ lệ pha động khác nhau: acetonitril – nước (50 : 50) để kiểm tra độ tinh khiết của tinh thể phyllanthin, acetonitril – nước (65 :

35) để xác định nồng độ của dung dịch phyllanthin. Trong cả hai trường hợp, tốc độ dòng được đặt ở 0,7 mL/phút và nhiệt độ của cột được duy trì ở 25 °C. Độ hấp thụ UV ở bước sóng 230 nm để phát hiện phyllanthin [62].

Năm 2013, Bhope S.G. và cộng sự đã định lượng đồng thời andrographolid, phyllanthin và hypophyllanthin bằng phương pháp HPLC đầu dò PDA. Điều kiện sắc ký với cột Symetry C8 (250 × 4,6 mm; 5 µm); pha động gồm pha động A: orthophosphoric 0,1 %, pha động B: acetonitril – methanol (1 : 1) theo chương trình dung môi; tốc độ dòng: 1 mL/phút. Phương trình hồi quy tuyến tính giữa nồng độ các chất phân tích và diện tích đỉnh có hệ số tương quan cao. Phương pháp dùng để định lượng andrographolid, phyllanthin và hypophyllanthin trong các chế phẩm bảo vệ gan từ dược liệu [18].

Năm 2014, Khabiya R. và cộng sự đã phát triển phương pháp HPTLC đơn giản để định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin từ toàn bộ cây *Phyllanthus amarus*. Pha động gồm n-hexan – ethyl acetat – acid acetic băng (9 : 3 : 0,3) đã tách tốt ba lignan này trên silica gel 60 F₂₅₄ khi định lượng ở bước sóng 230 nm. Phương pháp đã được thẩm định theo hướng dẫn của ICH về độ chính xác, độ lặp lại, độ đúng và độ tuyến tính. Định tính các chất và độ tinh khiết đã được xác định. Đây là báo cáo đầu tiên về việc định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin từ *Phyllanthus amarus* sử dụng TLC silica gel 60 F₂₅₄ pha thuận. Phương pháp được phát triển rất đơn giản, đúng, chính xác, tiết kiệm chi phí và ít tốn thời gian [44].

Năm 2015, Ketmongkhonsit P. và cộng sự đã phát triển phương pháp phân tích hình ảnh TLC nhanh để định lượng đơn giản phyllanthin trong dược liệu *Phyllanthus amarus*. Phương pháp này sử dụng công nghệ phần mềm máy tính và được coi là một phương pháp định lượng đơn giản, rẻ tiền và thuận tiện với độ chính xác và độ chính xác tốt đối với các thành phần hoạt tính sinh học trong dược liệu và thuốc thô. Phương pháp đề xuất đã được xác nhận theo Hội đồng quốc tế về hài hòa các yêu cầu kỹ thuật đối với dược phẩm dùng cho người (ICH) và hướng dẫn của Hiệp hội các nhà hóa học phân tích chính thức (AOAC) [43].

Năm 2015, Kandavel D. và cộng sự đã định lượng phyllanthin và hypophyllanthin từ các mẫu lá của *Phyllanthus amarus* bằng HPLC. Điều kiện sắc ký với cột Phenomenex C18 (100 x 3,0 mm; 2,5 μ m); pha động acetonitril – đệm phosphat pH 2,8; tốc độ dòng 0,4 mL/phút; phát hiện ở bước sóng 230 nm [38].

Năm 2018, Harikrishnan H. và cộng sự đã định lượng các lignan: phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin trong cao chiết ethanol 80 % *Phyllanthus amarus* bằng phương pháp HPLC, sử dụng cột XBridge™ C-18 (250 mm \times 4,6 mm; 5 μ m); pha động acetonitril – nước (acid hóa bằng acid orthophosphoric 0,1 %) (55 : 45); tốc độ dòng: 1 mL/phút; nhiệt độ cột: 25 °C, bước sóng: 205 nm [30].

Công trình nghiên cứu trong nước

Năm 2010, nhóm tác giả Trần Thùy Trang và Huỳnh Ngọc Thụy đã xây dựng phương pháp định lượng phyllanthin trong 3 loài Diệp hạ châu bằng kỹ thuật HPLC với Cột Restek Pinnacle II C18, pha động methanol – nước, tốc độ dòng 1 mL/phút, bước sóng 205 nm [9].

Năm 2012, nhóm tác giả Lữ Thị Kim Chi và Nguyễn Ngọc Vinh đã xây dựng quy trình định lượng phyllanthin trong chế phẩm Diệp hạ châu đắng bằng phương pháp HPLC. Điều kiện sắc ký như sau: Cột Phenomenex Gemini C18 (250 x 4,6 cm; 5 μ m); Pha động: acetonitril – acid phosphoric 0,1 % (65 : 35); Tốc độ dòng: 1,0 mL/phút; Thể tích tiêm: 20 μ L; Nhiệt độ cột: 30 °C; Đầu dò PDA, bước sóng phát hiện 230 nm. Phương pháp đã thẩm định với khoảng tuyến tính từ 2-20 μ g/mL, độ lặp lại, độ đúng đáp ứng yêu cầu phân tích định lượng. Đồng thời, đã xây dựng dự thảo bổ sung chỉ tiêu định tính và định lượng cho chuyên luận Diệp hạ châu đắng trong DĐVN IV và tiêu chuẩn cơ sở cho các chế phẩm có Diệp hạ châu đắng [3].

Năm 2018, nhóm tác giả Trần Thu Huyền đã xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng phyllanthin trong dược liệu Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus*) bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) sử dụng detector huỳnh quang. Điều kiện sắc ký gồm: Cột C18 (50 x 2,1 mm; 1,6 μ m), hệ dung môi acetonitril - nước với tỷ lệ (55 : 45), tốc độ dòng 0,3 mL/phút; thể tích tiêm mẫu 2 μ L; bước sóng kích thích và phát xạ huỳnh quang 230 nm và 340 nm. Phương pháp được thẩm định với các tiêu chí: tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ chính xác.

Các tiêu chí đều đáp ứng yêu cầu của phương pháp định lượng theo quy định hướng dẫn ICH [5].

1.3.2. Trong mẫu sinh học

Năm 2007, Murugaiyah V. và cộng sự đã xây dựng phương pháp HPLC đầu dò huỳnh quang để định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin, phyltetralin và niranthin từ *Phyllanthus niruri* L. trong huyết tương chuột. Giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của phương pháp lần lượt tương ứng là 4,88; 24,41; 4,88 và 9,76 ng/mL đối với phyllanthin, hypophyllanthin, phyltetralin và niranthin [58].

Năm 2015, Fan H. và cộng sự đã phát triển phương pháp HPLC-MS/MS nhạy, nhanh và đặc hiệu để xác định đồng thời bốn lignan, bao gồm hypophyllanthin, phyllanthin, nirtetralin và niranthin từ *Phyllanthus urinaria* L. trong huyết tương chuột. Các chất phân tích được chiết xuất từ huyết tương chuột với n-hexan - isopropanol và diazepam được sử dụng làm chất chuẩn nội. Phương pháp đã được thẩm định đầy đủ và áp dụng cho một nghiên cứu dược động học về bốn lignan ở chuột sau khi uống dịch chiết ethanol của *Phyllanthus urinaria* L. với các đường chuẩn tuyến tính ($r > 0,9971$) trong khoảng nồng độ 2-1000 ng/mL đối với hypophyllanthin và nirtetralin, và 1-1000 ng/mL đối với phyllanthin và niranthin. Độ chính xác, độ đúng, độ phục hồi và độ ổn định đạt yêu cầu [25].

Đã có nhiều phương pháp định lượng phyllanthin trong huyết tương chuột như: HPLC đầu dò huỳnh quang, HPLC đầu dò PDA. Các phương pháp này có giới hạn định lượng cao và thời gian phân tích dài (lên đến 30 phút). Nhằm hạ giới hạn định lượng của phyllanthin và phát hiện ở mức độ vết phyllanthin, phương pháp định lượng phyllanthin trong huyết tương chuột bằng phương pháp LC/MS/MS đã được phát triển bởi nhóm tác giả Nguyễn Văn Long (2019). Nghiên cứu dược động học cho thấy phyllanthin kém hấp thu qua ruột, do đó cần uống liều cao để đạt nồng độ điều trị. Để giải quyết vấn đề này, một số nhà nghiên cứu phát triển vài hệ thống vận chuyển như hệ micro tự nhũ hóa chứa phyllanthin hoặc hỗn hợp phyllanthin và piperin đã được micel hóa. Kỹ thuật tạo phức các phân tử thuốc từ dược liệu tiên tiến nhất hiện nay là gắn kết với phospholipid, được xem là một hệ thống chất mang tiềm năng để tăng sinh khả dụng của các chất chiết được có hoạt tính sinh học từ dược liệu nhưng có

tính tan thấp và hấp thu kém. Kỹ thuật này đã được áp dụng để cải thiện sinh khả dụng của silybin, curcumin, ginsenosid, phyllanthin. Trong nghiên cứu này, nhóm tác giả Nguyễn Văn Long đã đánh giá các đặc điểm dược động học của phức hợp phospholipid với dịch chiết *Phyllanthus amarus* chuẩn hóa so với dịch chiết *Phyllanthus amarus* chuẩn hóa trên chuột sau khi uống. Nghiên cứu này đã phát triển một phương pháp LC-MS/MS đơn giản và đáng tin cậy để đánh giá dược động học của dịch chiết *Phyllanthus amarus* chuẩn hóa với phức hợp phospholipid ở chuột [63].

Nhận xét: Nhiều công trình nghiên cứu phân tích các hợp chất lignan trong Diệp hạ châu đã công bố bằng nhiều phương pháp khác nhau như sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC), sắc ký khí (GC), sắc ký khí khối phổ (GC-MS), sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò tử ngoại (HPLC-UV), đầu dò huỳnh quang (HPLC-FL), đầu dò điện hóa (HPLC-ECD) và sắc ký lỏng hiệu năng cao khối phổ (HPLC-MS). Ở loài *Phyllanthus amarus*, các lignan đã được phân tích chủ yếu bằng phương pháp HPLC-UV pha đảo và HPTLC.

Nhiều công bố các công trình nghiên cứu phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao để đánh giá về hàm lượng các lignan chính như: phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin, nirtetralin,... chiết xuất từ *Phyllanthus amarus*. Hiện nay, phương pháp HPLC-UV pha đảo là phương pháp đơn giản, rất phổ biến và đáng tin cậy để phân tích các lignan trong dược liệu *Phyllanthus amarus*.

Phương pháp HPLC phát hiện bằng đầu dò huỳnh quang đã được sử dụng để đo các hợp chất polyphenolic, nhưng rất ít ứng dụng để phân tích lignan. Mặt khác, các phương pháp GC-MS và HPLC-MS có độ nhạy và độ tin cậy cao, phù hợp để ứng dụng trong phân tích các mẫu sinh học chứa nồng độ hoạt chất rất thấp. Tuy nhiên, những thiết bị phân tích này rất đắt tiền và do đó tính sẵn có cũng hạn chế.

Đa số nghiên cứu định lượng các hợp chất lignan chính như: phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin,... bằng phương pháp LC-MS/MS chỉ xây dựng trong huyết tương chuột và chỉ có một công trình nghiên cứu khảo sát nồng độ các lignan này được chiết xuất từ *Phyllanthus amarus* [63].

Bảng 1.4. Các phương pháp định lượng các hợp chất lignan

Tác giả, năm công bố	Hợp chất định lượng	Phương pháp phân tích	TLTK
Arvind K. T. và cộng sự (2006)	Phyllanthin và hypophyllanthin	HPTLC	[17]
Dhalwal K. và cộng sự (2006)	Phyllanthin, hypophyllanthin, acid gallic và acid ellagic	HPTLC	[22]
Murugaiyah V. và cộng sự (2007)	Phyllanthin, hypophyllanthin, phyltetralin và niranthin	HPLC đầu dò huỳnh quang	[59]
Murugaiyah V. và cộng sự (2007)	Phyllanthin, hypophyllanthin, phyltetralin và niranthin trong huyết tương chuột	HPLC đầu dò huỳnh quang	[58]
Srivastava V. và cộng sự (2008)	Phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin	HPTLC	[92]
Rai P. và cộng sự (2009)	Phyllanthin và hypophyllanthin	Quang phổ đạo hàm, HPLC đầu dò UV-Vis	[82]
Nayak S. P. và cộng sự (2010)	Phyllanthin	HPTLC	[61]
Trần Thùy Trang và cộng sự (2010)	Phyllanthin	HPLC đầu dò UV-Vis	[9]
Alvari A. và cộng sự (2011)	Phyllanthin	HPLC đầu dò UV-Vis	[15]
Patel J. R. và cộng sự (2011)	Cao ethanol <i>Phyllanthus amarus</i> và acid ellagic	HPLC đầu dò UV-Vis	[76]
Lữ Thị Kim Chi và cộng sự (2012)	Phyllanthin	HPLC đầu dò UV-Vis	[3]
Nguyễn Đức Hạnh và cộng sự (2013)	Phyllanthin	HPLC đầu dò UV-Vis	[62]
Bhople S.G. và cộng sự (2013)	Andrographolid, phyllanthin và hypophyllanthin	HPLC đầu dò PDA	[18]
Khabiya R. và cộng sự (2014)	Phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin	HPTLC	[44]
Ketmongkhonsit P. và cộng sự (2015)	Phyllanthin	Phân tích hình ảnh TLC nhanh để định lượng đơn giản	[43]
Kandavel D. và cộng sự (2015)	Phyllanthin và hypophyllanthin	HPLC đầu dò UV-Vis	[38]
Fan H. và cộng sự (2015)	Phyllanthin, hypophyllanthin, phyltetralin và niranthin trong huyết tương chuột	HPLC đầu dò huỳnh quang	[25]
Harikrishnan H. và cộng sự (2018)	Phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin	HPLC đầu dò UV-Vis	[30]
Trần Thu Huyền và cộng sự (2018)	Phyllanthin	UPLC đầu dò UV-Vis	[5]
Nguyễn Văn Long (2019)	Phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin trong huyết tương chuột	HPLC đầu dò huỳnh quang	[63]

1.4. CAO ĐỐI CHIẾU

Cao đối chiếu (Reference standard extract) mới được phát triển trong hệ thống chất đối chiếu, thường bao gồm các thành phần chính từ dược liệu ban đầu. Người ta sử dụng cao đối chiếu nhằm xây dựng phương pháp mới để đánh giá toàn diện chất lượng dược liệu.

Việc chỉ dùng một chất đối chiếu để đánh giá dược liệu có một số hạn chế trong những trường hợp: dược liệu giả, dược liệu có nguồn gốc khác nhau có cùng một hoạt chất với hàm lượng khác nhau, khó khăn khi xác định đồng thời nhiều hợp chất. Trong những trường hợp này, cần phải sử dụng đồng thời nhiều chất đối chiếu. Để thay thế cho các chất đối chiếu đắt tiền hay không có sẵn, người ta sử dụng cao đối chiếu. Cao đối chiếu dễ dàng phân lập với lượng lớn và giá cả thấp hơn so với một chất tinh khiết được phân lập [28], [103].

Tuy nhiên, nếu không sử dụng chất đối chiếu thì việc xác định vị trí của các chất trên sắc ký đồ trở nên khó khăn. Để giải quyết vấn đề này, USP đã đưa ra 3 phần liên kết với nhau: chuyên luận USP với yêu cầu tính phù hợp của hệ thống, cao đối chiếu, sắc ký đồ đối chiếu [28].

Hiện nay, bên cạnh chuyên luận chất đối chiếu, chuyên luận cao đối chiếu được đưa vào EP và USP [103].

USP sử dụng các cao đối chiếu trong phương pháp sắc ký gồm định tính, xác định pic và / hoặc kiểm tra tính phù hợp của hệ thống [101].

Theo Reference Standards in the Analysis of Botanicals [28], sử dụng một sắc ký đồ đối chiếu trong tính phù hợp hệ thống gồm:

- Cao đối chiếu USP và định danh các pic liên quan.
- Mỗi lô cao đối chiếu được đi kèm với một sắc ký đồ tham khảo.
- Tính phù hợp hệ thống được đáp ứng nếu có sắc ký đồ tương tự như sắc ký đồ của mỗi lô cao đối chiếu.
- Có thể xác định các pic bằng cách so sánh với sắc ký đồ đối chiếu.

1.5. TỔNG QUAN VỀ ĐÁNH GIÁ SINH KHẢ DỤNG CỦA THUỐC

1.5.1. Đánh giá sinh khả dụng của thuốc

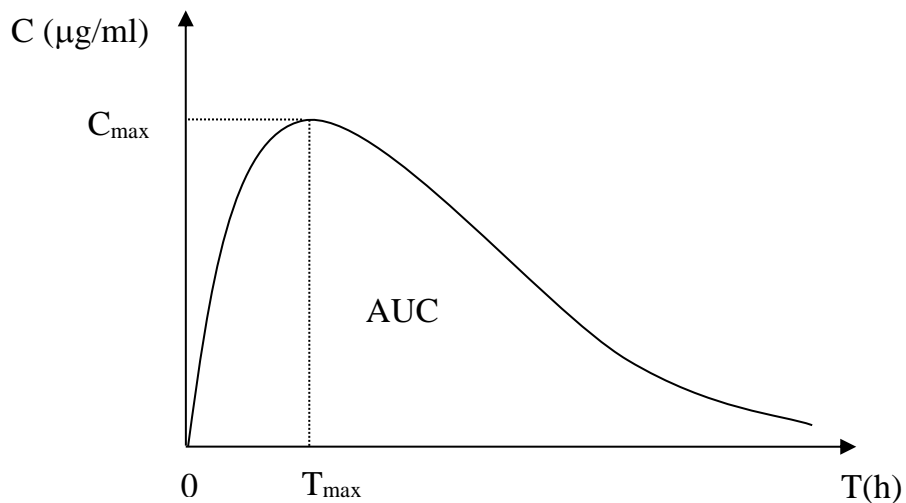
Sinh khả dụng (SKD) biểu thị tốc độ và mức độ hấp thu của dược chất từ chế phẩm thuốc vào hệ tuần hoàn. Mức độ hấp thu dược chất từ các chế phẩm dùng đường uống hoặc dùng tại chỗ có thể bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố. Trong đó, các yếu tố ảnh hưởng đáng kể đến quá trình hấp thu là kỹ thuật sản xuất, kích thước hạt, dạng tinh thể của dược chất, các tá dược như: tá dược độn, dính, rã, trơn, bao, tá dược làm tăng độ tan, tá dược gây tác dụng kéo dài... Sinh khả dụng là một chỉ số quan trọng đảm bảo chất lượng thực của sản phẩm [6].

SKD được xác định bằng các thông số dược động học sau:

C_{\max} : nồng độ tối đa trong huyết tương.

AUC: số lượng toàn thể thuốc được hấp thu vào tuần hoàn chung.

T_{\max} : thời điểm nồng độ trong huyết tương đạt mức tối đa.



Hình 1.4. Đồ thị biểu diễn nồng độ thuốc trong máu theo thời gian

Thiết kế thời điểm lấy mẫu

Thiết kế thời điểm lấy mẫu rất quan trọng để thu được kết quả nghiên cứu tin cậy. Cần phải lấy một điểm trước khi uống thuốc (mẫu trắng, thời điểm 0). Một đường cong nồng độ thuốc trong máu hoàn thiện phải bao gồm cả các pha hấp thu, phân bố và thải trừ. Thông thường, ít nhất nên có 4 thời điểm lấy mẫu trước khi đạt tới đỉnh của đường cong nồng độ – thời gian, 6 hoặc nhiều hơn điểm lấy mẫu sau đỉnh, 3 giá trị xung quanh đỉnh của đường cong, tổng số điểm lấy mẫu nên nhiều hơn 11. Thời gian lấy mẫu nên kéo dài tới khoảng 3 đến 5 lần thời gian bán thải của dược chất hoặc

khi nồng độ trong máu ở trong khoảng 1/10 đến 1/20 giá trị C_{\max} . Mẫu máu (huyết tương, huyết thanh hay máu toàn phần) phải bảo quản đông lạnh ngay sau khi lấy để chờ phân tích. Khi không thể xác định được nồng độ thuốc trong huyết tương, có thể thực hiện trên một mẫu sinh học khác như nước tiểu, nhưng chất xác định được và phương pháp phân tích phải phù hợp với những yêu cầu về đánh giá sinh khả dụng [6], [20].

Xác định liều thử

Trong nghiên cứu sinh khả dụng và tương đương sinh học, liều thử thường giống với liều dùng trong lâm sàng. Tốt nhất là liều thử của thuốc thử giống với liều thử của thuốc đối chứng. Trong trường hợp phải sử dụng liều khác nhau, phải nêu rõ lý do và phải điều chỉnh liều để tính toán sinh khả dụng phù hợp [6], [20].

Phân tích dược động học

Lập các bảng và hình để biểu thị các dữ liệu nồng độ thuốc trong huyết tương vào những thời điểm lấy mẫu khác nhau của từng cá thể, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn. Sau đó tính các thông số dược động học tương đối của mỗi cá thể, giá trị trung bình và độ lệch chuẩn cho mỗi thông số [6], [20].

Những thông số dược động học chính là:

- Nồng độ đỉnh trong máu (C_{\max})
- Diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian (AUC)
- Nửa đời thải trừ ($T_{1/2}$)
- Thời điểm đạt tới nồng độ đỉnh trong máu (T_{\max}).

C_{\max} và T_{\max} biểu thị bằng số liệu thu được trực tiếp từ thí nghiệm và không phải tính toán.

AUC_{0-t} (diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian từ thời điểm 0 đến thời điểm t) được tính theo phương pháp hình thang, với t là thời điểm lấy mẫu cuối cùng có thể định lượng được.

$AUC_{0-\infty}$ (diện tích dưới đường cong nồng độ - thời gian từ thời điểm 0 đến vô cùng) được tính toán theo công thức:

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t / K_e,$$

Trong đó:

C_t là nồng độ của thuốc tại thời điểm lấy mẫu cuối cùng;

K_e là hằng số tốc độ thải trừ.

$T_{1/2}$ có thể được tính bằng công thức: $T_{1/2} = 0,693 / K_e$

Trong đó:

K_e được tính từ độ dốc của đoạn tuyến tính trên đường biểu diễn logarit nồng độ - thời gian.

AUC_{0-t} từ thời điểm 0 đến thời điểm cuối cùng phải thỏa mãn:

$$(AUC_{0-t} / AUC_{0-\infty}) \times 100 \% > 80 \%$$

1.5.2. Những yêu cầu khi thẩm định quy trình phân tích mẫu sinh học

Các phương pháp sắc ký, như sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), sắc ký khí (GC) và các kỹ thuật phối hợp như GC-MS, LC-MS, là những phương pháp tốt nhất được sử dụng trong nghiên cứu sinh khả dụng và đánh giá tương đương sinh học. Những phương pháp này có tính đặc hiệu cao, có khả năng tách và định lượng trên cùng một hệ thống và cùng thời điểm. Nếu chọn được một đầu dò có độ nhạy thích hợp, phương pháp sẽ đáp ứng được yêu cầu phân tích các loại mẫu sinh học. Trong một số trường hợp, có thể sử dụng phương pháp phân tích sinh hóa và sinh học nếu cần.

Do quá trình phân tích mẫu sinh học bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như lượng mẫu ít, nồng độ thấp, lẫn nhiều tạp chất là các chất nội sinh (các muối vô cơ, lipid, protein và chất chuyển hóa) và sự khác nhau giữa các cá thể, nên phương pháp phân tích phải được thiết lập và thẩm định để đảm bảo độ tin cậy.

Tính đặc hiệu: Phải chứng minh được rằng chất xác định được là dược chất hay chất chuyển hóa có tác dụng. Sự phân tích mẫu không bị ảnh hưởng bởi các chất nội sinh và chất chuyển hóa có liên quan. Báo cáo kết quả phải bao gồm cả sắc ký đồ của mẫu trắng (dịch sinh học), mẫu chất chuẩn pha trong dịch sinh học và mẫu thử thu được sau khi dùng thuốc.

Đường chuẩn và khoảng tuyến tính: Mối quan hệ giữa đáp ứng với nồng độ của chất phân tích phải được đánh giá bằng phương trình hồi quy, thu được bằng phương pháp phân tích hồi quy (như phương pháp bình phương nhỏ nhất). Khoảng

tuyến tính là khoảng nồng độ từ thấp nhất đến cao nhất trong một đường chuẩn. Trong khoảng này, phép phân tích phải thoả mãn các yêu cầu về độ đúng và độ chính xác theo qui định. Đường chuẩn nên có ít nhất 5 nồng độ của chất chuẩn pha trong cùng một mẫu dịch sinh học. Khoảng tuyến tính phải bao gồm toàn bộ khoảng nồng độ của các mẫu cần phân tích. Không nên xác định nồng độ mẫu thử dựa trên điểm ngoại suy của khoảng tuyến tính. Đường chuẩn sẽ không bao giờ có điểm “0”.

Độ đúng và độ chính xác: Độ đúng và độ chính xác được xác định cùng lúc bằng cách sử dụng 3 nồng độ của mẫu cần kiểm tra, 1 nồng độ gần với giới hạn nhỏ nhất của phương pháp định lượng (LLOQ); 1 nồng độ gần với điểm giới hạn trên của đường chuẩn và 1 nồng độ ở gần điểm giữa. Mỗi nồng độ phải được xác định trên ít nhất 5 mẫu. Độ chính xác có thể được biểu thị bằng hệ số biến thiên (CV) trong ngày và giữa các ngày, được xác định trên mẫu chuẩn đối chứng. Nói chung, CV không nên vượt quá 15 %, riêng điểm gần giới hạn định lượng cho phép không vượt quá 20 %. Độ đúng được biểu thị là khả năng tiến tới gần nồng độ thực nhất của chất phân tích trong mẫu sinh học được xác định bằng phương pháp đặc biệt. Điều đó có thể được biểu thị bằng khả năng tìm lại tương đối, và phải nằm trong khoảng 85 % đến 115 %, nhưng có thể chấp nhận 80 % đến 120 % đối với điểm gần giới hạn định lượng dưới.

Giới hạn định lượng dưới: Giới hạn định lượng dưới, hay còn gọi là độ nhạy, là nồng độ thấp nhất của đường chuẩn có thể xác định được với độ đúng và độ chính xác cho phép. Giới hạn định lượng ít nhất phải thoả mãn khả năng phân tích nồng độ của mẫu thử lấy ở thời điểm bằng 3 đến 5 lần thời gian bán thải hoặc bằng 1/10 đến 1/20 giá trị C_{max} của chất phân tích.

Độ ổn định của mẫu thử: Độ ổn định của mẫu sinh học có chứa chất phân tích cần được khảo sát khi bảo quản ở nhiệt độ phòng, đông lạnh trong khoảng thời gian khác nhau để xác định điều kiện bảo quản và thời gian bảo quản mẫu sau khi lấy.

Hiệu suất chiết: Khả năng tìm lại sau khi chiết được đánh giá với ít nhất 3 nồng độ: cao, trung bình và thấp của đường chuẩn. Chỉ tiêu giới hạn có thể tham khảo những tài liệu liên quan.

Mẫu chuẩn kiểm chứng (QC): Mẫu chuẩn kiểm tra được dùng để so sánh khi định lượng là những mẫu tự tạo biết trước nồng độ, chuẩn bị bằng cách pha chất chuẩn của chất cần phân tích trong mẫu sinh học trắng.

Phân tích mẫu thử: Định lượng các mẫu thử bằng phương pháp phân tích đã được thẩm định. Mỗi mẫu thử có thể phân tích 1 lần hoặc lặp lại nếu cần. Với mỗi lô mẫu phân tích sinh học (các mẫu phân tích cùng một thời gian trong một buổi hoặc ngày), nên thiết lập một đường chuẩn mới để phân tích và dùng các mẫu QC với 3 nồng độ (thấp, trung bình và cao) để định lượng đồng thời trong mỗi lô phân tích. Nói chung, độ lệch giữa kết quả của mẫu chuẩn kiểm tra và giá trị thực không được quá 15 % [2], [23], [97].

1.5.3. Thẩm định quy trình định lượng thuốc trong dịch sinh học theo hướng dẫn US-FDA, EMA và DĐVN V

Theo EMA [23], US-FDA [98] và DĐVN V [2] các chỉ tiêu cần phải thẩm định đối với một quy trình định lượng dược chất và/hoặc chất chuyển hóa có tác dụng trong mẫu sinh học bao gồm: kiểm tra tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu/chọn lọc, tỷ lệ thu hồi (hiệu suất chiết), đường chuẩn và khoảng tuyến tính, độ đúng và độ chính xác, giới hạn định lượng dưới, độ ổn định của mẫu thử, ảnh hưởng của nền mẫu (matrix effect), ảnh hưởng của sự pha loãng; ảnh hưởng của lượng mẫu tồn dư (carry over).

Khi so sánh với quy định của US-FDA, quy định EMA có một số điểm khác biệt như sau:

Bảng 1.5. So sánh hướng dẫn của US-FDA và EMA

Chỉ tiêu	US-FDA 2018	EMA 2015
Tính đặc hiệu	- Không ít hơn 6 lô mẫu sinh học trắng - LLOQ thấp nhất của chất phân tích đạt độ đúng và chính xác	- Không ít hơn 6 lô mẫu sinh học trắng - Độ nhiễu tại đáp ứng của chất phân tích ở $LLOQ \leq 20\%$ - Độ nhiễu tại đáp ứng của chuẩn nội $\leq 5\%$
Giới hạn định lượng dưới	- Điểm thấp nhất của đường chuẩn (LLOQ) - Đáp ứng $LLOQ \geq 5$ lần so với đáp ứng của mẫu trắng - Độ chính xác $\leq 20\%$ và độ đúng 80 – 120 % so với nồng độ thực	- Điểm thấp nhất của đường chuẩn (LLOQ) - $LLOQ \leq C_{max}/20$ - Tín hiệu ở $LLOQ \geq 5$ lần so với tín hiệu của mẫu trắng - Độ chính xác $\leq 20\%$ và độ đúng 80 -120 % so với nồng độ thực
Đường chuẩn và khoảng tuyến tính	- Đường chuẩn ít nhất 6-8 mẫu với nền mẫu được xử lý gồm có chất phân tích và IS - Ở LLOQ: $CV \leq 20\%$ so với nồng độ thực và $\leq 15\%$ ở các nồng độ khác	- Đường chuẩn ít nhất 6 mẫu với nền mẫu được xử lý gồm có chất phân tích và IS - Ở LLOQ: $CV \leq 20\%$ so với nồng độ thực và $\leq 15\%$ ở các nồng độ khác - Xây dựng ít nhất 3 đường chuẩn
Mẫu kiểm tra (QC)	- Ở 3 mức nồng độ: thấp, trung bình, cao (LQC, MQC, HQC) - Mẫu QC là mẫu độc lập với các mẫu của đường chuẩn	- Ở 3 mức nồng độ: LQC, MQC, HQC - Mẫu QC là mẫu độc lập với các mẫu của đường chuẩn
Độ đúng và độ chính xác trong ngày và khác ngày	- Thực hiện ít nhất 3 nồng độ - Độ đúng: CV ở nồng độ LLOQ không lớn hơn $\pm 20\%$; Ở nồng độ LOQ, MQC, HQC có CV không lớn hơn $\pm 15\%$ - Độ chính xác: CV ở nồng độ LLOQ $\leq 20\%$. Ở nồng độ khác $CV \leq 15\%$	- Thực hiện ít nhất 4 nồng độ, phải có nồng độ LLOQ, 3 lần LLOQ, MQC, HQC - Độ đúng: CV ở nồng độ LLOQ không lớn hơn $\pm 20\%$; Ở nồng độ khác CV không lớn hơn $\pm 15\%$ - Độ chính xác: CV ở nồng độ LLOQ $\leq 20\%$; Ở nồng độ khác $CV \leq 15\%$
Hiệu suất chiết	- Tỷ lệ thu hồi của chất phân tích và chuẩn nội phải ổn định, chính xác và có tính tái lập - Thực hiện ở 3 nồng độ: LQC, MQC và HQC	- Không đề cập
Độ ổn định	- Dung dịch chuẩn gốc, chuẩn nội - Độ ổn định trong huyết tương: + Ngắn hạn + Dài hạn + Đông-rã đông + Sau khi xử lý mẫu	- Dung dịch chuẩn gốc, chuẩn nội - Độ ổn định trong huyết tương ở nồng độ thấp và cao: + Ngắn hạn ở nhiệt độ phòng + Dài hạn (-20 °C và -70 °C) + Đông-rã đông + Sau khi xử lý mẫu
Ảnh hưởng của nền mẫu	Xem xét có sự thay đổi của nền mẫu hay không, để bảo đảm phương pháp phân tích không ảnh hưởng của nền mẫu	CV của nền mẫu đối với chất phân tích và IS không quá 15 % ở 3 lần LLOQ và HQC, tính trên 6 lô nền mẫu
Lượng mẫu tồn dư	- Không đề cập	- Tiêm mẫu trắng ngay sau khi tiêm mẫu có nồng độ cao - Lượng mẫu tồn dư $\leq 20\%$ ở LLOQ và $\leq 5\%$ với chuẩn nội
Ảnh hưởng của sự pha loãng	- Pha loãng mẫu có nồng độ cao hơn ULOQ - Độ đúng và độ chính xác của các mẫu pha loãng phải được thẩm định	- Pha loãng mẫu có nồng độ cao hơn ULOQ (thực hiện ít nhất 5 mẫu đối với mỗi hệ số pha loãng) - Độ đúng và độ chính xác nằm trong khoảng $\pm 15\%$

1.5.4. Các công trình nghiên cứu đánh giá sinh khả dụng hợp chất lignan

Năm 2007, Murugaiyah V. và cộng sự đã cho chuột uống 5 mL/kg dung dịch cao giàu lignan chiết từ *Phyllanthus niruri* trong Tween 20 với liều uống 50 mg/kg và so với đường tiêm 1 mL/kg dung dịch trên với liều 5 mg/kg. Thời điểm lấy mẫu ở 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 6; 8; 10; 24 giờ sau khi tiêm tĩnh mạch đuôi chuột và ở 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10 và 24 giờ sau khi uống. Đối với đường tiêm, kết quả công bố cho thấy phyllanthin, hypophyllanthin, phyltetralin và niranthin có thể tích phân bố (V_d) lần lượt tương ứng là 0,20; 0,17; 0,14 và 0,15 L/kg; hệ số thanh thải lần lượt tương ứng là 0,04; 0,01; 0,03 và 0,02 L/kg.giờ và thời gian bán thải ($T_{1/2}$) từ 3,35-4,40 giờ. Đối với đường uống, kết quả công bố cho thấy cả 4 lignan hấp thu nhanh với T_{max} khoảng 1 giờ và C_{max} lần lượt tương ứng là 0,18; 0,56; 0,12 và 0,62 $\mu\text{g/mL}$. Kết quả tính toán sinh khả dụng tuyệt đối của phyllanthin, hypophyllanthin, phyltetralin và niranthin lần lượt tương ứng là 0,62; 1,52; 4,01 và 2,66 % [58].

Năm 2014, Parvathaneni M. và cộng sự đã dùng kỹ thuật HPLC, đầu dò dây diod quang (PDA), cột pha đảo C-18, với pha động methanol - nước (66 : 34), tốc độ dòng 1ml /phút được theo dõi ở bước sóng 199-400 nm. Carbamazepin được sử dụng làm chất chuẩn nội để định lượng phyllanthin, hypophyllanthin trong huyết tương chuột. Kết quả xác định được giá trị LOD và LOQ được tìm thấy là 56,14 ng/mL và 169,99 ng/mL đối với phyllanthin; và 56,04 ng/mL và 169,82 ng/mL đối với hypophyllanthin. Nhóm tác giả đã cho chuột uống 5 mL/kg dung dịch phân đoạn có lignan trong Tween 20 với các liều uống 2,5; 5; 10 mg/kg lần lượt cho phyllanthin và hypophyllanthin. Phân đoạn lignan này được phân lập từ cao hexan, chiết từ lá *Phyllanthus amarus*. Thời điểm lấy mẫu ở 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24; 36 giờ sau khi uống. Kết quả cho thấy giá trị C_{max} đối với ba liều uống (2,5, 5 và 10 mg/kg) đối với phyllanthin lần lượt tương ứng là $0,28 \pm 0,06$; $0,53 \pm 0,16$; $0,98 \pm 0,22$ (ng/mL); và hypophyllanthin lần lượt tương ứng là $0,68 \pm 0,76$; $1,35 \pm 0,23$; $2,45 \pm 0,33$ (ng/mL) [75].

Năm 2015, Fan H. và cộng sự đã cho chuột uống dung dịch cao ethanol 80 % chiết từ *Phyllanthus urinaria* L. trong carboxymethyl cellulose natri 0,5 % (20 g/kg). Thời điểm lấy mẫu ở 0; 0,083; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 24 giờ sau khi

uống. Kết quả cho thấy có hiện tượng hấp thu kép có 2 đỉnh hấp thu trong đường cong nồng độ - thời gian của 4 lignan hypophyllanthin, phyllanthin, nirtetralin và niranthin sau khi uống cao *Phyllanthus urinaria* L.. Điều này khác với các công bố trước. Thông số dược động học của hypophyllanthin và nirtetralin tương tự nhau, nồng độ đỉnh đầu tiên trong huyết tương (C_{max1}) đạt được lần lượt tương ứng ở $0,58 \pm 0,20$ giờ và $0,67 \pm 0,20$ giờ (T_{max1}); nồng độ đỉnh thứ hai trong huyết tương (C_{max2}) đạt được lần lượt tương ứng ở $8,67 \pm 1,63$ giờ (T_{max2}); thời gian bán thải ($T_{1/2}$) lần lượt tương ứng là $2,18 \pm 0,40$ giờ và $2,23 \pm 0,19$ giờ. Phyllanthin và niranthin cũng có thông số dược động học tương tự nhau, C_{max1} đạt được lần lượt tương ứng ở $2,32 \pm 1,11$ giờ và $3,12 \pm 0,81$ giờ, trong khi C_{max2} đạt được lần lượt tương ứng ở $6,67 \pm 1,03$ giờ cho cả hai; $T_{1/2}$ lần lượt tương ứng là $2,32 \pm 1,11$ giờ và $3,12 \pm 0,81$ giờ [25].

Năm 2019, Nguyen Van Long và cộng sự đã cho chuột uống dung dịch cao ethanol 80 % chiết từ *Phyllanthus amarus* với liều 2 mg/kg của phyllanthin. Hàm lượng phyllanthin trong cao chiết được là 9,12 %. Thời điểm lấy mẫu ở 0; 0,083; 0,167; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24 giờ sau khi uống. Kết quả cho các thông số dược động học của phyllanthin sau khi uống cao chiết như sau: AUC_{0-t} đạt $18,07 \pm 1,99$ giờ.ng/mL, $AUC_{0-\infty}$ đạt $22,38 \pm 1,67$ giờ.ng/mL, C_{max} đạt được $11,44 \pm 1,15$ ng/mL ở T_{max} sau 0,25 giờ và $T_{1/2}$ ở $5,24 \pm 0,21$ giờ. Ngoài ra, nhóm tác giả nghiên cứu khảo sát dược động học của công thức pha chế phức hợp phospholipid với cao chiết cùng liều uống 2 mg/kg của phyllanthin, kết quả các giá trị thông số dược động học cao hơn so với uống cao chiết [63].

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu

Toàn cây (trừ rễ) Diệp hạ châu đắng được thu hái vào tháng 4/2014 ở Vĩnh Long bởi Công ty TNHH Vạn Xuân (nhà máy sản xuất dược phẩm đạt GMP) đã loại rửa sạch, phơi sấy khô. Mẫu được xay nhỏ thành bột thô. Mẫu nghiên cứu đã được giám định tên khoa học là *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn., Euphorbiaceae tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh.

Dược liệu khô toàn cây (trừ rễ) Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.) được thu hái tại ba tỉnh Cần Thơ, Trà Vinh và Cà Mau vào tháng 4/2017 dùng ứng dụng phương pháp định lượng đồng thời 4 lignan trong dược liệu.

2.1.2. Chất đối chiếu

Chất đối chiếu phyllanthin (PLT) (số lô 010915; hàm lượng 99,35%), diazepam (số lô QT181 020215; hàm lượng 99,49 %), carbamazepin (số lô QT192 030415; hàm lượng 99,67 %) được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh.

Cao chuẩn *Phyllanthus amarus* (số lô FOK140; khối lượng 1 g) của USP.

2.1.3. Hóa chất và dung môi

Dung môi: aceton (PA), acetonitril (HPLC), cloroform (PA), dicloromethan (PA), ethanol (PA), ethyl acetat (PA), n-hexan (PA), n-hexan (HPLC), methanol (PA), methanol (HPLC), methanol (LC-MS) của hãng J.T.Baker; ethanol 96 % (PA) của Công ty CP Dược phẩm OPC.

Hóa chất: acid phosphoric (PA), kali dihydrophosphat (PA), natri citrat (PA) của hãng Merck, amoni format (LC-MS) của hãng Sigma-Aldrich.

Bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄ tráng sẵn trên nền nhôm của hãng Merck.

Silicagel cỡ hạt 40-60 µm của hãng Davisil.

2.1.4. Động vật thử nghiệm

Thỏ thí nghiệm khỏe mạnh, trọng lượng $2 \pm 0,5$ kg, cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh.

Huyết tương trắng thử do Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh cung cấp, được bảo quản ở tủ đông âm sâu ≤ -70 °C.

2.1.5. Trang thiết bị, vật tư sử dụng nghiên cứu

Bảng 2.1. Danh sách các trang thiết bị, vật tư sử dụng

Stt	Loại thiết bị, vật tư	Tên thiết bị, vật tư
1	Cân kỹ thuật	Mettler BD 202
2	Cân phân tích độ nhạy 0,1 mg	Mettler Toledo AT-200
3	Cân phân tích độ nhạy 0,001 mg	Mettler Toledo XP 26
4	Hệ thống sắc ký điều chế	Shimadzu LC-20A
5	Hệ thống sắc ký lỏng đầu dò PDA	Shimadzu UFLC SPD-M 20A
6	Hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ	Shimadzu LC-MS/MS 8040
7	Máy phân tích nhiệt vi sai	TGA/DSC 1 Star ^c System
8	Máy quang phổ UV-Vis	Shimadzu U-1800
9	Máy quang phổ hồng ngoại	FR – IR Nicolet Magna 760
10	Máy cộng hưởng từ hạt nhân	Avance Bruker AC 500 MHz
11	Máy cô quay	Yamato RRE 801
12	Tủ sấy	Binder 53
13	Tủ sấy chân không	Lab Line
14	Lò nung	Nabertherm B 170
15	Nồi cách thủy	Memmert WB 14
16	Kính hiển vi quang học	Nikon Eclipse 80 i
17	Tủ đông	Sanyo -20 °C
18	Tủ đông âm sâu	Froilabo -70 °C
19	Máy đo pH	Mettler Toledo S220-K
20	Cột sắc ký lỏng	Phenomenex C6-Phenyl 11A (150 x 4,6 mm; 3 μ m) Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) Phenomenex Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) Phenomenex Gemini C18 (100 x 3 mm; 5 μ m) Phenomenex Gemini C18 (100 x 2 mm; 3 μ m) Phenomenex Gemini C18 (50 x 3 mm; 5 μ m)
21	Cột sắc ký điều chế pha thuận	HiQ Sil-10 KYATECH (21,2 x 250 mm; 10 μ m)
22	Cột sắc ký điều chế pha đảo	Aligent - Prep - C18 (21,2 x 250 mm; 10 μ m)

Các thiết bị phân tích và dụng cụ thủy tinh chính xác đã được hiệu chuẩn đạt yêu cầu mục đích sử dụng bởi Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh.

2.1.6. Nơi thực hiện nghiên cứu

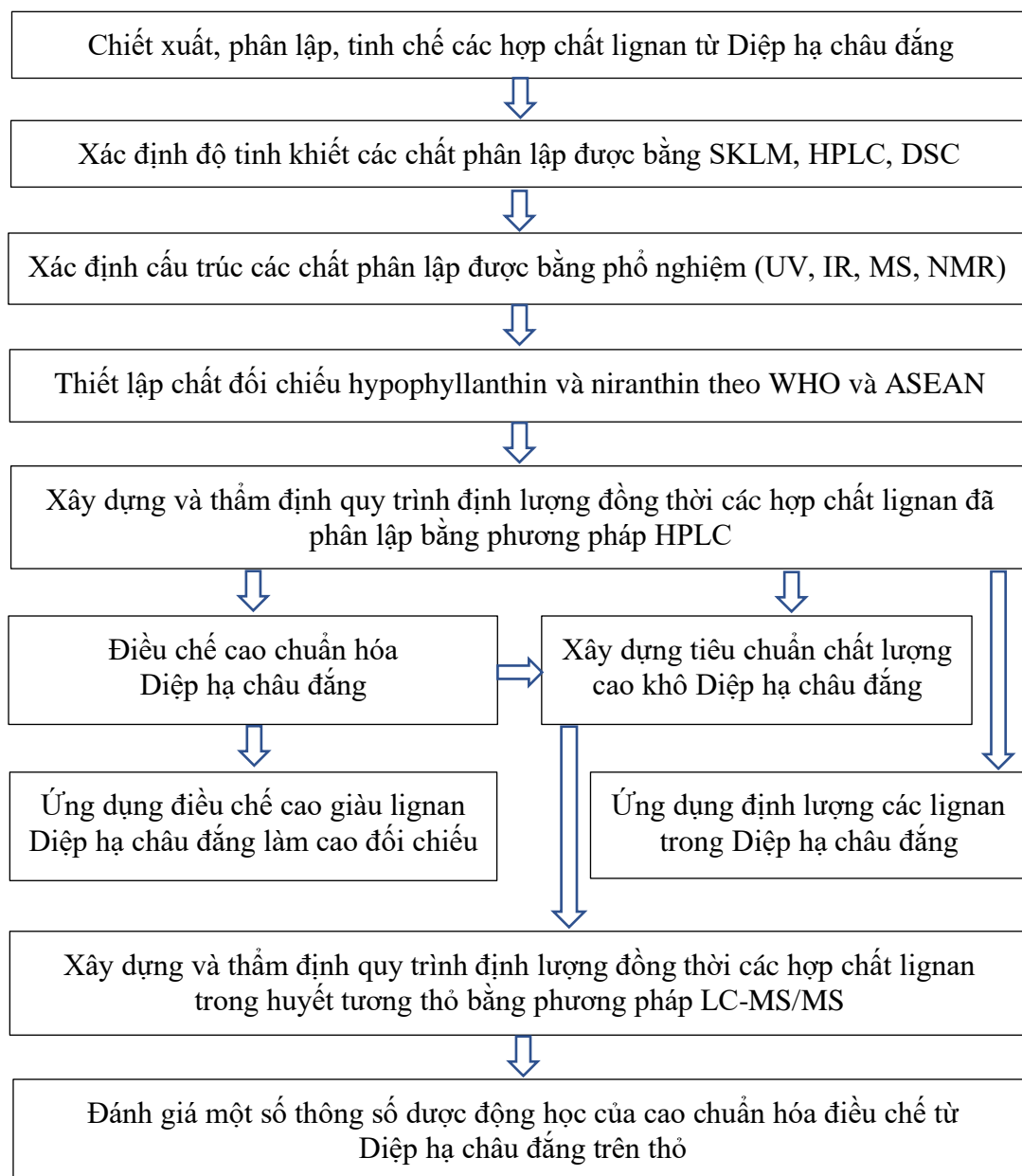
Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh: Khoa Kiểm nghiệm Đông dược dược liệu, Khoa Thiết lập chất đối chiếu - chất chuẩn, Khoa Vật lý đo lường, Khoa

Dược lý, Khoa Vi sinh, Trung tâm Đánh giá tương đương sinh học, các đơn vị này đều đạt tiêu chuẩn GLP-WHO và ISO/IEC 17025.

Công ty Cổ phần BV Pharma: Phòng Nghiên cứu phát triển, đơn vị sản xuất đạt tiêu chuẩn GMP-WHO.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Các nội dung nghiên cứu được trình bày tóm tắt ở sơ đồ 2.1.



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ trình tự các nội dung nghiên cứu

2.2.1. CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP, TINH CHẾ VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC, ĐỘ TINH KHIẾT CỦA CÁC CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC

2.2.1.1. Kiểm tra chất lượng dược liệu nghiên cứu

Kiểm tra chất lượng dược liệu nghiên cứu theo chuyên luận “Diệp hạ châu đắng” của ĐĐVN IV bao gồm các chỉ tiêu: mô tả thực vật học, vi phẫu, soi bột, định tính, độ ẩm, tro toàn phần, tỷ lệ vụn nát, chất chiết được trong dược liệu [1].

Định danh dược liệu bằng phương pháp sinh học phân tử DNA. Mẫu nghiên cứu đã được giám định tên khoa học là *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn., Euphorbiaceae tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh. Quá trình được thực hiện gồm các bước như sau: Chiết tách DNA bằng bộ KIT tách chiết DNA Dneasy Plant Mini Kit (Qiagen) theo nguyên tắc: Phá vỡ màng tế bào, loại bỏ protein, rửa DNA toàn phần, rửa rửa DNA, hòa tan DNA. DNA tách chiết được chạy điện di bằng gel agarose 1 %, điện thế 50 mV trong 40 phút. Kiểm tra bằng cách soi gel đèn UV 360 nm. Sau đó, khuếch đại đoạn DNA đặc hiệu. Lựa chọn đoạn DNA đích và primer tạo phản ứng PCR và chạy chương trình PCR theo Bảng 2.2, Bảng 2.3. Trình tự khuếch đại được chạy điện di bằng gel agarose 1 %, điện thế 25 mV trong 50 phút. Kiểm tra bằng cách soi gel đèn UV 360 nm.

Bảng 2.2. Trình tự các cặp mồi dùng cho phản ứng PCR

Tên mồi	Trình tự mồi	T _m (°C)	C
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'	57	154 pmol
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	53	146 pmol

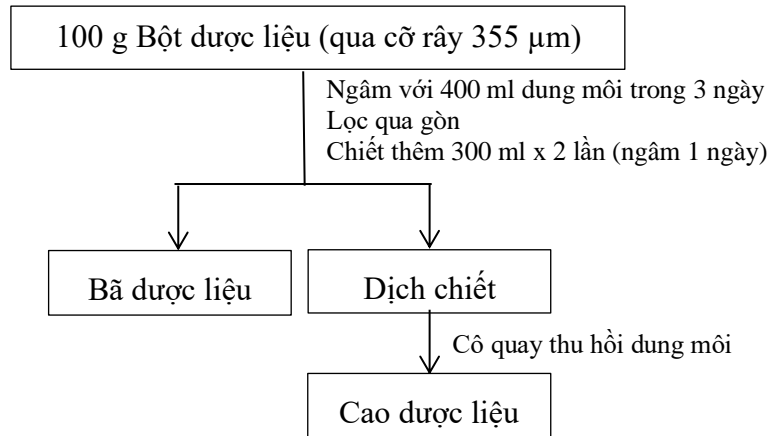
Bảng 2.3. Chương trình chạy PCR

Cặp primer ITS1 và ITS4		
Chu kỳ	Nhiệt độ (°C)	Thời gian
Khởi đầu	94	5 phút
30 chu kỳ	94	30 giây
	55	30 giây
	72	1 phút
Kết thúc	72	5 phút

Giải trình tự đoạn gen và so sánh kết quả với trình tự được lưu giữ tại genbank. Giải trình tự gen tại Công Ty Nam Khoa bằng phương pháp Sanger trên máy 3130 XL của AIB. Trình tự DNA thu được contig bằng DNA STAR, tra cứu trên NCBI (Blast Search on National Center for Biotechnology Information).

2.2.1.2. Chiết xuất cao toàn phần từ dược liệu Diệp hạ châu đắng

Khảo sát dung môi chiết dicloromethan, cloroform, aceton, ethyl acetat, ethanol 96 %, ethanol 70 % bằng phương pháp ngâm ở nhiệt độ phòng. Lọc thu dịch, sau đó cô thu hồi dung môi thu được cao toàn phần theo Sơ đồ 2.2.



Sơ đồ 2.2. Quy trình chiết xuất cao toàn phần dược liệu

So sánh hiệu suất chiết và quan sát vết trên bản mỏng SKLM silica gel 60 F₂₅₄, hệ dung môi khai triển: n-hexan – ethyl acetat (2 : 1), phát hiện bằng phun thuốc thử dung dịch acid sulfuric 10 %, sấy bản mỏng 15 phút ở 105 °C [1], [3] để sàng lọc chọn dung môi chiết cao toàn phần phù hợp. Sau đó, tiến hành sắc ký cột để tách ra các phân đoạn đơn giản. So sánh khả năng tách các phân đoạn của cột sắc ký ở các loại cao bằng sắc ký lớp mỏng để chọn dung môi chiết xuất cao toàn phần phù hợp nhất.

2.2.1.3. Phân lập cao toàn phần bằng sắc ký cột

Từ cao toàn phần tiến hành sắc ký cột nhằm thu các phân đoạn đơn giản. Tiến hành theo điều kiện sắc ký như sau: Cột thủy tinh có kích thước 7,0 x 70 cm. Khối lượng mẫu: 60 g cao DCM. Phương pháp nạp mẫu: Dạng dung dịch. Pha tĩnh: 600 g silica gel cỡ hạt 40-60 μm (Davisil); Pha động triển khai với dung môi nền là n-hexan để ổn định cột, khai triển cột bằng hệ n-hexan – ethyl acetat (từ 100 : 0 đến 80 : 20). Thể tích hứng: 50 mL, tốc độ hứng 60 giọt/phút. Các phân đoạn được kiểm tra bằng SKLM, hệ dung môi là n-hexan – ethyl acetat (2 : 1), phát hiện với UV (254 nm) và thuốc thử dung dịch acid sulfuric 10 %, sấy khô ở 105 °C.

2.2.1.4. Phân lập hợp chất từ cao phân đoạn

Phương pháp kết tinh phân đoạn

Từ các phân đoạn chỉ chứa chủ yếu một vết, sau khi loại hết dung môi, cặn phân đoạn này được hòa tan vào dung môi thích hợp để loại các tạp kém phân cực và phân cực. Tìm cách kết tinh trong các dung môi thích hợp. Lọc và rửa tinh thể (hoặc tủa) trên phễu thủy tinh xóp bằng dung môi lạnh. Sau đó kiểm tra sơ bộ độ tinh khiết chất phân lập được.

Phương pháp sắc ký cột hoặc sắc ký điều chế

Từ các phân đoạn chứa 2 hoặc nhiều vết, không thể tiến hành tinh chế bằng phương pháp kết tinh phân đoạn. Có thể dùng sắc ký cột hoặc sắc ký điều chế để tách chất cần nghiên cứu.

Phương pháp sắc ký cột

Các điều kiện sắc ký cụ thể:

- Cột thủy tinh có kích thước 1,5 x 50 cm.
- Phương pháp nạp mẫu: Dạng dung dịch.
- Pha tĩnh: 20 g silica gel cỡ hạt 40-60 μm (Davisil).
- Pha động triển khai với dung môi nền là n-hexan để ổn định cột, khai triển cột bằng hệ n-hexan – ethyl acetat điều chỉnh tỉ lệ thích hợp.
- Thể tích hứng: 10 mL (trong ống nghiệm).
- Tốc độ hứng 20 giọt/phút.

Các phân đoạn được kiểm tra bằng SKLM, hệ dung môi đã thăm dò là n-hexan – ethyl acetat (2 : 1), phát hiện với UV (254 nm) và thuốc thử dung dịch acid sulfuric 10 %, sấy khô ở 105 °C.

Phương pháp sắc ký điều chế

Thăm dò điều kiện sắc ký điều chế trên HPLC: Phân đoạn chứa chất cần nghiên cứu sau khi được loại màu bằng cách hấp phụ qua 5 g silica gel cỡ hạt 40-60 μm được thăm dò điều kiện sắc ký điều chế trên máy HPLC với các thông số sau:

- Cột sắc ký: Phenomenex Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm).
- Đầu dò PDA với bước sóng phát hiện 230 nm.
- Pha động: Acetonitril – acid acetic 0,1 % (40 : 60).

- Tốc độ dòng: 1 mL/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μ L.
- Nhiệt độ cột: 30 $^{\circ}$ C.

Tiến hành sắc ký điều chế:

Bảng 2.4. Điều kiện sắc ký điều chế ban đầu

Điều kiện	Cột pha đảo (1)	Cột pha thuận (2)
Cột điều chế	Aligent-Prep-C18 (21,2 x 250 mm; 10 μ m)	HiQ Sil-10 KYATECH (21,2 x 250 mm; 10 μ m)
Bước sóng	230 nm	230 nm
Pha động	ACN (A) – acid acetic 0,1 % (B)	n-hexan (C) – EtOAc (D)
Thể tích tiêm	200 μ L	200 μ L
Nhiệt độ cột	Nhiệt độ phòng	

Sau khi thăm dò được điều kiện, tiến hành chạy mẫu thử nghiệm với điều kiện dung môi, tỉ lệ dung môi, bước sóng phát hiện như trên máy HPLC. Thay đổi tốc độ dòng và lượng tiêm cho phù hợp. Tiến hành sắc ký điều chế, thu các phân đoạn dựa vào tín hiệu của các cấu tử trên sắc ký đồ.

2.2.1.5. Kiểm tra độ tinh khiết của chất phân lập được

Kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM

Chấm sắc ký chất mới phân lập lên bản mỏng, khai triển ít nhất với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau, phát hiện vết bằng cách soi UV 254 nm và thuốc thử dung dịch acid sulfuric 10 %, sấy khô ở 105 $^{\circ}$ C. Nếu chất phân lập tinh khiết thì sẽ cho một vết duy nhất trên bản SKLM. Nếu vết chưa tinh khiết (thấy vết phụ trên bản mỏng), cần kết tinh lại trong dung môi thích hợp cho đến khi được chất tinh khiết.

Kiểm tra độ tinh khiết bằng HPLC/PDA

Tiến hành mẫu trắng và mẫu thử vào hệ thống sắc ký với điều kiện sắc ký phù hợp. Ghi phổ và xem xét kết quả phổ UV, sắc ký đồ 3 chiều để xác định các pic tạp kèm theo pic chính (nếu có).

Kiểm tra độ tinh khiết bằng DSC

Tiến hành phân tích chất tinh khiết trên máy phân tích DSC với điều kiện xác định, ghi nhận phổ và xem xét kết quả nhiệt nóng chảy và % độ tinh khiết.

2.2.1.6. Xác định cấu trúc của chất phân lập được

Việc xác định cấu trúc hóa học chủ yếu dùng các kỹ thuật phổ học:

Phổ UV: Ghi nhận bước sóng hấp thu cực đại (λ_{\max} , nm).

Phổ IR: Xác định số sóng đặc trưng của nhóm chức có trong công thức cấu tạo.

Phổ MS: So sánh số khối (m/z) ghi nhận được với số khối (m/z) dự kiến.

Phổ NMR: Với 6 kỹ thuật căn bản (^{13}C -NMR, ^1H -NMR, DEPT, HSQC, HMBC, COSY), mẫu được đo trong CDCl_3 , thực hiện trên máy Bruker Avance 500 MHz. Độ dịch chuyển hóa học tính theo thang δ ppm với $\delta_{\text{TMS}} = 0,00$ ppm, tín hiệu của dung môi $\delta_{\text{H}} 7,27$ s, $\delta_{\text{C}} 77,0$ t (đối với CDCl_3). Các hằng số ghép (J, Hz) được tính trực tiếp trên phổ ^1H -NMR.

2.2.2. XÁC ĐỊNH CHẤT LƯỢNG VÀ THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU

Các hợp chất được chọn để thiết lập chất đối chiếu gồm: hypophyllanthin (HPL) và niranthin (NRT); xác định độ tinh khiết của nirtetralin (NTT).

2.2.2.1. Xây dựng qui trình xác định độ tinh khiết của nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu

Tiến hành HPLC để xác định độ tinh khiết chất chiết được bằng phương pháp quy về 100 % diện tích pic trên sắc ký đồ.

Sau khi khảo sát điều kiện sắc ký như cột sắc ký, tỉ lệ pha động, tốc độ dòng, chọn điều kiện sắc ký thích hợp và tiến hành thẩm định qui trình phân tích theo hướng dẫn ICH [28] với các thông số: tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ chính xác, độ đúng.

Xác định chất lượng và thiết lập chất đối chiếu hypophyllanthin

Chuẩn bị mẫu:

Cân chính xác khoảng 5 mg hypophyllanthin sau tinh chế cho vào bình định mức 5 mL, hòa tan bằng methanol và siêu âm trong 5 phút, để nguội, thêm methanol vừa đủ, thu được dung dịch có nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$ (dung dịch gốc HPL), lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Điều kiện sắc ký:

- Cột sắc ký Gemini C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm).
- Pha động: Acetonitril – acid phosphoric 0,1 % (60 : 40).

- Tốc độ dòng: 1 mL/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ L.
- Nhiệt độ cột: 35 °C.
- Đầu dò PDA bước sóng phát hiện 230 nm.

Kết quả định lượng được xác định dựa vào phần trăm diện tích pic trong sắc ký đồ.

Xác định chất lượng và thiết lập chất đối chiếu niranthin

Chuẩn bị mẫu:

Cân chính xác khoảng 5,0 mg niranthin sau tinh chế cho vào bình định mức 25 mL, thêm methanol, siêu âm 10 phút, để nguội, điền đủ methanol đến vạch, lắc đều (dung dịch gốc có nồng độ 200 μ g/mL).

Điều kiện sắc ký:

- Cột sắc ký: Phenomenex C6-Phenyl 11A (150 x 4,6 mm; 3 μ m).
- Pha động: Acetonitril – nước (60 : 40).
- Tốc độ dòng: 1 mL/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μ L.
- Nhiệt độ cột: 30 °C.
- Đầu dò PDA bước sóng phát hiện 230 nm.

Kết quả định lượng được xác định dựa vào % diện tích pic trong sắc ký đồ.

Xác định độ tinh khiết chất nirtetralin sau tinh chế

Chuẩn bị mẫu:

Cân chính xác khoảng 1 mg nirtetralin sau tinh chế cho vào bình định mức 5 mL, hòa tan bằng methanol và siêu âm trong 5 phút, để nguội, điền đủ methanol đến vạch, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ 200 μ g/mL (dung dịch gốc NTT).

Điều kiện sắc ký:

- Cột sắc ký Gemini C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m).
- Pha động: Acetonitril – acid phosphoric 0,1 % (60 : 40).
- Tốc độ dòng: 1 mL/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 20 μ L.

- Nhiệt độ cột: 35 °C.
- Đầu dò PDA bước sóng phát hiện 230 nm.

Kết quả định lượng được xác định dựa vào % diện tích pic trong sắc ký đồ.

2.2.2.2. Thiết lập chất đối chiếu

Đánh giá thiết lập chất đối chiếu hypophyllanthin và niranthin theo tài liệu hướng dẫn của WHO và ASEAN [19], [101].

Các chất thiết lập chất đối chiếu sau khi được đánh giá đạt yêu cầu chất lượng được đóng thành từng lọ nhỏ có khối lượng thích hợp. Sử dụng lọ thủy tinh nâu hàn kín, có lớp đệm teflon đạt tiêu chuẩn chất lượng theo quy định, dán nhãn tạm ghi tên hoạt chất và đánh số thứ tự từng lọ. Việc đóng gói được thực hiện trong glove-box: nạp khí nitơ 99,99 %; độ ẩm tương đối trong buồng đóng không quá 40 % tại Khoa Thiết lập chất chuẩn - chất đối chiếu, Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh. Sau khi đóng gói, các lọ được bảo quản ở nhiệt độ ổn định 2-8 °C, tránh ánh sáng.

Đánh giá đồng nhất lọ

Lấy mẫu ngẫu nhiên theo phần mềm Excel, số lọ được lấy để kiểm tra là $\sqrt{N}+1$, trong đó N là tổng số lọ. Tiến hành xác định độ tinh khiết chất phân tích trong từng lọ theo phương pháp đã thẩm định. Đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ bằng phép phân tích phương sai một yếu tố.

Đánh giá liên phòng thí nghiệm

Thành phẩm sau khi đóng gói và đánh giá đồng nhất lô đạt yêu cầu được lấy mẫu ngẫu nhiên gửi ba phòng thí nghiệm độc lập (PTN1: Khoa Thiết lập chất chuẩn - chất đối chiếu, PTN2: Khoa Đông dược dược liệu, PTN3: Khoa Vật lý đo lường) đạt tiêu chuẩn GLP và ISO 17025 tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh, mỗi phòng 6 lọ. Tiến hành xác định độ tinh khiết chất phân tích trong từng lọ theo phương pháp đã thẩm định.

Xác định giá trị ấn định - giá trị công bố

Tập hợp các kết quả của ba phòng thí nghiệm tham gia ($n = 18$). Xác định giá trị ấn định theo hướng dẫn của ISO 13528 [34], các bước tiến hành như sau:

- Sắp xếp theo thứ tự tăng dần: $x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_n$.

- Gọi giá trị trung bình thực (robust average) và độ lệch chuẩn thực (robust standard deviation) của các kết quả này lần lượt là x^* và s^* . Tính các giá trị khởi điểm (Lần lặp 0) của x^* và s^* như sau:

$$x^* = \text{trung vị của } x_i \ (i = 1, 2, \dots, n)$$

$$s^* = 1,483 \text{ trung vị của } d_i \ (i = 1, 2, \dots, n)$$

$$\text{Trong đó: } d_i = |x_i - x^*|$$

- Tính giá trị $\delta = 1,5s^*$

- Tính giá trị $x^* + \delta$ và $x^* - \delta$

- Tiến hành lần lặp thứ i ($i = 1, 2, \dots, r$)

- Cập nhật lại các giá trị x_i^* trong lần lặp thứ i theo công thức như sau:

$$x_i^* = \begin{cases} x^* - \delta, & x_i < x^* - \delta \\ x^* + \delta, & \text{nếu } x_i < x^* + \delta \\ x_i, & \text{khác} \end{cases}$$

Trong đó: x_i ($i = 1, 2, \dots, n$) là giá trị trong lần lặp ($i - 1$).

- Tính các giá trị mới của x^* và s^* theo công thức sau:

$$x^* = \sum_{i=1}^n x_i^* / n$$

$$s^* = 1,134 \sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i^* - x^*)^2 / (n - 1)}$$

- Chu kỳ tính toán các giá trị mới của x^* và s^* được lặp lại cho đến khi các giá trị này không thay đổi (tính đến giá trị thập phân thứ 3 sau dấu phẩy) thì dừng lại.

- Chọn giá trị x^* và s^* cuối cùng không thay đổi là giá trị ấn định và độ lệch chuẩn của giá trị ấn định.

- Sử dụng giá trị ấn định x^* để đánh giá từng kết quả phân tích theo test-z, loại bỏ các kết quả phân tích có $|z| > 2,0$. Chọn các giá trị $|z| \leq 2,0$; tính giá trị trung bình.

- Xác định độ không đảm bảo đo: $U(x) = 1,25 \times \frac{s^*}{\sqrt{n}}$

2.2.3. ĐIỀU CHẾ VÀ TIÊU CHUẨN HÓA CAO DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG

2.2.3.1. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan trong Diệp hạ châu đấng bằng phương pháp HPLC

Theo USP [98], hàm lượng của các lignan trong cao dược liệu được quy về tổng hàm lượng của phyllanthin và hypophyllanthin. Tiến hành HPLC theo quy trình USP như sau:

Chuẩn bị mẫu

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 3,0 g bột dược liệu cho vào bình nón có nút mài 250 mL, thêm 50 mL methanol, hồi lưu trong nồi cách thủy khoảng 20 phút, để lắng và gạn lấy phần nổi. Lặp lại cho đến khi dịch chiết cuối cùng không có màu. Gộp các dịch chiết, cô đặc trong chân không và thêm methanol chuyển vào bình định mức 100 mL, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Mẫu chuẩn gốc: Cân chính xác khoảng 10,0 mg phyllanthin chuẩn và 4,0 mg hypophyllanthin chuẩn vào mỗi bình định mức 25 mL, thêm khoảng 10 mL methanol, siêu âm 10 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều (dung dịch 1 có nồng độ phyllanthin 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ và dung dịch 2 có nồng độ hypophyllanthin 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$), lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Hỗn hợp chuẩn: Hút chính xác 5 mL dung dịch 1 và 5 mL dung dịch 2 cho vào bình định mức 20 mL, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Điều kiện sắc ký theo USP [98]:

- Cột: Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm).
- Pha động: Acetonitril – dung dịch A (40 : 60).
- Đầu dò: UV 230 nm.
- Nhiệt độ cột: 25 °C.
- Tốc độ dòng: 1,5 mL/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μL .

Dung dịch A: Hòa tan 0,14 g kali dihydrophosphat trong 900 mL nước, thêm 0,5 mL acid phosphoric, thêm nước vừa đủ 1000 mL, khuấy đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Hàm lượng phyllanthin hoặc hypophyllanthin trong cao tính theo công thức:

$$X (\mu\text{g}/\text{mg}) = S_t \times \frac{C_c}{S_c} \times C\% \times \frac{V_t}{m_t}$$

Trong đó:

S_t, S_c : Diện tích pic phyllanthin hoặc hypophyllanthin của mẫu thử và mẫu chuẩn.

V_t : Thể tích dung dịch thử (mL)

m_t : Khối lượng mẫu thử (mg)

C_c : Nồng độ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) của mẫu chuẩn

$C\%$: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%)

Hàm lượng của các lignan được quy về tổng hàm lượng của phyllanthin và hypophyllanthin.

Ngoài phyllanthin, hypophyllanthin thì niranthin và nirtetralin cũng là thành phần lignan chính trong cây Diệp hạ châu đắng. Do đó, tiến hành xây dựng quy trình định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan gồm phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin trong Diệp hạ châu đắng bằng phương pháp HPLC là cần thiết.

Sau khi tiến hành sắc ký theo quy trình USP, khảo sát điều kiện sắc ký thích hợp với điều kiện sẵn có của phòng thí nghiệm sao cho thời gian sắc ký ngắn, các pic tách hoàn toàn, hệ số đối xứng của pic nằm trong khoảng 0,8-1,5.

Điều kiện sắc ký ban đầu:

- Cột sắc ký: pha đảo.
- Đầu dò PDA với bước sóng phát hiện 230 nm.
- Tốc độ dòng: 1 mL/phút.
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μL .
- Nhiệt độ cột: 25 °C.

Khảo sát điều kiện chiết kiệt các hoạt chất từ dược liệu, chọn ra điều kiện chiết kiệt là số lần chiết mà tại đó không còn thấy vết của cả 4 hoạt chất. Khảo sát sơ bộ hàm lượng hoạt chất trong 1 g dược liệu để tiến hành chuẩn bị các dung dịch chuẩn hỗn hợp có nồng độ thích hợp.

Mẫu thử dược liệu: Cân chính xác khoảng 1,0 g bột dược liệu đã được rây qua rây 355 μm cho vào bình nón có nút mài 250 mL, thêm 20 mL methanol, đậy kín

bình nón lại, siêu âm 30 phút, lắc đều trong 30 phút, gạn dịch qua giấy lọc. Phần cặn còn lại tiếp tục chiết 2 lần, mỗi lần với 20 mL methanol. Tập trung dịch lọc vào bình định mức 100 mL, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Mẫu chuẩn đối chiếu: Dung dịch chuẩn chứa phyllanthin (PLT), hypopyllanthin (HPL), niranthin (NRT) và nirtetralin (NTT) trong methanol có nồng độ chính xác khoảng lần lượt là 22,5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$ và 17,5 $\mu\text{g/mL}$, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Quy trình định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của ICH [28] bao gồm: tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ), khoảng tuyến tính, độ chính xác (độ lặp lại, độ chính xác trung gian) và độ đúng.

Tính phù hợp hệ thống: Tiến hành sắc ký dung dịch mẫu chuẩn 6 lần. Xác định các thông số về thời gian lưu (R_t), diện tích pic (S), độ phân giải (R_s), hệ số đối xứng (A_s) và số đĩa lý thuyết.

Yêu cầu: Quy trình đạt tính phù hợp hệ thống khi mẫu chuẩn có: Các giá trị thời gian lưu (R_t), diện tích pic (S) có $RSD \leq 2\%$; Hệ số đối xứng (A_s) của pic trong khoảng 0,8-1,5; Độ phân giải $R_s \geq 1,5$.

Tính đặc hiệu: Tiến hành sắc ký mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử thêm chuẩn, mẫu trắng (methanol HPLC) theo điều kiện sắc ký đã chọn.

Yêu cầu: Thời gian lưu của pic chính cần định lượng trong mẫu thử phải tương ứng với thời gian lưu của các pic trong mẫu chuẩn, đồng thời mẫu trắng không có pic nào tại thời gian lưu trên.

Tính tuyến tính: Từ dung dịch chuẩn gốc tiến hành pha thêm 5 dung dịch chuẩn có nồng độ khoảng từ 60 % đến 140 %. Tiến hành sắc ký các dung dịch chuẩn.

Xây dựng phương trình hồi quy $\hat{y} = ax + b$, vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ với diện tích pic và xác định hệ số tương quan r. Sử dụng test F để kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy, test t để kiểm tra ý nghĩa của hệ số a và b.

Yêu cầu: $r \geq 0,999$.

Độ lặp lại: Tiến hành định lượng 6 mẫu thử. Xác định độ lệch chuẩn tương đối RSD %.

Yêu cầu: $RSD \% \leq 5 \%$.

Độ chính xác trung gian: Tiến hành định lượng 6 mẫu thử cùng điều kiện ở một phòng thí nghiệm nhưng khác ngày. Xác định độ lệch chuẩn tương đối RSD %.

Yêu cầu: $RSD \% \leq 5 \%$ ở mỗi ngày và độ sai khác kết quả định lượng giữa 2 hai ngày $\leq 5 \%$.

Độ đúng: Tiến hành xác định độ đúng bằng phương pháp mẫu thử thêm chuẩn. Chuẩn bị 9 mẫu thử thêm chuẩn ở 3 mức nồng độ 80 %, 100 % và 120 % so với mức nồng độ định lượng. Tính tỉ lệ phục hồi trung bình lượng chất chuẩn thêm vào.

Yêu cầu: Tỷ lệ phục hồi trung bình (%) của các mức nồng độ nằm trong khoảng 95 % - 105 % và $RSD \% \leq 5 \%$.

2.2.3.2. Điều chế cao chuẩn hóa Diệp hạ châu đắng

Khảo sát điều kiện thích hợp cho quá trình chiết cao Diệp hạ châu đắng.

Chuẩn bị mẫu: Cân một lượng khoảng 10 g bột dược liệu (rây qua cỡ rây 355 μm) cho vào bình nón, tiến hành chiết 2 lần dược liệu bằng phương pháp ngâm theo từng điều kiện khảo sát. Dịch chiết được để lắng và lọc qua bông gòn, sau đó được cô thành cặn trên bếp cách thủy. Cặn được sấy khô ở 85 °C đến khi độ ẩm nhỏ hơn 5 %, thu được các cao dược liệu tương ứng. Xác định khối lượng cặn. Hòa tan cặn bằng ethanol 96 % trong bình định mức, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Tiến hành sắc ký SKLM và HPLC. Đánh giá kết quả khảo sát trên khối lượng cặn thu được, các vết chính trên sắc ký đồ của SKLM và diện tích pic chính trên sắc ký đồ HPLC.

Mô hình thực nghiệm được tiến hành khảo sát lần lượt ở các điều kiện như sau:

- Khảo sát dung môi: ethanol 30 %, ethanol 50 %, ethanol 70 %, ethanol 96 % với tỉ lệ dược liệu : dung môi (tỉ lệ DL : DM) = (1 : 15).
- Khảo sát thời gian ngâm: 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 7 ngày.
- Khảo sát tỉ lệ dược liệu : dung môi: (1 : 20), (1 : 15), (1 : 10), (1 : 5), (1 : 4).
- Khảo sát số lần chiết: 1 lần, 2 lần, 3 lần, 4 lần.

Chọn điều kiện thích hợp cho quá trình chiết cao Diệp hạ châu đẳng để tiến hành chiết cao thực nghiệm.

Khảo sát điều kiện chiết trên quy mô phòng thí nghiệm và quy mô pilot. So sánh tổng hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin (quy về hàm lượng trong dược liệu) giữa các dung môi chiết, giữa quy trình chiết xuất cao quy mô phòng thí nghiệm và quy mô pilot.

2.2.3.3. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cao khô Diệp hạ châu đẳng

Xây dựng dự thảo tiêu chuẩn chất lượng cao khô Diệp hạ châu đẳng bao gồm các chỉ tiêu sau:

Tính chất: Quan sát bằng cảm quan.

Định tính: Tiến hành bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và phương pháp sắc ký lỏng.

Mất khối lượng do làm khô: Tiến hành theo ĐĐVN V, phụ lục 9.6.

Tro toàn phần: Tiến hành theo ĐĐVN V, phụ lục 9.8.

Giới hạn kim loại nặng: Tiến hành theo ĐĐVN V, phụ lục 9.4.8.

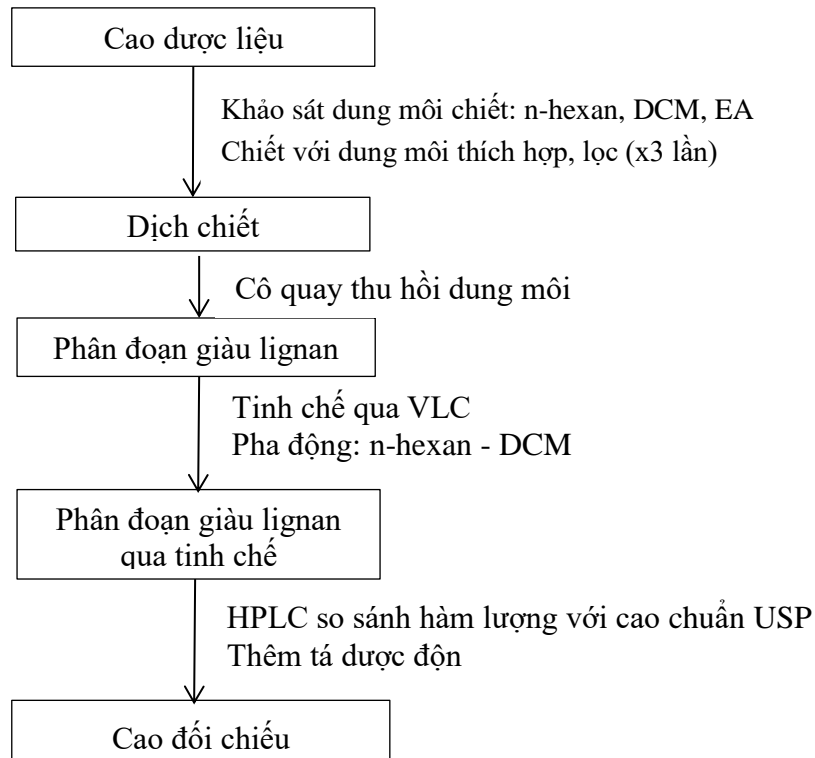
Định lượng: Tiến hành bằng phương pháp sắc ký lỏng

Giới hạn nhiễm khuẩn: Tiến hành theo ĐĐVN V, phụ lục 13.6.

2.2.3.4. Ứng dụng điều chế cao giàu lignan Diệp hạ châu đẳng dùng làm cao đối chiếu

Theo chuyên luận dược liệu Diệp hạ châu đẳng của USP [98] có dùng cao chuẩn USP (USP Powdered *Phyllanthus amarus* Extract RS) để đánh giá chỉ tiêu định tính và định lượng. Tiến hành khảo sát điều chế cao giàu lignan có chất lượng tương đương với cao chuẩn USP để dùng làm cao đối chiếu theo Sơ đồ 2.3.

Chọn dung môi chiết cho hàm lượng các lignan cao nhất và ít tạp nhất và tinh chế phân đoạn này bằng sắc ký cột chân không để loại tạp, thu được phân đoạn giàu lignan.



Sơ đồ 2.3. Sơ đồ điều chế cao giàu lignan *Phyllanthus amarus*

Mẫu chuẩn: Cân chính xác khoảng 5,0 mg phyllanthin chuẩn và 2,0 mg hypophyllanthin chuẩn vào bình định mức 10 mL, thêm khoảng 5 mL methanol, siêu âm khoảng 10 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều (dung dịch có nồng độ phyllanthin 500 $\mu\text{g/mL}$ và hypophyllanthin 200 $\mu\text{g/mL}$), lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Mẫu cao chuẩn USP: Cân chính xác khoảng 100,0 mg cao chuẩn USP vào bình định mức 20 mL, thêm khoảng 10 mL methanol, siêu âm 30 phút, lắc đều 30 phút, để nguội, bổ sung methanol đến vạch (dung dịch có nồng độ 5 mg/mL), lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 2,0 g cao ethanol 96 % vào bình nón 250 mL, thêm khoảng 50 mL dung môi, siêu âm 30 phút, lắc đều trong 30 phút, để lắng, gạn và lọc qua giấy. Phần cặn còn lại được tiếp tục chiết tương tự 2 lần, mỗi lần với 30 mL methanol. Tập trung dịch lọc vào cốc 100 mL. Cô cách thủy đến cạn, hòa tan cặn trong methanol, chuyển vào bình định mức 20 mL, bổ sung dung môi đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Tiến hành SKLM và HPLC theo USP [98].

So sánh hàm lượng hoạt chất trong phân đoạn giàu lignan đã tinh chế và cao chuẩn USP, thêm chất độn để được hàm lượng phù hợp.

Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cao giàu lignan điều chế dùng làm cao đối chiếu.

2.2.3.5. Ứng dụng định lượng các lignan trong Diệp hạ châu đắng

Định lượng các lignan trong các mẫu dược liệu: Thực hiện trên dược liệu được thu hái ở 3 tỉnh Trà Vinh, Cần Thơ và Cà Mau.

Định lượng các lignan trong các mẫu cao khô dược liệu:

Dung dịch chuẩn: Tiến hành pha dung dịch chuẩn theo mục 2.2.3.1.

Dung dịch thử:

- Cân chính xác khoảng 1,0 g cao khô dược liệu chiết với nước, ethanol 30 %, ethanol 40 %, ethanol 50 %, ethanol 60 % và ethanol 70 % được sản xuất ở quy mô pilot tại Công ty cổ phần BV Pharma cho vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 20 mL methanol và siêu âm 30 phút, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm .

- Cân chính xác khoảng 100 mg cao giàu lignan điều chế cho vào bình định mức 100 mL, thêm khoảng 20 mL methanol và siêu âm 30 phút, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm .

2.2.4. ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ THÔNG SỐ DƯỢC ĐỘNG HỌC CỦA CAO CHUẨN HÓA ĐIỀU CHẾ TỪ DIỆP HẠ CHÂU ĐẮNG

2.2.4.1. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ

Chuẩn bị mẫu

Để khảo sát các điều kiện sắc ký và điều kiện khối phổ, hỗn hợp chuẩn phyllanthin (PLT), hypophyllanthin (HPL), niranthin (NRT) và chuẩn nội (IS) được pha trong methanol với nồng độ mỗi chất là 1 $\mu\text{g/mL}$. Mẫu giả lập được chuẩn bị bằng cách thêm hỗn hợp chuẩn vào huyết tương trắng với tỷ lệ 1 : 20 về thể tích.

Khảo sát điều kiện khối phổ

Dựa vào các tài liệu tham khảo [25], [63], điều kiện khối phổ được khảo sát trên hệ thống máy LC-MS/MS Shimadzu 8040, sử dụng kỹ thuật ghi phổ full scan để xác định ion phân tử các chất và kỹ thuật product ion để tìm mảnh ion định lượng.

Quy trình phân tích được thực hiện trên hệ thống LC-MS/MS với các điều kiện khối phổ ban đầu như sau:

- Tốc độ dòng khí nitơ khô: 15 lít/phút.
- Tốc độ dòng khí phun: 3 lít/phút.
- Điện thế mao quản: 4500 V.
- Nhiệt độ hóa hơi dung môi: 250 °C.
- Nhiệt độ buồng ion hóa: 400 °C.

Các điều kiện khảo sát bao gồm: Chế độ ESI để khảo sát mảnh ion phân tử của các chất, chế độ MRM để khảo sát mảnh ion định lượng của các chất, thể phân mảnh và năng lượng va chạm được khảo sát và tối ưu hóa bằng công cụ tối ưu hóa tự động Optimize Voltage của phần mềm Lab Solutions 5.0 sao cho thu được tín hiệu các mảnh ion có tỷ số khối lượng/điện tích (m/z) cao nhất.

Khảo sát chuẩn nội

Một số yêu cầu trong chọn lựa chất chuẩn nội:

- Có tính chất lý, hóa giống với chất phân tích.
- Có cấu trúc tương tự với chất cần xác định, có cường độ tín hiệu cao, pic chuẩn nội nằm trong khoảng thời gian lưu không quá xa so với thời gian lưu của chất cần xác định.
- Không phản ứng với bất kỳ thành phần nào của mẫu thử.
- Phải có độ tinh khiết cao và dễ kiểm.

Qua tham khảo các tài liệu [25], [75] và căn cứ vào các tiêu chuẩn lựa chọn chuẩn nội với điều kiện khối phổ đã xác định, tiến hành khảo sát các chuẩn nội dự kiến đề xuất là diazepam và carbamazepin.

Khảo sát điều kiện sắc ký

Dựa vào đặc tính, cấu trúc hóa học của các chất phân tích và tham khảo tài liệu được công bố [25], [59], [63], [75]. Qua tham khảo các tài liệu quy trình phân tích định lượng được thực hiện trên máy LC-MS/MS Shimadzu 8040 với các điều kiện sắc ký ban đầu như sau:

- Cột sắc ký: Pha tĩnh C18 với kích thước khác nhau.
- Nhiệt độ cột: 40 °C.
- Tốc độ dòng: 0,3 mL/phút.
- Thể tích tiêm: 5 µL.
- Pha hỗn hợp dung dịch chuẩn chứa các chất phân tích ở nồng độ 50 ng/mL.
- Nồng độ dung dịch nội chuẩn: 1000 ng/mL.

Các điều kiện sắc ký sau đây được lựa chọn để khảo sát gồm:

Khảo sát cột sắc ký

Tiến hành khảo sát các cột với điều kiện pha động: Methanol – dung dịch đệm amoni acetat 10 mM (63 : 37) với các cột sắc ký như sau: (a) Gemini C18 (100 × 3 mm; 5 µm); (b) Gemini C18 (100 × 2 mm; 3 µm); (c) Gemini C18 (50 × 3 mm; 5 µm).

Khảo sát pha động

Từ các tài liệu tham khảo [25], [63], [75], tiến hành khảo sát các hệ pha động gồm: Methanol/ Acetonitril – dung dịch đệm amoni acetat hoặc amoni format với các nồng độ, pH khác nhau. Thay đổi tỉ lệ pha động thích hợp.

Khảo sát nồng độ dung dịch đệm

Tiến hành khảo sát nồng độ dung dịch đệm amoni format trong khoảng từ 2-10 mM.

Khảo sát pH dung dịch đệm

Tiến hành khảo sát các dung dịch đệm amoni format 5 mM với các pH khác nhau từ 3-7 và so sánh với dung dịch đệm khi không chỉnh pH.

Khảo sát tỉ lệ pha động

Khảo sát pha động: Methanol – dung dịch đệm amoni format 5 mM với các tỉ lệ (a) (65 : 35); (b) (63 : 37) và (c) (60 : 40).

Khảo sát nhiệt độ cột

Dựa vào tài liệu tham khảo [25], [63], [75], tiến hành khảo sát nhiệt độ cột trong khoảng từ 30-45 °C.

Khảo sát tốc độ dòng

Tiến hành khảo sát tốc độ dòng từ 0,2-0,5 mL/phút.

Khảo sát thể tích tiêm

Tiến hành khảo sát gồm 2 μL và 5 μL .

Qua đó, chọn điều kiện sắc ký thích hợp sao cho các pic hoạt chất và pic chất chuẩn nội cân đối, thời gian phân tích ngắn và tín hiệu cao.

Khảo sát phương pháp xử lý mẫu

Dựa theo các công trình đã công bố [25], [58], [63], [75], độ phân cực của chất phân tích và khả năng chuyển đổi của các chất, phương pháp xử lý mẫu bằng cách rửa protein và chiết lỏng - lỏng đã được lựa chọn. Chọn phương pháp xử lý mẫu sao cho hiệu suất chiết cao, sự ảnh hưởng của nền mẫu là tối thiểu.

Khảo sát phương pháp rửa protein

Các dung môi rửa protein được khảo sát là acetonitril và methanol với tỉ lệ 1 thể tích huyết tương thô : 3 thể tích dung môi rửa.

Chuẩn bị mẫu: Lấy chính xác 200 μL huyết tương thô có chứa các chất phân tích cho vào ống nghiệm, thêm 10 μL dung dịch chuẩn nội có nồng độ 1000 ng/mL, thêm tiếp 700 μL dung môi rửa protein, lắc xoáy 2500 vòng/phút trong 1 phút, ly tâm 17.000 vòng/phút trong 10 phút ở -5 °C, lấy dịch ly tâm, lọc qua màng lọc milipore 0,22 μm , tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn.

Khảo sát phương pháp chiết lỏng - lỏng

Các dung môi chiết được khảo sát gồm: *tert*-butyl methyl ether, ethyl acetat, *n*-hexan. Khảo sát thể tích dung môi chiết và số lần chiết.

Chuẩn bị mẫu:

Lấy chính xác 200 μL huyết tương thô có chứa các chất phân tích cho vào ống nghiệm, thêm 10 μL dung dịch chuẩn nội nồng độ 1000 ng/mL, lắc 10 giây. Thêm dung môi hữu cơ dùng để chiết, lắc xoáy 2000 vòng/phút trong 1 phút, lắc 300 vòng/phút trong 5 phút, ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, lấy dịch ly tâm, cô bay hơi đuôi dung môi đến cạn ở nhiệt độ phòng, lấy dịch trong, gộp

dịch chiết và bốc hơi dung môi tới gần bằng khí nitơ ở 40 °C. Hòa tan gần trong 200 μL methanol, lắc xoáy 1 phút, siêu âm 5 phút, ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ 0 °C, lọc qua màng lọc 0,22 μm , tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn.

Xác định khoảng nồng độ định lượng

Sau khi đã thiết lập được điều kiện sắc ký, điều kiện khối phổ và phương pháp xử lý mẫu, cần phải tính toán xây dựng khoảng nồng độ tuyến tính của từng hoạt chất trong quy trình và các mức nồng độ của các mẫu kiểm chứng (LLOQ, LQC, MQC, HQC) phù hợp với đường chuẩn và theo những hướng dẫn của quy trình định lượng thuốc trong dịch sinh học [23], [97]. Dựa vào các tài liệu tham khảo [63], [75] xác định khoảng nồng độ định lượng các hoạt chất.

Thẩm định quy trình phân tích

Quy trình định lượng PLT, HPL và NRT trong huyết tương thô bằng kỹ thuật LC-MS/MS được thẩm định dựa theo những quy định và yêu cầu trong hướng dẫn của US-FDA, EMA và ĐĐVN V về các chỉ tiêu tính đặc hiệu; đường chuẩn và khoảng tuyến tính; giới hạn định lượng dưới; độ đúng và độ chính xác; hiệu suất chiết; ảnh hưởng của nền mẫu, lượng mẫu tồn dư và độ pha loãng; độ ổn định của hoạt chất [2], [23], [97].

Tính phù hợp của hệ thống

Tiêm lặp lại 6 lần mẫu huyết tương đã xử lý có chứa hỗn hợp các chất cần phân tích và chuẩn nội ở mức nồng độ trung bình (MQC) .

Yêu cầu: Các thông số sắc ký khảo sát (tỷ số thời gian lưu, tỷ số diện tích pic) có hệ số phân tán (CV) không được quá 5 %.

Tính đặc hiệu

Tiêm 6 mẫu huyết tương trắng và 6 mẫu giả lập có thêm chuẩn nội ở mức nồng độ giới hạn định lượng dưới của phạm vi định lượng (LLOQ). Xác định thời gian lưu, tín hiệu đáp ứng pic.

Yêu cầu: Mẫu huyết tương trắng cho tín hiệu phân tích nằm trong giới hạn cho phép (≤ 20 % diện tích pic đối với các chất phân tích và ≤ 5 % đối với chuẩn nội).

Tỷ lệ thu hồi (Hiệu suất chiết)

Xác định tỷ lệ thu hồi (Hiệu suất chiết) bằng cách so sánh đáp ứng của chất phân tích được chiết từ mẫu giả lập thêm chuẩn nội ở 3 mức nồng độ (LQC, MQC và HQC) với đáp ứng của mẫu trắng sau khi xử lý được thêm dung dịch chuẩn để có cùng nồng độ tương ứng được pha trong dung môi. Chuẩn bị 6 mẫu ở mỗi mức nồng độ. Tiến hành sắc ký các mẫu này.

Tính tuyến tính và đường chuẩn

Chuẩn bị các hỗn hợp chuẩn với nồng độ trong phạm vi định lượng. Thêm các hỗn hợp chuẩn này vào trong huyết tương trắng (với tỷ lệ 1 : 20 theo thể tích so với nền mẫu), thêm tiếp chuẩn nội và tiến hành xử lý mẫu để thu được giai mẫu chuẩn có nồng độ trong phạm vi định lượng.

Xác định sự tương quan giữa nồng độ và tỷ số diện tích pic của chất phân tích và diện tích của pic chuẩn nội của từng chất phân tích theo một hàm tuyến tính nhất định, phù hợp với qui trình phân tích được đề ra.

Vẽ đường biểu diễn sự tương quan giữa giá trị nồng độ và tỷ số diện tích pic theo hàm giá trị đã xây dựng được. Sử dụng mô hình hồi qui tuyến tính $y = ax + b$, với trọng số $1/x^2$.

Yêu cầu:

- $R^2 \geq 0,98$.
- Không ít hơn 75 % các điểm đường chuẩn và tối thiểu 06 mẫu đường chuẩn phải có nồng độ tìm lại nằm trong khoảng 85 % - 115 % so với nồng độ lý thuyết (trừ điểm LLOQ nằm trong khoảng 80 % - 120 % so với nồng độ lý thuyết).

Độ đúng và độ chính xác (trong ngày và giữa các ngày)

Độ đúng và độ chính xác được xác định cùng lúc trên các mẫu huyết tương có chứa chất cần phân tích tại 4 mức nồng độ: LLOQ, LQC, MQC, HQC. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 6 mẫu. Tiến hành xử lý mẫu và sắc ký trong 1 ngày.

Đánh giá độ chính xác và độ đúng giữa các ngày bằng cách tiếp tục thực hiện thêm tối thiểu 2 ngày.

Yêu cầu:

- Độ đúng: 80 % - 120 % so với nồng độ lý thuyết ở nồng độ LLOQ và 85 % - 115 % so với nồng độ lý thuyết ở nồng độ LQC, MQC, HQC.

- Độ chính xác: $CV \leq 20\%$ ở nồng độ LLOQ và $\leq 15\%$ ở nồng độ LQC, MQC, HQC.

Giới hạn định lượng dưới

Tiến hành xác định nồng độ thấp nhất sao cho thỏa mãn điều kiện tín hiệu đáp ứng của chất phân tích so với tín hiệu đáp ứng của mẫu huyết tương trắng ít nhất bằng 5 lần và cho độ chính xác trong khoảng $\pm 20\%$ và độ đúng 80 % - 120 %.

Độ ổn định của mẫu thử

Độ ổn định của dung dịch chuẩn gốc

Pha 3 lô mẫu, mỗi lô chứa các chất phân tích trong dung môi ở nồng độ MQC, mỗi lô 6 mẫu. Phân tích ngay 1 lô theo phương pháp đã xây dựng.

- Độ ổn định ngắn hạn: Lô thứ 2 để ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ rồi phân tích.
- Độ ổn định dài hạn: Lô thứ 3 bảo quản ở nhiệt độ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ và phân tích sau 30 ngày.

Độ ổn định trong huyết tương

Pha 4 lô mẫu, mỗi lô chứa các chất phân tích trong huyết tương ở nồng độ LQC, HQC, mỗi nồng độ 6 mẫu. Phân tích ngay 1 lô theo phương pháp đã xây dựng.

- Độ ổn định ngắn hạn: Lô thứ 2 để ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 6 giờ rồi phân tích.
- Độ ổn định của mẫu sau 3 chu kỳ đông - rã đông: Lô thứ 3 bảo quản ở $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ít nhất 12 giờ, lấy ra để ở nhiệt độ phòng cho đến khi rã đông, lặp lại chu trình thêm 2 lần. Phân tích mẫu sau 3 chu trình đông - rã đông.
- Độ ổn định dài hạn: Lô thứ 4 bảo quản ở nhiệt độ $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ và phân tích sau 30 ngày.

- Độ ổn định sau khi xử lý mẫu (trong buồng tiêm mẫu): Tiêm lại lô mẫu ở nồng độ LQC, HQC, mỗi nồng độ 6 mẫu, sau ít nhất 24 giờ xử lý và bảo quản trong buồng tiêm mẫu ở $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Yêu cầu: Mẫu được xem là ổn định nếu như giá trị tìm lại của từng hoạt chất nằm trong khoảng 85 % - 115 % của nồng độ lý thuyết ở từng mức nồng độ.

Độ ổn định của dung dịch chuẩn nội

Pha 3 lô mẫu, mỗi lô chứa IS trong dung môi ở nồng độ 100 ng/mL, mỗi lô 6 mẫu. Phân tích ngay 1 lô theo phương pháp đã xây dựng.

- Độ ổn định ngắn hạn: Lô thứ 2 để ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ rồi phân tích.
- Độ ổn định dài hạn: Lô thứ 3 bảo quản ở nhiệt độ -20 °C và phân tích sau 30 ngày.

Pha loãng dung dịch chuẩn gốc sau các điều kiện bảo quản trong dung môi hòa mẫu để được nồng độ thích hợp và tiến hành phân tích cùng với dung dịch chuẩn mới pha có nồng độ tương ứng.

- Độ ổn định sau khi xử lý mẫu trong huyết tương (trong buồng tiêm mẫu): Tiêm lại lô mẫu ở nồng độ LQC, HQC, mỗi nồng độ 6 mẫu, sau ít nhất 24 giờ xử lý và bảo quản trong buồng tiêm mẫu ở 5 °C.

Yêu cầu: Mẫu được xem là ổn định nếu như giá trị tìm lại của từng chất phân tích và chuẩn nội nằm trong khoảng 90 % - 110 % (dung dịch gốc là ± 10 %, huyết tương mới là ± 15 %) của nồng độ ban đầu ở từng mức nồng độ.

Ảnh hưởng của nền mẫu (Matrix effects)

Chuẩn bị 6 lô huyết tương khác nhau, mỗi lô 3 mẫu, tiến hành phân tích mẫu theo qui trình xử lý mẫu, mẫu sau khi xử lý được thêm chất phân tích ở 2 nồng độ LQC, HQC và chuẩn nội vào 2 mẫu mỗi lô. Tiến hành phân tích mẫu song song với mẫu LQC và HQC có chuẩn nội trong pha động để xác định ảnh hưởng của nền mẫu.

$$MF_{AS} = \text{Area } M_{AS} / \text{Area } MP_{AS}$$

$$MF_{IS} = \text{Area } M_{IS} / \text{Area } MP_{IS}$$

$$\text{IS-normalized MF} = MF_{AS} / MF_{IS}$$

Trong đó:

Area $M_{AS (IS)}$: diện tích pic của chất phân tích (chuẩn nội) trong huyết tương

Area $MP_{AS (IS)}$: diện tích pic của chất phân tích (chuẩn nội) trong pha động

Yêu cầu: CV của IS-normalized MF ≤ 15 %.

Ảnh hưởng lượng mẫu tồn dư (Carry over)

Tiến hành tiêm mẫu có nồng độ cao nhất trong huyết tương (ULOQ) vào hệ thống sắc ký, sau khi phân tích xong, tiêm ngay mẫu trắng (Blank) vào hệ thống.

Thực hiện qui trình trên 6 lần. Tiêm 6 lần mẫu có nồng độ LLOQ trong huyết tương để đánh giá kết quả.

Yêu cầu: Ảnh hưởng lượng mẫu tồn dư trong mẫu trắng theo nồng độ không được lớn hơn 20 % so với giới hạn dưới của định lượng (LLOQ) đối với các chất phân tích và 5 % đối với chất chuẩn nội.

Ảnh hưởng của sự pha loãng

Chuẩn bị 6 mẫu huyết tương giả lập có nồng độ 50 ng/mL cho các chất phân tích. Pha loãng mẫu này 2 lần bằng huyết tương trắng rồi tiến hành xử lý mẫu và phân tích.

Yêu cầu: Mẫu được xem là không bị ảnh hưởng bởi sự pha loãng nếu như nồng độ tìm lại của từng chất phân tích nằm trong khoảng 85 % - 115 % của nồng độ lý thuyết.

2.2.4.2. Đánh giá một số thông số dược động học của cao chuẩn hóa điều chế từ Diệp hạ châu đắng

Thiết kế nghiên cứu theo mô hình ngẫu nhiên, đơn liều, một thuốc trong tình trạng đói. Cỡ mẫu nghiên cứu: thực hiện trên 12 con thỏ.

Tiêu chuẩn lựa chọn thử thí nghiệm

- Nguồn gốc rõ ràng, đáng tin cậy, trưởng thành, đực hoặc cái (nhưng không được mang thai), cân nặng $2 \pm 0,5$ kg.
- Khỏe mạnh, không dị tật, không chấn thương.
- Không tiêu chảy, tiết dịch mắt mũi, không sụt cân, ăn uống bình thường.
- Năng động, lông mượt, mắt sáng, không có biểu hiện bất thường về tâm tính.
- Không mang mầm bệnh tiềm ẩn, không mắc bệnh mạn tính, đặc biệt không mang tác nhân gây bệnh cho người.
- Chọn thử đủ điều kiện trên được theo dõi trong 3 ngày trước khi thử nghiệm về sức khỏe, trọng lượng và thân nhiệt.

Được chăn nuôi trong điều kiện thích hợp: Chuồng trại thoáng mát, yên tĩnh, đảm bảo vệ sinh, nhiệt độ, độ ẩm, ánh sáng thích hợp. Dinh dưỡng đầy đủ, cân bằng

hợp vệ sinh. Việc chăm sóc thỏ thí nghiệm được thực hiện đúng quy trình và được kiểm soát chặt chẽ.

Theo dõi thỏ: thỏ mới nhập ghi số lên tai thỏ, cho vào lồng nuôi. Ghi phiếu theo dõi.

Khẩu phần ăn: Cho thỏ ăn buổi sáng: thực hiện vào khoảng 8 giờ - 8 giờ 30 phút sau khi vệ sinh, cho thỏ ăn cám dạng viên, trung bình khoảng 50 g /thỏ /ngày. Nước đun sôi (1/2 chai) để vào vị trí quy định. Cho thỏ ăn buổi chiều: cho thỏ ăn cám dạng viên vào khoảng 15 giờ - 15 giờ 30 phút. Trong khi cho thỏ ăn quan sát tình trạng sức khỏe của thỏ, báo cáo cách ly thỏ bệnh ngay nếu có gì khác lạ.

Đặt từng mỗi con thỏ vào lồng riêng biệt trước khi uống thuốc nghiên cứu 1 giờ để ổn định.

Cách cho uống thuốc

Dựa vào tài liệu tham khảo [58], [63], [75], chọn liều thử nghiệm: 2 mg phyllanthin/kg cân nặng.

Từ kết quả định lượng hàm lượng phyllanthin trong cao (18,3 µg PLT/ mg cao), tính toán liều dùng cho thỏ uống thuốc như sau: 3000 mg cao pha trong bình định mức 100 mL. Thêm 60 mL nước, siêu âm 30 phút, lắc 30 phút. Điền đầy đến vạch, lắc đều. Ly tâm trong 10 phút, lấy dịch trong ở trên cho thỏ uống. Liều uống thuốc là 3,64 mL/kg.

