

**SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ TP-HCM
TRUNG TÂM THÔNG TIN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ**



BÁO CÁO PHÂN TÍCH XU HƯỚNG CÔNG NGHỆ

Chuyên đề:

ĐIỀU CHẾ VÀ THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN TỪ THIÊN NHIÊN ĐỂ PHỤC VỤ CÔNG TÁC NGHIÊN CỨU, KIỂM NGHIỆM VÀ TIÊU CHUẨN HÓA DƯỢC LIỆU, ĐÔNG DƯỢC



Biên soạn: Trung tâm Thông tin Khoa học và Công nghệ TP. HCM

Với sự cộng tác của: GS.TS. Nguyễn Minh Đức

Bộ môn Dược liệu Đại học Y dược TP.HCM

TP.Hồ Chí Minh, 09/2013

MỤC LỤC

I. TỔNG QUAN VỀ CHẤT CHUẨN	4
1. Giới thiệu về chất chuẩn	4
2. Phân loại chất chuẩn đối chiếu.....	4
2.1. Chất chuẩn dược điển	4
2.2. Các loại chuẩn khác.....	6
3. Sử dụng chất chuẩn	6
4. Thiết lập chất chuẩn	7
II. PHÂN TÍCH XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ VÀ THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN ĐỂ PHỤC VỤ CÔNG TÁC NGHIÊN CỨU VÀ KIỂM NGHIỆM TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ	9
1. Tình hình đăng ký sáng chế về nghiên cứu điều chế chất chuẩn theo thời gian.....	9
2. Các quốc gia tập trung sáng chế đăng ký về chất chuẩn để phục vụ công tác nghiên cứu và kiểm nghiệm.....	10
3. Các hướng nghiên cứu được quan tâm nhiều về chất chuẩn theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC	12
4. Nhận xét:.....	15
III. GIỚI THIỆU MỘT SỐ CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN ĐIỀU CHẾ VÀ THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN TỪ THIÊN NHIÊN	15
1. Giới thiệu một số sáng chế về điều chế và thiết lập chất chuẩn từ thiên nhiên	15
2. Tình hình điều chế và thiết lập chất chuẩn thiên nhiên ở Việt Nam.....	18
3. Kết quả nghiên cứu điều chế và thiết lập chất chuẩn thiên nhiên tại Đại học Y-Dược TP. HCM	27
3.1. Nội dung	27
3.2. Nguyên liệu điều chế.....	27
3.3. Chất chuẩn đối chiếu	27
3.4. Phương pháp nghiên cứu chung	28
3.5. Đóng gói	30
3.6. Thảm định.....	30
3.7. Điều chế Ginsenosid-Rb ₁	32
3.7.1. Điều chế	32
3.7.2. Định tính và xác định cấu trúc.....	32
3.7.3. Đánh giá Ginsenosid-Rg ₁ điều chế.....	36

3.7.4. <i>Đóng lọ và đánh giá đồng nhất lọ</i>	37
3.7.5. <i>Đánh giá liên phòng thí nghiệm</i>	38
3.7.6. <i>Xác định giá trị ấn định</i>	38
3.7.7. <i>Công bố chất chuẩn, dán nhãn</i>	38
3.7.8. <i>Theo dõi độ ổn định</i>	39
3.8. Kết luận	40
TÀI LIỆU THAM KHẢO	44

ĐIỀU CHẾ VÀ THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN TỪ THIÊN NHIÊN ĐỂ PHỤC VỤ CÔNG TÁC NGHIÊN CỨU, KIỂM NGHIỆM VÀ TIÊU CHUẨN HÓA DƯỢC LIỆU, ĐÔNG DƯỢC

I. TỔNG QUAN VỀ CHẤT CHUẨN

1. Giới thiệu về chất chuẩn

Chất chuẩn (standard substances) hay chất chuẩn đối chiếu (reference standards) là chất cần thiết để đánh giá các nguyên liệu, bán thành phẩm, thành phẩm ... theo các quy trình đã xác định nhằm đảm bảo kết quả phân tích đạt độ chính xác, đáng tin cậy.

Chất chuẩn đối chiếu là một phần quan trọng của đo lường và thiết lập tính khả thi trong so sánh (comparability) và có thể truy nguyên được (traceability).

