

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ 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)**

Chuyên ngành: Kiểm nghiệm thuốc và độc chất

Mã số: 62720410

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Thành phố Hồ Chí Minh, năm 2021

Công trình được hoàn thành tại:

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Người hướng dẫn khoa học:

PGS.TS. NGUYỄN NGỌC VINH

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường
hợp tại Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP. Hồ Chí Minh
- Thư viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

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 cứu 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.

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Diệp hạ châu đắng (*Phyllanthus amarus* Schum. et Thonn., Euphorbiaceae) (DHCD) là một trong những dược liệu được sử dụng rất phổ biến với tác dụng chính là cải thiện chức năng gan, đặc biệt là viêm gan B. Hiện nay, trên thị trường nhiều sản phẩm từ DHCD, chủ yếu được bào chế từ nguyên liệu là cao toàn phần. 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 liệu 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 DHCD không chỉ do phyllanthin mà còn có hypophyllanthin, niranthin. Các chất này có vai trò hết sức quan trọng trong tác dụng bảo vệ gan, kháng viêm, chống ung thư.

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 (CDC), cao chuẩn đối chiếu,... Mặt khác, các chất chuẩn đối chiếu chưa sẵn có và giá thành 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 DHCD 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 DHCD 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 DHCD 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.).

2. Tính cấp thiết của đề tài

DHCD là loài mọc tự nhiên rộng rãi khắp nơi, cũng có thể trồng ở quy mô lớn và có tác dụng rất tốt trong điều trị các bệnh lý về gan. DHCD đã được sử dụng rộng rãi từ lâu, các sản phẩm rất đa dạng, phong phú làm cho thầy thuốc cũng như người sử dụng rất vui mừng, nhưng cũng hết sức lo ngại về giá trị và chất lượng của sản phẩm do chưa có quy định của cơ quan nhà nước về tiêu chuẩn chất lượng của sản phẩm. Năm 2017, ĐĐVN V có chuyên luận về dược liệu DHCD, nhưng cũng chưa có quy định về chất lượng chế phẩm từ DHCD cũng như tiêu chuẩn chất lượng cho chế phẩm cao từ dược liệu. Từ những lý do trên, đề tài được thực hiện để thiết lập các CDC là những chất có hoạt tính sinh học phân lập được để phục vụ cho công tác kiểm nghiệm dược liệu và các chế phẩm từ dược liệu; đề xuất tiêu chuẩn chất lượng của cao chuẩn hóa DHCD và cũng là cơ sở cho việc quy định chất lượng các chế phẩm từ dược liệu này; khảo sát nghiên cứu đánh giá một số thông số dược động học của cao chuẩn hóa điều chế từ DHCD.

3. Những đóng góp mới của luận án

Về mặt hóa học chiết xuất, phân lập, tinh chế: Lần đầu tiên, phân lập được đồng thời 5 hợp chất lignan chính trong DHCD *Phyllanthus amarus* gồm phyllanthin (PLT), hypophyllanthin (HPL), niranthin (NRT), nirtetralin (NTT) và phyltetralin (PTT) 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.

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.

Về mặt điều chế và tiêu chuẩn hóa cao khô DHCD: Đã sử dụng phương pháp HPLC-PDA để định tính và định lượng đồng thời 4 lignan: phyllanthin, hypophyllanthin, niranthin và nirtetralin trong DHCD 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 DHCD.

Về mặt đánh giá một số thông số dược động học của cao chuẩn hóa điều chế từ DHCD: Quy trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thử 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 DHCD 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.