Bảng 2.5. Liều uống thuốc cho từng thỏ

Thỏ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Giới tính	♀	♀	♀	♂	♀	♀	♂	♂	♀	♀	♂	♂
Cân nặng (kg)	2,0	2,1	2,1	2,2	2,2	2,1	2,3	2,0	2,0	2,5	2,3	2,4
Uống (mL)	7,3	7,7	7,7	8,0	8,0	7,7	8,4	7,3	7,3	9,1	8,4	8,7

Thỏ uống thuốc sau thời gian nhịn đói qua đêm ít nhất 10 giờ. Không uống nước trong khoảng 01 giờ trước và sau khi uống thuốc. Thỏ chỉ được ăn sau 4 giờ uống thuốc và tất cả thỏ được ăn cùng loại thức ăn.

Thời điểm lấy mẫu

Thiết kế thời điểm lấy mẫu máu, ly trích huyết tương và bảo quản. Khảo sát thời điểm lấy mẫu máu sau khi uống thuốc thử nghiệm trên các đối tượng tham gia nghiên cứu phù hợp theo yêu cầu: 2 mẫu trước C_{max} , 3-4 mẫu quanh C_{max} , 6-8 mẫu ở

pha thải trừ, điểm cuối phải bằng ít nhất 4 lần thời gian bán thải. Trong vòng 20 phút sau khi lấy, các mẫu máu được ly tâm ở tốc độ 4500 vòng/phút trong 5 phút, tách lấy huyết tương, bảo quản ở dưới $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ cho đến khi phân tích.

Thời điểm lấy mẫu gồm tổng cộng: 14 mẫu máu (tổng cộng 21 mL máu) được lấy từ tĩnh mạch tai thỏ vào các thời điểm: 0 (trong vòng 30 phút trước khi uống thuốc), 5, 10, 15, 20, 30, 45 phút; 1, 2, 3, 4, 5, 6 và 8 giờ sau khi uống thuốc.



Hình 2.1. Cho thỏ uống thuốc



Hình 2.2. Lấy máu tai thỏ

Mỗi lần lấy khoảng 1,5 mL cho vào eppendorf 2 mL chứa sẵn 0,1 mL chất chống đông natri citrat. Mẫu máu thỏ sau đó được ly tâm 17.000 vòng/phút trong 10 phút để thu được huyết tương và bảo quản ở nhiệt độ dưới $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ cho đến khi phân tích.

Phân tích mẫu

Phân tích các mẫu huyết tương thỏ theo phương pháp LC-MS/MS đã thẩm định đạt yêu cầu theo hướng dẫn US-FDA, EMA và DĐVN V.

Xử lý và phân tích dữ liệu thực nghiệm

Xác định các thông số dược động học C_{\max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, T_{\max} , K_e , $T_{1/2}$. và phân tích thống kê mô tả (giá trị trung bình cộng, giá trị trung bình nhân, độ lệch chuẩn, hệ số phân tán, giá trị nhỏ nhất, giá trị lớn nhất) được tính cho các thông số dược động học của thuốc nghiên cứu. Các giá trị độ lệch chuẩn, hệ số phân tán được tính bằng giá trị trung bình cộng. Đồ thị biểu diễn nồng độ thuốc trong huyết tương theo thời gian của từng cá thể được trình bày trên thang tuyến tính và thang logarit bằng phần mềm WinNonLin 7.2.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP, TINH CHẾ VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC, ĐỘ TINH KHIẾT CỦA CÁC CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC

3.1.1. Kiểm tra chất lượng dược liệu nghiên cứu

Dược liệu nghiên cứu (Hình 3.1) được tiến hành kiểm tra chất lượng theo ĐĐVN IV, kết quả các chỉ tiêu được trình bày ở Bảng 3.1.



Hình 3.1. Toàn cây, mặt lá trên, mặt lá dưới và quả của Diệp hạ châu đắng

Bảng 3.1. Kết quả kiểm tra chất lượng dược liệu nghiên cứu

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Mô tả	Theo ĐĐVN IV	Đạt
Vi phẫu	Theo ĐĐVN IV	Đạt
Bột	Bột màu xanh, vị rất đắng. Soi kính hiển vi thấy: mảnh biểu bì mang lỗ khí, bó sợi dài, mảnh mô mềm tế bào đa giác, thành mỏng, mảnh mạch vạch, mạch xoắn	Đạt
Định tính Phản ứng hóa học Sắc ký lớp mỏng	Diệp hạ châu đắng (<i>Phyllanthus amarus</i> Schum. et Thonn.)	Đúng
Độ ẩm	Không quá 12,0 %	Đạt (9,7 %)
Tro toàn phần	Không quá 20,0 %	Đạt (7,2 %)
Tỷ lệ vụn nát	Không quá 8,0 %	Đạt (3,2 %)
Chất chiết được trong dược liệu	Không ít hơn 7,0 % tính theo dược liệu khô kiệt	Đạt (14,3 %)

Chiết tách DNA và giải trình tự có kết quả được thể hiện trong Bảng 3.2.

Bảng 3.2. Kết quả search blast NCBI cặp môi ITS1 – ITS4

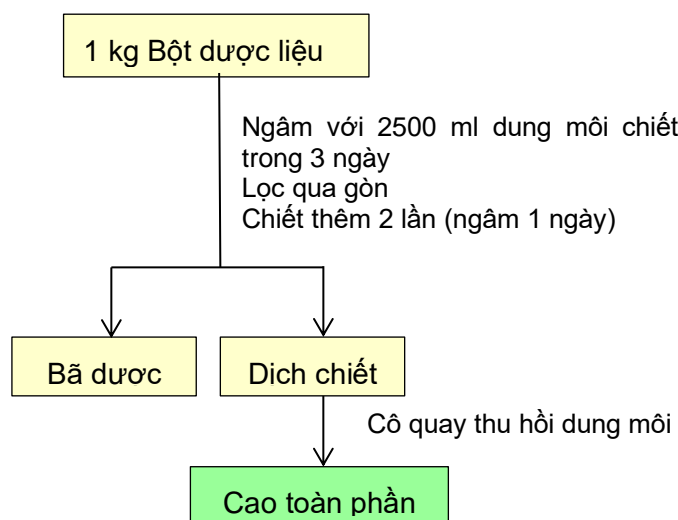
STT	Kí hiệu	Loài định danh	Mã số lưu trữ trong ngân hàng dữ liệu gen	% phủ	Giá trị E-value	Mức độ tương đồng
1	M1	<i>Phyllanthus amarus</i>	JQ230985.1	98 %	0,0	99 %
2	M2	<i>Phyllanthus amarus</i>	JQ230985.1	98 %	0,0	99 %
3	M3	<i>Phyllanthus amarus</i>	JQ230985.1	99 %	0,0	100 %

Nhận xét: Kết quả DNA đã định danh các mẫu dược liệu Diệp hạ châu đang nghiên cứu sử dụng trong đề tài đúng là *Phyllanthus amarus*.

3.1.2. Chiết xuất cao toàn phần từ dược liệu Diệp hạ châu đắng

3.1.2.1. Khảo sát dung môi chiết

Sử dụng quy trình chiết xuất theo Sơ đồ 3.1 với 3 loại dung môi khác nhau (dicloromethan, ethyl acetat và ethanol 96 %) thu được 39 g cao dicloromethan (hiệu suất 3,9 %), 31 g cao ethyl acetat (hiệu suất 3,1 %) và 32 g cao ethanol 96 % (hiệu suất 3,2 %). Sau đó tiến hành sắc ký cột so sánh khả năng tách của các phân đoạn.

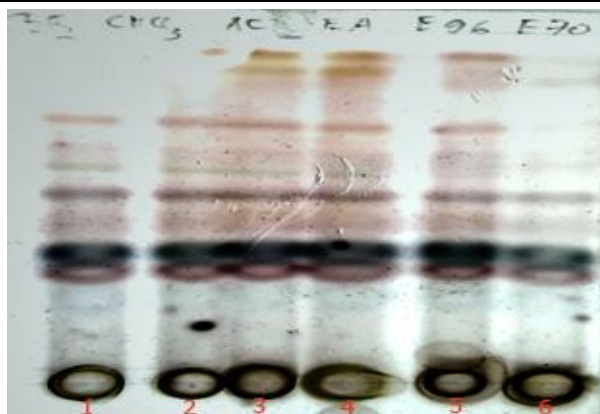


Sơ đồ 3.1. Quy trình chiết xuất cao toàn phần

Kết quả khảo sát dung môi chiết được trình bày ở Bảng 3.3 và Hình 3.2.

Bảng 3.3. Kết quả khảo sát các dung môi chiết

Dung môi	Khối lượng cao (g)	Hiệu suất chiết (%)	Hình ảnh sắc ký đồ (phun H ₂ SO ₄ 10 %)
Dicloromethan (1)	5,4	5,4	Khá rõ
Cloroform (2)	6,0	6,0	Rõ
Aceton (3)	4,1	4,1	Rõ
Ethyl acetat (4)	3,8	3,8	Rõ
Ethanol 96 % (5)	7,5	7,5	Rõ
Ethanol 70 % (6)	4,0	4,0	Khá rõ

**Hình 3.2.** Sắc ký đồ SKLM khảo sát dung môi chiết

với hệ dung môi n-hexan – ethyl acetat (2 : 1), phun thuốc thử H₂SO₄ 10 %

Nhận xét: Dung môi dicloromethan, ethyl acetat và ethanol 96 % được lựa chọn làm dung môi chiết.

3.1.2.2. Kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng để chọn dung môi

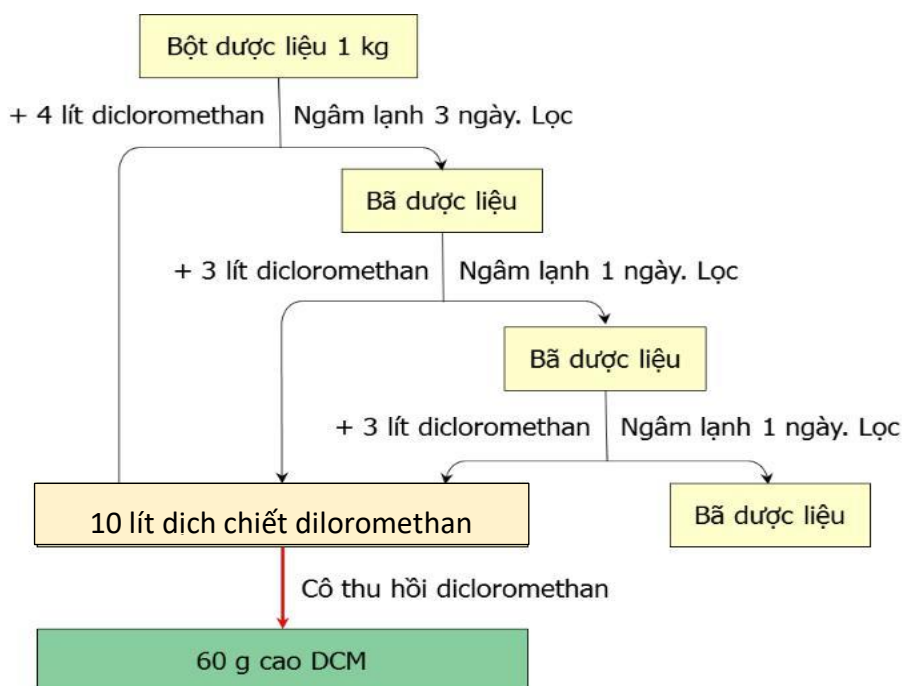
Từ cao dicloromethan, cao ethyl acetat và cao ethanol 96 %, tiến hành sắc ký cột để tách ra các phân đoạn đơn giản. So sánh khả năng tách các phân đoạn của cột sắc ký ở 3 loại cao này bằng sắc ký lớp mỏng. Kết quả khảo sát thành phần các phân đoạn của cao dicloromethan, cao ethyl acetat, cao ethanol 96 % được trình bày ở Bảng 3.4.

Bảng 3.4. Kết quả sắc ký cột của 3 loại cao

Loại cao	Lượng mẫu (g)	Số phân đoạn	Kết quả sắc ký
Dicloromethan	6	13	Các phân đoạn tách nhau rõ ràng
Ethyl acetat	6	10	Các phân đoạn tách nhau rõ ràng
Ethanol 96 %	6	7	Các phân đoạn tách không tốt, lẫn tạp màu vàng

Nhận xét: Chọn dung môi dicloromethan (DCM) là dung môi chiết xuất cao toàn phần.

Quy trình chiết cao toàn phần DCM được tiến hành theo Sơ đồ 3.2.



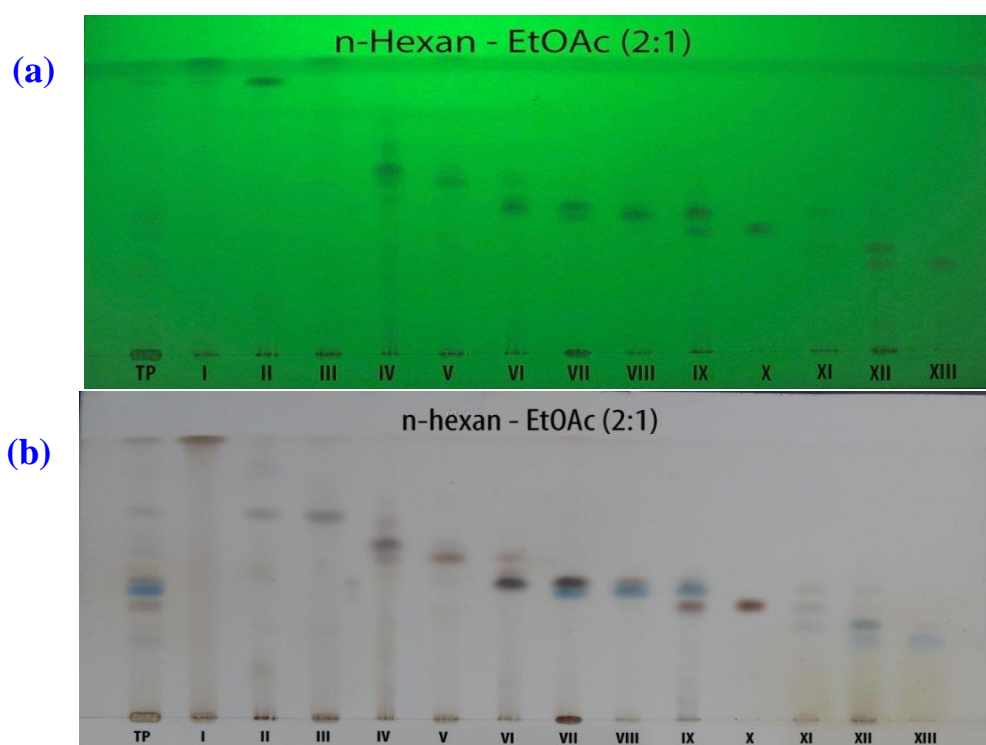
Sơ đồ 3.2. Quy trình chiết cao toàn phần DCM

3.1.3. Phân lập cao toàn phần bằng sắc ký cột

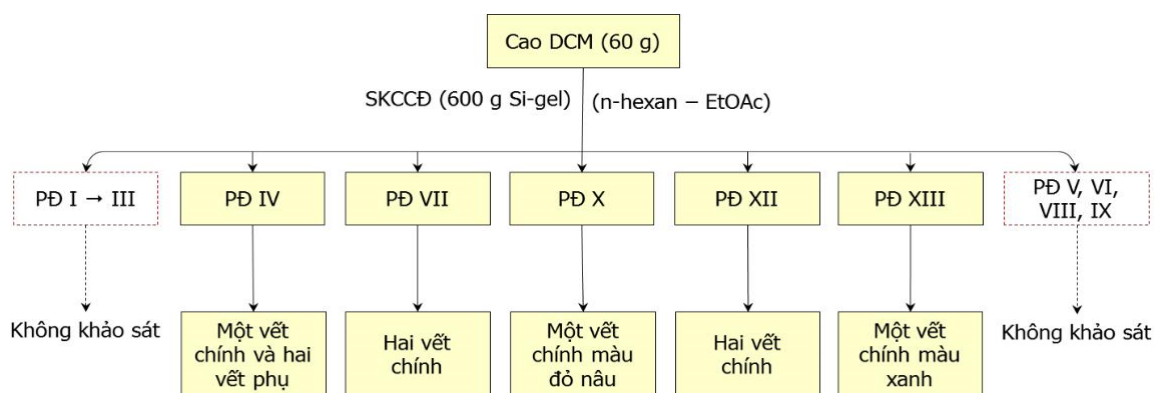
Từ kết quả sắc ký cột cao DCM và kết quả SKLM, phân tách được 13 phân đoạn nhỏ (I → XIII), kết quả trình bày ở Sơ đồ 3.3, Bảng 3.5 và Hình 3.3. Chọn 5 phân đoạn IV, VII, X, XII, XIII để tiếp tục nghiên cứu.

Bảng 3.5. Kết quả phân lập sắc ký cột cao DCM

Phân đoạn	Tỷ lệ	Lọ peni	Khối lượng cần (mg)
I	n-hexan	1 → 26	975 mg
II	n-hexan	27 → 58	520 mg
III	n-hexan – ethyl acetat (95 : 5)	59 → 100	2015 mg
IV	n-hexan – ethyl acetat (90 : 10)	101 → 111	150 mg
V	n-hexan – ethyl acetat (90 : 10)	112 → 135	210 mg
VI	n-hexan – ethyl acetat (90 : 10)	136 → 141	190 mg
VII	n-hexan – ethyl acetat (85 : 15)	142 → 163	1010 mg
VIII	n-hexan – ethyl acetat (85 : 15)	164 → 167	890 mg
IX	n-hexan – ethyl acetat (85 : 15)	168 → 198	200 mg
X	n-hexan – ethyl acetat (85 : 15)	199 → 226	1120 mg
XI	n-hexan – ethyl acetat (85 : 15)	227 → 239	180 mg
XII	n-hexan – ethyl acetat (80 : 20)	240 → 260	400 mg
XIII	n-hexan – ethyl acetat (80 : 20)	261 → 301	4010 mg



Hình 3.3. Sắc ký đồ SKLM các phân đoạn của cao DCM với hệ dung môi n-hexan – ethyl acetat (2 : 1): (a) Soi UV 254 nm, (b) Phun thuốc thử H_2SO_4 10 %.



Sơ đồ 3.3. Sơ đồ phân lập cao DCM bằng sắc ký cột

3.1.4. Phân lập hợp chất từ cao phân đoạn

3.1.4.1. Phân lập hợp chất từ cao phân đoạn IV bằng sắc ký cột

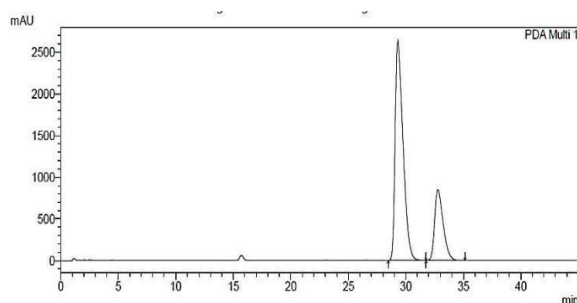
Bảng 3.6. Kết quả chạy sắc ký cột phân đoạn IV

Phân đoạn	Tỉ lệ	Lọ	Khối lượng cần
IV-1	n-hexan	1 → 10	70 mg
IV-2	n-hexan – ethyl acetat (98 : 2)	11 → 20	10 mg
IV-3	n-hexan – ethyl acetat (96 : 4)	21 → 32	10 mg
IV-4	n-hexan – ethyl acetat (94 : 6)	33 → 50	20 mg

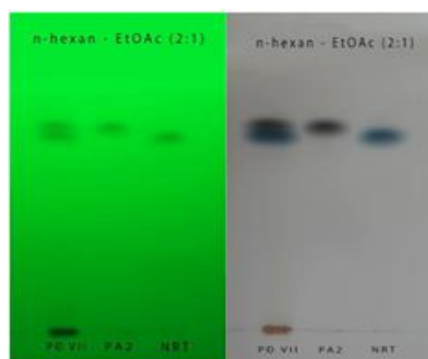
Nhận xét: Kết quả phân đoạn IV–3 cho 1 vết trên bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄, tắt quang ở 254 nm, hiện màu nâu đen với thuốc thử dung dịch acid sulfuric 10 %, cô dung môi thu được 10 mg cặn PA₁. PA₁ được kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM và HPLC.

3.1.4.2. Phân lập hợp chất từ cao phân đoạn VII bằng sắc ký điều chế

Thăm dò điều kiện sắc ký điều chế trên HPLC cho phân đoạn VII (1010 mg) của sắc ký cột cao DCM.



Hình 3.4. Sắc ký đồ HPLC phân đoạn VII



Soi UV 254 nm Phun H₂SO₄ 10 %

Hình 3.5. SKLM phân đoạn VII, PA₂ và PA₃

Nhận xét: Dựa vào sắc ký đồ HPLC của phân đoạn VII, thời gian lưu của 2 pic từ 30 → 35 phút. Do đó cần thăm dò lại điều kiện trên sắc ký điều chế với 2 loại cột pha thuận và pha đảo.

Thăm dò điều kiện trên sắc ký điều chế

Khảo sát tốc độ và tỉ lệ pha động trên 2 loại cột pha đảo và pha thuận theo Bảng 2.4 ở mục 2.2.1.4, kết quả được trình bày tóm tắt ở Bảng 3.7.

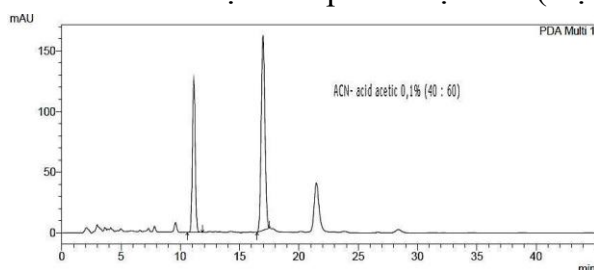
Bảng 3.7. Khảo sát điều kiện SKĐC phân đoạn VII

Điều kiện	Cột	Tốc độ dòng (mL/phút)	Tỉ lệ pha động	Thời gian (phút)	Nhận xét
VII-1	1	10	A–B (40:60)	> 90	Các pic không tách nhau
VII-2			A–B (50:50)	80	Tách không hoàn toàn
VII-3			A–B (60:40)	70	Các pic không tách nhau
VII-4	2	5	C–D (30:70)	60	Các pic không tách nhau
VII-5			C–D (33:67)	22	Tách không hoàn toàn
VII-6			C–D (36:64)	20	Các pic không tách nhau
VII-7	2	10	C–D (20:80)	20	Các pic không tách nhau
VII-8			C – D (30 :70)	18	Các pic không tách nhau
VII-9			C – D (40 :60)	15	Các pic không tách nhau

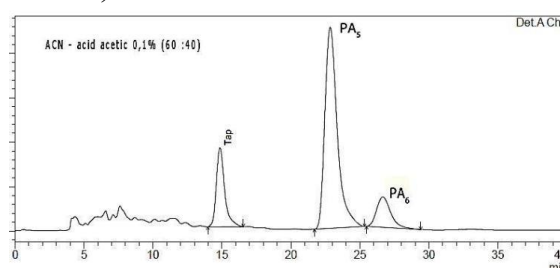
Tiến hành sắc ký với chương trình dung môi VII-5, các cấu tử được hứng theo thời gian rửa giải của từng chất (pic 1 hứng từ phút 18,5 → 19,2 và pic 2 hứng từ phút 19,7 → 20,5). Pic 1 và pic 2: cô thu hồi n-hexan và ethyl acetat đến cạn, hòa cạn trong methanol, để bay hơi tự nhiên hết methanol thu được 1 tủa hình kim 190 mg **PA₂** và căn vô định hình 250 mg **PA₃**. **PA₂** và **PA₃** đều cho 1 vết trên bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄, tắt quang ở 254 nm, hiện màu xám và xanh lá cây với thuốc thử H₂SO₄ 10 %. **PA₂** và **PA₃** được kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM và HPLC.

3.1.4.3. Phân lập hợp chất từ cao phân đoạn XII bằng sắc ký điều chế

Thăm dò điều kiện sắc ký điều chế: Phân đoạn XII (400 mg) được xử lý và thăm dò điều kiện như phân đoạn VII (mục 3.1.4.2).



Hình 3.6. Sắc ký đồ phân đoạn XII bằng HPLC



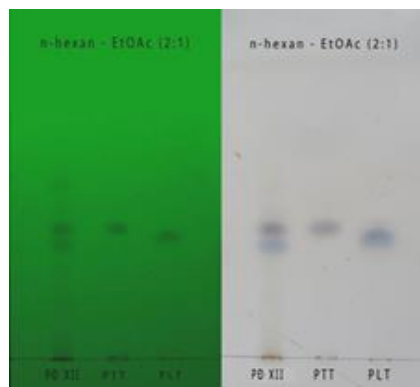
Hình 3.7. Sắc ký đồ HPLC phân đoạn XII bằng SKĐC (ĐK XII-6)

Tiến hành sắc ký điều chế

Khảo sát tốc độ và tỉ lệ pha động của điều kiện sắc ký điều chế ban đầu trên cột pha đảo theo Bảng 2.4 ở mục 2.2.1.4, kết quả được trình bày tóm tắt ở Bảng 3.8.

Bảng 3.8. Khảo sát điều kiện SKĐC phân đoạn XII

Chương trình	Tốc độ dòng (mL/phút)	Tỉ lệ pha động A-B	Thời gian phân tích (phút)	Nhận xét
XII-1	5	40 : 60	> 90	Các pic tách nhau, bắt đầu rõ. Thời gian chạy cho một lần tiêm ≥ 90 phút
XII-2		50 : 50	> 90	
XII-3		60 : 40	> 90	
XII-4	10	40 : 60	60	Các pic tách nhau
XII-5		50 : 50	40	Các pic tách nhau
XII-6		60 : 40	30	Các pic tách nhau

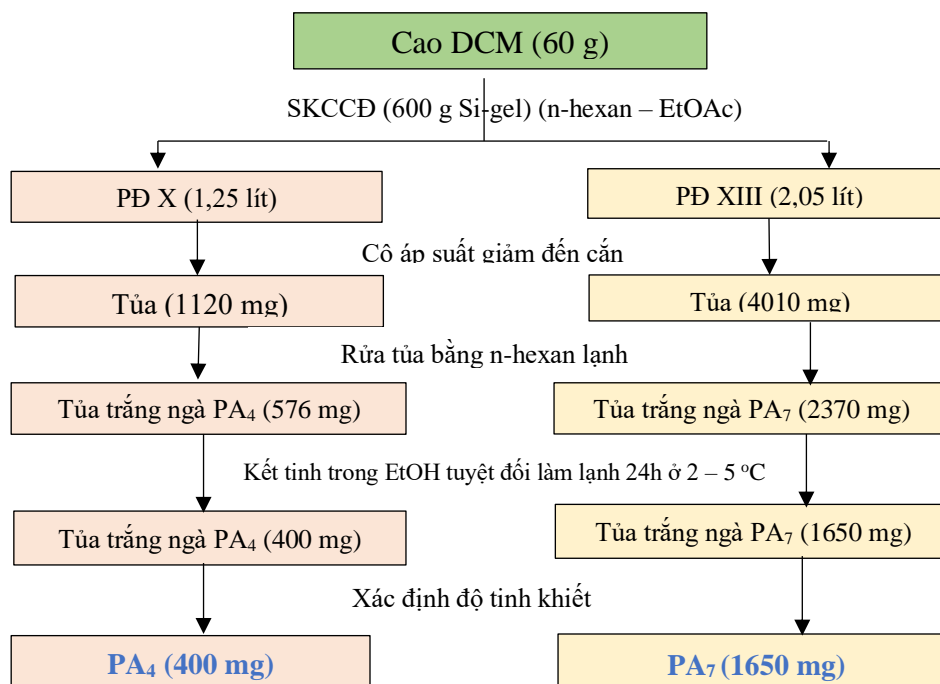


Soi UV 254 nm Phun H_2SO_4 10 %

Hình 3.8. SKLM phân đoạn XII, PA₅ và PA₆

Tiến hành sắc ký với chương trình dung môi XII-6, các cấu tử được hứng theo thời gian rửa giải của từng chất (pic 1 hứng từ phút 22,5 → 24,5 và pic 2 hứng từ phút 26,2 → 27,5). Pic 1 và pic 2: cô thu hồi một phần acetonitril và nước, sau đó để bay hơi tự nhiên thu được 2 loại tủa hình kim, lọc, rửa tủa bằng nước, thu được 60 mg tinh thể PA₅ và 80 mg tinh thể PA₆. PA₅ và PA₆ đều cho 1 vết trên bản silica gel 60 F₂₅₄, tắt quang ở 254 nm, hiện màu xám xanh và xanh với thuốc thử dung dịch acid sulfuric 10 %. PA₅ và PA₆ được kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM và HPLC.

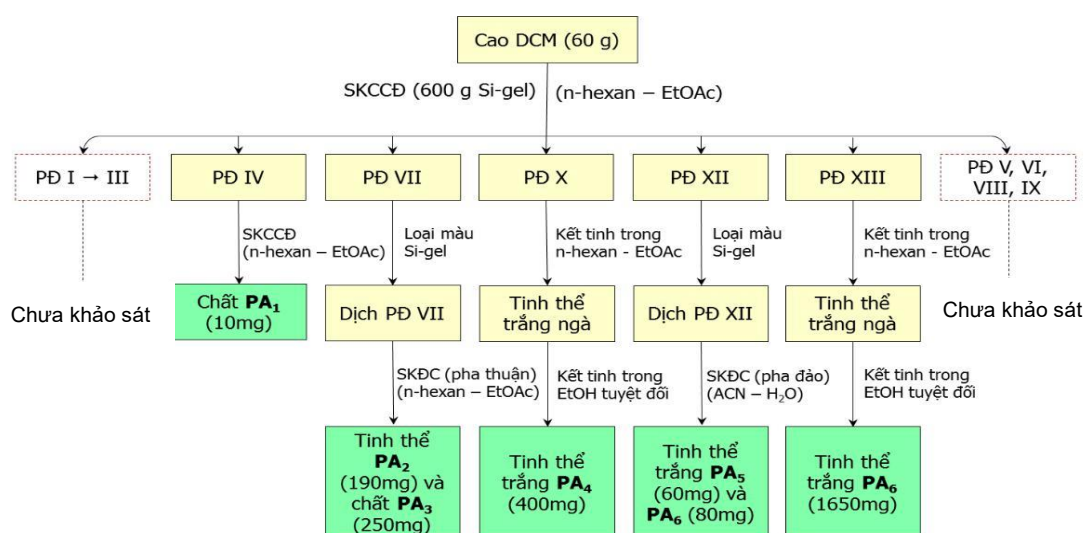
3.1.4.4. Phân lập hợp chất từ cao phân đoạn X và phân đoạn XIII bằng thay đổi dung môi



Sơ đồ 3.4. Phân lập và tinh chế các chất PA₄ và PA₇

Phân đoạn X và phân đoạn XIII khi cô quay cho kết tủa. Tiến hành tinh chế tủa theo Sơ đồ 3.4. thu được 2 loại tủa tinh thể màu trắng **PA₄** và **PA₇**. Tinh thể **PA₄** và **PA₇** cho 1 vết trên bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄, tắt quang ở 254 nm, hiện màu đỏ nâu và xanh với thuốc thử H₂SO₄ 10 %. **PA₄** và **PA₇** được kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM và HPLC. Riêng **PA₇** được chấm đối chiếu với **PA₆** (mục 3.1.4.3) trên 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau, kết quả cho các vết cùng màu sắc và giá trị R_f, vậy **PA₆** và **PA₇** là cùng một chất (**PA₆** ≡ **PA₇** sau này gọi chung là **PA₆**).

Kết luận: Từ 60 g cao DCM, qua sắc ký cột thu được 13 phân đoạn, tiến hành tinh chế 5 phân đoạn thu được 6 chất: **PA₁**, **PA₂**, **PA₃**, **PA₄**, **PA₅** và **PA₆**. Kết quả được biểu diễn ở Sơ đồ 3.5.



Sơ đồ 3.5. Sơ đồ phân lập và tinh chế các phân đoạn của cao DCM

3.1.5. Kiểm tra độ tinh khiết của chất phân lập được

3.1.5.1. Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Tiến hành SKLM 6 chất phân lập được (**PA₁**, **PA₂**, **PA₃**, **PA₄**, **PA₅** và **PA₆**) với các hệ dung môi khác nhau, phát hiện bằng UV 254 nm, thuốc thử dung dịch acid sulfuric 10 %. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.9. và Phụ lục 1 trang PL-2.

Bảng 3.9. Kết quả kiểm tra độ tinh khiết chất phân lập bằng SKLM

	Hệ dung môi	R _f của PA ₁	R _f của PA ₂	R _f của PA ₃	R _f của PA ₄	R _f của PA ₅	R _f của PA ₆
S1	EA - MeOH (95 : 5)	-	-	-	0,76	-	0,79
S2	EA (100)	0,87	0,86	0,85	-	0,81	-
S3	Toluen - EA (2 : 1)	0,79	0,68	0,66	0,60	0,56	0,48
S4	n-hexan - EA (2 : 8)	0,29	0,27	0,23	0,14	0,18	0,10

3.1.5.2. Phương pháp HPLC

Tiến hành HPLC-PDA lần lượt 6 chất phân lập được (PA₁, PA₂, PA₃, PA₄, PA₅ và PA₆) theo điều kiện sắc ký được xác định như sau: Cột sắc ký: Phenomenex C6-Phenyl 11A (150 x 4,6 mm; 3 μm). Pha động: Acetonitril – nước (45 : 55). Nhiệt độ buồng cột sắc ký: 30 °C. Dãy bước sóng phát hiện: 190-400 nm. Thể tích tiêm: 10 μL. Tốc độ dòng: 1 mL/phút. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.10.

Bảng 3.10. Kết quả kiểm tra độ tinh khiết chất phân lập bằng HPLC

Chất	Thời gian lưu (phút)	% diện tích pic (%)
PA ₁	19,135	89,24
PA ₂	19,353	99,22
PA ₃	20,313	97,76
PA ₄	16,255	98,01
PA ₅	11,871	97,07
PA ₆	13,835	99,75

3.1.5.3. Phương pháp quét nhiệt vi sai (DSC)

Lượng mẫu PA₁ tách được không nhiều (10 mg), do đó không tiến hành xác định cấu trúc và các thử nghiệm khác. Tiến hành phân tích 5 chất phân lập được PA₂, PA₃, PA₄, PA₅ và PA₆ trên máy DSC với các điều kiện xác định, ghi nhận được phổ DSC của các chất. Kết quả trình bày ở Bảng 3.11.

Bảng 3.11. Kết quả kiểm tra độ tinh khiết các chất phân lập bằng DSC

Chất	PA ₂	PA ₃	PA ₄	PA ₅	PA ₆
Độ tinh khiết (%)	99,01	97,01	97,12	-	98,72

3.1.6. Xác định cấu trúc của chất phân lập được

Hợp chất PA₂ (Niranthin)

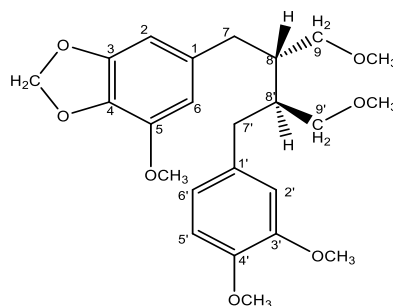
Phổ UV: λ_{max} (nm, MeOH): 201, 279 nm. *Phổ IR*: ν (KBr, cm⁻¹): 2868, 1632, 1508, 1452, 1264, 1234, 1132, 1092, 1041, 809, 766, 660. *Phổ khối*: ESI-MS (*m/z*): 455,2015 [M+Na]⁺ và 471,1728 [M+K]⁺, tương ứng với công thức phân tử C₂₄H₃₂O₇. *Phổ NMR*: Kết quả được trình bày ở Bảng 3.12. So sánh dữ liệu phổ của PA₂ theo các tài liệu công bố [67] cho thấy **hợp chất PA₂ phù hợp với chất niranthin**.

Bảng 3.12. So sánh các dữ liệu phổ NMR của chất PA₂ và niranthin

C	Chất PA ₂ (CDCl ₃ , 125/500 MHz)				Niranthin ^[67] (CDCl ₃ , 75/300 MHz)		
	CH _n	δ _C ppm	δ _H ppm, <i>m</i> (<i>J</i> , Hz)	HMBC	COSY	δ _C ppm	δ _H ppm, <i>m</i> (<i>J</i> , Hz)
1	C	133,2	-	-	-	135,7	-
2	CH	103,2	6,30 s	3, 4, 6, 7	-	103,2	6,16 s
3	C	143,3	-	-	-	148,6	-
4	C	135,7	-	-	-	133,6	-
5	C	147,2	-	-	-	143,4	-
6	CH	108,2	6,26 s	2, 4, 5, 7	-	108,0	6,12 s
7	CH ₂	34,9	2,58 m	2, 6, 8, 9, 8'	8	35,5	2,44-2,53 m
8	CH	40,8	2,03 m	1, 7, 9, 7', 8', 9'	7, 9, 8'	40,9	1,89-1,93 m
9	CH ₂	72,7	3,31 m	7, 9- OCH ₃ , 8'	8	72,6	3,20 m
1'	C	133,6	-	-	-	133,2	-
2'	CH	112,3	6,62 d (1,5)	3', 4', 6', 7'	-	112,1	6,52 s
3'	C	148,8	-	-	-	147,1	-
4'	C	148,6	-	-	-	148,7	-
5'	CH	111,1	6,76 d (8,0)	1', 3', 4'	6'	110,9	6,72 d (8,0)
6'	CH	121,1	6,65 dd (8,0; 1,5)	2', 4', 7'	5'	121,1	6,65 d (8,3)
7'	CH ₂	35,5	2,65 m	8, 2', 6', 8', 9'	8'	35,0	2,44-2,53 m
8'	CH	40,9	2,03 m	7, 9, 1', 7', 9'	8, 7', 9'	40,8	1,89-1,93 m
9'	CH ₂	72,5	3,31 m	8, 7', 9' -OCH ₃	8'	72,5	3,34 m
O-CH ₂ -O	CH ₂	101,1	5,92 s	3, 4	-	101,3	5,80 d s
5-OCH ₃	CH ₃	56,5	3,84 s	5	-	56,5	3,71 s
9-OCH ₃	CH ₃	58,7	3,30 s	9	-	59,0	3,24 s
3'-OCH ₃	CH ₃	55,9	3,85 s	3'	-	55,9	3,66 s
4'-OCH ₃	CH ₃	55,7	3,82 s	4'	-	55,8	3,72 s
9'-OCH ₃	CH ₃	58,7	3,30 s	9'	-	58,9	3,24 s

Phổ ¹³C-NMR của hợp chất PA₂ có 24 tín hiệu. Kết hợp với dữ liệu của phổ HSQC xác định được bao gồm: 7 carbon bậc IV đều thuộc vòng thơm trong đó có 5 tín hiệu thuộc vùng trường thấp hơn (135-148 ppm) do carbon liên kết với oxy; 7 tín hiệu carbon bậc III trong đó 5 tín hiệu thuộc vòng thơm (103-121 ppm); 5 nhóm methylen trong đó 1 nhóm methylenedioxy tại 101,1 ppm, 2 nhóm methylenoxy tại 72,7 và 72,5 ppm; 5 nhóm methoxy (55,7-58,7 ppm). Phổ ¹H-NMR của PA₂ có tổng cộng 32 proton, trong đó 5 tín hiệu -CH thuộc vòng thơm (6,26-6,76 ppm); 2 nhóm -CH no tại 2,03 ppm; 1 nhóm methylenedioxy tại 5,92 ppm; 2 nhóm methylenoxy tại 3,31 ppm; 2 nhóm methylen tại 2,58 và 2,65 ppm; 5 nhóm methoxy (3,30-3,85 ppm)

đều có phân đỉnh dạng *singlet*. Các dữ liệu phổ học định hướng PA₂ là một lignan (C₆-C₃-C₃-C₆) thuộc kiểu dibenzylbutan. Trên phổ HMBC, proton methylenedioxy (5,92 ppm; s) cho thấy các tương tác với các carbon tại 135,7 và 143,3 ppm chứng tỏ tại vòng thơm thứ nhất có nhóm -CH₂ cùng liên kết với oxy tại C-3 và C-4 tạo dị vòng 5 cạnh, đồng thời proton tại 3,84 ppm tương tác với carbon 147,2 nên tại C-5 gắn với nhóm methoxy. Tại đơn vị vòng thơm thứ 2 có 3 proton với dạng phân đỉnh đặc trưng cho cấu tạo ABX với các hằng số ghép $J = 8,0$ và $1,5$ Hz, ngoài ra các proton 3,82 và 3,85 ppm lần lượt tương tác với các carbon tại 148,8 và 148,6 ppm chứng tỏ tại C-3' và C-4' cũng mang các nhóm methoxy. 2 nhóm methoxy còn lại tại 3,30 ppm gắn tại C-9 và C-9' do các proton này tương tác với các carbon tại 72,7 và 72,5 ppm. Dựa vào sự biện giải cấu trúc từ các dữ liệu phổ học và so sánh với giá trị trong tài liệu tham khảo [67] đã khẳng định được cấu trúc hóa học của PA₂ là niranthin.



Hình 3.9. Cấu trúc hóa học của niranthin

Hợp chất PA₃ (Nirtetralin)

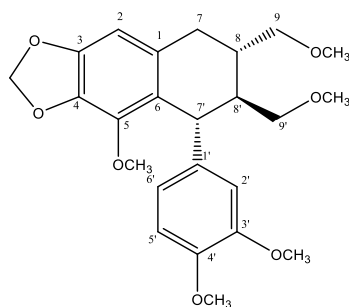
Phổ UV: λ_{\max} (nm, MeOH): 203, 281 nm. *Phổ IR*: ν (KBr, cm⁻¹): 2897, 1608, 1518, 1461, 1252, 1234, 1136, 1121, 1099, 1018, 809, 771, 665. *Phổ khối*: ESI-MS (m/z): 453,1810 [M+Na]⁺, tương ứng với công thức phân tử C₂₄H₃₀O₇. *Phổ NMR*: Kết quả được trình bày ở Bảng 3.13. So sánh dữ liệu phổ của PA₃ theo các tài liệu công bố [92] cho thấy **hợp chất PA₃ phù hợp với chất nirtetralin**.

Bảng 3.13. So sánh các dữ liệu phổ NMR của chất PA₃ và nirtetralin

C	Chất PA ₃ (CDCl ₃ , 125/500 MHz)				Nirtetralin ^[92] (CDCl ₃ , 75/300 MHz)		
	CH _n	δ _C ppm	δ _H ppm, <i>m</i> (<i>J</i> , Hz)	HMBC	COSY	δ _C ppm	δ _H ppm, <i>m</i> (<i>J</i> , Hz)
1	C	132,0	-	-	-	132,5	-
2	CH	102,9	6,41 s	3, 4, 6, 7	-	103,2	6,39 s
3	C	147,4	-	-	-	147,9	-
4	C	135,6	-	-	-	135,9	-
5	C	141,9	-	-	-	142,4	-
6	C	124,8	-	-	-	125,2	-
7	CH ₂	33,3	2,71 dd (10,5; 4,5) 2,57 dd (15,0; 11,0)	2, 6, 8, 8', 9	8	33,7	2,50-2,70 m
8	CH	37,0	1,82 m		7, 9, 8'	37,6	1,90 m
9	CH ₂	76,1	3,25 m	7, 8', 9- OCH ₃	8	76,6	3,20-3,30 m
1'	C	139,7	-	-	-	140,3	-
2'	CH	112,0	6,70 s	3', 4', 6', 7'	-	112,9	6,68 d (1,5)
3'	C	148,5	-	-	-	149,2	-
4'	C	146,9	-	-	-	147,5	-
5'	CH	110,8	6,71 d (8,5)	1', 3', 4'	6'	111,7	6,70 d (8,0)
6'	CH	119,9	6,55 dd (8,0; 1,5)	2', 4', 7'	5'	120,4	6,55 dd (8,0; 1,5)
7'	CH	41,4	4,3 d (6,0)	1, 6, 8, 1', 2', 6', 8', 9'	8'	41,7	4,29 d (6,0)
8'	CH	45,3	2,01 m	6, 8, 9, 1', 7', 9'	8, 7', 9'	45,6	1,81 m
9'	CH ₂	73,6	3,38 m	8, 7', 9' -OCH ₃	8'	74,3	3,20-3,30 m
O-CH ₂ -O	CH ₂	100,6	5,87 d (6,0)	3, 4	-	100,9	5,80 d (3,0)
5-OCH ₃	CH ₃	59,1	3,49 s	5	-	59,4	3,46 s
9-OCH ₃	CH ₃	58,9	3,29 s	9	-	59,1	3,27 s
3'-OCH ₃	CH ₃	55,9	3,82 s	3'	-	56,4	3,80 s
4'-OCH ₃	CH ₃	55,8	3,82 s	4'	-	56,4	3,80 s
9'-OCH ₃	CH ₃	58,9	3,34 s	9'	-	59,1	3,32 s

Phổ ¹³C-NMR của PA₃ có 24 tín hiệu. Kết hợp với phổ HSQC cho thấy 8 carbon bậc IV đều thuộc vòng thơm, trong đó 5 carbon liên kết với oxy do thuộc vùng trường thấp (135-148 ppm); 7 carbon bậc III trong đó 4 tín hiệu thuộc vòng thơm (102-119 ppm); 4 carbon CH₂ trong đó 1 nhóm methylenedioxy tại 100,6 ppm và 2 nhóm methylenoxy tại 73,6 và 73,1 ppm; 5 nhóm methoxy (55-59 ppm). Phổ ¹H-NMR có 30 proton, bao gồm 4 nhóm -CH thuộc vòng thơm (6,55-6,71 ppm); 1 nhóm methylenedioxy tại 5,87 ppm; 2 nhóm methylenoxy tại 3,25 và 3,38 ppm; 5 nhóm methoxy (3,29-3,82 ppm) đều có phân đỉnh *singlet*. Các đặc điểm phổ NMR của PA₃ gần tương đồng với PA₂ đều là các dẫn xuất lignan với một vòng thơm mang 1 cầu

nối methylenedioxy tạo dị vòng 5 cạnh tại C-3 và C-4 cùng 1 nhóm methoxy tại C-5; vòng thơm còn lại gắn 2 nhóm methoxy tại C-3' và C-4'. Sự khác biệt giữa PA₃ với PA₂ nằm ở proton tại 4,3 ppm (H-7') tương tác với các carbon tại 132,0 ppm (C-1), 141,9 ppm (C-5) và 124,8 ppm (C-6) chứng tỏ giữa C-7' và C-6 hình thành cầu nối tạo khung cấu trúc kiểu aryltetralin. Dựa vào sự biện giải cấu trúc từ các dữ liệu phổ học và so sánh với giá trị trong tài liệu tham khảo [92] đã khẳng định được cấu trúc hóa học của PA₃ là nirtetralin.



Hình 3.10. Cấu trúc hóa học của nirtetralin

Hợp chất PA₄ (Hypophyllanthin)

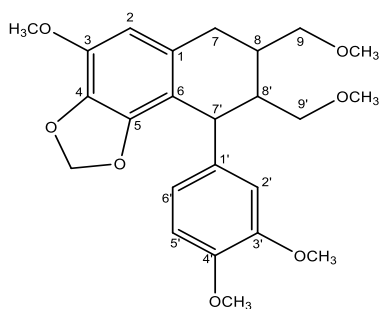
Mô tả: tinh thể hình kim, không màu, dễ tan trong ethyl acetat, cloroform, ethanol tuyệt đối, khó tan trong nước. *Phổ UV:* λ_{\max} (nm, MeOH): 202, 259, 279 nm. *Phổ IR:* ν (KBr, cm^{-1}): 2982, 2902, 2835, 2803 (C-H); 1202, 1185, 1151, 1127, 1102, 1089 (C-O-C); 862, 823, 808, 796, 755 (vòng thơm). *Phổ khối:* ESI-MS (m/z): 453, 1884 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{O}_7$. *Phổ NMR:* Kết quả được trình bày ở Bảng 3.14. So sánh dữ liệu phổ của PA₄ theo các tài liệu công bố [67] cho thấy **hợp chất PA₄ phù hợp với chất hypophyllanthin.**

Các dữ liệu phổ NMR của PA₄ gần như trùng khớp với PA₃, đều là một dẫn xuất aryltetralin. Sự khác biệt do độ dời hóa học tại các vị trí C-3, C-4 và C-5 của đơn vị vòng thơm thứ nhất. Phân tích các dữ liệu phổ 2D-NMR cho thấy, proton methylenedioxy (5,73 và 5,65 ppm) tương tác với các carbon tại 133,3 và 147,1 đồng thời proton H-7' (4,09 ppm) cũng tương tác với carbon tại 147,1 ppm chứng tỏ dị vòng 5 cạnh được hình thành giữa C-4 và C-5, còn nhóm methoxy gắn tại C-3. Như vậy, dựa vào sự biện giải cấu trúc từ các dữ liệu phổ học và so sánh với giá trị trong tài liệu tham khảo [67] đã khẳng định được cấu trúc hóa học của PA₄ là

hypophyllanthin.

Bảng 3.14. Dữ liệu phổ NMR của chất PA₄ và hypophyllanthin

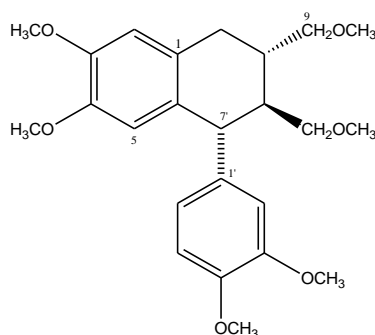
C	Chất PA ₄ (CDCl ₃ , 125/500 MHz)					Hypophyllanthin ^[67] (CDCl ₃ , 75/300 MHz)	
	CH _n	δ _C ppm	δ _H ppm, <i>m</i> (J, Hz)	HMBC	COSY	δ _C ppm	δ _H ppm, <i>m</i> (J, Hz)
1	C	131,8	-	-	-	131,8	-
2	CH	106,6	6,33 s	3, 4, 6, 7	-	106,4	6,34 s
3	C	142,1	-	-	-	142,1	-
4	C	133,3	-	-	-	133,3	-
5	C	147,1	-	-	-	147,1	-
6	C	115,1	-	-	-	115,1	-
7	CH ₂	33,3	2,80 dd (15,5; 4,5) 2,73 dd (15,5; 11,0)	1, 2, 6, 8, 9, 8'	8	33,4	2,76-2,82 m
8	CH	36,7	1,98 ddt (15,0; 6,5; 4,5)	1, 9, 7', 9'	7, 9	36,7	1,96 m
9	CH ₂	75,5	3,42 dd (9,5; 4,0) 3,38 m	7, 8, 9 -OCH ₃ , 8'	8	75,5	3,20-3,46 m
1'	C	138,1	-	-	-	138,0	-
2'	CH	111,9	6,67 d (2,0)	3', 4', 6', 7'	-	110,6	6,68 d (3,0)
3'	C	148,6	-	-	-	148,5	-
4'	C	147,2	-	-	-	147,1	-
5'	CH	110,8	6,74 d (8,0)	1', 3', 4'	6'	120,5	6,76 d (8,0)
6'	CH	120,4	6,64 dd (8,0; 2,0)	2', 4', 7'	5'	111,7	6,65 dd (8,0; 3,0)
7'	CH	41,9	4,09 d (8,0)	5, 8, 2', 6', 9'	8'	42,0	4,11 d (7,5)
8'	CH	45,4	1,90 ddt (9,5; 8,0; 4,0)	6, 7, 9, 1', 9'	7', 9'	45,5	1,92 m
9'	CH ₂	71,9	3,35 m 3,24 dd (9,5; 3,5)	8, 7', 8', 9'- OCH ₃	8'	71,7	3,20-3,46 m
3-OCH ₃	CH ₃	56,4	3,87 s	3	-	55,9	3,88 s
O-CH ₂ -O	CH ₂	101,1	5,73 d (1,5) 5,65 d (1,5)	4, 5	-	101,2	5,74 d (1,2) 5,64 d (1,2)
9-OCH ₃	CH ₃	58,9	3,31 s	9	-	59,0	3,34 s
3'-OCH ₃	CH ₃	55,9	3,80 s	3'	-	55,8	3,82 s
4'-OCH ₃	CH ₃	55,8	3,84 s	4'	-	56,4	3,86 s
9'-OCH ₃	CH ₃	58,9	3,33 s	9'	-	59,0	3,33 s

**Hình 3.11.** Cấu trúc hóa học của hypophyllanthin

Hợp chất PA₅ (Phyltetralin)

Phổ UV: λ_{\max} (nm, MeOH): 201, 281 nm. *Phổ IR*: ν (KBr, cm^{-1}): 2897, 1608, 1518, 1461, 1252, 1234, 1136, 1121, 1099, 1018, 809, 771, 665. *Phổ khối*: ESI-MS (m/z): 439,2103 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ và 455,1833 $[\text{M}+\text{K}]^+$, tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_6$. *Phổ NMR*: Kết quả được trình bày ở Bảng 3.15. So sánh dữ liệu phổ của PA₅ theo các tài liệu công bố [26] cho thấy **hợp chất PA₅ phù hợp với chất phyltetralin**.

Phổ ^{13}C -NMR của PA₅ có 24 tín hiệu, kết hợp phổ HSQC cho thấy 7 tín hiệu carbon bậc IV đều thuộc vòng thơm với 4 carbon liên kết với oxy thuộc vùng trường thấp (147-148 ppm); 8 carbon bậc III trong đó có 5 tín hiệu thuộc vòng thơm (110-121 ppm); 3 carbon $-\text{CH}_2$ trong đó 2 nhóm methylenoxy tại 71,3 và 75,5 ppm; 6 nhóm methoxy (55,8-58,9 ppm). Phổ ^1H -NMR có 32 proton, trong đó có 5 nhóm $-\text{CH}$ thuộc vòng thơm (6,23-6,84 ppm); 2 nhóm methylenoxy (3,09-3,46 ppm); 6 nhóm methoxy (3,27-3,88 ppm) đều có phân đỉnh dạng *singlet*. Dữ liệu NMR cho thấy PA₅ cũng là một dẫn xuất lignan kiểu aryltetralin tương tự PA₃ và PA₄. Sự khác biệt trong cấu trúc của PA₅ ở đặc điểm vòng thơm thứ nhất với sự vắng mặt của nhóm methylenedioxy tạo dị vòng 5 cạnh, thay vào đó 2 nhóm methoxy tại 3,58 và 3,84 ppm cho tương tác HMBC lần lượt với carbon tại 147,0 và 147,1 ppm chứng tỏ có 2 nhóm methoxy gắn với vòng thơm tại C-3 và C-4. Dựa vào sự biện giải cấu trúc từ các dữ liệu phổ học và so sánh với giá trị trong tài liệu tham khảo [26] đã khẳng định được cấu trúc hóa học của PA₅ là phyltetralin.



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của phyltetralin

Bảng 3.15. So sánh các dữ liệu phổ NMR của chất PA₅ và phylltetralin

C	Chất PA ₅ (CDCl ₃ , 125/500 MHz)				Phylltetralin ^[26] (CDCl ₃ , 125/500 MHz)		
	CH _n	δ _C ppm	δ _H ppm, <i>m</i> (J, Hz)	HMBC	COSY	δ _C ppm	δ _H ppm, <i>m</i> (J, Hz)
1	C	132,1	-	-	-	132,0	-
2	CH	111,1	6,61 s	3, 4, 6, 7	-	111,0	6,59 m
3	C	147,1	-	-	-	147,0	-
4	C	147,0	-	-	-	146,8	-
5	CH	112,8	6,23 s	1, 3, 4, 7'	-	112,7	6,20 s
6	C	128,9	-	-	-	128,7	-
7	CH ₂	36,3	2,84 d (7,0)	2, 6, 9, 8'	8	36,4	2,82 m
8	CH	33,1	2,17 m	1, 9, 7', 8', 9'	7, 9, 8'	33,1	2,14 m
9	CH ₂	75,3	3,46 m	7, 9 -OCH ₃ , 7', 9'	8	75,3	3,42 m
1'	C	138,0	-	-	-	138,0	-
2'	CH	112,3	6,62 d (1,0)	3', 4', 6', 7'	-	112,2	6,59 m
3'	C	148,9	-	-	-	148,8	-
4'	C	147,4	-	-	-	147,4	-
5'	CH	110,9	6,80 d (8,0)	1', 3', 4'	6'	110,8	6,77 d (8,0)
6'	CH	121,8	6,70 dd (8,0; 1,5)	2', 4', 7'	5'	121,8	6,65 dd (8,0; 2,0)
7'	CH	47,2	3,99 d (10,5)	1, 5, 8, 2', 6', 8', 9'	8'	47,2	3,94 d (10,0)
8'	CH	44,9	1,81 m	7, 9, 1', 7', 9'	8, 7', 9'	44,8	1,77 m
9'	CH ₂	71,3	3,09 dd (9,5; 3,0) 3,37 m	8, 7', 9' -OCH ₃	8'	71,3	3,05 dd (9,6; 3,2) 3,33 m
3-OCH ₃	CH ₃	55,8	3,84 s	3	-	55,9	3,80 s
4-OCH ₃	CH ₃	55,8	3,58 s	4	-	55,7	3,55 s
9-OCH ₃	CH ₃	58,9	3,36 s	9	-	58,9	3,33 s
3'-OCH ₃	CH ₃	55,8	3,80 s	3'	-	55,9	3,77 s
4'-OCH ₃	CH ₃	55,8	3,88 s	4'	-	55,7	3,85 s
9'-OCH ₃	CH ₃	58,9	3,27 s	9'	-	58,9	3,25 s

Hợp chất PA₆ ≡ PA₇ (Phyllanthin)

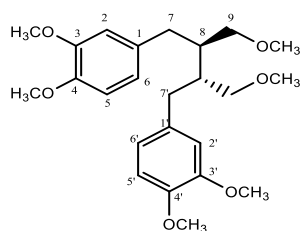
Mô tả: tinh thể hình kim, màu trắng, dễ tan trong ethyl acetat, cloroform, ethanol tuyệt đối, khó tan trong nước. *Phổ UV:* λ_{max} (nm, MeOH): 220, 230, 280 nm. *Phổ IR:* ν (KBr, cm⁻¹): 1606, 1589, 1518 (vòng thơm), 2839, 2869, 2917, 2974, 2999 (C – H). *Phổ khối:* ESI-MS (*m/z*): 419,2428 [M+H]⁺, tương ứng với công thức phân tử C₂₄H₃₄O₆. *Phổ NMR:* Kết quả được trình bày ở Bảng 3.16. So sánh dữ liệu phổ của **PA₆** theo các tài liệu công bố [26] cho thấy **hợp chất PA₆ phù hợp với chất phyllanthin.**

Phổ ¹³C-NMR của PA₆ có 12 tín hiệu, dựa trên dữ liệu phổ MS cho thấy cấu trúc của PA₆ có dạng đối xứng toàn phân tử. Kết hợp với phổ HSQC cho thấy 3 tín hiệu carbon bậc IV thuộc vòng thơm với 2 carbon nối với oxy tại 147,2 và 148,8 ppm;

4 tín hiệu $-CH$ với 3 carbon thuộc vòng thơm (111-121 ppm); 2 tín hiệu $-CH_2$ với 1 nhóm methylenoxy tại 72,7 ppm; 3 nhóm methoxy (55-58 ppm). Phổ 1H -NMR có sự hiện diện của 3 nhóm $-CH$ của vòng thơm với cấu trúc ABX dựa trên các giá trị hằng số ghép $J = 8,0$ và $2,0$ Hz. Phổ HMBC cho thấy các nhóm methoxy tại 3,81; 3,85 và 3,29 ppm lần lượt tương tác với các carbon 148,8; 147,2 và 72,7 xác định được sự hiện diện của các nhóm methoxy tại các vị trí C-3, C-4 và C-9. Như vậy, PA₆ cũng là một dẫn chất lignan có khung dibenzylbutan có cấu trúc đối xứng. Dựa vào sự biện giải cấu trúc từ các dữ liệu phổ học và so sánh với giá trị trong tài liệu tham khảo [26] đã khẳng định được cấu trúc hóa học của PA₆ là phyllanthin.

Bảng 3.16. Dữ liệu phổ NMR của chất PA₆ và phyllanthin

C	Chất PA ₆ (CDCl ₃ , 125/500 MHz)					Phyllanthin ^[26] (CDCl ₃ , 75/300 MHz)	
	CH _n	δ_C ppm	δ_H ppm, <i>m</i> (<i>J</i> , Hz)	HMBC	COSY	δ_C ppm	δ_H ppm, <i>m</i> (<i>J</i> , Hz)
1/1'	C	133,7	-	-	-	133,6	-
2/2'	CH	112,3	6,62 d (2,0)	3, 4, 6, 7	-	112,2	6,60 d (1,8)
3/3'	C	148,8	-	-	-	148,7	-
4/4'	C	147,2	-	-	-	147,1	-
5/5'	CH	111,1	6,75 d (8,0)	1, 3, 4	6	111,0	6,74 d (7,8)
6/6'	CH	121,1	6,64 dd (8,0; 2,0)	2, 4, 7	5	121,0	6,63 dd (7,8; 1,8)
7/7'	CH ₂	35,0	2,68 dd (13,5; 6,5) 2,62 dd (13,5; 8,0)	1, 2, 6, 8, 7'	8	34,9	2,63 m
8/8'	CH	40,8	2,04 m	1, 7', 8', 9'	7, 9	40,7	2,03 m
9/9'	CH ₂	72,7	3,33 dd (9,5; 5,5) 3,28 m	7, 8', 9 -OCH ₃	8	72,6	3,23 m
3/3'- OCH ₃	CH ₃	55,8	3,81 s	3	-	55,8	3,79 s
4/4'- OCH ₃	CH ₃	55,9	3,85 s	4	-	55,8	3,83 s
9/9'- OCH ₃	CH ₃	58,7	3,29 s	9	-	58,7	3,32 s



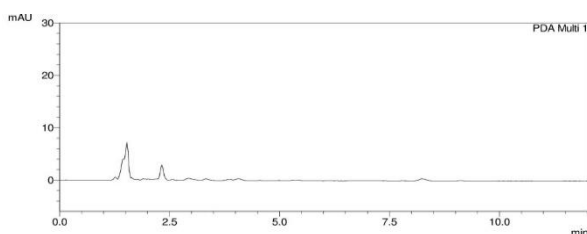
Hình 3.13. Công thức hóa học của phyllanthin

3.2. XÁC ĐỊNH CHẤT LƯỢNG VÀ THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU

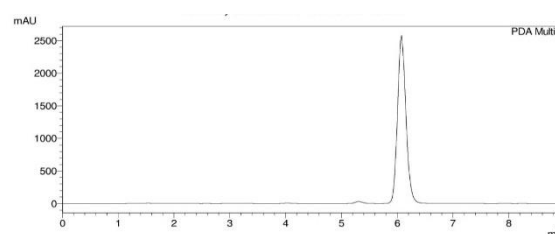
Các hợp chất được chọn đủ khối lượng và độ tinh khiết lớn hơn 95 % để thiết lập chất đối chiếu gồm: phyllanthin (PLT - 1500 mg); hypophyllanthin (HPL - 300 mg) và niranthin (NRT - 180 mg), nirtetralin (NTT - 50 mg). Do hợp chất phyllanthin đã được thiết lập chất đối chiếu [3] nên trong luận án này chỉ thiết lập chất đối chiếu đối với hypophyllanthin (HPL - 300 mg) và niranthin (NRT - 180 mg). Đối với nirtetralin (NTT - 50 mg) được xác định độ tinh khiết để ứng dụng định lượng các lignan trong Diệp hạ châu đắng.

3.2.1. Xác định chất lượng và thiết lập chất đối chiếu hypophyllanthin

Phương pháp đã được thẩm định, kết quả trình bày ở Bảng 3.17 và Hình 3.14.



(a) Sắc ký đồ của dung môi



(b) Sắc ký đồ của hypophyllanthin tinh chế

Hình 3.14. Sắc ký đồ tính đặc hiệu xác định độ tinh khiết hypophyllanthin

Bảng 3.17. Kết quả thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết hypophyllanthin

Thông số	Yêu cầu	Kết quả	Kết luận
Tính phù hợp hệ thống	$RSD_{\text{thời gian lưu}} \leq 2 \%$	$RSD_{\text{thời gian lưu}} = 0,09 \%$	Đạt
	$RSD_{\text{diện tích pic}} \leq 2 \%$	$RSD_{\text{diện tích pic}} = 0,12 \%$	
	$A_s = 1,45$	$0,8 \leq A_s \leq 1,5$	
Tính đặc hiệu	Đạt	Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic cần khảo sát; Pic hypophyllanthin tinh chế ở 6,055 phút, không xuất hiện tạp khi sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết pic	Đạt
Khoảng tuyến tính 300 - 700 ($\mu\text{g/mL}$)	$0,998 \leq r \leq 1,002$	Phương trình hồi quy: $\hat{y} = 55140x$; $r = 0,9988$	Đạt
Độ chính xác	$RSD \leq 2 \%$	$RSD = 0,69 \%$	Đạt
Độ đúng	98,0 % - 102,0 %	98,9 - 99,8 %	Đạt

Thiết lập chất đối chiếu hypophyllanthin

Lấy khoảng 300 mg hypophyllanthin tinh khiết đóng lọ trong điều kiện đạt tiêu chuẩn Glove-Box chứa 99,99 % khí nitơ và độ ẩm 30 %, được 30 lọ, mỗi lọ khoảng 10 mg. Lấy mẫu ngẫu nhiên 6 lọ tiến hành đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ bằng

phép phân tích phương sai một yếu tố, kết quả cho thấy: $F_{\text{tn}} = 0,15 < F_{\text{tc}} = 4,6$ ($p < 0,05$). Vậy các lọ trong quá trình đóng là đồng nhất.

Từ kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm trình bày ở Bảng 3.18, xác định giá trị ấn định theo hướng dẫn của ISO 13528 [34].

Bảng 3.18. Kết quả đánh giá liên PTN chất đối chiếu hypophyllanthin

Stt	Độ tinh khiết sắc ký (%)		
	PTN 1	PTN 2	PTN 3
1	98,74	98,73	98,72
2	98,72	97,92	97,88
3	97,90	97,91	98,69
4	97,46	97,49	97,51
5	97,22	97,20	97,43
6	97,42	97,76	97,78

Theo kết quả ở Bảng 3.19, giá trị s^* không thay đổi sau 3 lần tính, giá trị ấn định hypophyllanthin là 97,89 % với độ lệch chuẩn thực của giá trị ấn định (s^*) là 0,640 %. Xác định z-score: Không có giá trị nào có $|z| > 2$. Giá trị công bố được tính từ các kết quả phân tích ($n = 18$):

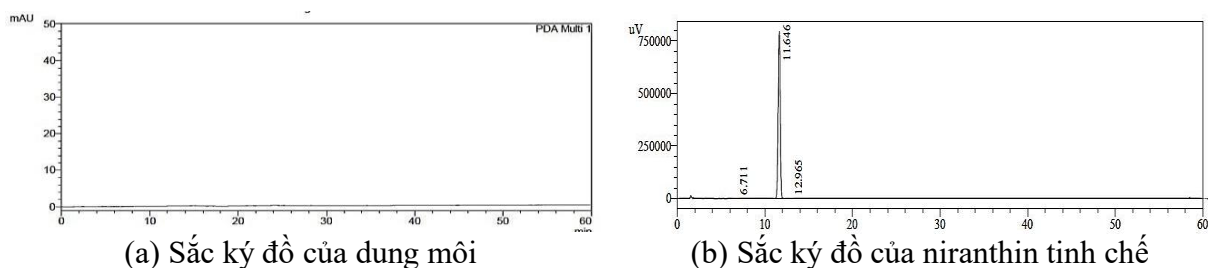
- Độ tinh khiết sắc ký là 97,89 % tính theo nguyên trạng, RSD = 0,64 %.
- Độ không đảm bảo đo $\mu = 1,25 \times 0,640/\sqrt{18} = 0,189$ %.

Bảng 3.19. Xác định giá trị ấn định chất đối chiếu hypophyllanthin

	x^*0	x^*1	x^*2	x^*3
$\delta=1,5 \times s^*$	-	0,960	0,960	0,960
$x^* - \delta$	-	96,97	96,934	96,934
$x^* + \delta$	-	98,69	98,853	98,853
Trung bình	97,92			
Độ lệch s	0,559			
x^* mới	97,830	97,894	97,894	97,894
s^* mới	0,571	0,640	0,640	0,640

3.2.2. Xác định chất lượng và thiết lập chất đối chiếu niranthin

Phương pháp đã được thẩm định, kết quả được trình bày ở Bảng 3.20 và Hình 3.15.



Hình 3.15. Sắc ký đồ tính đặc hiệu xác định độ tinh khiết niranthin

Bảng 3.20. Kết quả thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết niranthin

Thông số	Yêu cầu	Kết quả	Kết luận
Tính phù hợp hệ thống	RSD _{thời gian lưu} ≤ 2 % RSD _{diện tích pic} ≤ 2 % 0,8 ≤ A _s ≤ 1,5	RSD _{thời gian lưu} = 1,63 % RSD _{diện tích pic} = 0,08 % A _s = 1,0	Đạt
Tính đặc hiệu	Đạt	Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic cần khảo sát; Pic niranthin tinh chế ở 11,646 phút, không xuất hiện tạp khi sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết pic	Đạt
Khoảng tuyến tính 60 - 140 (µg/mL)	0,998 ≤ r ≤ 1,002	Phương trình hồi quy: ŷ = 121815x; r = 0,9999	Đạt
Độ chính xác	RSD ≤ 2 %	RSD = 0,04 %	Đạt
Độ đúng	98,0 % – 102,0 %	99,32 – 100,27 %	Đạt

Thiết lập chất đối chiếu niranthin

Lấy khoảng 180 mg niranthin tinh khiết đóng lọ trong điều kiện đạt tiêu chuẩn Glove-Box chứa 99,99 % khí nitơ và độ ẩm 30 %, được 36 lọ, mỗi lọ khoảng 5 mg. Lấy mẫu ngẫu nhiên 6 lọ tiến hành đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ bằng phép phân tích phương sai một yếu tố, kết quả cho thấy: $F_m = 0,199 < F_{tc} = 4,6$; $p < 0,05$. Vậy các lọ trong quá trình đóng là đồng nhất.

Từ kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm trình bày ở Bảng 3.21, xác định giá trị ấn định theo hướng dẫn của ISO 13528 [34].

Bảng 3.21. Kết quả đánh giá liên PTN chất đối chiếu niranthin

Stt	Độ tinh khiết sắc ký (%)		
	PTN 1	PTN 2	PTN 3
1	99,85	99,75	99,74
2	99,83	99,78	99,75
3	99,80	99,81	99,76
4	99,79	99,77	99,79
5	99,75	99,79	99,80
6	99,75	99,75	99,82

Theo kết quả ở Bảng 3.22, giá trị s^* không thay đổi sau 4 lần tính, giá trị ấn định niranthin là 99,78 % với độ lệch chuẩn thực của giá trị ấn định (s^*) là 0,034. Xác định z-score: Không có giá trị nào có $|z| > 2$. Giá trị công bố được tính từ các kết quả phân tích ($n = 18$):

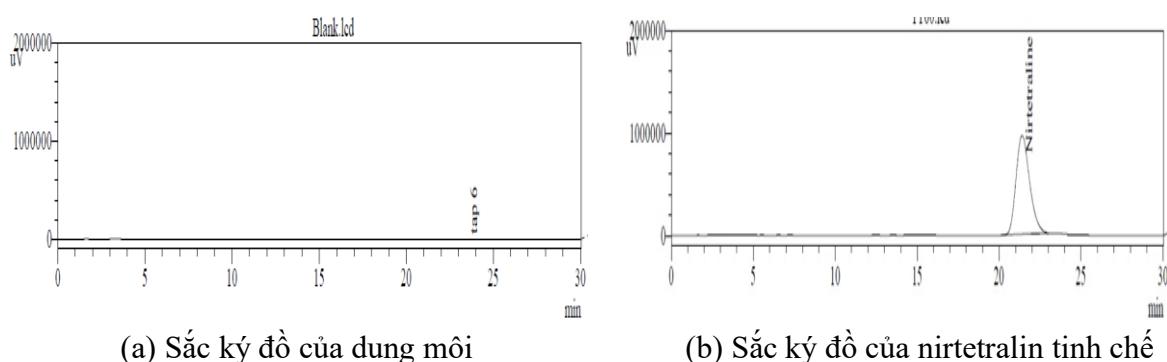
- Độ tinh khiết sắc ký là 99,78 % tính theo nguyên trạng, RSD = 0,034 %.
- Độ không đảm bảo đo $\mu = 1,25 \times 0,034/\sqrt{18} = 0,01$ %.

Bảng 3.22. Xác định giá trị ấn định chất đối chiếu niranthin

	x*0	x*1	x*2	x*3	x*4
$\delta = 1,5 \times s^*$	-	0,067	0,055	0,052	0,051
$x^* - \delta$	-	99,72	99,73	99,73	
$x^* + \delta$	-	99,85	99,84	99,83	
Trung bình	99,78				
Độ lệch s	0,032				
x^* mới	99,79	99,782	99,781	99,781	99,781
s^* mới	0,044	0,036	0,035	0,034	0,034

3.2.3. Xác định độ tinh khiết chất nirtetralin sau tinh chế

Phương pháp đã được thẩm định, kết quả được trình bày ở Bảng 3.23 và Hình 3.16.



Hình 3.16. Sắc ký đồ tính đặc hiệu xác định độ tinh khiết nirtetralin

Bảng 3.23. Kết quả thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết nirtetralin

Thông số	Yêu cầu	Kết quả	Kết luận
Tính phù hợp hệ thống	RSD _{thời gian lưu} ≤ 2 % RSD _{diện tích pic} ≤ 2 % 0,8 ≤ A _s ≤ 1,5	RSD _{thời gian lưu} = 0,02 % RSD _{diện tích pic} = 0,89 % A _s = 1,27	Đạt
Tính đặc hiệu	Đạt	Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic cần khảo sát; Pic nirtetralin tinh chế ở 21,398 phút, không xuất hiện tạp khi sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết pic	Đạt
Khoảng tuyến tính 120-280 (µg/mL)	0,998 ≤ r ≤ 1,002	Phương trình hồi quy: y = 414107x; r = 0,9996	Đạt
Độ chính xác	RSD ≤ 2 %	RSD = 0,05 %	Đạt
Độ đúng	98,0 % - 102,0 %	98,7 – 101,2 %	Đạt

Tiến hành xác định độ tinh khiết nirtetralin theo phương pháp đã xây dựng. Kết quả trình bày ở Bảng 3.24. Độ tinh khiết nirtetralin là 97,02 %.

Bảng 3.24. Kết quả xác định độ tinh khiết nirtetralin

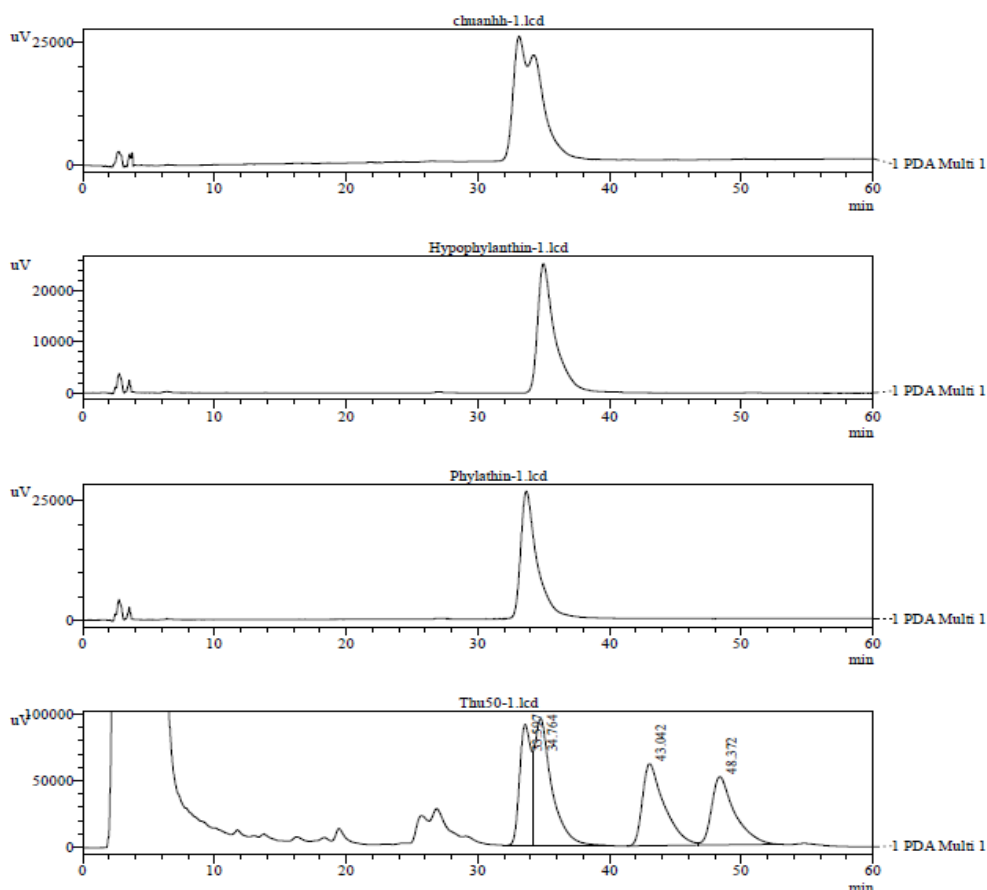
Stt	Độ tinh khiết sắc ký (%)	
	PTN 1	PTN 2
1	97,02	96,84
2	97,12	97,15
3	97,11	96,92
4	97,17	97,02
5	97,05	97,12
6	96,69	97,06

3.3. ĐIỀU CHẾ VÀ TIÊU CHUẨN HÓA CAO DIỆP HẠ CHÂU ĐẮNG

3.3.1. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan trong dược liệu Diệp hạ châu đắng bằng phương pháp HPLC

3.3.1.1. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan

Tiến hành sắc ký theo quy trình USP [98] nêu ở mục 2.2.3.1.



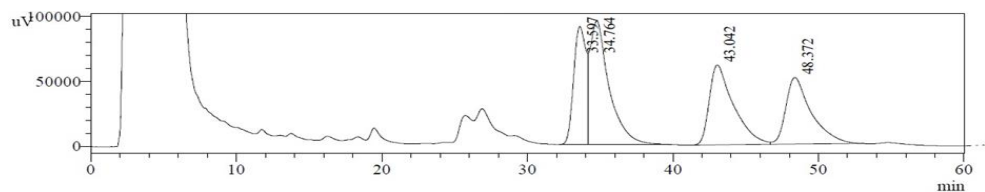
Hình 3.17. Sắc ký đồ HPLC với điều kiện sắc ký trong USP

Nhận xét: Các pic tách không tốt, độ phân giải, hệ số bất đối không đạt yêu cầu, thời gian sắc ký dài. Vì vậy, tiến hành xây dựng quy trình phân tích mới phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

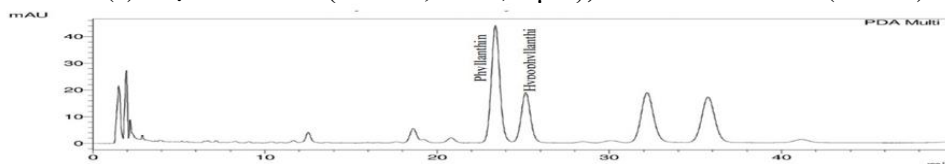
Khảo sát điều kiện sắc ký: Tiến hành sắc ký mẫu thử với các điều kiện khảo sát và kết quả được trình bày trong Bảng 3.25.

Bảng 3.25. Khảo sát điều kiện sắc ký định lượng đồng thời 4 lignan

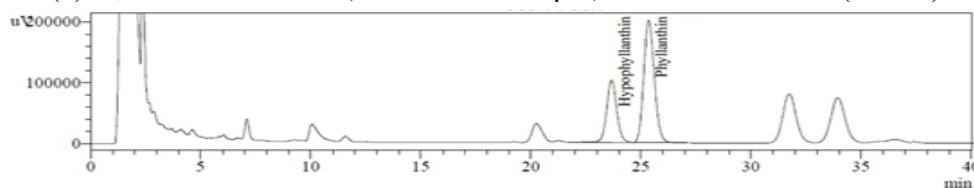
Điều kiện	Cột	Tỷ lệ pha động		Thời gian sắc ký (phút)	Nhận xét
		ACN – H ₂ O	MeOH – H ₃ PO ₄ 0,1 %		
1	Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm)	38 : 62		80	Các pic tách hoàn toàn
2		40 : 60		60	Các pic không tách tốt
3		42 : 58		45	Các pic không tách tốt
4	Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm)	38 : 62		60	Các pic tách hoàn toàn
5		40 : 60		40	Các pic tách hoàn toàn
6		42 : 58		30	Các pic không tách tốt
7			65 : 45	30	Các pic không tách tốt
8			60 : 40	40	Các pic tách hoàn toàn
9			56 : 44	50	Các pic tách hoàn toàn



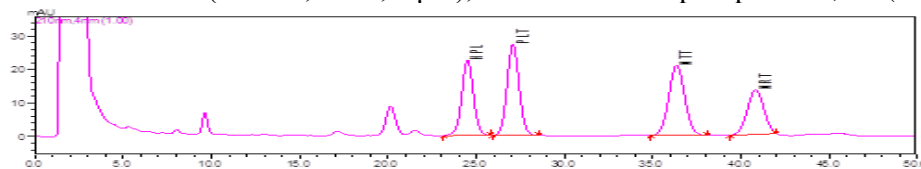
(a) Cột Luna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm); Acetonitril – nước (40 : 60)



(b) Cột Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm); Acetonitril – nước (40 : 60).



(c) Cột Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm); Methanol – acid phosphoric 0,1% (60 : 40)



(d) Cột Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm); Methanol – acid phosphoric 0,1% (56 : 44)

Hình 3.18. Sắc ký đồ khảo sát điều kiện HPLC

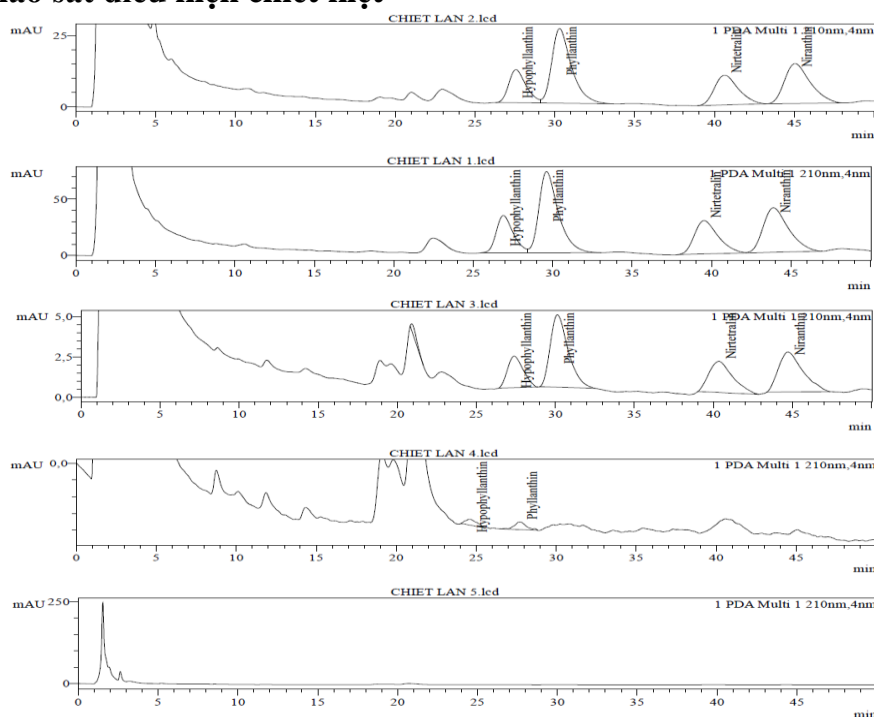
Nhận xét:

- Cột Luna C18 với tỉ lệ pha động acetonitril – nước (38 : 62) (Điều kiện 1) cho các pic tách hoàn toàn, nhưng thời gian tiến hành sắc ký dài 80 phút; với tỉ lệ pha động acetonitril – nước (40 : 60) (Điều kiện 2), thời gian tiến hành sắc ký 60 phút, các pic tách không tốt.

- Cột Gemini NX C18 với tỉ lệ pha động acetonitril – nước (40 : 60) (Điều kiện 5) hoặc methanol – acid phosphoric 0,1 % (60 : 40) (Điều kiện 8) đều cho các pic tách hoàn toàn. Tuy nhiên, ở điều kiện 8 nhận thấy khả năng phân tách của các pic phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin, nirtetralin chưa thật sự tốt nên tiến hành điều chỉnh tỉ lệ dung môi pha động methanol – acid phosphoric 0,1 % (56 : 44) (Điều kiện 9). Điều kiện sắc ký sau khi điều chỉnh cho sắc ký đồ đẹp hơn, các pic của 4 hợp chất lignan cần định lượng phân tách rõ ràng. Đồng thời, xét về yếu tố kinh tế, nên chọn pha động dùng methanol. Do đó, chọn điều kiện 9 làm điều kiện sắc ký cho quy trình định lượng 4 lignan. Sắc ký đồ được trình bày ở Hình 3.18.

Vậy điều kiện sắc ký thích hợp: Cột sắc ký: Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m). Pha động: Methanol – acid phosphoric 0,1 % (56 : 44). Tốc độ dòng: 1 mL/phút. Nhiệt độ cột: 25 °C. Đầu dò: PDA, bước sóng phát hiện 230 nm. Thể tích tiêm: 10 μ L.

Khảo sát điều kiện chiết kiệt



Hình 3.19. Sắc ký đồ dịch chiết lần 1, 2, 3, 4 và 5

Nhận xét: Dựa trên sắc ký đồ 5 lần chiết, nhận thấy: Lần 1: 4 pic của 4 hoạt chất xuất hiện rõ trên sắc ký đồ, tín hiệu 50 mAU. Lần 2: 4 pic hoạt chất xuất hiện trên sắc ký đồ tín hiệu chỉ ở mức 25 mAU. Lần 3: 4 pic hoạt chất chỉ xuất hiện trên sắc ký đồ với tín hiệu ở mức 5 mAU. Lần 4 trở đi: chỉ còn xuất hiện 2 pic hoạt chất và tín hiệu biến mất hoàn toàn ở lần chiết thứ 5. Kết luận: Chọn kết thúc quy trình chiết kiệt ở lần chiết thứ 3. Sắc ký đồ được trình bày ở Hình 3.19.

3.3.1.2. Thẩm định quy trình định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan trong dược liệu Diệp hạ châu bằng phương pháp HPLC

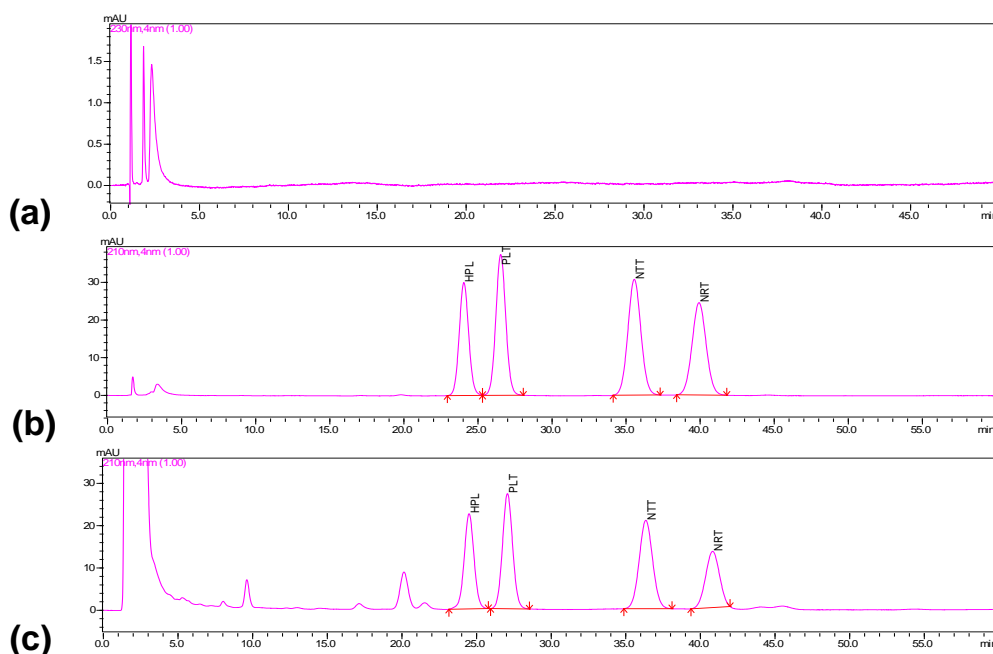
Tính phù hợp hệ thống: Tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn, kết quả tính phù hợp hệ thống được trình bày ở Bảng 3.26.

Bảng 3.26. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống (n = 6)

Chất	Thông số	t_R (phút)	RSD % của t_R	Diện tích đỉnh (S_{pic})	RSD % của S_{pic}	R_s	A_s
HPL		24,048	0,10	1346912	1,47	-	1,051
PLT		26,536	0,13	1738565	1,39	2,056	1,058
NTT		35,547	0,08	1879337	1,28	6,258	1,057
NRT		39,886	0,08	1660349	1,59	2,564	1,043

Nhận xét: Thời gian lưu t_R và diện tích pic S có độ lặp lại cao ($RSD \leq 2\%$), hệ số đối xứng nằm trong khoảng 0,8-1,5 và độ phân giải $R_s \geq 1,5$. Như vậy, hệ thống sắc ký đạt yêu cầu để tiến hành phân tích định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan.

Tính đặc hiệu: Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của chất chuẩn. Sắc ký đồ mẫu thử cho pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic trong sắc ký đồ mẫu chuẩn. Trên sắc ký đồ mẫu thử có xuất hiện thêm pic khác (pic tạp), pic này tách hoàn toàn với pic chính. Pic của các chất phân tích trong sắc ký đồ mẫu chuẩn và mẫu thử đều được kiểm tra độ tinh khiết pic, độ tinh khiết pic khoảng 1,000. Do đó, có thể khẳng định quy trình phân tích có tính đặc hiệu. Sắc ký đồ các mẫu được minh họa ở Hình 3.20.

**Hình 3.20.** Sắc ký đồ mẫu trắng (a), mẫu chuẩn (b), mẫu thử (c)

Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ): Pha loãng nồng độ chất phân tích đến mức tín hiệu nhỏ nhất còn phát hiện được để xác định LOD và

pha loãng nồng độ chất phân tích đến mức tín hiệu vẫn đáp ứng độ chính xác để xác định LOQ. Do tín hiệu thu được từ mẫu trắng (N) và mẫu thử (S). Thiết lập tỉ số S/N. Nồng độ mẫu thử tại điểm có S/N = 3/1 là LOD và S/N = 10/1 là LOQ. Kết quả thu được trình bày ở Bảng 3.27.

Bảng 3.27. Kết quả giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Chất phân tích	LOD ($\mu\text{g/mL}$)	LOQ ($\mu\text{g/mL}$)
Phyllanthin	0,19	0,57
Hypophyllanthin	0,06	0,20
Niranthin	0,14	0,43
Nirtetralin	0,15	0,51

Khoảng tuyến tính: Tiến hành sắc ký, xác định sự phụ thuộc tuyến tính giữa y (diện tích pic) và x (nồng độ) của lần lượt các chất phân tích. Kết quả khoảng tuyến tính được trình bày ở Bảng 3.28.

Bảng 3.28. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính

Chất	Phương trình hồi quy	Hệ số tương quan (r)	Khoảng tuyến tính
PLT	$\hat{y} = 38931x$	1,0000	17,1-68,4 $\mu\text{g/mL}$
HPL	$\hat{y} = 66652x$	1,0000	6,9-27,4 $\mu\text{g/mL}$
NRT	$\hat{y} = 54159x$	1,0000	12,2-48,8 $\mu\text{g/mL}$
NTT	$\hat{y} = 51618x$	1,0000	10,9-43,5 $\mu\text{g/mL}$

Độ lặp lại - Độ chính xác trung gian: Tiến hành phân tích đồng thời 6 mẫu thử riêng biệt thực hiện trong ngày (độ lặp lại) và khác ngày (độ chính xác trung gian). Kết quả được trình bày ở Bảng 3.29.

Bảng 3.29. Kết quả đánh giá độ lặp lại và độ chính xác trung gian

Chất	Độ lặp lại (n = 6)		Độ chính xác trung gian (n = 12)	
	Hàm lượng trung bình (%)	RSD (%)	Hàm lượng trung bình (%)	RSD (%)
PLT	0,38	1,05	0,38	1,17
HPL	0,15	0,56	0,15	0,80
NRT	0,22	1,76	0,22	1,96
NTT	0,24	1,12	0,24	1,44

Nhận xét: Giá trị RSD (%) của mỗi ngày phân tích và của cả hai ngày $\leq 2,0$ %. Độ sai khác kết quả định lượng giữa 2 ngày phân tích $\leq 2,0$ %. Vậy phương pháp định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan đạt yêu cầu về độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

Độ đúng: Độ đúng được tiến hành bằng cách thêm chuẩn vào mẫu thử ở 3 mức 50 %, 100 % và 150 % so với nồng độ các chất phân tích trong mẫu thử. Mỗi nồng độ thực hiện 3 lần. Kết quả đánh giá dựa trên tỷ lệ phục hồi của các chất và được trình bày ở Bảng 3.30.

Nhận xét: Tỷ lệ phục hồi trung bình của hàm lượng các chất đều nằm trong khoảng 95 % - 105 % và RSD \leq 2,0 % chứng tỏ phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đúng.

Bảng 3.30. Kết quả đánh giá độ đúng

Chất	Mức thêm vào	Tỷ lệ phục hồi (TB \pm RSD (%) (n = 3))		
		50 %	100 %	200 %
PLT		98,20 \pm 1,56	99,57 \pm 0,92	99,78 \pm 0,81
HPL		99,79 \pm 0,51	102,90 \pm 1,73	102,95 \pm 1,59
NRT		100,88 \pm 1,82	96,62 \pm 1,54	97,69 \pm 1,81
NTT		100,78 \pm 1,59	100,14 \pm 0,63	99,13 \pm 1,98

Kết luận: Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp định lượng đồng thời 4 lignan trong dược liệu Diệp hạ châu bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA đạt tất cả các yêu cầu về tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng theo qui định của ICH 2005 [31].

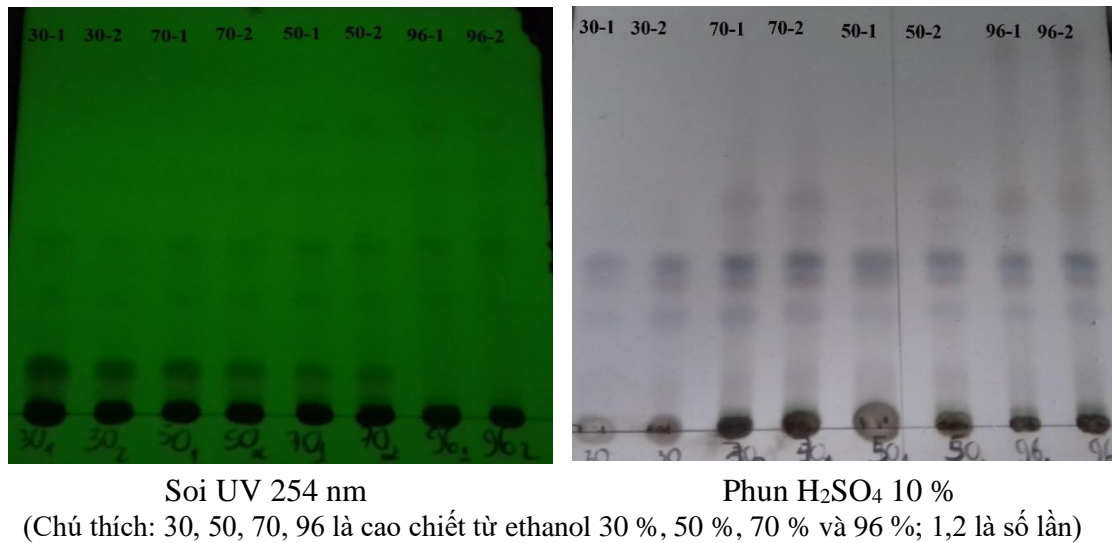
3.3.2. Điều chế cao chuẩn hóa Diệp hạ châu đắng

3.3.2.1. Khảo sát điều kiện thích hợp cho quá trình chiết xuất cao

Khảo sát dung môi chiết: Kết quả khảo sát hiệu suất chiết của các dung môi được trình bày ở Bảng 3.31 và Hình 3.21.

Bảng 3.31. Kết quả khối lượng cặn và lượng hoạt chất trong cặn chiết từ Diệp hạ châu đắng với các dung môi khác nhau

Dung môi	m _{cặn} /1 g mẫu	Hàm lượng % trong dược liệu	
		Phyllanthin	Hypophyllanthin
Ethanol 96 %	0,056	0,302	0,092
Ethanol 70 %	0,045	0,293	0,083
Ethanol 50 %	0,042	0,251	0,072
Ethanol 30 %	0,040	0,232	0,068



Soi UV 254 nm

Phun H₂SO₄ 10 %

(Chú thích: 30, 50, 70, 96 là cao chiết từ ethanol 30 %, 50 %, 70 % và 96 %; 1,2 là số lần)

Hình 3.21. Sắc ký đồ mẫu cao chiết từ các loại dung môi

Nhận xét: Các cao chiết từ dung môi ethanol 70 %, 50 % và 30 % có hàm lượng hoạt chất thấp hơn và lượng chất nhầy nhiều hơn ethanol 96 %. Ethanol 96 % là dung môi chiết tối ưu nhất và dễ thu hồi.

Khảo sát thời gian ngâm: Kết quả khảo sát thời gian ngâm dược liệu Diệp hạ châu đáng được trình bày ở Bảng 3.32.

Nhận xét: Khối lượng căn tăng theo thời gian ngâm. Lượng phyllanthin ở thời gian ngâm 2 ngày tăng nhiều so với thời gian là 1 ngày, nhưng thời gian 3 ngày và 7 ngày không khác biệt so với 2 ngày. Lượng hypophyllanthin trong căn ở ngày 2 có giảm so với ngày 1 và không khác biệt nhiều so với ngày 3 và ngày 7. Cho nên để đảm bảo chiết được lượng hoạt chất nhiều nhất và tiết kiệm thời gian, chọn thời gian ngâm 2 ngày là phù hợp nhất.

Bảng 3.32. Kết quả khối lượng căn và lượng hoạt chất trong căn Diệp hạ châu đáng theo thời gian ngâm

Thời gian	m _{căn} /1 g mẫu	Hàm lượng (%) trong dược liệu	
		Phyllanthin	Hypophyllanthin
1 ngày	0,058	0,218	0,096
	0,055	0,271	0,082
2 ngày	0,060	0,290	0,077
	0,060	0,305	0,073
3 ngày	0,063	0,305	0,073
	0,063	0,301	0,072
7 ngày	0,068	0,305	0,073
	0,073	0,319	0,077

Kết quả khảo sát tỉ lệ dược liệu : dung môi được trình bày ở Bảng 3.33.

Bảng 3.33. Kết quả khối lượng căn và lượng hoạt chất trong căn Diệp hạ châu đẳng theo tỉ lệ dược liệu : dung môi

Tỉ lệ DL : DM	$m_{\text{căn}}/1 \text{ g mẫu}$	Hàm lượng (%) trong dược liệu	
		Phyllanthin	Hypophyllanthin
(1 : 20)	0,064	0,241	0,090
	0,069	0,248	0,088
(1 : 15)	0,062	0,243	0,086
	0,060	0,242	0,085
(1 : 10)	0,055	0,246	0,085
	0,052	0,240	0,081
(1 : 5)	0,052	0,246	0,078
	0,053	0,249	0,083
(1 : 4)	0,050	0,216	0,070
	0,052	0,224	0,066

Nhận xét: Khối lượng căn thu được thay đổi không đáng kể khi thay đổi tỉ lệ dược liệu : dung môi chiết khi tăng lượng dung môi chiết nhưng hàm lượng phyllanthin thu được thì tăng dần và với tỉ lệ (1 : 5) thì hàm lượng phyllanthin đã gần tương đương với tỉ lệ (1 : 10), (1 : 15) và (1 : 20) nên chọn tỉ lệ dược liệu : dung môi phù hợp là (1 : 5).

Khảo sát số lần chiết: Kết quả khảo sát số lần chiết dược liệu Diệp hạ châu đẳng được trình bày ở Bảng 3.34.

Bảng 3.34. Kết quả lượng hoạt chất trong căn Diệp hạ châu đẳng theo số lần chiết

Số lần chiết	Hàm lượng (%) trong dược liệu	
	Phyllanthin	Hypophyllanthin
1	0,193	0,062
	0,179	0,058
2	0,223	0,072
	0,224	0,072
3	0,242	0,078
	0,244	0,078
4	0,248	0,080
	0,249	0,080

Nhận xét: Trong lần chiết thứ 2, lượng hoạt chất tăng khoảng 20 %. Trong lần chiết thứ 3, lượng hoạt chất tăng khoảng 10 % và lần chiết thứ 4 chỉ tăng 2,5 %. Để

đảm bảo chiết được lượng hoạt chất nhiều nhất, tiết kiệm thời gian và dung môi, chọn chiết 2 lần với thời gian ngâm 2 ngày là phù hợp nhất.

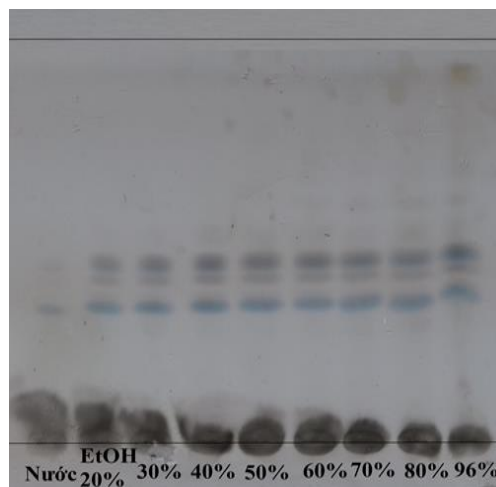
3.3.2.2. Tiến hành chiết thực nghiệm

Điều kiện thích hợp chiết xuất thực nghiệm ở quy mô phòng thí nghiệm như sau: *Phương pháp chiết*: ngâm. Dược liệu: 2 kg bột dược liệu được rây qua rây 355 μm . Dung môi: ethanol 96 % với tỉ lệ dược liệu : dung môi (1 : 5). Thời gian chiết: 48 giờ, chiết 2 lần. Tiến hành trên 3 lô. *Phương pháp điều chế cao đặc*: cô quay chân không. Nhiệt độ: 35-40 °C. Áp suất: 50-130 atm. Khối lượng cao thu được của 3 lô được trình bày ở Bảng 3.35.

Bảng 3.35. Khối lượng cao thu được

STT	Khối lượng dược liệu chiết (g)	Khối lượng cao (g)	Tỉ lệ cao chiết được (%)
Lô 1	2020	302,8	14,99
Lô 2	1970	285,7	14,50
Lô 3	2015	290,9	14,44

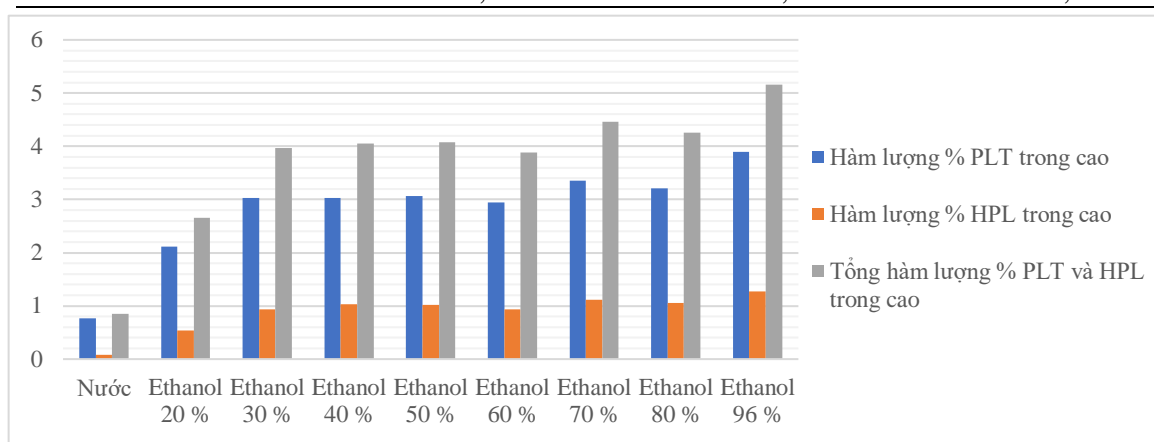
Quy mô phòng thí nghiệm: Tiến hành theo điều kiện như trên để chiết 2 kg bột dược liệu với lần lượt dung môi khảo sát: nước, ethanol 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 96 %. Sau đó, dịch chiết được lọc qua màng lọc để loại tạp cơ học, thu được dịch lọc. Dịch lọc được cô dưới áp suất giảm. Thực hiện SKLM và HPLC để kiểm tra hàm lượng của PLT và HPL trong cao thu được. Kết quả trình bày ở Bảng 3.36, Hình 3.22 và Hình 3.23.