Theo Dược điển Việt Nam IV, “Chất đối chiếu là chất đồng nhất đã được xác định là đúng để dùng trong các phép thử đã được quy định về hóa học, vật lý và sinh học. Trong các phép thử đó các tính chất của chất đối chiếu được so sánh với các tính chất của chất cần thử”.

Theo định nghĩa FDA: “Chất chuẩn đối chiếu (reference standards) là một lô hay mẻ của hợp chất làm thuốc được điều chế đặc biệt bằng cách tổng hợp độc lập hoặc bằng cách tinh chế bổ sung của nguyên liệu điều chế và được chứng minh bằng một loạt các thử nghiệm phân tích sâu rộng để xác nhận nó là nguyên liệu xác thực có độ tinh khiết tối đa, có thể đạt được một cách hợp lý. Nó thường được dùng cho việc phân giải cấu trúc và chất làm chuẩn cho các chất chuẩn làm việc (working standards).

2. Phân loại chất chuẩn đối chiếu

2.1. Chất chuẩn dược điển

Đặc trưng của chất chuẩn dược điển được đề cập trong phần giới thiệu của ISO Guide 34. Chúng được thiết lập và phân phối bởi HĐDDiển theo các nguyên tắc chung của ISO này.

(i) Chuẩn Dược điển Quốc tế:

Tổ chức y tế thế giới (WHO), cơ quan đặc biệt của Liên Hiệp Quốc chịu trách nhiệm chủ yếu về các vấn đề sức khỏe của cộng đồng quốc tế, ban hành Dược điển quốc tế với sự giúp đỡ của các tập đoàn đa quốc gia, họ cũng đã thiết lập các chất chuẩn quốc tế về sinh học và dược phẩm. Chuẩn Dược điển quốc tế là chuẩn gốc (primary) được thiết lập theo kiến nghị của ủy ban chuyên gia về kỹ thuật cho các chế phẩm dược phẩm của WHO. Chúng được sử dụng chủ yếu trong các thử nghiệm, phân tích hóa học và vật lý; được mô tả chi tiết trong Dược điển quốc tế hoặc các chuyên luận dự thảo. Chúng có thể dùng để hiệu chuẩn các chuẩn thứ cấp.

(ii) Chuẩn Dược điển Châu Âu:

Tổng cục Chất lượng Thuốc và Chăm sóc Sức khỏe Châu Âu EDQM (European Directorate for the Quality of Medicines and Health Care) cung cấp các chất chuẩn hóa học và sinh học cũng như phổ chuẩn trong các phép phân tích và kiểm tra. Các phép phân tích và kiểm tra này được thực hiện phù hợp với các phương pháp được ghi trong Dược điển châu Âu. Các chất chuẩn được chọn lọc đặc biệt và được thẩm định bởi Hội đồng Dược điển châu Âu. Chúng có thể được sử dụng cho các nghiên cứu cộng tác quốc tế.

(iii) Chuẩn Dược điển Anh:

Chuẩn Dược điển Anh được sản xuất để hỗ trợ cho các chuyên luận của Dược điển Anh (BP). Chúng chỉ được sử dụng cho các phép phân tích hóa học và thử nghiệm được mô tả trong Dược điển Anh, không thích hợp cho các mục đích khác như dùng cho người hay động vật. Chất chuẩn được đóng trong các đơn vị đóng gói đủ để thực hiện quy trình thử nghiệm.

Các chuẩn này được thiết lập bởi các phòng thí nghiệm phù hợp với quy định, được thẩm định và cho phép sử dụng bởi các chuyên gia của Hội đồng Dược điển Anh.

(iv) Chuẩn Dược điển Mỹ:

Chuẩn USP dựa vào các chuyên luận có tính chất pháp lý trong USP và NF, các quy trình và tiêu chuẩn của Dược điển này bị quản lý bởi cơ quan quản lý thuốc và thực phẩm Hoa Kỳ (FDA). Chúng được công nhận ở Mỹ và những nước khác. Ngành công nghiệp dược phẩm và các phòng thí nghiệm FDA tham gia vào sự phát triển các chất chuẩn này thông qua các phòng thí nghiệm hợp tác.