4. Bố cục luận án

Luận án gồm 149 trang: Mở đầu 2 trang, tổng quan 31 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 28 trang, kết quả nghiên cứu 55 trang, bàn

luận 28 trang, điểm mới của luận án 1 trang, kết luận 3 trang và kiến nghị 1 trang. Luận án có 72 bảng, 54 hình, 9 sơ đồ, 105 tài liệu tham khảo gồm 10 tài liệu tiếng Việt và 95 tài liệu tiếng Anh, 15 phụ lục thể hiện các kết quả thực nghiệm.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Trình bày những vấn đề sau:

- 1.1.** Tổng quan Diệp hạ châu đắng
- 1.2.** Các phương pháp nghiên cứu về chiết xuất, phân lập, tinh chế hợp chất lignan từ Diệp hạ châu đắng
- 1.3.** Các phương pháp định lượng các hợp chất lignan trong Diệp hạ châu
- 1.4.** Cao đối chiếu
- 1.5.** Tổng quan về đánh giá sinh khả dụng của thuốc

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu: 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.

2.1.2. Chất đối chiếu: phyllanthin, diazepam, carbamazepin được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh. Cao chuẩn *Phyllanthus amarus* (số lô F0K140, 1 g) của USP.

2.1.3. Hóa chất và dung môi: Đều đạt độ tinh khiết dùng cho phân tích và sắc ký.

2.1.4. Động vật thử nghiệm: Thỏ thí nghiệm khỏe mạnh, trọng lượng $2 \pm 0,5$ kg được cung cấp bởi Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh.

2.1.5. Trang thiết bị, vật tư sử dụng nghiên cứu: 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 đạt tiêu chuẩn GLP-WHO và ISO/IEC 17025 và Công ty cổ phần BV Pharma đạt tiêu chuẩn GMP-WHO.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Chiết xuất, phân lập, tinh chế, 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*: theo ĐĐVN IV và định danh dược liệu bằng phương pháp sinh học phân tử DNA.

2.2.1.2. *Chiết xuất cao toàn phần*: Khảo sát trên 6 loại dung môi: dicloromethan, cloroform, aceton, ethyl acetat, ethanol 96 %, ethanol 70 % bằng phương pháp ngâm ở nhiệt độ phòng để chọn ra dung môi dùng chiết có hiệu quả 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. Thực hiện với cột thủy tinh có lưới xốp G-3, chứa silica gel cỡ hạt 40-60 μm (Davisil), được nhồi vào cột với dung môi là n-hexan.

2.2.1.4. *Phân lập hợp chất từ cao phân đoạn*: Sử dụng phương pháp kết tinh phân đoạn từ các phân đoạn chỉ chứa chủ yếu một vết; phương pháp sắc ký cột hoặc sắc ký điều chế từ các phân đoạn chứa 2 hoặc nhiều vết.

2.2.1.5. *Kiểm tra độ tinh khiết của chất phân lập được*: bằng phương pháp SKLM, HPLC/PDA, DSC.

2.2.1.6. *Xác định cấu trúc của chất phân lập được*: bằng các kỹ thuật phổ nghiệm: UV, IR, MS, NMR (^{13}C -NMR, ^1H -NMR, DEPT, HSQC, HMBC, COSY) đối chiếu với các dữ liệu phổ đã công bố.

2.2.2. Xác định chất lượng và thiết lập chất đối chiếu

2.2.2.1. *Xây dựng qui trình xác định độ tinh khiết của nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu*: bằng phương pháp HPLC quy về 100 % diện tích pic trên sắc ký đồ và thẩm định theo hướng dẫn ICH.

2.2.2.2. *Thiết lập chất đối chiếu*: Đánh giá thiết lập CDC theo tài liệu hướng dẫn của WHO và ASEAN. Đánh giá độ đồng nhất lọ. Đánh giá so sánh liên phòng tại ba phòng thí nghiệm (PTN) độc lập đạt tiêu chuẩn

GLP và ISO 17025. Xác định giá trị ấn định - giá trị công bố theo hướng dẫn của ISO 13528.

2.2.3. Điều chế và tiêu chuẩn hóa cao diệp hạ châu đắng

2.2.3.1. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan trong Diệp hạ châu đắng bằng phương pháp HPLC: Tiến hành theo quy trình USP, khảo sát điều kiện sắc ký thích hợp và khảo sát điều kiện chiết kiệt các hoạt chất từ dược liệu. Sau đó, tiến hành thẩm định quy trình định lượng theo hướng dẫn ICH và ứng dụng quy trình để định lượng đồng thời 4 hợp chất lignan trong dược liệu và cao chiết từ DHCĐ.