Hình 3.22. SKLM khảo sát dung môi chiết ở quy mô phòng thí nghiệm

Bảng 3.36. Kết quả khảo sát dung môi chiết ở quy mô phòng thí nghiệm

STT	Dung môi	Hàm lượng % PLT trong cao	Hàm lượng % HPL trong cao	Tổng hàm lượng % PLT và HPL trong cao
1	Nước	0,77	0,08	0,85
2	Ethanol 20 %	2,12	0,54	2,66
3	Ethanol 30 %	3,03	0,93	3,97
4	Ethanol 40 %	3,03	1,03	4,05
5	Ethanol 50 %	3,07	1,02	4,08
6	Ethanol 60 %	2,95	0,94	3,88
7	Ethanol 70 %	3,35	1,11	4,46
8	Ethanol 80 %	3,21	1,05	4,26
9	Ethanol 96 %	3,89	1,27	5,16

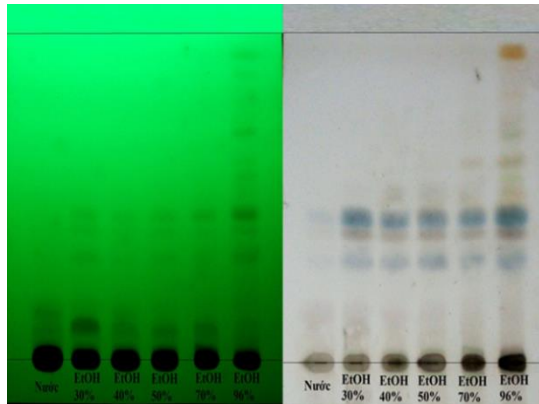
**Hình 3.23.** Biểu đồ khảo sát dung môi chiết ở quy mô phòng thí nghiệm

Nhận xét: Khi chiết bằng nước thì hàm lượng PLT và HPL trong cao thấp nhất. Chiết bằng dung môi ethanol thì từ ethanol 20 % đến ethanol 30 %, hàm lượng hoạt chất chiết được tăng nhanh (hàm lượng PLT và HPL cao gấp 4,5 lần so với nước), từ ethanol 30 % đến ethanol 80 %, hàm lượng hoạt chất tăng không đáng kể, ethanol 96 % cho hàm lượng hoạt chất chiết được cao nhất (hàm lượng PLT và HPL cao gấp 1,3 lần so với ethanol 30 %).

3.3.2.3. Điều chế cao khô ở quy mô pilot

Khảo sát điều kiện sản xuất ở quy mô pilot: Tiến hành ở quy mô pilot để chiết 20 kg bột dược liệu với lần lượt các dung môi khảo sát: nước, ethanol 30 %, 40 %, 50 %, 70 %, 96 % và phun sấy khô dịch chiết được 6 mẫu cao khô. Chọn dung môi thích hợp nhất để sản xuất 3 lô, mỗi lô 3 mẫu thử. Quá trình sản xuất ở quy mô pilot được tiến hành tại nhà máy Công ty Cổ phần BV Pharma với hệ thống chiết xuất

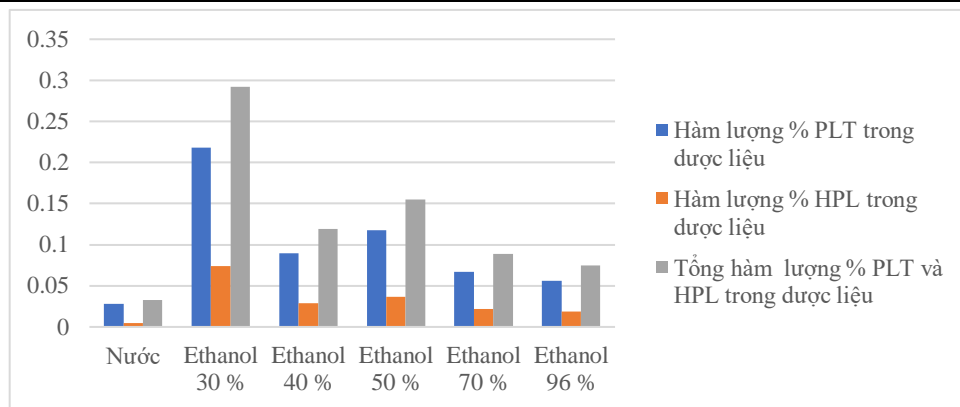
đa năng. Thực hiện SKLM và HPLC để kiểm tra hàm lượng của PLT và HPL. Kết quả trình bày ở Bảng 3.37, Hình 3.24 và Hình 3.25.



Hình 3.24. SKLM khảo sát dung môi chiết ở quy mô pilot

Bảng 3.37. Kết quả khảo sát dung môi chiết ở quy mô pilot

STT	Dung môi	Hàm lượng % PLT trong dược liệu	Hàm lượng % HPL trong dược liệu	Tổng hàm lượng % PLT và HPL trong dược liệu
1	Nước	0,028	0,005	0,033
2	Ethanol 30 %	0,218	0,074	0,292
3	Ethanol 40 %	0,090	0,029	0,119
4	Ethanol 50 %	0,118	0,037	0,155
5	Ethanol 70 %	0,067	0,022	0,089
6	Ethanol 96 %	0,056	0,019	0,075



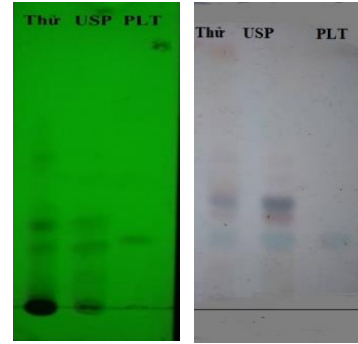
Hình 3.25. Biểu đồ khảo sát dung môi chiết ở quy mô pilot

Nhận xét: Khi chiết bằng nước thì hàm lượng hoạt chất PLT và HPL trong cao là thấp nhất. Khi chiết bằng dung môi ethanol thì ethanol 30 % cho hàm lượng hoạt chất trong cao là cao nhất (cao gấp 9,0 lần so với nước), từ ethanol 50 % đến ethanol

96 % hàm lượng hoạt chất trong cao giảm dần. Vì thế, ethanol 30 % được chọn làm dung môi chiết xuất dược liệu ở quy mô pilot.

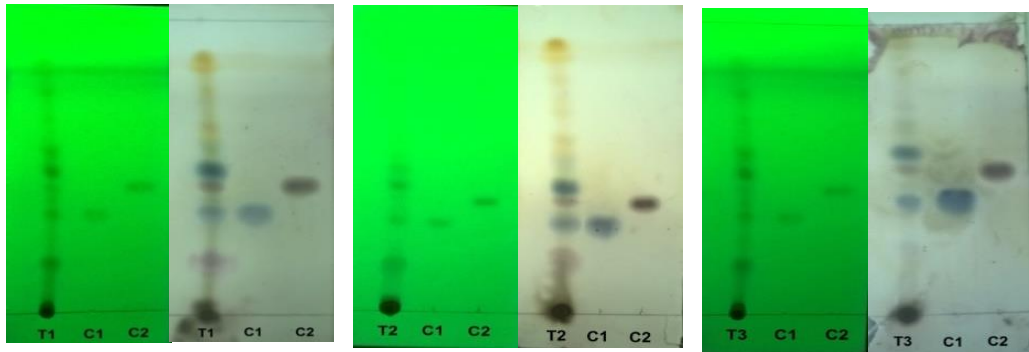
3.3.3. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cao khô Diệp hạ châu đắng

Tính chất: Cao dạng bột, màu nâu đồng nhất, mùi dược liệu, vị đắng, dễ hút ẩm.



Hình 3.26. Cao khô Diệp hạ châu đắng **Hình 3.27.** Sắc ký đồ SKLM định tính cao chuẩn USP (soi đèn 254 nm và phun H₂SO₄ 10 %)

Định tính: Tiến hành SKLM theo điều kiện sắc ký mục 2.2.1.2, kết quả định tính phyllanthin, hypophyllanthin trong cao khô Diệp hạ châu đắng được trình bày theo Hình 3.28.



Hình 3.28. Sắc ký đồ SKLM định tính các mẫu cao (soi đèn 254 nm và phun H₂SO₄ 10 %)

Ghi chú: T1, T2, T3: Cao khô Diệp hạ châu đắng lô 1, 2, 3 chiết từ ethanol 30 %. C1: Chuẩn phyllanthin đối chiếu. C2: Chuẩn hypophyllanthin đối chiếu.

Nhận xét: Trên các sắc ký đồ SKLM, các vết của mẫu thử và mẫu chuẩn đối chiếu có cùng trị số R_f và màu sắc.

Mất khối lượng do làm khô: Tiến hành theo ĐĐVN V, phụ lục 9.6, phương pháp 1. Kết quả mất khối lượng do làm khô của cao được trình bày ở Bảng 3.38.

Bảng 3.38. Kết quả mất khối lượng do làm khô của các mẫu cao

Lô	Mất khối lượng do làm khô (%)			Trung bình (%)	RSD (%)
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3		
T 1	3,51	3,59	3,64	3,58	1,83
T 2	3,35	3,25	3,31	3,30	1,52
T 3	3,65	3,64	3,69	3,66	0,72

Nhận xét: Dựa trên số liệu của lô có kết quả mất khối lượng do làm khô cao nhất (lô 3), mức giới hạn được chọn đối với chỉ tiêu mất khối lượng do làm khô của cao khô Diệp hạ châu đáng là: Không quá 5 %.

Tro toàn phần: Tiến hành theo DĐVN V, phụ lục 9.8. Kết quả độ tro toàn phần của cao được trình bày ở Bảng 3.39.

Bảng 3.39. Kết quả tro toàn phần của các mẫu cao

Lô	Tro toàn phần (%)			Trung bình (%)	RSD (%)
	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3		
T 1	7,24	7,17	7,37	7,26	1,40
T 2	6,98	7,05	7,68	7,24	5,33
T 3	6,77	7,01	6,94	6,91	1,79

Nhận xét: Dựa trên số liệu của lô có kết quả tro toàn phần cao nhất (lô 1), mức giới hạn được chọn đối với chỉ tiêu tro toàn phần của cao khô Diệp hạ châu đáng là: Không quá 10 %.

Kim loại nặng: Tiến hành kiểm tra giới hạn kim loại nặng theo DĐVN V, phụ lục 9.4.8. Kết quả giới hạn kim loại nặng của cao được trình bày ở Bảng 3.40.

Bảng 3.40. Kết quả giới hạn kim loại nặng của mẫu cao

Lô	Kim loại nặng
T 1	Đạt
T 2	Đạt
T 3	Đạt

Định lượng: Tiến hành HPLC theo điều kiện sắc ký mục 3.3.1.1. Từ diện tích pic của phyllanthin, hypophyllanthin thu được từ sắc ký đồ dung dịch thử và dung dịch chuẩn, tính hàm lượng (mg/g) phyllanthin, hypophyllanthin có trong mẫu cao. Kết quả hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin trong mẫu cao được trình bày ở Bảng 3.41.

Bảng 3.41. Hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin trong mẫu cao

Lô	Hàm lượng PLT (mg/g)	Hàm lượng HPL (mg/g)	Tổng hàm lượng PLT và HPL (mg/g)
T 1	18,3	7,5	25,8
T 2	18,7	7,7	26,4
T 3	18,4	7,5	25,9
Trung bình	18,5	7,6	26,0
RSD (%)	1,13	1,52	1,23

Giới hạn nhiễm khuẩn: Tiến hành theo ĐĐVN V, phụ lục 13.6. Kết quả giới hạn nhiễm khuẩn của cao được trình bày ở Bảng 3.42.

Bảng 3.42. Kết quả giới hạn nhiễm khuẩn của các mẫu cao

Lô	Kết quả giới hạn nhiễm khuẩn					
	Tổng số vi khuẩn hiếu khí	Nấm men và nấm mốc	Vi khuẩn Gram âm	<i>Salmonella</i> <i>spp.</i>	<i>Escherichia</i> <i>coli</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
T 1	1x10 ²	—	—	—	—	—
T 2	1x10 ²	—	—	—	—	—
T 3	1x10 ²	—	—	—	—	—

Ghi chú: “—”: Không phát hiện.

Nhận xét: Các lô mẫu cao hoàn toàn âm tính với kết quả giới hạn nhiễm khuẩn.

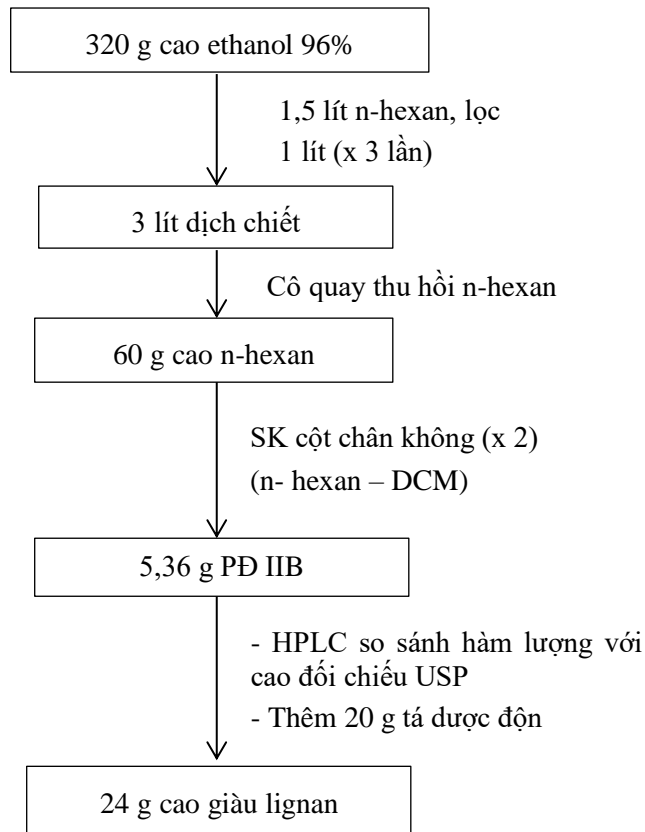
Dự thảo tiêu chuẩn chất lượng cao khô Diệp hạ châu đang được trình bày chi tiết ở Phụ lục 13. Kết quả kiểm nghiệm cao khô Diệp hạ châu đang trình bày ở Bảng 3.43.

Bảng 3.43. Kết quả kiểm nghiệm cao khô Diệp hạ châu đắng

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất	Bột màu nâu đồng nhất. mùi dược liệu, vị đắng, dễ hút ẩm	Đạt
Định tính		
<i>Sắc ký lớp mỏng</i>	Diệp hạ châu đắng	Đúng
<i>HPLC</i>	(<i>Phyllanthus amarus</i>)	Đúng
Mất khối lượng do làm khô	Không quá 5 %	Đạt (3,6 %)
Tro toàn phần	Không quá 10 %	Đạt (7,3%)
Kim loại nặng	Không quá 20 ppm	Đạt
Định lượng		
<i>Phyllanthin</i>	Hàm lượng phyllanthin (C ₂₄ H ₃₄ O ₆) không ít hơn 0,8 % tính trên chế phẩm khô	Đạt (1,83 %)
<i>Hypophyllanthin</i>	Hàm lượng hypophyllanthin (C ₂₄ H ₃₀ O ₇) không ít hơn 0,3 % tính trên chế phẩm khô	Đạt (0,75 %)
Độ nhiễm khuẩn		
Tổng số vi khuẩn hiếu khí	Không quá 10 ⁴ cfu/g	Đạt
Tổng số nấm men và nấm mốc	Không quá 10 ² cfu/g	Đạt
Vi khuẩn Gram âm	Không quá 10 ² cfu/g	Đạt
<i>Salmonella spp.</i>	Không được có/10 g	Đạt
<i>Escherichia coli</i>	Không được có/g	Đạt
<i>Staphylococcus aureus</i>	Không được có/g	Đạt

3.3.4. Ứng dụng điều chế cao giàu lignan dùng làm cao đối chiếu Diệp hạ châu đắng

Phân lập và tinh chế phân đoạn cao giàu lignan theo sơ đồ 3.6. Kết quả khảo sát và đánh giá chất lượng được trình bày ở Phụ lục 13.

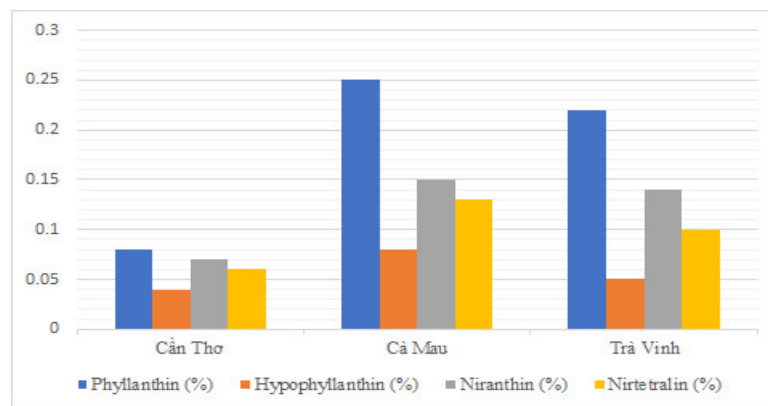


Sơ đồ 3.6. Quy trình điều chế cao giàu lignan

3.3.5. Ứng dụng định lượng các lignan trong Diệp hạ châu đắng

3.3.5.1. Định lượng các lignan trong một số mẫu dược liệu

Ứng dụng phương pháp đã xây dựng, tiến hành định lượng các mẫu dược liệu Diệp hạ châu đắng thu được trên địa bàn tỉnh Cần Thơ, Trà Vinh và Cà Mau. Kết quả hàm lượng 4 lignan trong các mẫu dược trình bày ở Bảng 3.44 và Hình 3.29.



Hình 3.29. Biểu đồ thể hiện hàm lượng (%) các lignan trong các mẫu dược liệu

Bảng 3.44. Tóm tắt kết quả hàm lượng (%) 4 hợp chất lignan trong mẫu dược liệu

Mẫu dược liệu	Phyllanthin (%)	Hypophyllanthin (%)	Niranthin (%)	Nirtetralin (%)
Cần Thơ	0,08	0,04	0,07	0,06
Cà Mau	0,25	0,08	0,15	0,13
Trà Vinh	0,22	0,05	0,14	0,1

Nhận xét: Kết quả cho thấy hàm lượng phyllanthin cao nhất so với các lignan còn lại ở tất cả các mẫu dược liệu. Các mẫu thu được tại các nơi khác nhau nhưng cho hàm lượng các chất tương ứng tỷ lệ gần giống nhau.

3.3.5.2. Định lượng trong các mẫu cao khô Diệp hạ châu đắng

Kết quả hàm lượng (%) trong các loại cao khô được trình bày trong Bảng 3.45.

Bảng 3.45. Tóm tắt kết quả hàm lượng (%) 4 hợp chất lignan trong các loại cao khô

Mẫu thử	Phyllanthin (%)	Hypophyllanthin (%)	Niranthin (%)	Nirtetralin (%)
Cao ethanol 30 %	1,45	0,52	0,59	0,61
Cao ethanol 40 %	0,83	0,30	0,40	0,42
Cao ethanol 50 %	1,17	0,43	0,59	0,61
Cao ethanol 60 %	0,91	0,32	0,43	0,45
Cao ethanol 70 %	0,77	0,28	0,38	0,39
Cao nước	0,18	0,04	0,04	0,03
Cao giàu lignan điều chế	8,37	0,91	1,29	1,12

Nhận xét: Hàm lượng phyllanthin cao nhất so với các lignan còn lại ở tất cả các mẫu cao khô dược liệu. Cao giàu lignan điều chế được có hàm lượng lignan cao và ethanol 30 % là dung môi thích hợp nhất để chiết xuất cao ở quy mô lớn.

3.4. ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ THÔNG SỐ DƯỢC ĐỘNG HỌC CỦA CAO CHUẨN HÓA ĐIỀU CHẾ TỪ DIỆP HẠ CHÂU ĐẮNG

3.4.1. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ

3.4.1.1. Khảo sát điều kiện khối phổ

Điều kiện khối phổ tối ưu đã được xác định như sau: Nguồn ion hóa ESI; Kiểu ion hóa ESI (+); Tốc độ dòng khí phun (nitơ) – Nebulizing Gas Flow: 3 L/phút; Tốc độ dòng khí khô (nitơ) – Drying Gas Flow: 15 L/phút; Nhiệt độ hóa hơi dung môi –

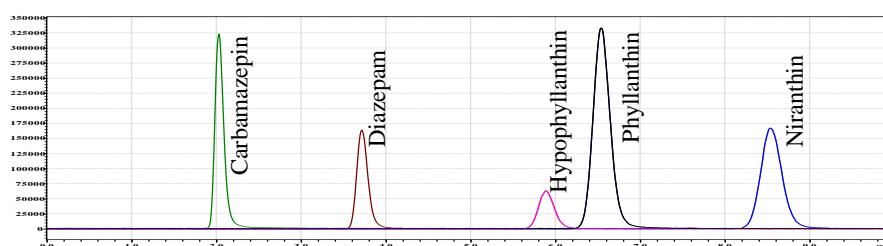
DL Temperature: 250 °C; Nhiệt độ buồng ion hóa – Heatblock Temperature: 400 °C;
 Áp suất khí phun: 25 psi; Chế độ ghi phổ: MRM; Điện thế mao quản: 4500 V; Thời
 gian chờ ghi nhận tín hiệu – Dwell time: 100 ms; Thể phân mảnh: ở Bảng 3.46.

Bảng 3.46. Thể phân mảnh của các chất khảo sát

Chất	ESI	m/z	Q1 (eV)	CE (eV)	Q3 (eV)	Tỷ lệ (%)
Phyllanthin (PLT)	(+)	436,00 → 151,10	-22	-33	-29	100
Hypophyllanthin (HPL)	(+)	261,20 → 231,10	-18	-14	-16	100
Niranthin (NRT)	(+)	449,95 → 369,20	-23	-18	-25	100
Diazepam	(+)	285,00 → 154,05	-21	-28	-30	100
Carbamazepin	(+)	237,15 → 193,10	-12	-35	-19	100

3.4.1.2. Khảo sát chuẩn nội

Kết quả trình bày ở Bảng 3.47 cho thấy diazepam có hiệu suất chiết cao hơn so với carbamazepin. Do đó, diazepam được dùng làm chuẩn nội để khảo sát phương pháp.



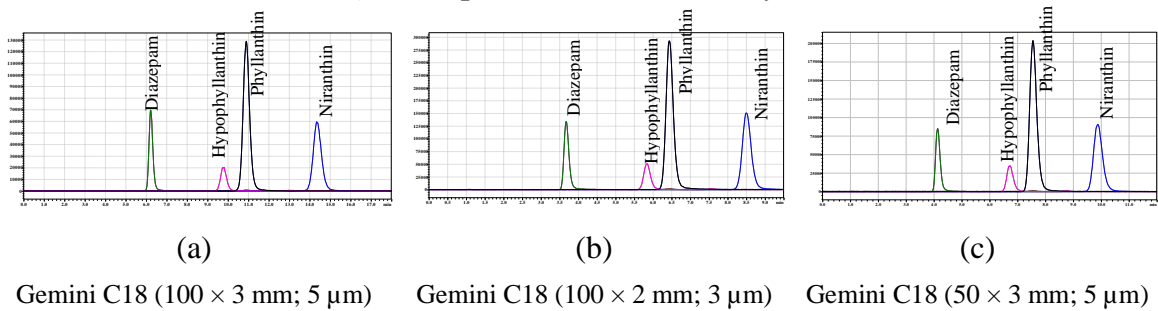
Hình 3.30. Sắc ký đồ mẫu giả lập chứa các chất phân tích và các chuẩn nội khảo sát ở cùng nồng độ 1 µg/mL

Bảng 3.47. Hiệu suất chiết của các chất chuẩn nội đã khảo sát

Mẫu	Hiệu suất chiết (%)	
	Diazepam	Carbamazepin
1	87,63	48,53
2	85,82	52,36
3	85,93	54,65
4	83,96	55,36
5	90,91	52,69
6	91,81	51,30
Trung bình	87,68	52,48
RSD %	3,53	4,67

3.4.1.3. Khảo sát điều kiện sắc ký

Khảo sát cột sắc ký: Kết quả khảo sát cho sắc ký đồ thu được ở Hình 3.31.



Hình 3.31. Sắc ký đồ khảo sát cột với các kích thước khác nhau

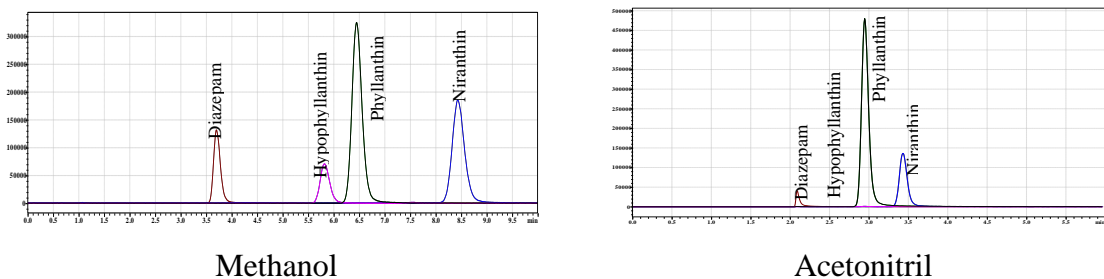
Các cột sắc ký trên đều cho các pic có hình dạng khá cân xứng, tương đối tách nhau. Tuy nhiên, cột (a) cho tổng thời gian phân tích dài (17 phút); cột (b) và (c) cho thời gian phân tích ngắn hơn (10 phút và 9 phút). Mặt khác, pic diazepam (IS) có hệ số đối xứng $A_s > 1,5$ khi sử dụng cột (c). Kết quả chi tiết được trình bày trong Bảng 3.48. Do đó, cột (b) Gemini C18 (100 × 2 mm; 3 μm) được sử dụng để khảo sát tiếp.

Bảng 3.48. Kết quả khảo sát cột sắc ký

Cột	Diazepam		Phyllanthin		Hypophyllanthin		Niranthin		Tổng thời gian phân tích
	t_R (phút)	A_s	t_R (phút)	A_s	t_R (phút)	A_s	t_R (phút)	A_s	
(a)	6,12	1,33	11,12	1,17	9,89	1,15	14,23	1,23	17 phút
(b)	3,72	1,28	6,75	1,17	5,88	1,13	8,52	1,27	10 phút
(c)	3,55	1,63	6,19	1,14	5,25	1,20	8,01	1,39	9 phút

Khảo sát pha động

Khảo sát hệ pha động chứa methanol hoặc acetonitril

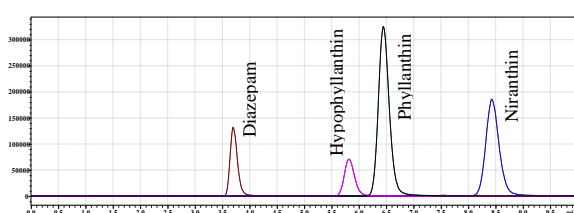


Hình 3.32. Sắc ký đồ khảo sát hệ pha động chứa methanol hoặc acetonitril

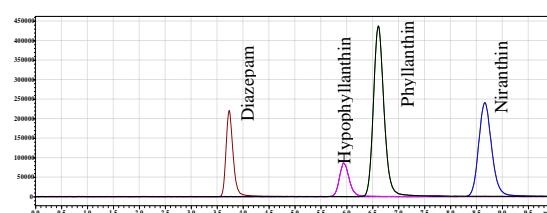
Nhận xét: Hệ pha động chứa acetonitril cho các pic hình dạng chưa cân xứng, tín hiệu thấp hơn rất nhiều so với hệ pha động chứa methanol, đặc biệt là HPL. Do đó, methanol được lựa chọn để khảo sát tiếp.

Bảng 3.49. Kết quả khảo sát hệ pha động chứa methanol hoặc acetonitril

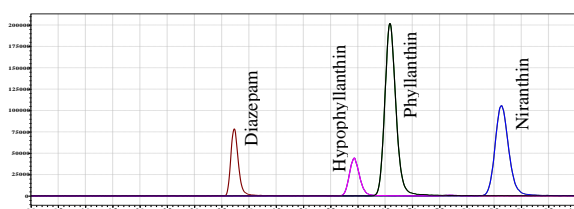
Chất phân tích	Methanol			Acetonitril		
	t_R (phút)	S_{pic}	A_s	t_R (phút)	S_{pic}	A_s
Phyllanthin	6,53	4282396	1,113	2,94	3026438	1,236
Hypophyllanthin	5,87	1552769	1,086	2,95	6227	1,149
Niranthin	8,50	3905449	1,098	3,43	963495	1,196
Diazepam	3,70	2048373	1,146	2,09	151294	2,791

Khảo sát 2 loại dung dịch đệm amoni acetat và amoni format

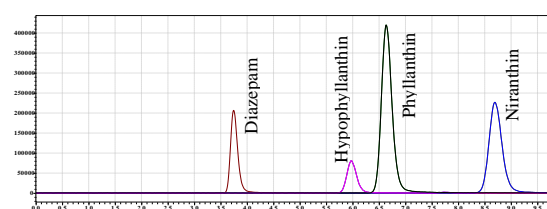
(a) Amoni acetat 5 mM



(b) Amoni format 5 mM



(c) Amoni acetat 10 mM



(d) Amoni format 10 mM

Hình 3.33. Sắc ký đồ khảo sát loại đệm trong pha động

Nhận xét: Không có sự khác biệt về thời gian lưu giữa 2 hệ pha động chứa amoni acetat và amoni format. Tuy vậy, có sự khác biệt đáng kể về tín hiệu (diện tích pic) giữa hai loại đệm này. Kết quả được trình bày trong Bảng 3.50.

Bảng 3.50. Kết quả so sánh loại đệm trong pha động

Chất phân tích	Đệm amoni acetat				Đệm amoni format			
	5 mM		10 mM		5 mM		10 mM	
	t_R (phút)	S_{pic}	t_R (phút)	S_{pic}	t_R (phút)	S_{pic}	t_R (phút)	S_{pic}
Phyllanthin	6,44	4351546	6,45	2716083	6,47	5928736	6,59	5685619
Hypophyllanthin	5,81	903801	5,82	559611	5,82	1061211	5,93	1030377
Niranthin	8,42	2969132	8,43	1738145	8,43	3932514	8,63	3705071
Diazepam	3,69	1197316	3,70	726776	3,69	1955434	3,73	1900661

Nhận xét: So sánh hệ pha động chứa 2 loại đệm khảo sát cho thấy hệ pha động chứa amoni format cho tín hiệu các chất phân tích cao hơn hẳn so với hệ pha động

chứa amoni acetat. Do đó, hệ pha động chứa amoni format được sử dụng để khảo sát tiếp.

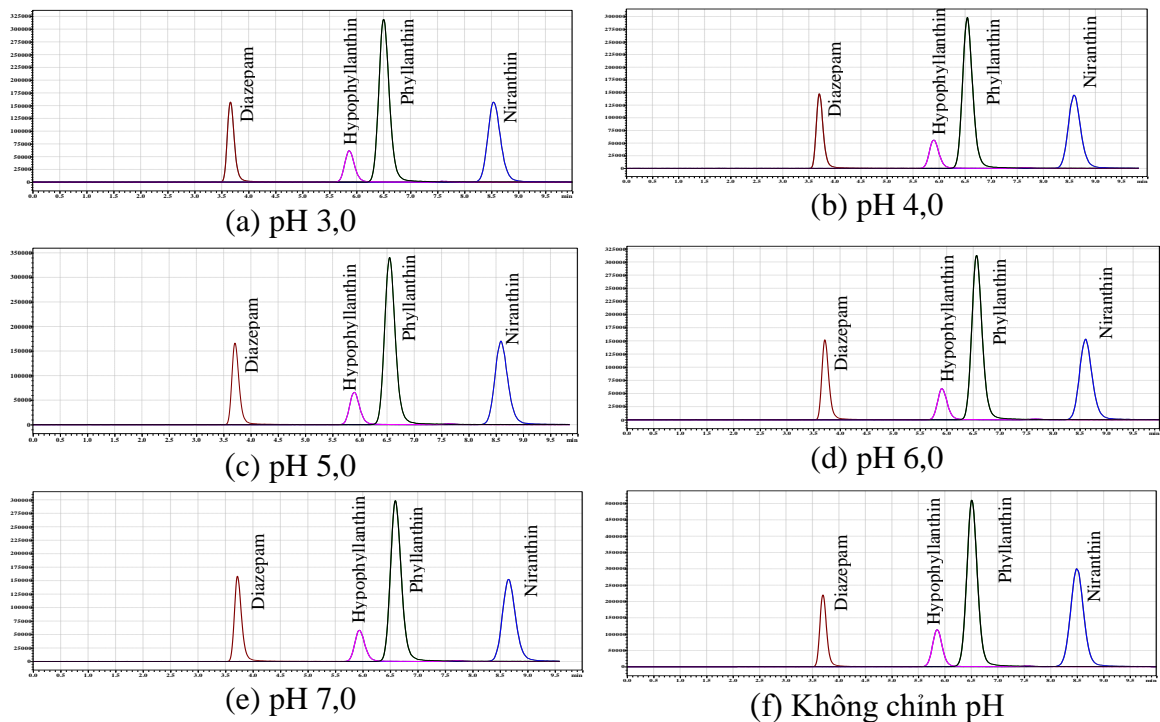
Khảo sát nồng độ dung dịch đệm: Kết quả được trình bày ở Bảng 3.51.

Bảng 3.51. Kết quả khảo sát nồng độ đệm amoni format

mM	Thời gian lưu (phút)				Diện tích pic				Hệ số bất đối			
	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ
2	6,55	5,88	8,54	3,71	4101641	1130968	4291135	2067519	1,09	1,08	1,11	1,57
3	6,57	5,90	8,55	3,72	4037553	1173236	4223153	2148394	1,07	1,08	1,11	1,58
5	6,56	5,90	8,55	3,71	4012826	1171779	4251618	2138989	1,10	1,10	1,10	1,18
7	6,55	5,89	8,55	3,71	4051073	1180965	4179302	2158038	1,11	1,12	1,08	1,18
8	6,54	5,89	8,52	3,70	4042365	1184510	4271755	2180061	1,12	1,07	1,13	1,16
10	6,56	5,89	8,54	3,71	4253216	1183690	4309455	2229543	1,10	1,11	1,11	1,20

Nhận xét: Khi nồng độ dung dịch đệm thay đổi, thời gian lưu các pic và tín hiệu (diện tích pic) không đổi. Tuy nhiên khi nồng độ amoni format dưới 5 mM thì pic diazepam (IS) mất cân xứng ($A_s > 1,5$). Ngoài ra, nồng độ dung dịch đệm càng cao thì càng có nguy cơ gây ô nhiễm nguồn ion trong quá trình phân tích, đặc biệt trong các đợt phân tích với số lượng mẫu nhiều. Do đó, dung dịch đệm amoni format 5 mM đã được chọn lựa để khảo sát tiếp.

Khảo sát pH dung dịch đệm: Kết quả trình bày ở Bảng 3.52 và Hình 3.34.

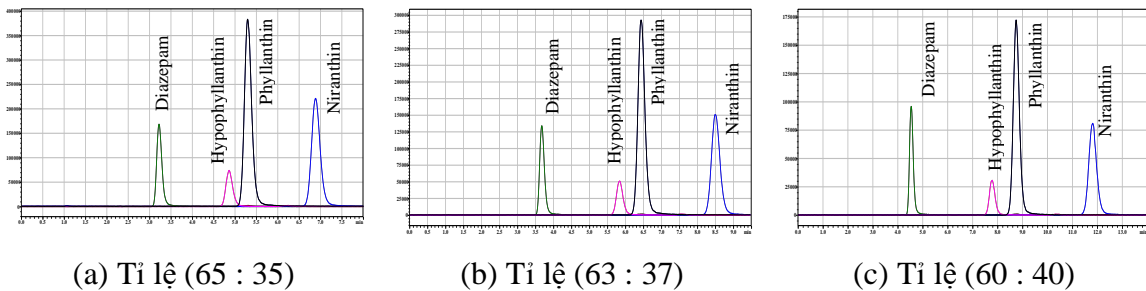


Hình 3.34. Sắc ký đồ khảo sát pH của dung dịch đệm amoni format 5 mM

Bảng 3.52. Kết quả khảo sát pH dung dịch đệm amoni format 5 mM

pH	Thời gian lưu (phút)				Diện tích pic				Hệ số bất đối			
	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ
3	6,56	5,86	8,59	3,70	4211926	1025145	4121554	2123215	1,01	1,03	1,20	1,14
4	6,54	5,92	8,59	3,73	4235689	992505	4155213	1931451	1,18	1,10	1,16	1,25
5	6,55	5,91	8,52	3,78	4136549	1121355	4015468	2126955	1,18	1,14	1,25	1,18
6	6,52	5,86	8,51	3,79	4123145	1145214	4054564	2015456	1,11	1,18	1,18	1,05
7	6,58	5,82	8,50	3,80	4121355	995215	4212135	2015645	1,04	1,21	1,18	1,18
-	6,52	5,81	8,51	3,72	4316565	1211231	3912155	1902151	1,10	1,07	1,08	1,16

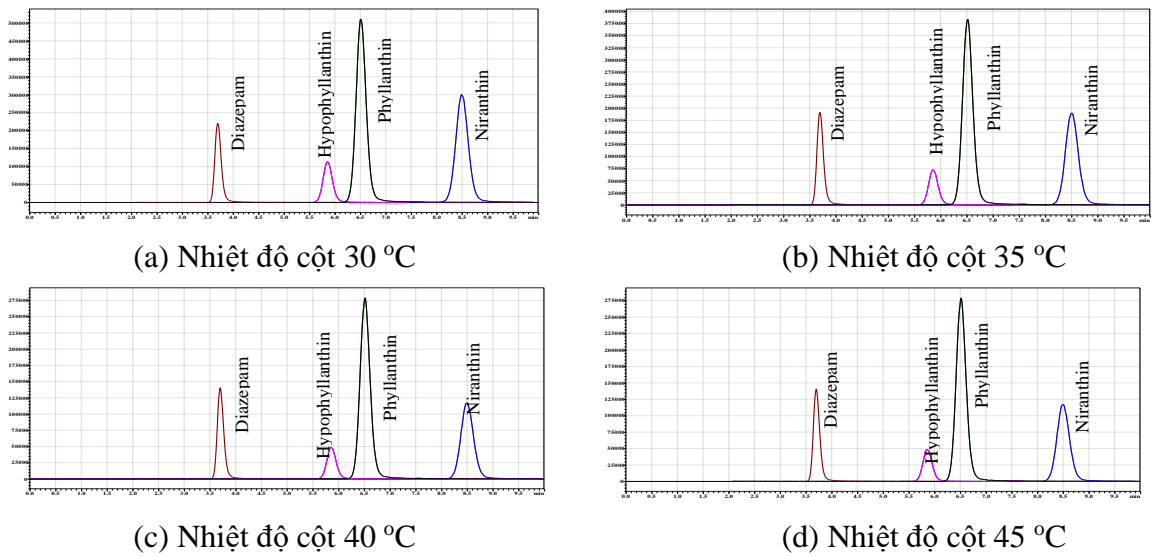
Nhận xét: Không có sự khác biệt đáng kể về thời gian phân tích, tín hiệu và hình dạng pic với các pH dung dịch đệm khác nhau. Do đó, dung dịch đệm (f) – amoni format 5 mM (không chỉnh pH) được lựa chọn để đơn giản hóa trong quá trình chuẩn bị pha động cho phân tích.

Khảo sát tỉ lệ pha động: Kết quả trình bày ở Hình 3.35.**Hình 3.35.** Sắc ký đồ khảo sát tỉ lệ pha động

Nhận xét: Khi tăng thành phần methanol trong pha động, các pic xuất hiện sớm hơn. Tuy nhiên, với tỉ lệ (a) (65 : 35) thì pic PLT và HPL chưa tách hoàn toàn, xen phủ với nhau. Với tỉ lệ (c) (60 : 40), mặc dù các pic tách nhau hoàn toàn nhưng thời gian phân tích dài (14 phút). Do đó, hệ pha động với tỉ lệ (b) (63 : 37) đã được lựa chọn vì cho thời gian phân tích phù hợp (10 phút) và các pic tách nhau hoàn toàn.

Khảo sát nhiệt độ cột: Kết quả trình bày ở Bảng 3.53 và Hình 3.36.**Bảng 3.53.** Thông số sắc ký của chất phân tích, chuẩn nội với nhiệt độ cột khảo sát

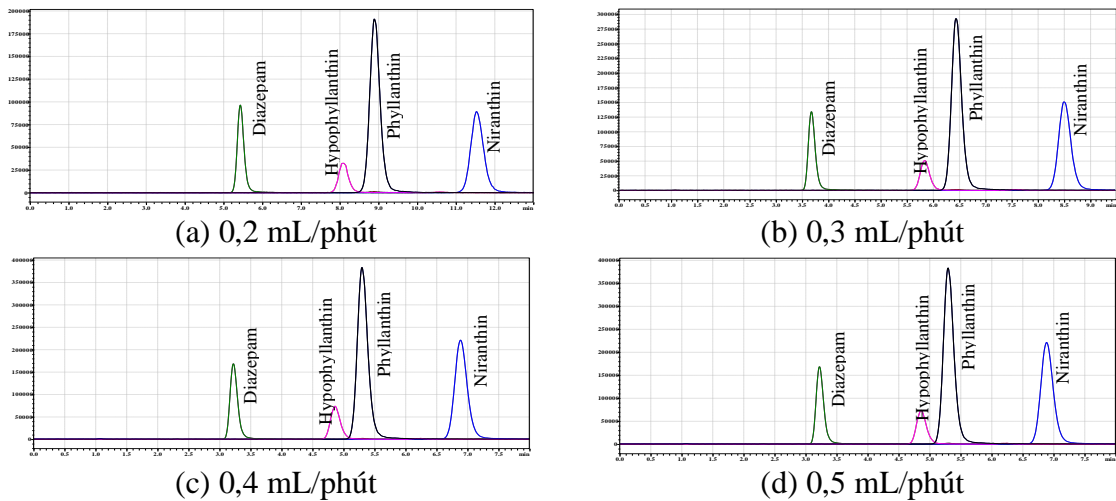
t°	Thời gian lưu (phút)				Diện tích pic				Hệ số bất đối			
	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ
30	6,98	6,20	9,15	4,20	4100213	1236266	4123126	2026669	1,17	1,05	1,08	1,14
35	6,89	6,12	8,89	4,05	4215365	1036126	4015615	1951163	1,12	1,13	1,25	1,25
40	6,52	5,95	8,56	3,77	4321352	1155312	3951548	1914521	1,17	1,18	1,06	1,28
45	6,10	5,55	8,15	3,58	4049648	1051456	3911455	1816361	1,11	1,18	1,04	1,66



Hình 3.36. Sắc ký đồ khảo sát nhiệt độ cột

Nhận xét: Khi nhiệt độ cột tăng từ 30-45 °C, tín hiệu của các chất phân tích gần như không thay đổi, các pic xuất hiện sớm hơn. Khi nhiệt độ trên 40 °C, pic diazepam mất cân đối ($A_s > 1,5$). Do vậy, nhiệt độ cột 40 °C được lựa chọn vì thời gian phân tích phù hợp và cho hình dạng pic cân xứng.

Khảo sát tốc độ dòng: Kết quả trình bày ở Bảng 3.54 và Hình 3.37.



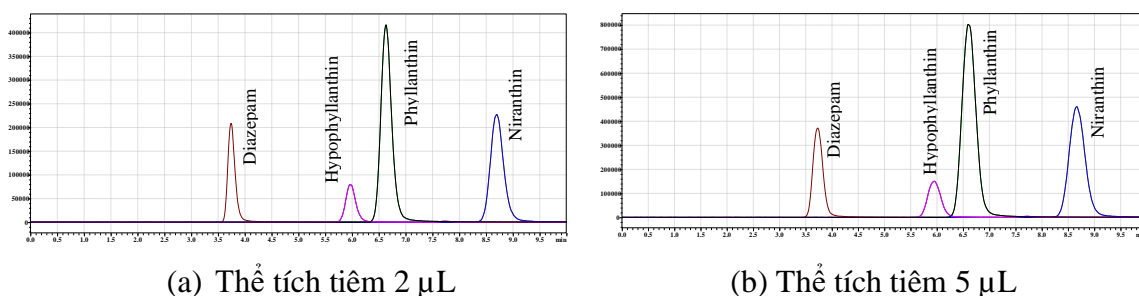
Hình 3.37. Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn tương ứng với các tốc độ dòng khảo sát

Bảng 3.54. Thông số sắc ký của hỗn hợp chuẩn tương ứng với tốc độ dòng

F (mL/phút)	Thời gian lưu (phút)				Diện tích pic				Hệ số bất đối			
	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ
0,2	7,16	6,25	9,15	4,10	4228424	1002493	4066669	2241248	1,00	1,09	1,22	1,14
0,3	6,58	5,91	8,59	3,83	4222905	1087353	3918298	2135246	1,05	1,11	1,03	1,10
0,4	5,88	5,28	7,96	3,15	3772178	892150	3595601	1765313	1,16	1,13	1,25	1,15
0,5	5,52	4,81	7,52	2,98	3531225	857693	3212482	1589331	1,10	1,14	1,00	1,06

Nhận xét: Khi tốc độ dòng tăng, các pic xuất hiện sớm nhưng tín hiệu giảm. Do đó, tốc độ dòng 0,3 mL/phút được lựa chọn vì cho tín hiệu các chất phân tích cao hơn so với tốc độ dòng 0,4 và 0,5 mL/phút; đồng thời thời gian phân tích ngắn hơn so với tốc độ dòng 0,2 mL/phút.

Khảo sát thể tích tiêm: Kết quả trình bày ở Bảng 3.55 và Hình 3.38.



Hình 3.38. Sắc ký đồ tương ứng với các thể tích tiêm khảo sát

Bảng 3.55. Thông số sắc ký của chất phân tích, chuẩn nội với thể tích tiêm khảo sát

V (µL)	Thời gian lưu (phút)				Diện tích pic				Hệ số bất đối			
	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ
2	6,59	5,90	8,59	3,82	8928255	2656459	8422133	3612521	1,15	1,26	1,15	1,24
5	6,58	5,91	8,59	3,83	4223155	1163266	4091425	1912346	1,07	1,10	1,05	1,09

Nhận xét: Khi thể tích tiêm tăng từ 2 µL lên 5 µL, tín hiệu (diện tích pic) tăng cao. Tuy nhiên, khi thể tích tiêm 5 µL thì các pic bị dãn, chiều rộng pic tăng. Điều này dẫn tới khả năng lấy tích phân sắc ký đồ không chính xác. Do vậy, thể tích tiêm 2 µL là phù hợp.

Từ các kết quả khảo sát, điều kiện sắc ký thích hợp để định lượng đồng thời 3 lignan phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ là: Pha động: Methanol – dung dịch đệm amoni format 5 mM (63 : 37). Cột sắc ký: Gemini C18 (100 × 2 mm; 3 µm). Nhiệt độ cột: 40 °C. Nhiệt độ autosampler: 5 °C. Tốc độ dòng: 0,3 mL/phút. Thể tích tiêm: 2 µL. Phát hiện: Đầu dò khối phổ MRM, ESI (+).

3.4.1.4. Khảo sát phương pháp xử lý mẫu

Phương pháp tủa protein: Hiệu suất chiết (H %) được trình bày trong Bảng 3.56.

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy phương pháp xử lý mẫu bằng cách tủa protein cho hiệu suất chiết của hypophyllanthin lớn hơn 110 %. Điều này chứng tỏ

phương pháp tua gây nên sự ảnh hưởng nền mẫu (matrix effect) theo kiểu tăng cường ion (ion enhancement). Do vậy, phương pháp tua không phù hợp để xử lý mẫu.

Bảng 3.56. Hiệu suất chiết các chất từ huyết tương thử với 2 dung môi tua (n = 6)

Mẫu	H % – Tua với methanol				H % - Tua với acetonitril			
	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ
1	109,49	135,62	118,95	111,18	92,66	126,11	99,00	95,60
2	109,00	129,36	112,70	108,02	97,72	130,48	99,04	90,23
3	106,82	123,99	116,72	111,35	100,96	133,93	97,70	96,29
4	110,82	129,07	118,20	106,26	91,28	126,09	96,93	93,98
5	104,70	129,91	108,37	106,04	95,81	129,09	98,09	86,78
6	100,70	136,91	128,37	110,04	101,49	119,13	93,82	93,66
TB	106,92	130,81	117,22	108,81	96,65	127,47	97,43	92,76
RSD %	3,50	3,63	5,75	2,19	4,36	3,95	1,99	3,89

Phương pháp chiết lỏng – lỏng

Khảo sát dung môi chiết: Kết quả khảo sát dung môi chiết được trình bày ở Bảng 3.57.

Bảng 3.57. Kết quả khảo sát dung môi chiết (n = 6)

Dung môi chiết		Hiệu suất chiết (%)			
		PLT	HPL	NRT	DAZ
<i>tert</i> -Butyl methyl ether	Trung bình	66,06	66,42	70,14	68,25
	RSD (%)	1,58	5,56	1,53	5,34
Ethyl acetat	Trung bình	81,87	70,63	90,10	79,01
	RSD (%)	12,06	16,37	12,84	18,42
<i>n</i> -Hexan	Trung bình	91,87	92,24	95,69	85,74
	RSD (%)	2,80	1,71	1,28	1,31

Nhận xét: Các dung môi chiết khảo sát đều chiết được các chất phân tích với hiệu suất khác nhau. Trong đó, khi chiết bằng *n*-hexan cho hiệu suất chiết cao hơn hẳn so với khi chiết bằng *t*-butyl methyl ether và ethyl acetat. Hơn nữa, khi chiết bằng ethyl acetat thì hiệu suất chiết không ổn định (RSD > 10 %). Do đó, *n*-hexan được chọn lựa để làm dung môi chiết lỏng - lỏng.

Khảo sát thể tích dung môi chiết: Tiến hành chiết một lần để khảo sát thể tích dung môi chiết với dung môi và điều kiện đã chọn (n = 6) để tính hiệu suất chiết. Bảng 3.58 tóm tắt kết quả khảo sát thể tích dung môi chiết *n*-hexan.

Nhận xét: Khi thể tích dung môi chiết càng tăng dần từ 2-3,5 mL thì hiệu suất chiết cũng tăng dần theo, tuy nhiên thể tích dung môi chiết từ 3 mL trở lên không có

sự khác biệt đáng kể về hiệu suất chiết. Do đó, thể tích 2,5 mL dung môi n-hexan dùng để chiết là phù hợp.

Bảng 3.58. Kết quả khảo sát thể tích dung môi chiết n-hexan (n = 6)

Thể tích dung môi chiết (mL)		Hiệu suất chiết (%)			
		PLT	HPL	NRT	DAZ
2	Trung bình	81,94	81,15	82,96	74,25
	RSD (%)	3,45	1,15	3,36	3,15
2,5	Trung bình	91,87	92,24	95,69	85,74
	RSD (%)	2,80	1,71	1,28	1,31
3	Trung bình	92,14	93,27	94,25	84,99
	RSD (%)	3,28	1,15	0,95	2,58
3,5	Trung bình	93,62	92,92	96,30	86,25
	RSD (%)	1,17	2,08	5,25	3,33

Khảo sát số lần chiết: Kết quả tóm tắt khảo sát số lần chiết với thể tích mỗi lần chiết là 2,5 mL n-hexan được trình bày ở Bảng 3.59.

Bảng 3.59. Kết quả khảo sát số lần chiết (n = 6)

Số lần chiết (lần)		Hiệu suất chiết (%)			
		PLT	HPL	NRT	DAZ
1	Trung bình	55,26	58,73	63,37	44,58
	RSD (%)	3,57	3,62	2,58	1,73
2	Trung bình	91,87	92,24	95,69	85,74
	RSD (%)	2,80	1,71	1,28	1,31
3	Trung bình	94,25	95,76	96,69	87,75
	RSD (%)	3,36	4,59	2,58	1,76

Nhận xét: Sau 2 lần chiết, hiệu suất chiết của hầu hết các chất đều trên 85%. Không có sự khác biệt đáng kể giữa chiết 2 lần và 3 lần nên số lần chiết được chọn là 2.

Từ các kết quả khảo sát, quy trình xử lý mẫu huyết tương thử được đề xuất như sau: Lấy chính xác 200 μ L huyết tương thử có chứa các chất phân tích cho vào ống nghiệm. Thêm 10 μ L dung dịch chuẩn nội diazepam nồng độ 1000 ng/mL trong methanol, lắc 10 giây. Chiết 2 lần với n-hexan, mỗi lần 2,5 mL, lắc xoáy 1 phút, lắc 300 vòng/phút trong 5 phút, ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, lấy dịch trong, gộp dịch chiết và bốc hơi dung môi tới cân bằng khí nitơ ở 40 °C. Hòa tan cân trong 200 μ L methanol, lắc xoáy 1 phút, siêu âm 5 phút, ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ 0 °C, lọc qua màng lọc 0,22 μ m.

3.4.1.5. Xác định khoảng nồng độ định lượng

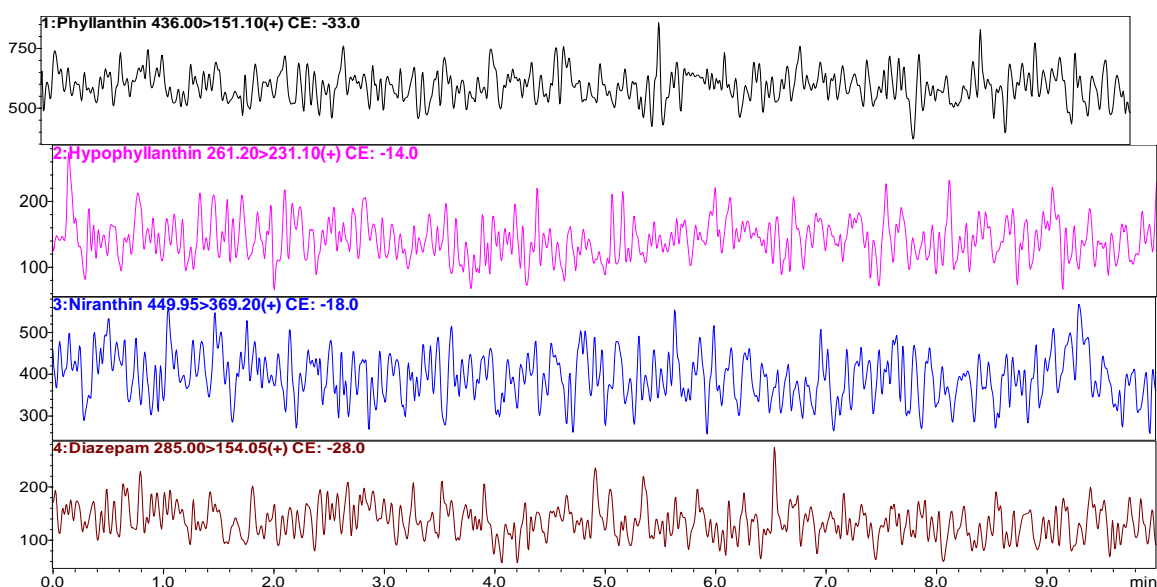
Các kết quả thăm dò và xây dựng phương pháp sắc ký cho phép xây dựng được khoảng nồng độ định lượng các hoạt chất, được trình bày trong Bảng 3.60. Ngoài ra, để đáp ứng phần yêu cầu tính tuyến tính và đặc hiệu, cần chuẩn bị thêm mẫu trắng và mẫu không. Trong đó, mẫu trắng là mẫu không có chuẩn nội còn mẫu không là mẫu được thêm chuẩn nội.

Bảng 3.60. Nồng độ của các hoạt chất trong huyết tương thỏ

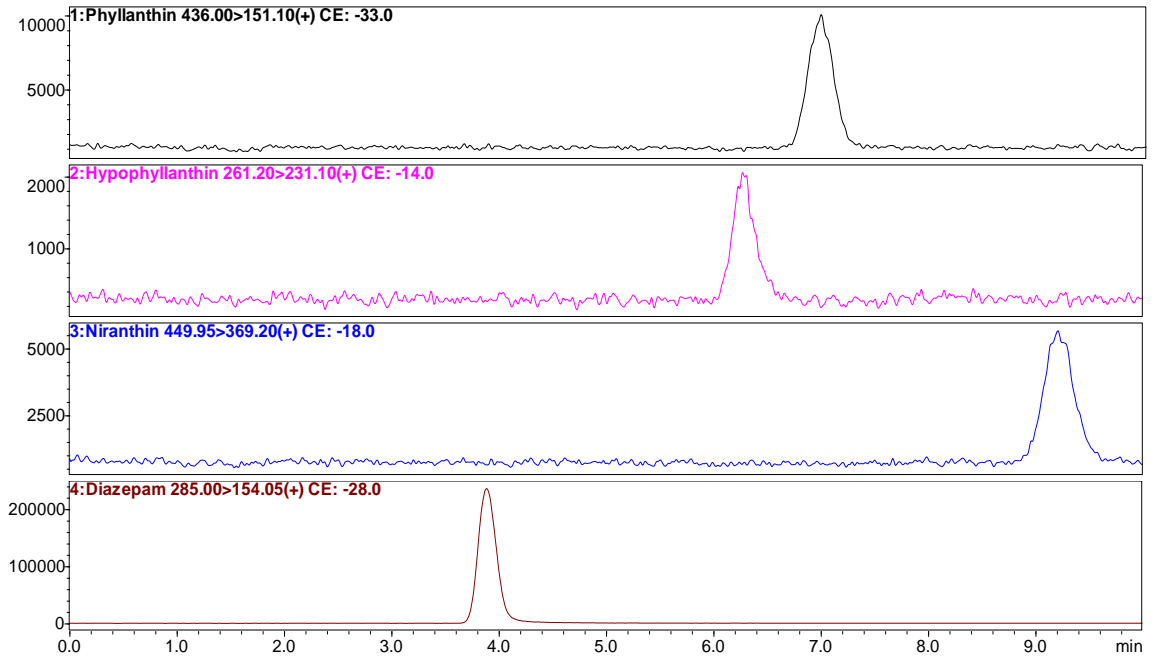
Chất	Nồng độ các hoạt chất trong huyết tương (ng/mL)										
	S-1 (LLOQ)	S-2	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	LQC	MQC	HQC
PLT	0,1	0,2	0,5	1	5	10	20	50	0,3	25	40
HPL	0,1	0,2	0,5	1	5	10	20	50	0,3	25	40
NRT	0,1	0,2	0,5	1	5	10	20	50	0,3	25	40
IS	50										

3.4.1.6. Thẩm định quy trình phân tích

Kết quả tóm tắt thẩm định quy trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin trong huyết tương thỏ bằng kỹ thuật LC-MS/MS theo hướng dẫn của US-FDA, EMA và ĐBVN V được trình bày ở Bảng 3.61. Hình 3.39 minh họa sắc ký đồ huyết tương trắng. Hình 3.41. minh họa sắc ký đồ mẫu giả lập chứa chất phân tích ở nồng độ LLOQ.

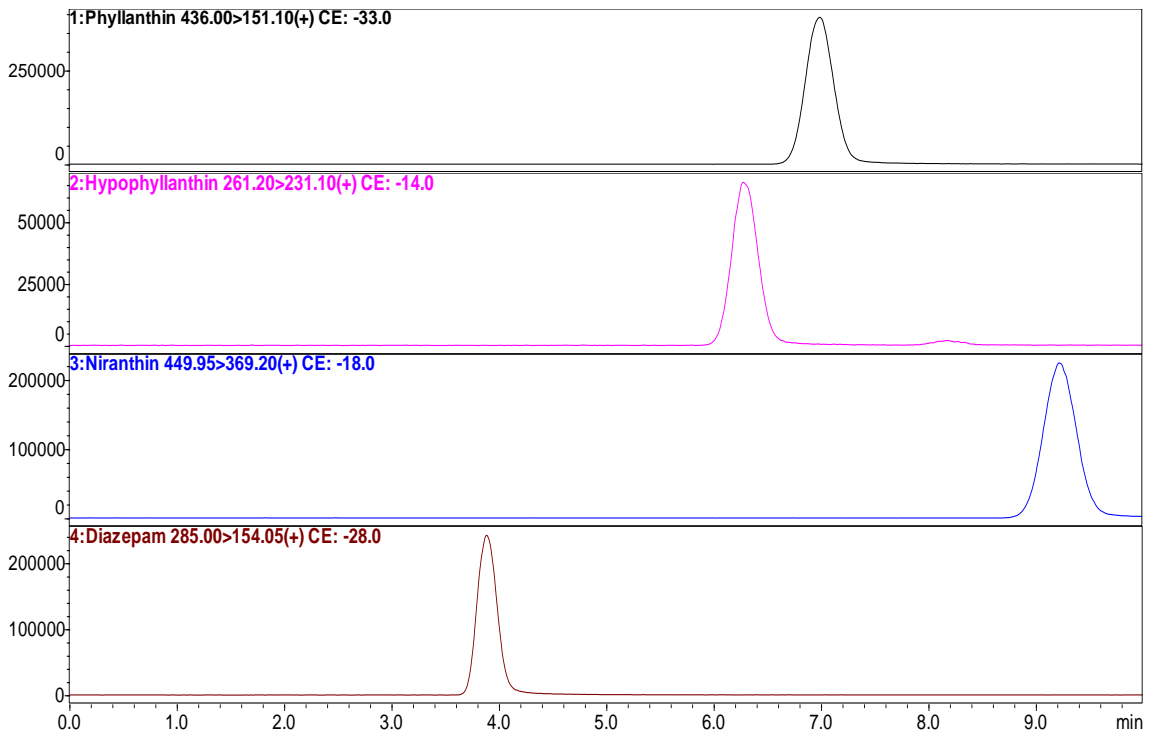


Hình 3.39. Sắc ký đồ mẫu huyết tương trắng

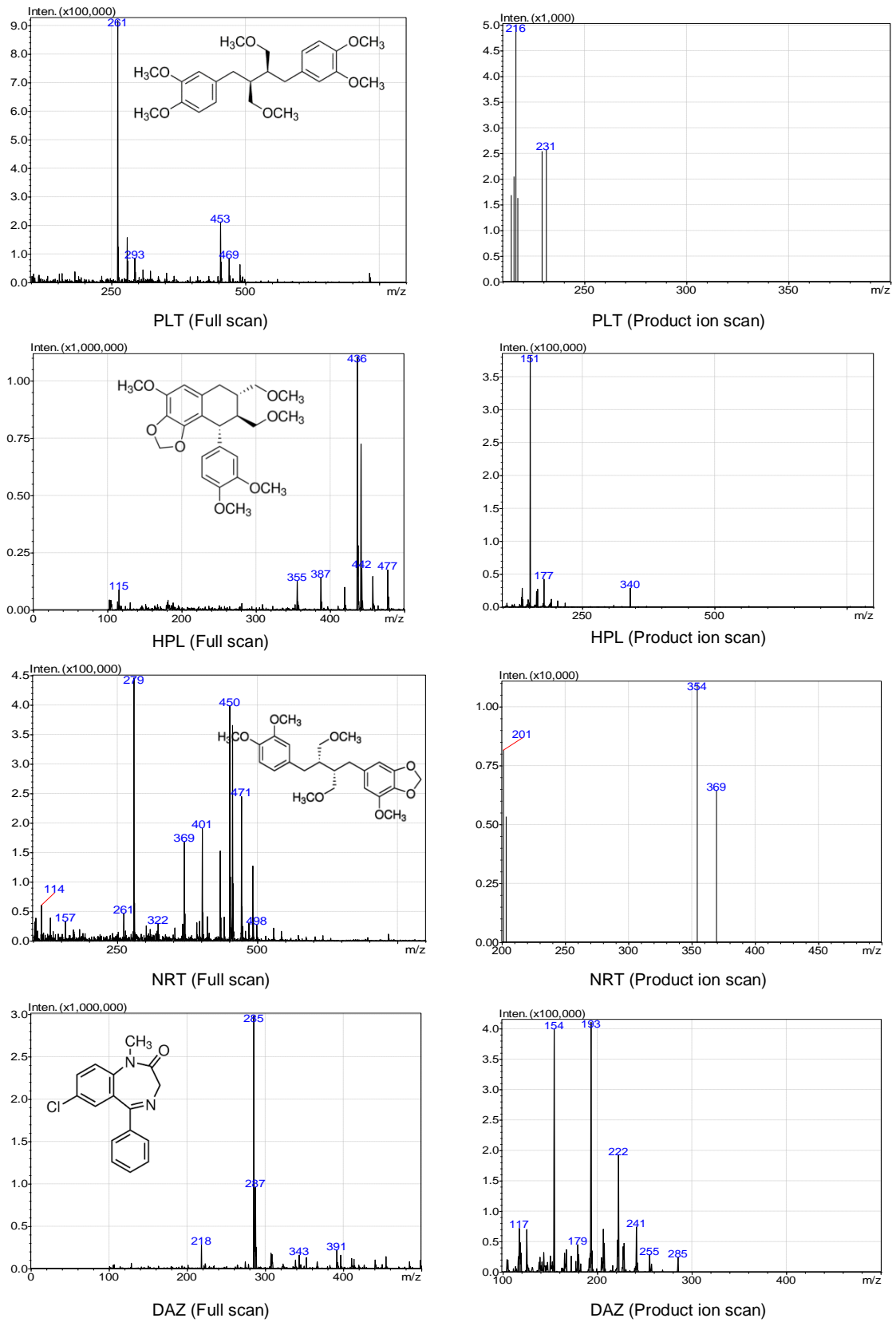


Hình 3.40. Sắc ký đồ mẫu huyết tương giả lập ở nồng độ LLOQ

Hình 3.40 minh họa sắc ký đồ mẫu huyết tương ở nồng độ 25 ng/mL (với PLT, HPL, NRT và IS).



Hình 3.41. Sắc ký đồ mẫu huyết tương ở nồng độ MQC



Hình 3.42. Công thức phân tử và phổ khối (ion phân tử và ion phân mảnh) của PLT, HPL, NRT và IS ở cùng nồng độ 1 $\mu\text{g/mL}$.

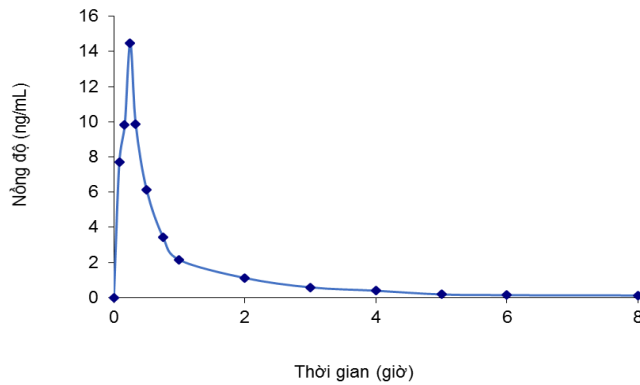
Bảng 3.61. Tóm tắt kết quả thẩm định phương pháp

STT	Chỉ tiêu	Kết quả
1	Tính đặc hiệu (n = 6)	Mẫu LLOQ có các pic PLT (6,735 phút), HPL (6,145 phút), NRT (9,048 phút) và IS (3,813 phút). Mẫu huyết tương trắng không xuất hiện pic tại thời gian lưu của PLT, HPL, NRT và IS. Tín hiệu đáp ứng của mẫu trắng tại thời điểm trùng với thời gian lưu của HPL, HPL và NRT không vượt quá 20 % tín hiệu đáp ứng của chất phân tích ở nồng độ LLOQ. Tín hiệu đáp ứng của mẫu trắng tại thời điểm trùng với thời gian lưu của chuẩn nội không vượt quá 5 % tín hiệu đáp ứng của chuẩn nội ở mẫu LLOQ.
2	Giới hạn định lượng dưới (n = 6)	Ở nồng độ 0,1 ng/mL (PLT, HPL và NRT) đều cho tỷ số S/N lớn hơn 5, đạt độ chính xác và độ đúng theo qui định, diện tích của chất phân tích lớn hơn 5 lần so với mẫu trắng tại cùng thời điểm, nồng độ này được chấp nhận là giới hạn định lượng dưới (LLOQ).
3	Đường chuẩn và khoảng tuyến tính (n = 10)	Phương trình hồi quy tuyến tính với trọng số $1/[nồng độ]^2 = 1/x^2$: - PLT (0,1-50 ng/mL): $y = 0,0630x + 0,0008$; $R^2 = 0,9923$ - HPL (0,1-50 ng/mL): $y = 0,01845x + 0,0021$; $R^2 = 0,9899$ - NRT (0,1-50 ng/mL): $y = 0,0528x + 0,0037$; $R^2 = 0,9920$
4	Độ đúng và độ chính xác trong ngày và khác ngày (n = 18)	Ở 4 mức nồng độ LLOQ, LQC, MQC và HQC: - PLT (85,59 % - 119,35 %; CV: 5,27 % - 10,96 %) - HPL (82,35 % - 118,66 %; CV: 5,97 % - 11,52 %) - NRT (85,41 % - 119,29 %; CV: 3,17 % - 11,57 %)
5	Hiệu suất chiết (n = 6)	Ở 3 mức nồng độ LQC, MQC và HQC: - PLT (89,48 % - 100,69 %; CV: 2,05 % - 4,53 %) - HPL (88,42 % - 102,04 %; CV: 1,56 % - 7,35 %) - NRT (99,36 % - 103,73 %; CV: 1,22 % - 4,55 %) - IS (93,79 % - 98,07 %; CV: 2,06 % - 5,20 %)
6	Độ ổn định (n = 6)	Dung dịch chuẩn gốc ổn định ở -20 °C trong ít nhất 30 ngày. Chất phân tích trong huyết tương ổn định ở nhiệt độ phòng 25 °C trong 6 giờ, buồng tiêm mẫu 5 °C trong 24 giờ, sau 3 chu kỳ đông - rã đông và ở -70 °C trong vòng 30 ngày.
7	Ảnh hưởng nền mẫu (n = 6)	Giá trị 'IS-normalized matrix factor' của PLT, HPL, NRT ở mức nồng độ LQC và HQC có giá trị CV lần lượt là 3,57 % - 7,64 %; 3,07 % - 12,18 %; 3,32 % - 8,57 %. Phương pháp phân tích có bị ảnh hưởng bởi nền mẫu nhưng vẫn nằm trong mức cho phép.
8	Lượng mẫu tồn dư (n = 6)	Tiêm lặp lại 6 lần mẫu có nồng độ cao nhất (ULOQ) và mẫu trắng, sau đó tiêm 6 lần mẫu có nồng độ LLOQ. Kết quả cho thấy không có ảnh hưởng của lượng mẫu tồn dư đối với cả PLT, HPL, NRT và IS.
9	Hệ số pha loãng (n = 6)	Chuẩn bị 6 mẫu huyết tương ở nồng độ 50 ng/mL (với PLT, HPL và NRT). Pha loãng 2 lần bằng huyết tương trắng, sau đó xử lý mẫu và tiến hành phân tích. Kết quả độ đúng trung bình của PLT, HPL và NRT lần lượt là 97,46 %; 102,97 % và 103,82 % với giá trị CV lần lượt là 3,77 %; 5,22 % và 10,47 %. Vậy quy trình xử lý mẫu đã xây dựng không bị ảnh hưởng bởi sự pha loãng.

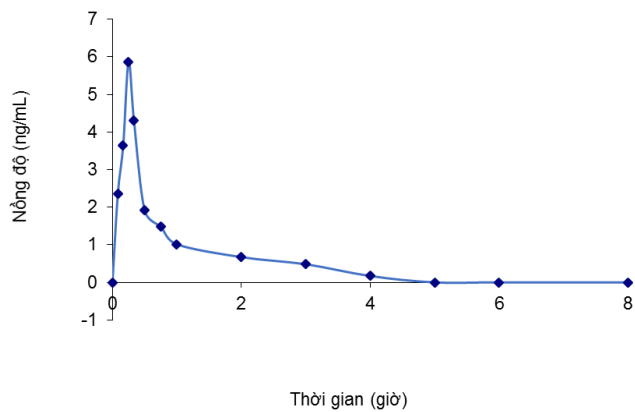
3.4.2. Đánh giá một số thông số dược động học của cao chuẩn hóa điều chế từ Diệp hạ châu đắng

Tiến hành phân tích mẫu huyết tương thử theo quy trình đã được thẩm định. Phân tích dược động học dựa trên các dữ liệu của 12 con. Kết quả nồng độ các chất phân tích phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và đồ thị biểu diễn nồng độ các chất theo thời gian của từng cá thể được trình bày ở Phụ lục 16. Đồ thị biểu diễn nồng độ chất trung bình theo thời gian được trình bày ở Hình 3.43, Hình 3.44, Hình 3.45.

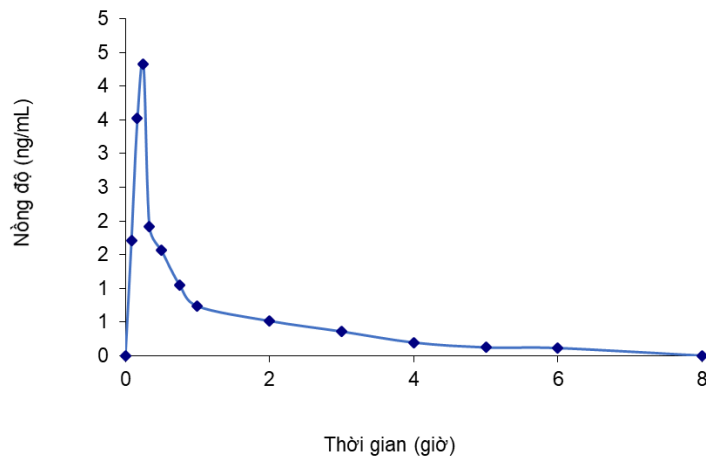
Từ nồng độ chất phân tích trong huyết tương ở các thời điểm, tính toán các thông số dược động học của từng cá thể và dược động học trung bình, kết quả được trình bày ở Bảng 3.62.



Hình 3.43. Đồ thị biểu diễn nồng độ phyllanthin trung bình theo thời gian



Hình 3.44. Đồ thị biểu diễn nồng độ hypophyllanthin trung bình theo thời gian



Hình 3.45. Đồ thị biểu diễn nồng độ niranthin trung bình theo thời gian

Bảng 3.62. Các thông số dược động học trung bình của các chất phân tích

Thông số	Phyllanthin (Trung bình \pm SD)	Hypophyllanthin (Trung bình \pm SD)	Niranthin (Trung bình \pm SD)
T_{max} (giờ)	0,24	0,26	0,24
C_{max} (ng/mL)	14,625 \pm 1,88	5,913 \pm 0,82	4,408 \pm 0,45
AUC_{0-t} (ng.giờ/mL)	9,694 \pm 0,71	4,172 \pm 0,39	3,135 \pm 0,24
$AUC_{0-\infty}$ (ng.giờ/mL)	10,150 \pm 0,61	4,503 \pm 0,42	3,497 \pm 0,38
$T_{1/2}$ (giờ)	1,78	1,17	1,41
$AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty}$ (%)	95,51	92,65	89,66

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP, TINH CHẾ VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC, ĐỘ TINH KHIẾT CỦA CÁC CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC

4.1.1. Chiết xuất, phân lập, tinh chế các chất phân lập được

Quy trình chiết xuất, phân lập các chất tinh khiết bắt đầu với việc thăm dò dung môi chiết nhằm chiết được chất cần phân lập. Căn cứ theo các tài liệu về hóa thực vật, các chất chuyển hóa cấp 2 trong Diệp hạ châu thuộc nhóm phân cực trung bình. Các hợp chất trong Diệp hạ châu bao gồm lignan, flavonoid, tannin (ellagitannin), polyphenol, triterpen, sterol và alkaloid [83]. Đặc biệt, hợp chất phenol lignan trong Diệp hạ châu là phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin, nirtetralin và phyltetralin, là các chất ở dạng aglycon, có tính bảo vệ gan và chống ung thư. Dung môi sử dụng cho chiết xuất với bộ phận dùng trên mặt đất của Diệp hạ châu đáng có độ phân cực trung bình thì mới loại được thành phần chlorophyl.

Phương pháp chiết xuất sử dụng thường quy trong phòng thí nghiệm là phương pháp ngâm. Phương pháp này đơn giản và tránh được nhiều tạp tuy thời gian lâu hơn phương pháp chiết xuất khác. Một số công trình nghiên cứu cũng đã dùng phương pháp ngâm với các dung môi như n-hexan, ethyl acetat, methanol, ethanol để phân lập các lignan [27], [29], [50], [54], [67], [74], [92].

Việc thăm dò chiết cao toàn phần với các loại dung môi có độ phân cực tăng dần khảo sát là dicloromethan, cloroform, aceton, ethyl acetat, ethanol 96 % và ethanol 70 %, kết quả dung môi dicloromethan được lựa chọn. Chiết bằng dung môi ethanol 70 % và cloroform cho khối lượng cao chiết cao hơn. Tuy nhiên, khối lượng cao thu được không phản ánh đầy đủ hiệu suất chiết xuất chất cần nghiên cứu. Trong số các dung môi khảo sát, chiết bằng dung môi dicloromethan, cloroform, ethyl acetat và ethanol 90 % cho SKLM rõ nét hơn, nhưng dung môi cloroform độc hơn. Vì thế, chọn dung môi dicloromethan, ethyl acetat và ethanol 90 % để khảo sát tiếp theo trên sắc ký cột. Khi khảo sát bằng SKLM, cao dicloromethan cho các vết tách khá rõ, hiệu suất chiết cao và ít độc hơn so với cloroform. Khi khảo sát bằng sắc ký cột thì cao dicloromethan có nhiều vết phân đoạn hơn và tách nhau rõ ràng so với cao ethyl acetat và cao ethanol 96 %. Cột sắc ký cao ethanol 96 % có một phân đoạn chứa hợp chất

màu vàng ra theo cùng nhiều phân đoạn khác, sẽ gây khó khăn cho quá trình tinh chế sau này. Vì vậy, dùng cao chiết bằng dung môi ethyl acetat hoặc dicloromethan để tiến hành sắc ký cột ở quy mô lớn hơn nhưng hiệu suất chiết cao toàn phần bằng ethyl acetat thấp hơn dicloromethan. Mặt khác, để xác định chính xác hơn khả năng chiết xuất chất cần nghiên cứu, tiến hành định lượng bằng HPLC, kết quả cho thấy lượng phyllanthin và hypophyllanthin chiết được cao hơn hai dung môi ethyl acetat và ethanol 96 %. Việc sử dụng dung môi dicloromethan từ 1000 g dược liệu, thu được 60 g cao dicloromethan với hiệu suất 6 % so với nghiên cứu trước đây sử dụng ethanol 96 % với hiệu suất chiết là 12 % từ 10 kg dược liệu [3]. Hiệu suất chiết thấp hơn có thể do ít phân phân cực hơn vì dung môi dicloromethan hòa tan các chất phân cực trung bình và loại đi các hợp chất phân cực.

Việc phân lập được tiến hành dựa trên sắc ký cột để tách các phân đoạn và các chất tinh khiết. Tuy nhiên, khi phân lập các chất có độ phân cực tương tự nhau bằng sắc ký cột với silica gel sẽ gặp khó khăn. Trong trường hợp này, phương pháp thường dùng là sắc ký pha đảo C8 hay C18 với hệ dung môi phân cực trên hệ thống bơm tạo áp suất trung bình hay áp suất cao.

Khi tách các phân đoạn bằng sắc ký cột, phương pháp chọn hệ dung môi càng đơn giản càng tốt, chỉ nên gồm hai thành phần và các vết có di chuyển, tách rõ, không kéo vệt dài. Tiếp theo công trình nghiên cứu của nhóm tác giả Lữ Thị Kim Chi, Nguyễn Ngọc Vinh [3], sử dụng hệ dung môi rửa giải là n-hexan – ethyl acetat với độ phân cực tăng dần và điều chỉnh tỉ lệ thay đổi từ (100 : 0) đến (80 : 20) thu được 13 phân đoạn, trong đó phân đoạn IV có một vết chính và hai vết phụ, phân đoạn VII có hai vết chính, phân đoạn X có một vết chính màu đỏ nâu, phân đoạn XII có hai vết chính và phân đoạn XIII có một vết chính màu xanh. Số phân đoạn thu được nhiều hơn số phân đoạn của nhóm tác giả trên, điều này có thể giúp cho việc tách các chất cần phân lập được thuận lợi hơn.

Nhằm loại tạp và tinh khiết hóa các hợp chất phân lập, các phương pháp tinh chế đã được sử dụng. Phương pháp đơn giản là kết tinh lại trong dung môi thích hợp. Phương pháp này cần có thời gian thăm dò dung môi và chỉ áp dụng với chất kết tinh. Một phương pháp khác được áp dụng là tủa trong dung môi nhờ sự khác biệt về tính

tan của chất cần phân lập với các tạp. Phương pháp khác cũng được áp dụng là dùng sắc ký điều chế, phương pháp này với đầu dò có thể tách các chất ra nhanh chóng tùy nhiên lượng mẫu nạp không nhiều.

Với kỹ thuật sắc ký cột, thu được hợp chất PA₁ (10 mg) từ phân đoạn IV. Với kỹ thuật sắc ký điều chế trên cột pha thuận của phân đoạn VII tách được hai hợp chất PA₂ và PA₃; trên cột pha đảo của phân đoạn XII tách được hai hợp chất PA₅ và PA₆. Kết tinh lại sau khi sắc ký cột cổ điển thu được hợp chất PA₄ từ phân đoạn X và hợp chất PA₇ từ phân đoạn XIII. Các hợp chất PA₂, PA₃, PA₄, PA₅ và PA₆ có độ tinh khiết sau phân lập cao từ 95,07 % - 99,76 %. Với độ tinh khiết này, việc xác định cấu trúc dễ dàng hơn. Lượng mẫu PA₁ tách được không nhiều (10 mg) và độ tinh khiết không cao (89,24 %), do đó chưa tiến hành xác định cấu trúc và các thử nghiệm khác.

4.1.2. Xác định cấu trúc, độ tinh khiết các chất phân lập được

Biện luận cấu trúc phyllanthin

Công thức phân tử của PA₆ là C₂₄H₃₄O₆ với độ bất bão hòa $\omega = 8$. Công thức nguyên với 24 C trong khi đó phổ DEPT cho 12 tín hiệu C chứng tỏ trong công thức có sự đối xứng. Trong các tín hiệu DEPT có các 6 tín hiệu olefin 111,6-148,4 ppm chứng tỏ trong cấu trúc có cấu tạo vòng. Ngoài ra có 3 tín hiệu -OCH₃ ở 55,2-58,1 ppm. Quan sát các tín hiệu proton trường thấp 6,53-6,81 ppm là proton sp². Ngoài ra có 3 tín hiệu *singlet* ở 3,21-3,71 ppm là các proton sp³ của nhóm -OCH₃. Quan sát các tín hiệu này trên HMBC cho thấy có 2 tín hiệu tương quan với trường thấp (146,9-148,5 ppm) chứng tỏ có 2 nhóm -OCH₃ gắn trên nhân thơm và 1 tín hiệu tương quan với 72,1 ppm chứng tỏ 1 nhóm OCH₃ gắn trên dây nhánh. Ngoài ra, trên phổ ¹³C-NMR có các tín hiệu 34,1-39,8 ppm là tín hiệu C dây nhánh. Dựa vào MS, độ bất bão hòa, tính đối xứng, các tín hiệu quan sát trên NMR và so sánh dữ liệu phổ với các dữ liệu, việc xác định cấu trúc PA₆ là phyllanthin là hoàn toàn phù hợp.

Biện luận cấu trúc hypophyllanthin

Công thức phân tử của PA₄ là C₂₄H₃₀O₇ tương ứng với độ bất bão hòa $\omega = 10$. Quan sát trên phổ DEPT có 24 tín hiệu C chứng tỏ công thức PA₄ không có tính đối xứng như PA₆. Quan sát trên phổ ¹³C-NMR có 12 tín hiệu trường thấp 106,5-148,6

ppm chứng tỏ trong công thức có 2 vòng thơm, với độ bất bão hòa là 10, công thức PA₄ còn có thêm 2 vòng nữa. Hơn nữa, phổ ¹³C-NMR có 5 tín hiệu –OCH₃ ở 55,8-58,9 ppm tương ứng với 5 tín hiệu *singlet* của proton sp³ ở 3,31-3,85 ppm. Có 3 proton này tương quan HMBC với các carbon olefin chứng tỏ chúng được gắn trên vòng thơm, các tín hiệu còn lại thuộc dây nhánh. Trên phổ ¹³C-NMR có cho thấy tín hiệu carbon acetal với 101,1 ppm. Có 2 tín hiệu carbinol được quan sát ở 71,8 ppm và 75,8 ppm. Dây nhánh được xác định với các tín hiệu ¹³C-NMR với độ dịch chuyển 33,3-45,4 ppm. Có 4 tín hiệu proton 6,31-6,72 ppm được ghi nhận trên ¹H-NMR. Tổng hợp các dữ liệu MS, độ bất bão hòa, NMR và các tài liệu công bố, PA₄ được xác định là hypophyllanthin là hoàn toàn phù hợp.

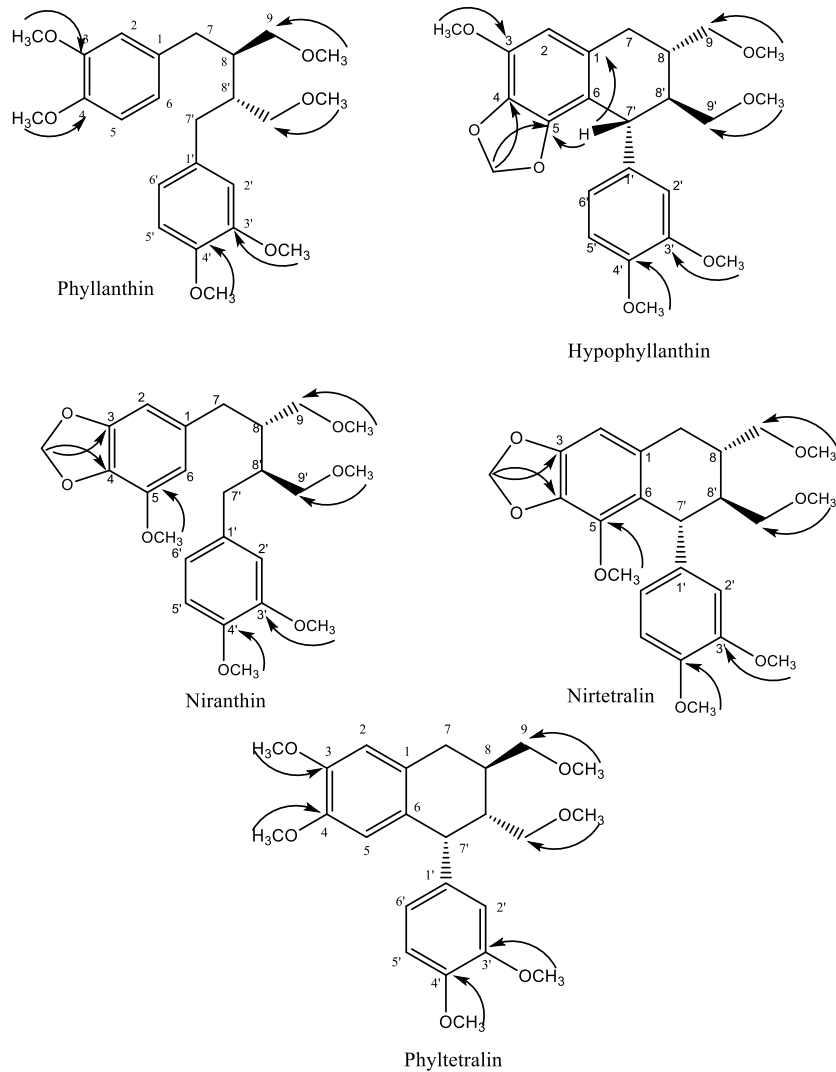
Biện luận cấu trúc phyltetralin

Công thức phân tử của PA₅ là C₂₄H₃₂O₆ tương ứng với độ bất bão hòa $\omega = 9$. Việc giảm đi 1 oxy của PA₅ so với niranthin và độ bất bão hòa cũng tương tự như niranthin số vòng hay nối đôi cũng tương tự như niranthin. Việc mất đi 1 tín hiệu proton *singlet* của proton sp³ ở vùng 3,31-3,85 ppm chứng tỏ khả năng mất 1 nhóm –OCH₃. Ngoài ra, không tồn tại tín hiệu carbon acetal ở 101,3 ppm chứng tỏ vòng 5 của niranthin bị mở và để đảm bảo độ bất bão hòa là 9 thì tồn tại vòng 6 cạnh trong công thức hypophyllanthin, trong khi đó các tín hiệu carbon olefin vẫn nguyên vẹn. Kết hợp với các dữ liệu phổ MS, NMR, PA₅ được xác định phyltetralin là hoàn toàn phù hợp.

Biện luận cấu trúc nirtetralin

Nirtetralin có công thức phân tử C₂₄H₃₀O₇ là đồng phân của hợp chất hypophyllanthin. Việc phân biệt hai chất này dựa vào quan sát tương quan HMBC. Proton của nhóm –OCH₃ của hypophyllanthin có tương quan với carbon trong vòng dioxolan và C₁ có độ dịch chuyển lớn hơn proton –OCH₃ của nirtetralin cũng có tương quan với vòng dioxolan nhưng có tương quan với C₇ có độ dịch chuyển thấp hơn. Nirtetralin có tác dụng anti-HBsAg tốt nhất trong thử nghiệm thăm dò tác dụng của 25 thành phần phân lập từ các loài *Phyllanthus* trên virus viêm gan B.

So sánh cấu trúc các hợp chất phân lập được



Hình 4.1. Cấu trúc hóa học các lignan phân lập được

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$

Về cấu trúc các lignan có các đặc điểm chung là nhân benzen với các độ dịch chuyển từ 106-150 ppm. Các nhóm $-\text{OCH}_3$ với độ dịch chuyển từ 55-59 ppm. Khi có tín hiệu khoảng 101 ppm cho thấy có sự hiện diện của vòng 1,3-dioxolan. Các tín hiệu khác có giá trị từ 33-42 ppm.

Phổ $^1\text{H-NMR}$

Quan sát phổ $^1\text{H-NMR}$, các lignan có các tín hiệu proton olefin với độ dịch chuyển từ 6,3-6,9 ppm. Các proton nhóm $-\text{OCH}_3$ có độ dịch chuyển 3,2-3,7 ppm và là những tín hiệu singlet. Các tín hiệu còn lại khoảng 1,9-3,3 ppm.

Phân biệt hợp chất hypophyllanthin và nirtetralin

Hai hợp chất này là đồng phân vị trí của $-OCH_3$ và vòng 1,3-dioxolan. Việc phân biệt hai đồng phân này dựa theo quan sát HMBC của nhóm $-OCH_3$ ở vị trí 3 đối với hypophyllanthin. Trong luận án này, proton của nhóm này có tương quan với 2 và 1 nên hợp chất thu được là hypophyllanthin.

4.2. XÁC ĐỊNH CHẤT LƯỢNG VÀ THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU

Từ 60 g cao dicloromethan chiết từ 1 kg bột Diệp hạ châu đắng, sau khi phân lập thu được 1730 mg chất PA₆ xác định là phyllanthin, 400 mg chất PA₄ xác định là hypophyllanthin, 190 mg chất PA₂ xác định là niranthin, 250 mg chất PA₃ xác định là nirtetralin và 60 mg chất PA₅ xác định là phyltetralin. Quy trình chiết xuất, phân lập thu được các hợp chất được xác định là thành phần lignan chính trong Diệp hạ châu đắng. Phyllanthin và hypophyllanthin được phân lập sau khi triển khai qua cột và kết tinh trong ethanol tuyệt đối. Niranthin, nirtetralin và phyltetralin được phân lập bằng sắc ký điều chế sau khi triển khai qua sắc ký cột. Các hợp chất lignan chính phân lập được đều có độ tinh khiết sắc ký lớn hơn 95 %, đáp ứng yêu cầu dùng làm chất đối chiếu.

Kết quả nghiên cứu cũng cho thấy quy trình phân lập phyllanthin được cải tiến hơn, có hiệu suất cao hơn nhiều so với các công bố trong nước trước đây từ 10 kg bột dược liệu thu được 30 mg phyllanthin [8] và từ 9 kg bột dược liệu thu được 890 mg phyllanthin [3]. Kassuya và cộng sự đã phân lập đồng thời 5 lignan: nirtetralin, niranthin, hypophyllanthin, phyltetralin và phyllanthin từ dịch chiết cao n-hexan của *Phyllanthus amarus* nhưng chỉ xác định các chất phân lập bằng SKLM, chưa xác định độ tinh khiết các chất phân lập được [40].

Trong nội dung nghiên cứu, đề tài vẫn tiến hành phân lập và xác định cấu trúc hợp chất phyllanthin do là chất điểm chỉ chính trong Diệp hạ châu đắng nhưng không đánh giá chất đối chiếu vì nhóm tác giả Lữ Thị Kim Chi, Nguyễn Ngọc Vinh [3] đã thiết lập chất chuẩn phyllanthin và Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh đã thương mại hóa trên thị trường. Dựa vào khối lượng chất tinh khiết phân lập được, hypophyllanthin và niranthin được thiết lập dùng làm chất đối chiếu và đánh giá chất lượng so sánh liên phòng bởi 3 phòng thí nghiệm đạt GLP, ISO 17025. Ngoài ra, do

lượng nirtetralin phân lập được không nhiều và giá thành chất chuẩn nirtetralin thương mại rất cao (hơn 500 USD/ 1 mg) nên chỉ xác định độ tinh khiết sắc ký bởi 2 phòng thí nghiệm để có thể dùng làm chất đối chiếu trong phạm vi nội dung nghiên cứu của đề tài cho phần khảo sát qui trình định lượng đồng thời bốn lignan phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin trong Diệp hạ châu đắng. Lượng phyltetralin phân lập được ít (60 mg) và độ tinh khiết đạt 95,07 % nên chưa khảo sát tiếp theo. So với mục tiêu nghiên cứu thì đề tài đã đạt được thiết lập hypophyllanthin và niranthin dùng làm chất đối chiếu.

Với kết quả của qui trình chiết xuất, phân lập này, các hợp chất phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin có thể thu nhanh với lượng lớn một cách hiệu quả, đạt độ tinh khiết cao ($\geq 97\%$) và có thể thiết lập dùng làm chất đối chiếu. Bên cạnh đó, các hợp chất nirtetralin và phyltetralin cũng có thể được phân lập dùng làm chất đối chiếu. Qua đó, kết quả nghiên cứu của luận án đã đóng góp rất lớn, giúp cho các nhà nghiên cứu có thể phân lập các hợp chất lignan chính trong Diệp hạ châu đắng gồm phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin, nirtetralin và phyltetralin tinh khiết dùng để thiết lập chất chuẩn thuận lợi hơn. Và cho đến nay, chưa thấy công trình nghiên cứu nào trên thế giới công bố chiết xuất, phân lập được 5 hợp chất lignan này đồng thời từ *Phyllanthus amarus* với lượng thu được chất tinh khiết lớn có thể dùng làm chất đối chiếu. Đồng thời, luận án cũng đã xây dựng đầy đủ bộ hồ sơ thiết lập chất đối chiếu hypophyllanthin và niranthin, bao gồm: Quy trình chiết xuất, phân lập chất đối chiếu từ cao Diệp hạ châu đắng và bộ dữ liệu phổ nghiệm của mỗi chất.

4.3. ĐIỀU CHẾ VÀ TIÊU CHUẨN HÓA CAO DIỆP HẠ CHÂU ĐẮNG

4.3.1. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan trong Diệp hạ châu đắng bằng phương pháp HPLC

Có nhiều công trình nghiên cứu phân tích các hợp chất lignan trong Diệp hạ châu đã công bố bằng nhiều phương pháp khác nhau như sắc ký lớp mỏng hiệu năng cao (HPTLC), sắc ký khí (GC), sắc ký khí khối phổ (GC-MS), sắc ký lỏng hiệu năng cao với đầu dò tử ngoại (HPLC-UV), đầu dò huỳnh quang (HPLC-FL), đầu dò điện hóa (HPLC-ECD) và sắc ký lỏng hiệu năng cao khối phổ (HPLC-MS).

Nhiều phương pháp HPTLC cũng được dùng để định lượng đồng thời phyllanthin và hypophyllanthin. Tuy nhiên, phương pháp HPTLC có những hạn chế, chẳng hạn như khả năng phân giải phyllanthin kém với các lignan khác, thiếu độ tái lập và hiệu quả về chi phí, độ đặc hiệu thấp để định lượng lignan chính, phyllanthin [22]. Phương pháp HPLC đầu dò huỳnh quang và đầu dò UV cũng được dùng tuy nhiên không đạt độ phân giải giữa phyllanthin và hypophyllanthin. Mặt khác, các phương pháp GC-MS và HPLC-MS có độ nhạy và độ tin cậy cao. Tuy nhiên, những thiết bị phân tích này rất đắt tiền cho nên tính sẵn có cũng hạn chế. Do đó, cần có sự phát triển của các phương pháp khác đơn giản và đáng tin cậy để phân tích đồng thời các lignan.

Đối với phương pháp HPLC thì đa số các nghiên cứu đã công bố định lượng phyllanthin, hypophyllanthin trên cột pha đảo C8 hoặc C18 với pha động có thể chứa methanol/ acetonitril – nước/ acid phosphoric 0,1 %/ đệm phosphat pH 2,8 theo tỉ lệ đẳng dòng hoặc chương trình rửa giải gradient.

Tài liệu Herbal Medicines Compendium của USP đưa ra chuyên luận riêng dành cho *Phyllanthus amarus*, sử dụng phương pháp HPLC để định tính bằng cách so sánh thời gian lưu tương đối của hypophyllanthin, niranthin với phyllanthin trên sắc ký đồ và định lượng lignan dựa trên hàm lượng của hypophyllanthin và phyllanthin [98]. Trong đó, hàm lượng của hypophyllanthin được tính dựa vào hàm lượng phyllanthin với một hệ số chuyển đổi. Xét thấy việc xác định hàm lượng hypophyllanthin như vậy chưa chính xác vì với dược liệu có nguồn gốc khác nhau, điều kiện, dung môi chiết xuất khác nhau thì tỉ lệ hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin có thể không giống nhau.

Sau khi tiến hành sắc ký thực nghiệm trên cột sắc ký Luna C18 (25 cm x 4,6 mm; 5 μ m) theo quy trình USP, nhận thấy thời gian sắc ký dài, khả năng tách các pic không tốt và thời gian phân tích dài nên tiến hành xây dựng quy trình phân tích mới định lượng đồng thời phyllanthin và hypophyllanthin phù hợp với điều kiện sẵn có của phòng thí nghiệm.

Có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tách (R_s) và hình dạng pic (A_s) của một chất khi phân tích bằng kỹ thuật HPLC-PDA: Pha tĩnh, loại dung môi, tỉ lệ dung

môi của pha động, nhiệt độ cột, tốc độ dòng, bước sóng phát hiện, thể tích tiêm mẫu. Trong đó, tốc độ dòng, nhiệt độ cột, thể tích tiêm mẫu, bước sóng phát hiện ít ảnh hưởng đến hai thông số A_s và R_s trong phân tích. Qua nhiều khảo sát thực nghiệm thăm dò, các yếu tố ảnh hưởng dựa vào điều kiện sắc ký định lượng theo USP, nhận thấy tỉ lệ dung môi pha động đóng vai trò quan trọng đến cả R_s và A_s và thời gian phân tích.

Kỹ thuật HPLC-PDA trong nghiên cứu này giống với các nghiên cứu đã công bố. Tuy nhiên, điều kiện sắc ký được khảo sát cải tiến được khả năng phân tách các pic so với các điều kiện sắc ký đã công bố. Nghiên cứu này đã sử dụng cột pha đảo Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), pha động methanol – acid phosphoric 0,1 % với chương trình đẳng dòng (60 : 40), tốc độ dòng 1 mL/phút. Với điều kiện sắc ký này thì thời gian phân tích khoảng 40 phút giống theo USP nhưng có nhiều ưu điểm hơn là: sử dụng pha động không chứa hệ đệm có muối vô cơ (KH_2PO_4) giúp hạn chế nhiễm bẩn cột nên có thể tiêm được nhiều mẫu và giúp bảo vệ cột phân tích, kéo dài tuổi thọ cột; tốc độ dòng ít hơn nên lượng dung môi trong pha động tiêu thụ ít hơn; và giá thành methanol thấp hơn 4 lần so với acetonitril nên kinh tế hơn so với USP. Phương pháp này được thẩm định đạt các yêu cầu thông số của quy trình định lượng: tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ lặp lại (độ chính xác) và độ đúng. Mặt khác, điều kiện sắc ký theo DĐVN V có pha động theo chương trình dung môi (gradient) nên ít ổn định đường nền sắc ký khi phân tích và có thể ảnh hưởng đến kết quả định lượng hoạt chất. Vì vậy, điều kiện sắc ký của phương pháp đã chọn thích hợp, ứng dụng dễ dàng, nhanh chóng hơn và định lượng đồng thời phyllanthin và hypophyllanthin so với DĐVN V.

Như đã biết, ngoài phyllanthin, hypophyllanthin thì niranthin và nirtetralin cũng là thành phần lignan chính trong cây Diệp hạ châu đắng. Do đó, tiến hành định tính, định lượng thêm niranthin và nirtetralin cùng với phyllanthin, hypophyllanthin. Tiến hành bằng phương pháp HPLC để định tính và định lượng đồng thời 4 lignan phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin dựa vào các chất đối chiếu của mỗi lignan. Dựa theo điều kiện sắc ký của phương pháp định lượng đồng thời phyllanthin và hypophyllanthin đã xây dựng, tiếp tục khảo sát tỉ lệ dung môi pha động

đề 4 lignan phân tách rõ ràng. Với việc điều chỉnh tỉ lệ dung môi pha động thành (56 : 44) thì 4 lignan tách rõ ràng và hệ số bất đối đạt yêu cầu. Thứ tự rửa giải và thời gian lưu của hypophyllanthin, phyllanthin, nirtetralin và niranthin lần lượt là 24,0; 26,5; 35,5 và 39,9 phút. Phương pháp HPLC với đầu dò PDA có thể xác định được pic của 4 lignan chính này trong Diệp hạ châu đẳng dựa vào thời gian lưu cùng với so sánh phổ UV của pic tương ứng với chất chuẩn. Kết quả thẩm định quy trình định lượng đồng thời 4 lignan cho thấy quy trình có tính đặc hiệu cao, hệ số tương quan $r = 1,0000$ trong khoảng nồng độ khảo sát và đạt yêu cầu về độ chính xác $RSD \leq 2\%$ và độ đúng trong giới hạn 95% - 105% đối với phân tích định lượng hoạt chất có hàm lượng thấp trong tự nhiên. Kết quả thẩm định này chứng tỏ rằng qui trình chuẩn bị mẫu thử là ổn định, các chất phân tích hầu như không bị mất đi nhiều trong quá trình xử lý mẫu.