Các chất chuẩn USP được định nghĩa là “các mẫu của dược chất, tá dược, các tạp chất liên quan, các sản phẩm giáng hóa (degradation products), các thuốc thử phức tạp (compendial reagents) hợp chất sinh học, các chất định chuẩn hồng ngoại gần (near IR calibrators) và các chất định chuẩn vận hành (performance calibrators).

(v) Chuẩn Dược điển Nhật:

Chất chuẩn được cung cấp bởi Viện quốc gia về Khoa học Vệ sinh. Đây là nơi sản xuất chất chuẩn dùng cho Hiệp hội Dược điển Nhật.

Dược điển Việt nam có đề cập đến chất đối chiếu (Mục 2.5, Phụ lục 2, trang PL-105), trong đó có quy định chính thức đơn vị phân phối là Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. HCM. Ngoài ra, các nguồn chất đối chiếu quốc tế, khu vực hay quốc gia khác được sử dụng theo quy định.

2.2. Các loại chuẩn khác

(i) Chuẩn gốc hay chuẩn sơ cấp (primary):

Là các chất chuẩn được thẩm định đầy đủ và được thừa nhận rộng rãi, có chất lượng phù hợp trong điều kiện quy định và có giá trị được chấp nhận mà không phải so sánh với chất khác.

Theo FDA: Chất chuẩn đối chiếu của USP-NF và các nguồn chính thức khác không cần phải qua thẩm định (chuẩn gốc) còn các chất chuẩn không từ các nguồn chính thức khác cần phải đạt được độ tinh khiết cao nhất có thể đạt được với nỗ lực hợp lý, và nó phải được xác định một cách đầy đủ để đảm bảo tính đồng nhất (identity), độ mạnh (strength), chất lượng (quality), độ tinh khiết (purity) và hiệu lực (potency).

ICH Guide Q7 định nghĩa chất chuẩn gốc là một chất được đưa ra bởi 1 loạt các thử nghiệm phân tích để trở thành vật liệu đáng tin cậy có độ tinh khiết cao. Chất chuẩn này có thể:

- Thu được từ nguồn được công nhận chính thức.
- Được bào chế bằng tổng hợp độc lập (independent synthesis).
- Thu được từ nguyên liệu sản xuất hiện có có độ tinh khiết cao.
- Được bào chế bằng cách tinh chế tiếp tục các nguyên liệu sản xuất có sẵn.

(ii) Chuẩn làm việc (working standards) hay chuẩn thứ cấp (secondary standards):

Gồm các chất chuẩn sinh học hay hóa học được thiết lập trên các nguyên liệu được chuẩn hóa so với các chất chuẩn gốc hay bằng phương pháp phân tích có độ chính xác cao để cung cấp rộng rãi cho các phòng kiểm nghiệm thuốc; được dùng để định tính, định lượng, đánh giá hoạt lực, xác định độ tinh khiết của thuốc, nguyên liệu và thành phẩm.

Theo ICH Guide Q7, chuẩn thứ cấp là một chất có độ tinh khiết và chất lượng được thiết lập bằng cách so sánh với một chất chuẩn gốc, được dùng làm chất chuẩn đối chiếu cho các phân tích thường ngày của phòng thí nghiệm.

(iii) Chuẩn cơ sở hay chuẩn của nhà sản xuất:

Là các chất được sản xuất và thiết lập bởi cơ sở hay nhà sản xuất theo các quy trình và các tiêu chí của cơ sở. Chất chuẩn cơ sở được tinh khiết hóa, mô tả đầy đủ và xác định rõ cấu trúc (IR, UV, MNR, MS...), thường được sử dụng cho các chất hóa học mới (New Chemical Entity - NCE) chưa có chuyên luận ...

3. Sử dụng chất chuẩn

Chất chuẩn đối chiếu được sử dụng trong các phạm vi sau đây:

- Thẩm định phương pháp (method validation).
- Xác định phương pháp (method verification).

- Xác định độ không đảm bảo đo (measurement uncertainty)
- Chuẩn định (calibration).
- Kiểm tra chất lượng (quality control)
- Đảm bảo chất lượng (quality assurance)
- Nghiên cứu (nhất là trong nghiên cứu dược liệu để xác định các chất, theo dõi độ ổn định thuốc ...)