2.2.3.2. Điều chế cao chuẩn hóa Diệp hạ châu đắng

Khảo sát điều kiện thích hợp cho quá trình chiết cao DHCĐ tiến hành 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 DHCĐ 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 PLT và HPL (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 đắng: Xây dựng dự thảo tiêu chuẩn chất lượng cao khô DHCĐ bao gồm các chỉ tiêu sau: Tính chất, định tính, mất khối lượng do làm khô, tro toàn phần, giới hạn kim loại nặng, định lượng, giới hạn nhiễm khuẩn.

2.2.3.4. Ứng dụng điều chế cao giàu lignan Diệp hạ châu đẳng dùng làm cao đối chiếu: Tiến hành khảo sát điều chế cao giàu lignan có chất lượng tương đương với cao chuẩn USP để dùng làm cao đối chiếu.

2.2.3.5. Ứng dụng định lượng các lignan trong Diệp hạ châu đẳng: Thực hiện trên 3 mẫu dược liệu được thu hái ở 3 tỉnh và định lượng các lignan trong các mẫu cao khô dược liệu.

2.2.4. Đánh giá một số thông số dược động học của cao chuẩn hóa điều chế từ diệp hạ châu đẳng

2.2.4.1. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời phyllanthin, hypophyllanthin và niranthin trong huyết tương thỏ: Khảo sát: điều kiện khối phổ, chất chuẩn nội, điều kiện sắc ký, phương pháp xử lý mẫu, xác định khoảng nồng độ định lượng và tiến hành thẩm định theo hướng dẫn của US-FDA, EMA và ĐĐVN V.

2.2.4.2. Đánh giá một số thông số dược động học của cao chuẩn hóa điều chế từ Diệp hạ châu đẳng: Thiết kế nghiên cứu theo mô hình ngẫu nhiên, đơn liều, một thuốc trong tình trạng đói. Cỡ mẫu nghiên cứu trên 12 con thỏ. Chọn liều thử nghiệm: 2 mg phyllanthin/kg cân nặng. 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. Ly trích huyết tương và bảo quản ở dưới -20 °C cho đến khi phân tích. Xác định các thông số dược động học C_{max} , AUC_{0-t} , $AUC_{0-\infty}$, T_{max} , K_e , $T_{1/2}$ bằng phần mềm WinNonLin 7.2.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Chiết xuất, phân lập, tinh chế, xác định cấu trúc, độ tinh khiết của các chất phân lập được

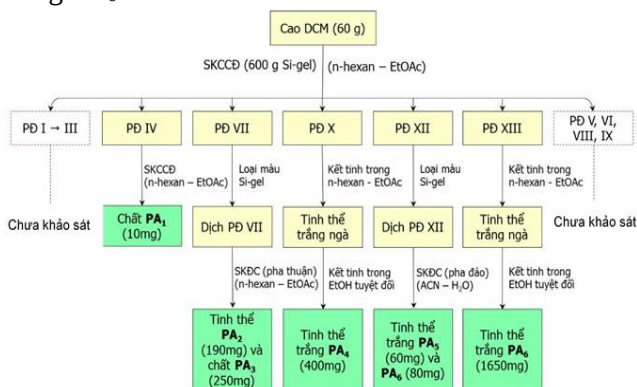
3.1.1. Kiểm tra chất lượng dược liệu nghiên cứu: Dược liệu nghiên cứu đạt các chỉ tiêu chất lượng theo ĐĐVN IV và kết quả DNA đã định

danh các mẫu được liệu DHCD 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: So sánh khả năng tách các phân đoạn của cột sắc ký ở các cao được chiết xuất từ 6 loại dung môi, kết quả chọn dicloromethan (DCM) là dung môi chiết cao toàn phần do có nhiều phân đoạn được tách nhau rõ ràng nhất. Thực hiện chiết xuất 1 kg bột DHCD với DCM bằng cách ngâm lạnh thu được 60 g cao 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). Chọn 5 phân đoạn IV, VII, X, XII, XIII có một 1-2 vết để tiếp tục nghiên cứu.