Bên cạnh đó, định tính và định lượng đồng thời 4 lignan phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin chỉ có nhóm tác giả Srivastava V. và cộng sự triển khai bằng phương pháp HPTLC sử dụng bản mỏng bất đối [92]. Tuy nhiên, phương pháp HPTLC có những hạn chế, chẳng hạn như khả năng phân giải giữa các chất lignan kém, thiếu độ tái lập và độ đặc hiệu thấp để định lượng lignan chính. Cho đến nay, quy trình định lượng đồng thời 4 lignan phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin trong Diệp hạ châu đẳng bằng phương pháp HPLC-PDA trong luận án vẫn chưa được công bố bởi tài liệu nào.

4.3.2. Điều chế cao khô Diệp hạ châu đẳng

Hiện nay, một số công ty dược phẩm đã sản xuất chế phẩm từ cây Diệp hạ châu đẳng dưới dạng bào chế viên nang, viên nén bao phim, viên nén bao đường mà khối lượng thành phần nguyên liệu, là cao chiết từ cây Diệp hạ châu đẳng *Phyllanthus amarus*, trong công thức bào chế ở mỗi sản phẩm khác nhau tùy nhà sản xuất. Mặt khác, tiêu chuẩn cơ sở của các chế phẩm này chưa đánh giá mức chất lượng cho chỉ tiêu định lượng theo một cách chung, có sản phẩm yêu cầu chỉ định lượng hàm lượng phyllanthin. Mục đích của đề tài là nghiên cứu một cách hệ thống điều chế cao chuẩn hóa Diệp hạ châu đẳng có hàm lượng hoạt chất cao giúp giảm khối lượng của thành phẩm chứa cao. Do đó, việc đánh giá và lựa chọn các thông số quy trình dựa trên hàm

lượng phần trăm trong cao dược liệu mang tính khoa học và thể hiện chính xác chất lượng cao cần nghiên cứu. Với việc sử dụng cao dược liệu có hàm lượng hoạt chất cao, thành phẩm chứa cao sẽ có khối lượng nhỏ giúp giảm chi phí trong sản xuất, việc sử dụng thuốc được dễ dàng từ đó nâng cao hiệu quả sử dụng thuốc.

Cao dược liệu được sử dụng để bào chế thành phẩm thuốc dùng cho người, do đó dung môi sử dụng phải ít gây độc cho cơ thể người. Đồng thời, với quy mô sản xuất công nghiệp thì dung môi chiết xuất được sử dụng thường là các dung môi rẻ tiền, thân thiện với môi trường để giảm chi phí xử lý chất thải và môi trường.

Loại dung môi là một trong các yếu tố đóng vai trò quyết định trong chiết xuất dược liệu. Lựa chọn dung môi không phù hợp không những làm giảm hiệu suất chiết hoạt chất mà còn góp phần gia tăng tạp không mong muốn trong hỗn hợp sản phẩm thu được. Trong công nghiệp dược, xét về yếu tố môi trường và kinh tế thì hai loại dung môi được sử dụng phổ biến là ethanol và nước. Trong đó, ethanol có nồng độ khác nhau có thể áp dụng cho cả hai phương pháp chiết nóng và chiết nguội (không dùng nhiệt độ). Với dung môi nước, chỉ có thể áp dụng phương pháp chiết nóng để chiết dược liệu. Qua thực nghiệm, bằng phương pháp đơn giản dễ thực hiện nhất là phương pháp ngâm ở nhiệt độ phòng, tiến hành khảo sát với nồng độ cồn khác nhau ở phòng thí nghiệm: ethanol 96 %, ethanol 70 %, ethanol 50 % và ethanol 30 %. Kết quả cho lượng hoạt chất chiết được trong các cao chiết từ dung môi ethanol 70 %, ethanol 50 % và ethanol 30 % có hàm lượng hoạt chất thấp hơn và lượng chất nhầy nhiều hơn ethanol 96 %.

Phương pháp chiết là ngâm được chọn từ thực nghiệm ban đầu vì đơn giản và phổ biến trong sản xuất ở quy mô công nghiệp, không ảnh hưởng đến sự phân hủy hoạt chất. Tuy nhiên, việc lựa chọn phương pháp chiết còn phụ thuộc vào cơ sở hạ tầng và nhu cầu của nhà sản xuất. Với mong muốn tiết kiệm điện năng, nhà sản xuất có thể chọn phương pháp ngâm nhưng đòi hỏi tốn nhiều thời gian nếu ngâm 2-3 lần để chiết kiệt hoạt chất. Qua thực nghiệm, thời gian ngâm được thực hiện khảo sát trong 7 ngày, nhận thấy khối lượng cặn tăng theo thời gian ngâm, nhưng lượng phyllanthin trong cặn tăng không đáng kể; tuy nhiên lượng hypophyllanthin trong cặn ở ngày 2 cao hơn ngày 1 rất nhiều và từ ngày thứ 3 đến thứ 7 không khác biệt nhiều

so với ngày thứ 2. Để đảm bảo chiết được lượng hoạt chất nhiều nhất và tiết kiệm thời gian, chọn thời gian ngâm 2 ngày là phù hợp nhất. Hơn nữa, trong quy mô công nghiệp, dịch chiết qua mỗi lần chiết không thể được lấy hoàn toàn khỏi bã dược liệu, do đó lượng hoạt chất trong lần chiết sau có thể là từ dịch chiết lần 2 còn sót lại nhưng hàm lượng hoạt chất chiết ra không tăng đáng kể nên chọn ngâm 48 giờ và chiết 2 lần là hoàn toàn phù hợp.

Về kích thước dược liệu, đề tài chọn kích thước bột dược liệu được rây qua rây 355 μm để có thể dễ dàng chiết các chất từ phương pháp ngâm. Nếu bột dược liệu có kích thước nhỏ hơn sẽ gây khó khăn trong quá trình sản xuất do tốn thời gian xay nhỏ, bay bụi trong quá trình thao tác, gây bết dính, tắc thiết bị, dịch chiết có thể chứa nhiều tạp chất hơn.

Khi thực hiện ở quy mô phòng thí nghiệm, tiến hành khảo sát chiết 2 kg bột dược liệu với dung môi: nước, ethanol 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 96 %. Kết quả nhận thấy, dung môi nước cho hàm lượng hoạt chất HPL và PLT trong dược liệu thấp nhất. Từ nước đến ethanol 30 %, hàm lượng hoạt chất chiết được tăng nhanh (hàm lượng HPL và PLT cao gấp 4,5 lần so với nước). Từ ethanol 30 % đến ethanol 80 %, hàm lượng hoạt chất tăng không đáng kể. Ethanol 96 % cho hàm lượng hoạt chất chiết được cao nhất (hàm lượng HPL và PLT cao gấp 1,3 lần so với ethanol 30 %). Như vậy, dung môi là ethanol 30 % và ethanol 96 % là đáng quan tâm nhất để lựa chọn. Xét về kinh tế thì ethanol 30 % sẽ có lợi hơn, vì chỉ tốn 1/3 kinh phí dung môi cho cùng khối lượng dược liệu cần chiết. Nếu mong muốn có chất chiết được giàu lignan thì chọn ethanol 96 %, bởi vì lượng lignan tăng khoảng 30 % so với ethanol 30 % trong cùng điều kiện. Khi chọn ethanol 96 % làm dung môi thì chất chiết được sẽ có ít chất dễ tan trong nước có trong dược liệu lẫn vào và giúp thuận lợi cho quá trình cô đặc sau này.

Khi thực hiện ở quy mô pilot, tiến hành theo điều kiện đã khảo sát ở quy mô phòng thí nghiệm để chiết 20 kg bột dược liệu với dung môi: nước, ethanol 30 %, 40 %, 50 %, 70 %, 96 %, phun sấy khô dịch chiết được 6 mẫu cao khô. Kết quả nhận thấy, dung môi nước cho hàm lượng hoạt chất HPL và PLT trong dược liệu thấp nhất, ethanol 30 % cho hàm lượng hoạt chất trong dược liệu cao nhất (cao gấp 9,0 lần so

với nước). Từ ethanol 50 % đến ethanol 96 % hàm lượng hoạt chất trong dược liệu giảm dần. Thực hiện ở quy mô pilot để tiến tới triển khai ở quy mô công nghiệp cho nên quá trình thực hiện có gia nhiệt, thực hiện trong hệ thống khép kín từ khi cho dược liệu và dung môi vào bình ngâm, gia nhiệt và sấy phun đến khi dịch chiết khô thành cao. Quy trình chiết có thể gọi là phương pháp chiết xuất có gia nhiệt dưới áp suất cao. Chính vì có gia nhiệt nên nhận thấy hàm lượng chất chiết được trong dung môi nước là thấp nhất có thể do nhiệt hóa hơi của nước cao nên dịch chiết phải tiếp xúc với nhiệt độ cao thời gian lâu làm giảm hàm lượng nhóm hoạt chất cần chiết. Theo khảo sát thì tổng hàm lượng PLT và HPL trong ethanol 30 % là cao nhất, đây là dung môi cần được lựa chọn trong chiết cao khô Diệp hạ châu đẳng ở quy mô sản xuất công nghiệp. Dung môi này sẽ hiệu quả kinh tế nhất và an toàn lao động sản xuất.

4.3.3. Tiêu chuẩn hóa cao khô Diệp hạ châu đẳng

Diệp hạ châu đẳng có nhiều chất có hoạt tính sinh học, có tác dụng dược lý hữu ích. Tuy nhiên, chưa có nhà nghiên cứu nào chiết xuất, phân lập một chất và đánh giá tác dụng dược lý đầy đủ để dùng làm nguyên liệu sản xuất một sản phẩm thuốc cụ thể. Cho nên, việc sử dụng Diệp hạ châu đẳng ở dạng cao toàn phần để điều trị là phù hợp. Do đó, việc xây dựng quy trình điều chế cao chuẩn hóa được coi là tối ưu khi cho khối lượng cao nhiều nhất và có đủ các chất được xem là đại diện cho dược liệu đem lại kết quả trị liệu mong muốn và ổn định theo thời gian.

ĐDVN V chỉ có chuyên luận dược liệu Diệp hạ châu đẳng và cao đặc Diệp hạ châu đẳng. Trong đó, chỉ tiêu định tính dùng dược liệu đối chiếu và xác định một chất điểm chỉ phyllanthin bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, chỉ tiêu định lượng chỉ xác định hàm lượng phyllanthin dựa vào chất đối chiếu phyllanthin bằng phương pháp sắc ký lỏng. Do đó, việc xây dựng tiêu chuẩn hóa cao khô Diệp hạ châu đẳng có ý nghĩa thực tiễn và cần thiết. Dự thảo tiêu chuẩn cơ sở dựa theo qui định chung của ĐDVN V và thực tế hàm lượng các chất sinh học tìm thấy trong dược liệu ở nước ta. Tiêu chuẩn chất lượng của cao dược liệu chuẩn hóa giúp kiểm soát và ổn định chất lượng trong quá trình sản xuất cao và thành phẩm thuốc chứa cao dược liệu.

Chỉ tiêu định tính bằng sắc ký lớp mỏng so sánh cao điều chế với cao chuẩn USP, phải có 4 vết trên sắc ký đồ trong cùng hệ dung môi khai triển. Chỉ tiêu định lượng bằng phương pháp HPLC, xác định hàm lượng của phyllanthin và hypophyllanthin. Việc xây dựng chỉ tiêu định tính và định lượng dựa vào bản chất của các chất có hoạt tính sinh học chính trong Diệp hạ châu đáng là không chỉ đối với phyllanthin và hypophyllanthin, mà còn có niranthin và nirtetralin. Niranthin và nirtetralin cũng có tác dụng dược lý rất tốt trong các bệnh lý về gan. Điều này có ý nghĩa thiết thực và góp phần ổn định hàm lượng hoạt chất của nguồn nguyên liệu đưa vào sản xuất thành phẩm, tránh trường hợp thành phẩm thuốc không đạt hàm lượng hoạt chất mong muốn. Cho nên, xây dựng chỉ tiêu định tính phải có 4 hoạt chất là cần thiết. Xây dựng chỉ tiêu định lượng chỉ dựa trên 2 hoạt chất là phyllanthin và hypophyllanthin là phù hợp với điều kiện thực tế của nước ta, tất cả cơ sở sản xuất hoặc các đơn vị kiểm nghiệm có thiết bị HPLC đều có thể làm được chỉ tiêu này.

Mức chất lượng của cao khô dược liệu đưa ra được dựa trên kết quả kiểm nghiệm của 3 lô của cùng một nguồn dược liệu nên mức chất lượng này chưa thể hiện được tính đại diện cho nhiều nguồn dược liệu khác nhau tùy thuộc vào vùng thổ nhưỡng, thời gian thu hái, cách chế biến dược liệu,... Tuy nhiên, mức chất lượng của cao dược liệu nêu trong đề tài này sẽ là nguồn tham khảo để các nhà sản xuất qui định tiêu chuẩn chấp nhận riêng cho các chỉ tiêu chất lượng tùy thuộc vào các nguồn dược liệu được cung cấp.

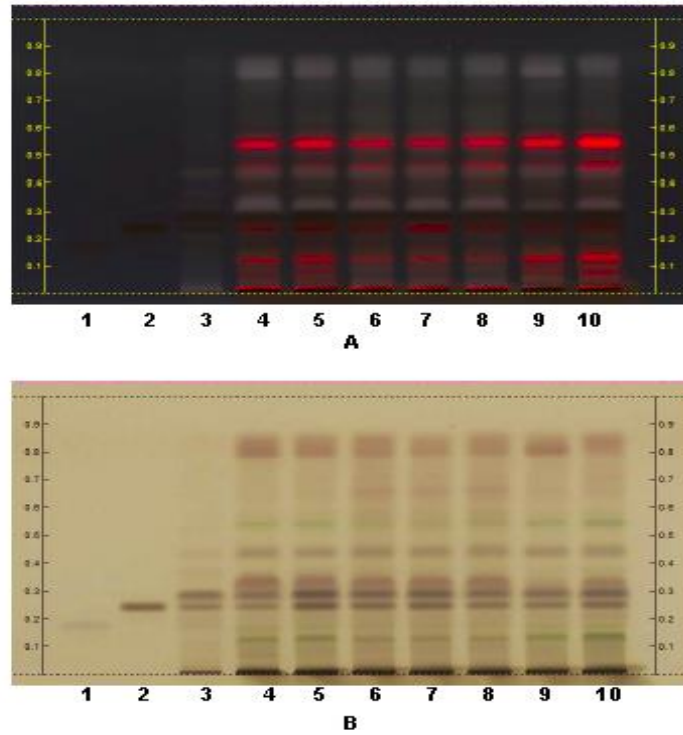
Với quy trình điều chế cao khô Diệp hạ châu đang ở quy mô pilot đã xây dựng, cao thu được có chất lượng ổn định với RSD (%) của kết quả kiểm nghiệm giữa các lô thấp. Kết quả hàm lượng trung bình trong cao của phyllanthin là 1,83 %, và hypophyllanthin là 0,75 %. Kết quả này cho thấy hàm lượng các chất là cao nên dự thảo tiêu chuẩn cơ sở đưa ra mức chất lượng hàm lượng của phyllanthin và hypophyllanthin lần lượt tương ứng là 0,8 % và 0,3 % tính trên chế phẩm khô.

4.3.4. Điều chế cao giàu lignan dùng làm cao đối chiếu Diệp hạ châu đắng

Hiện nay, trong các chuyên luận dược liệu của USP hay EP người ta dùng cao chuẩn (Herbal reference standard extract) để đánh giá dược liệu.

Các chất chuẩn đối chiếu còn được thiết lập cho mục đích xác định hàm lượng của các thành phần trong dược liệu và các chế phẩm có nguồn gốc từ dược liệu. Chúng có thể là thành phần có hoạt tính hoặc các chất điếm chỉ sử dụng dùng để định lượng hay các cao chiết dùng để định tính. Cao chiết được thiết lập dùng làm chất chuẩn là các mẫu đại diện chứa các thành phần có hoạt tính hoặc thành phần chất điếm chỉ.

Theo chuyên luận *Phyllanthus amarus* Aerial Parts và Powdered *Phyllanthus amarus* của USP Herbal Medicines Compendium [98], chỉ tiêu định tính bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng yêu cầu sắc ký đồ của dung dịch thử phải có sự hiện diện của 4 vết chính cùng giá trị R_f và màu sắc với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch cao chuẩn *Phyllanthus amarus* (USP Powdered *Phyllanthus amarus* Extract RS). Đồng thời, định tính và định lượng bằng phương pháp HPLC yêu cầu sắc ký đồ của dung dịch thử có những pic lignan có thời gian lưu tương ứng với sắc ký đồ của dung dịch cao chuẩn *Phyllanthus amarus* và sắc ký đồ đại diện được cung cấp theo lô cao chuẩn *Phyllanthus amarus* USP. Theo USP, xác định hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin trong dược liệu và chế phẩm.

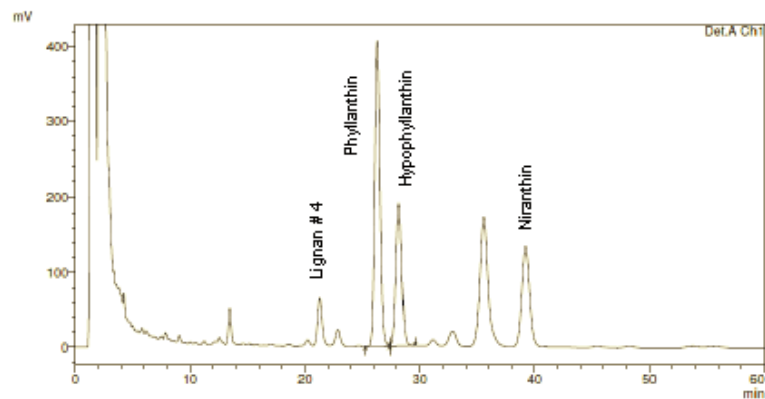


Typical HPTLC Chromatograms

These chromatograms are supplied for information only

Track assignment: 1) USP Phyllanthin RS (0.1 mg/mL); 2) hypophyllanthin (0.1 mg/mL); 3) USP *Phyllanthus amarus* Powdered Extract RS (10 mg/mL); 4-10) *Phyllanthus amarus* Aerial Parts, commercial samples

Hình 4.2. Sắc ký đồ SKLM đại diện cao chuẩn *Phyllanthus amarus* USP
(Theo nguồn: <https://hmc.usp.org/>)



Representative chromatogram of Content of Lignans in *Phyllanthus amarus* Aerial Parts

This chromatogram is supplied for information only

Hình 4.3. Sắc ký đồ HPLC đại diện cao chuẩn *Phyllanthus amarus* USP
(Theo nguồn: <https://hmc.usp.org/>)

Trong quá trình nghiên cứu, nhận thấy việc phân lập chất điểm chỉ để dùng làm chất đối chiếu khá phức tạp, chi phí cao, tốn nhiều thời gian. Hơn nữa, việc chỉ dùng một chất điểm chỉ đối chiếu để đánh giá dược liệu có một số hạn chế, chưa phản ánh đúng hết chất lượng của dược liệu. Từ nhu cầu cấp thiết đó, chúng tôi tiến hành xây dựng quy trình điều chế cao giàu lignan dùng làm cao đối chiếu dựa trên chất lượng của cao chuẩn USP.

Sau khi tiến hành SKLM và HPLC cao chuẩn USP, thành phần trong cao chủ yếu là các lignan, các hợp chất nhóm khác hầu như không có. Do đó, từ mẫu cao ethanol 96 % được chọn ở quy mô phòng thí nghiệm, khảo sát dung môi chiết theo hướng làm giàu nhóm lignan, loại tạp nhiều nhất. Chọn dung môi khảo sát dựa vào độ phân cực tăng dần: n-hexan, dicloromethan, ethyl acetat. Từ kết quả SKLM và HPLC, dung môi n-hexan cho hàm lượng lignan cao nhất và loại được nhiều tạp phân cực nhất. Chọn n-hexan để chiết phân đoạn lignan từ cao ethanol 96 %. Sau khi chiết với n-hexan, phân đoạn thu được vẫn còn chứa nhiều tạp: chất béo, chất màu... Do đó, tiến hành tinh chế phân đoạn này bằng sắc ký cột chân không để loại tạp, thu được phân đoạn giàu lignan. Phân đoạn giàu lignan thu được có hàm lượng hoạt chất phyllanthin và hypophyllanthin cao hơn nhiều so với cao chuẩn USP. Vì vậy, tiến hành điều chỉnh hàm lượng hoạt chất (theo hypophyllanthin) tương đương với cao chuẩn USP. Tá dược được thêm vào để điều chỉnh hàm lượng. Tá dược được chọn phải đạt yêu cầu trợ với các lignan, không làm vi khuẩn nấm mốc phát triển, có khả năng hút ẩm, có tính trơn. Do đó, silica dioxyd được chọn và thêm vào một lượng để làm tá dược.

Cao sau điều chế được đánh giá chất lượng đạt độ lặp lại và ổn định. Tuy nghiên cứu chỉ dừng lại việc đóng lọ, dán nhãn tạm, chưa đánh giá so sánh liên phòng thí nghiệm để dùng làm cao đối chiếu theo qui định của WHO và ASEAN. Nhưng đây cũng là một trong điểm mới của luận án, cho đến nay, vẫn chưa có một nghiên cứu nào công bố thiết lập cao để dùng làm cao đối chiếu được ứng dụng trong kiểm nghiệm chất lượng dược liệu và chế phẩm từ dược liệu. Từ kết quả này, luận án giúp định hướng phát triển các nghiên cứu chuyên sâu hơn về thiết lập cao đối chiếu ở Việt Nam. Điều này rất có ý nghĩa thực tiễn, giúp xác định đúng chất lượng của dược liệu

và chế phẩm từ dược liệu. Bên cạnh đó, góp phần đóng góp xây dựng chuyên luận Dược điển Việt Nam hòa hợp với Dược điển tham chiếu.

4.4. ĐÁNH GIÁ MỘT SỐ THÔNG SỐ DƯỢC ĐỘNG HỌC CỦA CAO CHUẨN HÓA ĐIỀU CHẾ TỪ DIỆP HẠ CHÂU ĐẮNG

Hiện nay, các lignan đại diện cho nhóm hợp chất phân tử có hoạt tính sinh học có trong hầu hết các cây thuốc và có tiềm năng lớn, được quan tâm trong định hướng phát triển các loại thuốc mới trong lĩnh vực điều trị ung thư. Phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin là các lignan chính chủ yếu có ở chi *Phyllanthus* và đã được chứng minh có tác dụng bảo vệ gan, chống viêm, chống oxy hóa, khả năng chống độc tế bào.

Mặc dù, có rất nhiều công bố trên thế giới về các lignan có hoạt tính sinh học ở chi *Phyllanthus*, nhưng cho đến nay, các nghiên cứu đa số tập trung đánh giá tác dụng dược lý trong khi dược động học của chúng chưa được nghiên cứu rõ ràng. Tuy nhiên, trên thế giới có một vài công trình nghiên cứu về dược động học của những hoạt chất lignan như phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin, nirtetralin và phyltetralin sau khi uống dịch chiết từ dược liệu *Phyllanthus amarus* hoặc *Phyllanthus niruri* L. hoặc *Phyllanthus urinaria* L. trên chuột thử nghiệm.

Diệp hạ châu đắng được sử dụng trong y học cổ truyền từ lâu đời, thường dùng dạng thuốc sắc từ dược liệu và có tiềm năng quan trọng rất lớn trong điều trị và phòng chống bệnh về gan do HBV. Một số nhà sản xuất trong và ngoài nước đã sản xuất thành phẩm đăng ký dạng thuốc viên nén, viên nang, nhưng vẫn chưa có nhà sản xuất nào đăng ký bản quyền thuốc gốc từ Diệp hạ châu đắng. Và cho đến nay, vẫn chưa có tài liệu nào công bố về sinh khả dụng của chế phẩm thuốc viên từ Diệp hạ châu đắng. Nghiên cứu dược động học là cần thiết để xác định liều dùng và nghiên cứu sinh khả dụng, góp phần tăng hiệu quả điều trị của chế phẩm Diệp hạ châu đắng. Tất cả các kết quả nghiên cứu trên thế giới đều cho thấy sinh khả dụng của phyllanthin, hypophyllanthin bằng đường uống rất thấp. Điều này, cũng cần xem lại liều dùng hàng ngày của các sản phẩm lưu hành trên thị trường.

4.4.1. Xây dựng và thẩm định qui trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ

Hiện nay, chỉ có một vài công trình công bố trên thế giới đã nghiên cứu định lượng các lignan trong huyết tương chuột bằng phương pháp HPLC với các loại đầu dò huỳnh quang (FL) [58], đầu dò dây diod quang (PDA) [75], đầu dò ghép nối khối phổ (MS/MS) [25], [63]. Kỹ thuật LC-MS/MS có ưu điểm là độ nhạy và tính đặc hiệu cao, khả năng phân tích đồng thời nhiều chất trong khoảng thời gian ngắn nên được chọn triển khai phương pháp. Trong đề tài này, quy trình định lượng đồng thời các lignan PLT, HPL và NRT trong huyết tương thỏ đã được xây dựng trên thiết bị sẵn có Shimadzu LCMS-8040. Trong quá trình khảo sát, kỹ thuật ion hóa ESI đã được áp dụng vì kỹ thuật này thích hợp với các chất phân tích có khối lượng lớn, có tính phân cực, không cần bền nhiệt và bay hơi. Kỹ thuật ghi phổ MRM có độ đặc hiệu và độ nhạy cao đã được sử dụng với mục đích định lượng. Chế độ ion hóa dương (positive) được lựa chọn vì làm tăng quá trình ion hóa của các chất phân tích cũng như pha động có các thành phần đệm amoni format, amoni acetat và acid formic.

Để lựa chọn các điều kiện ban đầu cho việc tìm điều kiện sắc ký thích hợp, một số điều kiện sắc ký được tham khảo từ các công trình công bố đã được xem xét. Trong hầu hết các nghiên cứu này, cột phân tích là cột pha đảo C18 với nhiều kích thước khác nhau. Trong đề tài này, cột Phenomenex® Gemini C18 đã được lựa chọn khảo sát vì cho hình dạng pic cân xứng, hiệu quả tách tốt với thời gian phân tích ngắn và sẵn có tại phòng thí nghiệm.

Dung môi điển hình được sử dụng trong sắc ký lỏng pha đảo tương thích với kiểu ion hóa ESI gồm: nước, acetonitril, methanol... Việc sử dụng các hệ đệm có chứa các ion vô cơ như phosphat nên tránh vì khó bay hơi và ngăn chặn sự ion hóa (ion suppression) đáng kể và có thể nhanh chóng gây ô nhiễm nguồn ion. Có thể thay thế bằng các hệ đệm tương thích với khối phổ như hệ đệm có amoni acetat, amoni format hoặc amoni bicarbonat. Trong đó, amoni format có khối lượng phân tử nhỏ nhất nên ít gây ô nhiễm nguồn ion hơn. Mặc dù vậy, những hệ đệm này vẫn gây ức chế ion. Do đó, nồng độ của đệm được sử dụng nên ở mức tối thiểu cần thiết để thu được sắc ký đồ phù hợp. Trong nghiên cứu này, pH của đệm được khảo sát từ 3-7 và acid formic từ 0,05 % - 0,2 %. Các hệ pha động methanol/ acetonitril – dung dịch đệm amoni format ở các nồng độ và tỷ lệ khác nhau đã được khảo sát. Khi sử dụng

hệ pha động methanol – dung dịch đệm amoni format (63 : 37) các chất phân tích được tách hoàn toàn, thời gian phân tích ngắn, áp suất cột thấp đồng thời vẫn phát hiện các chất ở nồng độ thấp (ng/mL), đáp ứng được mục tiêu nghiên cứu.

Trong các nghiên cứu đã công bố của Murugaiyah V. và cộng sự (2007) xử lý mẫu huyết tương chuột bằng cách tạo tủa protein với acetonitril và không sử dụng chất chuẩn nội [58], Parvathaneni M. và cộng sự (2014) xử lý mẫu huyết tương chuột bằng cách tạo tủa protein với methanol và có sử dụng chuẩn nội carbamazepin [75], Fan H. và cộng sự (2015) xử lý mẫu huyết tương chuột bằng chiết lỏng - lỏng với dung môi n-hexan – isopropanol (95 : 5) và sử dụng chuẩn nội diazepam [25], Nguyen Van Long và cộng sự (2019) xử lý mẫu huyết tương chuột bằng chiết lỏng - lỏng với dung môi *tert*-butyl methyl ether và sử dụng chuẩn nội felodipin [63].

Dựa vào các tài liệu đã công bố, carbamazepin và diazepam được khảo sát để làm chất chuẩn nội. Trong nghiên cứu này, kết quả khảo sát chọn diazepam làm chất chuẩn nội cho quy trình định lượng do diazepam là chất đối chiếu hóa học sẵn có, giá thành rẻ và kết quả trong quá trình thẩm định cho thấy việc sử dụng chất chuẩn nội diazepam cho tín hiệu đáp ứng tốt, hình dáng pic đối xứng, thời gian lưu phù hợp, hiệu suất chiết cao và ổn định hơn hẳn so với carbamazepin, đồng thời đảm bảo độ đúng và tính chính xác cho quy trình định lượng các chất lignan trong huyết tương thỏ.

Theo các tài liệu tham khảo, các phương pháp xử lý mẫu cho việc định lượng các chất phân tích trong huyết tương đều tập trung vào phương pháp chiết lỏng - lỏng và chiết pha rắn, một số nghiên cứu xử lý mẫu bằng phương pháp tủa protein. Trong quá trình xây dựng quy trình xử lý mẫu, phương pháp chiết pha rắn có chi phí cao nên không được ưu tiên lựa chọn để khảo sát, hai phương pháp tủa protein và chiết lỏng - lỏng đã được khảo sát nhằm tối ưu hóa việc làm sạch mẫu để giảm bớt ảnh hưởng nền mẫu, tăng hiệu suất chiết và kéo dài tuổi thọ của cột phân tích. Ban đầu, phương pháp tủa protein đã được lựa chọn do có ưu điểm dễ thao tác, ít tốn thời gian, ít tốn dung môi nhưng mẫu sau khi xử lý ít tinh khiết, bị lẫn nhiều tạp chất dẫn đến hiệu suất chiết không ổn định và thậm chí hiệu suất chiết của các chất phân tích cao hơn 100 %. Trong khi đó, với phương pháp chiết lỏng - lỏng, mẫu sau khi chiết sạch

hơn, độ pha loãng ít hơn nên nồng độ mẫu được tăng lên làm tăng tín hiệu các chất, thích hợp với chất có nồng độ trong huyết tương thấp. Trong quá trình nghiên cứu, hiệu suất chiết từ huyết tương thô của IS (DAZ) trong khoảng 86,21 % - 98,63 % và các chất lignan PLT, HPL, NRT lần lượt tương ứng trong khoảng 77,93 % - 98,35 % đạt so với yêu cầu chung của US-FDA, EMA và DĐVN V [2], [23], [97]. Qua thực nghiệm cho thấy, hiệu suất chiết các chất phân tích đều cao và ổn định, đảm bảo phương pháp chiết lỏng - lỏng hoàn toàn có thể áp dụng cho quy trình phân tích các chất trong mẫu huyết tương thô sau này.

Đề tài xây dựng quy trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thô bằng phương pháp LC-MS/MS dựa theo nghiên cứu của Fan H. [25] và hướng dẫn của US-FDA, EMA và DĐVN V [2], [23], [97]. Theo hướng dẫn của US-FDA, EMA và DĐVN V [2], [23], [97], một phương pháp phân tích sinh học cần thẩm định tính đặc hiệu, độ chính xác trong ngày (intra-day) và liên ngày (inter-day), độ đúng, giới hạn định lượng dưới (LLOQ), đường chuẩn và khoảng tuyến tính, hiệu suất chiết, ảnh hưởng nền mẫu (matrix effect), độ nhiễm chéo (carry over), hệ số pha loãng và độ ổn định ngắn hạn, dài hạn, sau các chu kỳ đông - rã đông.

Dựa theo các tài liệu công bố, qui trình phân tích đã xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng trong huyết tương thô với khoảng tuyến tính 1-1000 ng/mL với cả phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin. Tuy nhiên, qua khảo sát thăm dò liều uống thuốc cho thỏ (phyllanthin 2 mg/kg), phân tích nồng độ của các lignan thì nhận thấy nồng độ cao nhất trong số các chất là khoảng 20 $\mu\text{g/mL}$. Nếu áp dụng khoảng đường chuẩn 1-1000 ng/mL cho cả 3 chất sẽ không phù hợp với qui định, thang nồng độ của các mẫu đường chuẩn và mẫu kiểm chứng quá lớn. Điều này, có thể gây ảnh hưởng sai số kết quả định lượng khi phân tích các mẫu máu thỏ sau khi uống thuốc thử nghiệm. Vì vậy, đề tài phải thẩm định lại bổ sung một phần về tính đặc hiệu, độ chính xác trong ngày (intra-day) và liên ngày (inter-day), độ đúng, giới hạn định lượng dưới (LLOQ), đường chuẩn và khoảng tuyến tính, hiệu suất chiết, ảnh hưởng nền mẫu (matrix effect), độ nhiễm chéo (carry over) và hệ số pha loãng theo hướng dẫn của US-FDA, EMA và DĐVN V với khoảng tuyến tính 0,1-50 ng/mL cho

cả phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin. Việc này là cần thiết và đảm bảo định lượng được ở các thời điểm lấy máu khác nhau sau khi cho thỏ uống cao Diệp hạ châu đẳng, đáp ứng qui định thang đường chuẩn từ 1/20 của giá trị C_{max} đến 2-3 lần C_{max} .

Quy trình định lượng có giới hạn định lượng dưới các lignan đều là 0,1 ng/mL. Mức nồng độ LLOQ này đều ở trong khoảng 1/10 đến 1/20 giá trị C_{max} và cho kết quả độ đúng, độ chính xác đạt trong giới hạn cho phép. Giá trị LLOQ của mỗi chất phân tích phù hợp với mục đích nghiên cứu và lượng mẫu sử dụng, nhỏ hơn 5 % giá trị C_{max} của các chất phân tích trong huyết tương thỏ. Mức giới hạn này nhỏ hơn nhiều so với các những qui trình sử dụng cùng kỹ thuật phân tích được công bố và đặc biệt là ưu thế hơn hẳn những công trình khác đã công bố về giới hạn định lượng dưới của phương pháp. Thực nghiệm đã chứng tỏ giá trị LLOQ này hoàn toàn phù hợp đáp ứng qui định cho việc định lượng mẫu trong dịch sinh học, xác định các điểm trong pha thải trừ để đảm bảo tỉ số $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty} \geq 80 \%$.

Qua thực nghiệm theo dõi độ ổn định của phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ theo hướng dẫn của US-FDA và EMA, cho thấy các chất phân tích ổn định trong huyết tương thỏ ở các điều kiện bảo quản: mẫu sau khi xử lý để ở bộ phận tiêm mẫu 4 °C trong 48 giờ, ở nhiệt độ phòng 6 giờ, 3 chu kỳ đông - rã đông và ở điều kiện bảo quản -70 °C trong vòng 30 ngày.

Đề tài đã triển khai thẩm định tất cả các thông số này trên động vật thử nghiệm giúp cung cấp cơ sở khoa học một cách hệ thống về phương pháp phân tích định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ. Kết quả thẩm định phương pháp xác định nồng độ các lignan trong huyết tương thỏ đạt các thông số theo yêu cầu chung dành cho huyết tương người theo hướng dẫn của US-FDA, EMA và ĐĐVN V [2], [23], [97] nên có thể áp dụng để xác định nồng độ các lignan sau khi cho thỏ uống chế phẩm cao chuẩn hóa đã điều chế.

Hiện nay, các công trình nghiên cứu đã công bố về quy trình định lượng các lignan trong huyết tương chuột gồm có: định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin, phyltetralin và niranthin chiết từ lá *Phyllanthus niruri* L. bằng phương pháp HPLC-FL của nhóm tác giả Murugaiyah V. (2007) [58], định lượng

đồng thời phyllanthin và hypophyllanthin chiết từ *Phyllanthus amarus* bằng phương pháp HPLC-PDA của nhóm tác giả Parvathaneni M. (2014) [75], định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin, nirtetralin và niranthin chiết từ cây *Phyllanthus urinaria* L. bằng phương pháp HPLC-MS/MS của nhóm tác giả Fan H. (2015) [25], định lượng phyllanthin chiết từ cây *Phyllanthus amarus* bằng phương pháp HPLC-MS/MS của nhóm tác giả Nguyen Van Long (2019) [63]. Các công bố này chỉ đề cập định lượng trong huyết tương chuột, cho đến nay, vẫn chưa có nghiên cứu nào xác định nồng độ của lignan trong huyết tương thỏ. Mặt khác, do nghiên cứu chỉ đánh giá độ tinh khiết của chất nirtetralin phân lập được, chưa thiết lập đánh giá so sánh liên phòng thí nghiệm dùng làm chất đối chiếu và chất chuẩn nirtetralin thương mại giá rất cao 500 USD/ 1 mg, không mua được nên đề tài định lượng đồng thời các lignan trong huyết tương thỏ chỉ thực hiện trên 3 lignan có tác dụng sinh học chính của Diệp hạ châu đáng là phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin. Nội dung nghiên cứu này cũng là một trong những điểm mới của luận án, góp phần đánh giá sinh khả dụng của chế phẩm từ Diệp hạ châu đáng.

4.4.2. Đánh giá một số thông số dược động học của cao chuẩn hóa điều chế từ Diệp hạ châu đáng

Diệp hạ châu đáng được sử dụng rộng rãi với nhiều công dụng trong các phương thuốc cổ truyền. Các thành phần chính góp phần nên tác dụng của loài thảo dược này các các hợp chất lignan, chủ yếu gồm phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin. Một số công trình đã nghiên cứu về sinh khả dụng của các hợp chất này trên các loài chuột. Tuy nhiên, nghiên cứu về sinh khả dụng của các hợp chất này trên động vật thử nghiệm khác thì chưa. Do vậy, đề tài đã thực hiện trên thỏ, loài động vật bậc cao hơn chuột, để từ đó có cái nhìn tổng quan hơn về sinh khả dụng của các hợp chất lignan trong Diệp hạ châu đáng.

Theo các nghiên cứu sinh khả dụng của các lignan trên chuột đã công bố, nhận thấy như sau:

Nhóm tác giả Murugaiyah V. (2007) đã cho chuột uống 5 mL/kg dung dịch cao giàu lignan chiết từ *Phyllanthus niruri* pha trong Tween 20 với liều uống 50 mg/kg và so với đường tiêm 1 mL/kg dung dịch trên với liều 5 mg/kg. Thời điểm lấy

máu ở 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 6; 8; 10; 24 giờ sau khi tiêm tĩnh mạch đuôi chuột và ở 0; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 6; 8; 10 và 24 giờ sau khi uống. Đối với đường tiêm, kết quả công bố cho thấy phyllanthin, hypophyllanthin, phyltetralin và niranthin có thể tích phân bố (V_d) tương đối nhỏ lần lượt tương ứng là 0,20; 0,17; 0,14 và 0,15 L/kg nên khiến chúng không phân bố rộng vào khoang mô. Tuy nhiên, các lignan này xuất hiện chậm nên hệ số thanh thải nhỏ lần lượt tương ứng là 0,04; 0,01; 0,03 và 0,02 L/kg.giờ và thời gian bán thải ($T_{1/2}$) dài hơn từ 3,35-4,40 giờ. Kết quả nghiên cứu này cho thấy, có thể do có sự hiện diện của các lignan thân dầu trong cao chiết *Phyllanthus niruri* từ n-hexan. Các lignan thân dầu này có thể phân bố vào khoang mô và được giữ lại nên thải trừ chậm mặc dù các lignan phyllanthin, hypophyllanthin, phyltetralin và niranthin có thể tích phân bố nhỏ. Đối với đường uống, kết quả công bố cho thấy cả 4 lignan hấp thu nhanh với T_{max} khoảng 1 giờ và C_{max} lần lượt tương ứng là 0,18; 0,56; 0,12 và 0,62 $\mu\text{g/mL}$. Do các lignan thân dầu hòa tan có thể thấm vào dịch dạ dày - ruột dễ dàng hơn nên đạt nồng độ đỉnh C_{max} sau 1 giờ. Tuy nhiên, giá trị AUC thấp hơn lần lượt tương ứng là 18, 7, 3 và 4 lần so với đường tiêm mặc dù uống liều cao hơn 10 lần, chứng tỏ sự hấp thu bằng đường uống là không hoàn toàn. Kết quả tính toán sinh khả dụng tuyệt đối của phyllanthin, hypophyllanthin, phyltetralin và niranthin lần lượt tương ứng là 0,62; 1,52; 4,01 và 2,66 % [58].

Nhóm tác giả Parvathaneni M. (2014) đã cho chuột uống 5 mL/kg dung dịch phân đoạn có lignan pha trong Tween 20 với lần lượt các liều uống 2,5; 5; 10 mg/kg cho cả phyllanthin và hypophyllanthin. Phân đoạn lignan này được phân lập từ cao n-hexan, chiết từ lá *Phyllanthus amarus*. Thời điểm lấy máu ở 0; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24; 36 giờ sau khi uống. Kết quả cho thấy cả hai lignan này không tăng tuyến tính khi tăng liều vì các lignan thân dầu có thể bị phân lập vào cao n-hexan gây cản trở các lignan hấp thu và các lignan thân dầu này hòa tan có thể thấm vào dịch dạ dày - ruột dễ dàng hơn nên đạt nồng độ đỉnh C_{max} sau 1 giờ [75].

Nhóm tác giả Fan H. (2015) đã cho chuột uống dung dịch cao ethanol 80 % chiết từ *Phyllanthus urinaria* L. trong carboxymethyl cellulose natri 0,5 % (20 g/kg). Thời điểm lấy mẫu ở 0; 0,083; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 12; 14; 24 giờ sau khi uống. Kết quả cho thấy có hiện tượng hấp thu kép có 2 đỉnh hấp thu trong đường cong

nồng độ - thời gian của 4 lignan hypophyllanthin, phyllanthin, nirtetralin và niranthin sau khi uống cao *Phyllanthus urinaria* L. Điều này khác với các công bố trước. Thông số dược động học của hypophyllanthin và nirtetralin tương tự nhau, nồng độ đỉnh đầu tiên trong huyết tương (C_{max1}) đạt được lần lượt tương ứng ở $0,58 \pm 0,20$ giờ và $0,67 \pm 0,20$ giờ (T_{max1}); nồng độ đỉnh thứ hai trong huyết tương (C_{max2}) đạt được lần lượt tương ứng ở $8,67 \pm 1,63$ giờ (T_{max2}); thời gian bán thải ($T_{1/2}$) lần lượt tương ứng là $2,18 \pm 0,40$ giờ và $2,23 \pm 0,19$ giờ. Phyllanthin và niranthin cũng có thông số dược động học tương tự nhau, C_{max1} đạt được lần lượt tương ứng ở $2,32 \pm 1,11$ giờ và $3,12 \pm 0,81$ giờ, trong khi C_{max2} đạt được lần lượt tương ứng ở $6,67 \pm 1,03$ giờ cho cả hai; $T_{1/2}$ lần lượt tương ứng là $2,32 \pm 1,11$ giờ và $3,12 \pm 0,81$ giờ. So với hypophyllanthin và nirtetralin, nồng độ và giá trị AUC của phyllanthin và niranthin thấp hơn nhiều, mặc dù hàm lượng phyllanthin và niranthin trong *Phyllanthus urinaria* L. cao hơn. Điều này, có thể là do sự hấp thụ kém và kéo dài chuyển hóa của phyllanthin và niranthin *in vivo* [25].

Nhóm tác giả Nguyen Van Long (2019) đã cho chuột uống dung dịch cao ethanol 80 % chiết từ *Phyllanthus amarus* với liều 2 mg/kg của phyllanthin. Hàm lượng phyllanthin trong cao chiết được là 9,12 %. Thời điểm lấy mẫu ở 0; 0,083; 0,167; 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24 giờ sau khi uống. Nghiên cứu chỉ định lượng nồng độ của phyllanthin trong huyết tương chuột. Kết quả cho các thông số dược động học sau khi uống cao chiết như sau: AUC_{0-t} đạt $18,07 \pm 1,99$ giờ.ng/mL, $AUC_{0-\infty}$ đạt $22,38 \pm 1,67$ giờ.ng/mL, C_{max} đạt được $11,44 \pm 1,15$ ng/mL ở T_{max} sau 0,25 giờ và $T_{1/2}$ ở $5,24 \pm 0,21$ giờ. Ngoài ra, nhóm tác giả nghiên cứu khảo sát dược động học của công thức pha chế phức hợp phospholipid với cao chiết cùng liều uống 2 mg/kg của phyllanthin, kết quả các giá trị thông số dược động học cao hơn so với uống cao chiết [63].

Dựa vào các công trình công bố trên, đề tài thực hiện nghiên cứu các thông số dược động học trên đối tượng động vật thử nghiệm là thỏ. 12 con thỏ đã được lựa chọn cho thử nghiệm, trong đó có 7 con đực (58,3 %) và 5 con cái (42,7 %). Cân nặng trung bình (min – max) của 12 con thỏ tham gia thử nghiệm là 2,18 kg (2,0-2,5 kg). Các thỏ được cho uống chế phẩm cao khô Diệp hạ châu đẳng với liều 2 mg

phyllanthin/ kg cân nặng. Lấy máu tổng cộng 14 thời điểm: 0 (trong vòng 15 phút trước khi uống thuốc), 5, 10, 15, 20, 30, 45 phút; 1, 2, 3, 4, 5, 6 và 8 giờ sau khi uống.

So với khoảng cách giữa các thời điểm lấy mẫu đã được báo cáo trước đây [25], [58], [63], khoảng cách giữa các thời điểm ban đầu ngắn hơn nên việc tăng số điểm lấy mẫu ở pha hấp thu và thời điểm lấy mẫu cuối cùng ngắn hơn. Điều này, sẽ giúp dự đoán chiều hướng thay đổi chính xác hơn nồng độ các lignan trong huyết tương thỏ.

Trong đánh giá sinh khả dụng của thuốc, thiết kế thời điểm lấy mẫu rất quan trọng để thu được kết quả nghiên cứu tin cậy. Đề tài đã thiết kế thời điểm lấy mẫu máu bao gồm: có một điểm trước khi uống thuốc (mẫu trắng, thời điểm 0), 2-3 thời điểm trước khi đạt tới nồng độ đỉnh của đường cong nồng độ - thời gian, 7-10 thời điểm lấy mẫu sau đỉnh, 3 thời điểm xung quanh đỉnh của đường cong. Thời gian lấy mẫu kết thúc 8 giờ, gấp 4-5 lần thời gian bán thải của các chất và đảm bảo tỉ số $AUC_{0-t}/AUC_{0-\infty} \geq 80 \%$, phù hợp theo hướng dẫn qui định về nghiên cứu sinh khả dụng của ĐĐVN V [2] và ASEAN [20].

Kết quả thực nghiệm cho thấy, các thông số dược động học sau khi cho thỏ uống, các lignan phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin nhanh chóng hấp thu và nồng độ đỉnh (C_{max}) đạt được lần lượt tương ứng $14,62 \pm 1,88$; $5,91 \pm 0,82$ và $4,41 \pm 0,45$ ng/mL ở T_{max} lần lượt tương ứng 0,24; 0,26 và 0,24 giờ; Tuy nhiên, các lignan cũng nhanh chóng thải trừ ra khỏi cơ thể, thời gian bán thải ($T_{1/2}$) lần lượt tương ứng ở 1,78; 1,17; 1,41 giờ. Từ các thông số dược động học cũng cho thấy các hoạt chất trong cao Diệp hạ châu đắng hấp thu kém, điều này hoàn toàn phù hợp với các tài liệu đã công bố.

Nội dung nghiên cứu của đề tài so với các báo cáo nghiên cứu sinh khả dụng các lignan thử nghiệm trên chuột, nhận thấy có các điểm khác nhau như sau:

Về sản phẩm uống: chế phẩm nghiên cứu của đề tài là cao khô Diệp hạ châu đắng chiết từ ethanol 30 %, trong khi các nghiên cứu công bố trước đây thử nghiệm trên cao *Phyllanthus amarus* chiết từ ethanol 80 % [63], cao *Phyllanthus amarus* chiết từ n-hexan [75], cao *Phyllanthus niruri* chiết từ n-hexan [58], cao *Phyllanthus urinaria* L. chiết từ ethanol 80 % [25]. Khi chiết từ các dung môi n-hexan, ethanol

80 % thì hàm lượng lignan sẽ cao hơn ethanol 30 % ở quy mô phòng thí nghiệm cho nên liều uống khảo sát của các nghiên cứu này là cao hơn. Chế phẩm cao khô Diệp hạ châu đẳng chiết từ ethanol 30 % ở quy mô pilot có thể làm cho các nhóm hợp chất thân nước như tanin thủy phân, flavonoid, polyphenol có khả năng tan trong ethanol thấp độ nên cao khô Diệp hạ châu đẳng ngoài chiết được các lignan cao nhất còn có thêm các nhóm chất khác trong cần thô thu được.

Về liều uống thử nghiệm: Đề tài chọn liều uống thử nghiệm cho thỏ là 2 mg phyllanthin/kg cân nặng giống theo nghiên cứu của nhóm tác giả Nguyen Van Long do cùng loài dược liệu *Phyllanthus amarus* ở Việt Nam. Do đó, đề tài không khảo sát liều uống mà dùng liều thử nghiệm của nhóm tác giả Nguyen Van Long để giúp nhìn tổng thể hơn về thông số dược động học của các lignan này trên các động vật thử nghiệm khác nhau.

Về cách pha sản phẩm: Một số nghiên cứu công bố chuẩn bị pha cao trong dung dịch Tween 20 [58], [75] hoặc carboxymethyl cellulose natri 0,5 % [25], một số nghiên cứu không công bố cách pha cao trước khi uống [63]. Khi pha cao có thêm chất diện hoạt trong dung dịch sẽ làm tăng tính thấm của các lignan phân tích cho nên nồng độ các chất cao hơn khi pha trong nước ở liều uống thử nghiệm. Đề tài không sử dụng chất diện hoạt mà chỉ hòa cao trong nước để giống như cách sử dụng đường uống của người.

So sánh kết quả với các báo cáo của nhóm tác giả Nguyen Van Long thử nghiệm trên chuột [63], nhận thấy: Đối với phyllanthin cho C_{max} và T_{max} là tương tự nhau. Trong khi giá trị AUC khi thử nghiệm trên chuột cao hơn vì thời gian bán thải của phyllanthin ở chuột dài hơn (5,24 giờ).

Sinh khả dụng đường uống thấp có thể do chúng kém khả năng hòa tan trong nước, chỉ một phần nhỏ có sẵn ở dạng hòa tan nên hấp thu ít sau khi uống. Những phát hiện này có giá trị góp phần nghiên cứu thêm để phát triển sinh khả dụng của các lignan có hoạt tính sinh học qua đường miệng. Hơn nữa, sinh khả dụng của thuốc thân dầu bằng đường uống dưới dạng liều rắn là rất thấp. Nguyên nhân chính là sự hấp thu kém. Do các chất hòa tan chậm hoặc không hoàn toàn trong hệ tiêu hóa. Trong trường hợp này, cách tiếp cận cải tiến để cải thiện sinh khả dụng có thể được

thực hiện thông qua hệ thống phân phối, có thể tăng tỷ lệ và/ hoặc mức độ hòa tan thuốc vào dịch ruột. Phospholipid đóng một vai trò quan trọng trong công nghệ sản xuất thuốc hiện nay. Vì vậy, các nghiên cứu sâu hơn về sự hấp thụ, chuyển hóa và định hướng cho các lignan này sẽ cần được tiến hành và đánh giá rõ ràng hơn về sự chênh lệch hấp thụ giữa các kết quả đã nghiên cứu được cho đến nay. Sự hấp thụ thuốc là một quá trình phức tạp, bị ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố. Do đó, sự hấp thụ không điển hình như hấp thụ kép thường gặp, đặc biệt trong nghiên cứu các thành phần được phân lập từ thuốc có nguồn gốc từ dược liệu. Hiện tượng hấp thu kép có thể là do chu kỳ tuần hoàn gan ruột, chậm làm rỗng dạ dày, biến đổi sự hấp thụ hoặc sự tái hấp thụ phân bố. Sự xuất hiện đỉnh thứ hai có thể do các lignan có thể được chuyển từ mô sang huyết tương khi nồng độ của chất phân tích trong mô cao hơn so với trong huyết tương hoặc có thể là chất phân tích có thể được hấp thụ hai lần từ các vùng khác nhau trong ruột. Điều này cần thiết có các nghiên cứu sâu hơn để khám phá cơ chế của hiện tượng này.

Đề tài chỉ dừng lại bước đầu ở việc xác định các thông số dược động học của phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin sau khi thử uống cao khô Diệp hạ châu đắng đã được chuẩn hóa có thể dùng làm nguyên liệu sản xuất thành phẩm dạng viên. Việc nghiên cứu sinh khả dụng các lignan này đề nghị sẽ tiếp tục nghiên cứu chuyên sâu hơn với mục đích cải thiện sự hấp thụ bằng đường uống và góp phần tham khảo hỗ trợ giúp xác định liều uống cho các chế phẩm viên đang lưu hành trên thị trường Việt Nam nhằm tăng hiệu quả điều trị của các chế phẩm từ dược liệu Diệp hạ châu đắng *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.

ĐIỂM MỚI CỦA ĐỀ TÀI

1. Về mặt hóa học chiết xuất, phân lập, tinh chế

Lần đầu tiên, phân lập được đồng thời 5 hợp chất lignan chính trong Diệp hạ châu đắng *Phyllanthus amarus* gồm phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin, nirtetralin và phyltetralin kèm bộ dữ liệu phổ nghiệm đầy đủ của mỗi chất đạt độ tinh khiết cần thiết để thiết lập chất đối chiếu phục vụ công tác kiểm nghiệm nguyên liệu và các chế phẩm từ cây thuốc này.

2. Về mặt thiết lập chất đối chiếu

Lần đầu tiên, xây dựng bộ hồ sơ hoàn chỉnh để thiết lập chất đối chiếu hypophyllanthin và niranthin.

3. Về mặt điều chế và tiêu chuẩn hóa cao Diệp hạ châu đắng

Đã sử dụng phương pháp HPLC-PDA để định tính và định lượng đồng thời 4 lignan: phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin trong Diệp hạ châu đắng *Phyllanthus amarus* và cho đến nay phương pháp vẫn chưa được công bố bởi tài liệu nào.

Lần đầu tiên, công bố nghiên cứu khảo sát điều chế cao giàu lignan để dùng làm cao đối chiếu có chất lượng tương đương cao chuẩn *Phyllanthus amarus* USP được ứng dụng trong kiểm nghiệm chất lượng dược liệu và chế phẩm từ dược liệu Diệp hạ châu đắng.

4. Về mặt đánh giá một số thông số dược động học của cao chuẩn hóa điều chế từ Diệp hạ châu đắng

Quy trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ bằng phương pháp LC-MS/MS đã được xây dựng và thẩm định, cho đến nay vẫn chưa được công bố bởi tài liệu nào.

Bước đầu xác định các thông số dược động học của các lignan chính: phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin sau khi cho thỏ uống cao khô Diệp hạ châu đắng đã được chuẩn hóa với mục đích dùng làm nguyên liệu sản xuất thành phẩm dạng thuốc rắn phân liều, cho đến nay vẫn chưa được công bố bởi tài liệu nào.

KẾT LUẬN

Sau thời gian thực hiện, luận án đã hoàn thành các nội dung nghiên cứu và đạt được tất cả các mục tiêu đề ra ban đầu.

Các kết quả nghiên cứu đạt được như sau:

1. Chiết xuất, phân lập, tinh chế và xác định cấu trúc, độ tinh khiết của các chất phân lập được (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.)

Từ 60 g cao dicloromethan được chiết xuất từ 1 kg bột dược liệu Diệp hạ châu đắng đã phân lập được 5 hợp chất lignan có độ tinh khiết lớn hơn 95 % gồm: 1730 mg phyllanthin, 400 mg hypophyllanthin, 190 mg niranthin, 250 mg nirtetralin và 60 mg phyltetralin.

Xây dựng bộ dữ liệu phổ nghiệm gồm phổ UV, IR, MS, NMR của 5 hợp chất lignan đã phân lập được gồm: phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin, nirtetralin và phyltetralin.

2. Thiết lập chất đối chiếu hợp chất chiết từ Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.)

Trong 5 hợp chất được phân lập thì có 4 hợp chất đủ khối lượng và đạt độ tinh khiết để thiết lập chất đối chiếu gồm: phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin. Do hợp chất phyllanthin đã được thiết lập chất đối chiếu [3] nên trong luận án này chỉ thiết lập chất đối chiếu đối với hypophyllanthin và niranthin. Đối với nirtetralin được xác định độ tinh khiết để ứng dụng định lượng các lignan của Diệp hạ châu đắng trong đề tài.

Thiết lập được 3 hợp chất chiết từ dược liệu Diệp hạ châu đắng gồm: 2 hợp chất hypophyllanthin và niranthin đạt yêu cầu dùng làm chất đối chiếu và tiêu chuẩn cơ sở để đánh giá chất lượng; 1 hợp chất nirtetralin đã xác định độ tinh khiết sắc ký có thể dùng làm chất đối chiếu phòng thí nghiệm. Quy trình thiết lập chất đối chiếu tuân theo hướng dẫn của WHO và ASEAN.

3. Điều chế và xây dựng tiêu chuẩn cao Diệp hạ châu đắng

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 4 lignan: phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin bằng phương pháp HPLC với cột C18, đầu dò PDA, đẳng dòng. Quy trình định lượng đạt yêu cầu các chỉ tiêu thẩm định về tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng theo hướng dẫn ICH.

Xác định điều kiện chiết cao thích hợp cho quy mô phòng thí nghiệm với dung môi ethanol 96 % và quy mô pilot với dung môi ethanol 30 % cho hàm lượng các chất lignan cao nhất so với các dung môi chiết khác. Điều này rất có ý nghĩa thiết thực, mang lại hiệu quả kinh tế, an toàn cho người và không gây độc hại môi trường.

Xây dựng được quy trình điều chế và tiêu chuẩn hóa cao Diệp hạ châu đắng.

Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho cao khô Diệp hạ châu đắng đáp ứng chất lượng về: chỉ tiêu, mức chất lượng, phương pháp thử theo qui định của Dược điển Việt Nam và Dược điển Mỹ.

Ứng dụng phương pháp định lượng đồng thời 4 lignan: phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin bằng phương pháp HPLC trên các mẫu dược liệu và cao chiết Diệp hạ châu đắng.

Ứng dụng xây dựng được quy trình điều chế và đánh giá chất lượng cao Diệp hạ châu đắng giàu lignan dùng làm cao đối chiếu đạt yêu cầu phục vụ cho công tác kiểm nghiệm.

4. Đánh giá một số thông số dược động học của cao chuẩn hóa điều chế từ Diệp hạ châu đắng

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 3 lignan: phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thử bằng phương pháp LC-MS/MS với chất chuẩn nội diazepam, cột C18, đẳng dòng, đầu dò khối phổ ESI (+) chế độ đo MRM, xử lý mẫu bằng chiết lỏng - lỏng đạt yêu cầu các chỉ tiêu thẩm định về tính đặc hiệu, giới hạn định lượng dưới, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, hiệu suất chiết, ảnh hưởng nền mẫu, lượng mẫu tồn dư và độ ổn định theo hướng dẫn US-FDA, EMA và ĐDVN V.

Bước đầu nghiên cứu một số thông số dược động học C_{\max} , AUC, T_{\max} , $T_{1/2}$ khi cho thỏ uống cao chuẩn hóa Diệp hạ châu đắng (hàm lượng phyllanthin là 18,3 mg/g cao) với liều uống 2 mg phyllanthin/ kg cân nặng và ghi nhận kết quả các thông số dược động học biểu thị tốc độ và mức độ hấp thu của các chất phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ.

KIẾN NGHỊ

Các kết quả đạt được nêu trên là cơ sở khoa học để thực hiện các hướng nghiên cứu tiếp theo. Một số kiến nghị như sau:

- Tiếp tục tối ưu hóa điều kiện để chiết xuất, phân lập, tinh chế các hợp chất lignan: nirtetralin và phyltetralin và đánh giá chất lượng so sánh liên phòng thí nghiệm dùng làm chất đối chiếu.

- Đề nghị tiến hành xây dựng “Chuyên luận cao khô Diệp hạ châu đắng” cho Dược điển Việt Nam trong lần xuất bản tới.

- Theo chuyên luận *Phyllanthus amarus* trong USP 40, cao chuẩn *Phyllanthus amarus* cùng với sắc ký đồ đối chiếu của lô cao chuẩn *Phyllanthus amarus* chỉ được dùng để định tính nên đề nghị tiếp tục nghiên cứu đồng nhất lô và đánh giá chất lượng so sánh liên phòng thí nghiệm cao giàu lignan điều chế được để có thể dùng làm cao đối chiếu ứng dụng cho định tính các hợp chất lignan có trong dược liệu và cao Diệp hạ châu đắng.

- Tiếp tục nghiên cứu để cải thiện sinh khả dụng của chế phẩm từ Diệp hạ châu đắng.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Phạm Văn Sơn, Lữ Thị Kim Chi, Phan Nguyễn Trường Thắng, Nguyễn Ngọc Vinh (2017), “Nghiên cứu phân cấu lập hypophyllanthin từ cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. Et Thonn.) làm chất đối chiếu”, *Tạp chí Dược học*, 491 (57), tr. 55-58.
2. Phạm Văn Sơn, Phương Tráng Quân, Nguyễn Đăng Lâm, Nguyễn Ngọc Vinh (2017), “Nghiên cứu phân lập niranthin làm chất đối chiếu từ cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.)”, *Tạp chí Dược học*, 498 (57), tr. 32-35.
3. Pham Van Son, Tran Long Thai, Chuong Ngoc Nai, Pham Thi Thanh Thao, Nguyen Duc Tuan, Tran Viet Hung, Nguyen Ngoc Vinh (2020), “Simultaneous determination of phyllanthin, hypophyllanthin and niranthin in rabbit plasma by LC-MS/MS”, *International Journal of Pharmaceutical Research*, 12 (4), pp. 1974-1980.
4. Phạm Văn Sơn, Trần Long Thái, Phan Nguyễn Trường Thắng, Nguyễn Ngọc Vinh (2020), “Xây dựng quy trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin trong cây Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.)” bằng phương pháp HPLC, *Tạp chí Y Dược học – Dược học*; số 2 tháng 9 - 2020, tr. 144 - 148.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Bộ Y tế (2009), *Dược điển Việt Nam IV*, Nhà xuất bản Y học, tr.742-743.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, tr.1143-1144; tr.PL358-PL363.
3. Lữ Thị Kim Chi, Nguyễn Ngọc Vinh (2012), “Phân lập và thiết lập chuẩn phyllanthin từ cây Diệp hạ châu đắng *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.”, *Tạp chí Dược học*, 434 (6), tr. 39-44.
4. Võ Văn Chi (2018), *Từ Điển Cây Thuốc Việt Nam*, Nhà xuất bản Y học, tr. 438-439.
5. Trần Thu Huyền, Chử Đức Thành, Vũ Tuấn Anh và cs (2018), “Định lượng phyllanthin trong Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* L.) bằng sắc ký lỏng siêu hiệu năng sử dụng detector huỳnh quang”, *Tạp chí Y dược học Quân sự*, 3, tr. 26-31.
6. Lê Quan Nghiêm (2007), *Sinh dược học*, Đại học Y Dược Tp. Hồ Chí Minh, tr. 13-20, 39-55.
7. Nguyễn Kim Phi Phụng (2007), *Phương pháp cô lập hợp chất hữu cơ*, Nhà xuất bản Đại học quốc gia Tp. Hồ Chí Minh, tr. 244-255.
8. Huỳnh Ngọc Thụy (2008), “Nghiên cứu dược liệu Diệp hạ châu đắng *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn., Euphorbiaceae”, Luận án Tiến sĩ dược học. Đại Y Dược Tp. Hồ Chí Minh.
9. Trần Thùy Trang, Huỳnh Ngọc Thụy (2010), “Quantitative determination of phyllanthin in tree *phyllanthus* species collected in South Vietnam by HPLC – PDA method”, *Tạp chí Dược liệu*, 15 (6), tr. 369-373.
10. Trần Anh Tuấn, Trần Huy Thái, Nguyễn Quang Hưng và cs (2010), “Các hợp chất flavonoid và lignan từ cây chó đẻ thân xanh”, *Tạp chí Hóa học*, **48** (2), tr. 216-221.

Tiếng Anh

11. Abhyankar G., Suprasanna P., Pandey B. N. et al. (2010), “Hairy root extract of *Phyllanthus amarus* induces apoptotic cell death in human breast cancer cells”. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11, pp. 526-532.
12. Adeneye A. A. (2012), “The leaf and seed aqueous extract of *Phyllanthus amarus* improves insulin resistance diabetes in experimental animal studies”, *Journal of Ethnopharmacology*, 144 (3), pp. 705-711.
13. Adeneye A. A., Amole O. O., Adeneye A. K. (2006), “Hypoglycemic and hypocholesterolemic activities of the aqueous leaf and seed extract of *Phyllanthus amarus* in mice”, *Fitoterapia*, 77 (7-8), pp. 511-514.
14. Akinjogunla O. J., Eghafona N. O., Enabulele I. O., et al. (2010), “Antibacterial activity of ethanolic extracts of *Phyllanthus amarus* against extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from stool samples of HIV sero-positive patients with or without diarrhea”, *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 4 (6), pp. 402-407.
15. Alvari A., Rafsanjani O. S. M., Ahmed F. J. et al. (2011), “Rapid RP-HPLC technique for the determination of phyllanthin as bulk and its quantification in *Phyllanthus amarus* extract”, *International Journal of Phytomedicine*, 3, pp. 115-119.
16. Appiah-Opong R., Nyarko A. K., Doodoo D. et al. (2011), “Antiplasmodial activity of extracts of *Tridax procumbens* and *Phyllanthus amarus* in *in vitro* *plasmodium falciparum* culture systems”, *Ghana Medical Journal*, 4 (45), pp. 143-150.
17. Arvind K. T., Ram K. V., Anil K. G. et al. (2006), “Quantitative determination of phyllanthin and hypophyllanthin in *Phyllanthus* species by high-performance thin layer chromatography”, *Phytochemical Analysis*, 17, pp. 394–397.
18. Bhope S. G., Kuber V., Patil M. (2013), "Development and validation of RP-HPLC method for simultaneous analysis of andrographolide, phyllanthin, and

- hypophyllanthin from herbal hepatoprotective formulation", *Acta Chromatographica*, 25 (1), p. 159-169.
19. Committee on ASEAN reference substances (2005), *Guidelines for the establishment, handling, storage and use of Asean reference substances, Thailand*, pp. 2-12.
 20. Committee on ASEAN reference substances (2015), *ASEAN guideline for the conduct of bioequivalence studies, Lao*, pp. 1-25.
 21. Devi S., Rashid R., Kumar M. (2017), "Phytochemistry and pharmacological properties of *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.: A review", *The Pharma Innovation Journal*, 6 (12), pp. 169-172.
 22. Dhalwal K., Biradar S. Y., Rajani M. (2006), "High-performance thin-layer chromatography densitometric method for simultaneous quantitation of phyllanthin, hypophyllanthin, gallic acid, and ellagic acid in *Phyllanthus amarus*", *Journal of AOAC International*, 89 (3), pp. 619-623.
 23. European Medicines Agency (2015), *Guideline on bioanalytical method validation*, pp. 1-25.
 24. Fabian C. A., Omogbai K. E. (2007), "Hypotensive effect of aqueous extract of the leaves of *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn. (Euphorbiaceae)", *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 64 (6), pp. 547-552.
 25. Fan H., Zhang W., Wang J. et al. (2015), "HPLC-MS/MS method for the determination of four lignans from *Phyllanthus urinaria* L. in rat plasma and its application", *Bioanalysis*, 7 (6), pp. 701-712.
 26. Fang S., Raob Y. K., Tzeng Y. (2008), "Anti-oxidant and inflammatory mediator's growth inhibitory effects of compounds isolated from *Phyllanthus urinaria*", *Journal of Ethnopharmacology*, 116, pp. 333-340.
 27. Garg C., Verma S., Satija S. et al. (2016), "Microwave assisted extraction of bioactive compound phyllanthin from *Phyllanthus amarus* and optimization using central composite design", *International Journal of Pharmaceutical Science and Research*, 1 (7), pp. 30-35.
 28. Giancaspro I. G. (2019), *Reference Standards in the Analysis of Botanicals*, USP.

29. Hamrapurkar P., Pawar S., Phale M. (2010), “Quantitative HPTLC analysis of phyllanthin in *Phyllanthus amarus*”, *Journal of Planar Chromatography*, 23 (2), pp. 112-115.
30. Harikrishnan H. , Jantan I., Haque A. et al. (2018), “Anti-inflammatory effects of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. through inhibition of NF- κ B, MAPK, and PI3K-Akt signaling pathways in LPS-induced human macrophages”, *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, p. 224.
31. ICH Harmonised tripartite guideline (2005), *Validation of analytical procedures: text and methodology*, pp. 1-13.
32. Ilangkovan M., Jantan I., Bukhari S. N. (2016), “Phyllanthin from *Phyllanthus amarus* inhibits cellular and humoral immune responses in Balb/C mice”, *Phytomedicine*, 23 (12), pp. 1441-1450.
33. Inchoo M., Chirdchupunseree H., Pramyothin P. et al. (2011), “Endothelium-independent effects of phyllanthin and hypophyllanthin on vascular tension”, *Fitoterapia*, 82 (8), pp. 1231-1236.
34. International Organisation for Standardization (2015), *Guide 13528:2015 Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons*, 2, pp. 1-89.
35. Islam A., Selvan T., Mazumder U. K., Gupta M. et al. (2008), “Antitumour effect of phyllanthin and hypophyllanthin from *Phyllanthus amarus* against Ehrlich ascites carcinoma in mice”, *Pharmacologyonline*, 2, pp. 796-807.
36. Joshi C. S., Sanmuga P. E. (2007), “ β -Glucuronidase inhibitory effect of phenolic constituents from *Phyllanthus amarus*”, *Pharmaceutical Biology*, 45 (5), pp. 363-365.
37. Joshi H., Parle M. (2007), “Pharmacological evidences for anti-amnesic potentials of *Phyllanthus amarus* in mice”, *African Journal of Biomedical Research*, 10 (2), pp. 165-173.
38. Kandavel D., Sekar S. (2015), “Impact of certain biotic and abiotic factors on phyllanthin and hypophyllanthin content of *Phyllanthus Amarus* Schum.&

- Thonn.”, *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7 (5), pp. 258-265.
39. Karuna R., Reddy S. S., Baskar R. et al. (2009), “Antioxidant potential of aqueous extract of *Phyllanthus amarus* in rats”, *Indian Journal of Pharmacology*, 41 (2), pp. 64-67.
40. Kassuya C. A. L., Leite D. F. P., Melo L. V. et al. (2005), “Anti-inflammatory properties of extracts, fractions and lignans isolated from *Phyllanthus amarus*”, *Planta Medica*, 71 (8), pp. 721-726.
41. Kassuya C. A. L., Silvestre A. A., Menezes-de-Lima O. J., Marotta D. M. et al. (2006), “Antiinflammatory and antiallodynic actions of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus amarus*. Evidence for interaction with platelet activating factor receptor”, *European Journal of Pharmacology*, 546 (1-3), pp. 182-188.
42. Kassuya C. A. L., Silvestre A. A., Rehderb G. V. et al. (2006), “Anti-allodynic and anti-oedematogenic properties of the extract and lignans from *Phyllanthus amarus* in models of persistent inflammatory and neuropathic pain”, *European Journal of Pharmacology*, 478, pp. 145-153.
43. Ketmongkhonsit P., Chaichantipyuth C., Palanuvej C. et al. (2015), “A validated TLC-image analysis method for detecting and quantifying bioactive phyllanthin in *Phyllanthus amarus* and commercial herbal drugs”, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 37 (3), pp. 319-326.
44. Khabiya R., Upadhyay D., Anandjiwala S. (2014), “Simultaneous quantification of three bioactive lignans, viz., phyllanthin, hypophyllanthin, and niranthin from *Phyllanthus amarus* using high-performance thin-layer chromatography”, *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC*, 27 (4), pp. 281-286.
45. Khan K. H. (2009), “Roles of *Embllica officinalis* in medicine - A review”, *Botany Research International*, 2 (4), pp. 218-228.

46. Khatoon S., Rai V., Rawat A. K. S. et al. (2006), "Comparative pharmacognostic studies of three *Phyllanthus* species", *Journal of Ethnopharmacology*, 104 (1-2), pp. 79-86.
47. Kumar B., Kumar S., Madhusudanan K. P. (2020), *Phytochemistry of Plants of Genus Phyllanthus*, CRC Press, 1, pp. 5-45.
48. Kushwahaa S. K., Dashorab A., Dashoraa N. et al. (2013), "Acute oral toxicity studies of the standardized methanolic extract of *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn.", *Journal of Pharmacy Research*, 6, pp. 720-724.
49. Lee S. H., Jaganath I. B., Wang S. M. et al. (2011), "Antimetastatic effects of *Phyllanthus* on human lung (A549) and breast (MCF-7) cancer cell lines", *PLoS ONE*, 6 (6), pp. 1-14.
50. Liu S. et al. (2014), "In vitro and in vivo anti-hepatitis B virus activities of the lignan niranthin isolated from *Phyllanthus niruri* L.", *Journal Ethnopharmacol*, **155** (2), pp. 1061-1067.
51. Londhe J. S., Devasagayam T. P. A., Foo L. Y. et al. (2008), "Antioxidant activity of some polyphenol constituents of the medicinal plant *Phyllanthus amarus* Linn.", *Redox Report*, 13 (5), pp. 199-207.
52. Maciel M. A. M., Cunha A. F., Dantas T. N. C. (2007), "NMR Characterization of Bioactive Lignans from *Phyllanthus amarus* Schum & Thorn", *Annals of Magnetic Resonance*, 6 (3), pp. 76-82.
53. Maciel M. A. M., Cunha A. F., Kaiser C. R. et al. (2012), "Chemical constituents from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. and its pharmacological effectiveness", *Medicinal plants: phytochemistry, pharmacology and therapeutics*, 2 (3), pp. 41-52.
54. Maciel M. A. M., Gineide C., Revoredo M. S. (2019), "Botanic, phytochemistry and pharmacological aspects of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. as powerful tools to improve its biotechnological studies", *Annals of Chemical Science Research*, 1 (2), pp. 1-9.

55. Mahat M. A., Patil B. M. (2007), "Evaluation of antiinflammatory activity of methanol extract of *Phyllanthus amarus* in experimental animal models", *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69 (1), pp. 33-36.
56. Meena J., Sharma R. A. , Rolania R. (2018), "A review on phytochemical and pharmacological properties of *Phyllanthus amarus* Schum. and Thonn.", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 4 (9), pp. 1377-1386.
57. Mohamed S. I. A., Jantan I., Nafiah M. A. et al. (2018), "Dendritic cells pulsed with generated tumor cell lysate from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. induces anti-tumor immune response", *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18, pp. 232-244.
58. Murugaiyah V., Chan K. L. (2007), "Analysis of lignans from *Phyllanthus niruri* L. in plasma using a simple HPLC method with fluorescence detection and its application in a pharmacokinetic study", *Journal of Chromatography B*, 852 (1-2), pp. 138-144.
59. Murugaiyah V., Chan K. L. (2007), "Determination of four lignans in *Phyllanthus niruri* L. by a simple high-performance liquid chromatography method with fluorescence detection", *Journal of Chromatography A*, 1154 (1-2), pp. 198-204.
60. Naaza F., Javed S., Abdina M. Z. (2007), "Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn. on aflatoxin B₁-induced liver damage in mice", *Journal of Ethnopharmacology*, 113 (3), pp. 503-509.
61. Nayak S. P., Upadhyay A., Dwivedi K. S. et al. (2010), "Quantitative determination of phyllanthin in *Phyllanthus amarus* by high performance thin layer chromatography", *Medicinal and Aromatic Plants*, 9 (5), pp. 353-358.
62. Nguyen Duc Hanh, Sinchaipanid N. and Mitrevej A. (2013), "Physicochemical characterization of phyllanthin from *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn." *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 40 (6), pp. 793-802.

63. Nguyen Van Long, Chu Van Men, Vu Tuan Anh et al. (2019), "A new LC/MS/MS method for the analysis of phyllanthin in rat plasma and its application on comparative bioavailability of phyllanthin in different formulations after oral administration in rats", *Pharmacogn Journal*, 11 (5), pp. 968-975.
64. Nguyen Van Tang, Bowyer M. C., Van Altena I. A. et al. (2016), "Optimisation of microwave-assisted extraction from *Phyllanthus amarus* for phenolic compounds-enriched extracts and antioxidant capacity", *Chemical Papers*, 70, pp. 713-725.
65. Nguyen Van Tang, Pham H. N. T., Bowyer M. C et al. (2016), "Influence of solvents and novel extraction methods on bioactive compounds and antioxidant capacity of *Phyllanthus amarus*", *Chemical Papers*, 70, pp. 556-566.
66. Nguyen Van Tang, Vuong Q. V., Bowyer, M.C. et al. (2015), "Effects of different drying methods on bioactive compound yield and antioxidant capacity of *Phyllanthus amarus*", *Drying Technology Journal*, 33, pp. 1006-1017.
67. Noor M. A. N., Nafiah A. M., Johari T. T. A. S, Hasnan H. H. M. et al. (2019), "Anticancer effect of hypophyllanthin, niranthin and lintetralin from *Phyllanthus amarus* on hela cells and NIH/3T3 Cells", *International Journal of Recent Technology and Engineering*, 8 (2S7), pp. 106-110.
68. Ofuegbe O. S., Adedapo A.A., Adeyemi A. A. (2014), "Anti-inflammatory and analgesic activities of the methanol leaf extract of *Phyllanthus amarus* in some laboratory animals", *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, 25 (2), pp. 175-180.
69. Ojezele M. O., Igbe I., Okhurobo A. (2018), "Reproductive indices in malaria infested mice treated with antimalarials *Phyllanthus amarus* combined with vitamins", *Bulletin of Faculty of Pharmacy*, 56 (2), pp. 179-184.
70. Ojezele M. O., Moke E. G., Onyesom I. (2017), "Impact of generic antimalarial or *Phyllanthus amarus* and vitamin co-administration on antioxidant status

- of experimental mice infested with *Plasmodium berghei*”, *Journal of Basic and Applied Sciences*, 6 (3), pp. 260-265.
71. Opong R. A., Nyarko A. K., Dodoo D. et al. (2011), “Antiplasmodial activity of extracts of *Tridax procumbens* and *Phyllanthus amarus* in *in vitro Plasmodium Falciparum* culture systems”, *Ghana Medical Journal*, 45 (4), pp. 143-150.
 72. Owolabi O.A., James D.B., Anigo K.M. et al. (2011), “Combined effect of aqueous extracts of *Phyllanthus amarus* and *Vitex doniana* Stem Bark on blood glucose of streptozotocin (STZ) induced diabetes rats and some liver biochemical parameters”, *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2 (3), pp. 143-147.
 73. Oyewo E. B., Adewumi M. A., Adeniran S. A. (2012), “Immunomodulation capabilities of aqueous leaf extract of *Phyllanthus amarus* in male Wistar rats”, *Report and Opinion*, 4, p. 1-5.
 74. Parvathaneni M. (2013), “Investigation of pharmacological activities, formulation of liposomes and pharmacokinetic studies of lignans from aerial parts of *Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn.”, *Pharmaceutical Sciences and Research*, pp. 48-55,160 -163.
 75. Parvathaneni M., Battu R. G., Jangiti R. et al. (2014), “Pharmacokinetic study of phyllanthin and hypophyllanthin after oral administration to rats”, *Pharmacognosy Journal*, 6 (2), pp. 124-130.
 76. Patel J. R., Tripathi P., Sharma V. et al. (2011), “*Phyllanthus amarus*: ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology: A review”, *Journal of Ethnopharmacology*, 138 (2), pp. 286-313.
 77. Pathak M., Singh U.K, Upadhyay G. (2017), “Antibacterial activity of *Phyllanthus amarus* plant extract against resistant pathogenic bacterial strains: An ethanomedicinal plant”, *Asian Journal of Science and Technology*, 08 (09), pp. 5672-5674.

78. Pereira R. G., Nakamura N. R., Rodrigues N. V. M et al. (2017), "Supercritical fluid extraction of phyllanthin and niranthin from *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn.", *The Journal of Supercritical Fluids*, 127, pp. 23-32.
79. Pramyothin P., Ngamtin C., Pongshompoo So. et al. (2007), "Hepatoprotective activity of *Phyllanthus amarus* Schum. et. Thonn. extract in ethanol treated rats: *in vitro* and *in vivo* studies", *Journal of Ethnopharmacology*, 14 (2), pp. 169-173.
80. Putakala M., Gujjala S., Nukala S. et al. (2017), "Cardioprotective effect of *Phyllanthus amarus* against high fructose diet induced myocardial and aortic stress in rat model", *Biomed Pharmacother*, 95, pp. 1359-1368.
81. Qi Weiyan, Lei Hua, Kun Gao (2014), "Chemical constituents of the plants from the genus *Phyllanthus*", *Chemistry & Biodiversity*, 11 (3), pp. 364-395.
82. Rai P., Patil P., Rajput J. S. (2009), "Simultaneous determination of phyllanthin and hypophyllanthin in herbal formulation by derivative spectrophotometry and liquid chromatography", *Pharmacognosy Magazine*, 5 (18), pp. 151-158.
83. Ravikumar Y. S., Ray U., Nandhitha M. et al. (2011), "Inhibition of hepatitis C virus replication by herbal extract: *Phyllanthus amarus* as potent natural source", 158 (1-2), pp. 89-97.
84. Sainvitu P., Nott K., Richard G. (2012), "Structure, properties and obtention routes of flaxseed lignan secoisolariciresinol: A review", *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment*, 16 (1), pp. 115-124.
85. Santoshkumar, Jeevangi, Manjunath S. et al. (2013), "A study of anti-hyperlipidemia, hypolipidemic and anti-atherogenic activity of fruit of *Emblica officinalis* (amla) in high fat fed albino rats", *International Journal of Medical Research & Health Sciences*, 1 (2), pp. 70-77.
86. Saranraj P., Sivasakthivelan P. (2012), "Screening of antibacterial activity of the medicinal plant *Phyllanthus amarus* against urinary tract infection causing bacterial pathogens", *Applied Journal of Hygiene*, 1 (3), pp. 19-24.

87. Sen D. A., Batra A. (2013), "The study of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activity and total phenolic content of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn.: A medicinally important plant", *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5 (3), pp. 942-947.
88. Sharad M. M., Sinnathambi A., Kapase U. C. et al. (2011), "Anti- arthritic activity of standardised extract of *Phyllanthus amarus* in Freund's complete adjuvant induced arthritis", *Biomedicine & Aging Pathology*, 2011, pp. 85-190.
89. Shukla P., Gopalkrishna B., Shukla P. (2012), "Isolation of rutin from *Phyllanthus amarus*", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3 (4), pp. 1198-1201.
90. Singh M., Tiwari N., Shanker K. et al. (2009), "Two new lignans from *Phyllanthus amarus*", *Journal of Asian Natural Products Research*, 11 (6), pp. 562-568.
91. Sparzak B., Baranowska M. K., Kawiak A. (2015), "Cytotoxic lignan from the non-transformed root culture of *Phyllanthus amarus*", *Molecules*, pp. 7915-7924.
92. Srivastava V., Singh M., Malasoni R. et al. (2008), "Separation and quantification of lignans in *Phyllanthus* species by a simple chiral densitometric method", *Journal of Separation Science*, 31, pp. 47-55.
93. Syed B. A., Iqbal M. M., Kiranmai M. et al. (2012), "Hepatoprotective Activity of *Phyllanthus amarus* Seeds Extracts in CCl₄ Treated Rats: *in vitro* & *in vivo*", *Global Journal of Medical Research*, 12 (6), pp. 1-6.
94. Takhtajan A. (2009). *Flowering plants*, 2nd Ed, New York: Springer, pp.74-75
95. Tamil I. G., Dineshkumar B., Nandhakumar M. (2010), "*In vitro* study on α -amylase inhibitory activity of an Indian medicinal plant, *Phyllanthus amarus*", *Indian Journal of Pharmacology*, 42 (5), pp. 280-282.
96. Tang Y. Q., Jaganath I., Manikam R., Sekaran S. D. (2013), "Phyllanthus suppresses prostate cancer cell, PC-3, proliferation and induces apoptosis through multiple signalling pathways (MAPKs, PI3K/Akt, NF B, and

- Hypoxia)”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, pp. 1-13.
97. U.S. Department of Health and Human Services (2018), *Food and Drug Administration Bioanalytical Method Validation*, pp. 1-42.
 98. U.S. Pharmacopeial Convention (2020), *Herbal Medicines Compendium, Phyllanthus amarus aerial parts and Powdered Phyllanthus amarus*.
 99. Ushie O., Neji P., Etim E. (2013), “Phytochemical screening and antimicrobial activities of *Phyllanthus amarus* stem bark extracts”, *International Journal of Modern Biology and Medicines*, 3, pp. 101-112.
 100. Verma S., Sharma H., Garg M. (2014), “*Phyllanthus Amarus*: A Review”, *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3 (2), pp. 18-22.
 101. World Health Organization (2006), *General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances*, pp. 59-82.
 102. Yuandani, Ilangkovan M., Jantan I. et al. (2013), “Inhibitory effects of standardized extracts of *Phyllanthus amarus* and *Phyllanthus urinaria* and their marker compounds on phagocytic activity of human neutrophils”, *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2013, pp. 1- 9.
 103. Zöllner T., Schwarz M. (2013), “Herbal Reference Standards: Applications, definitions and regulatory requirements”, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 23 (1), pp. 1-21.
 104. Zubair M. F., Atolani O., Ibrahim S. O. et al. (2017), “Chemical constituents and antimicrobial properties of *Phyllanthus amarus* (Schum & Thonn)”, *Bayero Journal of Pure and Applied Sciences*, 10 (1), pp. 238-246.
 105. National Center for Biotechnology Information, “Phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin, nirtetralin, phyltetralin”, Pubchem web page [online]. URL: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>> (Access on: 15/10/2020).

DANH MỤC PHỤ LỤC

	Trang
Phụ lục 1. Sắc ký đồ kiểm tra độ tinh khiết của các chất phân lập.....	PL-2
Phụ lục 2. Dữ liệu phổ của chất PA ₂ phân lập (niranthin)	PL-5
Phụ lục 3. Dữ liệu phổ của chất PA ₃ phân lập (nirtetralin).....	PL-15
Phụ lục 4. Dữ liệu phổ của chất PA ₄ phân lập (hypophyllanthin).....	PL-25
Phụ lục 5. Dữ liệu phổ của chất PA ₅ phân lập (phyltetralin)	PL-36
Phụ lục 6. Dữ liệu phổ của chất PA ₆ phân lập (phyllanthin).....	PL-46
Phụ lục 7. Quy trình xác định độ tinh khiết sắc ký của hypophyllanthin bằng phương pháp HPLC.....	PL-56
Phụ lục 8. Quy trình xác định độ tinh khiết sắc ký của niranthin bằng phương pháp HPLC	PL-63
Phụ lục 9. Quy trình xác định độ tinh khiết sắc ký của nirtetralin bằng phương pháp HPLC	PL-70
Phụ lục 10. Phiếu phân tích hypophyllanthin và niranthin.....	PL-77
Phụ lục 11. Quy trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin trong cao Diệp hạ châu đắng bằng phương pháp HPLC	PL-83
Phụ lục 12. Dự thảo Tiêu chuẩn cơ sở Cao khô Diệp hạ châu đắng.....	PL-99
Phụ lục 13. Điều chế Cao giàu lignan dùng làm cao đối chiếu Diệp hạ châu đắng	PL-103
Phụ lục 14. Quy trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin, và niranthin trong huyết tương thỏ bằng phương pháp LC-MS/MS	PL-111
Phụ lục 15. Kết quả định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ	PL-121

PHỤ LỤC 1. SẮC KÝ ĐỒ KIỂM TRA ĐỘ TINH KHIẾT CỦA CHẤT PHÂN LẬP ĐƯỢC

EtOAc (100)



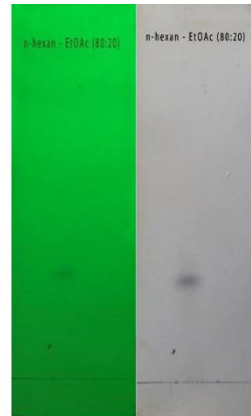
PA₁

Toluen – EtOAc (2 : 1)



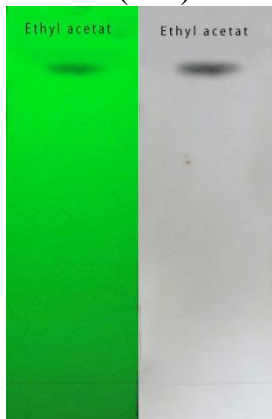
PA₁

n-hexan – EtOAc (20 : 80)



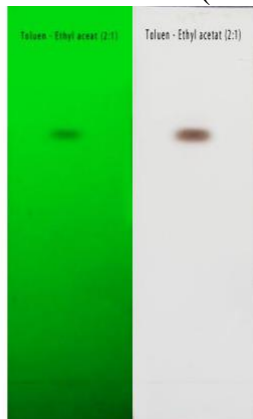
PA₁

EtOAc (100)



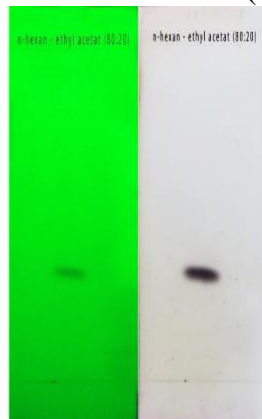
PA₂

Toluen – EtOAc (2 : 1)



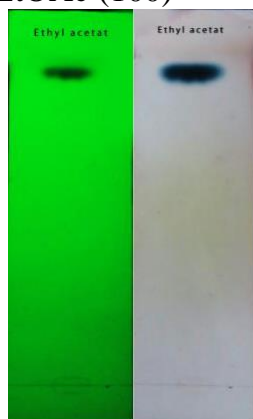
PA₂

n-hexan – EtOAc (20 : 80)



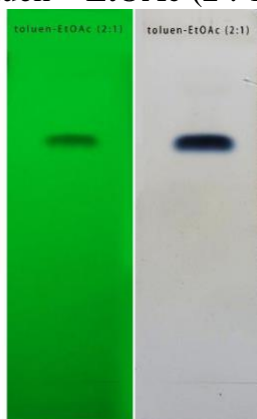
PA₂

EtOAc (100)



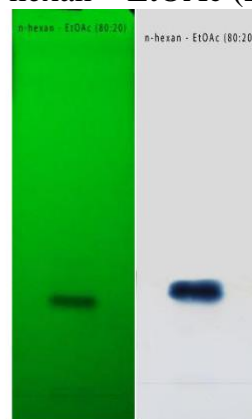
PA₃

Toluen – EtOAc (2 : 1)

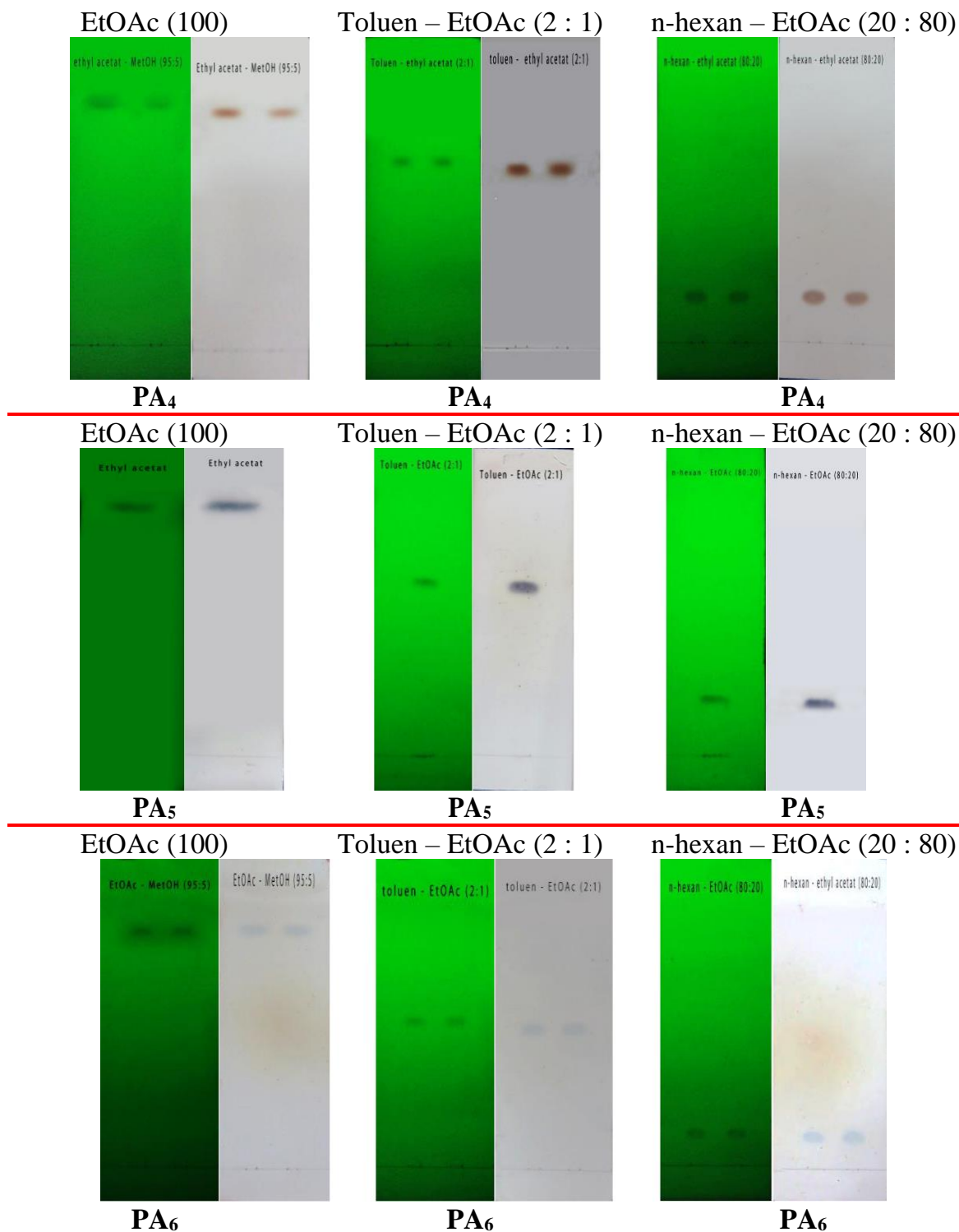


PA₃

n-hexan – EtOAc (20 : 80)

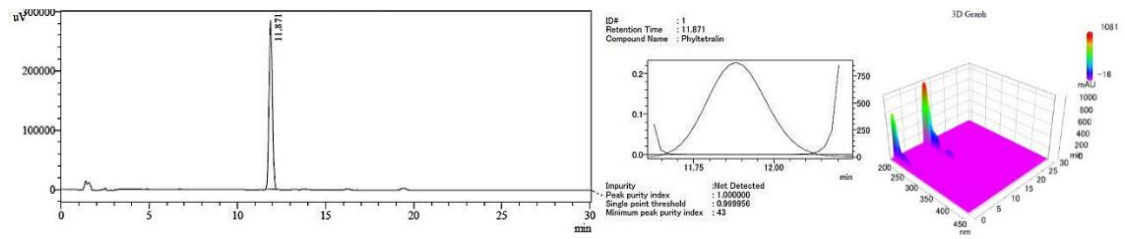


PA₃

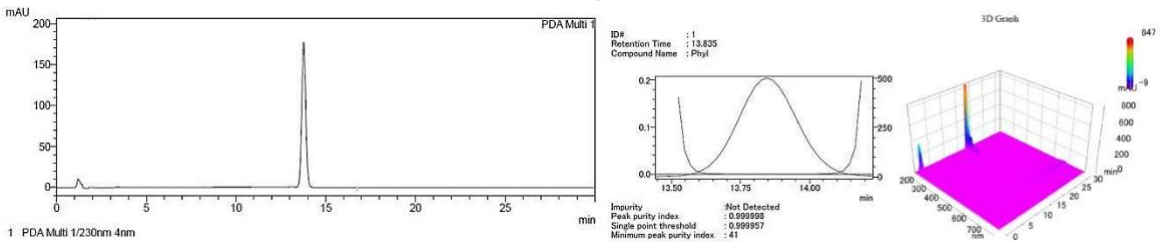


Hình PL1.1. Sắc ký đồ SKLM kiểm tra độ tinh khiết của chất phân lập được

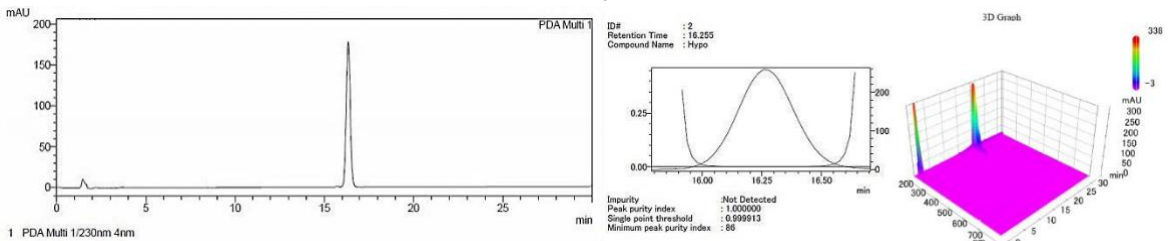
PL-4



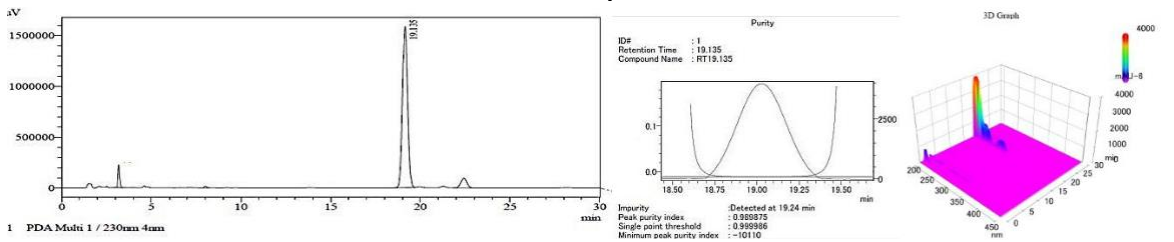
PA5



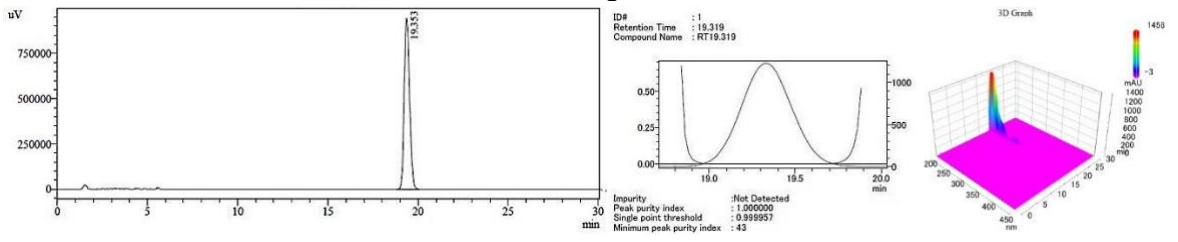
PA6



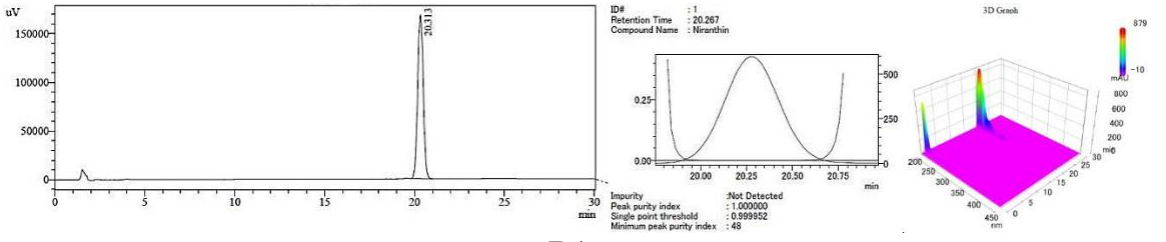
PA4



PA1



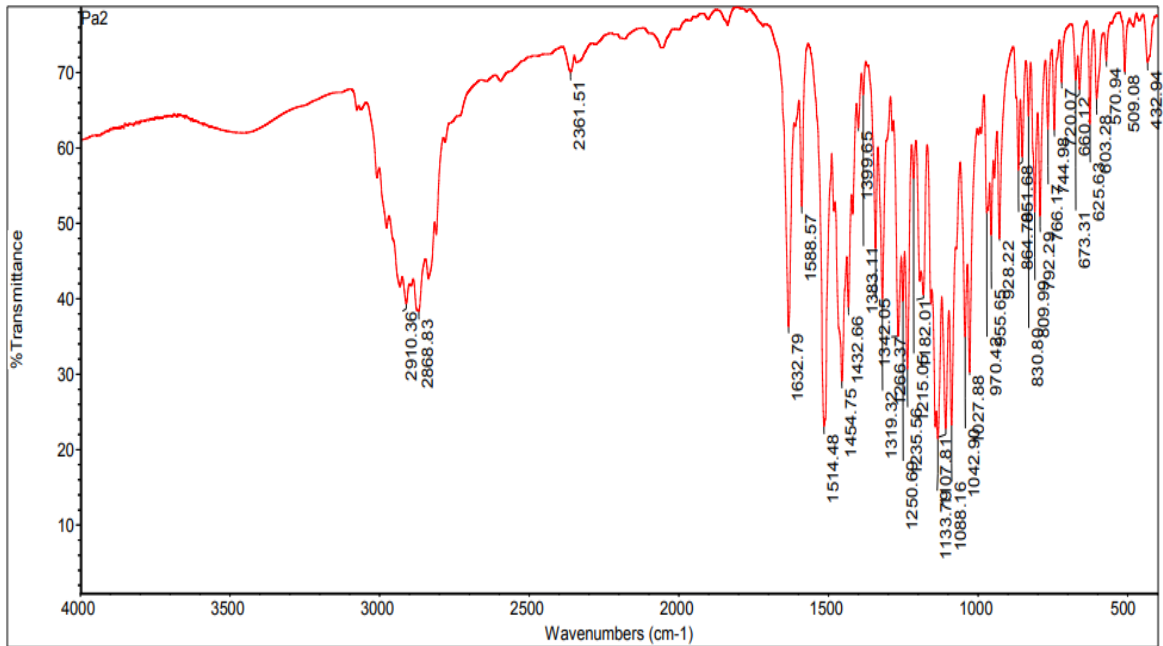
PA2



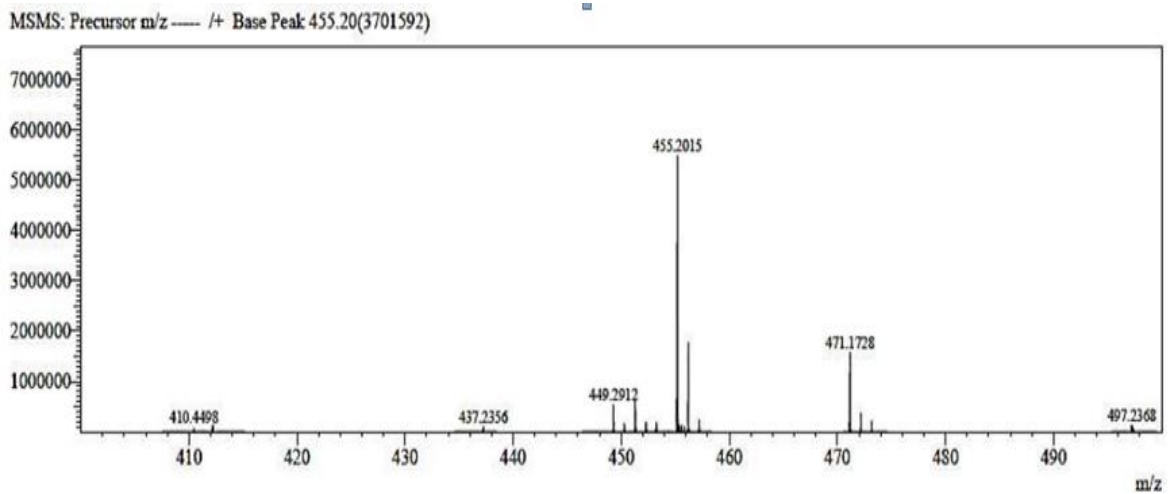
PA3

Hình PL1.2. Sắc ký đồ HPLC kiểm tra độ tinh khiết của chất phân lập được

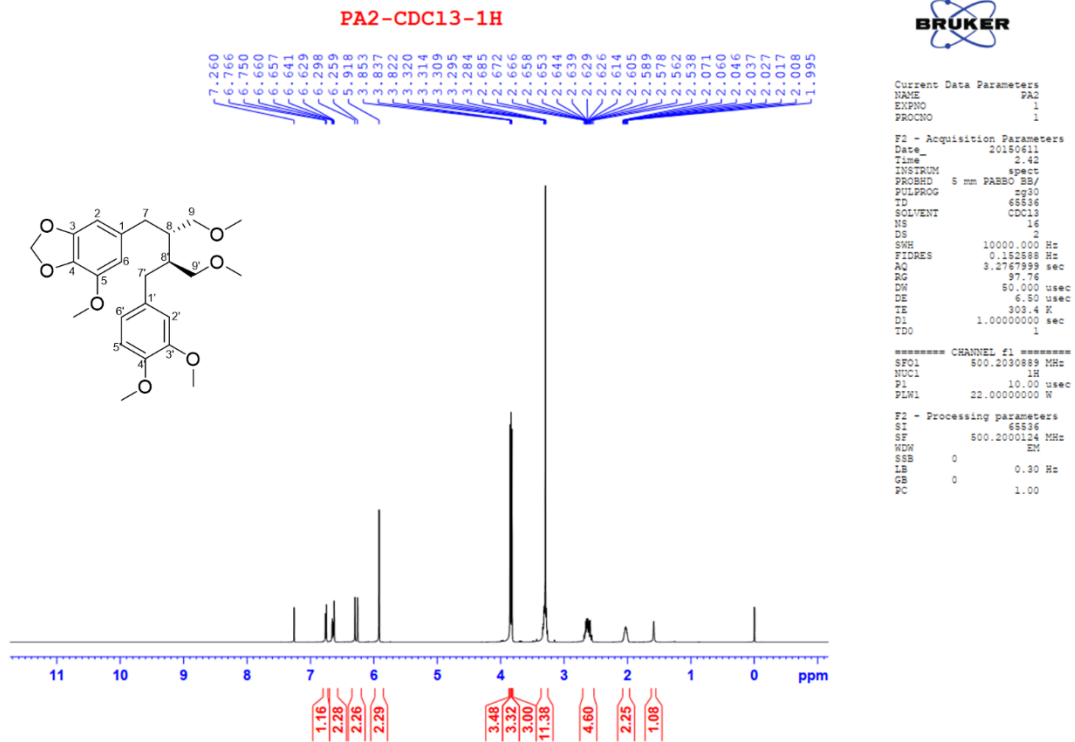
PHỤ LỤC 2. DỮ LIỆU PHỔ CHẤT PA₂ PHÂN LẬP (NIRANTHIN)