Trong thực tế các chất chuẩn được sử dụng nhiều trong kiểm nghiệm chất lượng sản phẩm (thuốc, thực phẩm chức năng, thực phẩm, hàng hóa ...)

Trong lĩnh vực kiểm nghiệm chất chuẩn đối chiếu thường được dùng trong các thử nghiệm:

- Định tính bằng các phương pháp phân tích dụng cụ (hồng ngoại, tử ngoại ...).
- Thử nghiệm giới hạn tạp chất [SKLM, GC, HPLC ... → vai trò quan trọng của các chuẩn tạp (impurity reference standards)].
- Định lượng bằng các phương pháp dụng cụ (UV, HPLC).
- Định lượng bằng các phương pháp sinh học (Ví dụ: thử hoạt độ kháng sinh).
- Dùng trong các thử nghiệm các dạng thuốc (Ví dụ: thử độ hòa tan).
- Thử nghiệm có sử dụng các thuốc thử đặc biệt hay hiếm (Ví dụ: các thử nghiệm hoạt tính enzym).
- Các thử nghiệm khác có quy định trong các chuyên luận dược điển.

4. Thiết lập chất chuẩn

Yêu cầu của chất chuẩn

Yêu cầu	Chuẩn khu vực ASEAN	Chuẩn quốc gia	Chuẩn làm việc
Phạm vi sử dụng	Các nước ASEAN	Các phòng kiểm nghiệm trong nước	Đơn vị thiết lập ra chuẩn làm việc.
Đánh giá kết quả	Phòng kiểm nghiệm của các quốc gia ASEAN	Phối hợp các phòng kiểm nghiệm trong nước.	Kết quả đánh giá của một phòng kiểm nghiệm.
Sử dụng chuẩn gốc	Chuẩn quốc tế, USP, EP...	Chuẩn quốc tế, USP, EP, ASEAN...	Chuẩn quốc gia hoặc ASEAN
Các tiêu chuẩn phải đánh giá	Tất cả	Tất cả	IR, tạp chất liên quan, hàm lượng.
Quyết định kết quả	Tiểu ban thiết lập chuẩn ASEAN.	Tiểu ban thiết lập chuẩn quốc gia	Phụ trách phòng quản lý CL.

Hồ sơ	Chứng chỉ Hồ sơ kiểm nghiệm của các phòng kiểm nghiệm.	Chứng chỉ Hồ sơ kiểm nghiệm của các phòng kiểm nghiệm.	Phiếu kiểm nghiệm. Hồ sơ kiểm nghiệm.
-------	---	---	---

Dù là chuẩn khu vực, chuẩn quốc gia hay chuẩn làm việc đều phải tuân theo một nguyên tắc chung về thiết lập, bảo quản và phân phối như sau:

- Nguyên liệu được sử dụng thiết lập chất chuẩn phải có độ tinh khiết cao (đối với hợp chất hóa dược > 95%), được lựa chọn từ các lô nguyên liệu sản xuất thuốc có chất lượng cao, có tính đồng nhất và được cung cấp từ các nguồn đáng tin cậy (các nhà sản xuất gốc).

- Việc đánh giá mức độ phù hợp của một nguyên liệu dự kiến thiết lập chuẩn phải được tiến hành rất cẩn thận, phải cân nhắc tất cả số liệu thu được từ các phép thử và nên áp dụng nhiều phương pháp phân tích khác nhau để đánh giá so sánh.

- Các nhà sản xuất chất chuẩn có uy tín (ví dụ: USP, Chromadex ...) thường xây dựng một quy trình cụ thể, chặt chẽ để thẩm định chất chuẩn của mình.

Vai trò của ISO trong thiết lập chất chuẩn

ISO là tên viết tắt của Tổ chức Quốc tế về tiêu chuẩn hóa (International Organization for Standardization), được thành lập vào năm 1946 và chính thức hoạt động vào 23/02/1947. Việt Nam chính thức gia nhập từ năm 1977 và là thành viên thứ 71 của ISO.

Để xây dựng quy trình thiết lập và chứng nhận chất chuẩn, các đơn vị điều chế chất chuẩn chủ yếu dựa vào ba bộ ISO Guide 31, 34 và 35 làm cơ sở:

- ISO Guide 31 cung cấp các chỉ dẫn cần thiết giúp nhà sản xuất chất chuẩn soạn thảo giấy chứng nhận phân tích một cách rõ ràng, ngắn gọn phù hợp với tiêu chuẩn quốc tế.