3.1.4. Phân lập hợp chất từ cao phân đoạn: Tiến hành phân lập các phân đoạn theo sơ đồ 3.5., thu được kết quả: 10 mg chất PA₁ (số lượng ít không khảo sát tiết theo); 190 mg PA₂, 250 mg PA₃, 400 mg PA₄, 60 mg PA₅, 1730 mg PA₆.



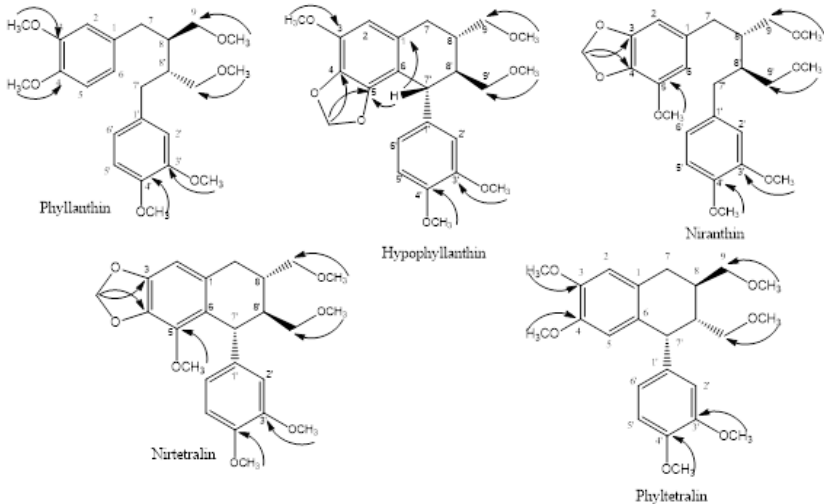
Sơ đồ 3.5. Sơ đồ phân lập và tinh chế các phân đoạn của cao DCM

3.1.5. Kiểm tra độ tinh khiết của chất phân lập được: 6 chất phân lập (PA₁, PA₂, PA₃, PA₄, PA₅ và PA₆) được kiểm tra độ tinh khiết bằng phương pháp SKLM, HPLC-PDA và DSC.

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

Mẫu	HPLC	DSC
	% diện tích pic	Độ tinh khiết (%)
PA ₅	97,07	-
PA ₆	99,75	97,12
PA ₄	98,01	97,12
PA ₁	89,24	89,24
PA ₂	99,22	99,01
PA ₃	97,76	97,01

3.1.6. Xác định cấu trúc của chất phân lập được: bằng các kỹ thuật phổ nghiệm: UV, IR, MS, NMR (^{13}C -NMR, ^1H -NMR, DEPT, HSQC, HMBC, COSY) đối chiếu với các dữ liệu phổ đã công bố, kết quả cho thấy hợp chất PA₂ phù hợp với chất niranthin, hợp chất PA₃ phù hợp với chất nirtetralin, hợp chất PA₄ phù hợp với chất hypophyllanthin, hợp chất PA₅ phù hợp với chất phylltetralin, hợp chất PA₆ $\equiv$ PA₇ phù hợp với chất 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 CĐC gồm: phyllanthin (PLT-1500 mg); hypophyllanthin (HPL-

300 mg) và niranthin (NRT-180 mg), nirtetralin (NTT-50 mg). Do hợp chất PLT đã được thiết lập CDC [3] nên trong luận án này chỉ thiết lập CDC đối với HPL và NRT. Đối với NTT được xác định độ tinh khiết để ứng dụng định lượng các lignan trong DHCD.