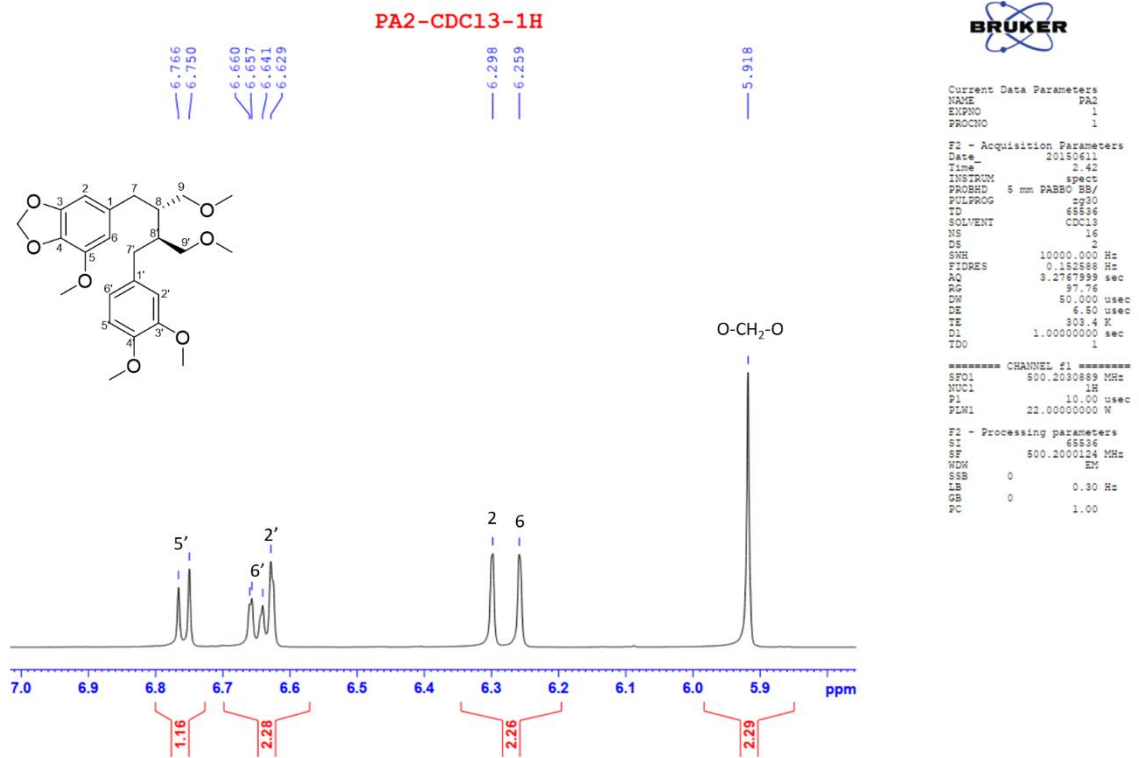
Hình PL2.1. Phổ IR của chất PA₂



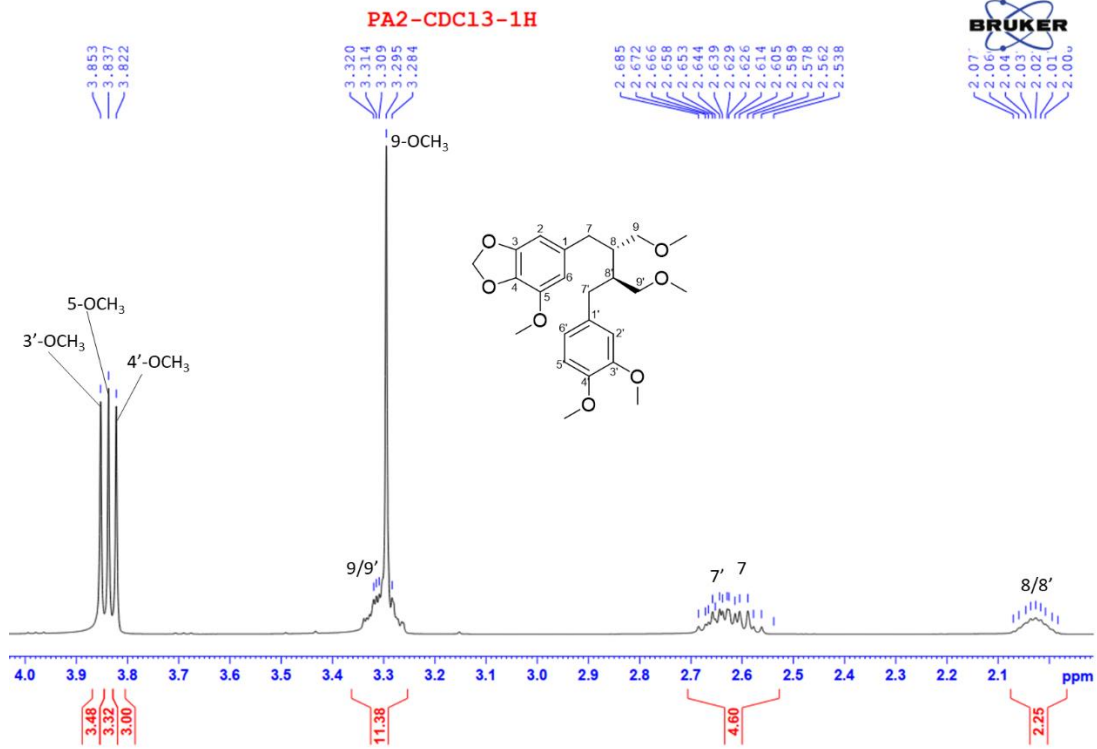
Hình PL2.2. Phổ MS của chất PA₂



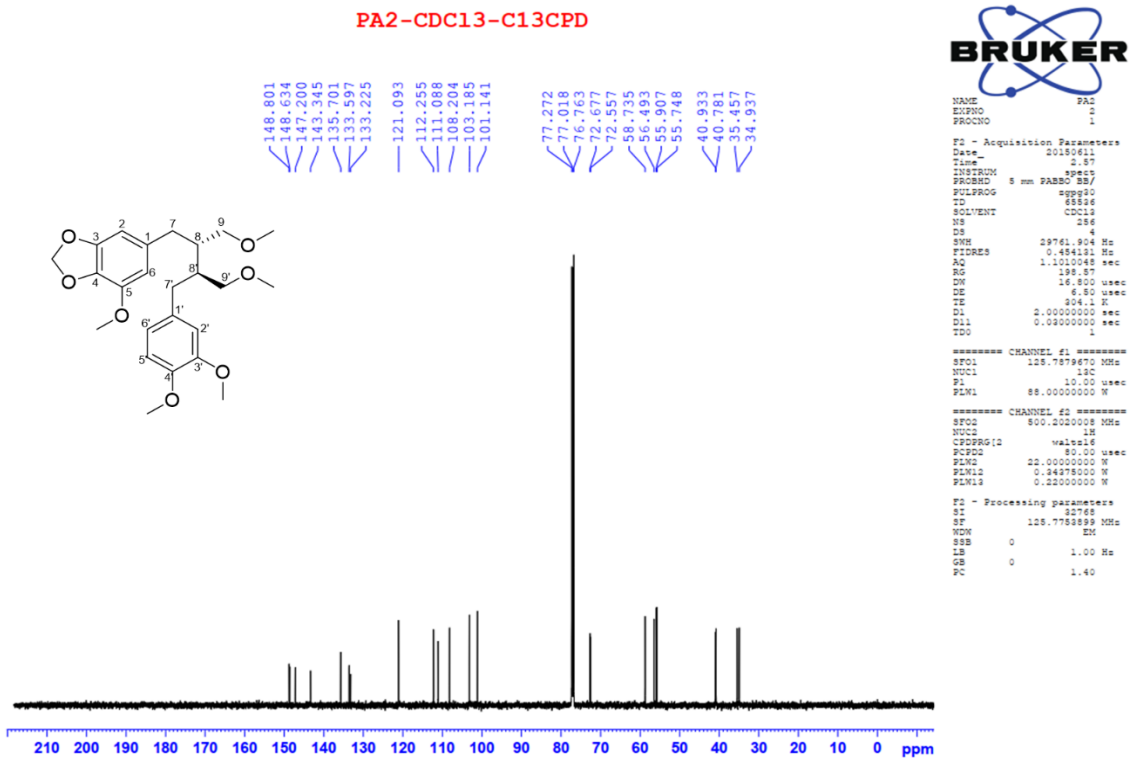
Hình PL2.3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) của chất PA_2



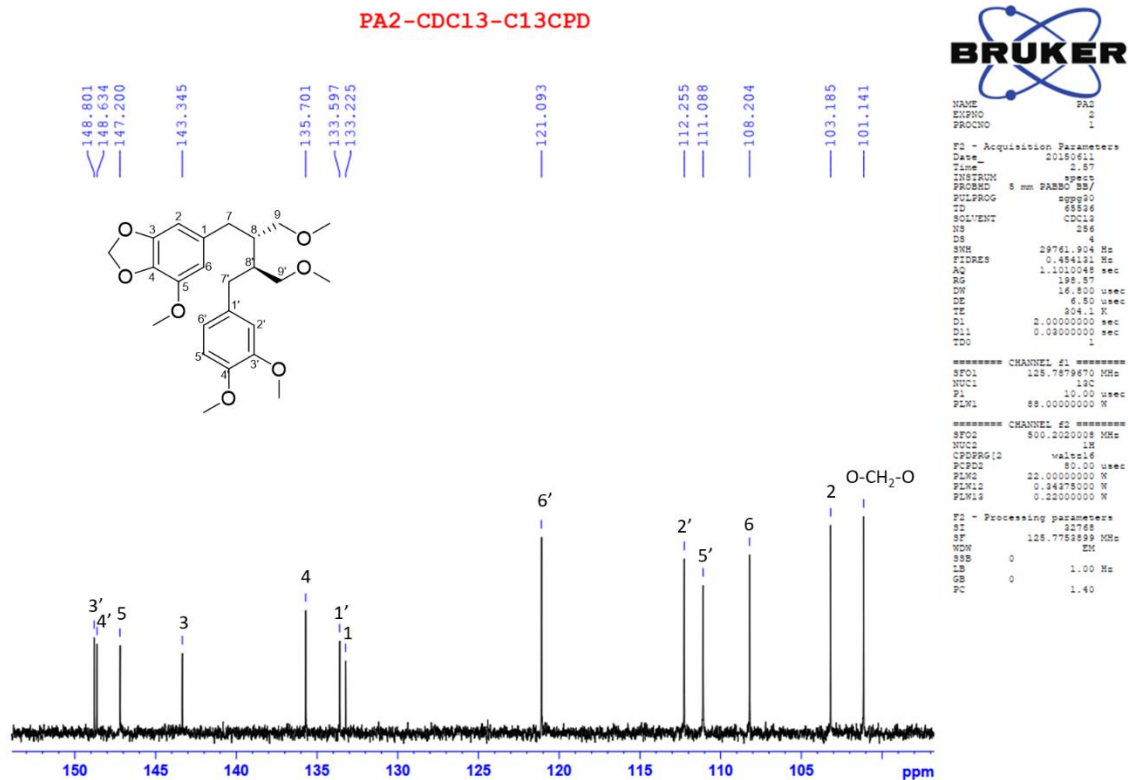
Hình PL2.4. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) của chất PA_2 trích vùng 5,8-7,0 ppm



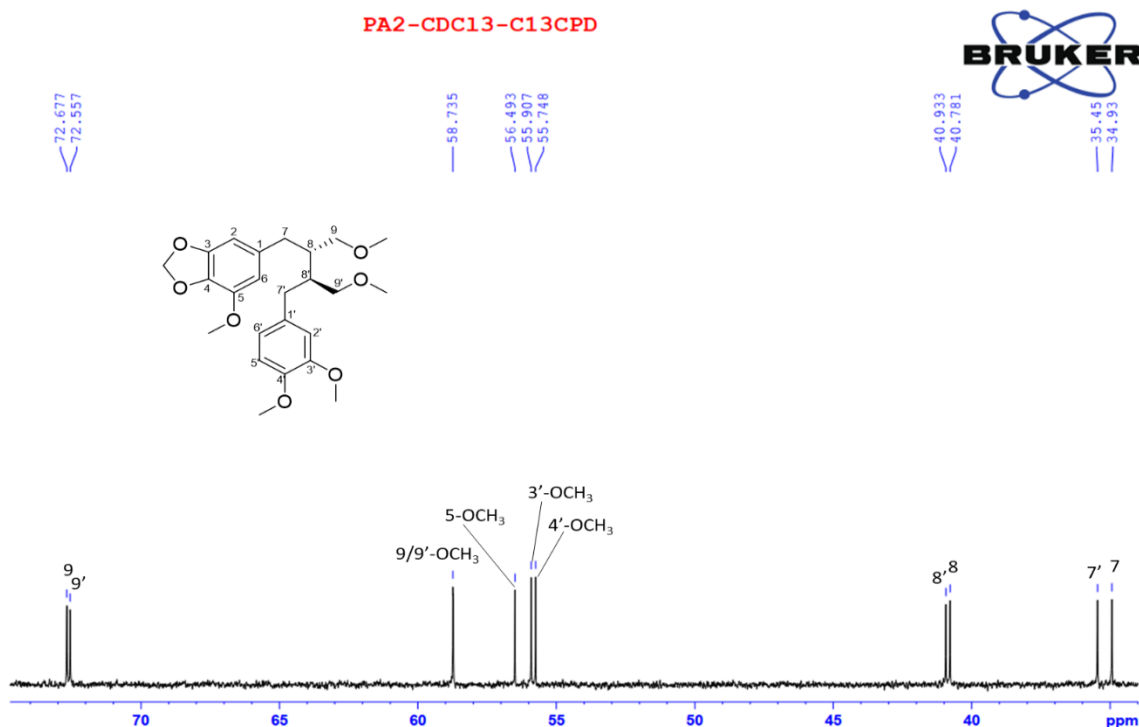
Hình PL2.5. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) của chất PA₂ trích vùng 2,0-4,0 ppm



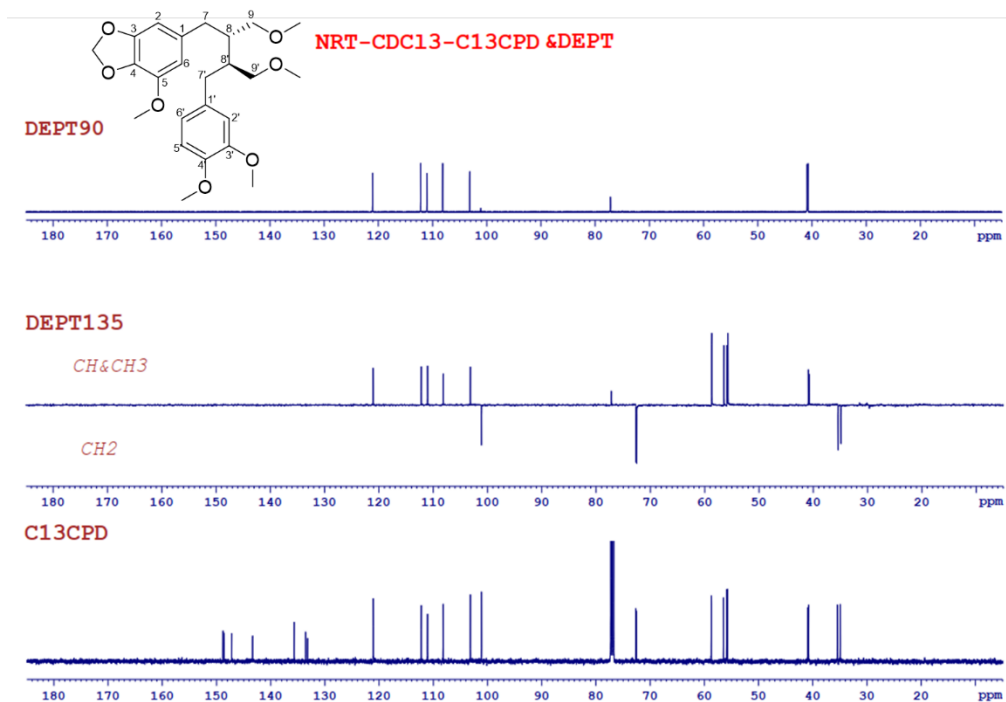
Hình PL2.6. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) của chất PA₂



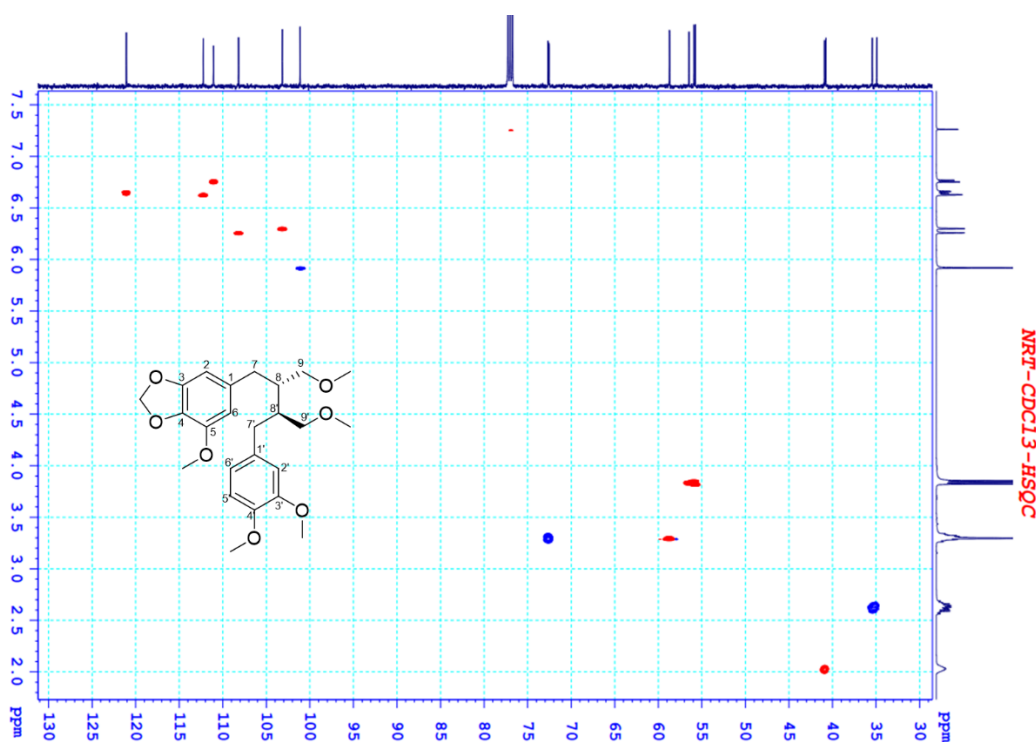
Hình PL2.7. Phổ ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) của chất PA₂ trích vùng 100-150 ppm



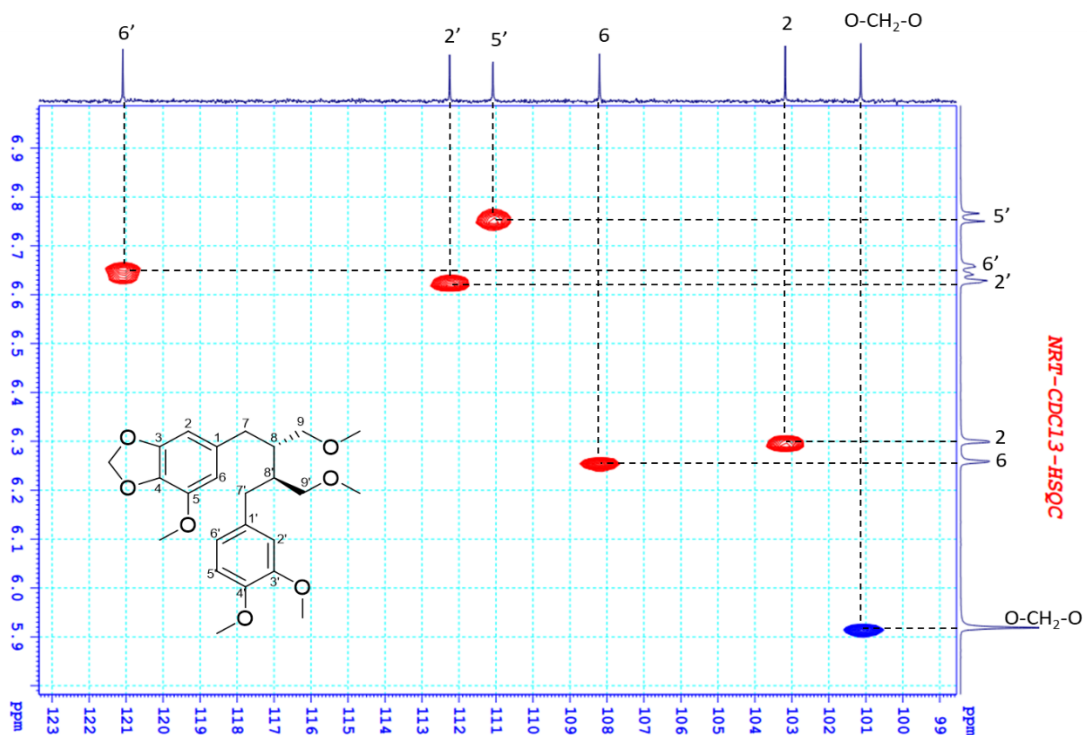
Hình PL2.8. Phổ ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) của chất PA₂ trích vùng 35-75 ppm



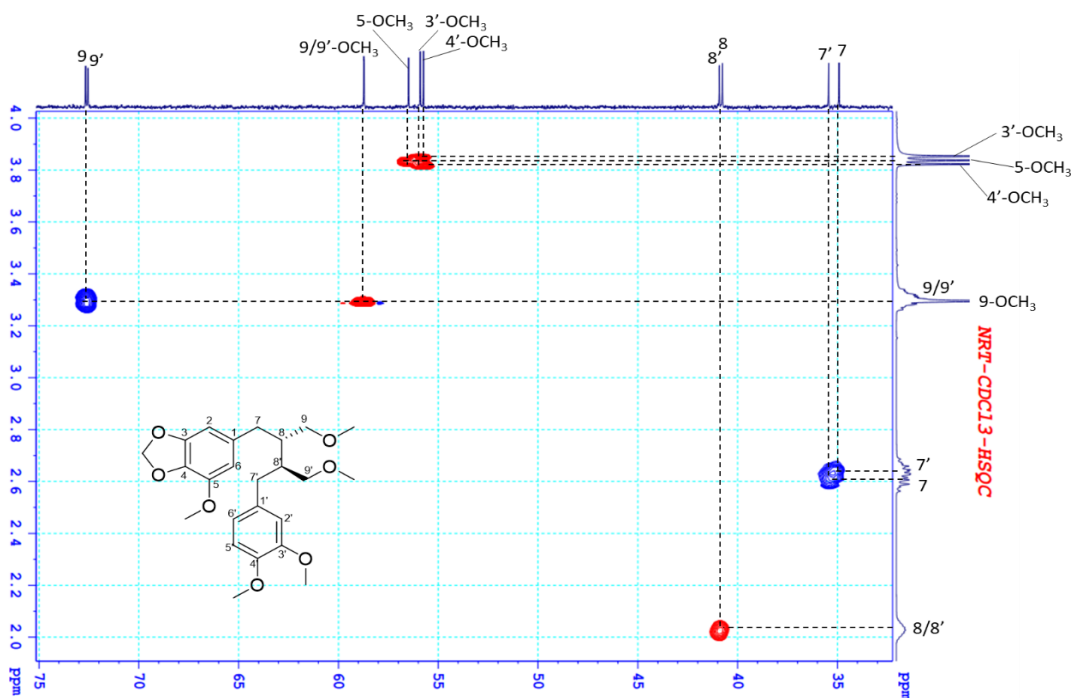
Hình PL2.9. Phổ DEPT (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₂



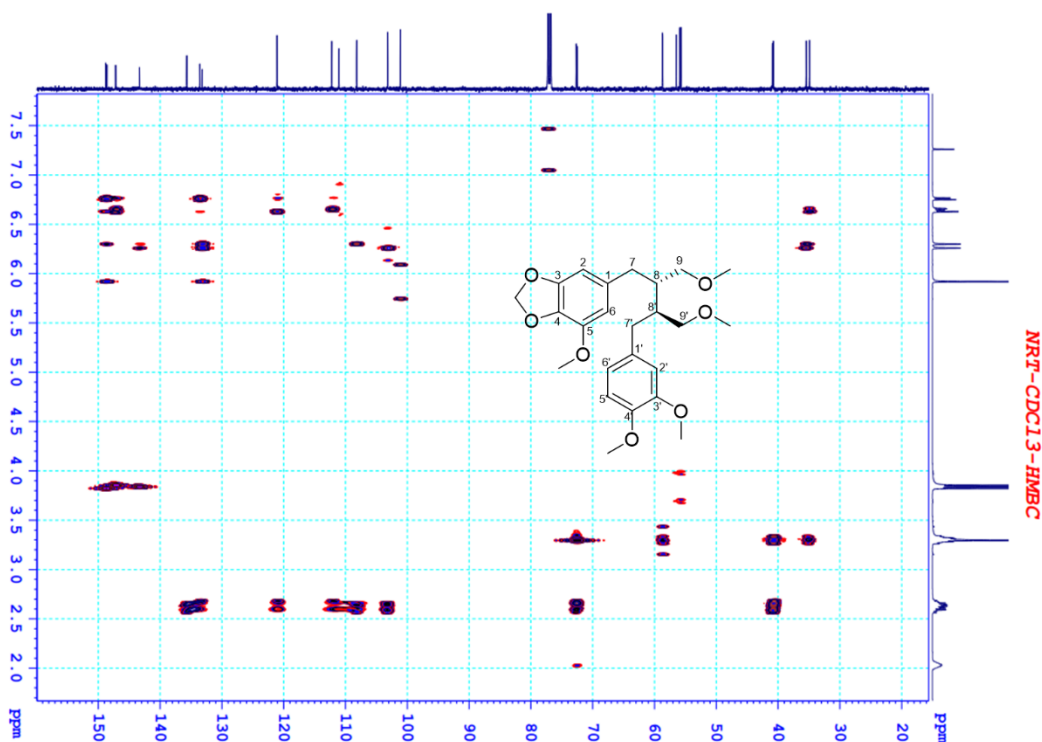
Hình PL2.10. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₂



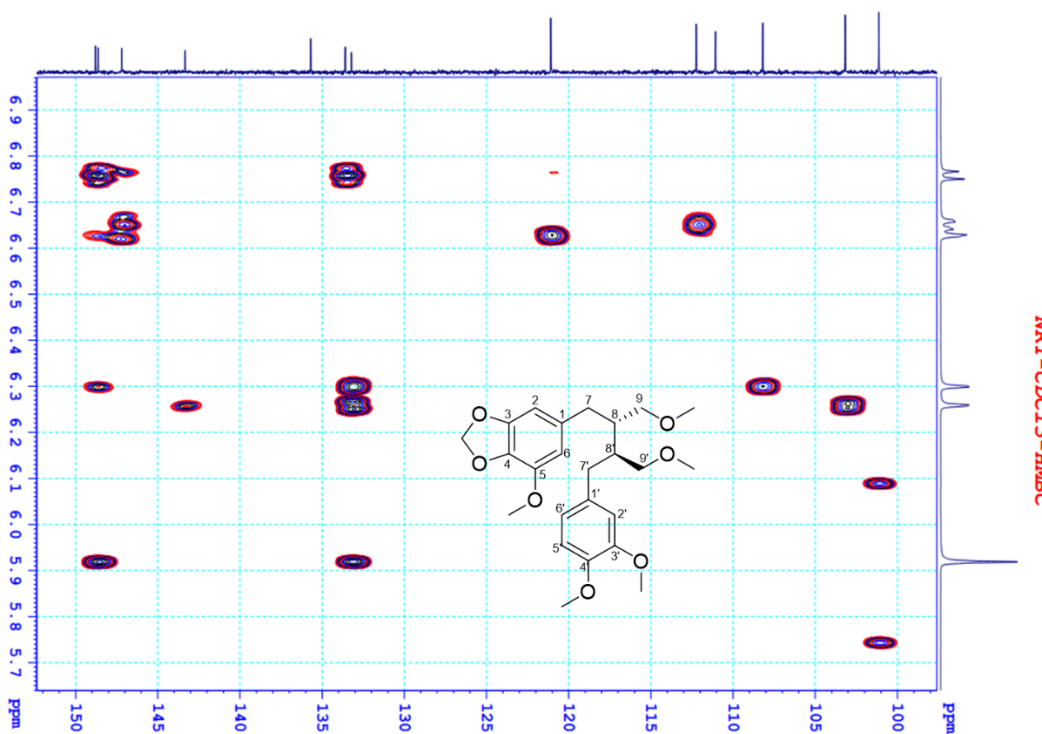
Hình PL2.11. Phổ HSQC (CDCl_3 , 125/500 MHz) của chất PA_2 trích vùng 5,8-7,0 ppm x 99-123 ppm



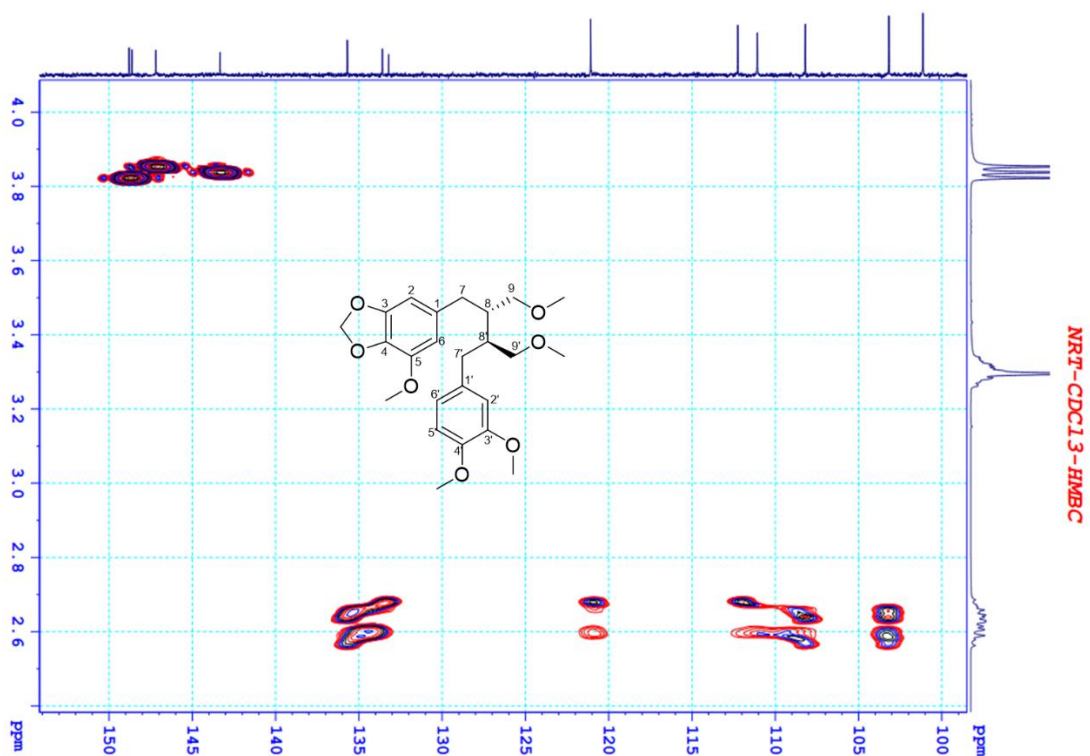
Hình PL2.12. Phổ HSQC (CDCl_3 , 125/500 MHz) của chất PA_2 trích vùng 2,0 - 4,0 ppm x 30-75 ppm



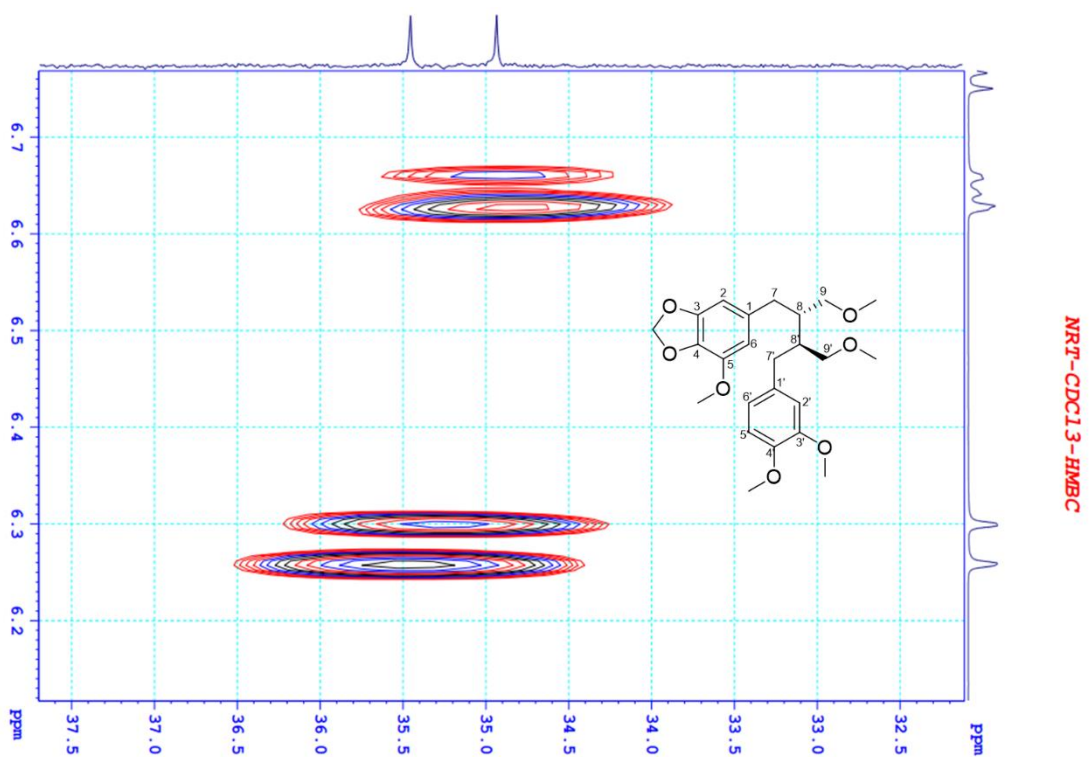
Hình PL2.13. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₂



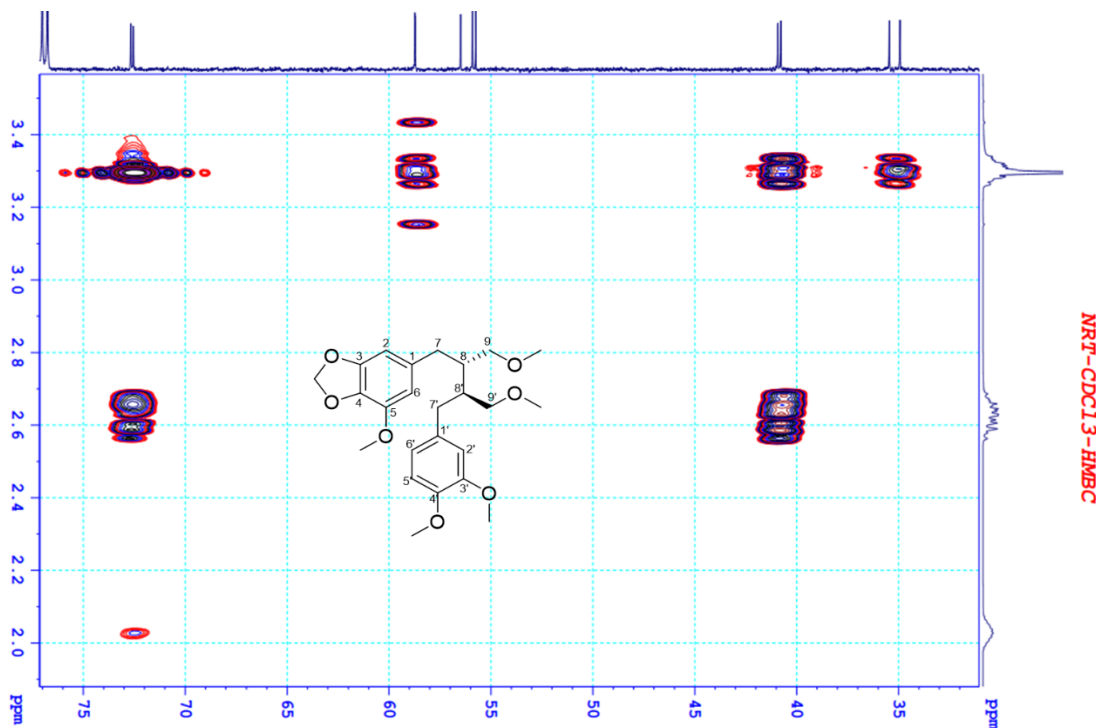
Hình PL2.14. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₂
trích vùng 5,7-6,9 ppm x 100-150 ppm



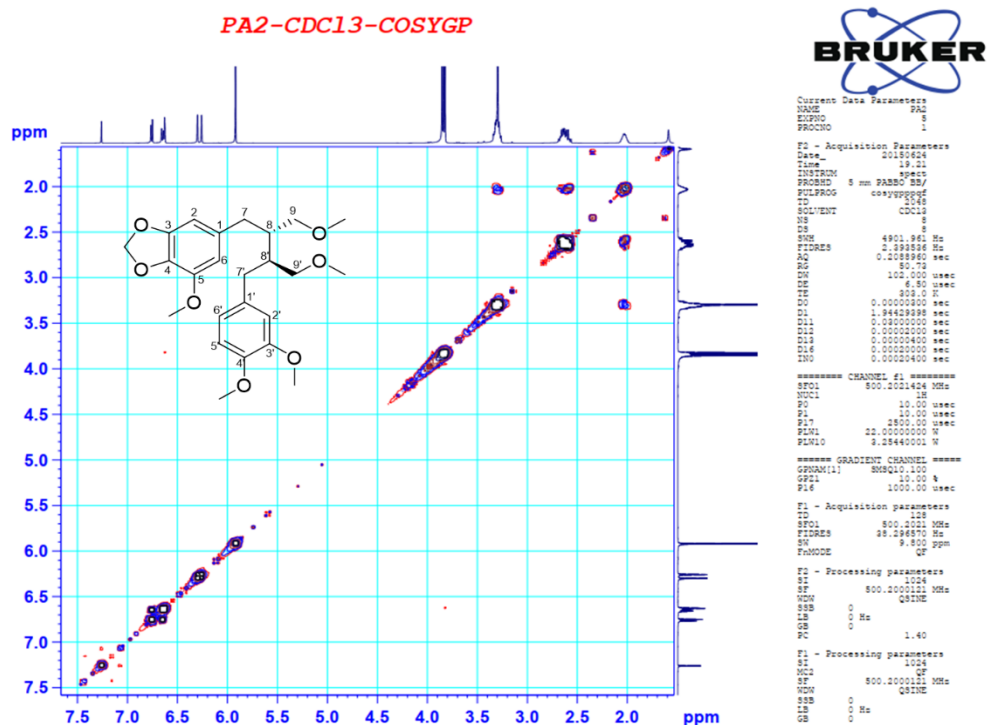
Hình PL2.15. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₂ trích vùng 4,0-6,2 ppm x 100-150 ppm



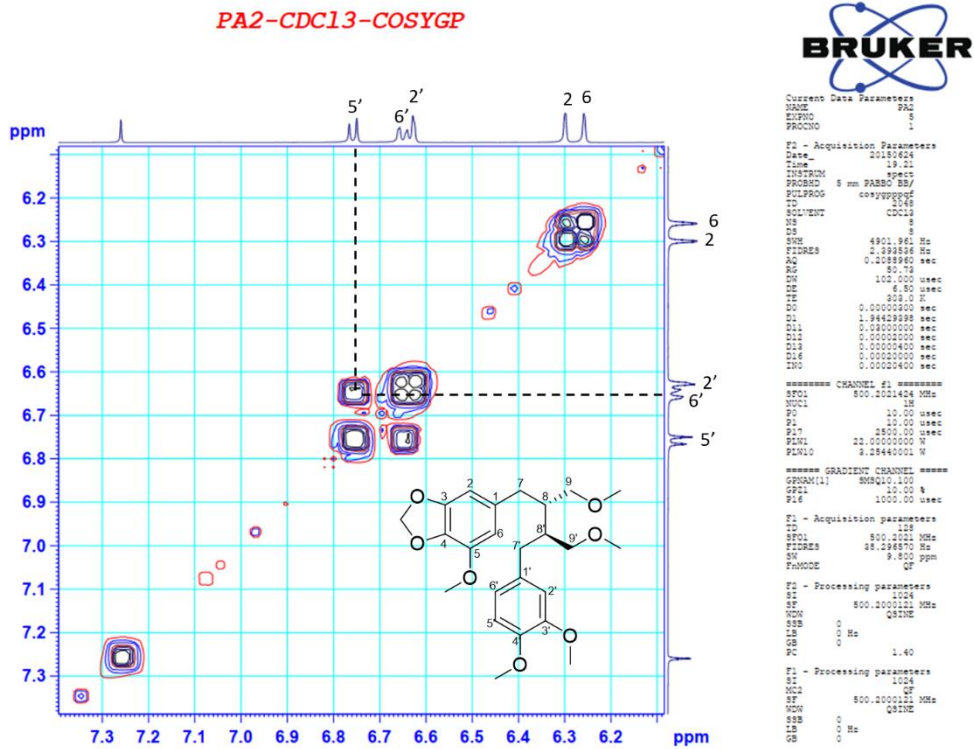
Hình PL2.16. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của hợp chất PA₂ trích vùng 6,1-6,8 ppm x 32-38 ppm



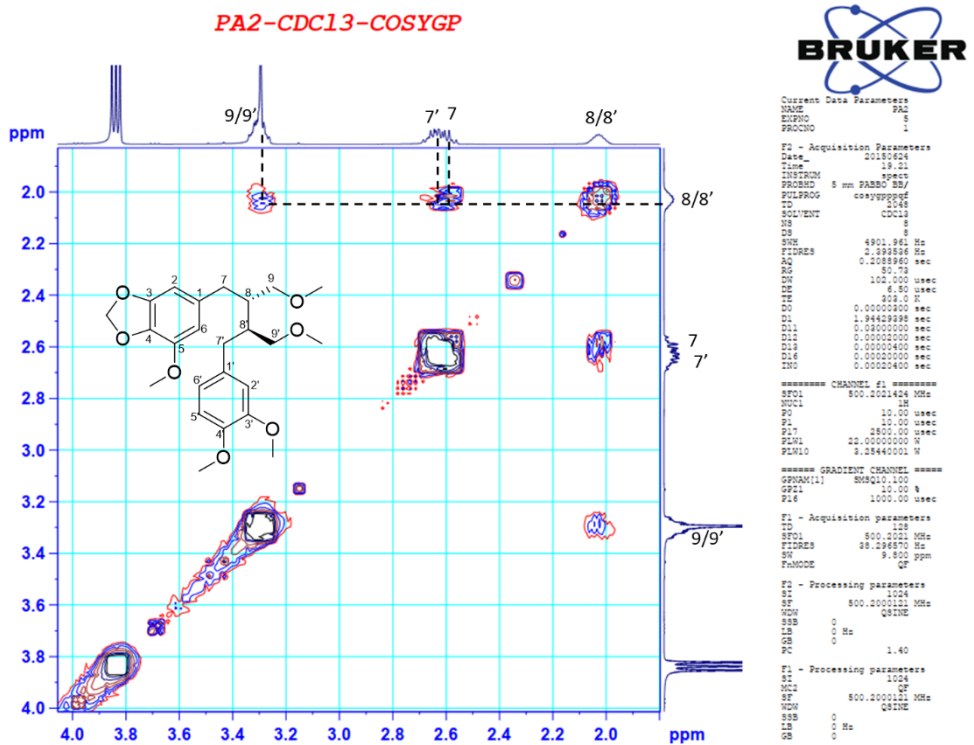
Hình PL2.17. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₂ trích vùng 2,0-3,4 ppm x 30-75 ppm



Hình PL2.18. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₂

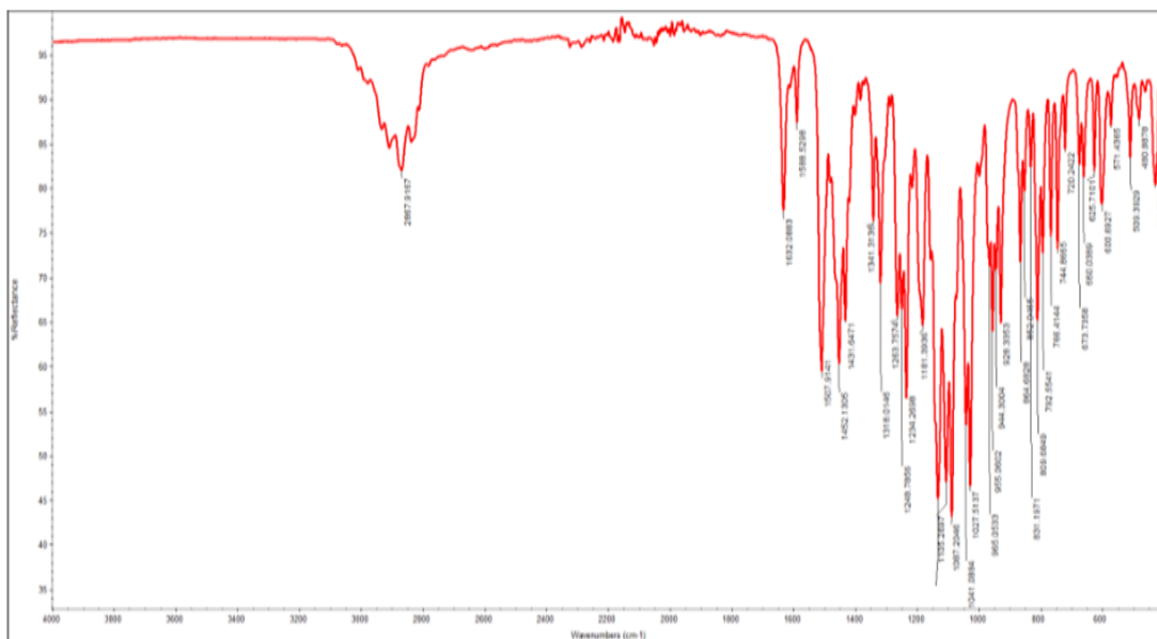


Hình PL2.19. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₂ trích vùng 6,1-7,4 ppm

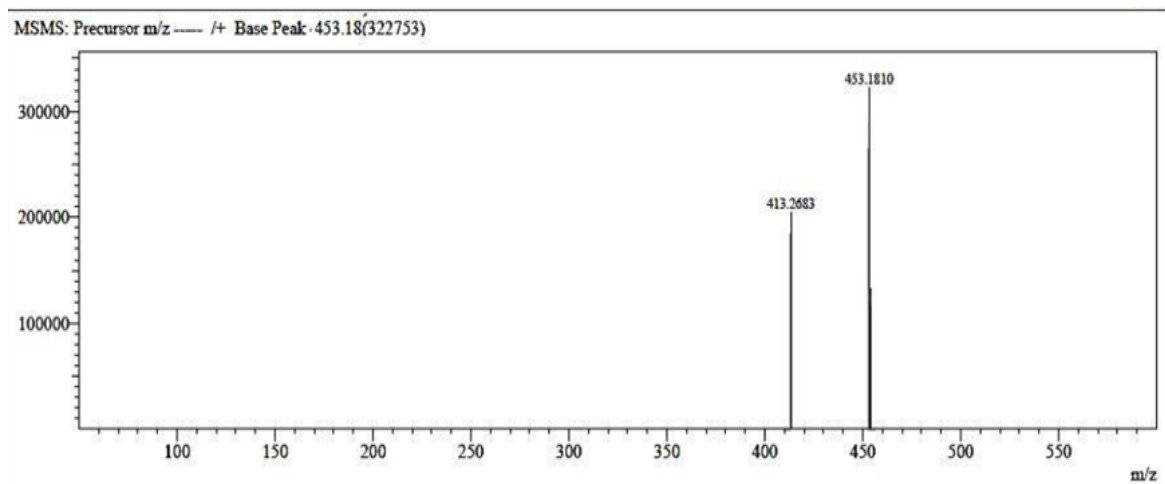


Hình PL2.20. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₂ trích vùng 2,0-4,0 ppm

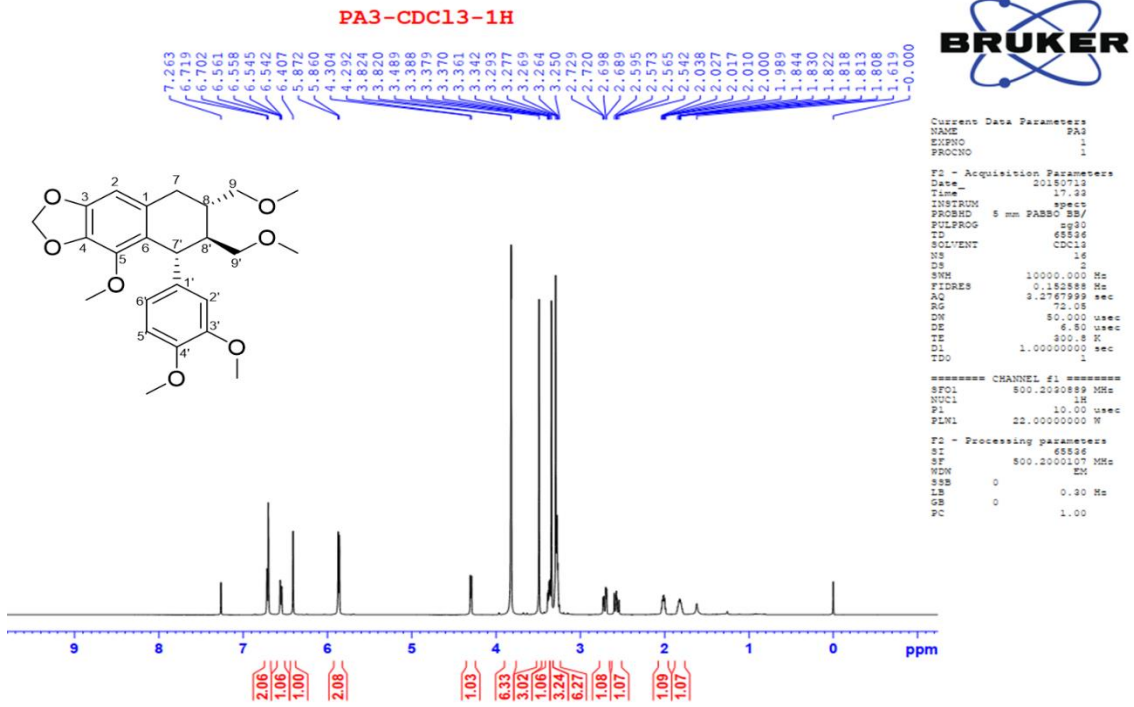
PHỤ LỤC 3. DỮ LIỆU PHỔ CỦA CHẤT PA₃ PHÂN LẬP (NIRTETRALIN)



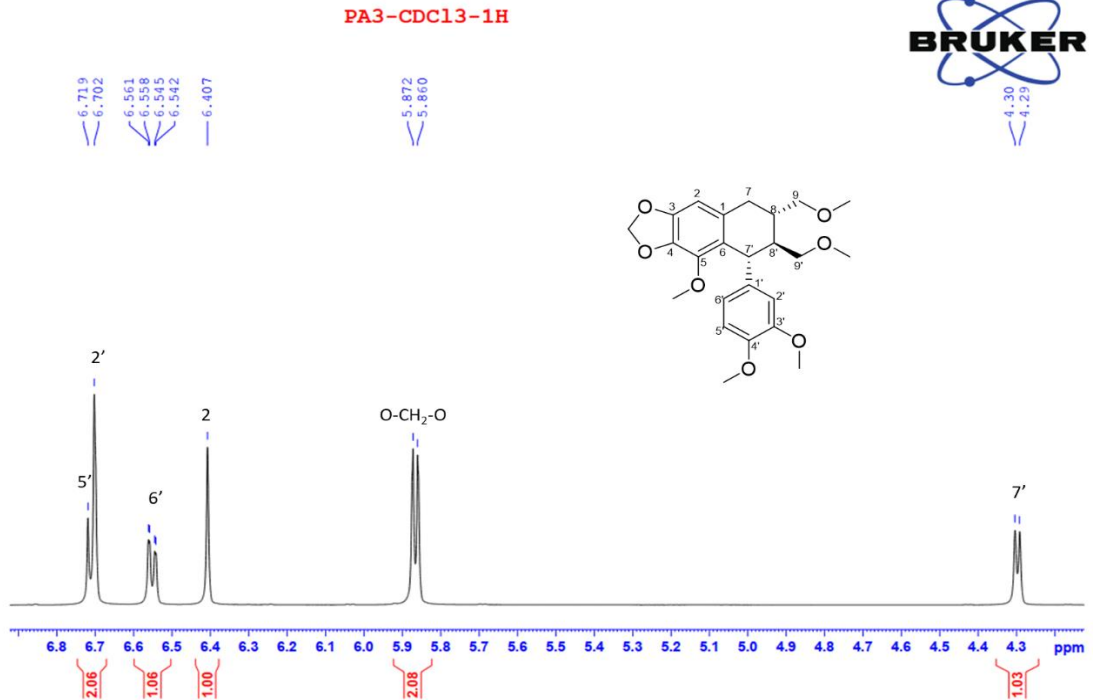
Hình PL3.1. Phổ IR của chất PA₃



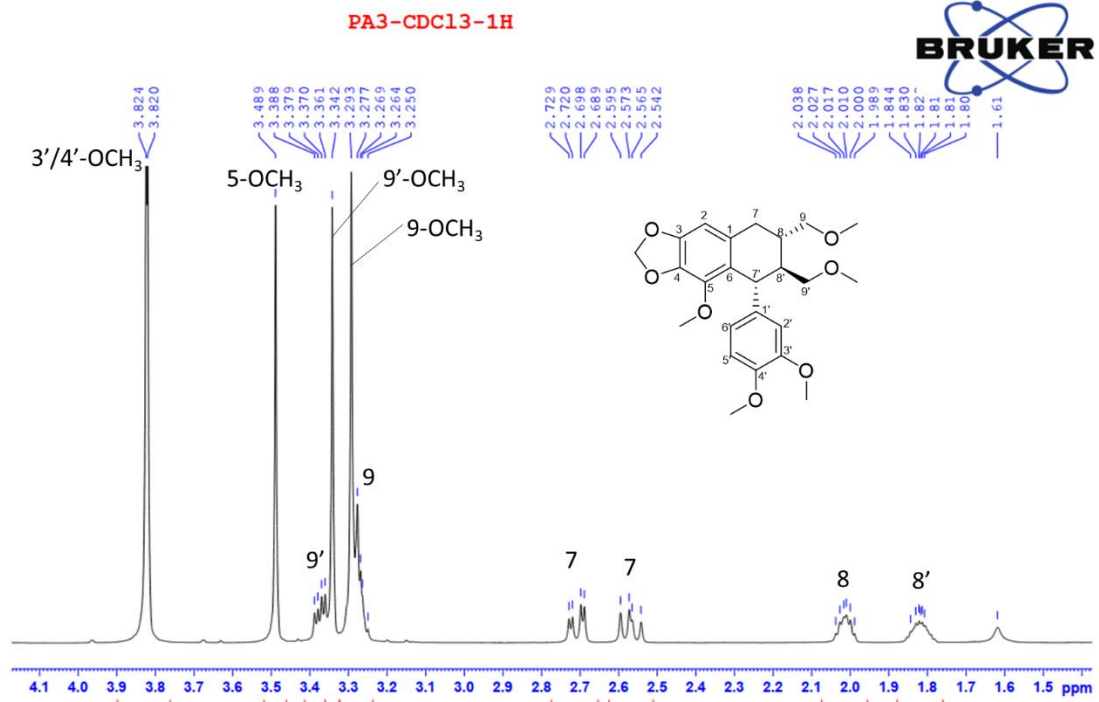
Hình PL3.2. Phổ MS của chất PA₃



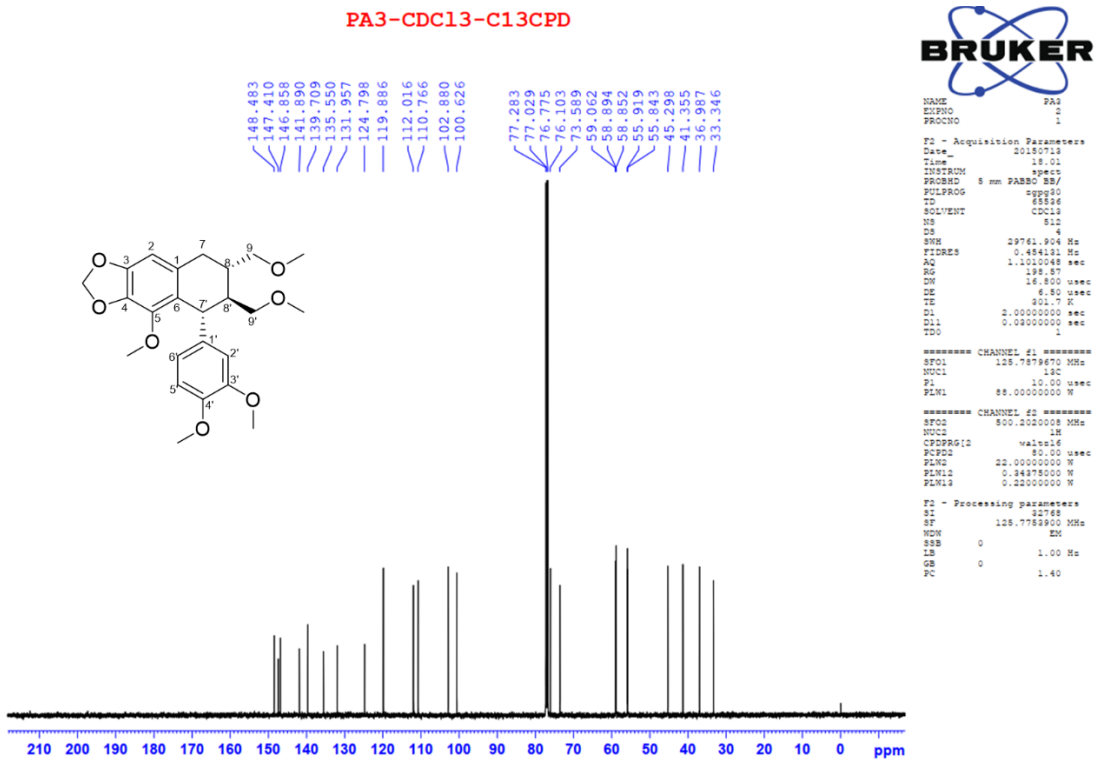
Hình PL3.3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) của chất PA_3



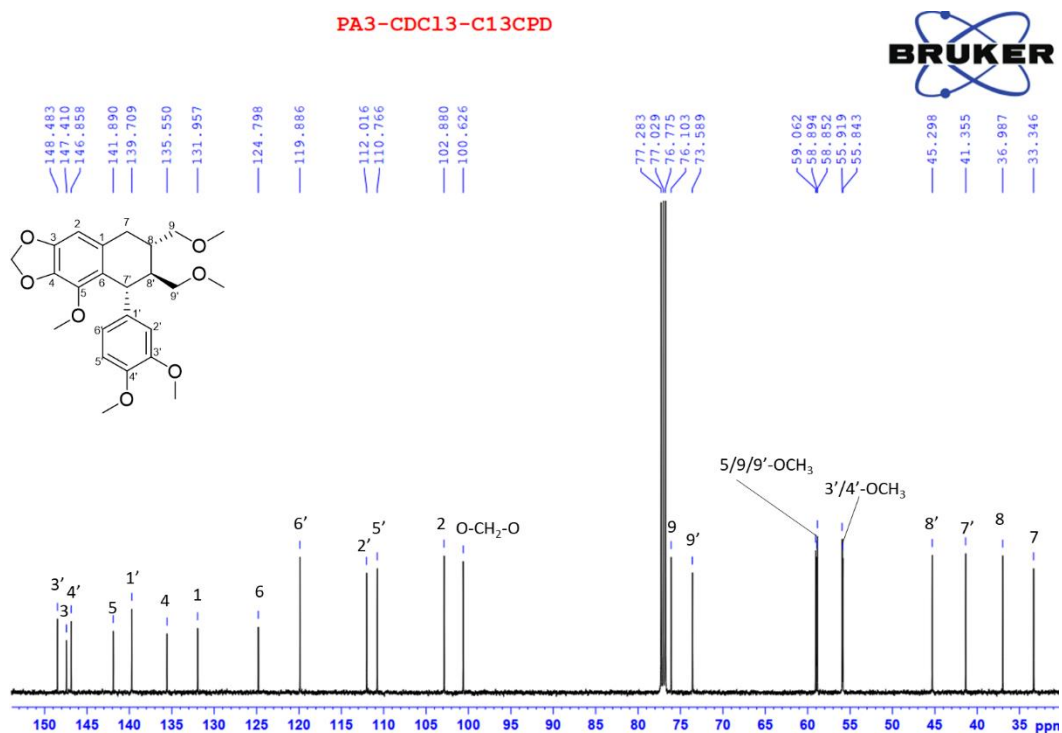
Hình PL3.4. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) của chất PA_3 trích vùng 4,2–6,8 ppm



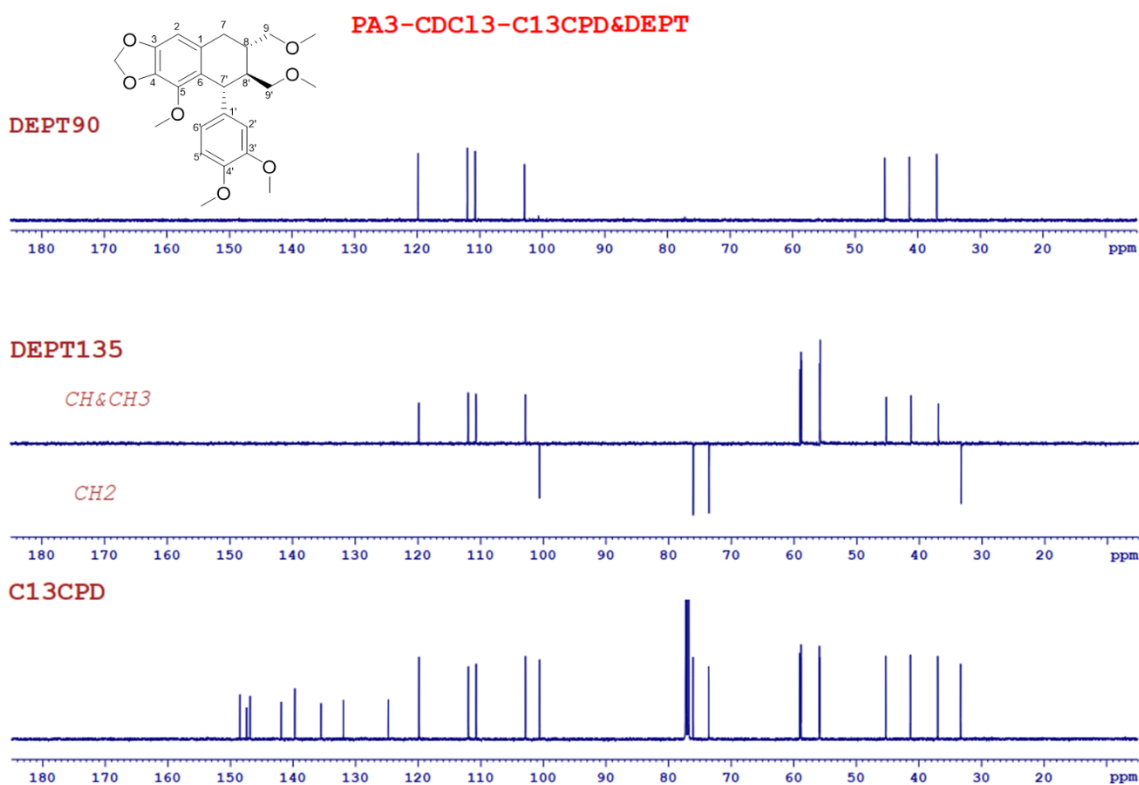
Hình PL3.5. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) của chất PA_3 trích vùng 1,5-4,1 ppm



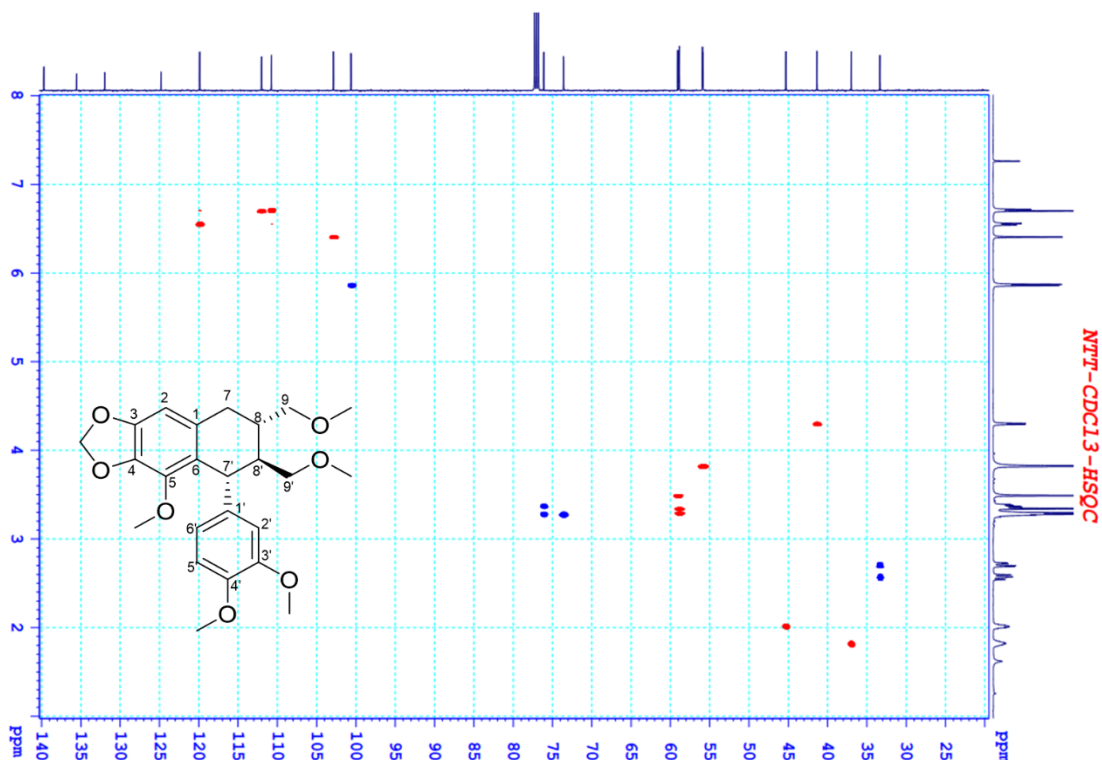
Hình PL3.6. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz) của chất PA_3



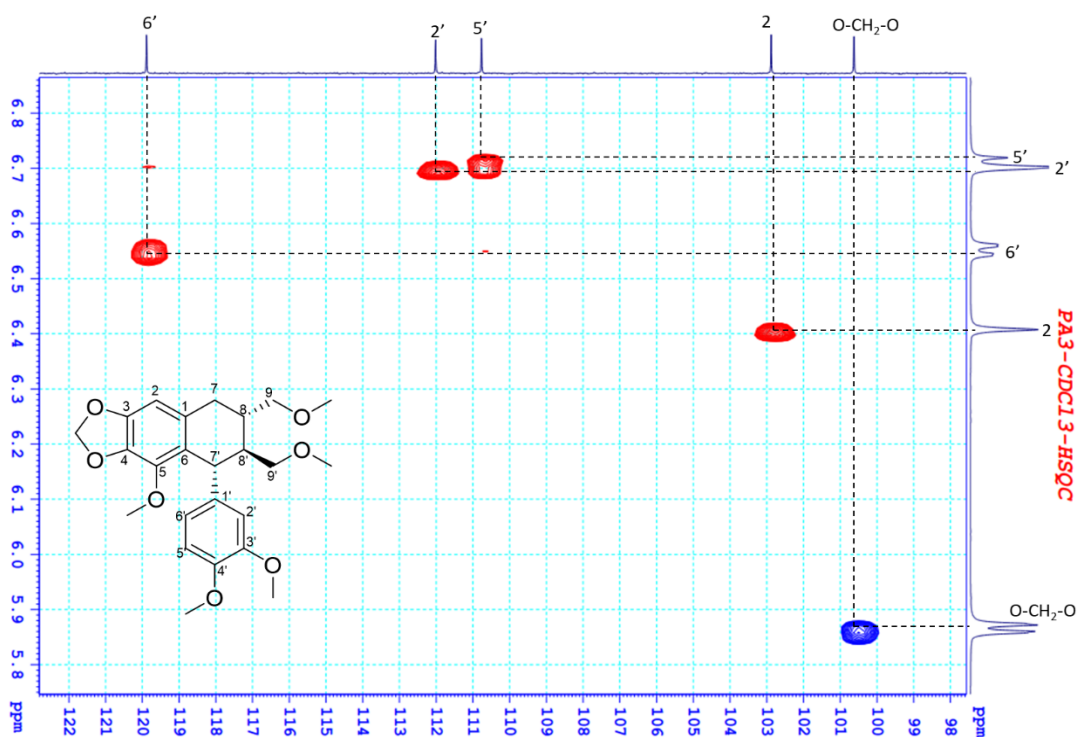
Hình PL3.7. Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₃ trích vùng 30-150 ppm



Hình PL3.8. Phổ DEPT (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₃

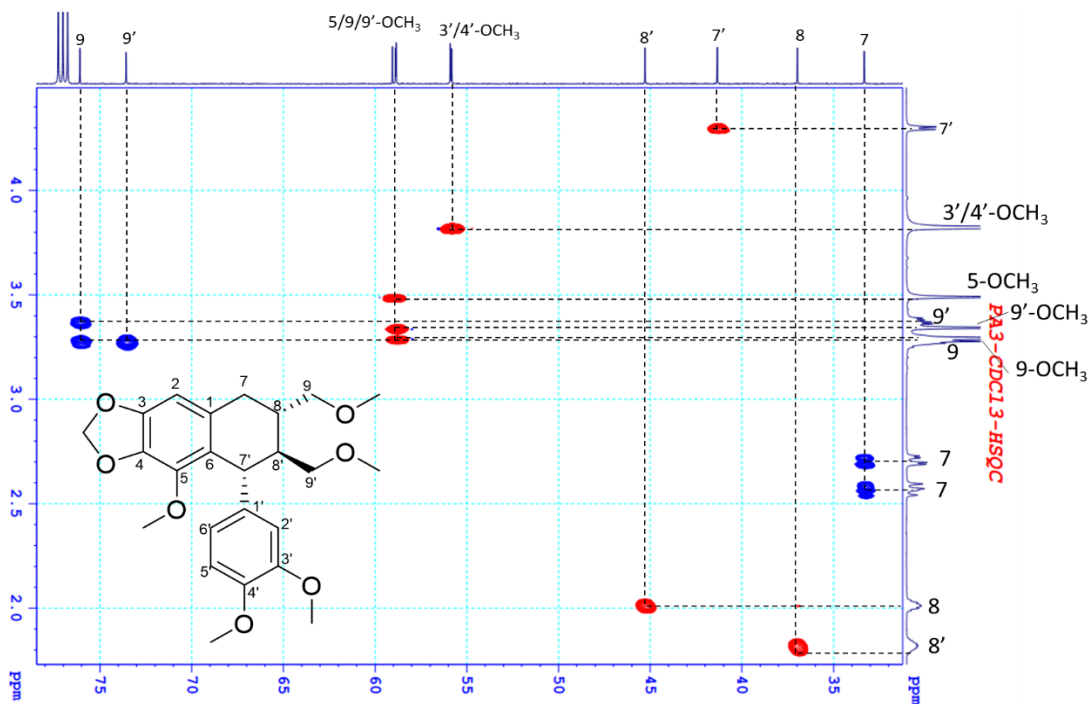


Hình PL3.9. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₃

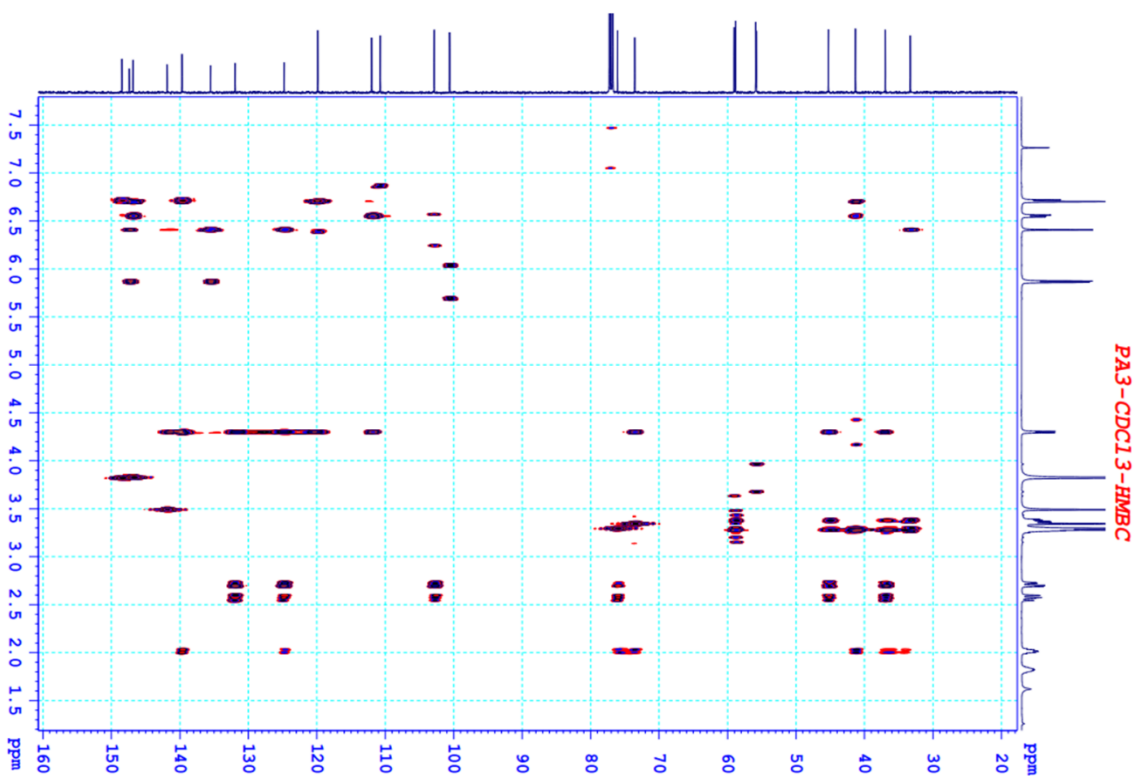


Hình PL3.10. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₃

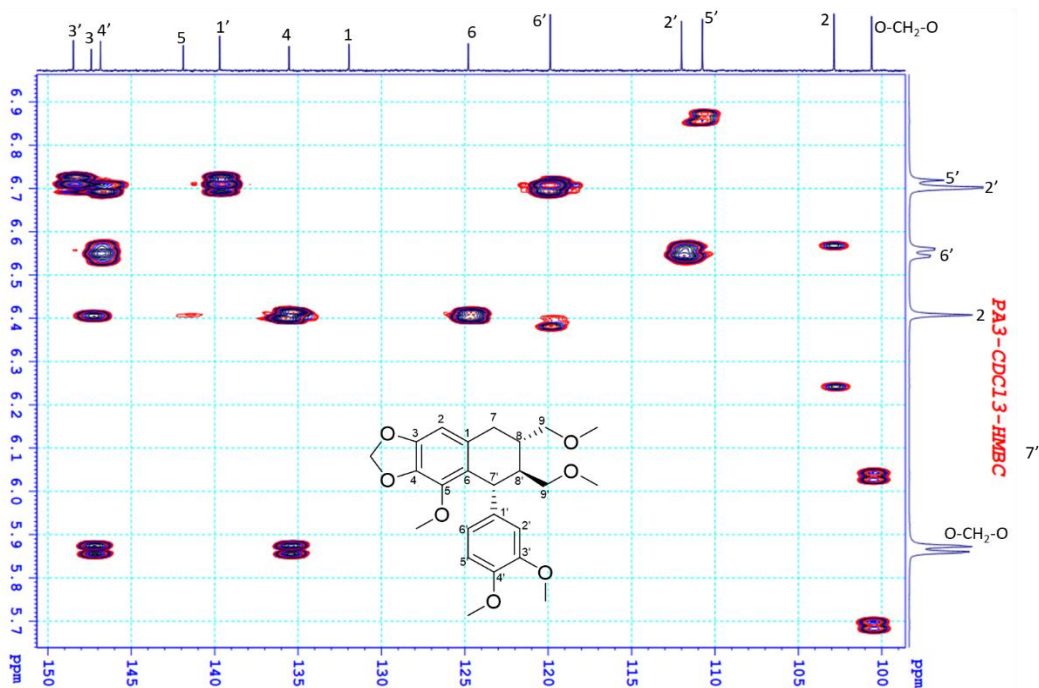
trích vùng 5,8-6,8 ppm x 98-122 ppm



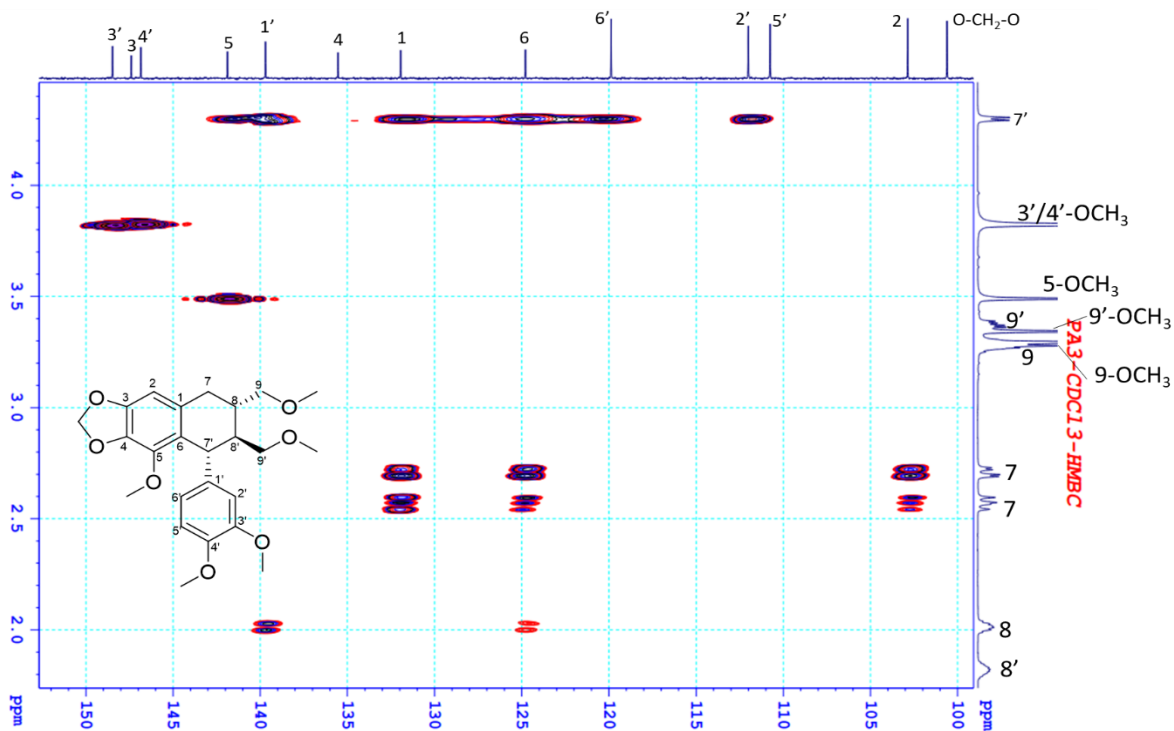
Hình PL3.11. Phổ HSQC (CDCl_3 , 125/500 MHz) của chất PA_3 trích vùng 1,5-4,5 ppm x 30-80 ppm



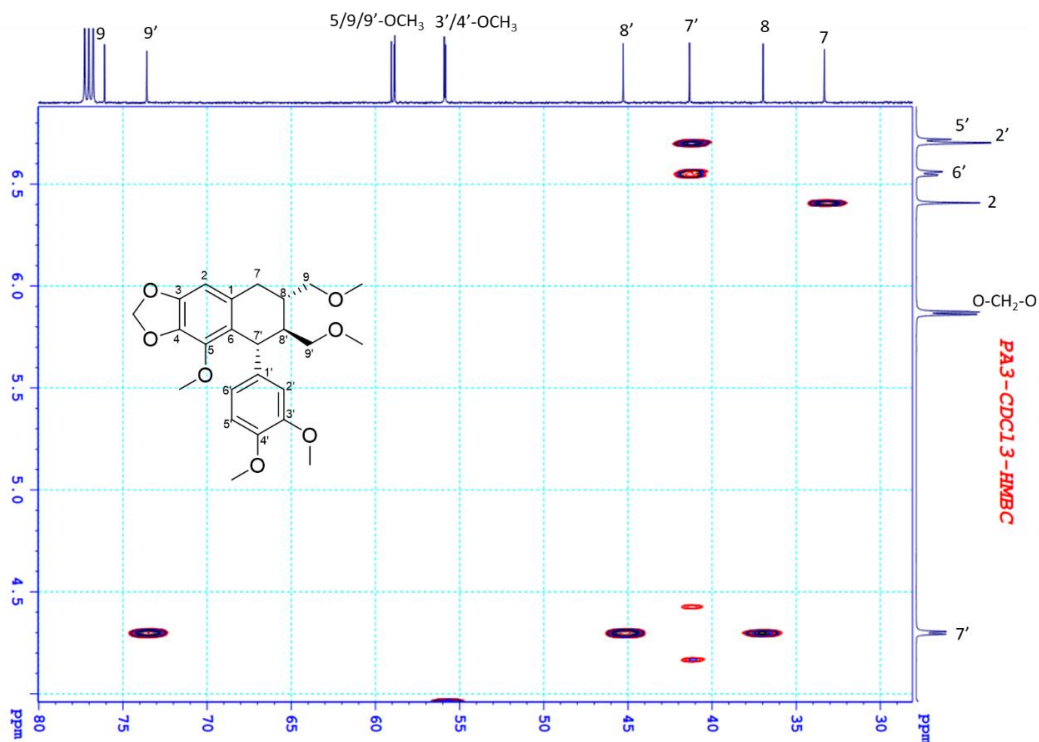
Hình PL3.12. Phổ HMBC (CDCl_3 , 125/500 MHz) của chất PA_3



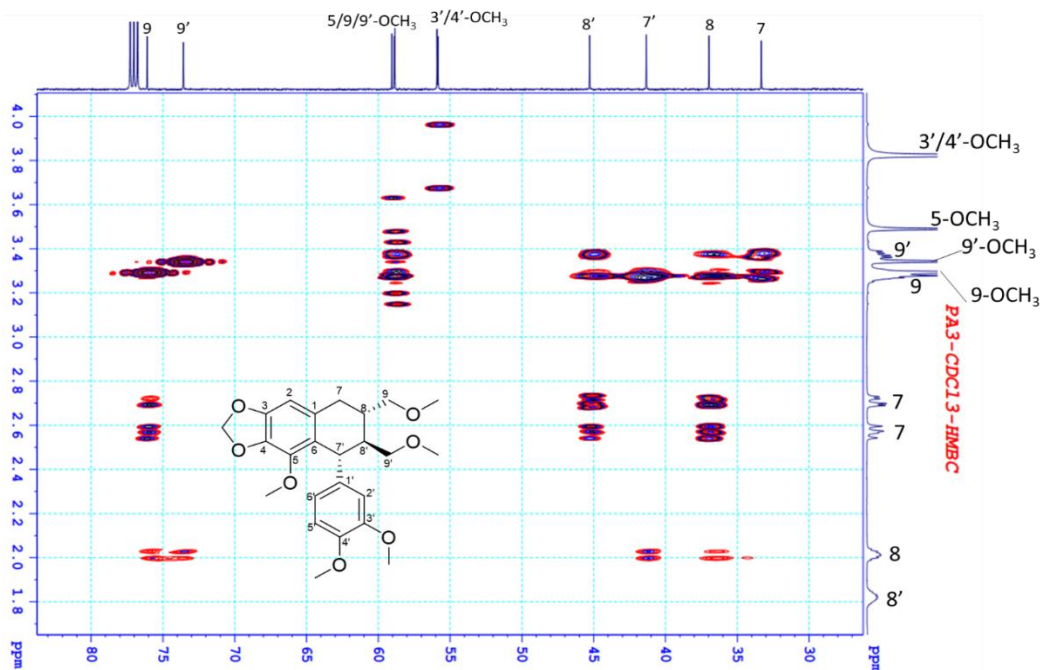
Hình PL3.13. Phổ HMBC (CDCl_3 , 125/500 MHz) của chất PA_3 trích vùng 5,7-6,9 ppm x 100-150 ppm



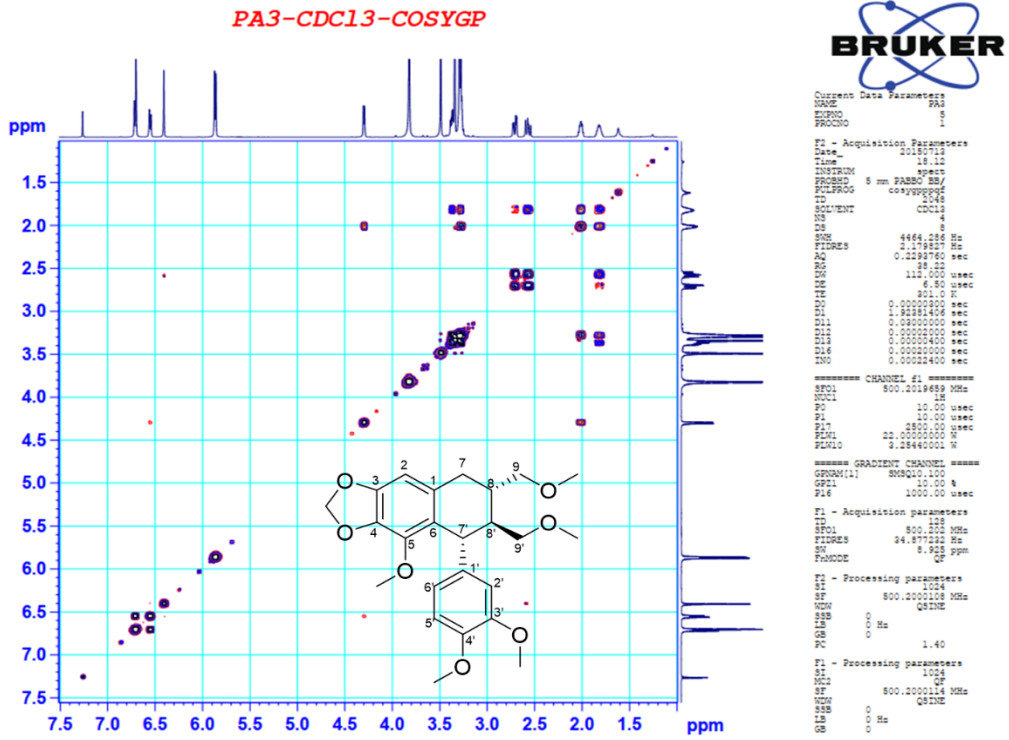
Hình PL3.14. Phổ HMBC (CDCl_3 , 125/500 MHz) của chất PA_3 trích vùng 1,5-4,5 ppm x 100-150 ppm



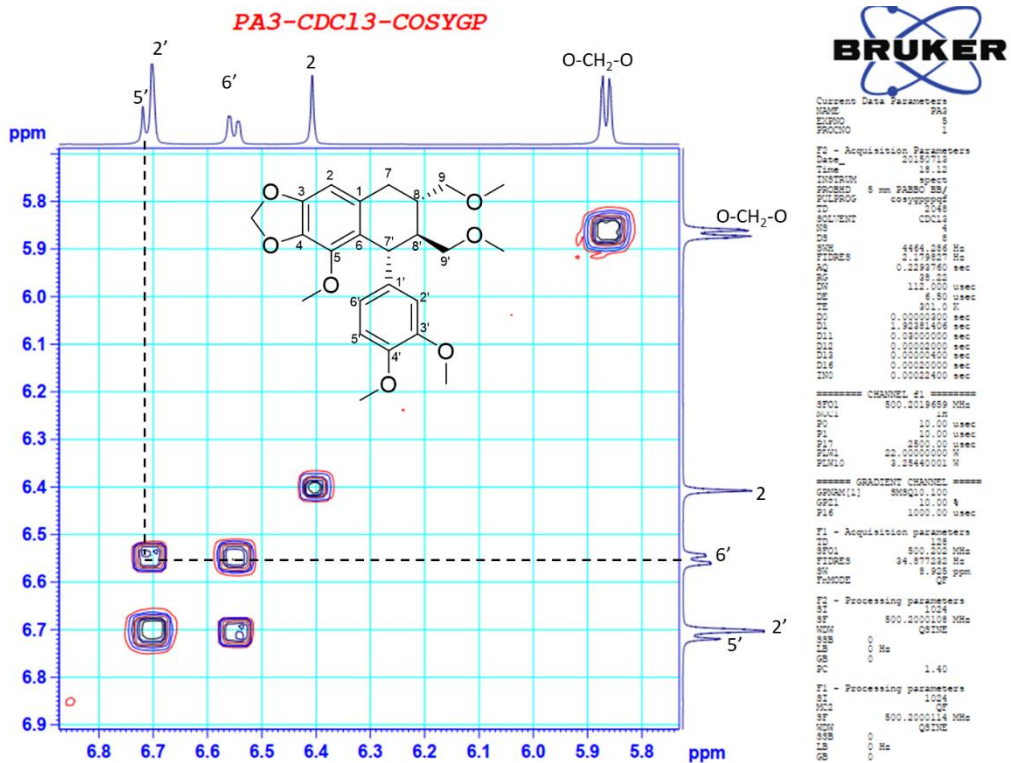
Hình PL3.15. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₃ trích vùng 4,0-7,0 ppm x 30-80 ppm



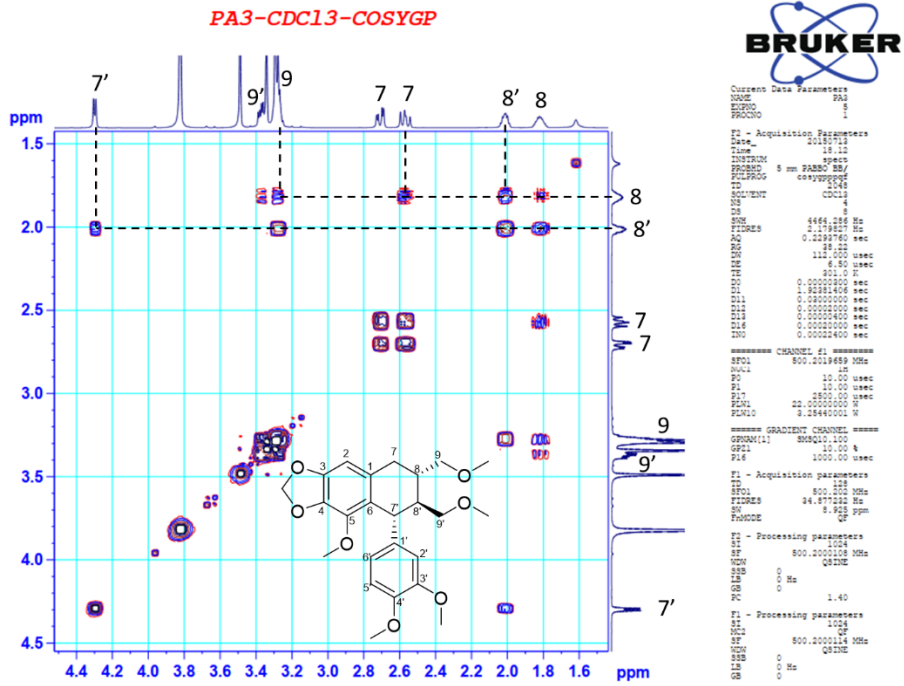
Hình PL3.16. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₃ trích vùng 1,8-4,0 ppm x 30-80 ppm



Hình PL3.17. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₃

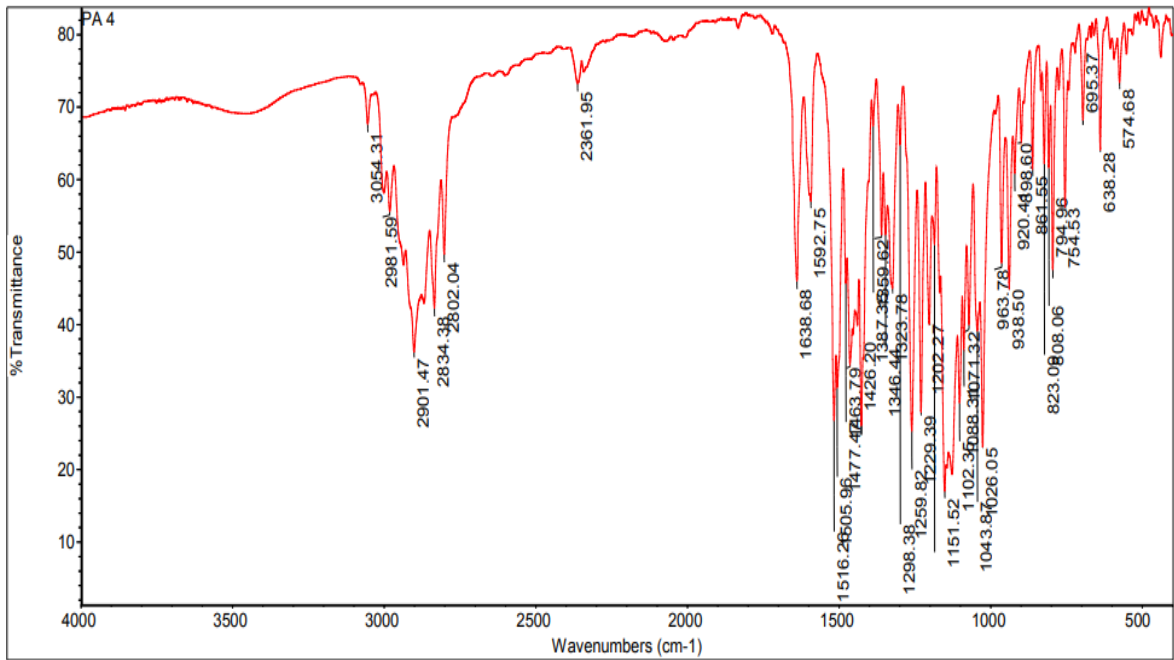


Hình PL3.18. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₃ trích vùng 5,8-6,8 ppm

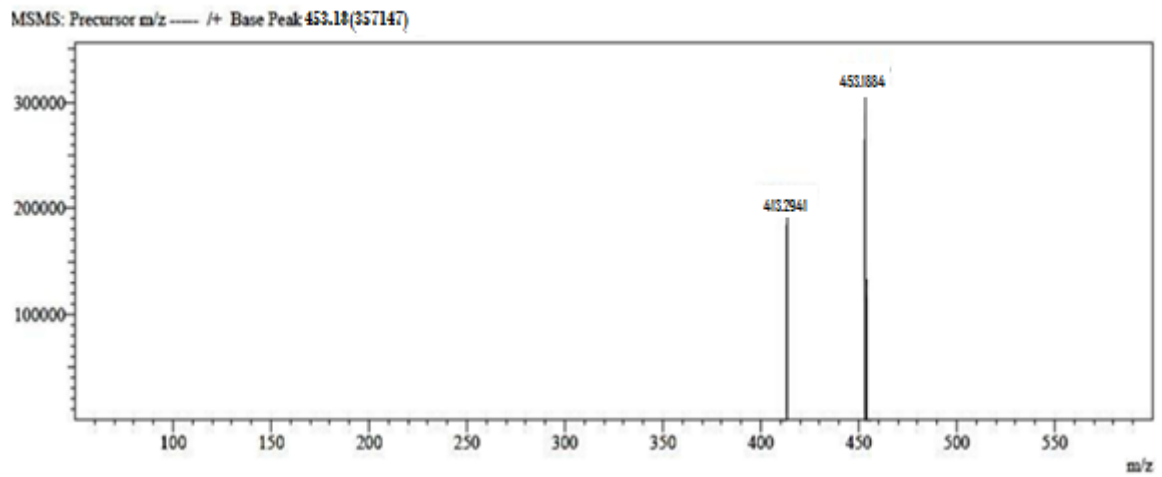


Hình PL3.19. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₃ trích vùng 1,6-4,4 ppm

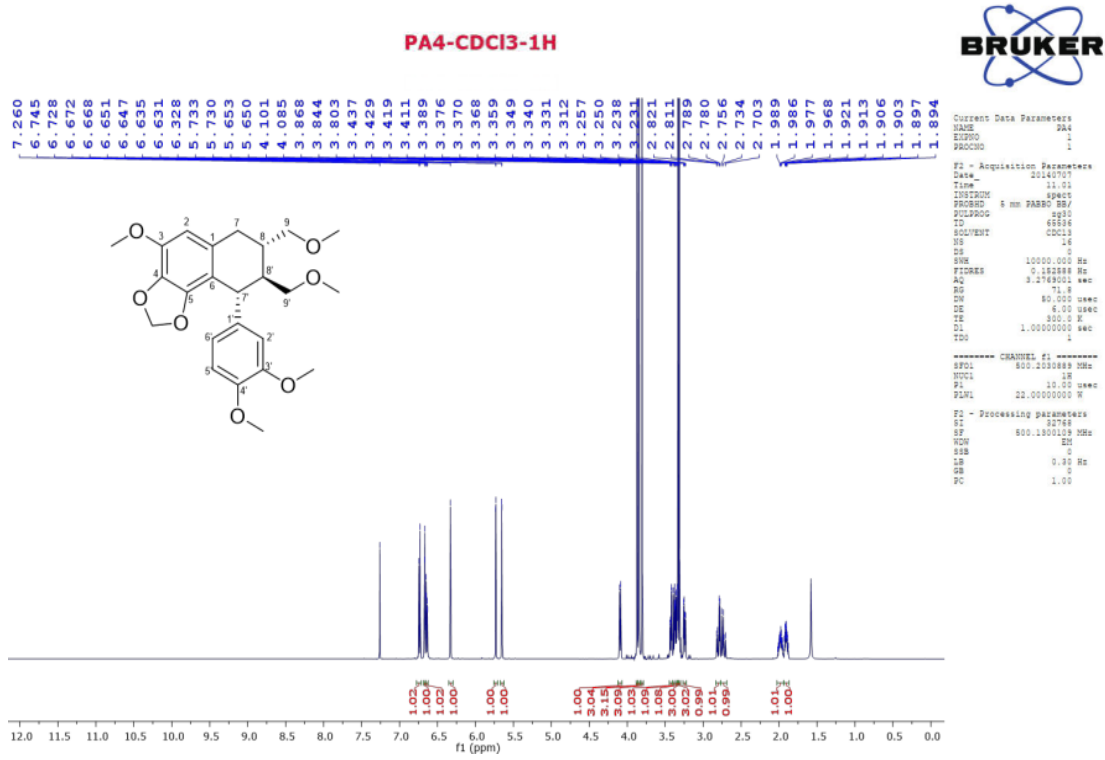
PHỤ LỤC 4. DỮ LIỆU PHỔ CỦA CHẤT PA₄ PHÂN LẬP (HYPOPHYLLANTHIN)