- ISO Guide 34 đưa ra các yêu cầu mà nhà sản xuất cần phải đáp ứng, đồng thời hướng dẫn làm thế nào để đáp ứng các yêu cầu này. Nhìn chung, hướng dẫn này đưa ra các mô hình cho thử nghiệm tính đồng nhất, độ ổn định và xác định hàm lượng của nguyên liệu thử nghiệm.

- ISO Guide 35 được xem như một ứng dụng của hướng dẫn xác định độ không đảm bảo đo (Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement - GUM). ISO Guide này hướng dẫn chi tiết về cách xác định độ không đảm bảo đo và cách đánh giá độ đồng nhất lô, độ ổn định trong quá trình thiết lập chất chuẩn.

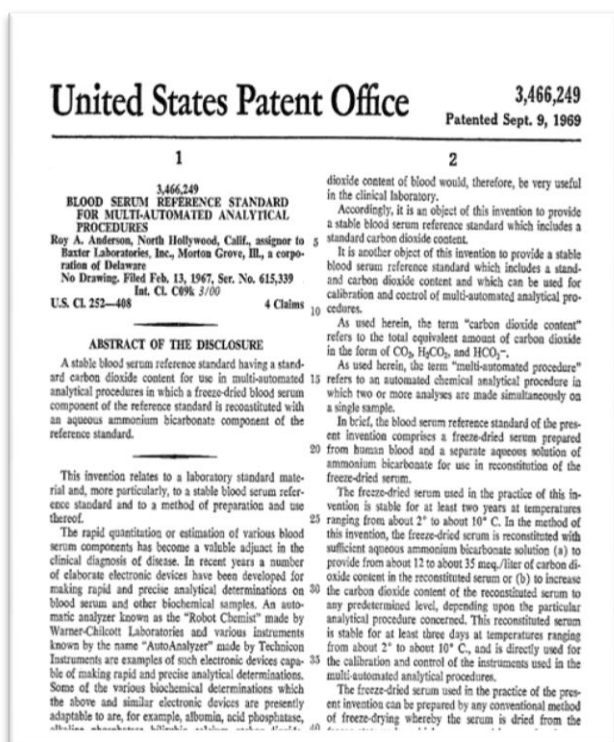
– Ngoài ra, tài liệu ISO Guide13528 hướng dẫn các phương pháp thống kê dùng trong thử nghiệm thành thạo trong so sánh liên phòng thí nghiệm cũng được áp dụng.

II. PHÂN TÍCH XU HƯỚNG NGHIÊN CỨU ĐIỀU CHẾ VÀ THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN ĐỂ PHỤC VỤ CÔNG TÁC NGHIÊN CỨU VÀ KIỂM NGHIỆM TRÊN CƠ SỞ SỐ LIỆU SÁNG CHẾ QUỐC TẾ

1. Tình hình đăng ký sáng chế về nghiên cứu điều chế chất chuẩn theo thời gian

Theo nguồn thông tin tiếp cận được từ cơ sở dữ liệu Wipsglobal (WIPS), nghiên cứu về điều chế và thiết lập chất chuẩn để phục vụ công tác nghiên cứu và kiểm nghiệm có khoảng 261 sáng chế.

Năm 1967: có sáng chế đầu tiên đăng ký về vấn đề này. Những sáng chế đầu tiên đề cập tới chất chuẩn trong kiểm nghiệm huyết thanh.