3.2.1. Xây dựng qui trình xác định độ tinh khiết của nguyên liệu thiết lập CDC: bằng phương pháp HPLC quy về 100 % diện tích pic trên sắc ký đồ và thẩm định theo hướng dẫn ICH.

3.2.2. Thiết lập chất đối chiếu: Đánh giá thiết lập chất đối chiếu hypophyllanthin và niranthin theo tài liệu hướng dẫn của WHO và ASEAN.

Thiết lập chất đối chiếu hypophyllanthin: 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 $\mu = 0,189\%$.

Thiết lập chất đối chiếu niranthin: 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 $\mu = 0,01\%$.

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

Tiến hành xác định độ tinh khiết nirtetralin theo phương pháp HPLC đã xây dựng. Độ tinh khiết nirtetralin là 97,02%.

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 DHCD bằng phương pháp HPLC

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.

Kết quả thẩm định cho thấy phương pháp đạt tất cả các yêu cầu về tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác và độ đúng theo qui định của ICH.

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: Điều kiện thích hợp chiết xuất thực 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.

3.3.2.2. 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. *Nhận xét:* Khi chiết bằng nước thì hàm lượng PLT và HPL trong cao thấp nhất. Chiết bằng 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: 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. *Nhận xét:* Khi chiết bằng nước thì hàm lượng hoạt chất PLT và HPL trong cao là thấp nhất. Khi chiết bằng 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

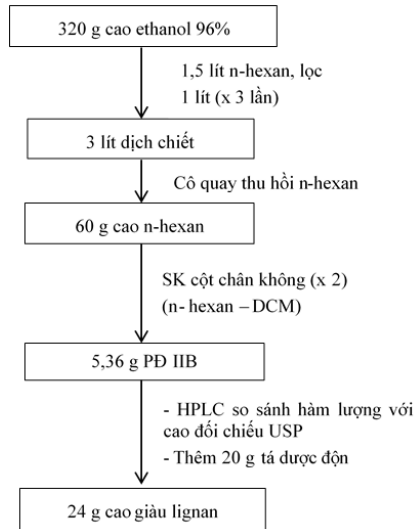
ethanol 96% hàm lượng hoạt chất trong cao giảm dần. Vì thế, ethanol 30% được chọn làm dung môi chiết xuất dược liệu ở quy mô pilot.

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

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		
Sắc ký lớp mỏng	Diệp hạ châu đắng	Đúng
HPLC	(<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		
Phyllanthin	Hàm lượng phyllanthin ($C_{24}H_{34}O_6$) không ít hơn 0,8 % tính trên chế phẩm khô	Đạt (1,83 %)
Hypophyllanthin	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</i> spp.	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



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

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

Mẫu dược liệu	PLT (%)	HPL (%)	NRT (%)	NTT (%)
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

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

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

Mẫu thử	PLT (%)	HPL (%)	NRT (%)	NTT (%)
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

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

Điều kiện khối phổ tối ưu: Kiểu ion hóa ESI (+). Tốc độ dòng khí phun: 3 L/phút. Tốc độ dòng khí khô: 15 L/phút. Nhiệt độ hóa hơi dung môi: 250 °C. Nhiệt độ buồng ion hóa: 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: 100 ms. Thể phân mảnh như sau:

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 thích hợp: 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.

Phương pháp xử lý mẫu: Lấy chính xác 200 µL huyết tương thử 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 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 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.

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

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					

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 HPL, 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. 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.

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

Thông số	Phyllanthin (TB ± SD)	Hypophyllanthin (TB ± SD)	Niranthin (TB ± 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

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

Việc thăm dò chiết cao toàn phần với các loại dung môi có độ phân cực tăng dần khảo sát là DCM, cloroform, acetone, ethyl acetat, ethanol 96% và ethanol 70%, kết quả DCM được lựa chọn. Khi khảo sát bằng SKLM, cao DCM 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 DCM có nhiều vết phân đoạn hơn và tách nhau rõ ràng so với cao ethyl acetat và cao ethanol 96 %. 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 PLT và HPL chiết được cao hơn hai dung môi ethyl acetat và ethanol 96 %. Việc sử dụng DCM từ 1000 g dược liệu, thu được 60 g cao DCM 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.