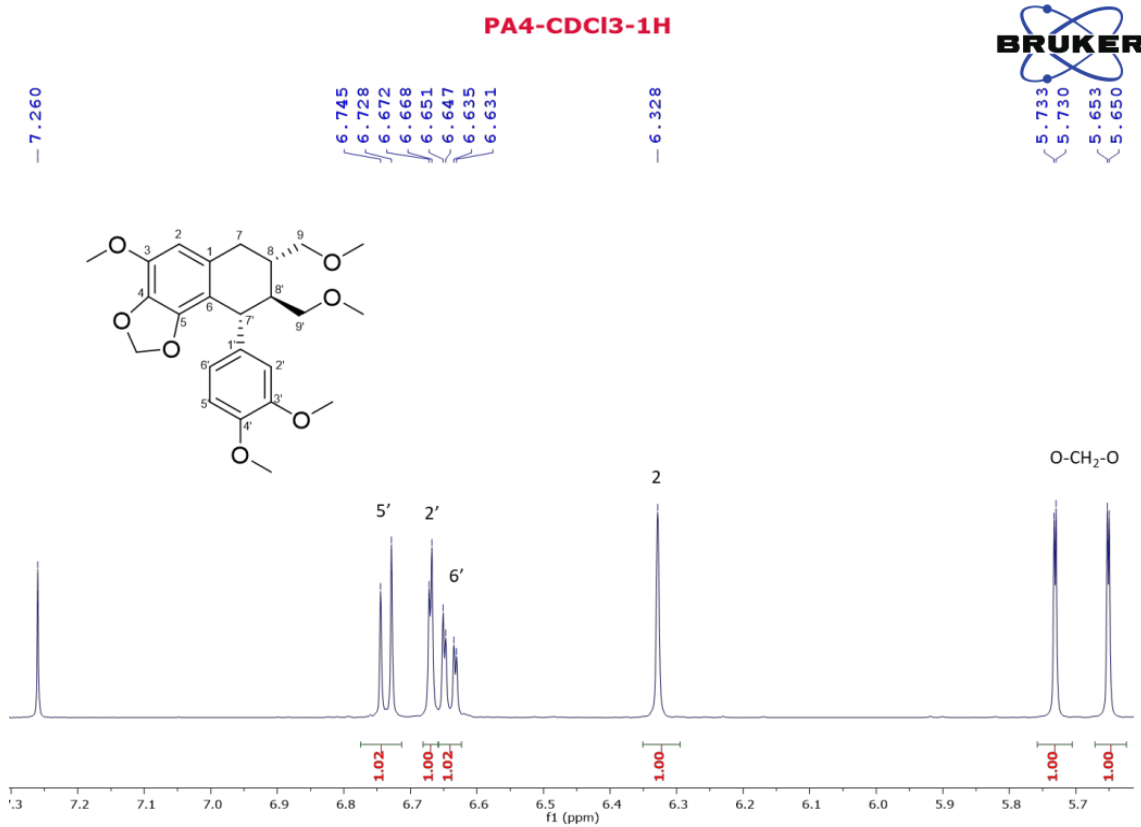
Hình PL4.1. Phổ IR của chất PA₄



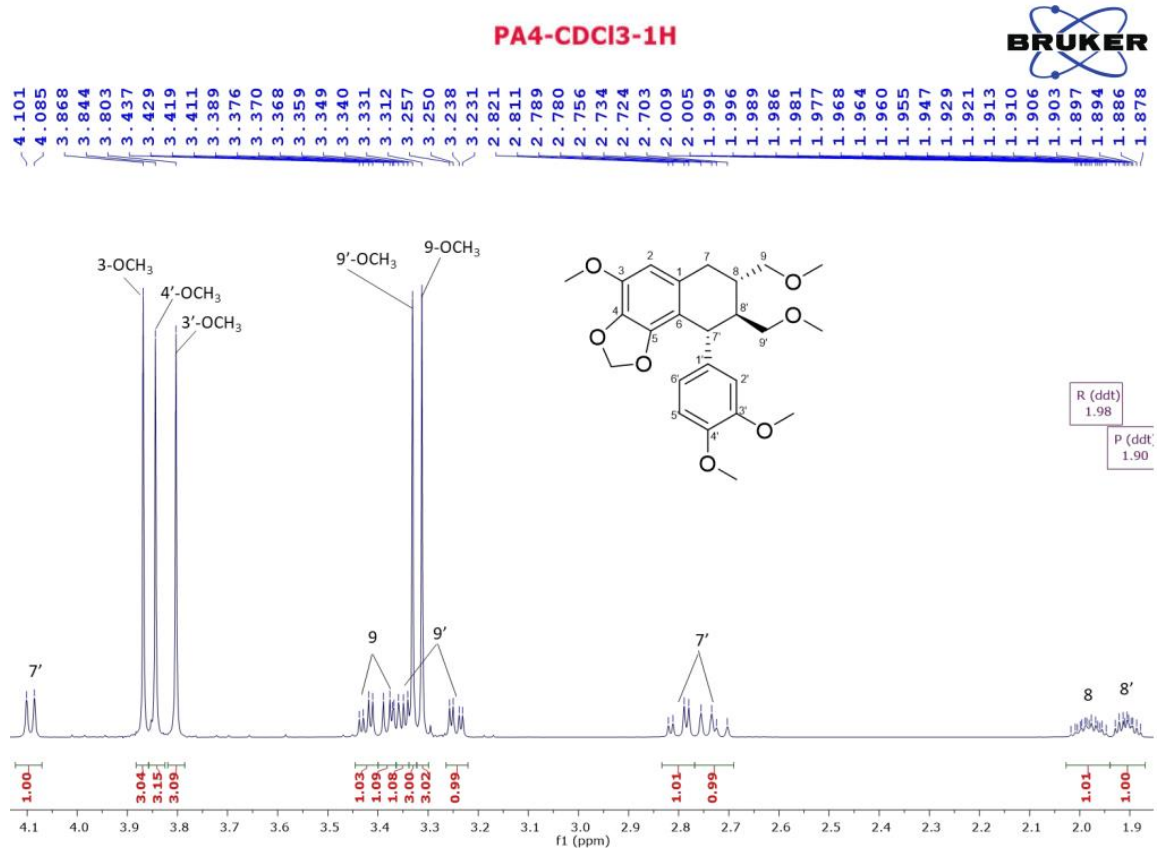
Hình PL4.2. Phổ MS của chất PA₄



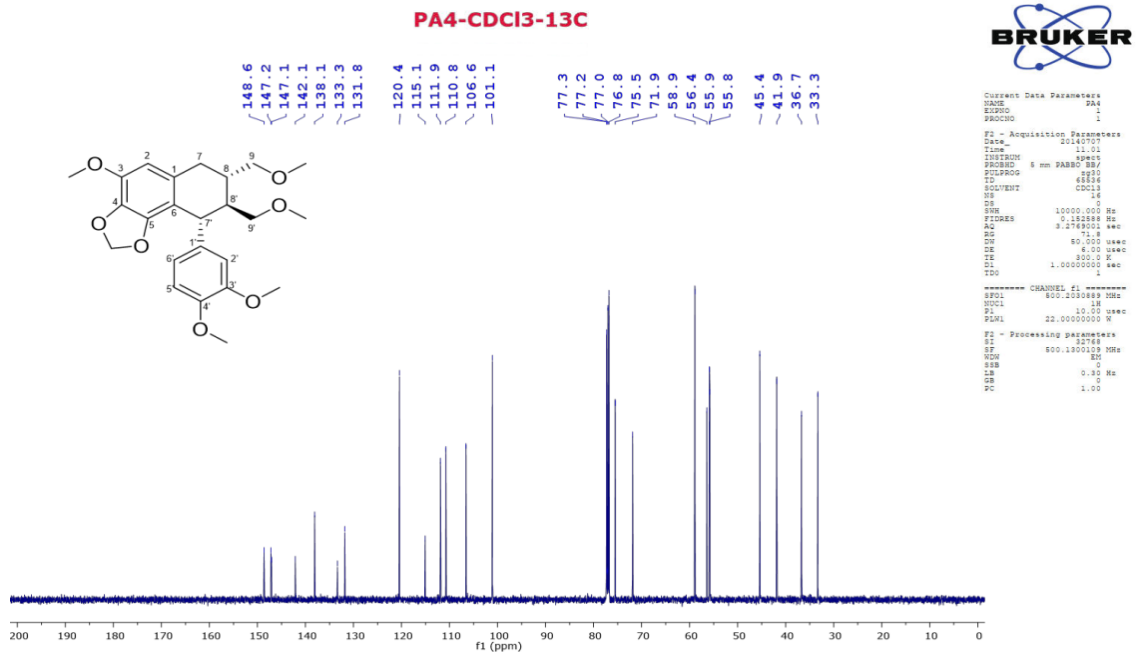
Hình PL4.3. Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₄



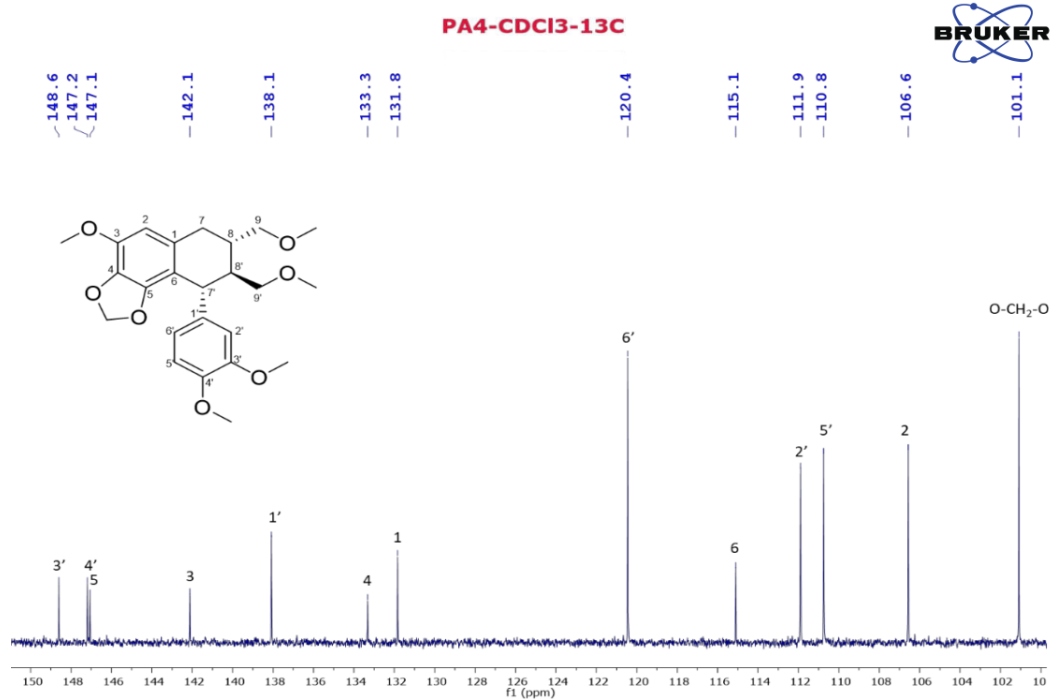
Hình PL4.4. Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₄ trích vùng 5,6-7,3 ppm



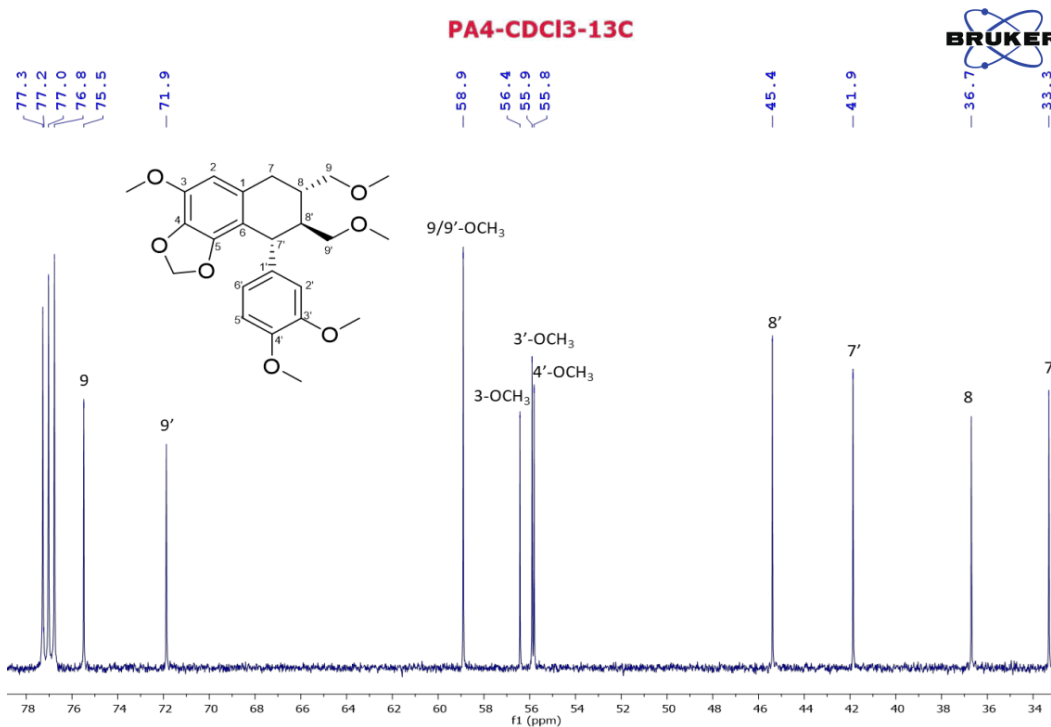
Hình PL4.5. Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₄ trích vùng 1,9-4,1 ppm



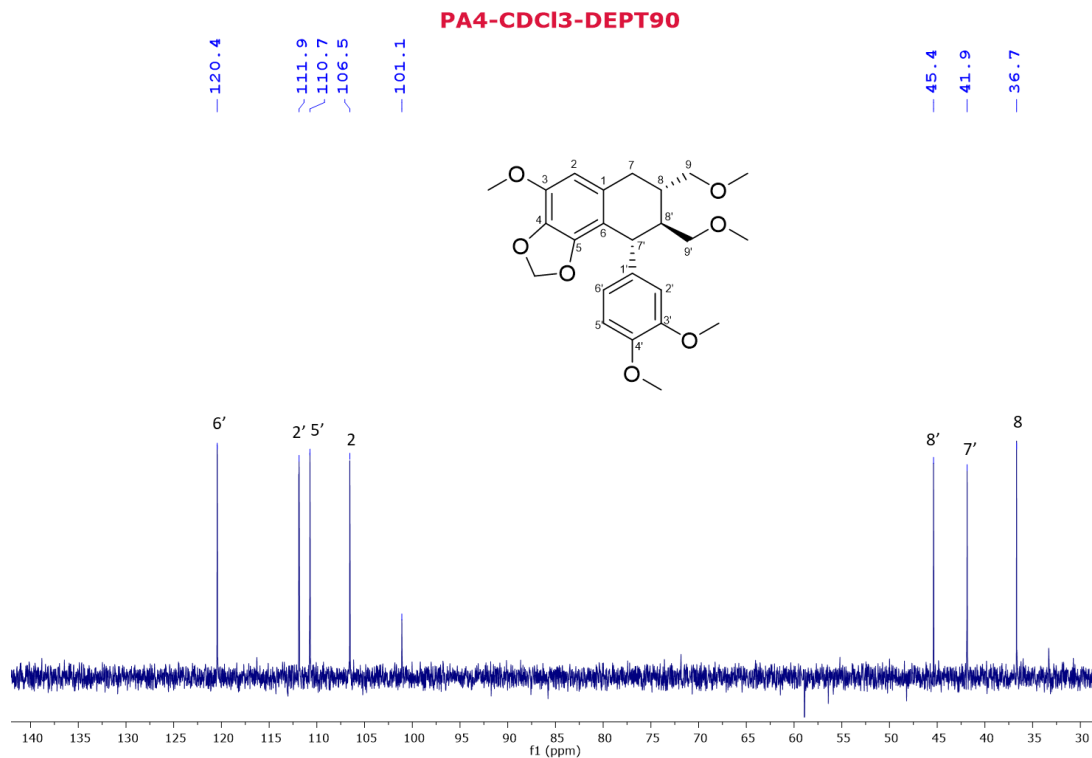
Hình PL4.6. Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₄



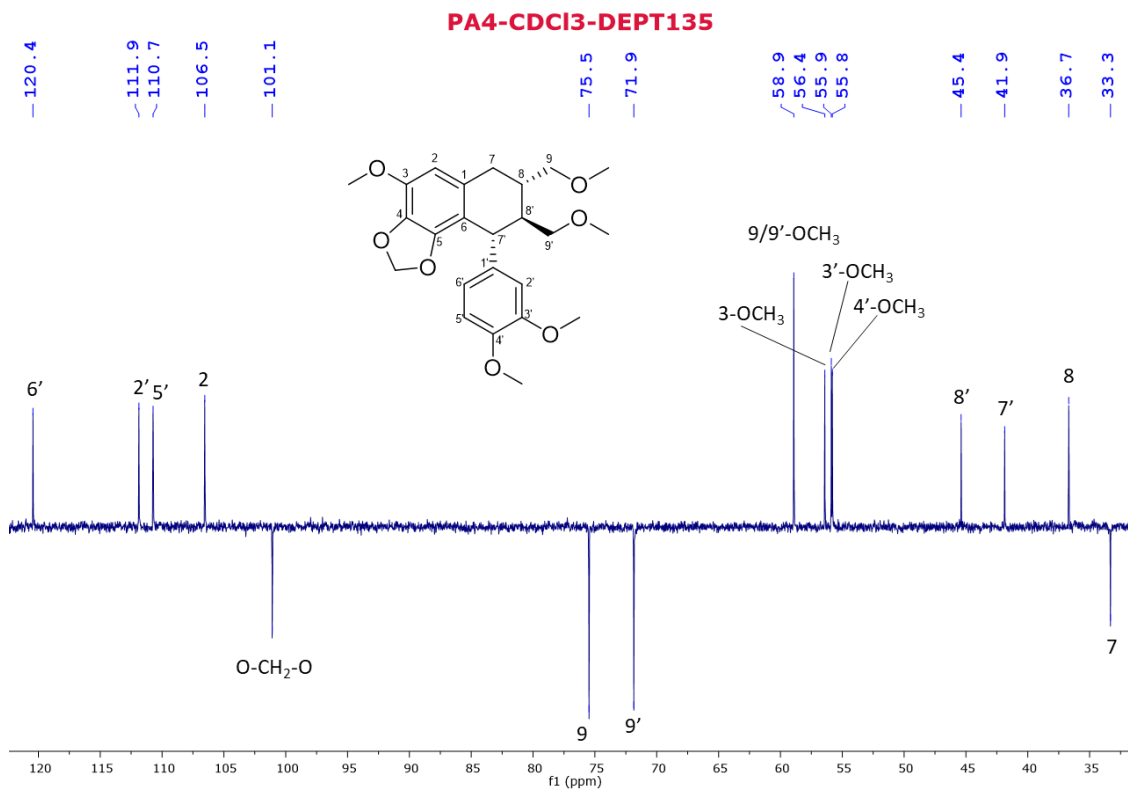
Hình PL4.7. Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₄ trích vùng 100-150 ppm



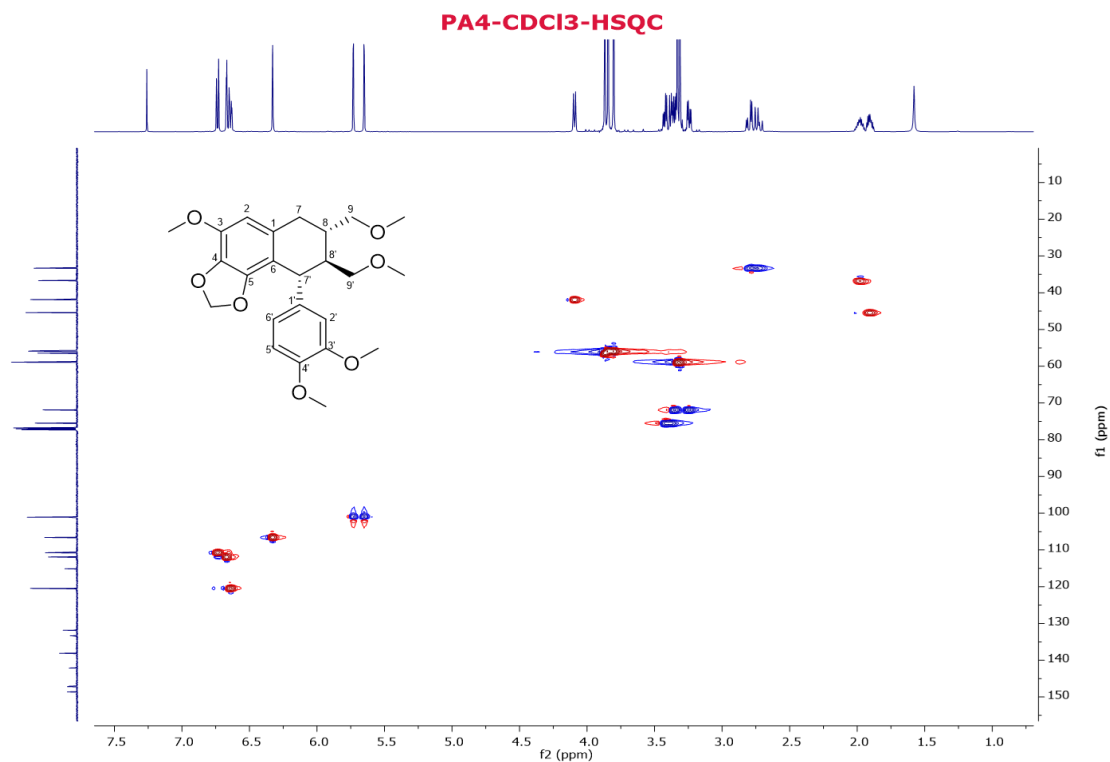
Hình PL4.8. Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₄ trích vùng 33-78 ppm



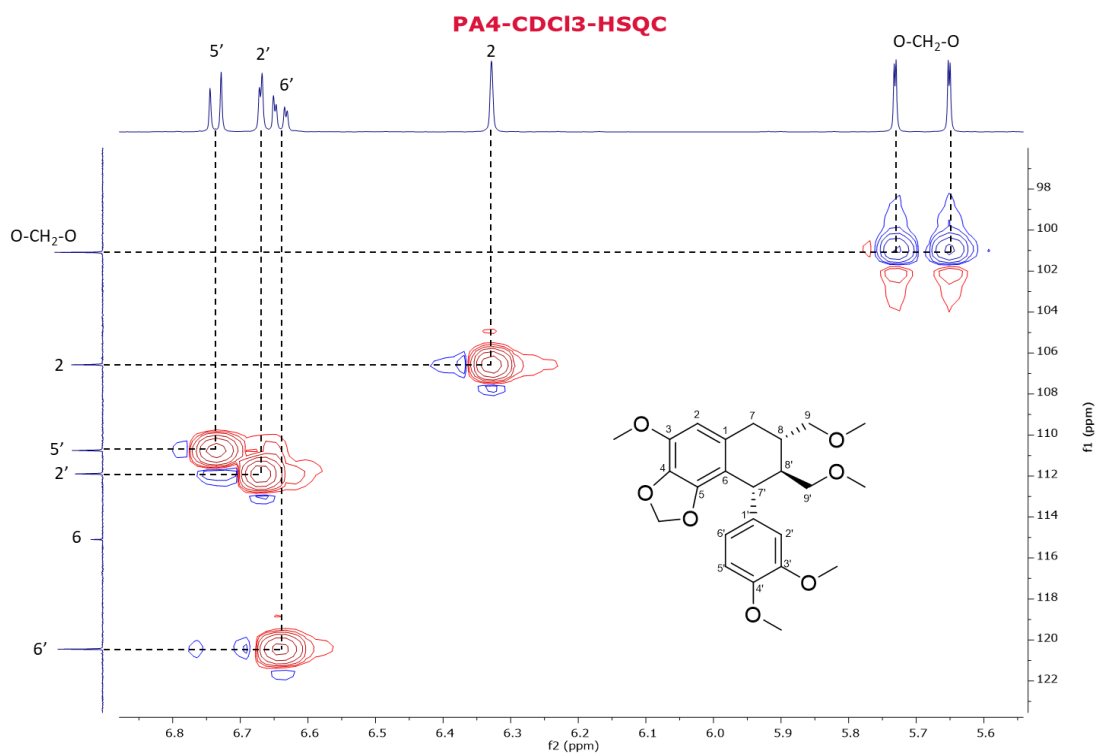
Hình PL4.9. Phổ DEPT-90 (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₄



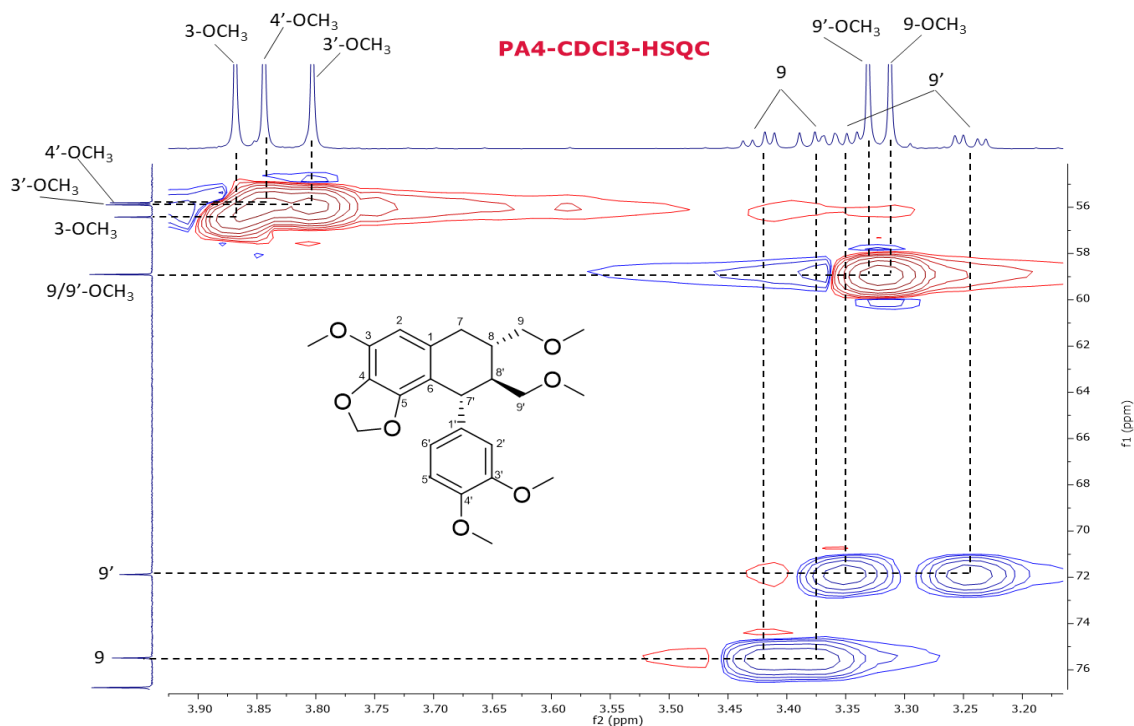
Hình PL4.10. Phổ DEPT-135 (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₄



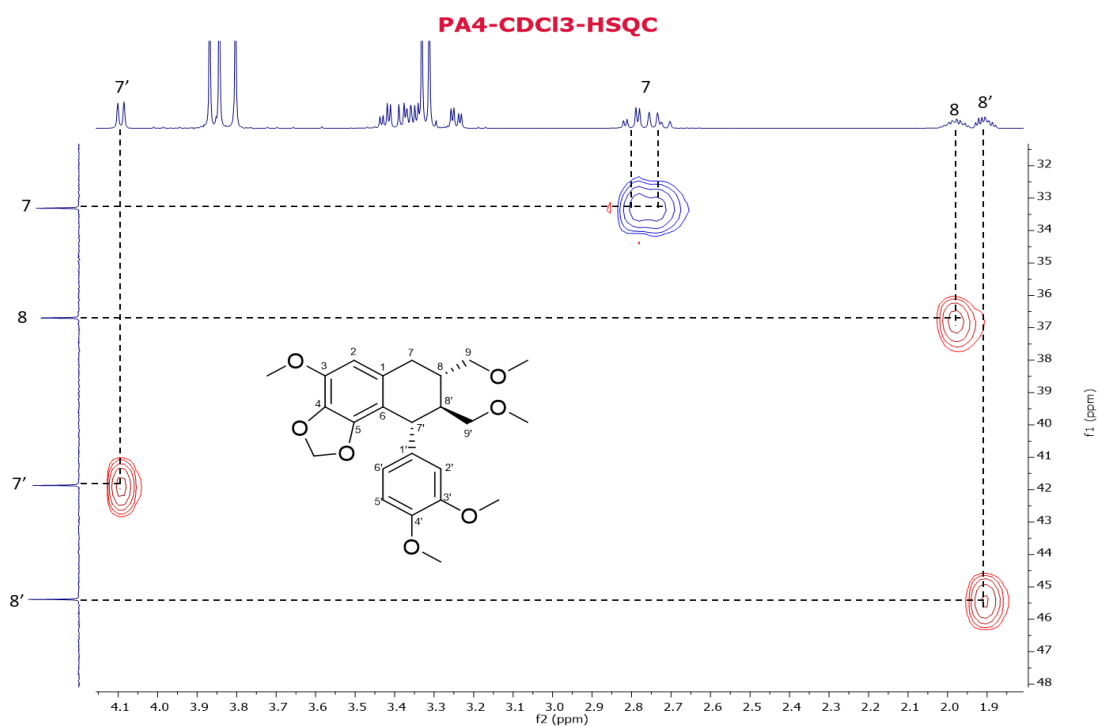
Hình PL4.11. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₄



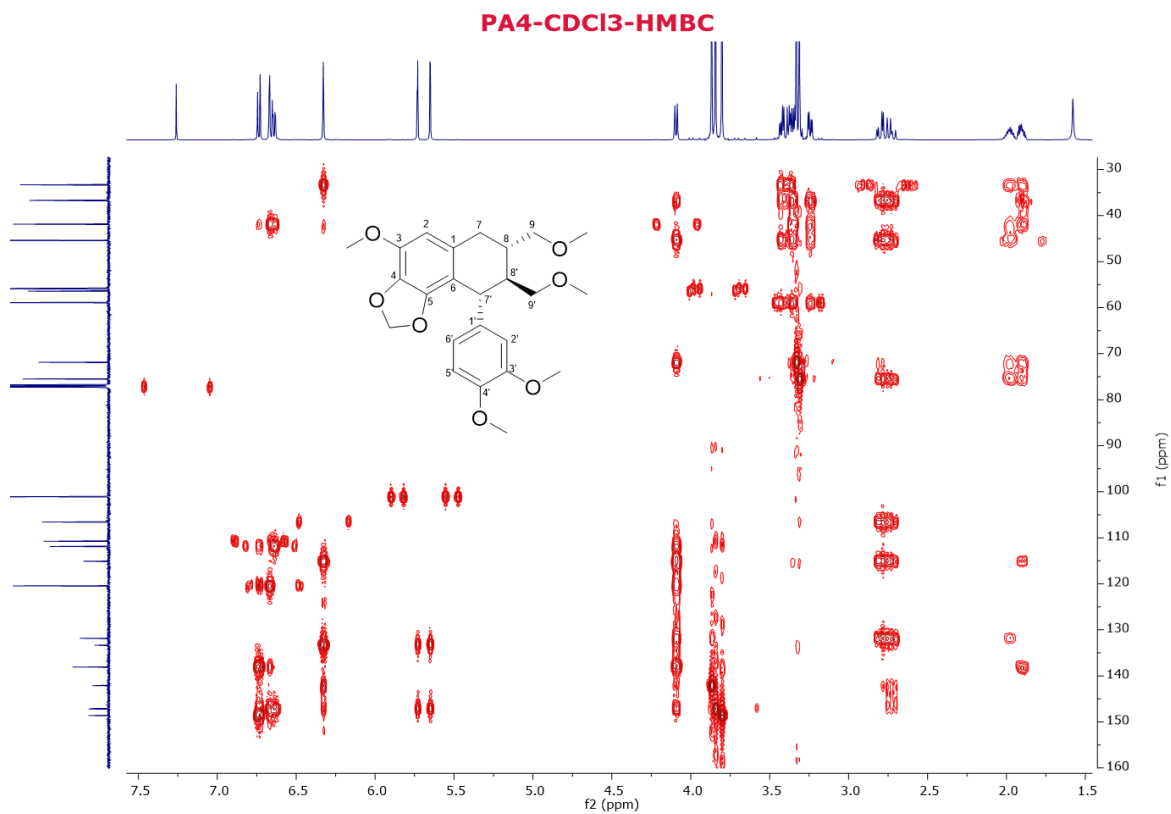
Hình PL4.12. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₄
trích vùng 5,6-6,8 ppm x 98-122 ppm



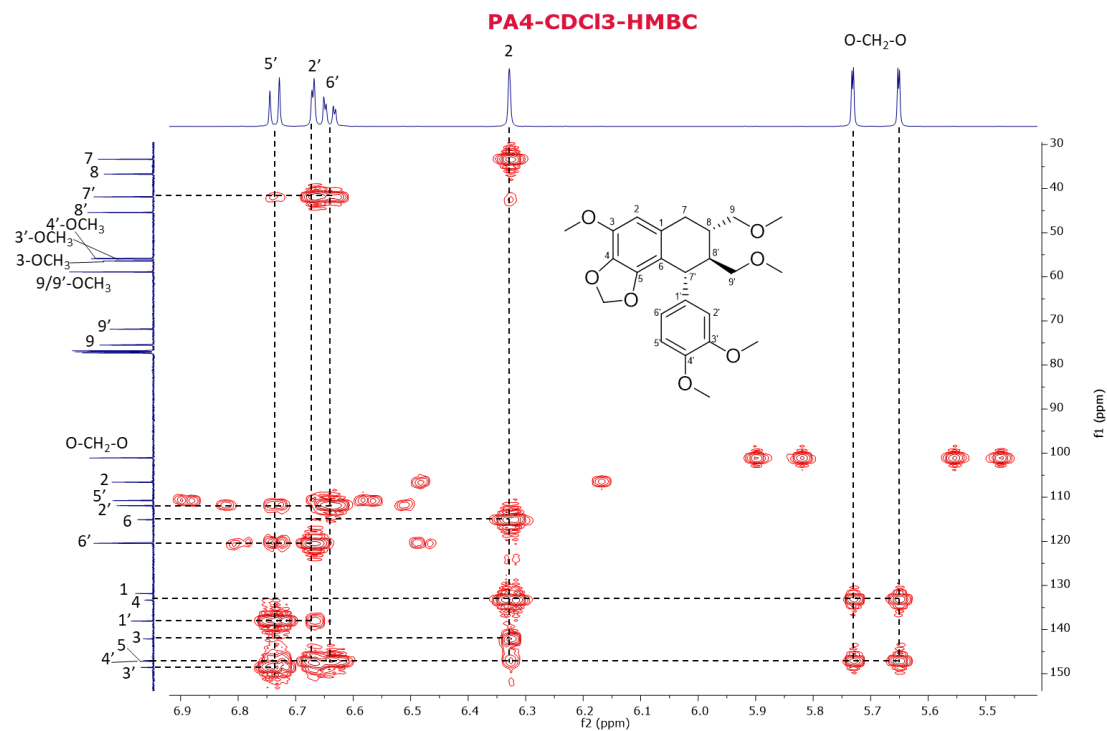
Hình PL4.13. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₄ trích vùng 3,2-3,9 ppm x 55-76 ppm



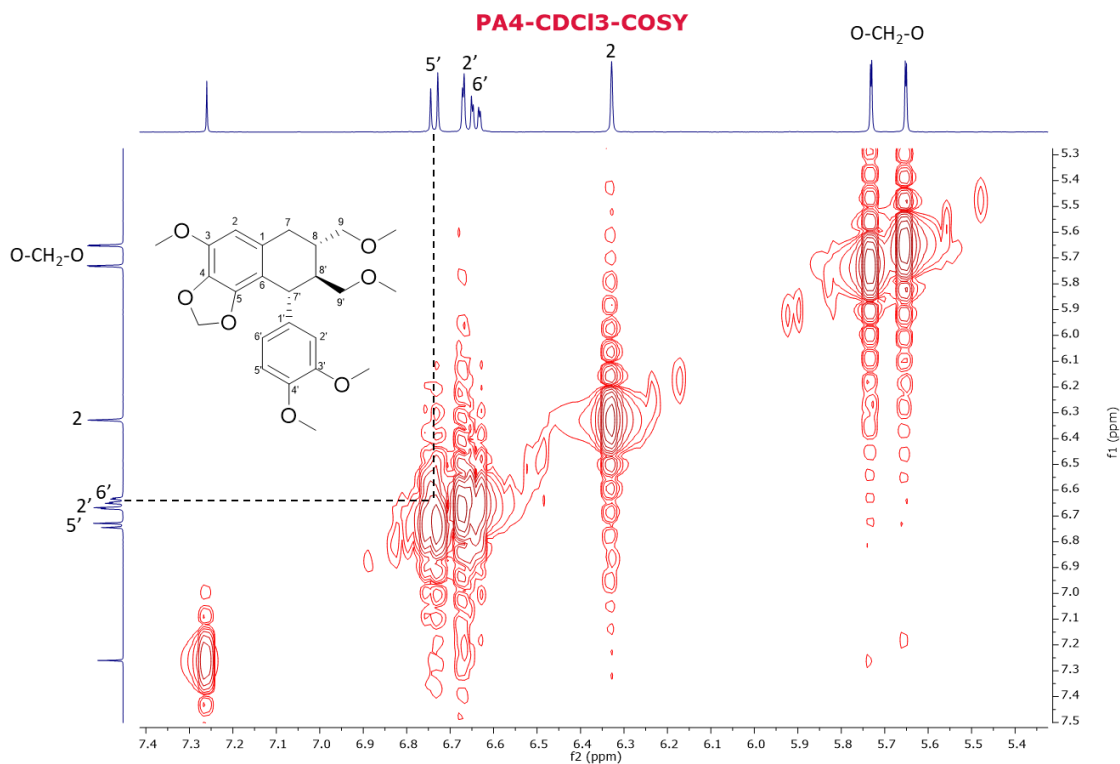
Hình PL4.14. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₄ trích vùng 1,9-4,1 ppm x 32-48 ppm



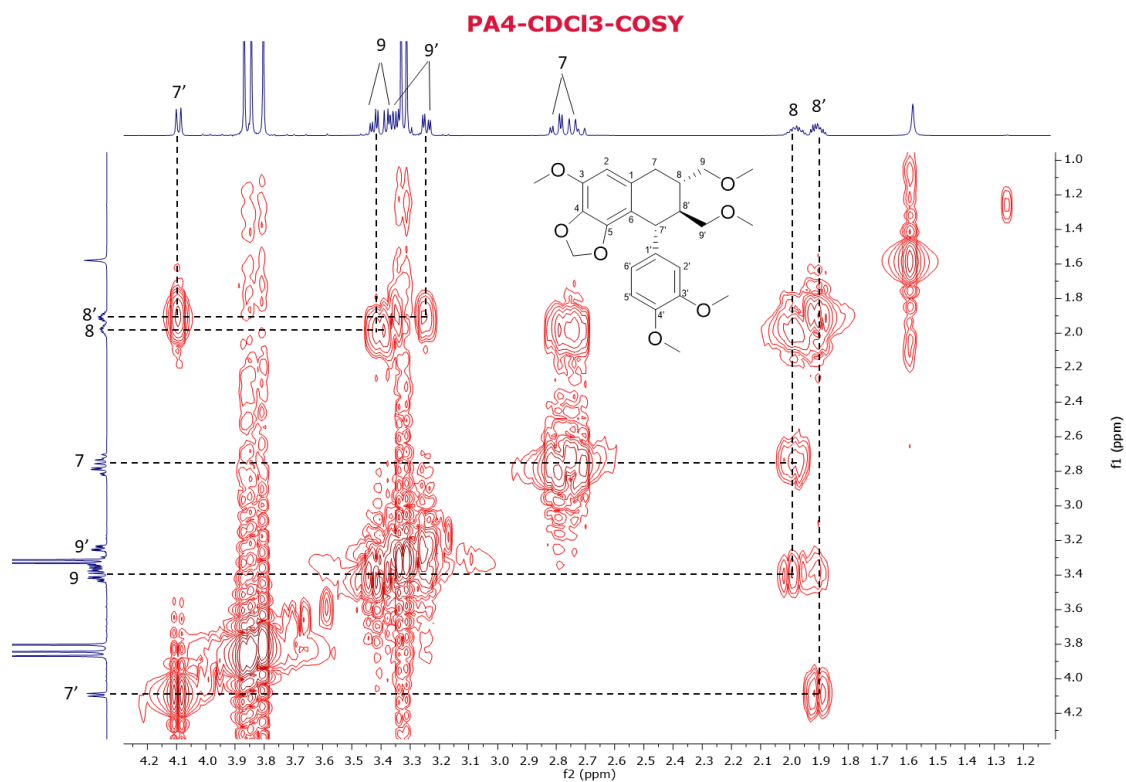
Hình PL4.15. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₄



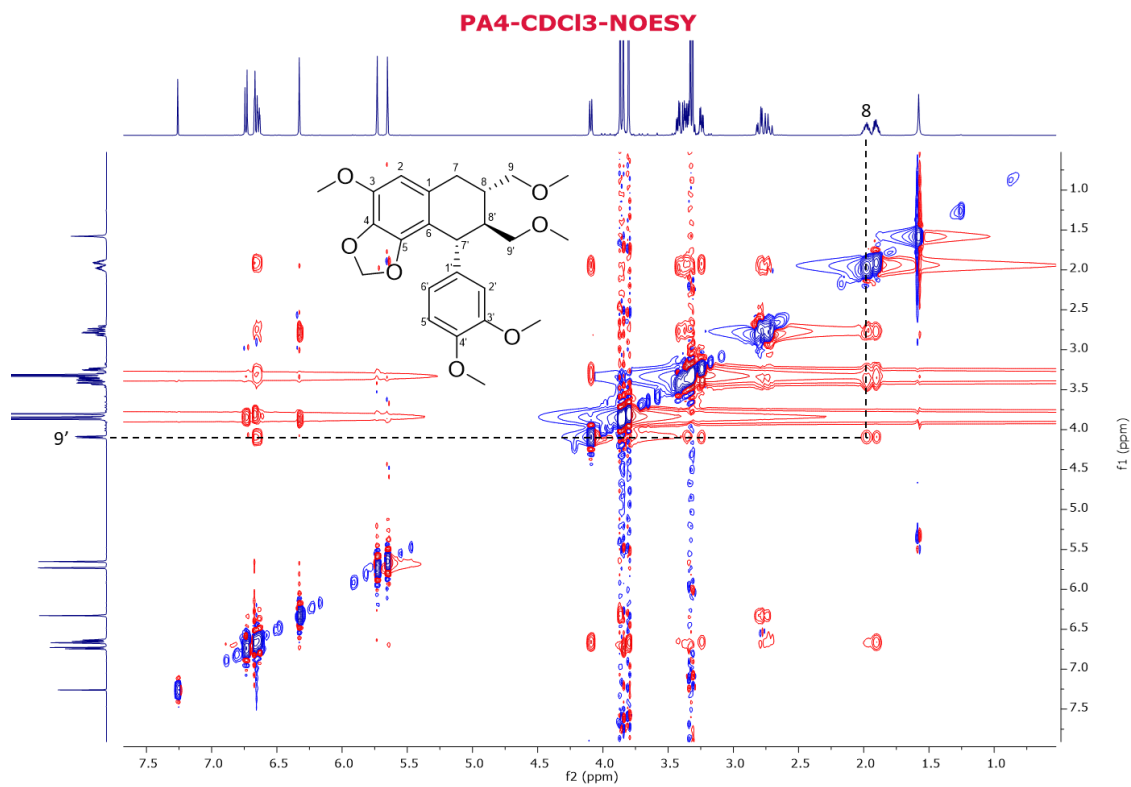
Hình PL4.16. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của PA₄
trích vùng 5,5-6,9 ppm x 30-150 ppm



Hình PL4.19. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₄ trích vùng 5,4–7,4 ppm

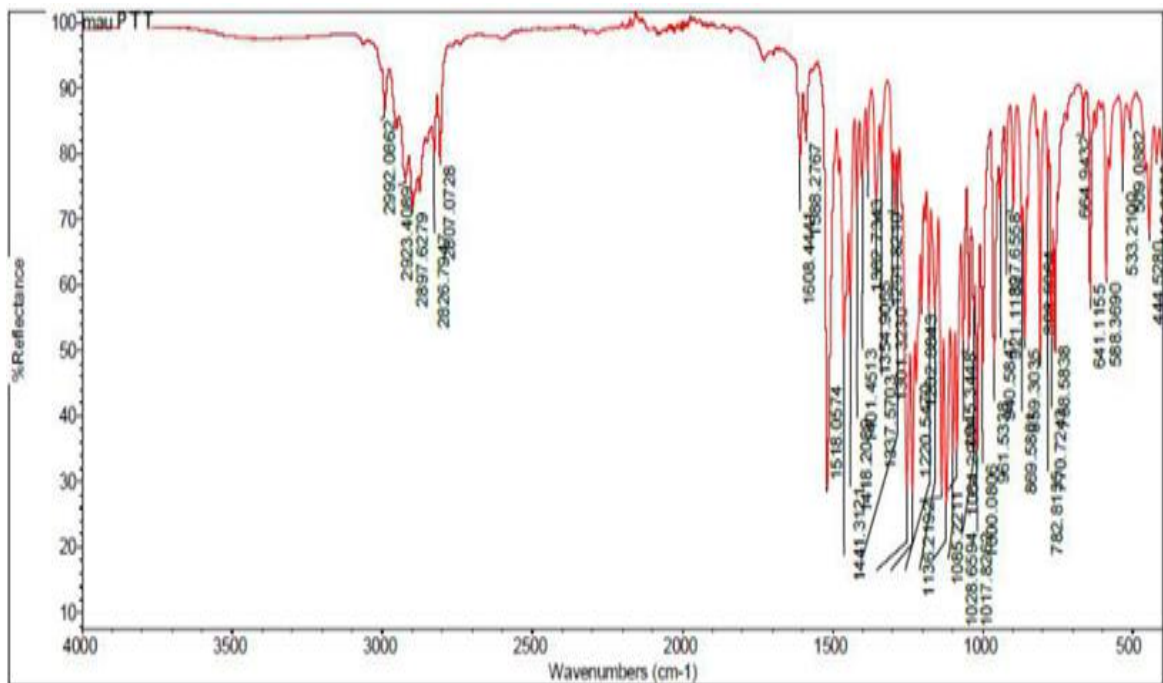


Hình PL4.20. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của PA₄ trích vùng 1,2–4,2 ppm

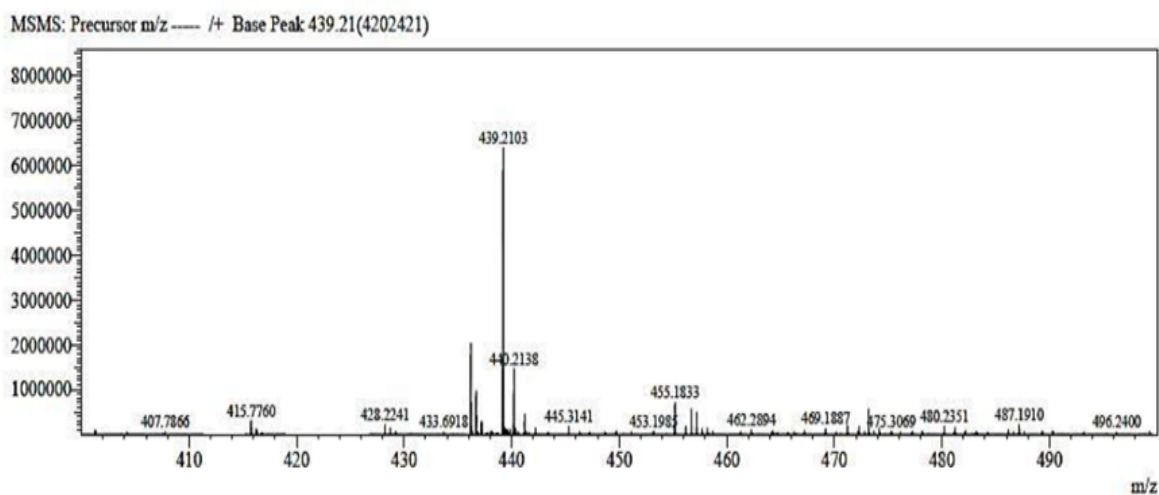


Hình PL4.21. Phổ NOESY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₄

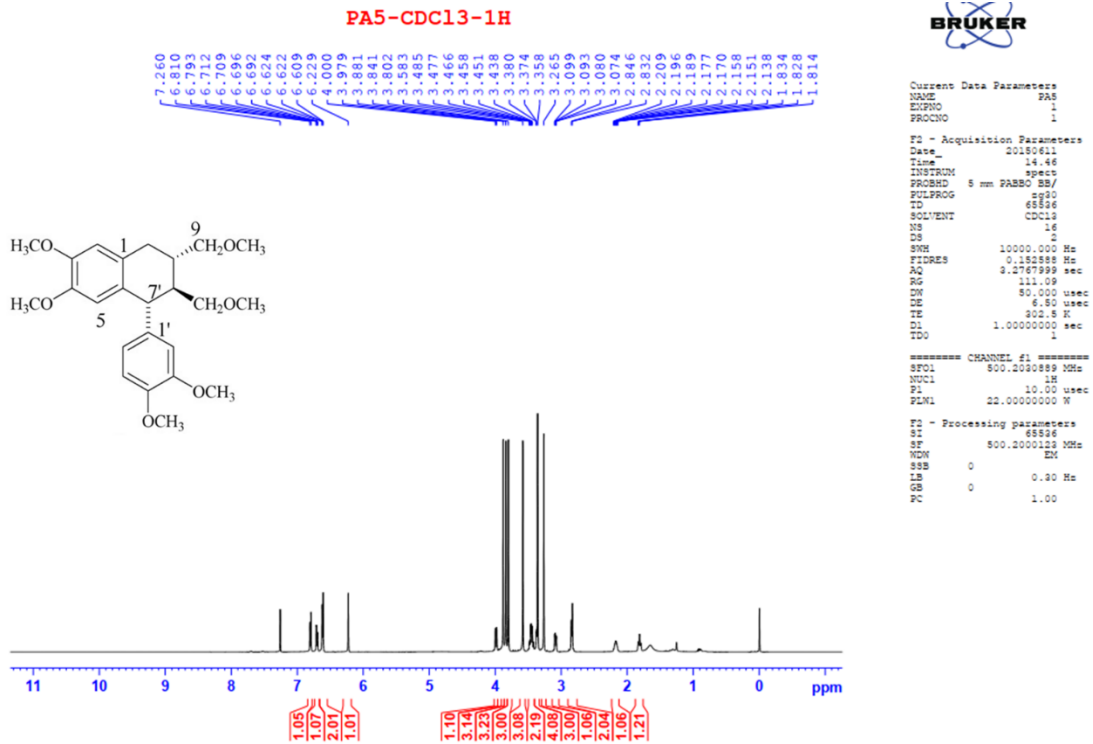
**PHỤ LỤC 5. DỮ LIỆU PHỔ CỦA CHẤT PA₅ PHÂN LẬP
(PHYL TETRALIN)**



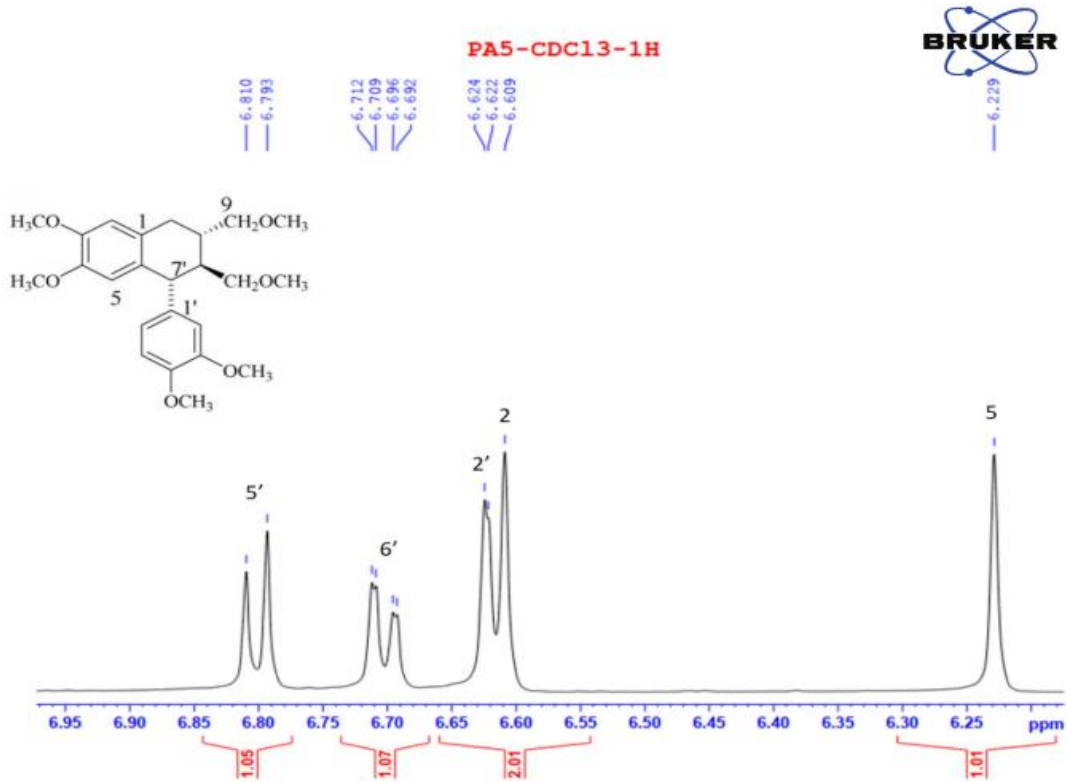
Hình PL5.1. Phổ IR của chất PA₅



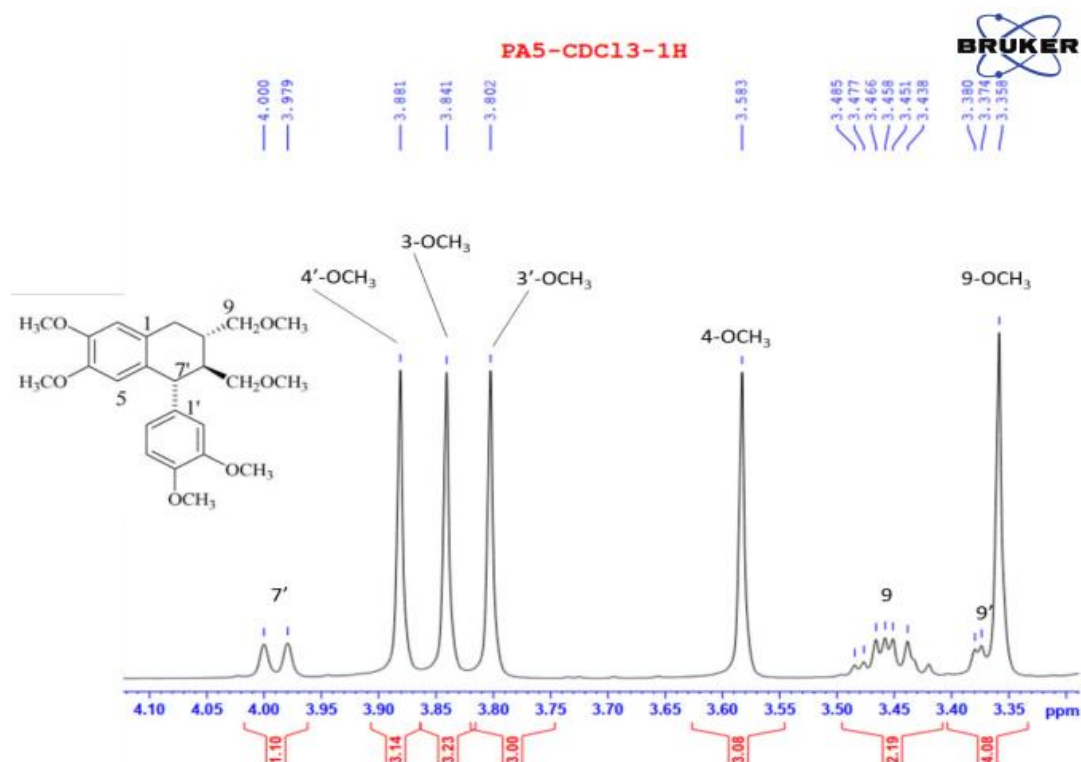
Hình PL5.2. Phổ MS của chất PA₅



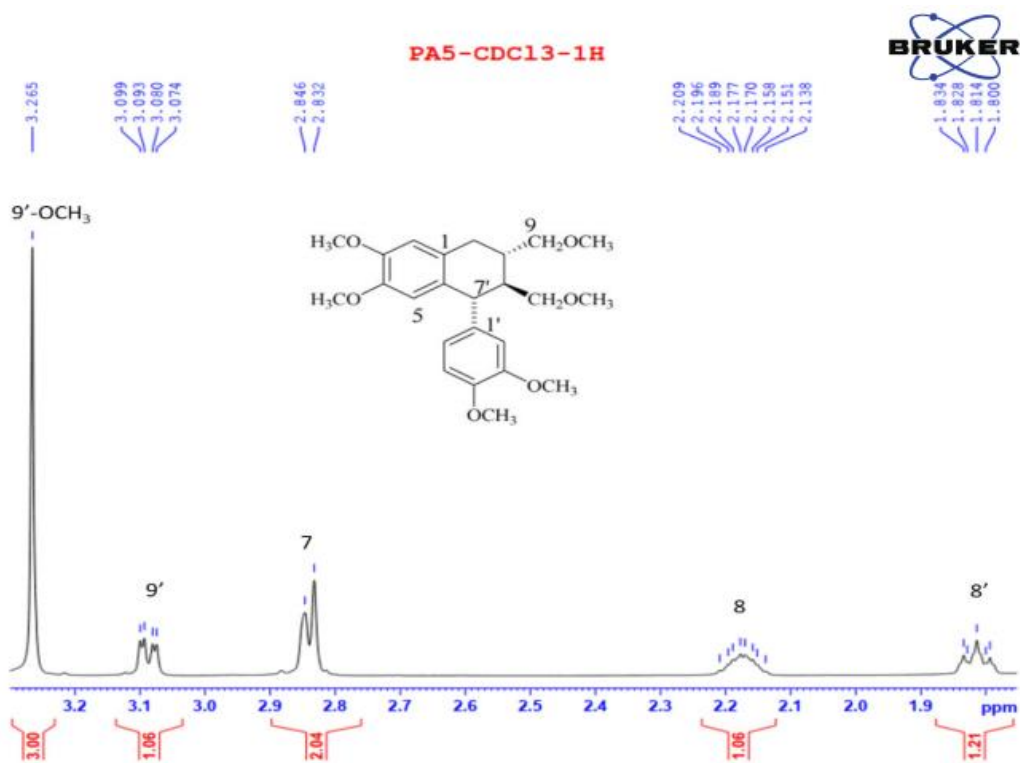
Hình PL5.3. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) của chất PA₅



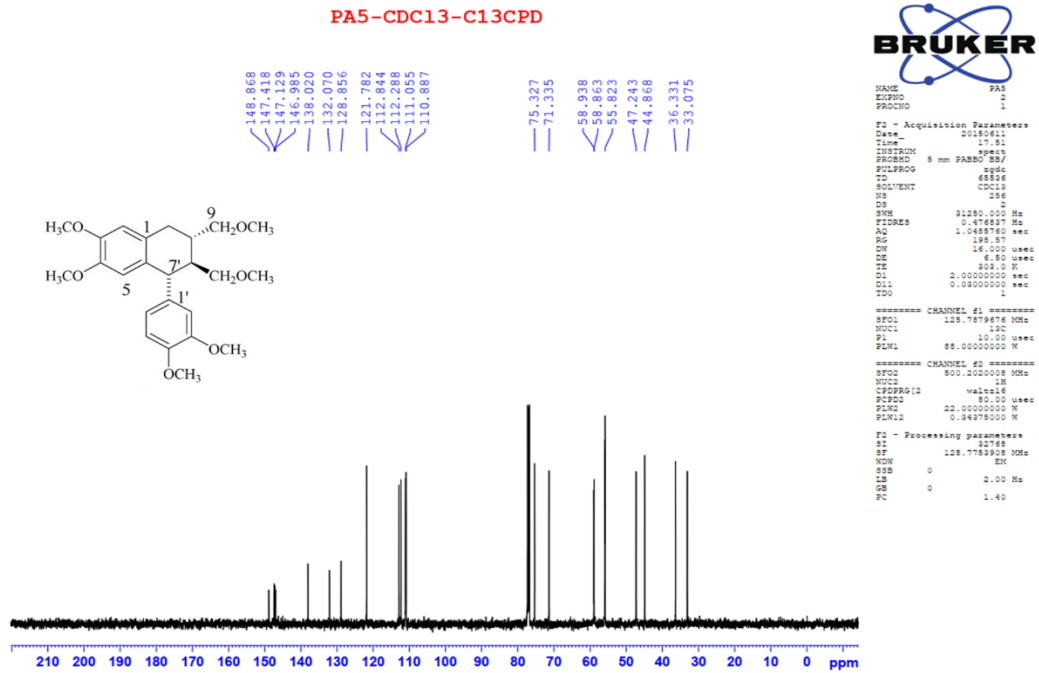
Hình PL5.4. Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) của chất PA₅ trích vùng 6,2-7,0 ppm



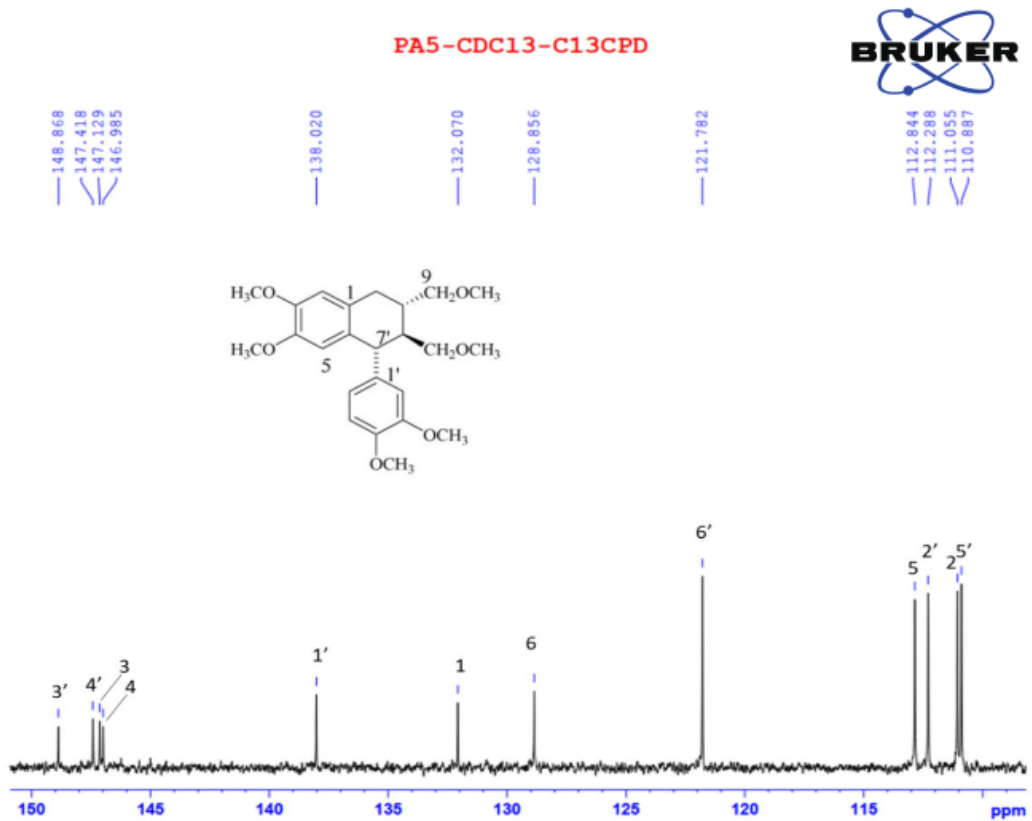
Hình PL5.5. Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₅ trích vùng 3,3–4,1 ppm



Hình PL5.6. Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₅ trích vùng 1,8–3,3 ppm

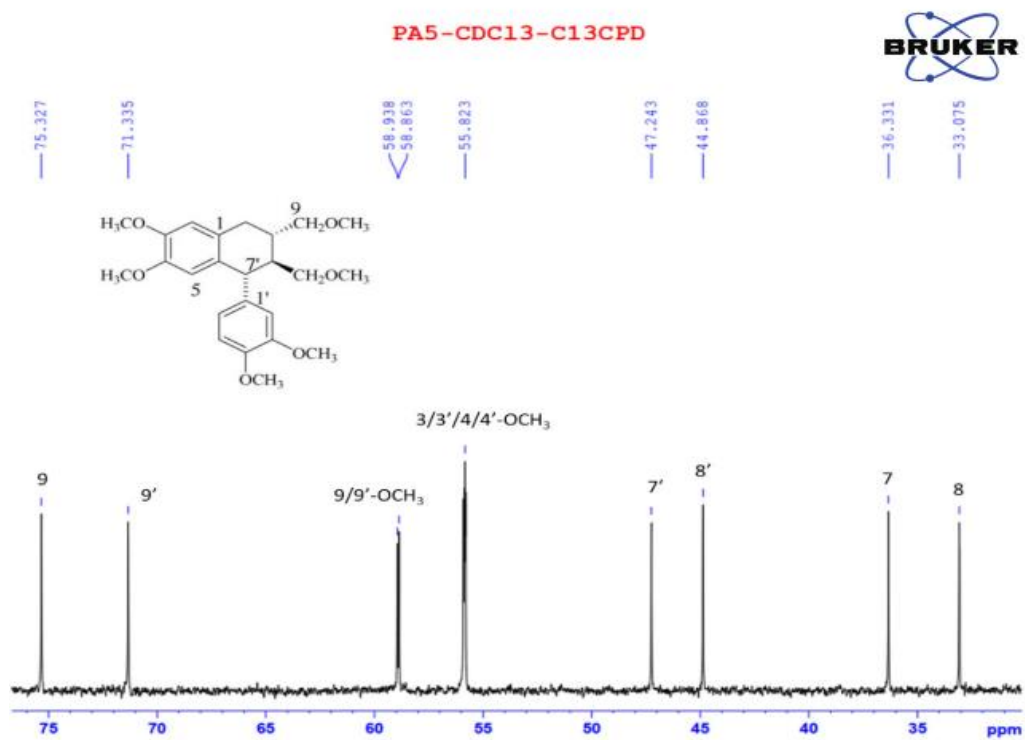


Hình PL5.7. Phổ ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) của chất PA₅

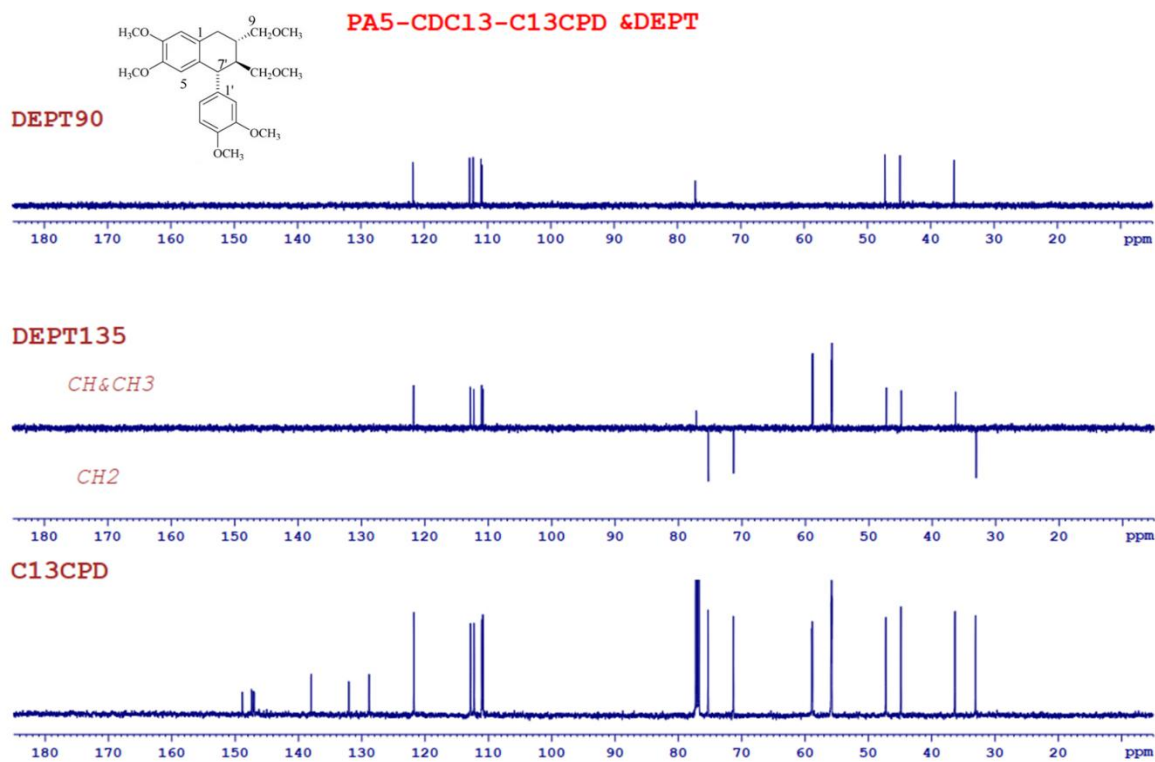


Hình PL5.8. Phổ ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) của chất PA₅

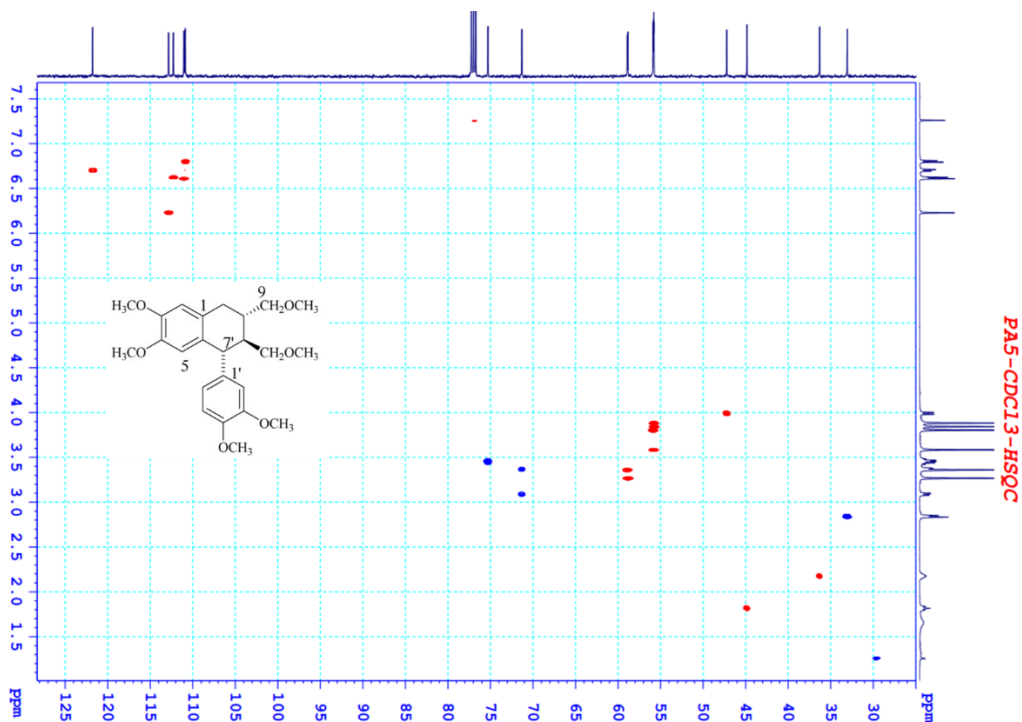
trích vùng 110-150 ppm



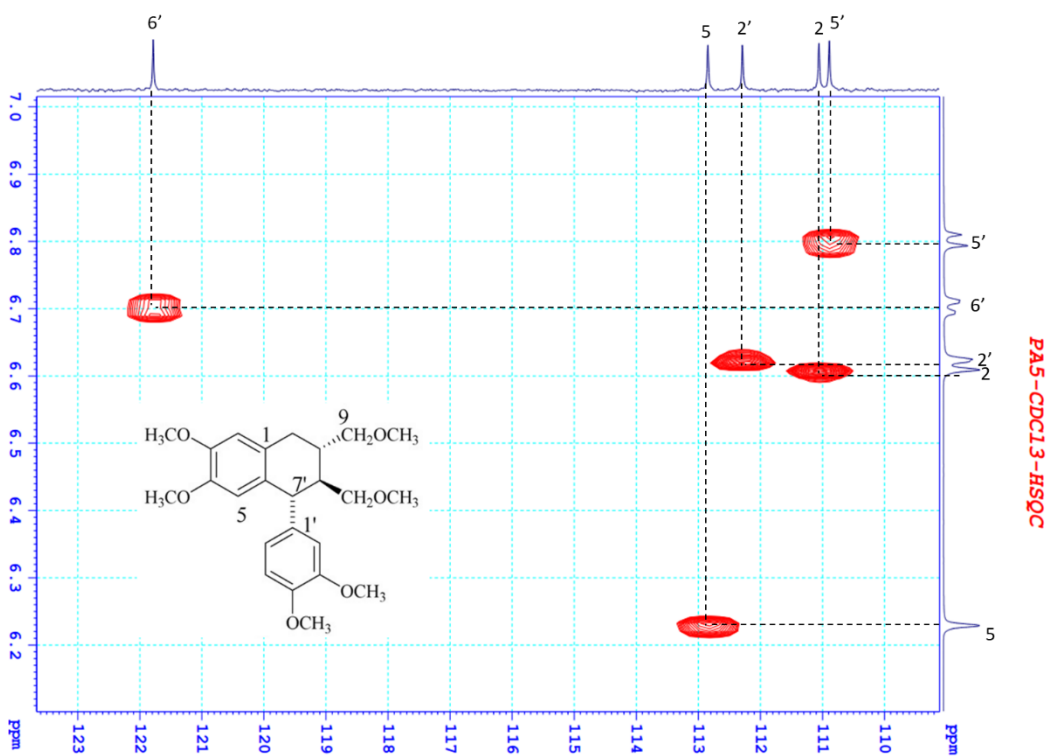
Hình PL5.9. Phổ ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz) của chất PA₅ trích vùng 30-75 ppm



Hình PL5.10. Phổ DEPT (CDCl_3 , 125 MHz) của chất PA₅

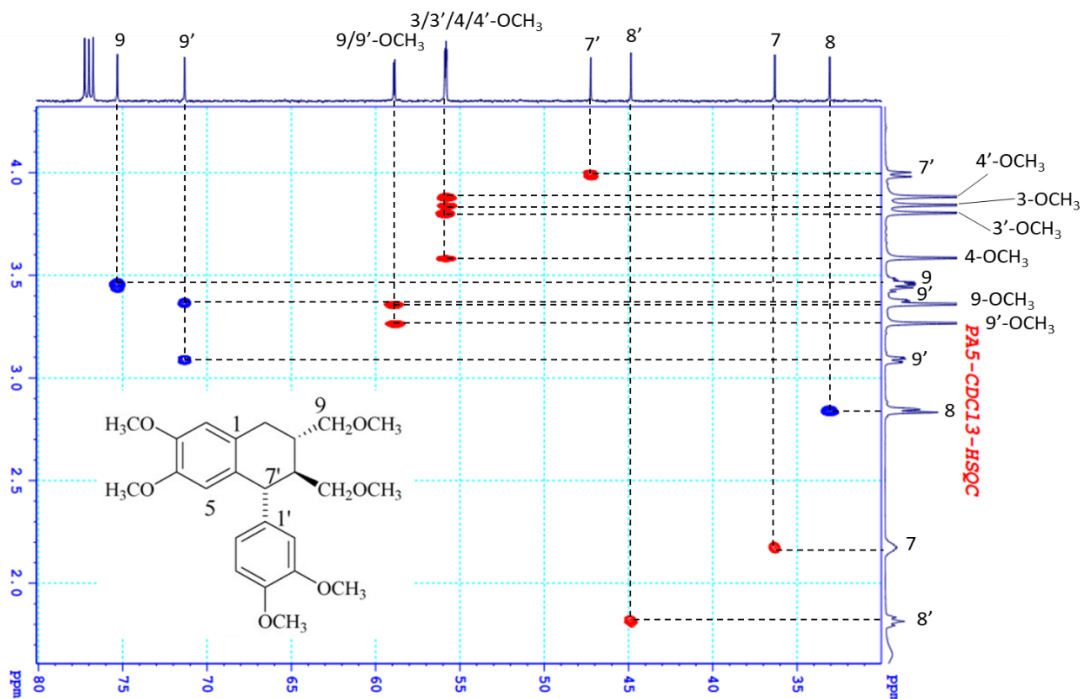


Hình PL5.11. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₅

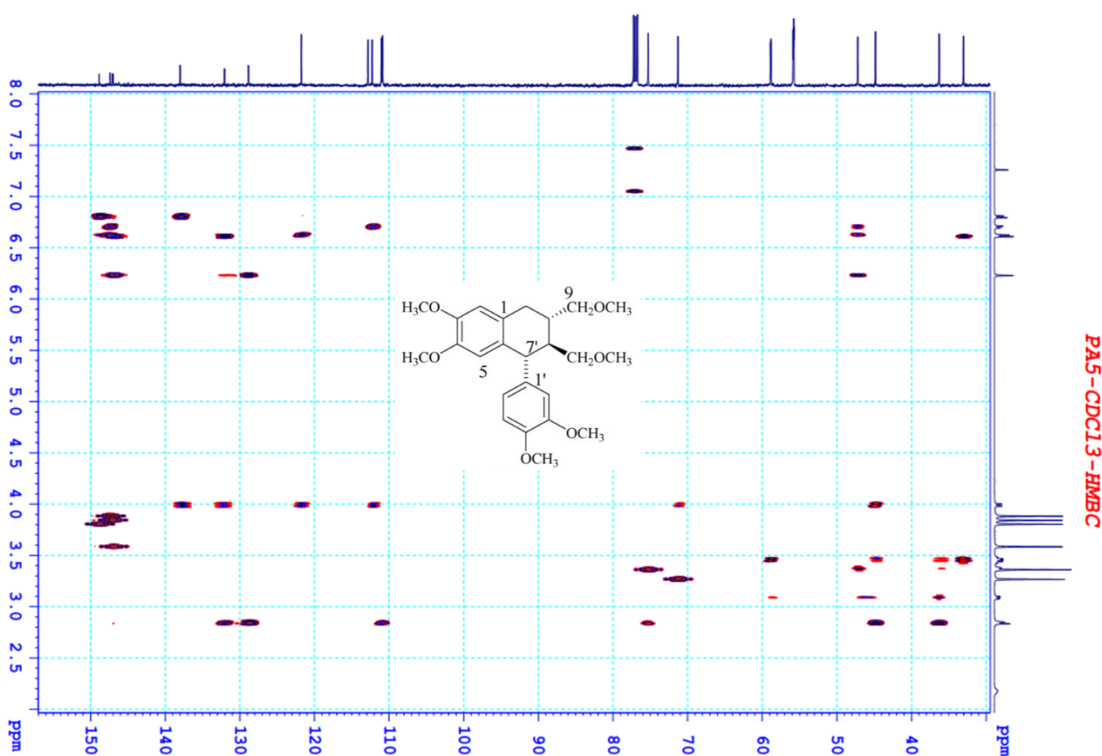


Hình PL5.12. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₅

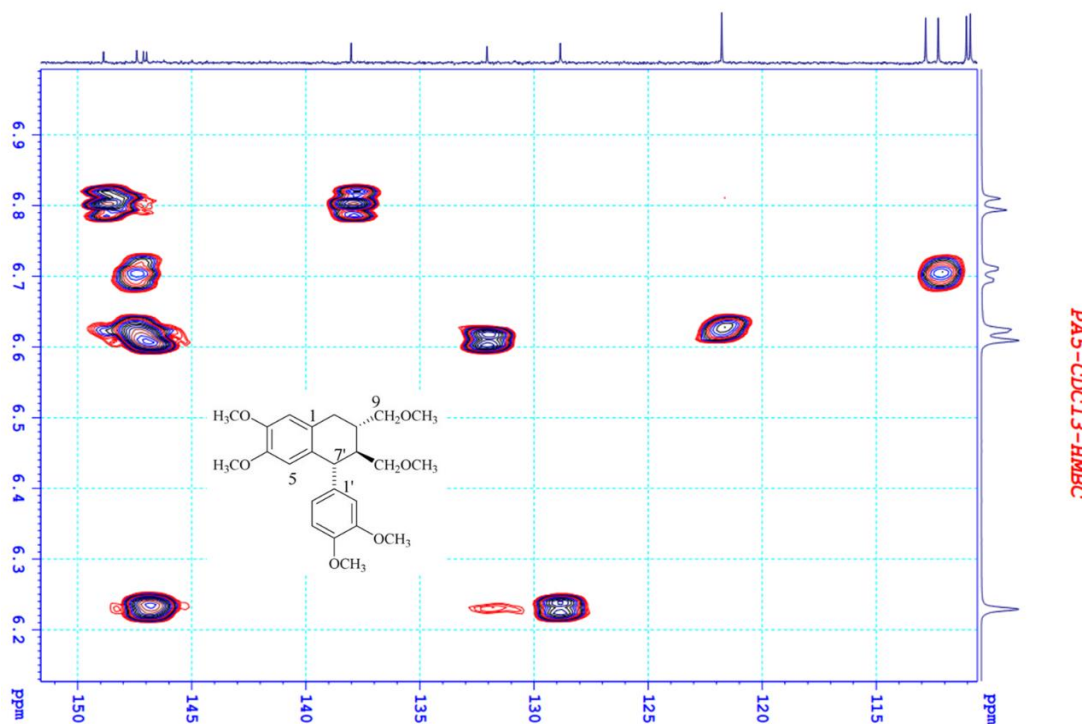
trích vùng 6,1-7,0 ppm x 110-123 ppm



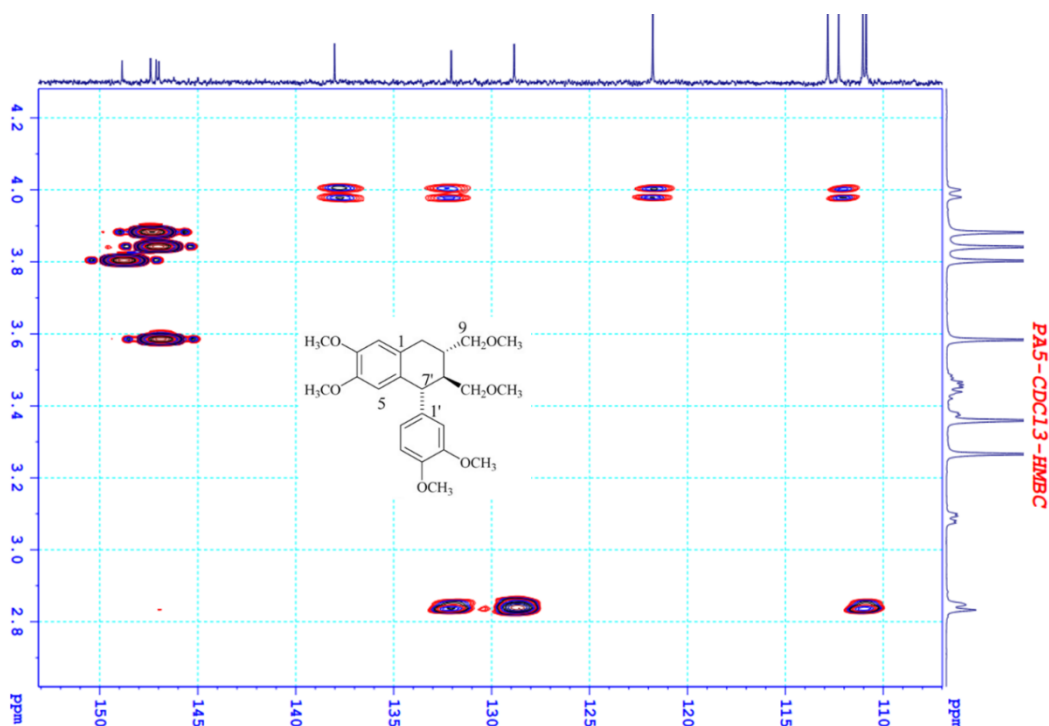
Hình PL5.13. Phổ HSQC (CDCl_3 , 125/500 MHz) của chất PA_5 trích vùng 1,5-4,5 ppm x 30-80 ppm



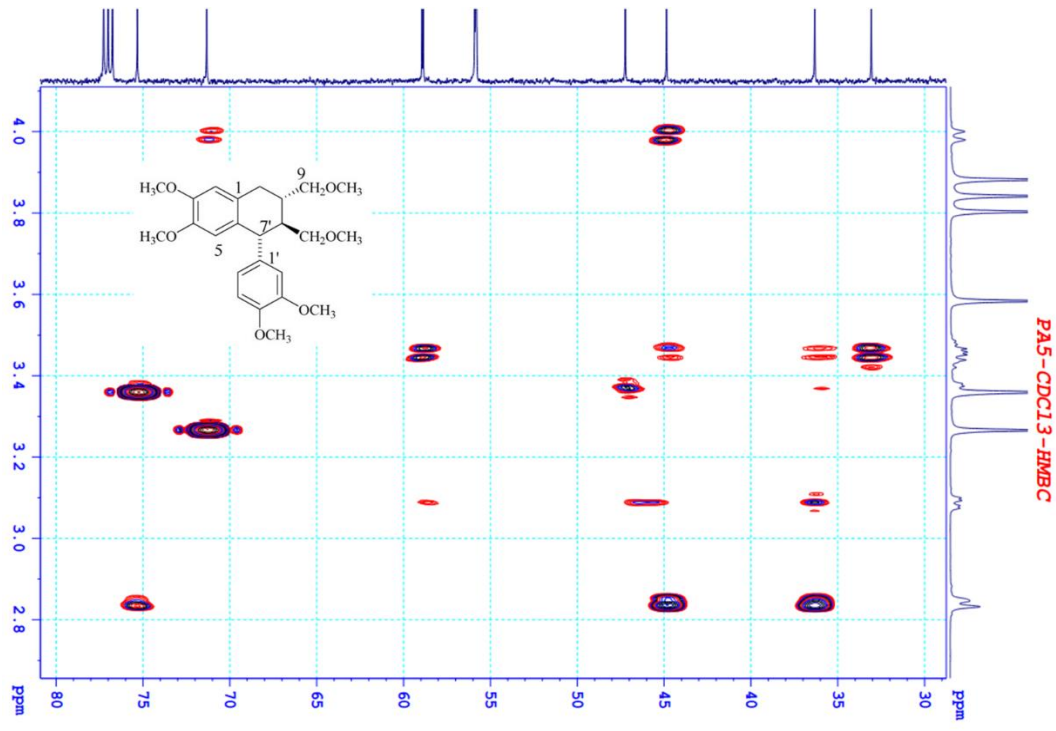
Hình PL5.14. Phổ HMBC (CDCl_3 , 125/500 MHz) của chất PA_5



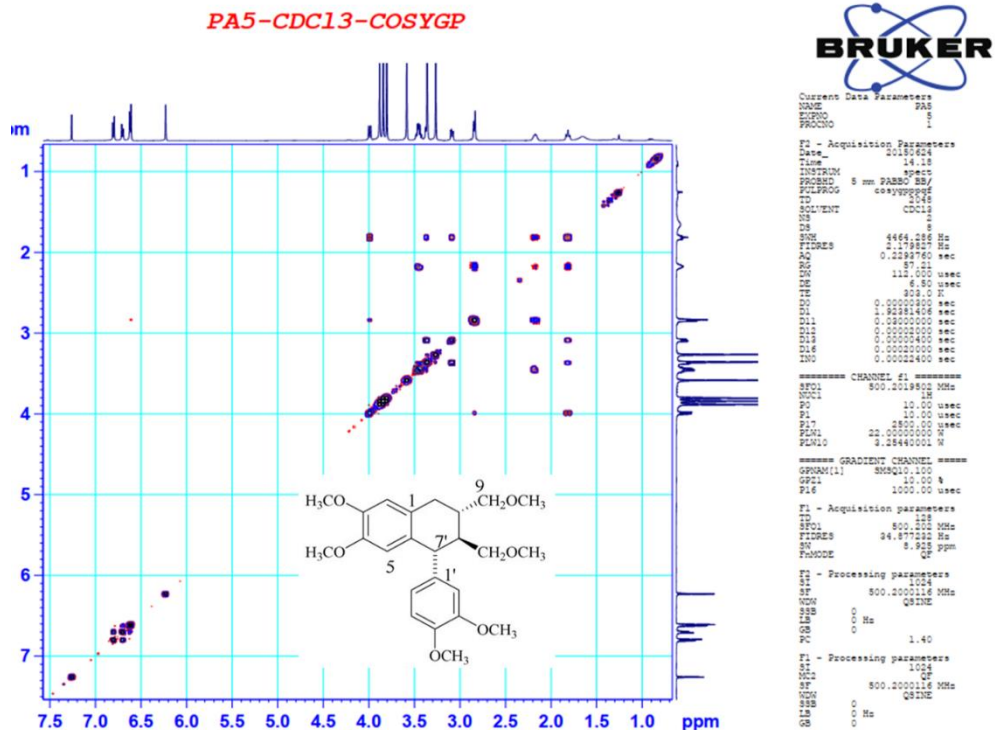
Hình PL5.15. Phổ HMBC (CDCl_3 , 125/500 MHz) của chất PA_5 trích vùng 6,1-7,0 ppm x 110-150 ppm



Hình PL5.16. Phổ HMBC (CDCl_3 , 125/500 MHz) của chất PA_5 trích vùng 2,6-4,2 ppm x 110-150 ppm



Hình PL5.17. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₅ trích vùng 2,6-4,2 ppm x 30-80 ppm



BRUKER

```

Current Data Parameters
NAME      PA5
EXPNO    2
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    201504
Time     14.18
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  cosypprog2
TD       65536
SOLVENT  CDCl3
NS       2048
DS       4
SWH      4664.016 Hz
FIDRES   0.119816 Hz
AQ       0.2393760 sec
RG       67
SFO      500.1362600 MHz
DQ       6.50 usec
DE       303.0 V
TE       300.2 K
DPC1     0.00000000 sec
DPC2     0.00000000 sec
DPC3     0.00000000 sec
DPC4     0.00000000 sec
DPC5     0.00000000 sec
DPC6     0.00000000 sec
===== CHANNEL f1 =====
SFO1     500.1319500 MHz
NUC1     13C
P1       10.00 usec
PL1      0.00 dB
PC1      20.00000000 Hz
PCNUC1  1.28400001 s

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPRAM(1)  RMSQ10.100
GPCI      10.00 %
PL16     1000.00 usec

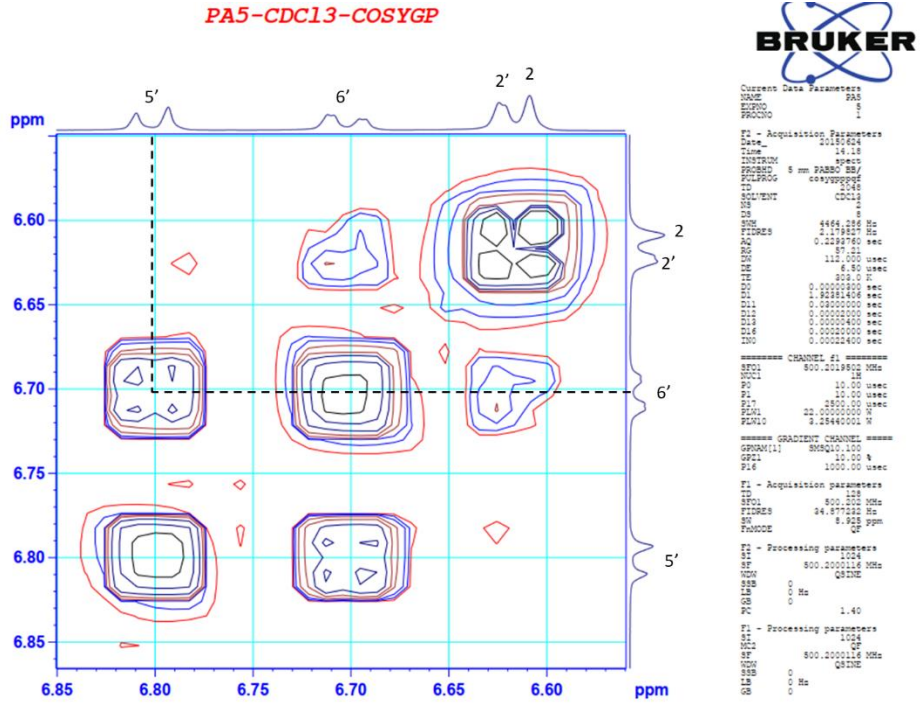
F1 - Acquisition parameters
TD       128
SFO1     500.1319500 MHz
FIDRES   24.870000 Hz
SS       8.925 ppm
PNUC1    13C

F1 - Processing parameters
SI       128
SF       500.1319500 MHz
WDW      EM
SSB      0 Hz
GB       0 Hz
PC       1.40

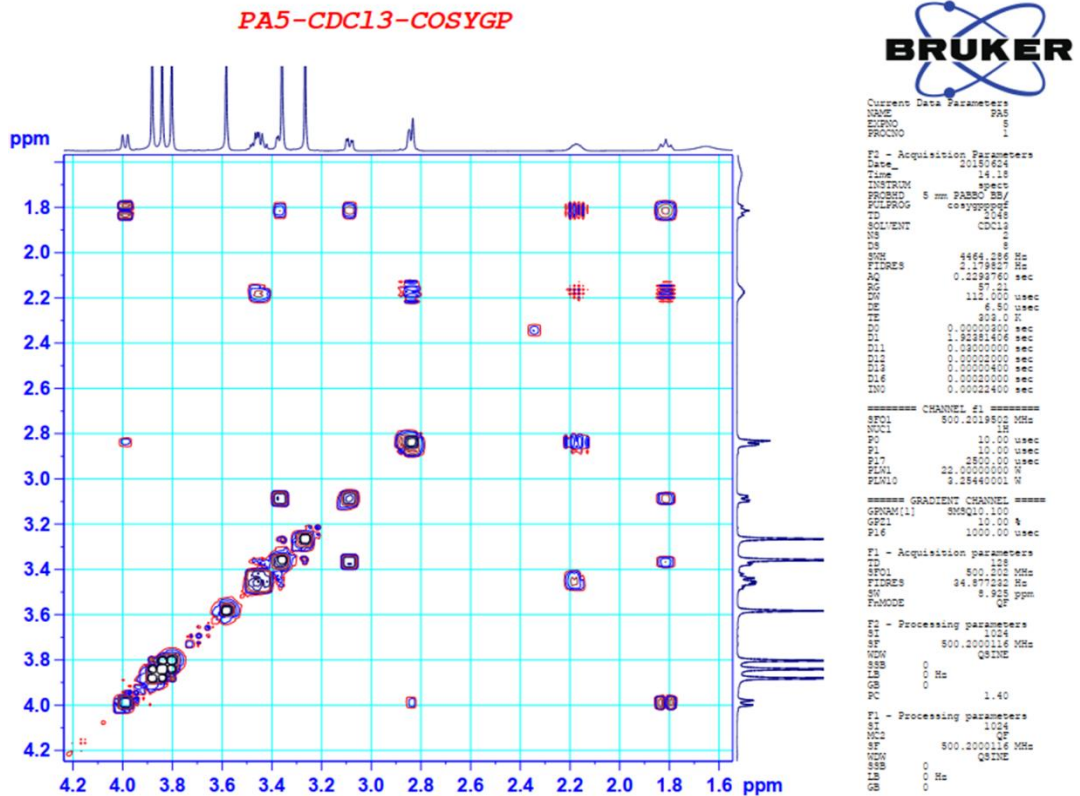
F1 - Processing parameters
SI       65536
SF       500.1319500 MHz
WDW      EM
SSB      0 Hz
GB       0 Hz

```

Hình PL5.18. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₅

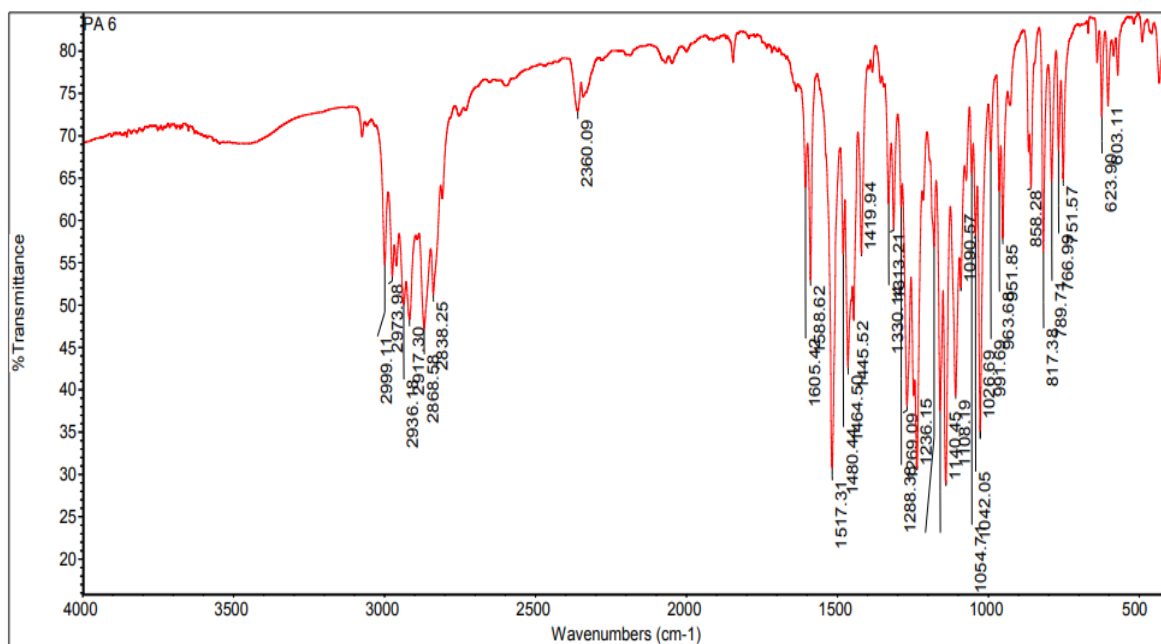


Hình PL5.19. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₅ trích vùng 6,55-6,85 ppm

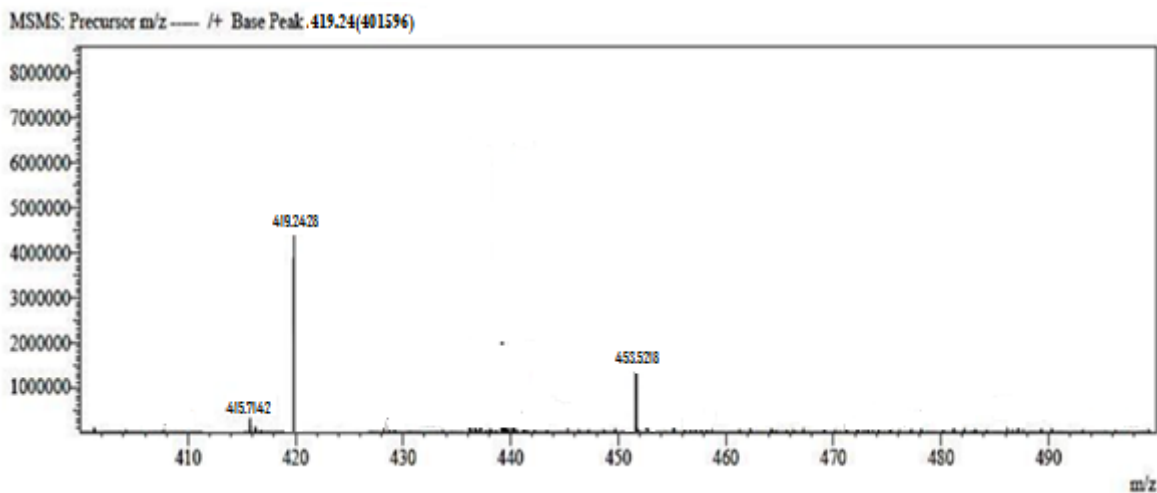


Hình PL5.20. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₅ trích vùng 1,6-4,2 ppm

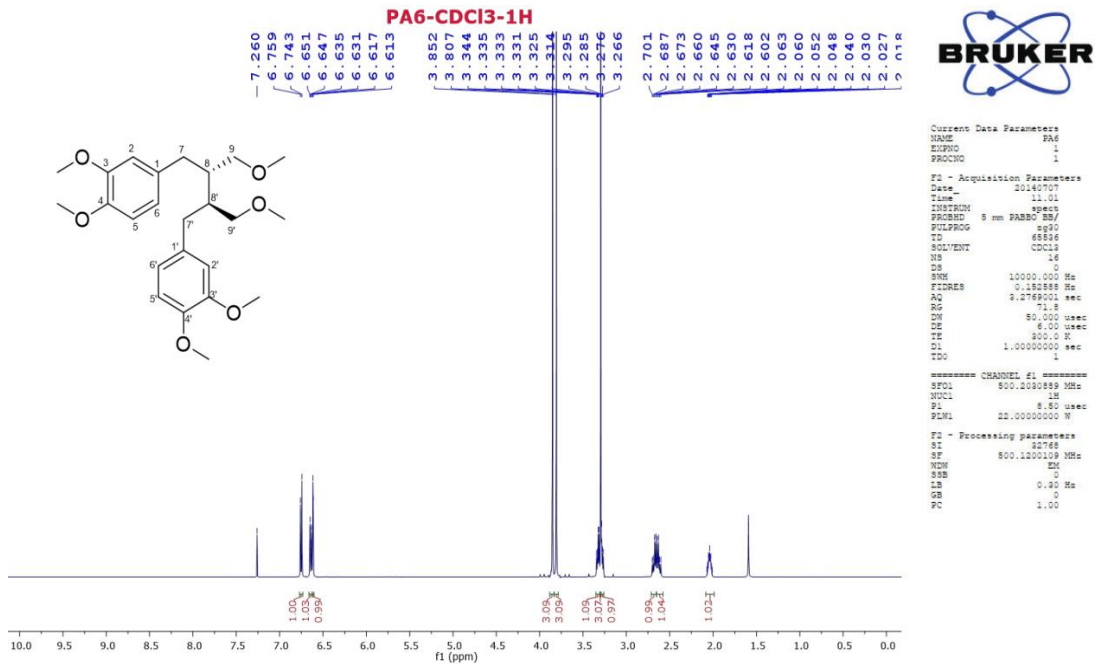
PHỤ LỤC 6. DỮ LIỆU PHỔ CỦA CHẤT PA₆ PHÂN LẬP (PHYLLANTHIN)