Việc phân lập được tiến hành dựa trên sắc ký cột để tách các phân đoạn và các chất tinh khiết. Tiếp theo công trình nghiên cứu của nhóm tác giả Lữ Thị Kim Chi, Nguyễn Ngọc Vinh, 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. 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.

4.2. Xác định chất lượng và thiết lập chất đối chiếu

PLT và HPL được phân lập sau khi triển khai qua cột và kết tinh trong ethanol tuyệt đối. NRT, NTT và PTT 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 CĐC. Dựa vào khối lượng chất tinh khiết phân lập được, HPL và NRT được thiết lập dùng làm CĐC và đánh giá chất lượng so sánh liên phòng bởi 3 PTN 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 PTN để có thể dùng làm CĐC trong phạm vi nội dung nghiên cứu của đề tài cho phần khảo sát qui trình định lượng đồng thời bốn lignan trong DHCD. Lượng PTT 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 HPL và NRT dùng làm CĐC.

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 DHCD bằng phương pháp HPLC

Ngoài PLT, HPL thì NRT và NTT cũng là thành phần lignan chính trong cây DHCD. Do đó, tiến hành định tính, định lượng thêm NRT và NTT cùng với PLT, HPL. Tiến hành bằng phương pháp HPLC-PDA để định tính và định lượng đồng thời 4 lignan PLT, HPL, NRT và NTT dựa vào các chất đối chiếu của mỗi lignan. 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 (56 : 44), tốc độ dòng 1 mL/phút. Với điều kiện sắc ký này, có 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.

4.3.2. Điều chế cao khô Diệp hạ châu đắng

Mục đích của đề tài là nghiên cứu một cách hệ thống điều chế cao chuẩn hóa DHCD 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. 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. 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 DHCD 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 đắng

ĐĐVN V chỉ có chuyên luận dược liệu DHCD và cao đặc DHCD. Trong đó, chỉ tiêu định tính dùng dược liệu đối chiếu và xác định một chất điểm chỉ PLT bằng SKLM, chỉ tiêu định lượng chỉ xác định hàm lượng PLT dựa vào CDC PLT bằng HPLC. Việc xây dựng chỉ tiêu định tính và định lượng dựa vào bản chất của các chất có hoạt tính sinh học chính trong DHCD là không chỉ đối với PLT và HPL, mà còn có NRT và NTT. NRT và NTT 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 PLT và HPL 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.

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

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. 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 PTN, khảo sát dung môi chiết theo hướng làm giàu nhóm lignan, loại tạp nhiều nhất. Từ kết quả SKLM và HPLC, 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 PLT và HPL cao hơn nhiều so với cao chuẩn USP. Vì vậy, tiến hành điều chỉnh hàm lượng hoạt chất (theo HPL) 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 nhiên 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.

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

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

Đề tài xây dựng quy trình định lượng đồng thời PLT, HPL và NRT trong huyết tương thỏ bằng phương pháp LC-MS/MS dựa theo các tài liệu công bố và thẩm định phương pháp theo hướng dẫn của US-FDA, EMA và ĐĐVN V. Hiện nay, các công trình nghiên cứu đã công bố chỉ đề cập định lượng các lignan trong huyết tương chuột, cho đến nay, vẫn chưa có nghiên cứu nào xác định nồng độ của lignan trong huyết tương thỏ.

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

Một số công trình đã nghiên cứu về sinh khả dụng của các hợp chất lignan 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 DHCD. 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 DHCD hấp thu kém, điều này hoàn toàn phù hợp với các tài liệu đã công bố. Đề tài chỉ dừng lại bước đầu ở việc xác định các thông số dược động học của PLT, HPL và NRT sau khi thỏ uống cao khô DHCD 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 thu 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.

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 thô 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 ĐBVN 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.