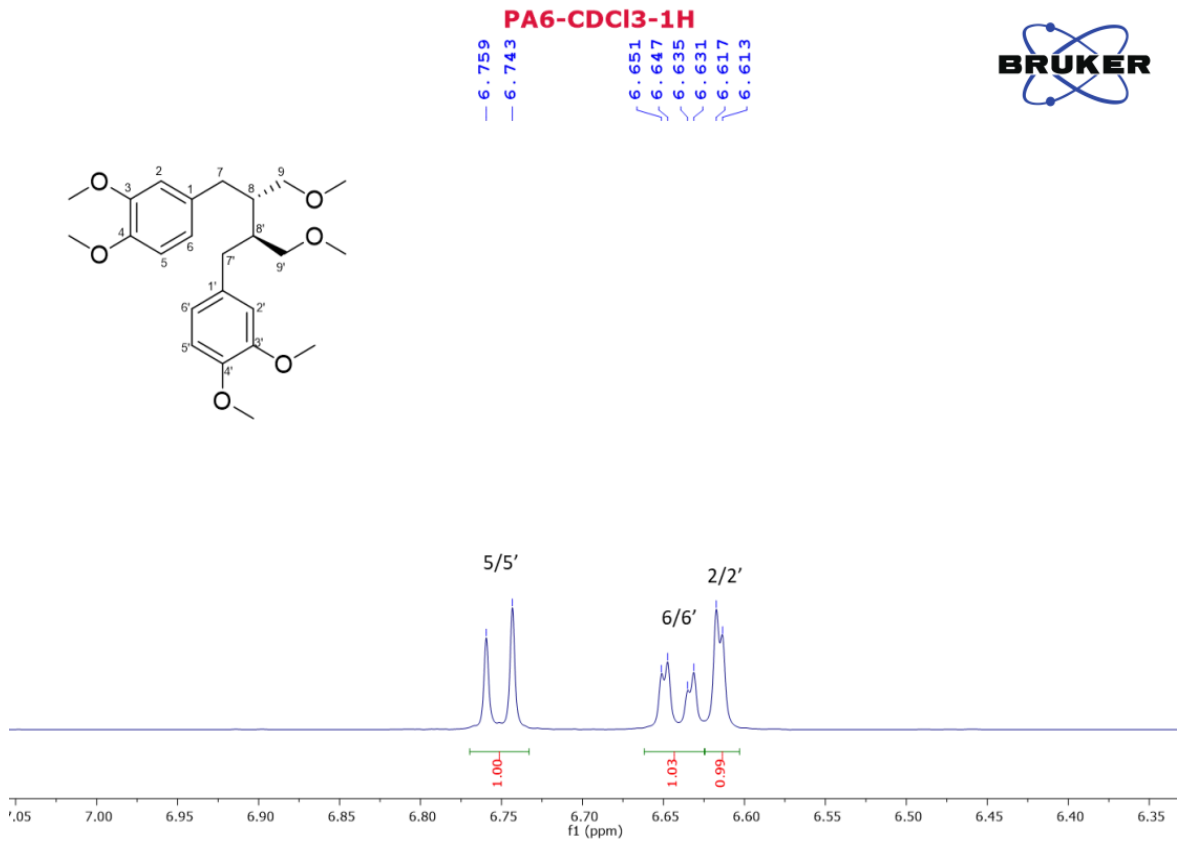
Hình PL6.1. Phổ IR của chất PA₆



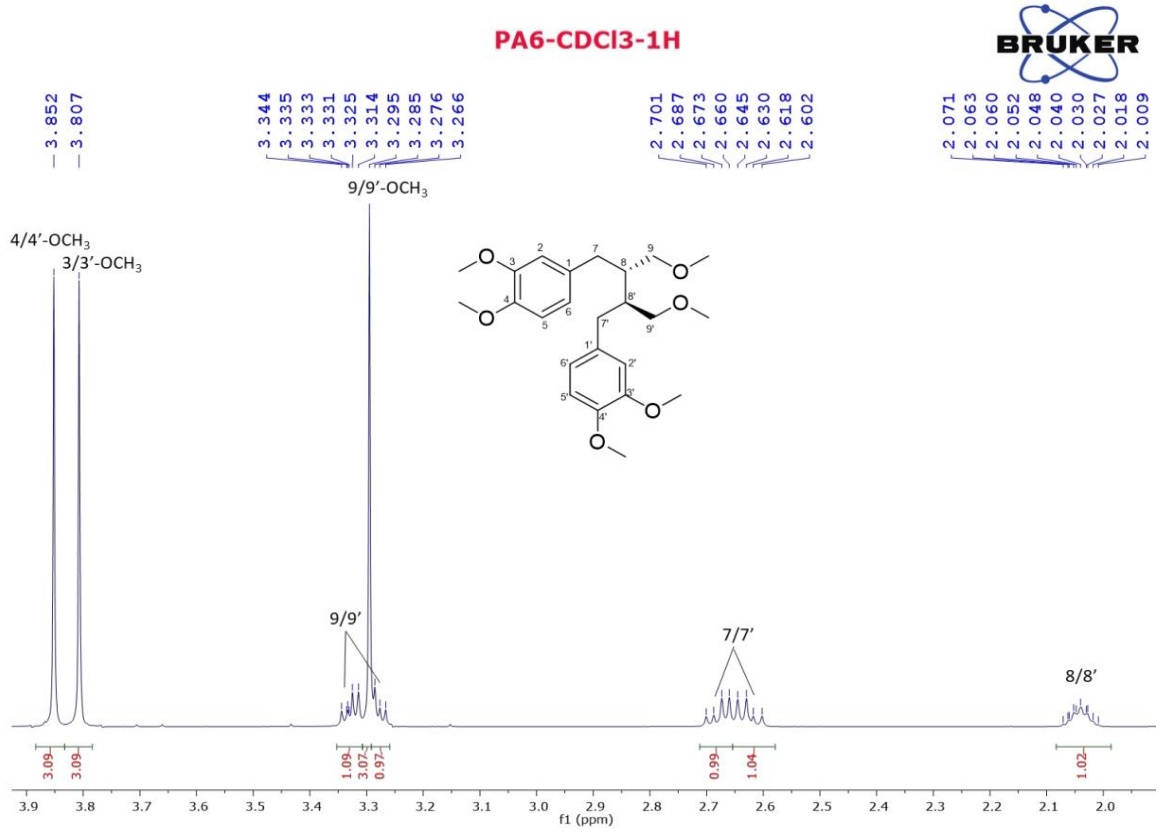
Hình PL6.2. Phổ MS của chất PA₆



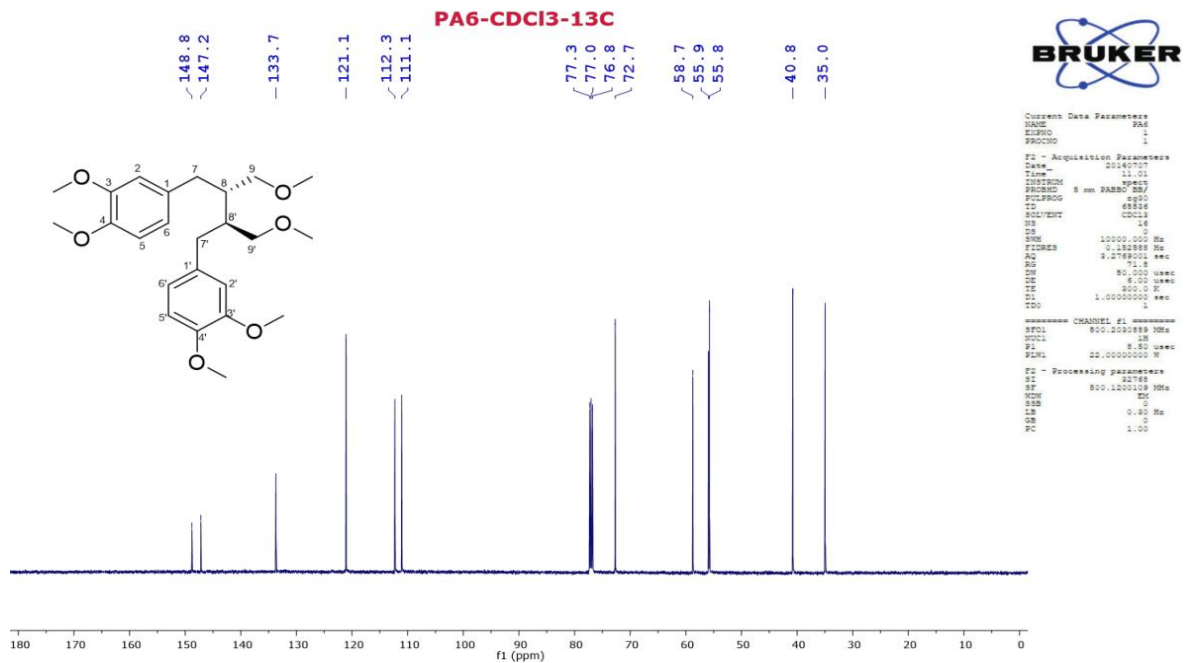
Hình PL6.3. Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₆



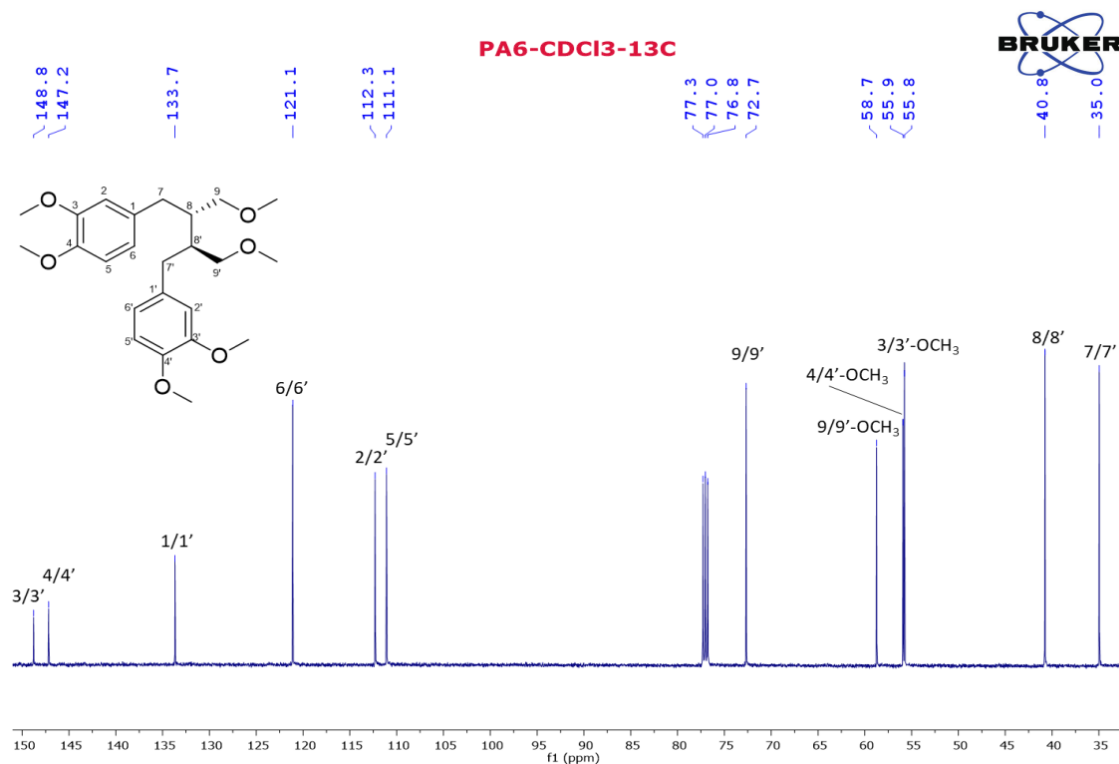
Hình PL6.4. Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₆ trích vùng 6,3-7,0 ppm



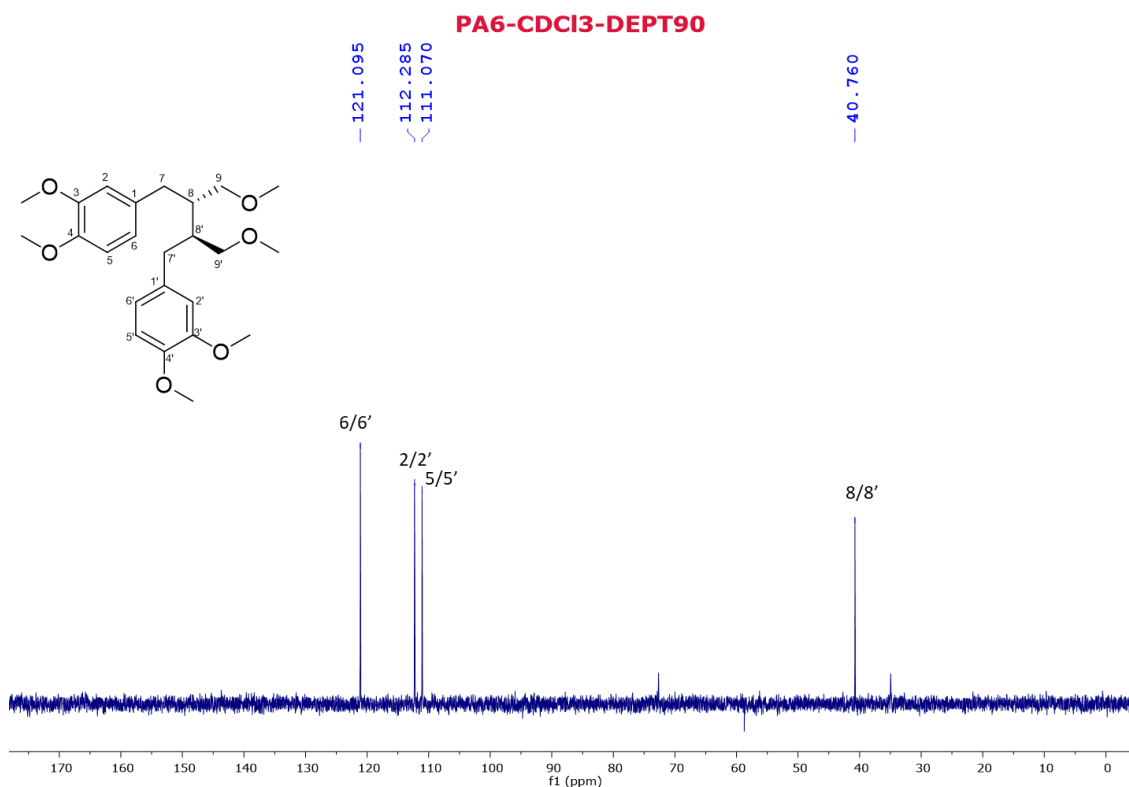
Hình PL6.5. Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₆ trích vùng 2,0-3,9 ppm



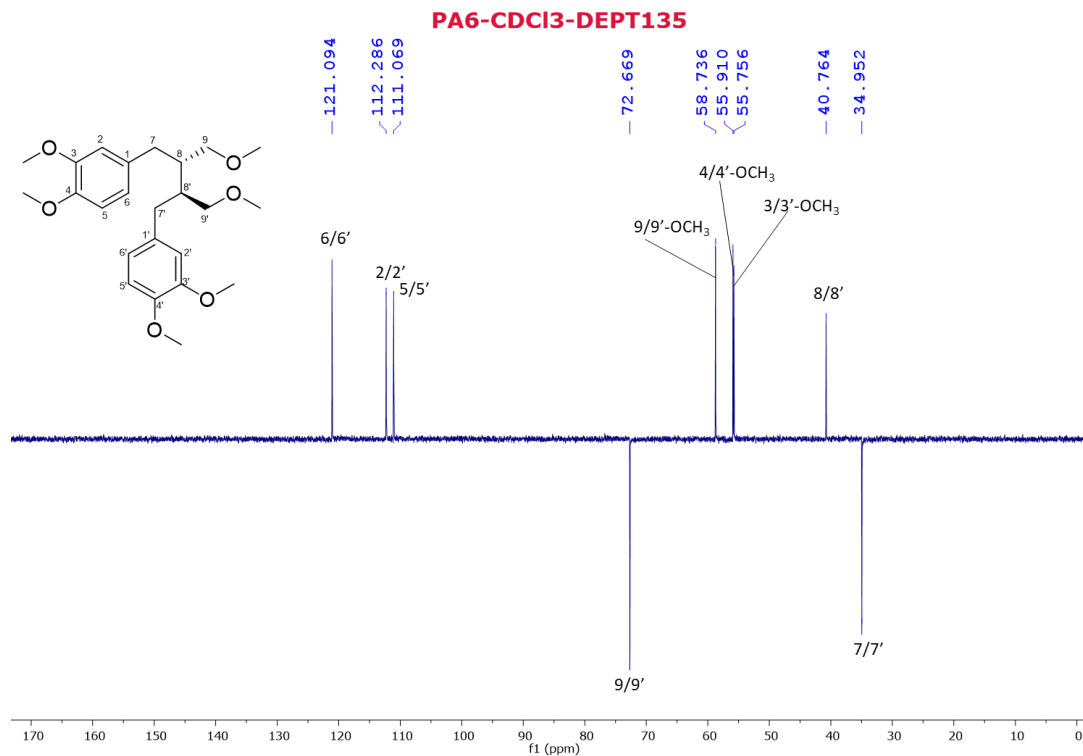
Hình PL6.6. Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₆



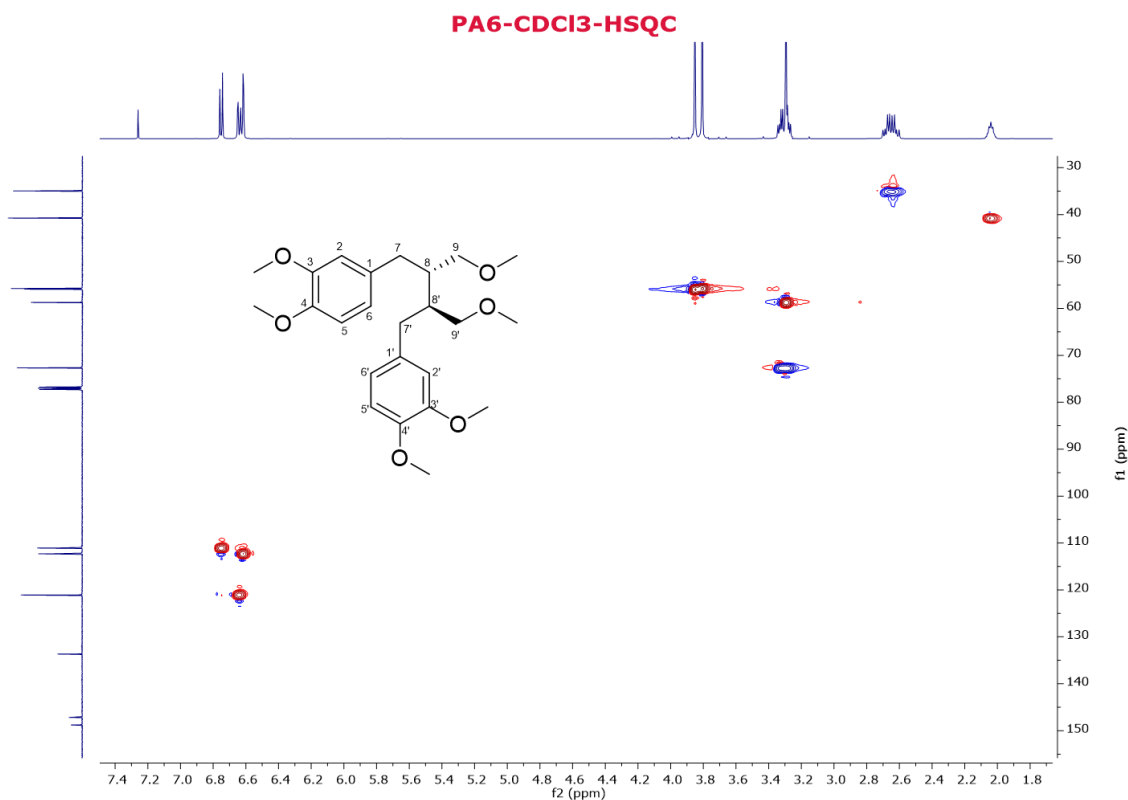
Hình PL6.7. Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₆ trích vùng 35-150 ppm



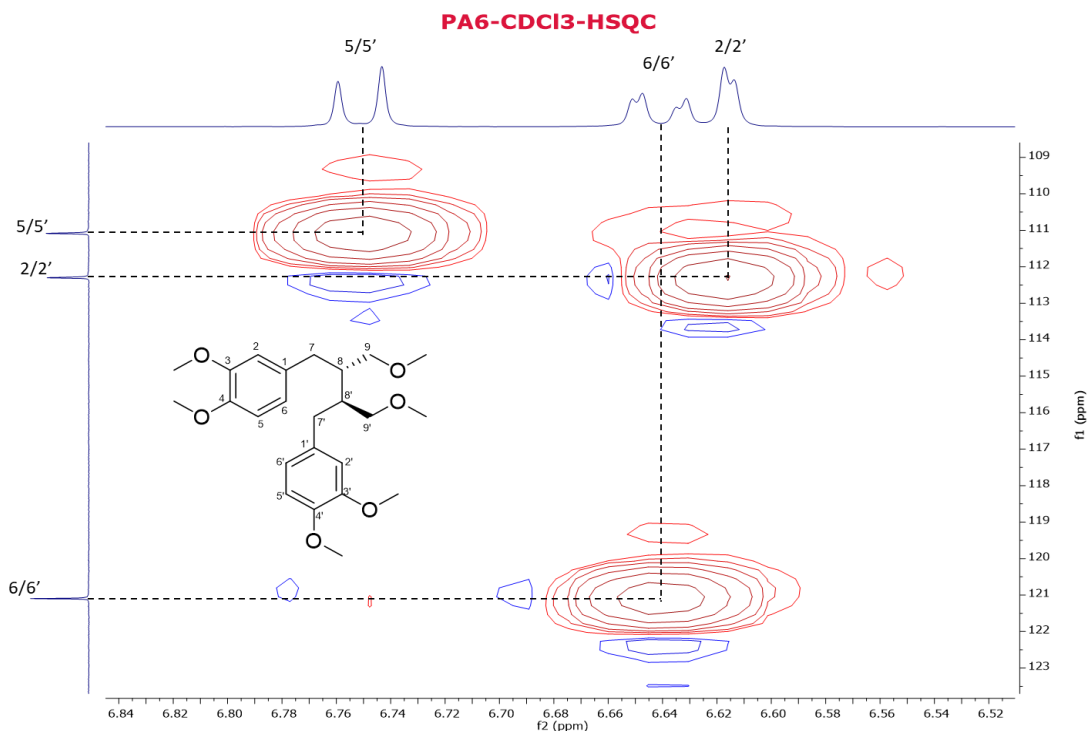
Hình PL6.8. Phổ DEPT-90 (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₆



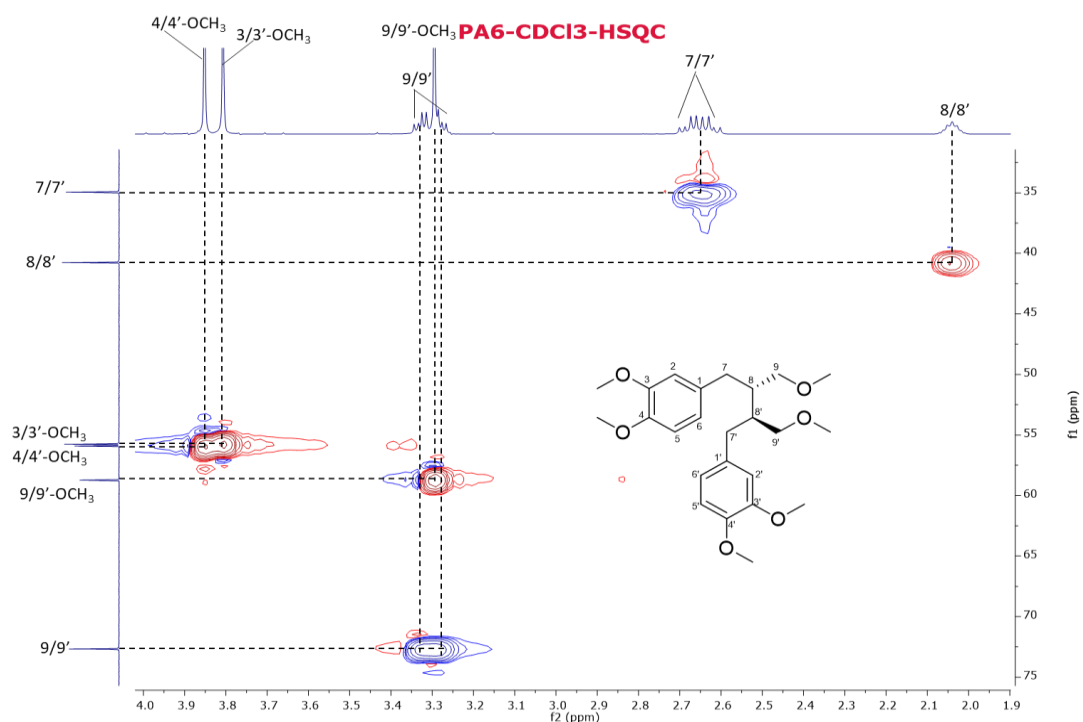
Hình PL6.9. Phổ DEPT-135 (CDCl₃, 125 MHz) của chất PA₆



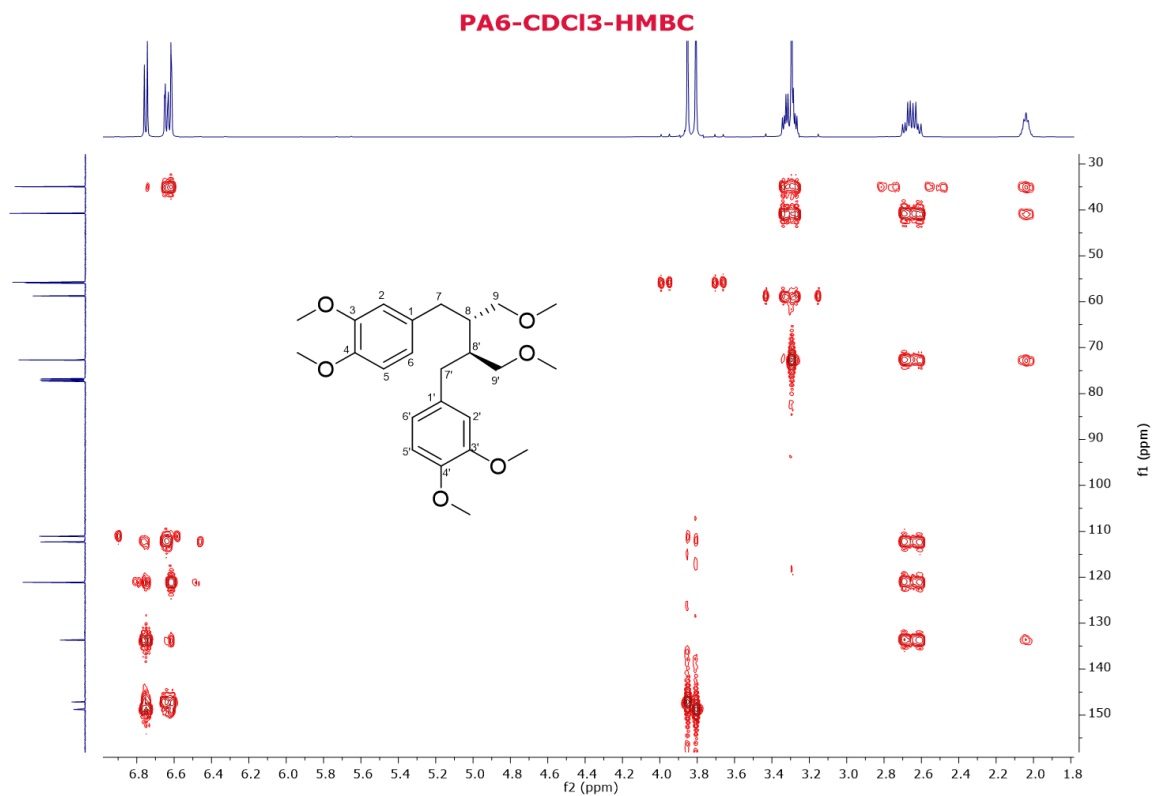
Hình PL6.10. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₆



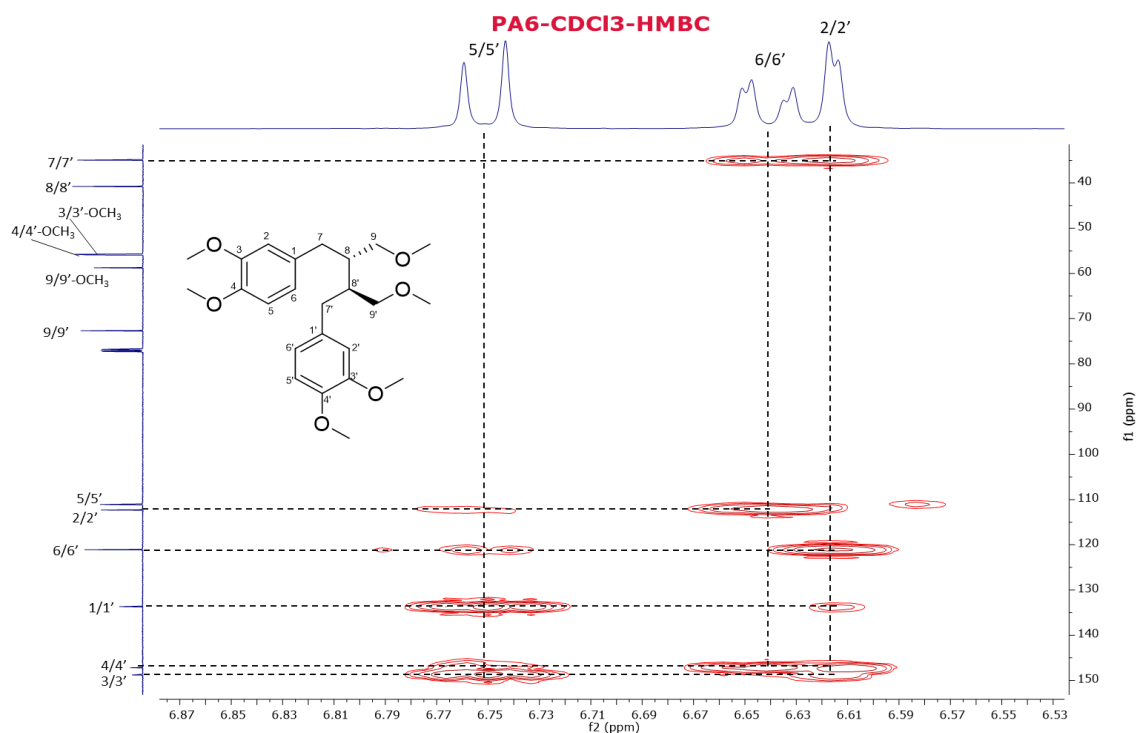
Hình PL6.11. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₆
trích vùng 6,5-6,8 ppm x 109-123 ppm



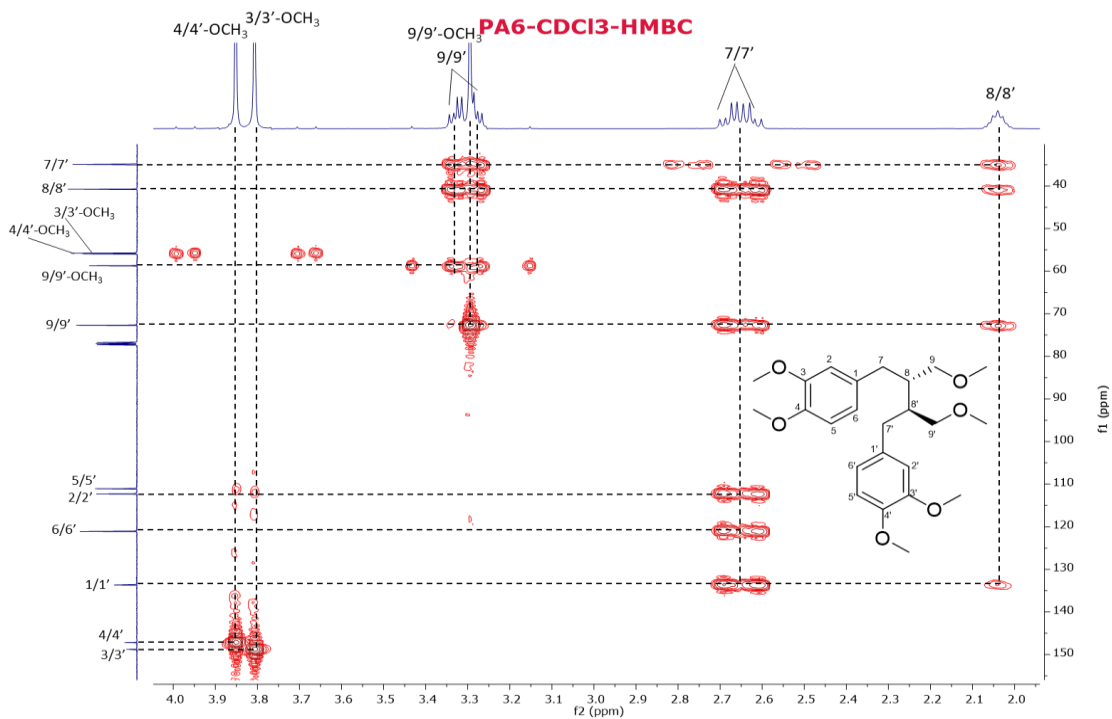
Hình PL6.12. Phổ HSQC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₆
trích vùng 1,9-4,0 ppm x 35-75 ppm



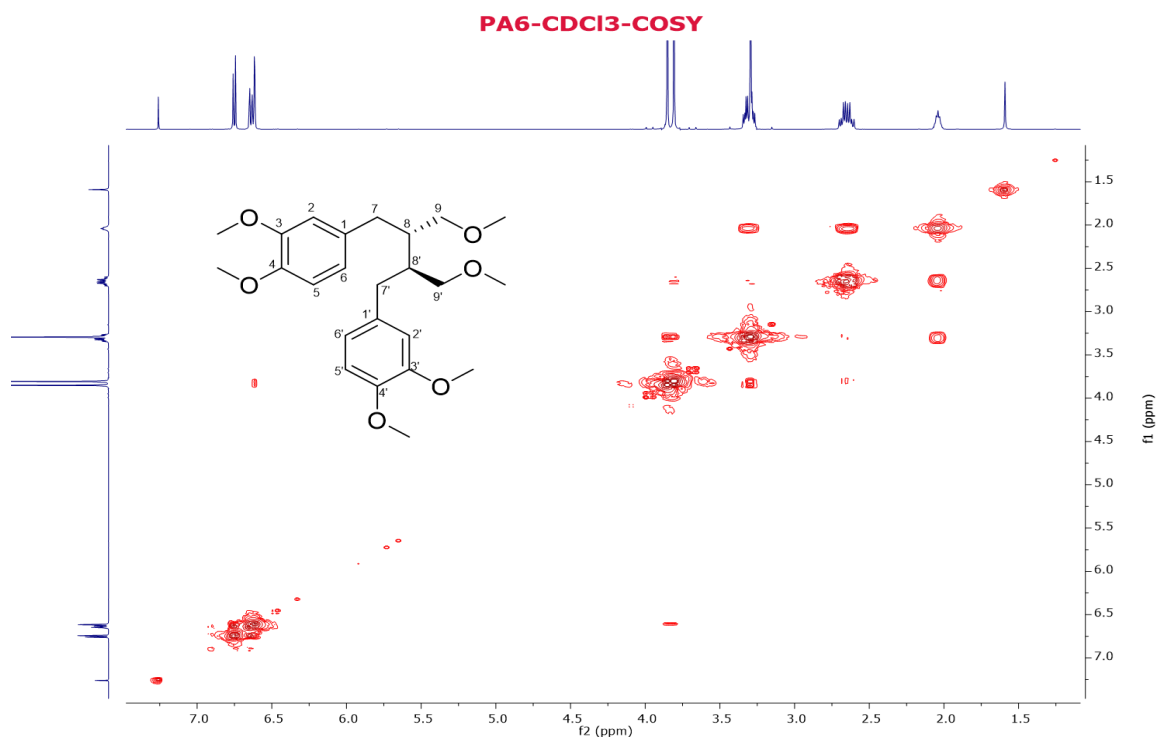
Hình PL6.13. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₆



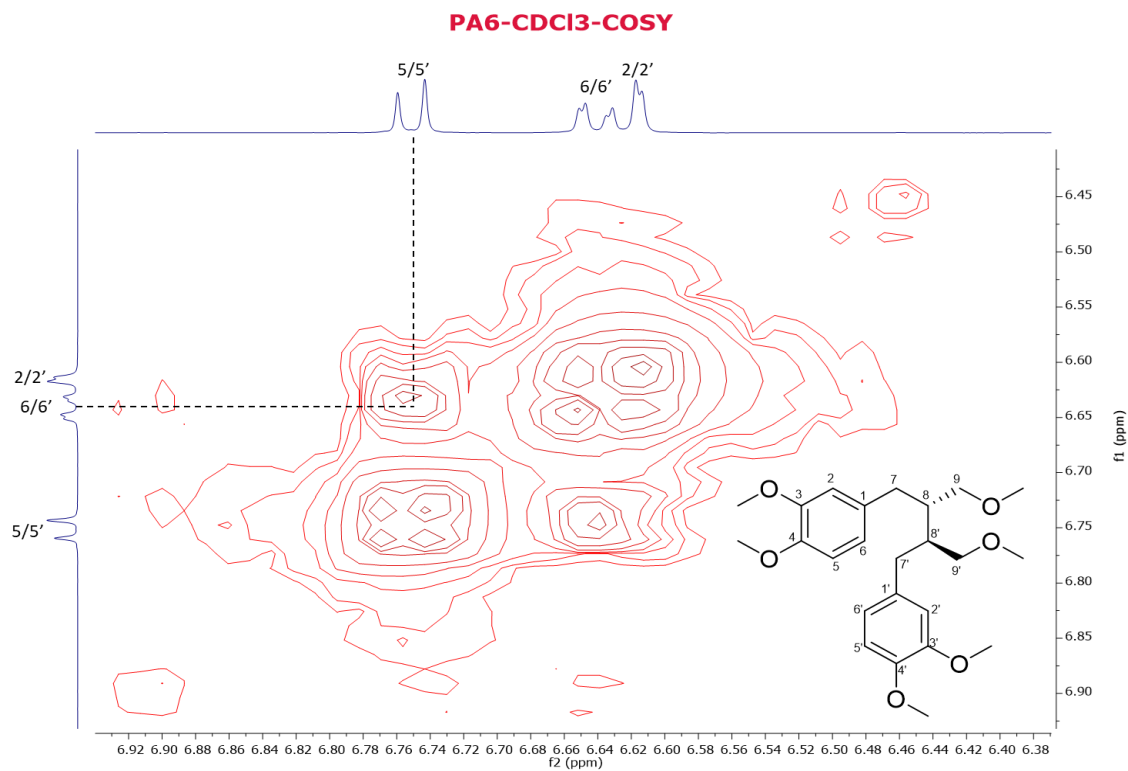
Hình PL6.14. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₆
trích vùng 6,5-6,9 ppm x 40-150 ppm



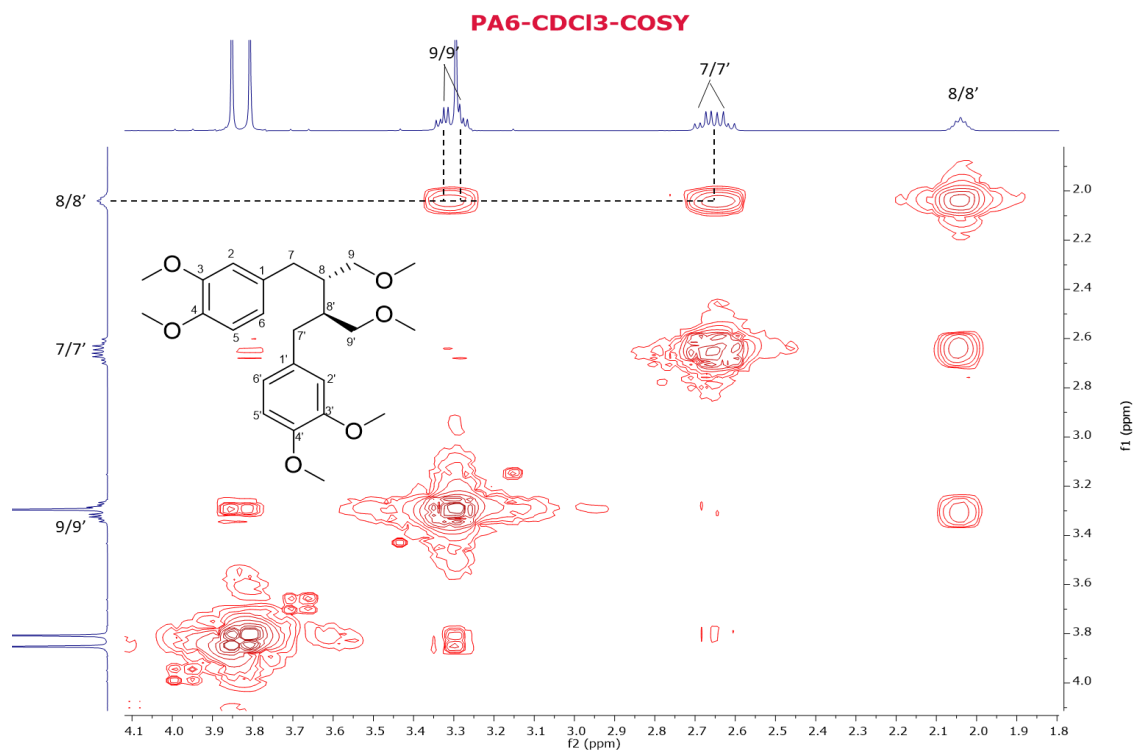
Hình PL6.15. Phổ HMBC (CDCl₃, 125/500 MHz) của chất PA₆
trích vùng 2,0-4,0 ppm x 40-150 ppm



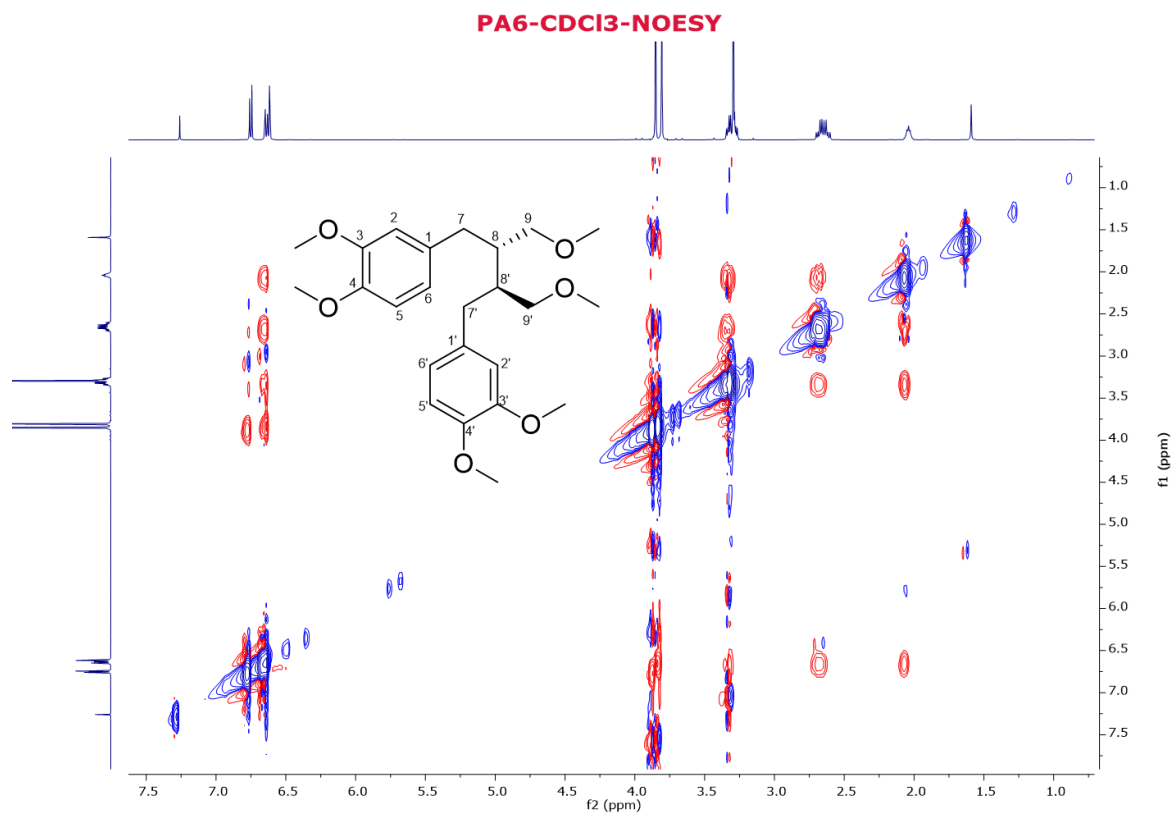
Hình PL6.16. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₆



Hình PL6.17. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₆ trích vùng 6,4-6,9 ppm



Hình PL6.18. Phổ COSY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₆ trích vùng 1,8-4,1 ppm



Hình PL6.19. Phổ NOESY (CDCl₃, 500 MHz) của chất PA₆

PHỤ LỤC 7. QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÝ HYPOPHYLLANTHIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

1. QUY TRÌNH THỰC HIỆN

Dung dịch gốc: Cân chính xác khoảng 50,0 mg hypophyllanthin phân lập (HPL) vào bình định mức 50 mL, hòa tan bằng methanol, siêu âm 10 phút, để nguội, thêm methanol vừa đủ, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ 1000 µg/mL.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 10 mg hypophyllanthin phân lập (HPL) vào bình định mức 20 mL, hòa tan bằng methanol, siêu âm 10 phút, để nguội, thêm methanol vừa đủ, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ 500 µg/mL, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký:

- Cột sắc ký: Phenomenex Gemini C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm)
- Pha động: Acetonitril – acid phosphoric 0,1 % (60 : 40)
- Tốc độ dòng: 1 mL/phút
- Nhiệt độ cột: 35 °C
- Đầu dò: PDA, bước sóng phát hiện 230 nm
- Thể tích tiêm: 20 µL

Tiến hành sắc ký trên dung dịch thử, ghi nhận phần trăm diện tích pic trên sắc ký đồ.

2. THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH

Tính phù hợp hệ thống

Tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần của dung dịch thử. Xác định các thông số về thời gian lưu (R_t), diện tích pic (S), hệ số đối xứng (A_s) và số đĩa lý thuyết. Tính độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu.

Yêu cầu: Quy trình đạt tính phù hợp hệ thống khi đáp ứng các điều kiện sau:

- Các giá trị thời gian lưu (R_t), diện tích pic (S) có RSD ≤ 2 %.
- Hệ số đối xứng (A_s) của pic trong khoảng 0,8-1,5.

Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu trắng (dung môi methanol HPLC), dung dịch thử trong cùng điều kiện sắc ký. Ghi lại các sắc ký đồ. Xác định thời gian lưu của pic hypophyllanthin.

Yêu cầu: Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic tại pic chính trong dung dịch thử.

Tính tuyến tính

Từ dung dịch gốc hypophyllanthin có nồng độ 1000 µg/mL, tiến hành pha loãng 5 dung dịch hypophyllanthin có mức nồng độ lần lượt là 60 %, 80 %, 100 %, 120 %, 140 % theo bảng sau:

Bảng 2.1. Bảng pha chế các dung dịch hypophyllanthin kiểm tra tính tuyến tính

Mức nồng độ (%)	60	80	100	120	140
Dung dịch gốc 1000 µg/mL (mL)	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
Methanol vừa đủ (mL)	5				
Nồng độ dung dịch hypophyllanthin (µg/mL)	300	400	500	600	700

Tiến hành sắc ký các dung dịch trên, xác định diện tích của pic chính (mỗi mẫu đo 3 lần).

Xây dựng phương trình hồi quy $y = ax + b$, vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic với nồng độ và xác định hệ số tương quan r .

Sử dụng test F để kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy, test t để kiểm tra ý nghĩa của hệ số a và b .

Yêu cầu: $r \geq 0,999$.

Độ chính xác

Độ lặp lại: Tiến hành sắc ký 6 dung dịch thử. Xác định thông số phần trăm diện tích của pic hypophyllanthin. Tính độ lệch chuẩn tương đối RSD %.

Yêu cầu: $RSD \% \leq 2 \%$.

Độ chính xác trung gian: Tiến hành sắc ký 6 dung dịch thử ở 2 phòng thí nghiệm và bởi 2 kiểm nghiệm viên khác nhau. Xác định thông số phần trăm diện tích của pic hypophyllanthin. Tính độ lệch chuẩn tương đối RSD %.

Yêu cầu:

- RSD % ≤ 2 % ở cả 2 phòng thí nghiệm.
- Độ sai khác kết quả định lượng giữa 2 phòng thí nghiệm ≤ 2 %.

Độ đúng

Sử dụng phương pháp thêm mẫu thử vào pha động. Chuẩn bị 9 mẫu thêm hypophyllanthin ở 3 mức nồng độ 80 %, 100 % và 120 % so với mức nồng độ định lượng (500 $\mu\text{g/mL}$). Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu. Mỗi mẫu tiến hành sắc ký 1 lần.

Bảng 2.2. Bảng pha chế các mẫu kiểm tra độ đúng

Mức nồng độ (%)	80	100	120
Lượng cân hypophyllanthin phân lập (mg)	4,0	5,0	6,0
Pha động vừa đủ (mL)	10		
Nồng độ dung dịch ($\mu\text{g/mL}$)	160	500	240

Yêu cầu: Tỷ lệ phục hồi trung bình (%) của các mức nồng độ nằm trong khoảng 98 % - 102 % và RSD % $\leq 2,0$ %.

3. BÁO CÁO KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH

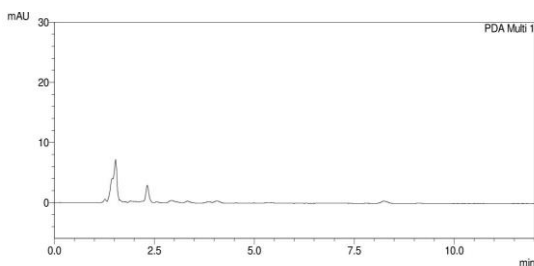
3.1. Tính phù hợp hệ thống

Bảng 3.1. Tính phù hợp hệ thống trên mẫu hypophyllanthin (n = 6)

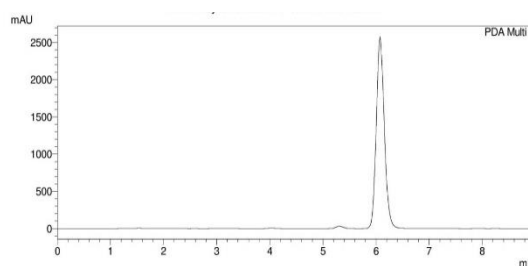
Số thứ tự	Thời gian lưu (t _R)	Diện tích pic (S)	Hệ số đối xứng (As)	Số đĩa lý thuyết (N)
1	6,055	27120357	1,472	27120357
2	6,045	27072133	1,448	27072133
3	6,043	27098163	1,446	27098163
4	6,043	27023285	1,452	27023285
5	6,053	27090712	1,474	27090712
6	6,045	27086099	1,448	27086099
TB	6,047	27081792	1,456	27081792
RSD (%)	0,09	0,12	0,88	0,12

Nhận xét: Điều kiện HPLC cho độ lặp lại tốt về thời gian lưu, diện tích pic, % diện tích pic, hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết, đều có RSD ≤ 2 %. Kết luận hệ thống tương thích với qui trình khảo sát độ tinh khiết hypophyllanthin.

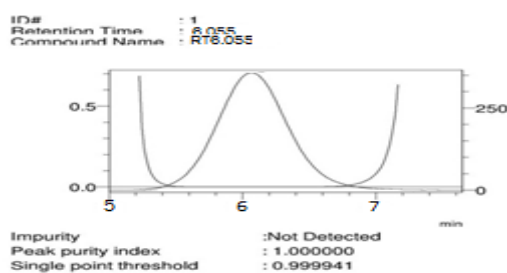
3.2. Tính đặc hiệu



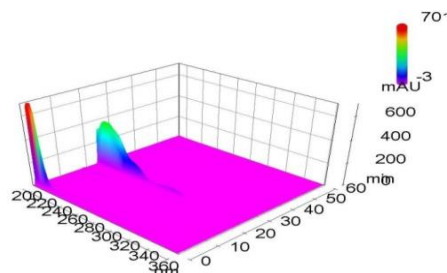
(a) Sắc ký đồ của dung môi



(b) Sắc ký đồ của dung dịch thử



(c) Độ tinh khiết pic ở 6,055 phút



(d) Sắc ký đồ HPLC 3D của mẫu HPL

Hình 3.1. Sắc ký đồ thẩm định tính đặc hiệu

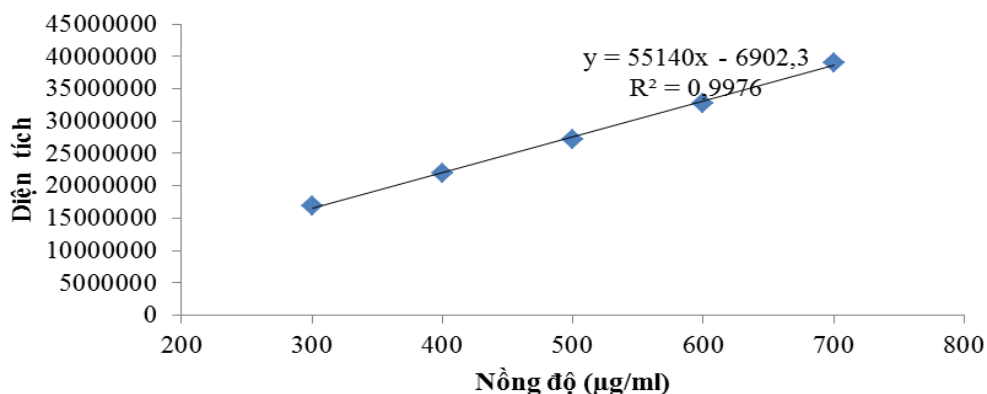
Nhận xét: Sắc ký đồ của hypophyllanthin phân lập cho pic ở thời gian lưu 6,055 phút, không trùng với pic nào trên mẫu trắng. Kết luận quy trình đạt tính đặc hiệu.

3.3. Tính tuyến tính

Bảng 3.2. Khảo tính tuyến tính trên các mẫu hypophyllanthin (n = 3)

Mẫu	Nồng độ (µg/mL)	Diện tích pic (S)	Diện tích pic trung bình (S _{tb})
1	300	16953615	16964789
		16969234	
		16971518	
2	400	21873913	21877473
		21826743	
		21931764	
3	500	27120357	27098654
		27103472	
		27072133	
4	600	32748556	32800842
		32793746	
		32860225	
5	700	39028261	39072948
		39073847	
		39116736	

PL-60



Hình 3.2. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ hypophyllanthin

Biện luận

Hệ số tương quan của x và y là $r = 0,9988$

$F = 1551,613 > F_{0,05} = 10,13$ phương trình hồi quy tương thích

Xét hệ số b: $t = 1,25 < t_{0,05} = 3,18$ hệ số b không có ý nghĩa

Xét hệ số a: $t = 39,39 > t_{0,05} = 3,18$ hệ số a có ý nghĩa

Vậy phương trình hồi quy: $\hat{y} = 55140x$ với $r = 0,9988$.

Nhận xét: Quy trình đạt tính tuyến tính với khoảng tuyến tính 300-700 µg/mL.

3.4. Độ chính xác

Bảng 3.3. Khảo sát độ lặp lại trên các mẫu thử (n = 6)

Mẫu	Độ tinh khiết sắc ký (%)
1	98,74
2	98,72
3	97,90
4	97,46
5	97,22
6	97,42
TB (%)	97,91
RSD (%)	0,69

Bảng 3.4. Khảo sát độ chính xác trung gian trên các mẫu thử (n = 12)

Stt	Độ tinh khiết sắc ký (%)	
	Phòng thí nghiệm 1	Phòng thí nghiệm 2
1	98,74	98,73
2	98,72	97,92
3	97,90	97,91
4	97,46	97,49
5	97,22	97,20
6	97,42	97,76
TB (%)	97,91	97,84
RSD (%)	0,69	0,53
TB (%)	97,87	
RSD (%)	0,59	

Nhận xét: Điều kiện HPLC cho độ chính xác tốt về % diện tích pic với RSD \leq 2 %. Kết luận quy trình khảo sát độ tinh khiết hypophyllanthin đạt độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

3.5. Độ đúng

Bảng 3.5. Khảo sát độ đúng trên các mẫu thử (n = 9)

Khoảng thêm chuẩn	KL chất đối chiếu thêm (mg)	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic	Nồng độ tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)	Độ phục hồi (%)
80 %	4,0262	402,62	22009760	398,27	98,92
	4,0009	400,09	21860513	398,85	99,69
	3,9920	399,20	21809701	397,00	99,45
100 %	5,0129	501,29	27149551	498,93	99,53
	5,0048	500,48	27121956	499,48	99,80
	4,9978	499,78	27029848	494,58	98,96
120 %	5,9876	598,76	32687227	597,50	99,79
	5,9923	599,23	32703058	598,09	99,81
	5,9904	599,04	32735261	593,35	99,05
TB (%)					99,44
RSD (%)					0,37

Nhận xét: Quy trình đạt độ đúng với tỉ lệ phục hồi trung bình 99,44 % và RSD % \leq 2,0 %.

PHỤ LỤC 8. QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÝ NIRANTHIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

3. QUY TRÌNH THỰC HIỆN

Dung dịch gốc: Cân chính xác khoảng 5,0 mg niranthin phân lập (NRT) vào bình định mức 25 mL, hòa tan bằng methanol, siêu âm 10 phút, để nguội, thêm methanol vừa đủ, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ 200 µg/mL.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 2,0 mg niranthin phân lập (NRT) cho vào bình định mức 20 mL, hòa tan bằng methanol, siêu âm 10 phút, để nguội, thêm methanol vừa đủ, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ 100 µg/mL, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký:

- Cột sắc ký: Phenomenex C6-Phenyl 11A (150 x 4,6 mm; 3 µm)
- Pha động: Acetonitril – nước (60 : 40)
- Tốc độ dòng: 1 mL/phút
- Nhiệt độ cột: 30 °C
- Đầu dò: PDA, bước sóng phát hiện 230 nm
- Thể tích tiêm: 10 µL

Tiến hành sắc ký trên dung dịch thử, ghi nhận phần trăm diện tích pic trên sắc ký đồ.

4. THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH

Tính phù hợp hệ thống

Tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần của dung dịch thử. Xác định các thông số về thời gian lưu (R_t), diện tích pic (S), hệ số đối xứng (A_s) và số đĩa lý thuyết. Tính độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu.

Yêu cầu: Quy trình đạt tính phù hợp hệ thống khi đáp ứng các điều kiện sau:

- Các giá trị thời gian lưu (R_t), diện tích pic (S) có RSD ≤ 2 %.
- Hệ số đối xứng (A_s) của pic trong khoảng 0,8-1,5.

Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu trắng (dung môi methanol HPLC), dung dịch thử trong cùng điều kiện sắc ký. Ghi lại các sắc ký đồ. Xác định thời gian lưu của pic niranthin.

Yêu cầu: Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic tại pic chính trong dung dịch thử.

Tính tuyến tính

Từ dung dịch gốc niranthin có nồng độ 200 µg/mL, tiến hành pha loãng 5 dung dịch niranthin có mức nồng độ lần lượt là 60 %, 80 %, 100 %, 120 %, 140 % theo bảng sau:

Bảng 2.1. Bảng pha chế các dung dịch niranthin kiểm tra tính tuyến tính

Mức nồng độ (%)	60	80	100	120	140
Dung dịch gốc 200 µg/mL (mL)	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
Methanol vừa đủ (mL)			5		
Nồng độ dung dịch niranthin (µg/mL)	60	80	100	120	140

Tiến hành sắc ký các dung dịch trên, xác định diện tích của pic chính (mỗi mẫu đo 3 lần).

Xây dựng phương trình hồi quy $y = ax + b$, vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic với nồng độ và xác định hệ số tương quan r .

Sử dụng test F để kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy, test t để kiểm tra ý nghĩa của hệ số a và b .

Yêu cầu: $r \geq 0,999$.

Độ chính xác

Độ lặp lại: Tiến hành sắc ký 6 dung dịch thử. Xác định thông số phần trăm diện tích của pic niranthin. Tính độ lệch chuẩn tương đối RSD %.

Yêu cầu: $RSD \% \leq 2 \%$.

Độ chính xác trung gian: Tiến hành sắc ký 6 dung dịch thử ở 2 phòng thí nghiệm và bởi 2 kiểm nghiệm viên khác nhau. Xác định thông số phần trăm diện tích của pic niranthin. Tính độ lệch chuẩn tương đối RSD %.

Yêu cầu:

- RSD % ≤ 2 % ở cả 2 phòng thí nghiệm.
- Độ sai khác kết quả định lượng giữa 2 phòng thí nghiệm ≤ 2 %.

Độ đúng

Sử dụng phương pháp thêm mẫu thử vào pha động. Chuẩn bị 9 mẫu thêm niranthin ở 3 mức nồng độ 80 %, 100 % và 120 % so với mức nồng độ định lượng (200 $\mu\text{g/mL}$). Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu. Mỗi mẫu tiến hành sắc ký 1 lần.

Bảng 2.2. Bảng pha chế các mẫu kiểm tra độ đúng.

Mức nồng độ (%)	80	100	120
Lượng cân niranthin phân lập (mg)	4,0	5,0	6,0
Pha động vừa đủ (mL)	50		
Nồng độ dung dịch ($\mu\text{g/mL}$)	80	100	120

Yêu cầu: Tỷ lệ phục hồi trung bình (%) của các mức nồng độ nằm trong khoảng 98 % - 102 % và RSD % $\leq 2,0$ %.

3. BÁO CÁO KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH

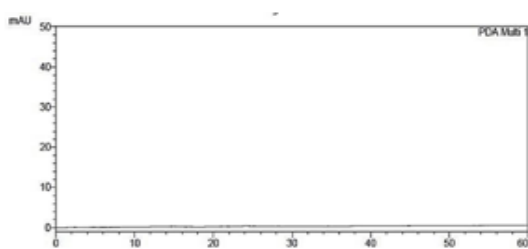
3.1. Tính phù hợp hệ thống

Bảng 3.1. Tính phù hợp hệ thống trên mẫu niranthin (n = 6)

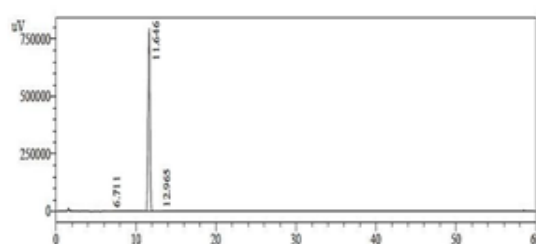
Số thứ tự	Thời gian lưu (t_R)	Diện tích pic (S)	Hệ số đối xứng (A_s)	Số đĩa lý thuyết (N)
1	11,553	12171303	1,0	62047
2	11,920	12186049	1,0	62809
3	11,791	12199388	1,0	61708
4	11,647	12180263	1,0	62219
5	11,553	12183741	1,0	62025
6	11,387	12185801	1,0	62193
TB	11,642	12184424	1,0	62167
RSD (%)	1,63	0,08	0,38	0,59

Nhận xét: Điều kiện HPLC cho độ lặp lại tốt về thời gian lưu, diện tích pic, % diện tích pic, hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết, đều có RSD ≤ 2 %. Kết luận hệ thống tương thích với qui trình khảo sát độ tinh khiết niranthin.

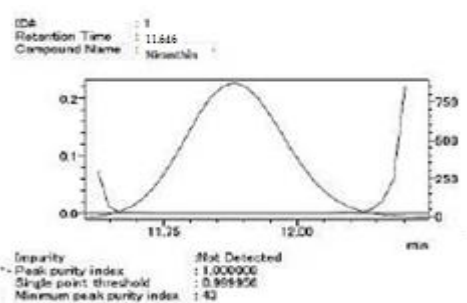
3.2. Tính đặc hiệu



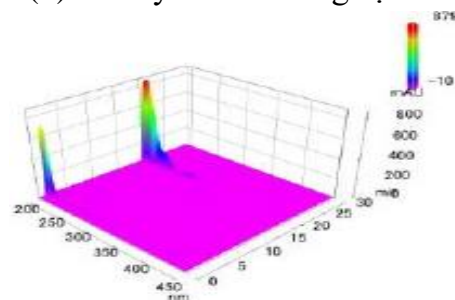
(b) Sắc ký đồ của dung môi



(b) Sắc ký đồ của dung dịch thử



(c) Độ tinh khiết pic ở 11,646 phút



(d) Sắc ký đồ HPLC 3D của mẫu NRT

Hình 3.1. Sắc ký đồ thẩm định tính đặc hiệu

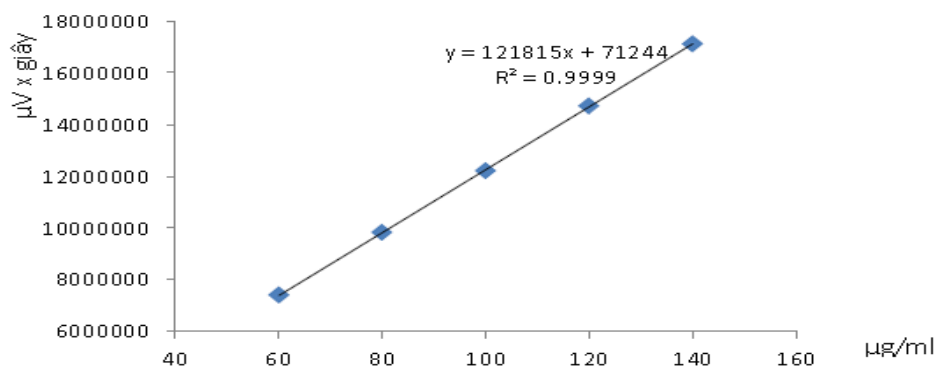
Nhận xét: Sắc ký đồ của niranthin phân lập cho pic ở thời gian lưu 11,646 phút, không trùng với pic nào trên mẫu trắng. Kết luận quy trình đạt tính đặc hiệu.

3.3. Tính tuyến tính

Bảng 3.2. Khảo tính tuyến tính trên các mẫu niranthin (n = 3)

Mẫu	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic (S)	Diện tích pic trung bình (S_{tb})
1	60	7392849	7389887
		7378190	
		7398623	
2	80	9828839	9829073
		9839288	
		9819093	
3	100	12205129	12204217
		12300836	
		12106687	
4	120	14804660	14709293
		14614994	
		14708226	
5	140	17256356	17131284
		17123053	
		17014444	

PL-66



Hình 3.2. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ niranthin

Biện luận

Hệ số tương quan của x và y là $r = 0,9999$

$F = 58295 > F_{0,05} = 10,13$ phương trình hồi quy tương thích

Xét hệ số b: $t = 1,36 < t_{0,05} = 3,18$ hệ số b không có ý nghĩa

Xét hệ số a: $t = 241,44 > t_{0,05} = 3,18$ hệ số a có ý nghĩa

Vậy phương trình hồi quy: $\hat{y} = 121815x$ với $r = 0,9999$

Nhận xét: Quy trình đạt tính tuyến tính với khoảng tuyến tính 60–140 µg/mL.

3.4. Độ chính xác

Bảng 3.3. Khảo sát độ lặp lại trên các mẫu thử (n = 6)

Mẫu	Độ tinh khiết sắc ký (%)
1	99,85
2	99,83
3	99,8
4	99,79
5	99,75
6	99,75
TB (%)	99,80
RSD (%)	0,04

Bảng 3.4. Khảo sát độ chính xác trung gian trên các mẫu thử (n = 12)

Stt	Độ tinh khiết sắc ký (%)	
	Phòng thí nghiệm 1	Phòng thí nghiệm 2
1	99,85	99,75
2	99,83	99,78
3	99,8	99,81
4	99,79	99,77
5	99,75	99,79
6	99,75	99,75
TB (%)	99,80	99,78
RSD (%)	0,04	0,02
TB (%)	99,79	
RSD (%)	0,03	

Nhận xét: Điều kiện HPLC cho độ chính xác tốt về % diện tích pic với RSD \leq 2 %. Kết luận quy trình khảo sát độ tinh khiết niranthin đạt độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

3.5. Độ đúng

Bảng 3.5. Khảo sát độ đúng trên các mẫu thử (n = 9)

Khoảng thêm chuẩn	KL chất đối chiếu thêm (mg)	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic	Nồng độ tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)	Độ phục hồi (%)
80 %	3,9599	79,20	9773080	3,97	100,26
	3,9593	79,19	9773847	3,97	100,27
	3,9628	79,26	9789461	3,98	100,43
100 %	4,9535	99,07	12101994	4,92	99,32
	4,9506	99,01	12183741	4,95	99,99
	4,9495	98,99	12185801	4,95	100,01
120 %	5,9363	118,73	14630395	5,94	100,06
	5,9395	118,79	14622620	5,94	100,01
	5,9419	118,84	14616686	5,94	99,97
TB (%)					100,04
RSD %					0,31

Nhận xét: Quy trình đạt độ đúng với tỉ lệ phục hồi trung bình 100,04 % và RSD % \leq 2,0 %.

PHỤ LỤC 9. QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT SẮC KÝ NIRTETRALIN BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

5. QUY TRÌNH THỰC HIỆN

Dung dịch gốc: Cân chính xác khoảng 10,0 mg nirtetralin phân lập (NTT) vào bình định mức 25 mL, hòa tan bằng methanol, siêu âm 10 phút, để nguội, thêm methanol vừa đủ, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ 400 µg/mL.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 2,0 mg nirtetralin phân lập (NTT) vào bình định mức 10 mL, hòa tan bằng methanol, siêu âm 10 phút, để nguội, thêm methanol vừa đủ, lắc đều, thu được dung dịch có nồng độ 200 µg/mL, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký:

- Cột sắc ký: Phenomenex Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm)
- Pha động: Methanol – acid phosphoric 0,1 % (60 : 40)
- Tốc độ dòng: 1 mL/phút
- Nhiệt độ cột: 25 °C
- Thể tích tiêm: 20 µL
- Đầu dò PDA, bước sóng phát hiện 230 nm

Tiến hành sắc ký trên dung dịch thử, ghi nhận phần trăm diện tích pic trên sắc ký đồ.

6. THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH

Tính phù hợp hệ thống

Tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần của dung dịch thử. Xác định các thông số về thời gian lưu (R_t), diện tích pic (S), hệ số đối xứng (A_s) và số đĩa lý thuyết. Tính độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu.

Yêu cầu: Quy trình đạt tính phù hợp hệ thống khi đáp ứng các điều kiện sau:

- Các giá trị thời gian lưu (R_t), diện tích pic (S) có RSD ≤ 2 %.
- Hệ số đối xứng (A_s) của pic trong khoảng 0,8-1,5.

Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu trắng (dung môi methanol HPLC), dung dịch thử trong cùng điều kiện sắc ký. Ghi lại các sắc ký đồ. Xác định thời gian lưu của pic nirtetralin.

Yêu cầu: Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic tại pic chính trong dung dịch thử.

Tính tuyến tính

Từ dung dịch gốc nirtetralin có nồng độ 400 µg/mL, tiến hành pha loãng 5 dung dịch nirtetralin có mức nồng độ lần lượt là 60 %, 80 %, 100 %, 120 %, 140 % theo bảng sau:

Bảng 2.1. Bảng pha chế các dung dịch nirtetralin kiểm tra tính tuyến tính

Mức nồng độ (%)	60	80	100	120	140
Dung dịch gốc 400 µg/mL (mL)	1,5	2,0	2,5	3,0	3,5
Methanol vừa đủ (mL)	5				
Nồng độ dung dịch nirtetralin (µg/mL)	120	160	200	240	280

Tiến hành sắc ký các dung dịch trên, xác định diện tích của pic chính (mỗi mẫu đo 3 lần).

Xây dựng phương trình hồi quy $\hat{y} = ax + b$, vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic với nồng độ và xác định hệ số tương quan r.

Sử dụng test F để kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy, test t để kiểm tra ý nghĩa của hệ số a và b.

Yêu cầu: $r \geq 0,999$.

Độ chính xác

Độ lặp lại: Tiến hành sắc ký 6 dung dịch thử. Xác định thông số phần trăm diện tích của pic nirtetralin. Tính độ lệch chuẩn tương đối RSD %.

Yêu cầu: $RSD \% \leq 2 \%$.

Độ chính xác trung gian: Tiến hành sắc ký 6 dung dịch thử ở 2 phòng thí nghiệm và bởi 2 kiểm nghiệm viên khác nhau. Xác định thông số phần trăm diện tích của pic nirtetralin. Tính độ lệch chuẩn tương đối RSD %.

Yêu cầu:

- RSD % ≤ 2 % ở cả 2 phòng thí nghiệm.
- Độ sai khác kết quả định lượng giữa 2 phòng thí nghiệm ≤ 2 %.

Độ đúng

Sử dụng phương pháp thêm mẫu thử vào pha động. Chuẩn bị 9 mẫu thêm nirtetralin ở 3 mức nồng độ 80 %, 100 % và 120 % so với mức nồng độ định lượng (200 $\mu\text{g/mL}$). Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu. Mỗi mẫu tiến hành sắc ký 1 lần.

Bảng 2.2. Bảng pha chế các mẫu kiểm tra độ đúng.

Mức nồng độ (%)	80	100	120
Lượng cân nirtetralin phân lập (mg)	1,6	2,0	2,4
Pha động vừa đủ (mL)	10		
Nồng độ dung dịch ($\mu\text{g/mL}$)	160	200	240

Yêu cầu: Tỷ lệ phục hồi trung bình (%) của các mức nồng độ nằm trong khoảng 98 % - 102 % và RSD % $\leq 2,0$ %.

3. BÁO CÁO KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH

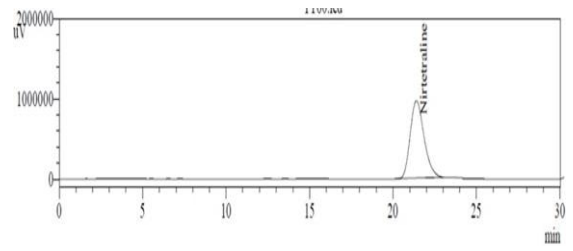
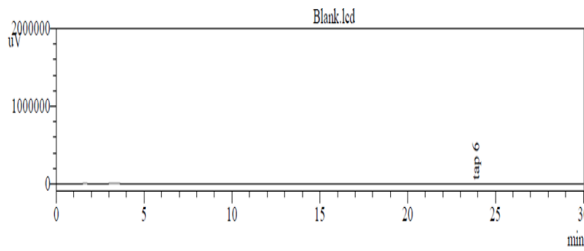
3.1. Tính phù hợp hệ thống

Bảng 3.1. Tính phù hợp hệ thống trên mẫu nirtetralin (n = 6)

Số thứ tự	Thời gian lưu (t_R)	Diện tích pic (S)	Hệ số đối xứng (A_s)	Số đĩa lý thuyết (N)
1	20,831	91685076	1,271	3051
2	20,882	91550226	1,268	3054
3	21,061	91616697	1,267	3048
4	21,124	91560156	1,264	3048
5	21,230	91655492	1,265	3044
6	21,307	91553957	1,263	3038
TB	21,073	91603601	1,266	3047
RSD (%)	0,89	0,06	0,23	0,18

Nhận xét: Điều kiện HPLC cho độ lặp lại tốt về thời gian lưu, diện tích pic, % diện tích pic, hệ số đối xứng và số đĩa lý thuyết, đều có RSD ≤ 2 %. Kết luận hệ thống tương thích với qui trình khảo sát độ tinh khiết nirtetralin.

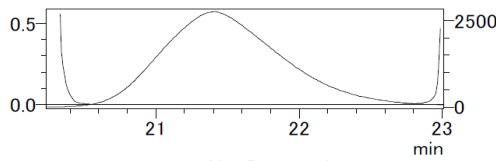
3.2. Tính đặc hiệu



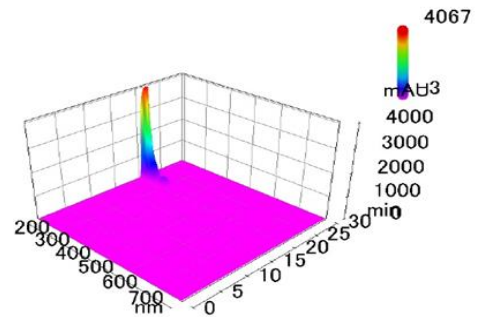
(c) Sắc ký đồ của dung môi

(b) Sắc ký đồ của dung dịch thử

ID# : 1
Retention Time : 21.398
Compound Name : Nirtetraline



Impurity : Not Detected
Peak purity index : 0.999999
Single point threshold : 0.999973
Minimum peak purity index : 25



(c) Độ tinh khiết pic ở 21,398 phút

(d) Sắc ký đồ HPLC 3D của mẫu NTT

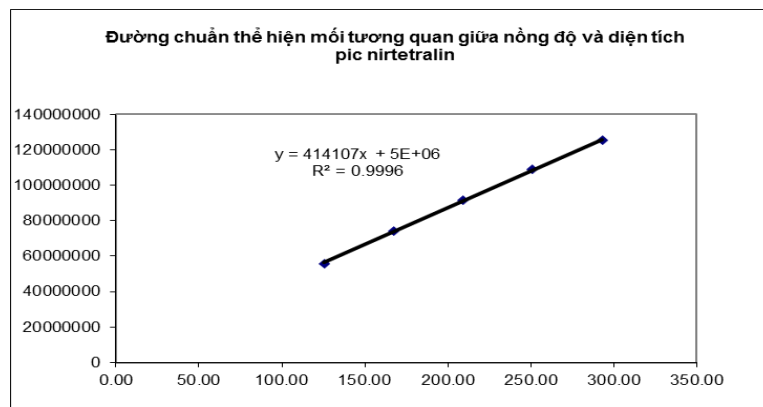
Hình 3.1. Sắc ký đồ thẩm định tính đặc hiệu

Nhận xét: Sắc ký đồ của nirtetralin phân lập cho pic ở thời gian lưu 21,398 phút, không trùng với pic nào trên mẫu trắng. Kết luận quy trình đạt tính đặc hiệu.

3.3. Tính tuyến tính

Bảng 3.2. Khảo tính tuyến tính trên các mẫu nirtetralin (n = 3)

Mẫu	Nồng độ (µg/mL)	Diện tích pic (S)	Diện tích pic trung bình (S _{tb})
1	125,53	55997554	55997396
		55969287	
		56025348	
2	167,37	74008056	73997244
		73997539	
		73986138	
3	209,22	91762659	91796559
		91745652	
		91881365	
4	251,06	108800515	108781026
		108526203	
		109016359	
5	292,90	125409128	125243211
		125728504	
		124592001	



Hình 3.2. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic và nồng độ nirtetralin

Biện luận

Hệ số tương quan của x và y là $r = 0,9996$

$F = 8165,73 > F_{0,05} = 10,13$ phương trình hồi quy tương thích

Xét hệ số b: $t = 4,54 < t_{0,05} = 3,18$ hệ số b không có ý nghĩa

Xét hệ số a: $t = 90,36 > t_{0,05} = 3,18$ hệ số a có ý nghĩa

Vậy phương trình hồi quy: $\hat{y} = 414107x$ với $r = 0,9996$

Nhận xét: Quy trình đạt tính tuyến tính với khoảng tuyến tính 125,53–292,90 $\mu\text{g/mL}$.

3.4. Độ chính xác

Bảng 3.3. Khảo sát độ lặp lại trên các mẫu thử (n = 6)

Mẫu	Độ tinh khiết sắc ký (%)
1	97,02
2	97,12
3	97,11
4	97,17
5	97,05
6	96,69
TB (%)	97,03
RSD (%)	0,18

Bảng 3.4. Khảo sát độ chính xác trung gian trên các mẫu thử (n = 12)

Stt	Độ tinh khiết sắc ký (%)	
	Phòng thí nghiệm 1	Phòng thí nghiệm 2
1	97,02	96,84
2	97,12	97,15
3	97,11	96,92
4	97,17	97,02
5	97,05	97,12
6	96,69	97,06
TB (%)	97,03	97,02
RSD (%)	0,18	0,12
TB (%)	97,02	
RSD (%)	0,15	

Nhận xét: Điều kiện HPLC cho độ chính xác tốt về % diện tích pic với RSD \leq 2 %. Kết luận quy trình khảo sát độ tinh khiết nirtetralin đạt độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

3.5. Độ đúng

Bảng 3.5. Khảo sát độ đúng trên các mẫu thử (n = 9)

Khoảng thêm chuẩn	KL chất đối chiếu thêm (mg)	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Diện tích pic	Nồng độ tìm thấy ($\mu\text{g/mL}$)	Độ phục hồi (%)
80 %	1,6717	167,17	73821218	168,40	100,74
	1,7032	170,32	73907620	168,59	98,98
	1,6969	169,69	73686115	168,09	99,06
100 %	2,0575	205,75	90298489	205,98	100,11
	2,0351	203,51	89970141	205,23	100,85
	2,0321	203,21	90162177	205,67	101,21
120 %	2,5818	258,18	113530967	258,98	100,31
	2,5826	258,26	113335707	258,53	100,10
	2,6123	261,23	113063569	257,91	98,73
TB (%)					100,01
RSD %					0,89

Nhận xét: Quy trình đạt độ đúng với tỉ lệ phục hồi trung bình 100,01 % và RSD % \leq 2,0 %.

PHỤ LỤC 10. PHIẾU PHÂN TÍCH HYPOPHYLLANTHIN VÀ NIRANTHIN

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TP. HCM
200 Cô Bắc, Q.1, TP. Hồ Chí Minh

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc


PHIẾU PHÂN TÍCH

(Dùng cho kiểm nghiệm viên trả lời nội bộ)

Mẫu phân tích : Hypophyllanthin
Đơn vị sản xuất : Khoa Dược - Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
Số lô : Không Hạn dùng : Không
Số lượng mẫu : 6 lọ
Khoa chuyên môn : Khoa Thiết lập chất chuẩn – Chất đối chiếu
Ngày giao nhận mẫu : 21/7/2015
Yêu cầu phân tích : Độ tinh khiết
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : Hướng dẫn “Đánh giá chất đối chiếu Hypophyllanthin”
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đựng trong lọ thủy tinh nâu, nắp đậy kín, có dán nhãn tạm.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất		Tinh thể hình kim nhỏ, màu trắng
Độ tinh khiết sắc ký		Lọ 1: 98,74 % Lọ 2: 98,72 % Lọ 3: 97,90 % Lọ 4: 97,46 % Lọ 5: 97,22 % Lọ 6: 97,42 %

Phụ trách Phòng kiểm nghiệm


Trần Thị Hương Giang

Ngày 28 tháng 07 năm 2015
Kiểm nghiệm viên



KS Chiền Thị Thu Tiên

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TP. HCM
200 Cô Bắc, Q.1, TP. Hồ Chí Minh

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU PHÂN TÍCH

(Dùng cho kiểm nghiệm viên trả lời nội bộ)

Mẫu phân tích : Hypophyllanthin
Đơn vị sản xuất : Khoa Dược - Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
Số lô : Không **Hạn dùng : Không**
Số lượng mẫu : 6 lọ
Khoa chuyên môn : Khoa Đông dược – Dược liệu
Ngày giao nhận mẫu : 21/7/2015
Yêu cầu phân tích : Độ tinh khiết
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : Hướng dẫn “Đánh giá chất đối chiếu Hypophyllanthin”
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đựng trong lọ thủy tinh nâu, nắp đậy kín, có dán nhãn tạm.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất		Tinh thể hình kim nhỏ, màu trắng
Độ tinh khiết sắc ký		Lọ 1: 98,73 % Lọ 2: 97,92 % Lọ 3: 97,91 % Lọ 4: 97,49 % Lọ 5: 97,20 % Lọ 6: 97,76 %

Phụ trách Phòng kiểm nghiệm

ThS. Lê Thị Kim Chi

Ngày 30 tháng 07 năm 2015
Kiểm nghiệm viên

Nguyễn Thị Thủy Tiên

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TP. HCM
200 Cô Bắc, Q.1, TP. Hồ Chí Minh

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU PHÂN TÍCH

(Dùng cho kiểm nghiệm viên trả lời nội bộ)

Mẫu phân tích : Hypophyllanthin
Đơn vị sản xuất : Khoa Dược - Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
Số lô : Không Hạn dùng : Không
Số lượng mẫu : 6 lọ
Khoa chuyên môn : Khoa Vật lý đo lường
Ngày giao nhận mẫu : 21/7/2015
Yêu cầu phân tích : Độ tinh khiết
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : Hướng dẫn "Đánh giá chất đối chiếu Hypophyllanthin"
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đựng trong lọ thủy tinh nâu, nắp đậy kín, có dán nhãn tạm.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất	-	Tinh thể hình kim nhỏ, màu trắng
Độ tinh khiết sắc ký		Lọ 1: 98,72 % Lọ 2: 97,88 % Lọ 3: 98,69 % Lọ 4: 97,51 % Lọ 5: 97,43 % Lọ 6: 97,78 %

Phụ trách Phòng kiểm nghiệm



TS. Lê Thị Thu Cúc

Ngày 31 tháng 07 năm 2015.
Kiểm nghiệm viên



Thái Hồng Hạnh

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TP. HCM
200 Cô Bắc, Q.1, TP. Hồ Chí Minh

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU PHÂN TÍCH

(Dùng cho kiểm nghiệm viên trả lời nội bộ)

Mẫu phân tích : Niranthin
Đơn vị sản xuất : Khoa Dược - Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
Số lô : Không **Hạn dùng** : Không
Số lượng mẫu : 6 lọ
Khoa chuyên môn : Khoa Thiết lập chất chuẩn – Chất đối chiếu
Ngày giao nhận mẫu : 21/7/2015
Yêu cầu phân tích : Độ tinh khiết
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : Hướng dẫn “Đánh giá chất đối chiếu Niranthin”
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đựng trong lọ thủy tinh nâu, nắp đậy kín, có dán nhãn tạm.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất		Tinh thể hình kim nhỏ, màu trắng
Độ tinh khiết sắc ký		Lọ 1: 99,85 % Lọ 2: 99,83 % Lọ 3: 99,80 % Lọ 4: 99,79 % Lọ 5: 99,75 % Lọ 6: 99,75 %

Phụ trách Phòng kiểm nghiệm


Trịnh Hoàng Dương

Ngày 28 tháng 07 năm 2015
Kiểm nghiệm viên


Ks. Nguyễn Thị Thu Liên

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TP. HCM
200 Cô Bắc, Q.1, TP. Hồ Chí Minh

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU PHÂN TÍCH

(Dùng cho kiểm nghiệm viên trả lời nội bộ)

Mẫu phân tích : Niranthin
Đơn vị sản xuất : Khoa Dược - Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
Số lô : Không Hạn dùng : Không
Số lượng mẫu : 6 lọ
Khoa chuyên môn : Khoa Vật lý đo lường
Ngày giao nhận mẫu : 21/7/2015
Yêu cầu phân tích : Độ tinh khiết
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : Hướng dẫn "Đánh giá chất đối chiếu Niranthin"
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đựng trong lọ thủy tinh nâu, nắp đậy kín, có dán nhãn tạm.

Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tinh chất		Tinh thể màu trắng
Độ tinh khiết sắc ký		Lọ 1: 99,74 % Lọ 2: 99,75 % Lọ 3: 99,76 % Lọ 4: 99,79 % Lọ 5: 99,80 % Lọ 6: 99,82 %

Phụ trách Phòng kiểm nghiệm



Trần Thị Thu Cúc

Ngày 31 tháng 07 năm 2015
Kiểm nghiệm viên



Thái Hồng Hạnh

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC TP. HCM
200 C6 BẮC, Q.1, TP. HỒ CHÍ MINH

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU PHÂN TÍCH

(Dùng cho kiểm nghiệm viên trả lời nội bộ)

Mẫu phân tích : Niranthin
Đơn vị sản xuất : Khoa Dược - Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
Số lô : Không Hạng dùng : Không
Số lượng mẫu : 6 lọ
Khoa chuyên môn : Khoa Đông dược - Dược liệu
Ngày giao nhận mẫu : 21/7/2015
Yêu cầu phân tích : Độ tinh khiết
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng : Hướng dẫn "Đánh giá chất đối chiếu Niranthin"
Tình trạng mẫu khi nhận : Mẫu đựng trong lọ thủy tinh nâu, nắp đậy kín, có dán nhãn tạm.

Chi tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất		Tinh thể màu trắng
Độ tinh khiết sắc ký		Lọ 1: 99,75 % Lọ 2: 99,78 % Lọ 3: 99,81 % Lọ 4: 99,77 % Lọ 5: 99,79 % Lọ 6: 99,75 %

Phụ trách Phòng kiểm nghiệm

ThS. *Lữ Thị Kim Chi*

Ngày 30 tháng 07 năm 2015
Kiểm nghiệm viên

Nguyễn Thị Thùy Dương

PHỤ LỤC 11. QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI PHYLLANTHIN, HYPOPHYLLANTHIN, NIRANTHIN VÀ NIRTETRALIN TRONG CAO KHÔ DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

7. QUY TRÌNH THỰC HIỆN

Chuẩn bị dung dịch

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,5 g chế phẩm đã xác định độ ẩm vào bình định mức 50 mL, thêm 5 mL nước, lắc kỹ để phân tán mẫu đều. Thêm 30 mL methanol, lắc siêu âm trong 30 phút. Để nguội, bổ sung *methanol (TT)* đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Mẫu chuẩn: Cân chính xác 15,0 mg phyllanthin chuẩn, 4,0 mg hypophyllanthin chuẩn, 5,0 mg niranthin chuẩn và 10,0 mg nirtetralin chuẩn vào lần lượt 4 bình định mức 10 mL, 20 mL, 10 mL và 25 mL. Thêm khoảng 10 mL methanol, siêu âm 10 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều (dung dịch 1 có nồng độ phyllanthin 1500 $\mu\text{g/mL}$, dung dịch 2 có nồng độ hypophyllanthin 200 $\mu\text{g/mL}$, dung dịch 3 có nồng độ niranthin 500 $\mu\text{g/mL}$ và dung dịch 4 có nồng độ nirtetralin 400 $\mu\text{g/mL}$).

Hỗn hợp chuẩn gốc: Hút chính xác 3 mL dung dịch 1, 8 mL dung dịch 2, 6 mL dung dịch 3 và 7 mL dung dịch 4 cho vào bình định mức 25 mL, lắc đều, thu được dung dịch chuẩn gốc hỗn hợp có nồng độ phyllanthin 180 $\mu\text{g/mL}$, hypophyllanthin 64 $\mu\text{g/mL}$, niranthin 120 $\mu\text{g/mL}$ và nirtetralin 112 $\mu\text{g/mL}$ Lọc qua màng lọc 0,45 μm .

Điều kiện sắc ký:

- Cột: Phenomenex Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm)
- Tốc độ dòng: 1 mL/phút
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μL
- Detector PDA, bước sóng phát hiện 230 nm
- Pha động: Methanol – acid phosphoric 0,1 % (56 : 44)
- Nhiệt độ cột : 25 °C

Tính kết quả:

Hàm lượng các chất phân tích trong cao tính theo công thức:

$$X (\mu\text{g}/\text{mg}) = S_t \times \frac{C_c}{S_c} \times C\% \times \frac{V_t}{m_t}$$

Trong đó:

S_t, S_c : Diện tích pic chất phân tích của mẫu thử và mẫu chuẩn

V_t : Thể tích dung dịch thử (mL)

m_t : Khối lượng mẫu thử (mg)

C_c : Nồng độ ($\mu\text{g}/\text{mL}$) của mẫu chuẩn

$C\%$: Độ tinh khiết của chất chuẩn (%)

8. THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH**Tính phù hợp hệ thống**

Tiến hành sắc ký lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn. Xác định các thông số về thời gian lưu (R_t), diện tích pic (S), hệ số đối xứng (A_s), độ phân giải (R_s) và số đĩa lý thuyết. Tính độ lệch chuẩn tương đối của diện tích pic và thời gian lưu.

Yêu cầu: Quy trình đạt tính phù hợp hệ thống khi đáp ứng các điều kiện sau:

- Các giá trị thời gian lưu (R_t), diện tích pic (S) có $RSD \leq 2\%$.
- Hệ số đối xứng (A_s) của pic trong khoảng 0,8-1,5.
- Độ phân giải $R_s \geq 1,5$.

Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký dung dịch chuẩn, dung dịch thử và dung dịch mẫu trắng (dung môi methanol HPLC) trong cùng điều kiện sắc ký. Ghi lại các sắc ký đồ.

Yêu cầu: Thời gian lưu của pic chính cần định lượng trong dung dịch thử phải tương ứng với thời gian lưu của các pic trong dung dịch chuẩn, đồng thời dung dịch mẫu trắng không có pic nào tại thời gian lưu trên.

Tính tuyến tính

Từ dung dịch hỗn hợp chuẩn gốc có nồng độ hypophyllanthin 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$,

phyllanthin 180 µg/mL, niranthin 120 µg/mL và nirtetralin 112 µg/mL tiến hành pha 5 dung dịch chuẩn bao gồm 50 %, 70 %, 100 %, 150 % và 200 % theo bảng sau:

Bảng 2.1. Bảng pha chế các dung dịch chuẩn kiểm tra tính tuyến tính

Dung dịch chuẩn (%)	Thể tích hút dung dịch hỗn hợp chuẩn (mL)	Thể tích pha loãng (mL)	Nồng độ dung dịch (µg/mL)			
			PLT	HPL	NRT	NTT
50	2,0	20,0	17,1	6,9	12,2	10,9
70	7,0	50,0	24,0	9,6	17,1	15,2
100	2,0	10,0	34,2	13,7	24,4	21,8
150	3,0	10,0	51,3	20,6	36,6	32,7
200	4,0	10,0	68,4	27,4	48,8	43,5

Tiến hành sắc ký các dung dịch trên, xác định diện tích của pic chính (mỗi mẫu đo 3 lần).

Xây dựng phương trình hồi quy $y = ax + b$, vẽ đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích pic với nồng độ và xác định hệ số tương quan r .

Sử dụng test F để kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy, test t để kiểm tra ý nghĩa của hệ số a và b .

Yêu cầu: $r \geq 0,999$.

Độ chính xác

Độ lặp lại: Tiến hành định lượng 6 mẫu thử. Xác định hàm lượng của các chất phân tích trong mẫu thử. Tính độ lệch chuẩn tương đối RSD %.

Yêu cầu: $RSD \% \leq 5 \%$.

Độ chính xác trung gian: Tiến hành định lượng 6 mẫu thử vào một ngày khác. Xác định hàm lượng của các chất phân tích trong mẫu thử. Tính độ lệch chuẩn tương đối RSD %.

Yêu cầu:

- $RSD \% \leq 5 \%$ ở cả 2 ngày.
- Độ sai khác kết quả định lượng giữa 2 ngày $\leq 5 \%$.

Độ đúng

Tiến hành xác định độ đúng bằng phương pháp mẫu thử thêm chuẩn. Thêm một lượng chính xác dung dịch chuẩn tương ứng với ở 3 mức nồng độ 50 %, 100 % và 200 % so với mức nồng độ định lượng. Tiến hành sắc ký, ghi nhận diện tích pic và suy ra nồng độ. Xác định tỉ lệ phục hồi ở từng nồng độ rồi tính tỉ lệ phục hồi trung bình lượng chất chuẩn thêm vào. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu. Mỗi mẫu tiến hành sắc ký 1 lần.

Yêu cầu: Tỷ lệ phục hồi trung bình (%) của các mức nồng độ nằm trong khoảng 90 % - 110 % và RSD % \leq 5,0 %.

3. BÁO CÁO KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH

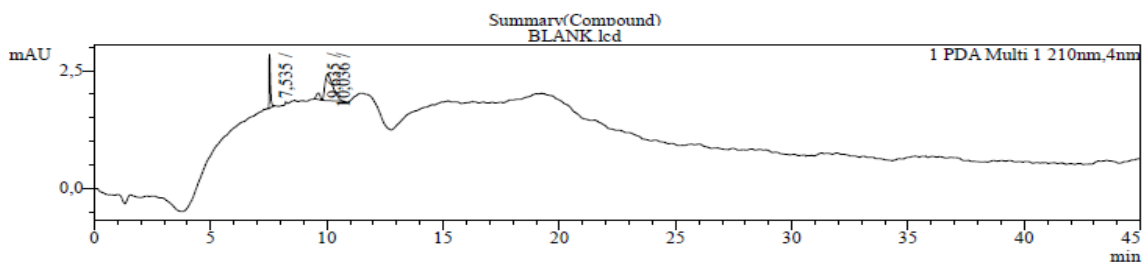
3.1. Tính phù hợp hệ thống

Bảng 3.1. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống (n = 6)

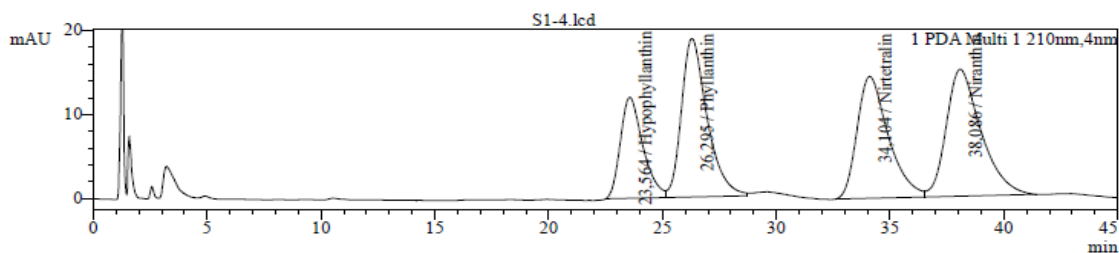
Chất		Thời gian lưu	Diện tích pic	Hệ số đối xứng	Số đĩa lý thuyết	Độ phân giải
PLT	TB	25,91	1435987	1,34	2838	1,82
	RSD (%)	1,94	1,51	1,49	1,63	1,22
HPL	TB	23,11	825269	1,37	2739	-
	RSD (%)	1,97	0,40	0,73	1,60	-
NRT	TB	37,65	1600993	1,35	3098	10,45
	RSD (%)	1,97	0,61	1,48	2,39	1,05
NTT	TB	33,78	1381235	1,49	3052	2,01
	RSD (%)	1,98	0,32	1,34	1,90	1,18

Nhận xét: Thời gian lưu và diện tích pic có độ lặp lại cao (RSD \leq 2 %), hệ số đối xứng nằm trong khoảng 0,8-1,5, số đĩa lý thuyết lớn hơn 2000 và độ phân giải $R_s \geq 1,5$. Như vậy, hệ thống sắc ký đạt yêu cầu tính phù hợp hệ thống để tiến hành phân tích định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan.

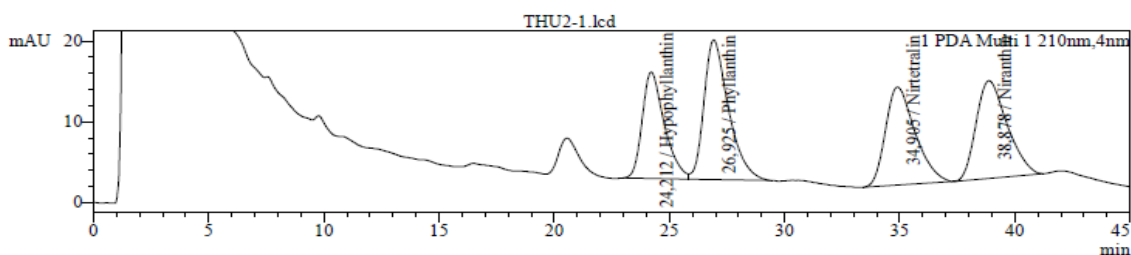
3.2. Tính đặc hiệu



Hình 3.1. Sắc ký đồ mẫu trắng



Hình 3.2. Sắc ký đồ mẫu chuẩn



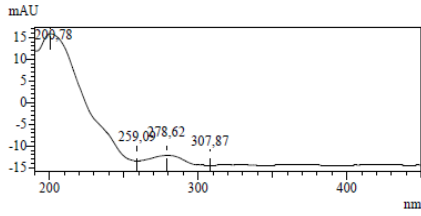
Hình 3.3. Sắc ký đồ mẫu thử

Bảng 3.2. Thông số thời gian lưu (phút) của 4 lignan của mẫu chuẩn và mẫu thử (n = 6)

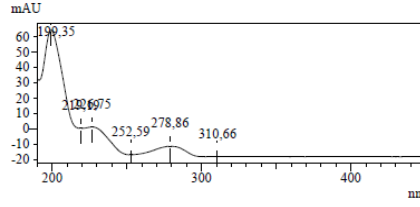
	Mẫu chuẩn	Mẫu thử	RSD (%)	Kết quả
Hypophyllanthin	23,56	24,21	1,92	Đạt
Phyllanthin	26,29	26,92	1,67	Đạt
Nirtetralin	34,10	34,95	1,74	Đạt
Niranthin	38,08	38,87	1,45	Đạt

Phổ UV

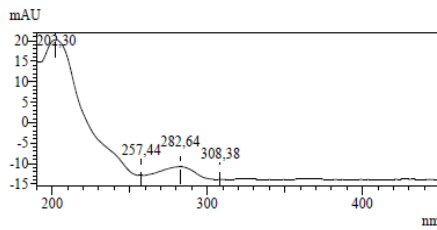
ID# : 1
Retention Time : 22,492 min
Compound Name : RT:22,492
Spectrum Operation : None



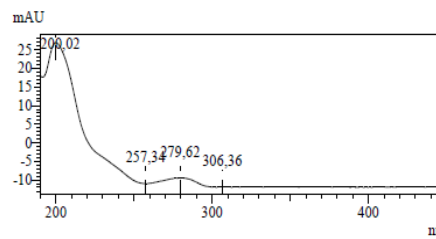
ID# : 2
Retention Time : 25,217 min
Compound Name : RT:25,217
Spectrum Operation : None



ID# : 3
Retention Time : 32,250 min
Compound Name : RT:32,250
Spectrum Operation : None

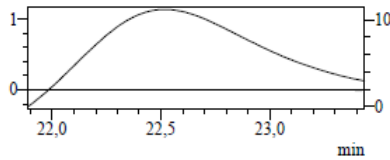


ID# : 4
Retention Time : 36,088 min
Compound Name : RT:36,088
Spectrum Operation : None



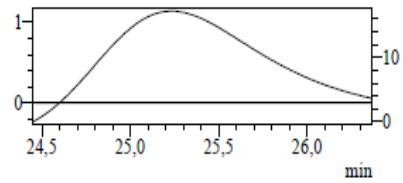
Độ tinh sạch pic

ID# : 1
Retention Time : 22,492 min
Compound Name : RT:22,492



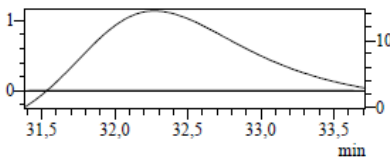
Impurity : Detected at 23,42 min
Peak purity index : 0,996057
Single point threshold : 1,000000
Minimum peak purity index : -3943

ID# : 2
Retention Time : 25,217 min
Compound Name : RT:25,217



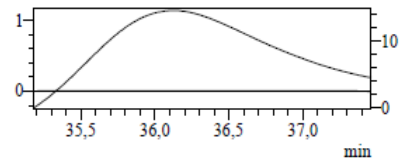
Impurity : Detected at 26,36 min
Peak purity index : 0,998209
Single point threshold : 1,000000
Minimum peak purity index : -1790

ID# : 3
Retention Time : 32,250 min
Compound Name : RT:32,250



Impurity : Detected at 33,71 min
Peak purity index : 0,994716
Single point threshold : 1,000000
Minimum peak purity index : -5283

ID# : 4
Retention Time : 36,088 min
Compound Name : RT:36,088



Impurity : Detected at 37,45 min
Peak purity index : 0,994344
Single point threshold : 1,000000
Minimum peak purity index : -5656

Hình 3.4. Thông số phổ UV và độ tinh sạch pic 4 ligan tại mẫu thử

Nhận xét:

- Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của chất chuẩn.

- Sắc ký đồ mẫu thử cho pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic trong sắc ký đồ mẫu chuẩn. Trên sắc ký đồ mẫu thử có xuất hiện thêm pic khác (pic tạp), pic này phải tách hoàn toàn với pic chính.

- Pic của hoạt chất cần phân tích trong sắc ký đồ mẫu chuẩn và mẫu thử đều tinh khiết, phổ UV-Vis của pic tương ứng trong sắc ký đồ mẫu chuẩn xấp xỉ 1,00.

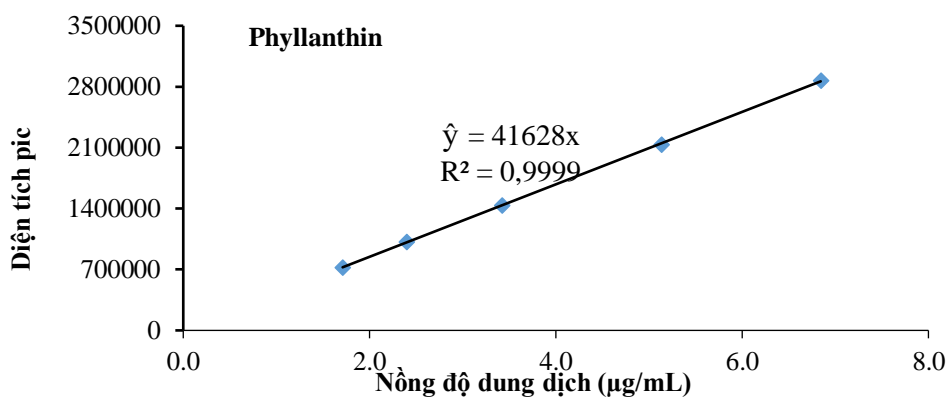
Như vậy quy trình đáp ứng yêu cầu có tính đặc hiệu.

3.3. Tính tuyến tính

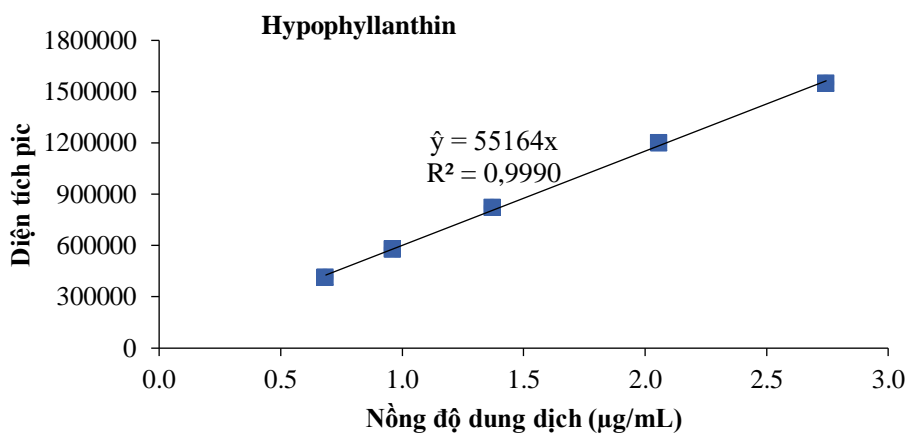
Kết quả xác định độ tuyến tính theo bảng sau:

Bảng 3.3. Kết quả xác định tính tuyến tính của 4 hợp chất lignan (n =3)

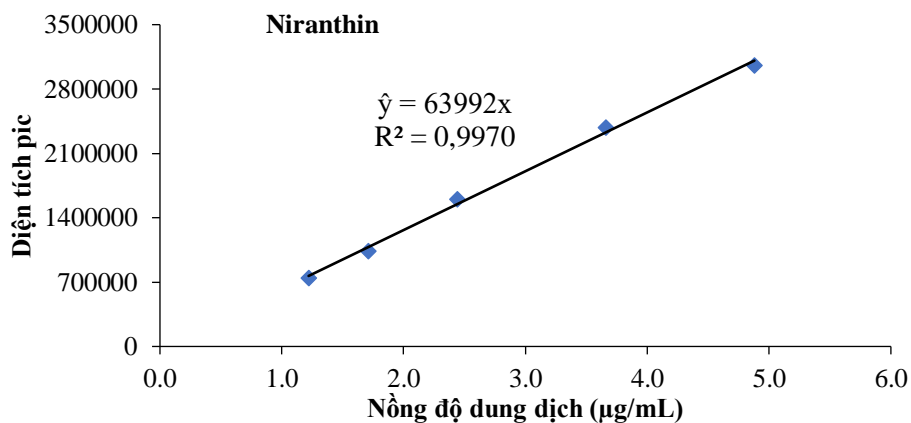
Dung dịch chuẩn (%)	Phyllanthin		Hypophyllanthin	
	Nồng độ (µg/mL)	Diện tích pic	Nồng độ (µg/mL)	Diện tích pic
50	17,1	726053	6,9	413391
70	24,0	1017316	9,6	578683
100	34,2	1434561	13,7	821817
150	51,3	2133456	20,6	1198839
200	68,4	2872326	27,4	1549125
Dung dịch chuẩn (%)	Niranthin		Nirtetralin	
	Nồng độ (µg/mL)	Diện tích pic	Nồng độ (µg/mL)	Diện tích pic
50	12,2	742979	10,9	649842
70	17,1	1041384	15,2	908118
100	24,4	1604678	21,8	1376610
150	36,6	2382442	32,7	2033110
200	48,8	3058204	43,5	2605057



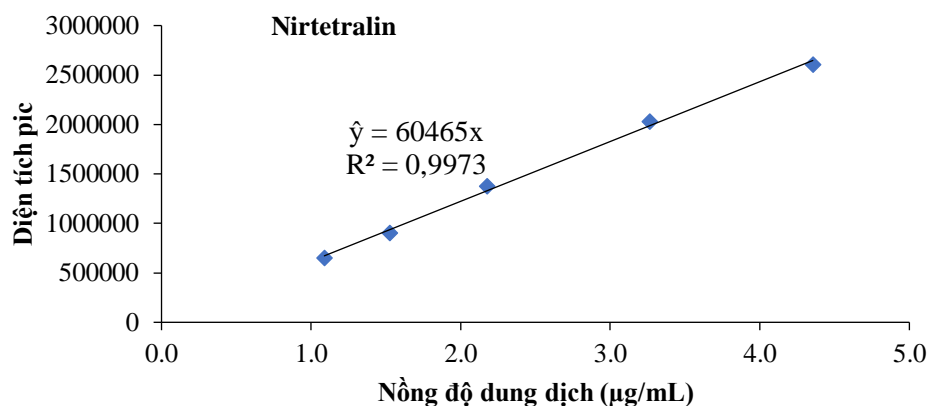
Hình 3.5. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của Phyllanthin



Hình 3.6. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của Hypophyllanthin



Hình 3.7. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của Niranthin



Hình 3.8. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của Nirtetralin

Nhận xét:

- Quy trình phân tích phyllanthin đạt tính tuyến tính trên khoảng nồng độ từ 17,1 µg/mL đến 68,4 µg/mL với phương trình hồi quy: $\hat{y} = 41628x$ với $r = 0,9999$.

- Quy trình phân tích hypophyllanthin đạt tính tuyến tính trên khoảng nồng độ từ 6,9 µg/mL đến 27,4 µg/mL với phương trình hồi quy: $\hat{y} = 55164x$ với $r = 0,9995$.

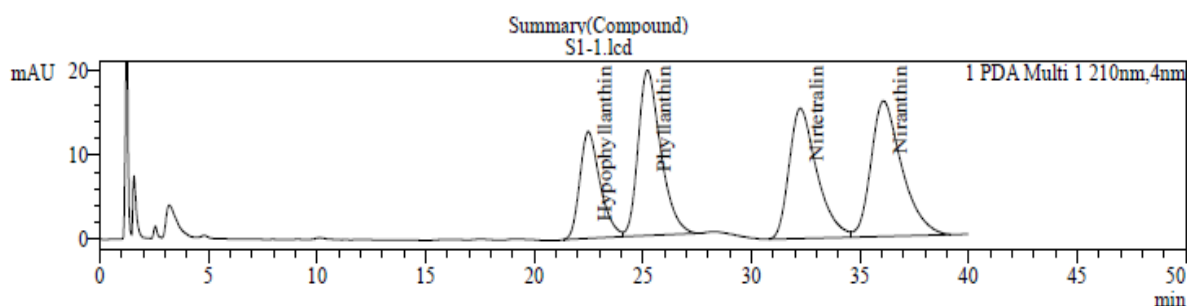
- Quy trình phân tích niranthin đạt tính tuyến tính trên khoảng nồng độ từ 12,2 µg/mL đến 44,8 µg/mL với phương trình hồi quy: $\hat{y} = 63992x$ với $r = 0,9985$.

- Quy trình phân tích nirtetralin đạt tính tuyến tính trên khoảng nồng độ từ 10,9 µg/mL đến 43,5 µg/mL với phương trình hồi quy: $\hat{y} = 60465x$ với $r = 0,9986$.

Kết luận: Quy trình phân tích đạt tính tuyến tính.

3.4. Độ chính xác

Độ lặp lại



Hình 3.9. Sắc ký đồ đại diện mẫu thử

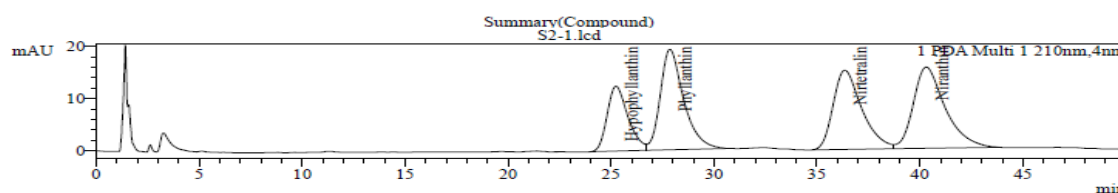
Bảng 3.4. Kết quả xác định độ lặp lại của mẫu thử (n = 6)

STT	KL mẫu thử (mg)	Nồng độ (mg/mL)	Diện tích PLT	Hàm lượng PLT (%)	Diện tích HPL	Hàm lượng HPL (%)
1	1108,0	35,596	1493883	0,7044	1008662	0,3320
2	1123,4	35,863	1505118	0,7000	1012578	0,3287
3	1113,4	36,445	1529518	0,7177	1015923	0,3327
4	1103,4	35,998	1510758	0,7154	1021672	0,3376
5	1103,4	36,296	1523256	0,7213	1020677	0,3373
6	1103,4	36,389	1527180	0,7231	1026250	0,3392
TB				0,7137		0,3346
RSD (%)				1,31		1,21
STT	KL mẫu thử (mg)	Nồng độ (mg/mL)	Diện tích NRT	Hàm lượng NRT (%)	Diện tích NTT	Hàm lượng NTT (%)
1	1108,0	20,459	1342574	0,4049	1260921	0,3933
2	1123,4	20,354	1335685	0,3973	1263545	0,3887
3	1113,4	19,893	1305382	0,3918	1278268	0,3968
4	1103,4	19,403	1273268	0,3856	1268459	0,3973
5	1103,4	18,636	1222906	0,3703	1278027	0,4003
6	1103,4	19,694	1292337	0,3914	1296814	0,4062
TB				0,3902		0,3971
RSD (%)				3,00		1,50

Nhận xét: Giá trị RSD (%) của kết quả định lượng hàm lượng hoạt chất có trong các mẫu thử đều $\leq 5,0$ %. Vậy quy trình định lượng đồng thời 4 lignan đạt yêu cầu về độ lặp lại.

Độ chính xác trung gian

Tiến hành pha các mẫu chuẩn và mẫu thử theo chỉ tiêu độ lặp lại vào một ngày khác.

**Hình 3.10.** Sắc ký đồ mẫu thử ngày 2

Bảng 3.5. Kết quả xác định độ chính xác trung gian (n = 12)

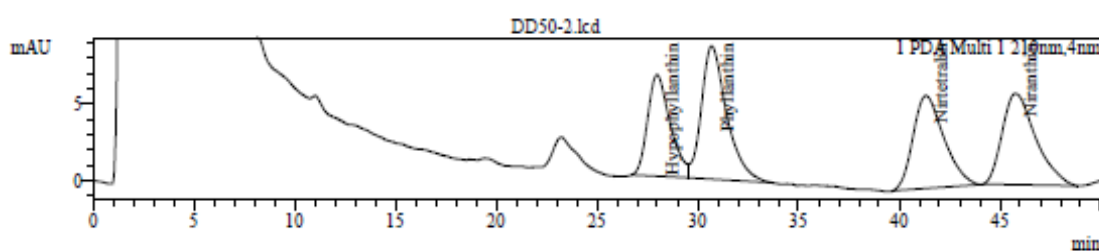
STT	Hàm lượng phyllanthin (%)		Hàm lượng hypophyllanthin (%)		Hàm lượng niranthin (%)		Hàm lượng nirtetralin (%)	
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 1	Ngày 2
1	0,7044	0,6774	0,3320	0,3251	0,4049	0,3836	0,3933	0,3806
2	0,7000	0,6903	0,3287	0,3343	0,3973	0,3925	0,3887	0,3930
3	0,7177	0,6582	0,3327	0,3116	0,3918	0,3814	0,3968	0,3913
4	0,7154	0,6833	0,3376	0,3282	0,3856	0,3842	0,3973	0,3795
5	0,7213	0,6737	0,3373	0,3258	0,3703	0,3799	0,4003	0,3786
6	0,7231	0,6858	0,3392	0,3262	0,3914	0,3836	0,4062	0,3836
TB	0,6959		0,3299		0,3872		0,3908	
RSD (%)	3,03		2,28		2,32		2,25	

Nhận xét:

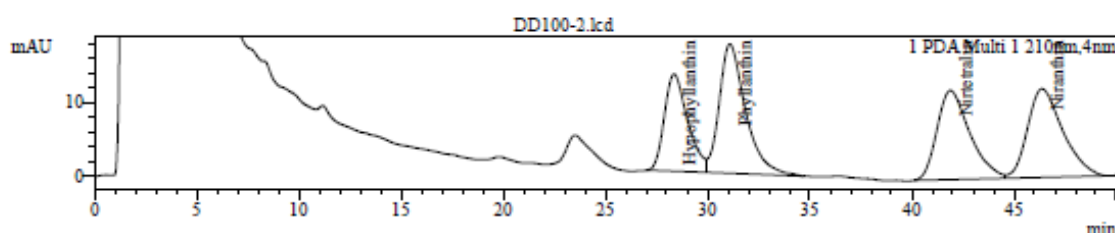
- Giá trị RSD (%) kết quả định lượng của mỗi ngày phân tích và của cả hai ngày phân tích $\leq 5,0$ %.
- Độ sai khác kết quả định lượng giữa 2 ngày phân tích $\leq 5,0$ %.

Vậy quy trình định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan đạt yêu cầu về độ chính xác trung gian.

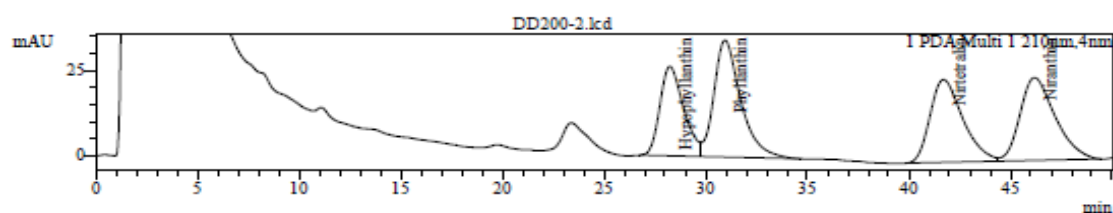
3.5. Độ đúng



Hình 3.11. Sắc ký đồ mẫu thử thêm chuẩn 50 %



Hình 3.12. Sắc ký đồ mẫu thử thêm chuẩn 100 %



Hình 3.13. Sắc ký đồ mẫu thử thêm chuẩn 200 %

Bảng 3.6. Kết quả xác định độ đúng phương pháp

Phyllanthin (Độ pha loãng 20 mL)

Chuẩn	KL mẫu thử (mg)	Lượng PLT thêm vào (µg)	Diện tích pic PLT	Lượng tìm lại (µg)	Độ phục hồi (%)
50 %	0,305	171,10	753372	355,7101	97,54
	0,310	171,10	761134	359,4393	97,71
	0,308	171,10	775185	366,1901	99,89
100 %	0,321	513,00	1417333	674,7074	94,14
	0,322	513,00	1428367	680,0086	94,79
	0,320	513,00	1453961	692,3052	96,68
200 %	0,301	1368,80	3099370	1482,8351	95,06
	0,302	1368,80	3054555	1461,3039	93,64
	0,303	1368,80	3106896	1486,4509	95,22
TB (%)					96,07
RSD (%)					2,10

Hypophyllanthin (Độ pha loãng 20 mL)

Chuẩn	KL mẫu thử (mg)	Lượng HPL thêm vào (μg)	Diện tích pic HPL	Lượng tìm lại (μg)	Độ phục hồi (%)
50 %	0,305	68,60	513222	168,2032	104,88
	0,310	68,60	515425	169,0019	104,40
	0,308	68,60	510516	167,2221	103,69
100 %	0,321	205,80	936374	321,6192	106,36
	0,322	205,80	922501	316,5894	104,59
	0,320	205,80	932224	320,1146	105,97
200 %	0,301	548,80	1948313	688,5030	107,68
	0,302	548,80	1944602	687,1576	107,42
	0,303	548,80	1941861	686,1638	107,22
TB (%)					105,80
RSD (%)					1,57

Niranthin (Độ pha loãng 20 mL)

Chuẩn	KL mẫu thử (mg)	Lượng NRT thêm vào (μg)	Diện tích pic NRT	Lượng tìm lại (μg)	Độ phục hồi (%)
50 %	0,305	122,00	690770	220,2282	95,87
	0,310	122,00	685562	218,6005	94,44
	0,308	122,00	686107	218,7708	94,80
100 %	0,321	366,00	1441834	454,9650	94,91
	0,322	366,00	1432850	452,1571	94,25
	0,320	366,00	1424379	449,5096	93,84
200 %	0,301	976,00	3159601	991,8343	91,64
	0,302	976,00	3135256	984,2255	90,91
	0,303	976,00	3164165	993,2607	91,71
TB (%)					93,55
RSD (%)					2,14

Nirtetralin (Độ pha loãng 20 mL)

Chuẩn	KL mẫu thử (mg)	Lượng NTT thêm vào (µg)	Diện tích pic NRT	Lượng tìm lại (µg)	Độ phục hồi (%)
50 %	0,305	108,90	625736	202,3938	93,01
	0,310	108,90	645264	208,8531	95,20
	0,308	108,90	635542	205,6373	94,04
100 %	0,321	326,70	1333306	436,4366	98,94
	0,322	326,70	1337622	437,8642	99,18
	0,320	326,70	1334670	436,8878	99,12
200 %	0,301	871,20	2759660	908,2315	104,25
	0,302	871,20	2720435	895,2571	102,76
	0,303	871,20	2769480	911,4797	104,62
TB (%)					99,01
RSD (%)					4,90

Nhận xét: Độ đúng của phương pháp nằm trong khoảng 95,0 % đến 105,0 % và giá trị RSD \leq 5,0 %. Vậy quy trình định đồng thời 4 hợp chất lignan đạt yêu cầu về độ đúng.

Kết luận: Kết quả thẩm định cho thấy quy trình định lượng đồng thời 4 lignan trong cao dược liệu Diệp hạ châu bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA đạt tất cả các yêu cầu về độ đặc hiệu, tính tuyến tính - khoảng xác định, độ chính xác và độ đúng theo qui định của ICH 2005.

PHỤ LỤC 12. DỰ THẢO TIÊU CHUẨN CƠ SỞ
CAO KHÔ DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG

BỘ Y TẾ	Dự thảo	Số TC:
ĐẠI HỌC Y DƯỢC TP. HỒ CHÍ MINH	TIÊU CHUẨN CƠ SỞ CAO KHÔ DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG <i>(Extractum Herba Phyllanthi amari siccum)</i>	Hiệu lực từ:

I. YÊU CẦU CHẤT LƯỢNG

Chỉ tiêu	Mức chất lượng
Tính chất	Bột màu nâu đồng nhất, mùi dược liệu, vị đắng, dễ hút ẩm
Định tính <i>Sắc ký lớp mỏng</i> <i>HPLC</i>	Diệp hạ châu đắng <i>(Phyllanthus amarus)</i>
Mất khối lượng do làm khô	Không quá 5 %
Tro toàn phần	Không quá 10 %
Kim loại nặng	Không quá 20 ppm
Định lượng <i>Phyllanthin</i> <i>Hypophyllanthin</i>	Hàm lượng phyllanthin (C ₂₄ H ₃₄ O ₆) không ít hơn 0,8 % tính trên chế phẩm khô Hàm lượng hypophyllanthin (C ₂₄ H ₃₀ O ₇) không ít hơn 0,3 % tính trên chế phẩm khô
Giới hạn nhiễm khuẩn Tổng số vi khuẩn hiếu khí Tổng số nấm men và nấm mốc Vi khuẩn Gram âm <i>Salmonella spp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Không quá 10 ⁴ cfu/g Không quá 10 ² cfu/g Không quá 10 ² cfu/g Không được có/10 g Không được có/g Không được có/g

II. PHƯƠNG PHÁP THỬ

1. Mô tả: Thử bằng cảm quan, chế phẩm phải đạt yêu cầu đã nêu.

2. Định tính

A. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4)

Bản mỏng: Silica gel 60F₂₅₄.

Dung môi khai triển: n-hexan (TT) – ethyl acetat (TT) (2 : 1)

Dung dịch đối chiếu (1): Hòa tan phyllanthin chuẩn trong *methanol* (TT) để được dung dịch có nồng độ khoảng 1 mg/mL.

Dung dịch đối chiếu (2): Hòa tan cao đối chiếu Diệp hạ châu đắng (*Powerd Phyllanthus amarus extract*) trong *methanol* (TT) để được dung dịch có nồng độ khoảng 10 mg/mL. Siêu âm khoảng 10 phút, ly tâm và lấy lớp trên.

Dung dịch thử: Lấy khoảng 0,5 g chế phẩm, siêu âm với 5 ml *methanol* (TT) trong 10 phút, ly tâm, lấy lớp trên.

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên cùng bản mỏng 10 μ l mỗi dung dịch trên. Sau khi triển khai, lấy bản mỏng ra, để khô ngoài không khí rồi phun *dung dịch acid sulfuric 10 %* (TT). Sấy bản mỏng ở 120 °C đến khi hiện rõ vết. Quan sát bản mỏng dưới ánh sáng thường hoặc ánh sáng tử ngoại tại bước sóng 366 nm.

Kết quả: Trên sắc ký đồ thu được dung dịch thử phải có vết màu xanh lam ở một phần ba dưới của bản mỏng cùng màu sắc và giá trị R_f với vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1); vết màu tím do hypophyllanthin ở giá trị R_f cao hơn so với vết của phyllanthin; vết màu xanh lam ở giá trị R_f cao hơn vết của hypophyllanthin; và thêm vết màu tím ở một phần ba trên của bản mỏng. Các vết được phát hiện trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có cùng màu sắc và giá trị R_f với các vết trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (2). Các vết nhỏ khác có thể xuất hiện trên sắc ký đồ của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (2).

B. Trong phần Định lượng, pic chính trên sắc ký đồ thu được của dung dịch thử phải có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic phyllanthin trong sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (1). Nhận biết các pic lignan khác trên sắc ký đồ của dung dịch thử bằng cách so sánh với sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (2) và sắc ký đồ đối chiếu với lô USP Powder *Phyllanthus amarus Extract* RS đang được sử dụng. Sắc ký đồ của dung dịch thử phải có một pic bổ sung có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của hypophyllanthin.

3. Mất khối lượng do làm khô

Tiến hành theo DĐVN V, phụ lục 9.6. Cân chính xác 1,0 g chế phẩm. Sấy ở 85 °C đến khối lượng không đổi.

4. Tro toàn phần

Tiến hành theo DĐVN V, phụ lục 9.8, phương pháp 2.

5. Kim loại nặng

Tiến hành phép thử giới hạn kim loại nặng theo DĐVN V, phụ lục 9.4.8. Lấy 1 g chế phẩm và dùng 2 ml *dung dịch chì mẫu 10 phần triệu Pb (TT)* để chuẩn bị mẫu đối chiếu.

6. Định lượng

Tiến hành bằng phương pháp sắc ký lỏng (phụ lục 5.3)

Điều kiện sắc ký:

Cột: Gemini NX C18 (150 mm x 4,6 mm; 5 µm)

Tốc độ dòng: 1 ml/ phút

Thể tích tiêm mẫu: 10 µl

Nhiệt độ cột: 25 °C

Đầu dò PDA: bước sóng 230 nm.

Pha động: *Methanol (TT) - acid phosphoric 0,1 % (TT) (56 : 44)*

Dung dịch thử:

Cân chính xác khoảng 0,5 g chế phẩm đã xác định độ ẩm vào bình định mức 50 ml, thêm 5 ml nước, lắc kỹ để phân tán mẫu đều. Thêm 30 ml *methanol (TT)*, lắc siêu âm trong 30 phút. Để nguội, bổ sung *methanol (TT)* đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan phyllanthin chuẩn và hypophyllanthin chuẩn trong *methanol (TT)* để được dung dịch có nồng độ chính xác lần lượt tương ứng khoảng 0,2 mg/ml và 0,08 mg/ml, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Cách tiến hành:

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn, độ lệch chuẩn tương đối của các diện tích pic thu được từ 6 lần tiêm lặp lại không lớn hơn 2 %.

Tiến hành sắc ký lần lượt các dung dịch chuẩn và dung dịch thử. Ghi sắc ký đồ và xác định vị trí pic chuẩn phyllanthin.

Hàm lượng % (k1/k1) của phyllanthin ($C_{24}H_{34}O_6$) và hypophyllanthin ($C_{24}H_{30}O_7$) trong cao khô Diệp hạ châu đẳng tính trên chế phẩm khô được tính theo công thức sau:

$$X\% = (R_u/R_s) \times m_s \times C_s \times (100/m_t) \times F_d \times 100/(100 - H\%)$$

Trong đó:

R_u : diện tích pic phyllanthin hoặc hypophyllanthin trên sắc ký đồ dung dịch thử

R_s : diện tích pic phyllanthin hoặc hypophyllanthin trên sắc ký đồ dung dịch chuẩn

m_s : khối lượng mg chất chuẩn tương ứng

C_s : hàm lượng nguyên trạng của chất chuẩn tương ứng (mg chứa trong 1 mg chất chuẩn)

m_t : khối lượng mg của bột chế phẩm đem thử (mg)

F_d : thừa số hiệu chuẩn do sự khác nhau của độ pha loãng thử so với chuẩn

$H\%$: hàm lượng ẩm

7. Giới hạn nhiễm khuẩn

Tiến hành theo DĐVN V, phụ lục 13.6.

III. ĐÓNG GÓI – BẢO QUẢN

Đóng gói: Quy cách 20 g. Mỗi quy cách cho cao khô vào trong 2 lớp túi PE hàn kín, rồi cho vào 1 lớp bao nhôm hàn kín.

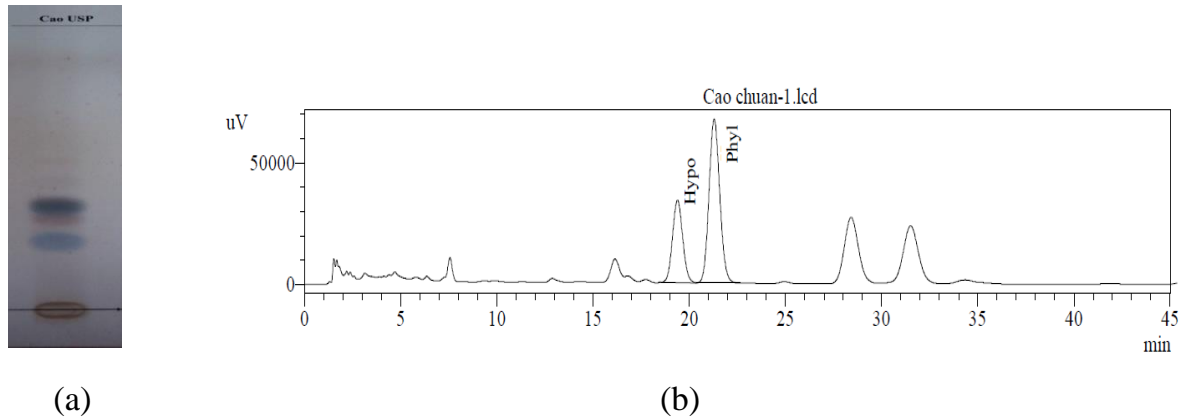
Nhãn đúng quy chế.

Bảo quản: Ở nhiệt độ trong khoảng 15-30 °C, tránh ẩm.

PHỤ LỤC 13. ĐIỀU CHẾ CAO GIÀU LIGNAN DÙNG LÀM CAO ĐỐI CHIẾU DIỆP HẠ CHÂU ĐẰNG

1. Phân lập và tinh chế phân đoạn giàu lignan

Tiến hành SKLM và HPLC cao chuẩn USP cho kết quả sắc ký đồ trình bày ở Hình 1.1.



Hình 1.1. Sắc ký đồ SKLM (a) và HPLC (b) cao chuẩn USP Diệp hạ châu đắng

Sau khi tiến hành sắc ký, cao USP chứa thành phần chính là các lignan. Do đó, khảo sát dung môi chiết cao theo hướng làm giàu nhóm lignan, loại tạp nhiều nhất. Kết quả khảo sát các dung môi: n-hexan, dicloromethan, ethyl acetat được trình bày ở Bảng 1.1, Hình 1.2. và Hình 1.3.

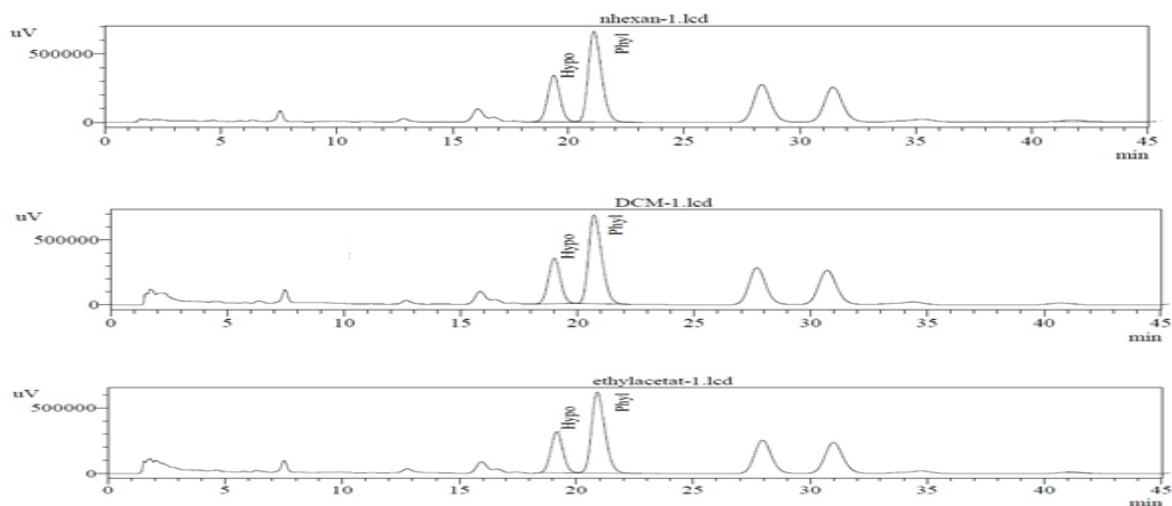


Soi UV 254 nm



Phun H₂SO₄ 10 %

Hình 1.2. Sắc ký đồ SKLM khảo sát dung môi chiết phân đoạn giàu lignan



Hình 1.3. Sắc ký đồ HPLC khảo sát dung môi chiết phân đoạn giàu lignan

Bảng 1.1. Kết quả HPLC khảo sát dung môi chiết phân đoạn giàu lignan

Dung môi	Hàm lượng HPL (%)	Hàm lượng PLT (%)	Tổng hàm lượng HPL và PLT (%)
n-hexan	0,45	1,28	1,73
Diclorometan	0,45	1,27	1,72
Ethyl acetat	0,40	1,16	1,56
Cao chuẩn USP	0,94	2,61	3,55

Từ kết quả SKLM và HPLC, dung môi n-hexan cho hàm lượng lignan cao nhất và loại được nhiều tạp phân cực nhất. Chọn n-hexan để chiết phân đoạn lignan từ cao ethanol 96 %.

Quy trình chiết: 320 g cao ethanol 96 %, được ngâm lạnh với 1,5 lít n-hexan trong 8 giờ, thỉnh thoảng dùng đũa khuấy đều, lọc thu dịch. Phần cặn được tiếp tục ngâm lạnh với 1 lít n-hexan trong 3 giờ, lọc thu dịch. Lặp lại lần 3 tương tự lần 2. Gộp các dịch lọc, thu được 3 lít dịch chiết n-hexan. Cô thu hồi dung môi, thu được 60 g cao n-hexan.

Tinh chế phân đoạn giàu lignan: Sau khi chiết với n-hexan, phân đoạn thu được vẫn còn chứa nhiều tạp: chất béo, chất màu...Do đó, tiến hành tinh chế phân đoạn này bằng sắc ký cột chân không để loại tạp. Các điều kiện sắc ký cụ thể:

- Cột sắc ký thủy tinh có kích thước 7 x 70 cm.
- Khối lượng mẫu: 60 g cao n-hexan.
- Phương pháp nạp mẫu: dạng dung dịch.

- Pha tĩnh: 300 g silica gel cỡ hạt 0,040-0,063 mm (Davisil).
- Pha động triển khai với dung môi nền là n-hexan để ổn định cột, khai triển cột bằng n-hexan, n-hexan – dicloromethan (50 : 50), dicloromethan.
- Thể tích hứng: 200 mL (trong bình nón).
- Các phân đoạn được kiểm tra bằng SKLM, hệ dung môi là n-hexan – ethyl acetat (2 : 1), phát hiện với UV ở 254 nm và thuốc thử dung dịch acid sulfuric 10 % trong nước, sấy khô ở 105 °C.

Bảng 1.2. Kết quả sắc ký cột chân không (lần 1)

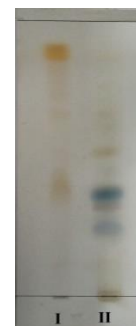
Phân đoạn	Dung môi	Bình hứng	Khối lượng cần (g)
I	n-hexan	1 – 11	25,60
		12 – 16	
II	DCM	17 – 25	27,53
		26 – 39	



Soi UV 366 nm



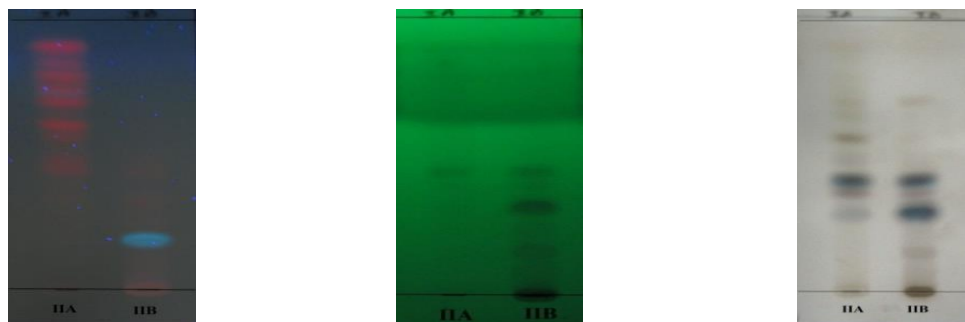
Soi UV 254 nm

Phun H₂SO₄ 10 %**Hình 1.4.** Sắc ký đồ SKLM các phân đoạn sau sắc ký cột chân không (lần 1)

Tiếp tục tinh chế phân đoạn II. Điều kiện sắc ký như trên với pha tĩnh: 120 g silica gel cỡ hạt 0,040-0,063 mm (Davisil) cho khối lượng mẫu: 27,53 g.

Bảng 1.3. Kết quả sắc ký cột chân không (lần 2)

Phân đoạn	Dung môi	Bình hứng	Khối lượng cần (g)
IIA	n-hexan	1 – 5	3,21
	n-hexan – DCM (50 : 50)	6 – 15	13,71
IIB	n-hexan – DCM (50 : 50)	15 - 19	5,36
	DCM	20 - 27	

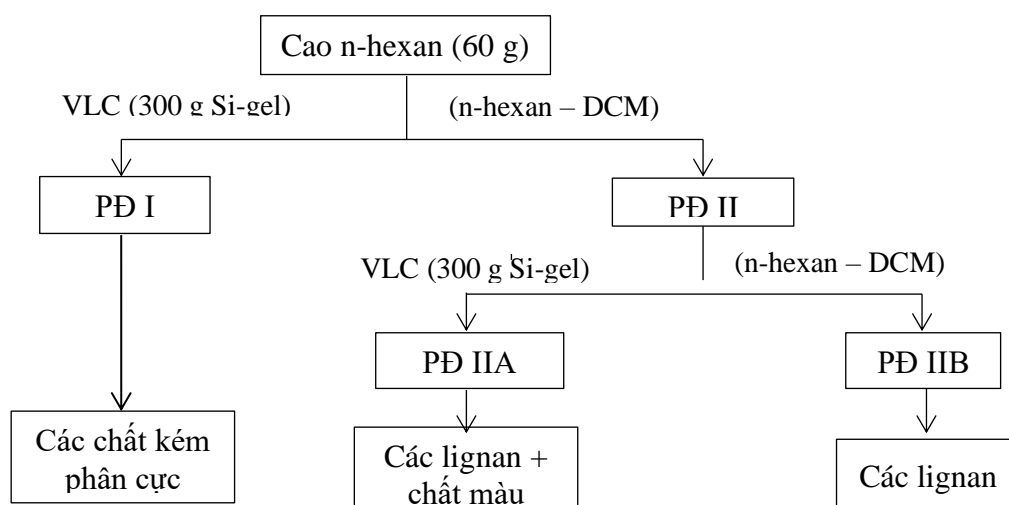


Soi UV 366 nm

Soi UV 254 nm

Phun H₂SO₄ 10 %

Hình 1.5. Sắc ký đồ SKLM các phân đoạn sau sắc ký cột chân không (lần 2)



Sơ đồ 1.1. Sơ đồ phân lập phân đoạn lignan qua sắc ký cột chân không

Nhận xét: từ kết quả sau sắc ký cột chân không cao n-hexan, chọn phân đoạn IIB để tiếp tục điều chế cao đối chiếu.

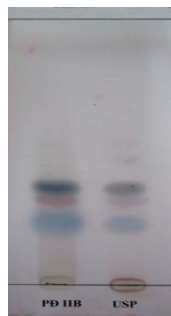
So sánh hàm lượng hoạt chất trong cao chuẩn USP và PĐ IIB

Chuẩn bị mẫu:

Mẫu cao chuẩn USP: Cân chính xác khoảng 100,0 mg cao chuẩn USP vào bình định mức 20 mL, thêm khoảng 10 mL methanol, siêu âm 30 phút, lắc đều 30 phút, để nguội, bổ sung methanol đến vạch (dung dịch có nồng độ 5 mg/mL), lọc qua màng lọc 0,45 μm.

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 50 mg PĐ IIB vào bình định mức 10 mL, thêm methanol, siêu âm 30 phút, lắc đều 30 phút, để nguội, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều (dung dịch có nồng độ 5 mg/mL), lọc qua màng lọc 0,45 μm.

Tiến hành SKLM và HPLC mẫu chuẩn và mẫu thử.



Hình 1.6. Sắc ký đồ SKLM PĐ IIB và cao chuẩn USP

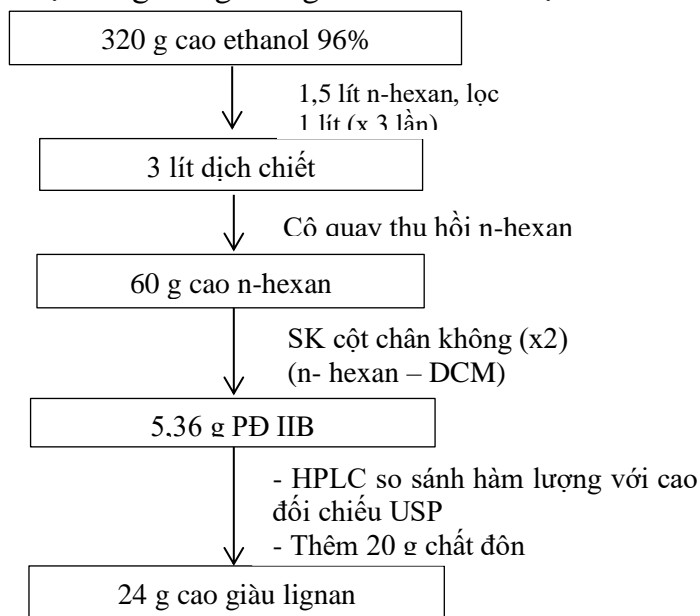
Bảng 1.4. Kết quả hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin của PĐ IIB và cao chuẩn USP

	Hàm lượng PLT ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Hàm lượng HPL ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
PĐ IIB	416,21	43,06
Cao đối chiếu USP	26,79	9,05

Nhận xét: Trong PĐ IIB, hàm lượng phyllanthin cao gấp 15,54 lần và hypophyllanthin cao gấp 4,76 lần so với cao chuẩn USP.

Do đó, tiến hành điều chỉnh hàm lượng hoạt chất (theo hypophyllanthin) tương đương với cao chuẩn USP bằng chất độn silica có tính trơ, có khả năng hút ẩm. Lượng chất độn thêm vào: 20 g.

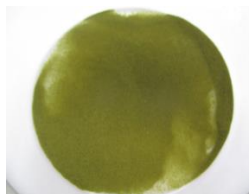
Cách tiến hành: thêm 20 g silica dioxyd vào PĐ IIB, trộn đều, sấy ở 85 °C trong 5 giờ, được 24 g cao giàu lignan điều chế được.



Sơ đồ 1.2. Quy trình điều chế cao giàu lignan

2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cao giàu lignan điều chế

Cảm quan: Bột đồng nhất có màu xanh lá cây.



Hình 2.1. Cao giàu lignan điều chế

Hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin – Sắc ký đồ đối chiếu

Chuẩn bị mẫu:

Mẫu cao chuẩn USP: Cân chính xác khoảng 100,0 mg cao chuẩn USP vào bình định mức 20 mL, thêm khoảng 10 mL methanol, siêu âm 30 phút, lắc đều 30 phút, để nguội, bổ sung methanol đến vạch (dung dịch có nồng độ 5 mg/mL), lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 50 mg cao giàu lignan điều chế vào bình định mức 10 mL, thêm methanol, siêu âm 30 phút, lắc đều 30 phút, để nguội đến nhiệt độ phòng, bổ sung methanol đến vạch, lắc đều (dung dịch có nồng độ 5 mg/mL), lọc qua màng lọc 0,45 μ m. Tiến hành HPLC với 6 mẫu.

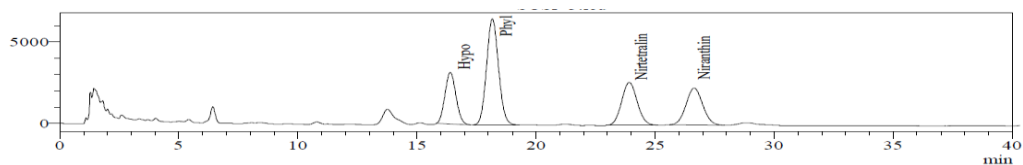
Điều kiện sắc ký:

- Cột sắc ký: Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m).
- Pha động: Methanol – acid phosphoric 0,1 % (56 : 44).
- Tốc độ dòng: 1 mL/phút.
- Nhiệt độ cột: 25 °C.
- Đầu dò: PDA, bước sóng phát hiện 230 nm.
- Thể tích tiêm: 10 μ L.

Sắc ký đồ đối chiếu



Hình 2.2. Sắc ký đồ SKLM cao giàu lignan điều chế và cao chuẩn USP



Hình 2.3. Sắc ký đồ HPLC cao giàu lignan điều chế

Bảng 2.1. Hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin trong cao giàu lignan điều chế

Mẫu	Hàm lượng PLT ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Hàm lượng HPL ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	Tổng hàm lượng HPL và PLT ($\mu\text{g}/\text{mg}$)
Cao giàu lignan điều chế 1	112,44	11,44	123,88
Cao giàu lignan điều chế 2	111,58	11,35	122,93
Cao giàu lignan điều chế 3	112,59	11,49	124,08
Cao giàu lignan điều chế 4	111,72	11,41	123,13
Cao giàu lignan điều chế 5	112,02	11,43	123,45
Cao giàu lignan điều chế 6	112,91	11,51	124,42
Trung bình ($\mu\text{g}/\text{mg}$)	112,21	11,44	123,65
RSD (%)	0,13	0,13	0,46

Nhận xét: Hàm lượng phyllanthin trong cao giàu lignan điều chế là 112,21 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (cao gấp 4 lần so với cao chuẩn USP). Hàm lượng hypophyllanthin trong cao giàu lignan điều chế là 11,44 $\mu\text{g}/\text{mg}$ tương đương với trong cao chuẩn USP (9,05 $\mu\text{g}/\text{mg}$). Tổng hàm lượng phyllanthin và hypophyllanthin trong cao giàu lignan điều chế là 123,65 $\mu\text{g}/\text{mg}$.

Mất khối lượng do làm khô: Sấy 1,0 g cao ở 85 °C trong 5 giờ.

Yêu cầu: Không quá 5,0 %.

Bảng 2.2. Kết quả mất khối lượng do làm khô của cao giàu lignan điều chế

	Mẫu 1	Mẫu 2	Mẫu 3
Mất khối lượng do làm khô (%)	1,02	1,00	1,05
Trung bình (%)	1,02		
RSD (%)	2,46		

Kết luận: Vây cao giàu lignan điều chế được từ Diệp hạ châu đáng đạt yêu cầu chất lượng có thể dùng làm cao đối chiếu.

3. Đóng ống – Dán nhãn

Cao giàu lignan điều chế đựng trong lọ thủy tinh màu nâu kín, tránh ánh sáng và ẩm.

Bảo quản ở ngăn mát tủ lạnh.

Dán nhãn: nhãn ghi đầy đủ tên khoa học của dược liệu, khối lượng.

**PHỤ LỤC 14. QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI PHYLLANTHIN,
HYPOPHYLLANTHIN VÀ NIRANTHIN TRONG HUYẾT TƯƠNG THỎ
BẰNG KỸ THUẬT LC-MS/MS**

Đối tượng áp dụng

Quy trình này được áp dụng để định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin, và niranthin trong huyết tương thỏ, sử dụng chuẩn nội diazepam, với khoảng tuyến từ 1-1000 ng/mL trên hệ thống sắc ký lỏng ghép nối khối phổ LC-MS/MS Shimadzu 8040.

1. QUY TRÌNH THỰC HIỆN

Chất chuẩn, trang thiết bị, hóa chất - dung môi, huyết tương trắng

Chất chuẩn

Tên chất chuẩn	Nguồn gốc	Số lô	Hàm lượng nguyên trạng
Phyllanthin	Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM	010915	99,35 %
Hypophyllanthin	Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM	010915	97,92%
Niranthin	Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM	010915	97,02%
Diazepam (IS)	Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM	QT181 020213	99,49 %

Trang thiết bị

Thiết bị phân tích	Mã hiệu	Nhà sản xuất
Hệ thống LC-MS/MS 8040	8040	Shimadzu (Nhật Bản)
Cân kỹ thuật (d = 0,01 g)	JP 802-G	Metler Toledo (Thụy Sĩ)
Cân phân tích (d = 0,01 mg)	AB 265-S	Metler Toledo (Thụy Sĩ)
Micropipet	Research plus	Eppendorf (Thụy Sĩ)
Máy ly tâm lạnh	Mikro 220R	Hettich (Đức)
Bể siêu âm	Hwashin 410	PowerSonic (Hàn Quốc)
Máy lắc ống nghiệm	Advanced	Talboys (ỹ)
Máy lắc vòng	Advanced 3500	Talboys (Mỹ)
Máy cô ly tâm chân không	Lab conco	Talboys (Mỹ)
Tủ lạnh 2 - 8 °C	LG	Hàn Quốc
Tủ đông -70 °C	EMS 690	Froilabo (Pháp)

Các thiết bị phân tích đều được hiệu chuẩn theo yêu cầu của GLP và ISO/IEC 17025. Các dụng cụ thủy tinh đạt yêu cầu chính xác dùng trong phân tích.

Hóa chất - dung môi

Hóa chất	Loại	Nguồn gốc
Methanol	LC-MS	J.T. Baker
Amoni format	LC-MS	Sigma-Aldrich
n-hexan	PA	J.T. Baker

Huyết tương trắng

Huyết tương trắng thô do Khoa Dược lý – Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh cung cấp, được bảo quản ở tủ đông âm sâu ≤ -70 °C.

Chuẩn bị mẫu

Dung môi pha mẫu: Methanol

Dung dịch chuẩn gốc: pha các dung dịch chuẩn gốc có nồng độ tương ứng với từng chất như sau:

Chất chuẩn	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)
Phyllanthin	100
Hypophyllanthin	100
Niranthin	100
Diazepam (IS)	100

Dung dịch chuẩn: Từ các dung dịch chuẩn gốc pha các dung dịch chuẩn với dung môi pha mẫu có các nồng độ thích hợp.

Dung dịch chuẩn gốc và tất cả các dung dịch chuẩn được bảo quản ở -20 °C.

Thêm vào huyết tương trắng các dung dịch chuẩn S1 – S10 và dung dịch chuẩn nội với tỷ lệ 5 % thể tích để thu được các mẫu huyết tương giả lập (giai mẫu chuẩn) và mẫu kiểm chứng có nồng độ như sau:

Bảng 1.1. Nồng độ của các hoạt chất trong huyết tương

Chất	Nồng độ các hoạt chất trong huyết tương (ng/mL)											
	S-1 (LLOQ)	S-2 (LQC)	S-3	S-4	S-5	S-6	S-7	S-8	S-9	S-10	MQC	HQC
PLT	1	2	5	10	20	50	100	200	500	1000	250	800
HPL	1	2	5	10	20	50	100	200	500	1000	250	800
NRT	1	2	5	10	20	50	100	200	500	1000	250	800
IS	50											

Cách xử lý mẫu

Lấy chính xác 200 μL huyết tương thô có chứa các chất phân tích cho vào ống nghiệm. Thêm 10 μL dung dịch chuẩn nội diazepam nồng độ 1000 ng/mL trong methanol, lắc 10 giây. Chiết 2 lần với n-hexan, mỗi lần 2,5 mL, lắc xoay 1 phút, lắc

300 vòng/phút trong 5 phút, ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng, lấy dịch trong, gộp dịch chiết và bốc hơi dung môi tới cân bằng khí nitơ ở 40 °C. Hòa tan cân trong 200 µL methanol, lắc xoáy 1 phút, siêu âm 5 phút, ly tâm 4000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ 0 °C, lọc qua màng lọc 0,22 µm.

Điều kiện khối phổ

Nguồn ion hóa ESI. Kiểu ion hóa ESI (+).

Tốc độ dòng khí phun (nitơ) – Nebulizing Gas Flow: 3 L/phút.

Tốc độ dòng khí khô (nitơ) – Drying Gas Flow: 15 L/phút.

Nhiệt độ hóa hơi dung môi – DL Temperature: 250 °C.

Nhiệt độ buồng ion hóa – Heatblock Temperature: 400 °C.

Áp suất khí phun: 25 psi.

Chế độ ghi phổ: MRM.

Điện thế mao quản: 4500 V.

Thời gian chờ ghi nhận tín hiệu – Dwell time: 100 ms.

Thế phân mảnh:

Chất	ESI	<i>m/z</i>	Q1 (eV)	CE (eV)	Q3 (eV)	Tỷ lệ (%)
Phyllanthin	(+)	436,00 → 151,10	-22	-33	-29	100
Hypophyllanthin	(+)	261,20 → 231,10	-18	-14	-16	100
Niranthin	(+)	449,95 → 369,20	-23	-18	-25	100
Diazepam	(+)	285,00 → 154,05	-21	-28	-30	100

Điều kiện sắc ký

Pha động: Methanol – dung dịch đệm amoni format 5 mM (63 : 37).

Cột sắc ký: Gemini C18 (100 × 2 mm; 3 µm).

Nhiệt độ cột: 40 °C.

Nhiệt độ autosampler: 5 °C.

Tốc độ dòng: 0,3 mL/phút.

Thể tích tiêm: 2 µL.

Phát hiện: Đầu dò khối phổ, ESI.

Tiến hành

Tiến hành sắc ký 6 lần mẫu huyết tương giả lập ở nồng độ MQC. Phép thử chỉ có giá trị khi các thông số thời gian lưu, diện tích pic và tỷ số diện tích pic của chất phân tích và chuẩn nội đều có CV nhỏ hơn 5 %.

Tính kết quả

Dựa vào phương trình hồi qui tuyến tính giữa nồng độ chất phân tích và tỷ số diện tích pic của chất phân tích với chuẩn nội $y = ax + b$ với trọng số (weighting factor) $1/x^2$, trong đó y là tỉ số diện tích giữa chất phân tích và chuẩn nội và x là nồng độ chất phân tích (ng/mL), xác định được nồng độ phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ (ng/mL).

2. ĐỀ CƯƠNG THẨM ĐỊNH QUI TRÌNH PHÂN TÍCH

Qui trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ bằng kỹ thuật LC-MS/MS được thẩm định dựa theo những qui định và yêu cầu trong hướng dẫn của US-FDA, EMA và DĐVN V.

2.1. Tính phù hợp của hệ thống

Tiêm lặp lại 6 lần mẫu huyết tương đã xử lý có chứa hỗn hợp các chất cần phân tích và chuẩn nội ở mức nồng độ trung bình (MQC) .

Yêu cầu: Các thông số sắc ký khảo sát (tỷ số thời gian lưu, tỷ số diện tích pic) có hệ số phân tán (CV) không được quá 5 %.

2.2. Tính đặc hiệu

Tiêm 6 mẫu huyết tương trắng và 6 mẫu giả lập có thêm chuẩn nội ở mức nồng độ giới hạn định lượng dưới của phạm vi định lượng (LLOQ). Xác định thời gian lưu, tín hiệu đáp ứng pic.

Yêu cầu: Mẫu huyết tương trắng cho tín hiệu phân tích nằm trong giới hạn cho phép (≤ 20 % diện tích pic đối với các chất phân tích và ≤ 5 % đối với chuẩn nội).

2.3. Tỷ lệ thu hồi (Hiệu suất chiết)

Xác định tỷ lệ thu hồi (Hiệu suất chiết) bằng cách so sánh đáp ứng của chất phân tích được chiết từ mẫu giả lập thêm chuẩn nội ở 3 mức nồng độ (LQC, MQC và HQC) với đáp ứng của mẫu trắng sau khi xử lý được thêm dung dịch chuẩn để có cùng nồng độ

tương ứng được pha trong dung môi. Chuẩn bị 6 mẫu ở mỗi mức nồng độ. Tiến hành sắc ký các mẫu này.

2.4. Tính tuyến tính và đường chuẩn

Chuẩn bị các hỗn hợp chuẩn với nồng độ trong phạm vi định lượng. Thêm các hỗn hợp chuẩn này vào trong huyết tương trắng (với tỷ lệ 1 : 20 theo thể tích so với nền mẫu), thêm tiếp chuẩn nội và tiến hành xử lý mẫu để thu được giai mẫu chuẩn có nồng độ trong phạm vi định lượng.

Xác định sự tương quan giữa nồng độ và tỷ số diện tích pic của chất phân tích và diện tích của pic chuẩn nội của từng chất phân tích theo một hàm tuyến tính nhất định, phù hợp với qui trình phân tích được đề ra.

Vẽ đường biểu diễn sự tương quan giữa giá trị nồng độ và tỷ số diện tích pic theo hàm giá trị đã xây dựng được.

Yêu cầu:

- $R^2 \geq 0,98$.
- Không ít hơn 75 % các điểm đường chuẩn và tối thiểu 06 mẫu đường chuẩn phải có nồng độ tìm lại nằm trong khoảng 85 % - 115 % so với nồng độ lý thuyết (trừ điểm LLOQ nằm trong khoảng 80 % - 120 % so với nồng độ lý thuyết).

2.5. Độ đúng và độ chính xác (trong ngày và giữa các ngày)

Độ đúng và độ chính xác được xác định cùng lúc trên các mẫu huyết tương người có chứa chất cần phân tích tại 4 mức nồng độ: LLOQ, LQC, MQC, HQC. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 6 mẫu. Tiến hành xử lý mẫu và sắc ký trong 1 ngày.

Đánh giá độ chính xác và độ đúng giữa các ngày bằng cách tiếp tục thực hiện thêm tối thiểu 2 ngày.

Yêu cầu:

Độ đúng: 80 % - 120 % so với nồng độ lý thuyết ở nồng độ LLOQ và 85 % - 115 % so với nồng độ lý thuyết ở nồng độ LQC, MQC, HQC.

Độ chính xác: $CV \leq 20$ % ở nồng độ LLOQ và ≤ 15 % ở nồng độ LQC, MQC, HQC.

2.6. Giới hạn định lượng dưới

Tiến hành xác định nồng độ thấp nhất sao cho thỏa mãn điều kiện tín hiệu đáp ứng

của chất phân tích so với tín hiệu đáp ứng của mẫu huyết tương trắng ít nhất bằng 5 lần và cho độ chính xác trong khoảng $\pm 20\%$ và độ đúng 80% - 120%.

2.7. Độ ổn định của mẫu thử

a. Độ ổn định của dung dịch chuẩn gốc

Pha 3 lô mẫu, mỗi lô chứa PLT, HPL, NRT trong dung môi ở nồng độ MQC, mỗi lô 6 mẫu. Phân tích ngay 1 lô theo phương pháp đã xây dựng.

- Độ ổn định ngắn hạn: Lô thứ 2 để ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ rồi phân tích.

- Độ ổn định dài hạn: Lô thứ 3 bảo quản ở nhiệt độ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ và phân tích sau 30 ngày.

b. Độ ổn định trong huyết tương

Pha 4 lô mẫu, mỗi lô chứa PLT, HPL, NRT trong huyết tương ở nồng độ LQC, HQC, mỗi nồng độ 6 mẫu. Phân tích ngay 1 lô theo phương pháp đã xây dựng.

- Độ ổn định ngắn hạn: Lô thứ 2 để ở nhiệt độ phòng trong ít nhất 6 giờ rồi phân tích.

- Độ ổn định của mẫu sau 3 chu kỳ đông - rã đông: Lô thứ 3 bảo quản ở $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ ít nhất 12 giờ, lấy ra để ở nhiệt độ phòng cho đến khi rã đông, lặp lại chu trình thêm 2 lần. Phân tích mẫu sau 3 chu trình đông - rã đông.

- Độ ổn định dài hạn: Lô thứ 4 bảo quản ở nhiệt độ $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ và phân tích sau 30 ngày.

- Độ ổn định sau khi xử lý mẫu (trong buồng tiêm mẫu): Tiêm lại lô mẫu ở nồng độ LQC, HQC, mỗi nồng độ 6 mẫu, sau ít nhất 24 giờ xử lý và bảo quản trong buồng tiêm mẫu ở $5\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Yêu cầu: Mẫu được xem là ổn định nếu như giá trị tìm lại của từng hoạt chất nằm trong khoảng 85% - 115% của nồng độ lý thuyết ở từng mức nồng độ.

2.8. Độ ổn định của dung dịch chuẩn nội

Pha 3 lô mẫu, mỗi lô chứa IS trong dung môi ở nồng độ 100 ng/mL, mỗi lô 6 mẫu. Phân tích ngay 1 lô theo phương pháp đã xây dựng.

- Độ ổn định ngắn hạn: Lô thứ 2 để ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ rồi phân tích.

- Độ ổn định dài hạn: Lô thứ 3 bảo quản ở nhiệt độ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ và phân tích sau 30 ngày.

Pha loãng dung dịch chuẩn nội gốc sau các điều kiện bảo quản trong dung môi hòa mẫu để được nồng độ thích hợp và tiến hành phân tích cùng với dung dịch chuẩn mới pha có nồng độ tương ứng.

- Độ ổn định sau khi xử lý mẫu trong huyết tương (trong buồng tiêm mẫu): Tiêm lại lô mẫu ở nồng độ LQC, HQC, mỗi nồng độ 6 mẫu, sau ít nhất 24 giờ xử lý và bảo quản trong buồng tiêm mẫu ở 5 °C.

Yêu cầu: Mẫu được xem là ổn định nếu như giá trị tìm lại của từng chất phân tích và chuẩn nội nằm trong khoảng 90 % - 110 % (dung dịch gốc là ± 10 %, huyết tương mới là ± 15 %) của nồng độ ban đầu ở từng mức nồng độ.

2.9. Ảnh hưởng của nền mẫu (Matrix effects)

Chuẩn bị 6 lô huyết tương người khác nhau, mỗi lô 3 mẫu, tiến hành phân tích mẫu theo qui trình xử lý mẫu, mẫu sau khi xử lý được thêm chất phân tích ở 2 nồng độ LQC, HQC và chuẩn nội vào 2 mẫu mỗi lô. Tiến hành phân tích mẫu song song với mẫu LQC và HQC có chuẩn nội trong pha động để xác định ảnh hưởng của nền mẫu.

$$MF_{AS} = \text{Area } M_{AS} / \text{Area } MP_{AS}$$

$$MF_{IS} = \text{Area } M_{IS} / \text{Area } MP_{IS}$$

$$\text{IS-normalized MF} = MF_{AS} / MF_{IS}$$

Trong đó:

Area $M_{AS (IS)}$: diện tích pic của chất phân tích (chuẩn nội) trong huyết tương người

Area $MP_{AS (IS)}$: diện tích pic của chất phân tích (chuẩn nội) trong pha động.

Yêu cầu: CV của IS-normalized MF ≤ 15 %.

2.10. Ảnh hưởng lượng mẫu tồn dư (Carry over)

Tiến hành tiêm mẫu có nồng độ cao nhất trong huyết tương người (ULOQ) vào hệ thống sắc ký, sau khi phân tích xong, tiêm ngay mẫu trắng (Blank) vào hệ thống. Thực hiện qui trình trên 6 lần. Tiêm 6 lần mẫu có nồng độ LLOQ trong huyết tương người để đánh giá kết quả.

Yêu cầu: Ảnh hưởng lượng mẫu tồn dư trong mẫu trắng theo nồng độ không được lớn hơn 20 % so với giới hạn dưới của định lượng (LLOQ) đối với các chất phân tích và 5 % đối với chất chuẩn nội.

2.11. Hệ số pha loãng

Chuẩn bị 6 mẫu huyết tương giả lập có nồng độ gần nồng độ HQC của mỗi chất phân tích. Pha loãng mẫu này 2 lần bằng huyết tương trắng rồi tiến hành xử lý mẫu và phân tích.

Yêu cầu: Mẫu được xem là không bị ảnh hưởng bởi sự pha loãng nếu như nồng độ tìm lại của từng chất phân tích nằm trong khoảng 85 % - 115 % của nồng độ lý thuyết.

3. BÁO CÁO KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH PHÂN TÍCH

3.1. Tính phù hợp hệ thống

Tính phù hợp hệ thống được khảo sát với các thông số sắc ký thời gian lưu, diện tích pic, tỷ số diện tích pic và tỷ số thời gian lưu của các chất phân tích so với chuẩn nội. Thực hiện trên mẫu giả lập ở mức nồng độ trung bình (MQC) có thêm chuẩn nội, tiêm lặp lại 6 lần. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả kiểm tra tính phù hợp của hệ thống (n = 6)

Thông số sắc ký	Giá trị thống kê	PLT	HPL	NRT	IS
Thời gian lưu (t _R -phút)	TB	7,00	6,29	9,24	3,89
	CV (%)	0,12	0,12	0,07	0,13
Diện tích pic (S)	TB	6083430	949053	3858677	2755877
	CV (%)	0,91	0,88	0,90	0,93
Tỷ số S/S _{IS}	TB	1,800	1,618	2,375	-
	CV (%)	0,22	0,22	0,11	-
Tỷ số t _R /t _{R(IS)}	TB	2,208	0,344	1,400	-
	CV (%)	0,80	1,26	0,82	-

Nhận xét: Kết quả cho thấy các thông số thời gian lưu, diện tích pic, tỷ số diện tích pic và tỷ số thời gian lưu của các chất phân tích và chuẩn nội khi tiêm lặp lại 6 lần đều có CV < 5 %. Vậy phương pháp đạt tính phù hợp của hệ thống.

3.2. Tính đặc hiệu (Độ chọn lọc)

Tiến hành sắc ký 6 mẫu huyết tương trắng từ 6 lô huyết tương khác nhau và 6 mẫu kiểm chứng ở mức nồng độ LLOQ.

Kết quả khảo sát cho thấy trên sắc ký đồ mẫu LLOQ có các đỉnh PLT (6,95 phút); HPL (6,27 phút), NRT (9,20 phút) và đỉnh IS (3,89 phút). Mẫu huyết tương trắng không xuất hiện đỉnh tại vị trí PLT, HPL và NRT. Tín hiệu đáp ứng của mẫu trắng tại thời điểm trùng với thời gian lưu của PLT, HPL và NRT không vượt quá 20 % tín hiệu đáp ứng của chất phân tích ở nồng độ LLOQ. Tín hiệu đáp ứng của mẫu trắng

tại thời điểm trùng với thời gian lưu của chuẩn nội không vượt quá 5 % tín hiệu đáp ứng của chuẩn nội ở mẫu LLOQ. Kết quả xác định độ chọn lọc được trình bày ở Bảng 3.2. Vậy, quy trình phân tích đạt yêu cầu về tính đặc hiệu.

Bảng 3.2. Kết quả xác định tính đặc hiệu

Lô huyết tương	Diện tích pic								Tỷ lệ ảnh hưởng (%)			
	Mẫu trắng				Mẫu LLOQ							
	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ	PLT	HPL	NRT	DAZ
1	0	0	0	0	130976	24990	91622	2676919	0,00	0,00	0,00	0,00
2	0	0	0	0	138544	25019	102195	2675395	0,00	0,00	0,00	0,00
3	0	0	0	0	134538	24679	109172	2680018	0,00	0,00	0,00	0,00
4	0	0	0	0	142629	23157	95513	2658667	0,00	0,00	0,00	0,00
5	0	0	0	0	133991	26102	102315	2673255	0,00	0,00	0,00	0,00
6	0	0	0	0	145580	24091	92122	2653829	0,00	0,00	0,00	0,00
TB	0	0	0	0	137710	24673	98823	2669681	0,00	0,00	0,00	0,00
CV (%)					4,06	4,01	6,99	0,40				

3.3. Tỷ lệ thu hồi (Hiệu suất chiết)

Tiến hành sắc ký các mẫu huyết tương giả lập có PLT, HPL và NRT ở các nồng độ LQC, MQC, HQC và IS cùng với các mẫu chuẩn có nồng độ tương ứng được pha trong dung môi hòa cần. So sánh diện tích pic của chất phân tích và chuẩn nội trong các mẫu. Kết quả được tóm tắt ở Bảng 3.3 cho thấy hiệu suất chiết của các chất ổn định ở 3 mức nồng độ.

Bảng 3.3. Hiệu suất chiết của PLT, HPL, NRT và IS (n = 6)

Mức nồng độ	PLT		HPL		NRT		IS	
	Hiệu suất chiết TB (%)	CV (%)	Hiệu suất chiết TB (%)	CV (%)	Hiệu suất chiết TB (%)	CV (%)	Hiệu suất chiết TB (%)	CV (%)
LQC	92,68	2,05	88,42	7,35	93,76	1,67	98,07	2,06
MQC	100,69	4,53	102,04	3,54	103,73	4,55	98,78	5,20
HQC	89,48	3,52	95,07	1,56	99,36	1,22	93,79	2,79
TB	94,29	3,36	95,18	4,15	98,95	2,48	96,88	3,35
Yêu cầu	$H \leq 110 \%, CV \leq 15 \%$							
Kết luận	Đạt							

Nhận xét: Ở nồng độ LQC, MQC, HQC hiệu suất chiết trung bình của PLT, HPL, NRT và DAZ lần lượt là 94,29 %; 95,18 %, 98,95 % và 96,88 % Các giá trị CV của hiệu suất chiết tại 3 mức nồng độ PLT, HPL, NRT và IS lần lượt là 3,36 %; 4,15 %; 2,48 % và 3,35 % ($CV \leq 15 \%$). Vậy quy trình xử lý mẫu đã xây dựng phù hợp, có hiệu suất chiết cao và ổn định ở cả 3 mức nồng độ.

3.4. Tính tuyến tính và đường chuẩn

Tiến hành sắc ký các mẫu huyết tương giả lập chứa PLT, HPL và NRT có khoảng nồng độ khảo sát lần lượt từ 1-1000 ng/mL (PLT), 1-1000 ng/mL (HPL) và 1-1000 ng/mL (NRT). Sự tương quan giữa nồng độ PLT, HPL và NRT trong huyết tương, tỷ số diện tích pic chất phân tích với chuẩn nội trong huyết tương được trình bày ở Bảng 3.4.

Đường chuẩn bao gồm: 2 mẫu huyết tương trắng (blank), 1 mẫu huyết tương trắng có chuẩn nội (zero) và 8 mẫu huyết tương đường chuẩn. Tiến hành phân tích lặp lại 3 đường chuẩn. Đánh giá sự tương quan giữa nồng độ chất phân tích trong huyết tương với tỷ số diện tích pic đo được trong khoảng nồng độ khảo sát. Sử dụng mô hình hồi qui tuyến tính $y = ax + b$, với trọng số $1/x^2$.

Bảng 3.4. Sự tương quan giữa nồng độ PLT, HPL và NRT và tỷ số diện tích pic chất phân tích với chuẩn nội trong huyết tương

Phyllanthin				
Mẫu	Nồng độ lý thuyết (ng/mL)	Tỉ lệ diện tích pic PLT/IS	Nồng độ tìm lại (ng/mL)	Độ đúng (%)
L1	1,07	0,059	1,09	1,80
L2	2,14	0,107	2,05	-3,87
L3	5,34	0,281	5,57	4,28
L4	10,68	0,490	9,80	-8,28
L5	21,36	1,092	21,95	2,77
L6	53,40	2,535	51,11	-4,29
L7	106,80	5,544	111,91	4,78
L8	213,60	10,600	214,06	0,21
L9	534,01	27,467	554,83	3,90
L10	1068,01	52,175	1054,06	-1,31
Phương trình hồi quy			A	0,04949
tuyến tính ($\hat{y} = Ax + B$)			B	0,00530
			R ²	0,9977
<i>Yêu cầu độ đúng:</i>		<i>Có ít nhất 75 % số điểm trong đường chuẩn đạt yêu cầu: 85 % - 115 %, ngoại trừ LLOQ: 80 % - 120 %; R² ≥ 0,980</i>		
<i>Kết luận:</i>		<i>Đạt</i>		

Hypophyllanthin				
Mẫu	Nồng độ lý thuyết (ng/mL)	Tỉ lệ diện tích pic HPL/IS	Nồng độ tìm lại (ng/mL)	Độ đúng (%)
L1	1,00	0,008	1,01	0,64
L2	2,01	0,017	2,01	0,26
L3	5,02	0,042	4,94	-1,49
L4	10,04	0,082	9,58	-4,55
L5	20,07	0,172	20,00	-0,35
L6	50,18	0,419	48,55	-3,26
L7	100,37	0,906	105,02	4,63
L8	200,74	1,800	208,42	3,83
L9	501,84	4,416	511,24	1,87
L10	1003,68	8,533	987,76	-1,59
Phương trình hồi quy tuyến tính ($\hat{y} = Ax + B$)			A	0,00864
			B	-0,00083
			R ²	0,9990
<i>Yêu cầu độ đúng</i>	<i>Có ít nhất 75 % số điểm trong đường chuẩn đạt yêu cầu: 85 % - 115 %, ngoại trừ LLOQ: 80 % - 120 %; R² ≥ 0,980</i>			
<i>Kết luận</i>	<i>Đạt</i>			

Niranthin				
Mẫu	Nồng độ lý thuyết (ng/mL)	Tỉ lệ diện tích pic HPL/IS	Nồng độ tìm lại (ng/mL)	Độ đúng (%)
L1	1,03	0,042	1,07	4,11
L2	2,06	0,069	1,88	-8,47
L3	5,14	0,186	5,37	4,46
L4	10,28	0,322	9,47	-7,96
L5	20,57	0,697	20,72	0,71
L6	51,42	1,643	49,09	-4,54
L7	102,84	3,661	109,63	6,60
L8	205,68	7,116	213,29	3,70
L9	514,21	17,483	524,30	1,96
L10	1028,41	34,091	1022,50	-0,57
Phương trình hồi quy tuyến tính ($\hat{y} = Ax + B$)			A	0,033334
			B	0,006465
			R ²	0,9965
<i>Yêu cầu độ đúng</i>	<i>Có ít nhất 75 % số điểm trong đường chuẩn đạt yêu cầu: 85 % - 115 %, ngoại trừ LLOQ: 80 % - 120 %; R² ≥ 0,980</i>			
<i>Kết luận</i>	<i>Đạt</i>			

3.5. Độ đúng và độ chính xác trong ngày và giữa các ngày

Chuẩn bị lô mẫu gồm 5 mức nồng độ LLOQ, LQC, MQCa, MQCb, HQC, mỗi nồng độ 6 mẫu. Xử lý và phân tích theo phương pháp đã xây dựng. Tiến hành sắc ký các mẫu huyết tương giả lập chứa các chất phân tích ở các mức nồng độ trên, lặp lại vào 2 ngày khác. Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đạt độ đúng trong ngày và khác ngày với độ đúng nằm trong khoảng 85 % - 115 % (trừ LLOQ có độ đúng từ 80 % - 120 %) và đạt độ chính xác với CV nhỏ hơn hoặc bằng 15 % (trừ LLOQ có CV ≤ 20 %). Kết quả được trình bày ở Bảng 3.5.

Bảng 3.5. Kết quả xác định độ đúng, độ chính xác trong ngày và khác ngày

Chất	Mức nồng độ (ng/mL)		Tỷ lệ hồi phục trung bình (%) – CV (%)				
			Trong ngày (n = 6)			Khác ngày (n = 18)	
			Ngày 01	Ngày 02	Ngày 03		
PLT	LLOQ	TB	91,49	116,33	102,28	103,37	
		CV (%)	5,71	4,18	4,52	4,27	
	LQC	TB	110,79	103,89	99,05	104,58	
		CV (%)	3,54	5,59	3,90	4,95	
	MQC	TB	109,06	92,00	99,54	100,20	
		CV (%)	2,38	5,72	3,95	3,19	
	HQC	TB	98,56	97,70	104,38	100,21	
		CV (%)	4,96	4,06	3,28	4,28	
	HPL	LLOQ	TB	110,01	112,29	107,08	109,79
			CV (%)	5,28	4,89	5,90	5,65
LQC		TB	100,30	96,097	99,54	98,65	
		CV (%)	4,99	6,15	5,40	5,85	
MQC		TB	108,16	95,85	96,41	100,14	
		CV (%)	4,07	3,88	5,93	4,93	
HQC		TB	104,84	92,00	101,15	99,33	
		CV (%)	4,69	6,72	5,61	5,64	
NRT		LLOQ	TB	88,78	111,82	100,15	100,25
			CV (%)	3,75	2,27	4,39	3,63
	LQC	TB	106,08	90,46	104,10	100,21	
		CV (%)	6,17	8,02	6,46	7,02	
	MQC	TB	111,07	107,67	102,28	107,01	
		CV (%)	3,22	3,50	4,52	4,08	
	HQC	TB	107,46	114,13	99,05	106,88	
		CV (%)	2,45	3,69	3,90	3,73	

3.6. Giới hạn định lượng dưới

Tiến hành sắc ký 6 mẫu huyết tương trắng và 6 mẫu kiểm chứng ở mức nồng độ LLOQ. Ở nồng độ 1 ng/mL với phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin, các kết quả sau khi phân tích đều cho tỷ số S/N lớn hơn 5, đạt độ chính xác và độ đúng theo qui định, diện tích của chất phân tích lớn hơn 5 lần so với mẫu trắng tại cùng thời điểm, do đó nồng độ này được chấp nhận là giới hạn định lượng dưới (LLOQ) của phương pháp. Kết quả xác định giới hạn định lượng dưới được trình bày ở Bảng 3.6.

Bảng 3.6. Kết quả xác định giới hạn định lượng dưới

Lô huyết tương	Độ đúng (%)			Giá trị S/N		
	PLT	HPL	NRT	PLT	HPL	NRT
1	91,32	115,97	84,95	18,5	7,7	12,6
2	100,20	119,08	88,23	25,7	10,8	11,8
3	89,12	108,43	85,23	23,8	7,7	13,9
4	93,35	113,10	92,60	20,9	10,1	15,4
5	90,59	117,39	92,38	16,0	6,5	10,2
6	84,36	116,09	89,29	16,5	6,3	10,8
TB	91,49	115,01	88,78	20,23	8,18	12,45
CV (%)	5,71	3,28	3,75	19,51	22,78	15,67

3.7. Độ ổn định của mẫu thử

3.7.1. Độ ổn định của dung dịch chuẩn gốc

Kết quả đánh giá độ ổn định của hoạt chất dung dịch chuẩn gốc được trình bày ở Bảng 3.7.

Bảng 3.7. Độ ổn định của PLT, HPL và NRT trong dung dịch chuẩn gốc (n = 6)

Điều kiện bảo quản	Độ đúng % (CV %)				
	PLT	HPL	NRT	IS	
Sau 6 giờ ở nhiệt độ phòng	TB	101,67	107,04	103,91	101,16
	CV (%)	1,70	1,82	2,38	1,71
Sau 30 ngày ở -20 °C	TB	99,89	98,71	100,46	100,89
	CV (%)	4,46	3,45	3,80	2,53

Nhận xét: Giá trị tìm lại của các chất nằm trong khoảng 90 % - 110 % của nồng độ lý thuyết với giá trị CV đều không quá 15 % sau 6 giờ bảo quản ở nhiệt độ phòng và sau 30 ngày bảo quản ở -20 °C. Như vậy, các dung dịch chuẩn gốc PLT, HPL, NRT và IS ổn định ở điều kiện nhiệt độ phòng sau 6 giờ và ở -20 °C sau 30 ngày.

3.7.2. Độ ổn định của hoạt chất trong huyết tương

- Độ ổn định ngắn hạn: Bảo quản ngắn hạn ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ.

- Độ ổn định dài hạn: Bảo quản dài hạn ở dưới -70 °C trong thời gian 30 ngày.
- Độ ổn định chu kỳ đông-rã đông: Bảo quản sau 3 chu kỳ đông-rã đông.
- Độ ổn định sau khi xử lý mẫu (trong bộ phận tiêm mẫu): Bảo quản sau khi xử lý mẫu 24 giờ trong buồng tiêm mẫu ở 5 °C.

Kết quả đánh giá độ ổn định của PLT, HPL và NRT trong huyết tương được trình bày ở Bảng 3.8.

Bảng 3.8 Độ ổn định của PLT, HPL và NRT trong huyết tương (n = 6)

Điều kiện bảo quản	Phần trăm giá trị tìm lại so với nồng độ lý thuyết (CV %)							
	PLT		HPL		NRT		IS	
	LQC	HQC	LQC	HQC	LQC	HQC		
Điều kiện ngắn hạn								
Sau 6 giờ ở nhiệt độ phòng	TB	112,37	98,95	111,54	105,30	113,08	99,78	-
	CV (%)	3,64	5,73	5,25	4,31	4,23	6,30	
Sau khi xử lý mẫu trong buồng tiêm mẫu 24 giờ ở 5 °C	TB	114,28	99,80	116,45	107,10	115,54	99,03	102,52
	CV (%)	4,07	3,41	6,64	3,69	3,86	5,36	1,33
Sau 3 chu kỳ đông-rã đông	TB	110,75	106,14	106,56	107,21	101,43	105,98	-
	CV (%)	2,28	2,38	5,84	5,72	5,78	8,01	
Điều kiện dài hạn								
Sau 30 ngày ở -70 °C	TB	106,11	107,83	99,16	107,99	105,29	106,77	-
	CV (%)	6,55	4,47	3,57	5,07	4,49	6,56	

Nhận xét: Giá trị tìm lại của các chất nằm trong khoảng 85 % - 115 % của nồng độ lý thuyết với giá trị CV đều không quá 15 %. Như vậy, mẫu huyết tương giả lập chứa PLT, HPL, NRT và IS đạt các chỉ tiêu ổn định theo hướng dẫn của US-FDA, EMA và ĐDVN V, cụ thể như sau: ổn định sau 6 giờ bảo quản ở nhiệt độ phòng, 24 giờ trong bộ phận tiêm mẫu sắc ký ở 5 °C, sau 3 chu kỳ đông - rã đông và sau 30 ngày bảo quản ở -70 °C.

3.8. Ảnh hưởng của nền mẫu (Matrix effects)

Tiến hành phân tích song song 6 lô mẫu huyết tương trắng đã xử lý rồi thêm IS và chất phân tích ở 2 nồng độ LQC và HQC, với mẫu LQC và HQC có chuẩn nội trong dung môi hòa cần để tính ảnh hưởng của nền mẫu. Ảnh hưởng của nền mẫu đối với các chất phân tích được trình bày ở Bảng 3.9.

Bảng 3.9. Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của nền mẫu (n = 6)

Mức nồng độ	Ảnh hưởng nền mẫu						
	MF _{PLT}	MF _{HPL}	MF _{NRT}	MF _{IS}	MF _{PLT} /MF _{IS}	MF _{HPL} /MF _{IS}	MF _{NRT} /MF _{IS}
LQC	73,75	82,12	79,81	84,95	0,87	0,97	0,94
	77,80	96,32	75,95	85,39	0,91	1,13	0,89
	79,65	74,73	83,36	87,24	0,91	0,86	0,96
	70,15	76,23	73,85	89,24	0,79	0,85	0,83
	73,17	87,77	72,19	94,90	0,77	0,92	0,76
	77,86	93,82	71,04	85,32	0,91	1,10	0,83
TB	75,40	85,16	76,03	87,84	0,86	0,97	0,87
CV (%)					7,64	12,18	8,57
HQC	169,78	84,68		98,48	102,74	103,85	96,46
	173,88	88,15		96,56	99,28	101,73	99,56
	159,40	82,90		91,03	96,04	95,44	98,10
	171,05	87,08		97,90	98,08	99,42	97,15
	159,38	83,83		98,47	101,07	101,42	96,89
	168,78	86,74		96,58	99,36	100,20	97,22
TB	167,05	85,57		96,50	99,43	100,34	97,56
CV (%)					3,57	3,07	3,32

Nhận xét: Tỷ số MF_{PLT}/MF_{IS}, MF_{HPL}/MF_{IS} và MF_{NRT}/MF_{IS} ở mức nồng độ LQC và HQC có giá trị CV đều < 15 %. Như vậy, phương pháp phân tích tuy có bị ảnh hưởng bởi nền mẫu nhưng nằm trong giới hạn cho phép nên vẫn đạt yêu cầu về ảnh hưởng của nền mẫu.

3.9. Ảnh hưởng của lượng mẫu tồn dư (Carry over)

Tiến hành thử nghiệm lượng mẫu tồn dư để kiểm tra sự có mặt của chất phân tích từ lần tiêm trước đó (độ nhiễm chéo). Các mẫu được tiêm theo thứ tự sau: mẫu có nồng độ cao nhất (ULOQ) và mẫu trắng, lặp lại 6 lần. Tiêm 6 lần mẫu LLOQ để đánh giá kết quả. Bảng 3.10 trình bày kết quả khảo sát ảnh hưởng của lượng mẫu tồn dư.

Bảng 3.10. Kết quả đánh giá sự ảnh hưởng của lượng mẫu tồn dư (n = 6)

Chất phân tích	Mức nồng độ	Diện tích pic trung bình	Lượng mẫu tồn dư (%)
PLT	LLOQ	144961	0,00
	ULOQ	133182318	
	Mẫu trắng	0	
HPT	LLOQ	24711	0,00
	ULOQ	21265567	
	Mẫu trắng	0	
NRT	LLOQ	99686	0,00
	ULOQ	85249808	
	Mẫu trắng	0	
IS	LLOQ	2558048	0,00

Chất phân tích	Mức nồng độ	Diện tích pic trung bình	Lượng mẫu tồn dư (%)
	ULOQ	2553734	
	Mẫu trắng	0	

Nhận xét: Kết quả ở Bảng 3.10 cho thấy, không có sự ảnh hưởng của mẫu tồn dư đối với PLT, HPL, NRT và IS.

3.10. Hệ số pha loãng

Chuẩn bị 6 mẫu huyết tương giả lập ở nồng độ gấp 2 lần nồng độ HQC, sau đó pha loãng 2 lần bằng huyết tương trắng, xử lý mẫu và tiến hành phân tích. Kết quả phân tích đánh giá sự ảnh hưởng của việc pha loãng với hệ số pha loãng là 2 được trình bày ở Bảng 3.11.

Bảng 3.11. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của sự pha loãng (n = 6)

Mẫu	Nồng độ lý thuyết (ng/mL)			Nồng độ thực tế (ng/mL)			Tỷ lệ thu hồi (%)		
	PLT	HPL	NRT	PLT	HPL	NRT	PLT	HPL	NRT
1				758,37	784,01	140,81	94,81	98,13	87,96
2				733,88	755,51	147,81	91,74	94,56	92,34
3	799,91	769,28	160,08	796,31	848,97	177,16	99,55	106,26	110,67
4				781,01	847,11	178,30	97,64	106,03	111,38
5				791,77	864,47	181,59	98,98	108,20	113,44
6				816,19	835,96	171,47	102,04	104,63	107,12
TB							97,46	102,97	103,82
CV (%)							3,77	5,22	10,47

Nhận xét: Khi được pha loãng 2 lần, tỷ lệ thu hồi PLT, HPL và NRT lần lượt là 97,46 %; 102,97 % và 103,82 % (giới hạn cho phép 85 % - 115%) với giá trị CV của tỷ lệ thu hồi lần lượt là 3,77 %; 5,22 % và 10,47 % (≤ 15 %). Vậy quy trình xử lý mẫu đã xây dựng không bị ảnh hưởng bởi độ pha loãng.

Kết luận: Kết quả thẩm định cho thấy quy trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ bằng kỹ thuật LC-MS/MS với khoảng tuyến tính nồng độ các chất phân tích 1-1000 ng/ml đã được xây dựng và thẩm định đáp ứng các yêu cầu theo hướng dẫn của US-FDA, EMA và ĐDVN V về thẩm định phương pháp phân tích thuốc trong dịch sinh học.

**PHỤ LỤC 15. KẾT QUẢ ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI PHYLLANTHIN,
HYPOPHYLLANTHIN VÀ NIRANTHIN TRONG HUYẾT TƯƠNG THỎ
BẰNG KỸ THUẬT LC-MS/MS**

Tiến hành phân tích mẫu huyết tương thỏ theo quy trình đã được thẩm định (Phụ lục 14). Phân tích được động học dựa trên các dữ liệu của 12 con thỏ.

Kết quả nồng độ các chất phân tích phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin được trình bày ở Bảng 1, Bảng 2 và Bảng 3.

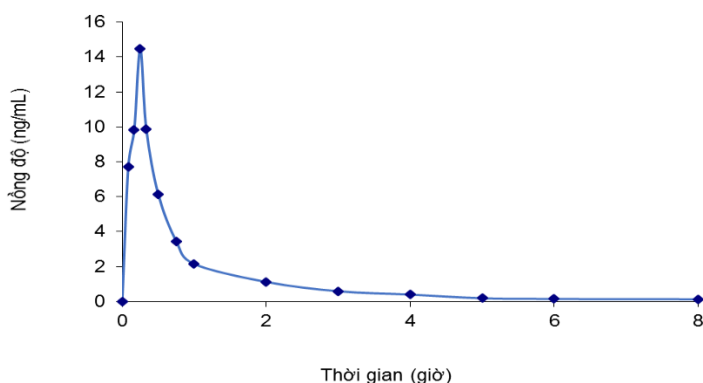
Đồ thị biểu diễn nồng độ chất trung bình theo thời gian được trình bày ở Hình 1, Hình 2 và Hình 3.

Đồ thị biểu diễn nồng độ các chất phân tích phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin theo thời gian của từng cá thể được trình bày ở Hình 4.

Từ nồng độ chất trong huyết tương ở các thời điểm, tính toán các thông số dược động học của từng cá thể và dược động học trung bình, kết quả được trình bày ở Bảng 4.

Bảng 1. Nồng độ phyllanthin trong huyết tương của từng cá thể (ng/mL)

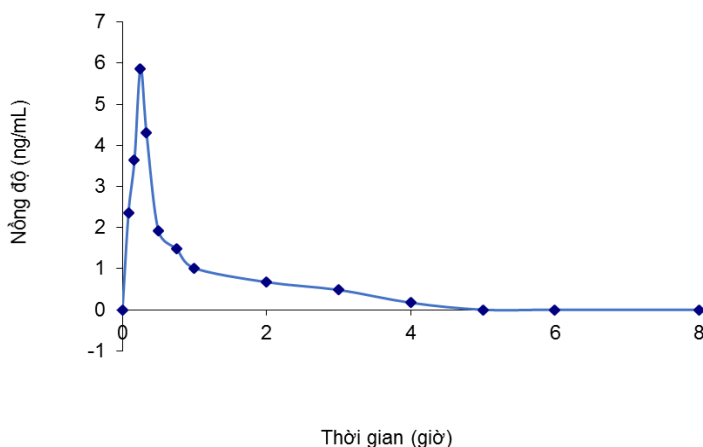
Thỏ	Nồng độ Phyllanthin (PLT) ở từng thời điểm (ng/mL)													
	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇	t ₈	t ₉	t ₁₀	t ₁₁	t ₁₂	t ₁₃
	0'	5'	10'	15'	20'	30'	45'	1 ^h	2 ^h	3 ^h	4 ^h	5 ^h	6 ^h	8 ^h
1	0	9,054	11,575	14,056	7,787	5,447	3,720	2,742	1,054	0,591	0,373	0,261	0,132	0,098
2	0	10,139	8,635	8,399	7,564	6,740	2,775	2,294	1,153	0,500	0,492	0,116	-	-
3	0	8,241	10,255	16,063	11,590	6,652	2,110	1,204	1,138	0,453	0,328	0,227	0,200	0,123
4	0	5,041	9,001	13,701	11,066	6,235	2,553	2,003	1,027	0,789	0,473	0,172	0,132	0,100
5	0	8,294	10,670	14,342	10,860	6,322	4,638	2,474	1,350	0,349	0,271	0,126	0,105	-
6	0	9,588	10,496	14,177	9,792	6,363	4,538	2,880	1,096	0,789	0,234	0,184	0,132	-
7	0	6,208	7,302	16,941	8,575	5,396	2,621	2,334	0,852	0,673	0,467	0,060	-	-
8	0	8,753	10,857	16,780	9,759	6,178	4,557	2,016	1,480	0,520	0,472	0,160	0,121	-
9	0	7,067	9,651	16,650	9,529	6,987	4,932	2,841	0,846	0,534	0,312	0,234	0,108	-
10	0	5,282	9,392	14,730	11,063	7,065	4,074	1,356	0,988	0,734	0,351	0,077	-	-
11	0	5,472	9,713	13,532	9,459	5,108	2,568	2,026	1,177	0,534	0,574	0,224	0,189	0,136
12	0	9,131	10,417	14,383	11,596	5,082	2,241	1,551	1,203	0,513	0,344	0,113	0,080	-
TB	0	7,689	9,830	14,480	9,887	6,131	3,444	2,143	1,114	0,582	0,391	0,163	0,140	0,120
SD	-	1,80	1,15	2,28	1,40	0,71	1,06	0,56	0,18	0,14	0,10	0,07	0,04	0,02



Hình 1. Đồ thị biểu diễn nồng độ phyllanthin trung bình theo thời gian

Bảng 2. Nồng độ hypophyllanthin trong huyết tương của từng cá thể (ng/mL)

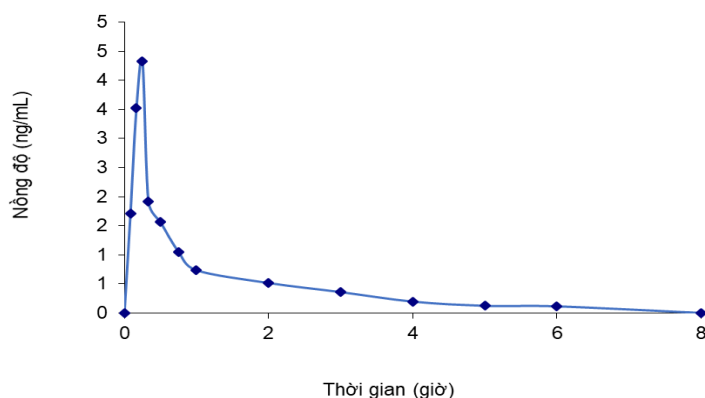
Thỏ	Nồng độ Hypophyllanthin (HPL) ở từng thời điểm (ng/mL)													
	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇	t ₈	t ₉	t ₁₀	t ₁₁	t ₁₂	t ₁₃
	0'	5'	10'	15'	20'	30'	45'	1 ^h	2 ^h	3 ^h	4 ^h	5 ^h	6 ^h	8 ^h
1	0	3,029	4,784	5,183	3,37	2,714	1,709	1,109	0,638	0,509	0,249	-	-	-
2	0	2,334	4,027	6,098	4,426	1,223	1,58	0,997	0,717	0,521	0,196	-	-	-
3	0	2,378	3,027	6,189	3,849	1,753	1,243	1,098	0,603	0,435	0,188	0,095	-	-
4	0	2,045	4,241	5,055	4,845	1,8	1,178	0,748	0,512	0,338	0,271	0,071	-	-
5	0	1,318	2,623	4,073	4,58	1,815	1,482	1,094	0,552	0,344	0,093	-	-	-
6	0	2,252	2,834	4,935	3,544	2,491	1,668	0,813	0,694	0,525	0,196	0,084	-	-
7	0	2,442	3,462	7,131	4,31	1,678	1,254	1,159	0,798	0,38	0,142	0,073	-	-
8	0	2,043	4,655	6,14	4,954	1,705	1,574	0,922	0,5	0,356	0,08	0,042	-	-
9	0	3,445	3,381	5,872	4,367	1,183	1,084	0,985	0,74	0,407	0,229	0,089	-	-
10	0	3,156	3,662	6,503	3,961	2,365	1,687	0,904	0,687	0,611	0,227	0,098	-	-
11	0	1,871	3,321	7,007	4,666	2,277	1,973	1,161	0,86	0,77	0,155	0,021	-	-
12	0	1,835	3,719	6,265	4,697	1,928	1,32	1,168	0,76	0,582	0,176	0,052	-	-
TB	0	2,346	3,645	5,871	4,297	1,911	1,479	1,013	0,672	0,482	0,184	0,069	-	-
SD	-	0,61	0,68	0,90	0,51	0,47	0,27	0,14	0,11	0,13	0,06	0,03	-	-



Hình 2. Đồ thị biểu diễn nồng độ hypophyllanthin trung bình theo thời gian

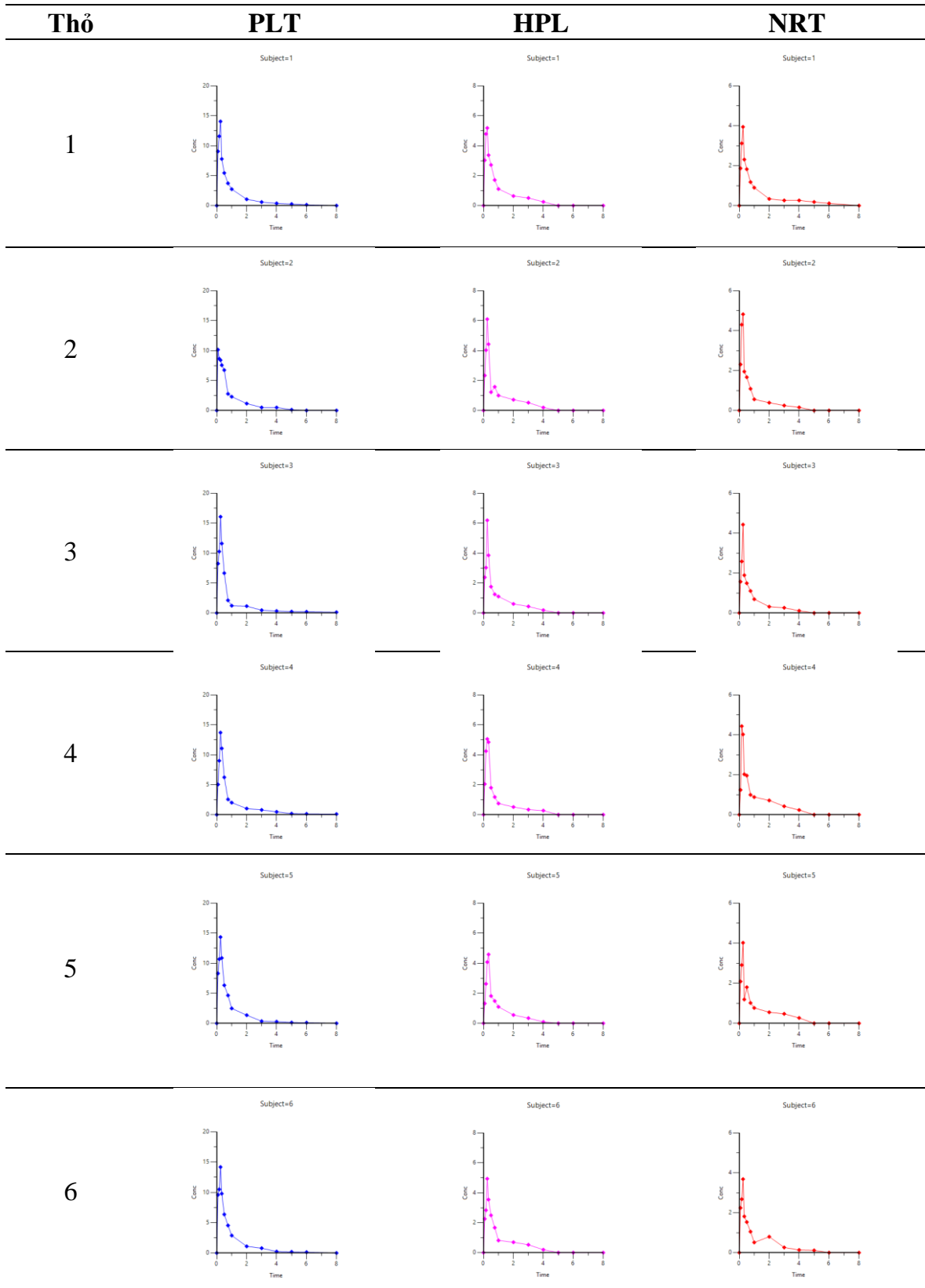
Bảng 3. Nồng độ niranthin trong huyết tương của từng cá thể (ng/mL)

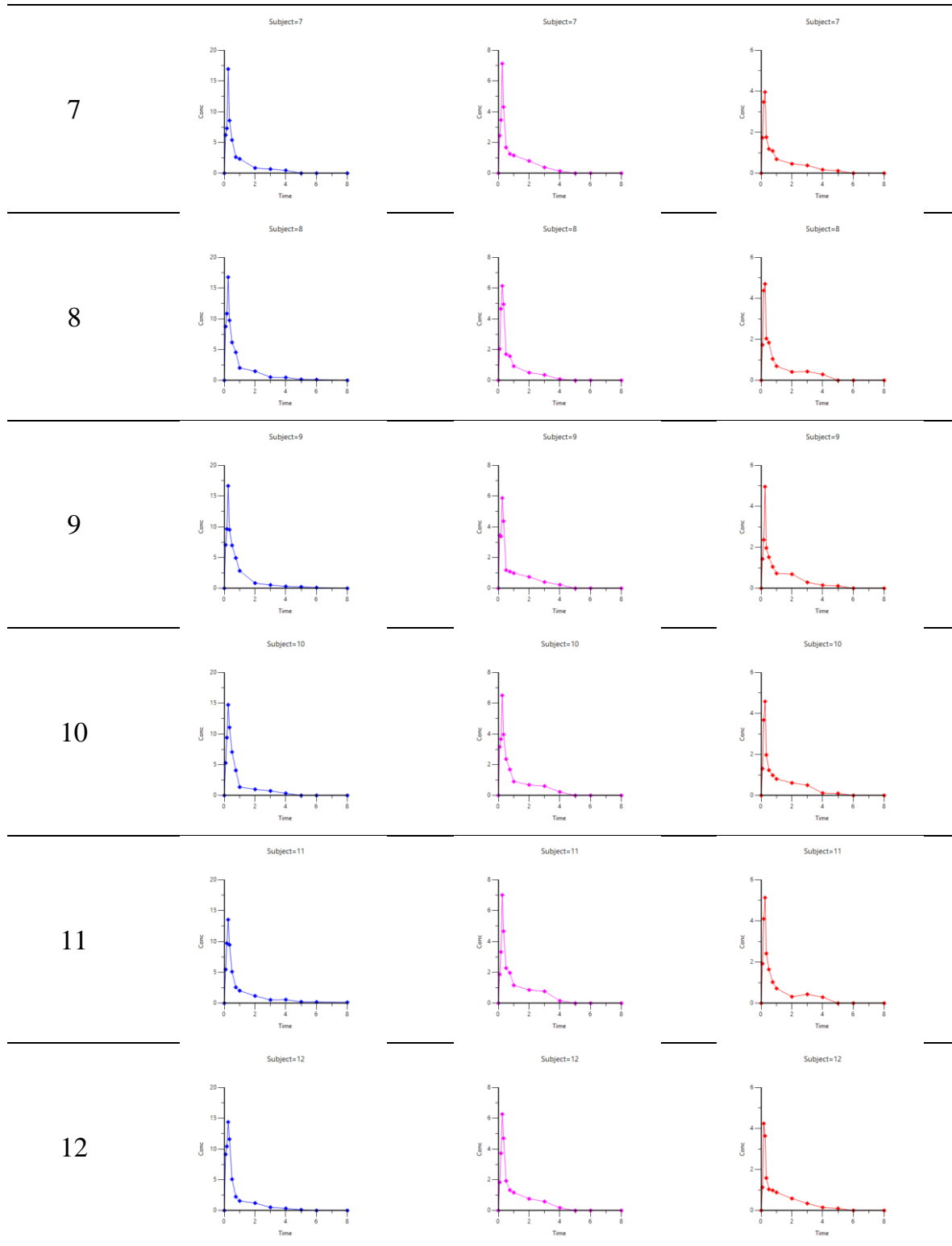
Thỏ	Nồng độ Niranthin (NRT) ở từng thời điểm (ng/mL)													
	t ₀	t ₁	t ₂	t ₃	t ₄	t ₅	t ₆	t ₇	t ₈	t ₉	t ₁₀	t ₁₁	t ₁₂	t ₁₃
	0'	5'	10'	15'	20'	30'	45'	1 ^h	2 ^h	3 ^h	4 ^h	5 ^h	6 ^h	8 ^h
1	0	1,865	3,118	3,942	2,31	1,824	1,179	0,899	0,335	0,259	0,26	0,181	0,112	-
2	0	2,306	4,298	4,819	1,949	1,666	1,085	0,557	0,387	0,247	0,154	0,092	-	-
3	0	1,567	2,58	4,426	1,889	1,489	1,101	0,69	0,315	0,26	0,109	0,082	-	-
4	0	1,238	4,432	4,021	2,024	1,957	0,994	0,881	0,713	0,421	0,232	0,051	-	-
5	0	2,087	2,908	4,019	1,191	1,801	1,016	0,767	0,552	0,471	0,268	0,092	-	-
6	0	2,242	2,677	3,682	1,814	1,531	1,051	0,511	0,796	0,259	0,133	0,114	-	-
7	0	1,732	3,474	3,96	1,761	1,184	1,09	0,685	0,46	0,378	0,174	0,118	-	-
8	0	1,734	4,379	4,705	2,042	1,841	1,048	0,694	0,412	0,433	0,292	0,09	-	-
9	0	1,433	2,367	4,959	1,967	1,523	1,051	0,725	0,689	0,293	0,152	0,118	-	-
10	0	1,308	3,68	4,581	1,975	1,236	0,983	0,804	0,61	0,500	0,115	0,098	-	-
11	0	1,923	4,101	5,129	2,415	1,643	1,026	0,717	0,317	0,435	0,292	0,090	-	-
12	0	1,13	4,242	3,638	1,584	1,036	0,982	0,882	0,585	0,342	0,149	0,100	-	-
TB	0	1,714	3,521	4,323	1,91	1,561	1,051	0,734	0,514	0,358	0,194	0,102	0,112	-
SD	-	0,39	0,77	0,51	0,32	0,29	0,06	0,12	0,17	0,09	0,07	0,03	-	-

**Hình 3.** Đồ thị biểu diễn nồng độ niranthin trung bình theo thời gian**Bảng 4.** Các thông số dược động học trung bình của các chất

Thông số	Phyllanthin (Trung bình ± SD)	Hypophyllanthin (Trung bình ± SD)	Niranthin (Trung bình ± SD)
T _{max} (giờ)	0,24	0,26	0,24
C _{max} (ng/mL)	14,625 ± 1,88	5,913 ± 0,82	4,408 ± 0,45
AUC _{0-t} (ng.giờ/mL)	9,694 ± 0,71	4,172 ± 0,39	3,135 ± 0,24
AUC _{0-∞} (ng.giờ/mL)	10,150 ± 0,61	4,503 ± 0,42	3,497 ± 0,38
T _{1/2} (giờ)	1,78	1,17	1,41
AUC _{0-t} /AUC _{0-∞} (%)	95,51	92,65	89,66

Đồ thị biểu diễn nồng độ các chất của từng cá thể theo thời gian:





Hình 4. Đồ thị biểu diễn nồng độ phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin theo thời gian của từng cá thể