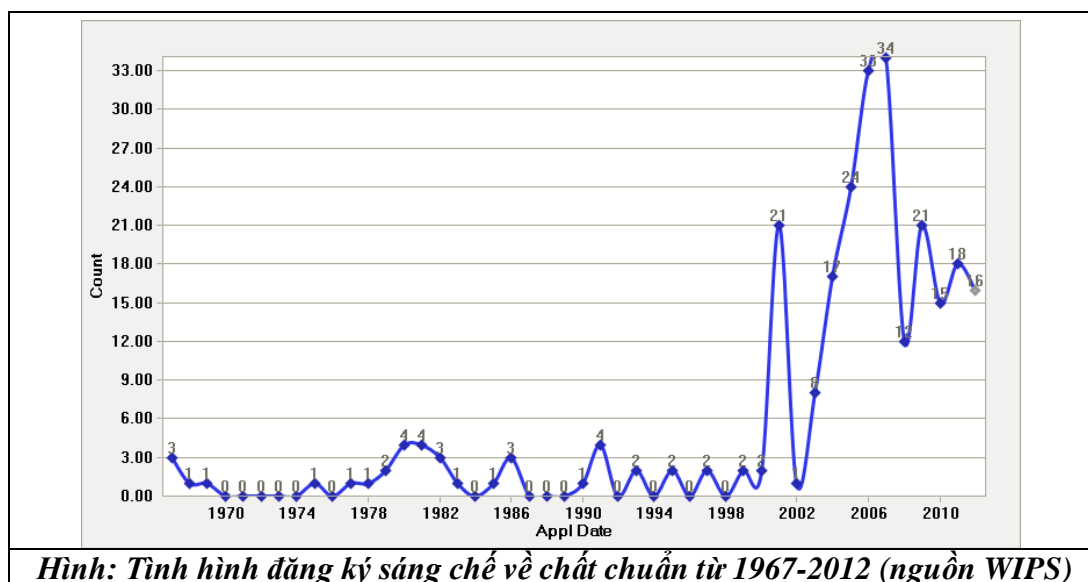


US 3466249 A Blood serum reference standard for multi-automated analytical procedures

- Country: US (UNITED STATES(U.S.A))
- Patent Number: 3466249 (1969.09.09)
- Kind of Document: A (Patent [From begin until end 2000] or Patent issued after first publication within the TVPP [A2 not used in INP FIL])
- Application Number: 3466249D (1967.02.13)
- Priority Number US: 1967-615339 (1967.02.13)
- Inventor: Anderson Roy A
- Applicant / Assignee: Baxter Laboratories Inc (Phòng thí nghiệm của Baxter – một công ty dược của Mỹ, chuyên về các thiết bị y tế, dược phẩm và công nghệ sinh học để tạo ra các sản phẩm chăm sóc bệnh nhân trên toàn thế giới)

Hình: Thông tin về sáng chế đầu tiên đăng ký năm 1967

Tình hình đăng ký sáng chế từ năm 1967-2012 được biểu hiện ở đồ thị sau:



Dựa theo biểu đồ phân tích từ WIPS, có thể thấy những điểm sau:

- ❖ Trong giai đoạn đầu, lượng sáng chế đăng ký chưa nhiều. Từ 1967-1999: có 39 sáng chế, trung bình mỗi năm có khoảng 1 sáng chế được đăng ký.
- ❖ Tình hình đăng ký sáng chế tập trung nhiều từ năm 2000 cho đến nay. Từ 2000-2012: có 222 sáng chế, trung bình mỗi năm có khoảng 20 sáng chế được đăng ký.
- ❖ Lượng sáng chế tăng liên tục trong giai đoạn 2002-2007, đỉnh điểm vào năm 2007 với 34 sáng chế đăng ký.

2. Các quốc gia tập trung sáng chế đăng ký về chất chuẩn để phục vụ công tác nghiên cứu và kiểm nghiệm

Hiện nay, sáng chế về chất chuẩn phục vụ cho công tác nghiên cứu và kiểm nghiệm được đăng ký ở 18 quốc gia trên thế giới

❖ Giai đoạn 1967-1979:

STT	Quốc gia	Sáng chế
1	Mỹ	6
2	Nhật	2
3	Anh	1
4	Úc	1

Những năm thập niên 60, 70: sáng chế về chất chuẩn phục vụ cho công tác nghiên cứu và kiểm nghiệm được đăng ký đầu tiên ở Mỹ, Nhật, Anh và Úc.

❖ **Giai đoạn 1980-1999:**

STT	Quốc gia	Sáng chế
1	Nhật	11
2	Úc	5
3	Đức	2
4	Trung Quốc	2
5	Ba Lan	1
6	Anh	1
7	Canada	1

Những năm thập niên 80,90: có thêm nhiều quốc gia quan tâm đến chất chuẩn như: Đức, Trung Quốc, Ba Lan, Canada.

❖ **Giai đoạn 2000-2012:**

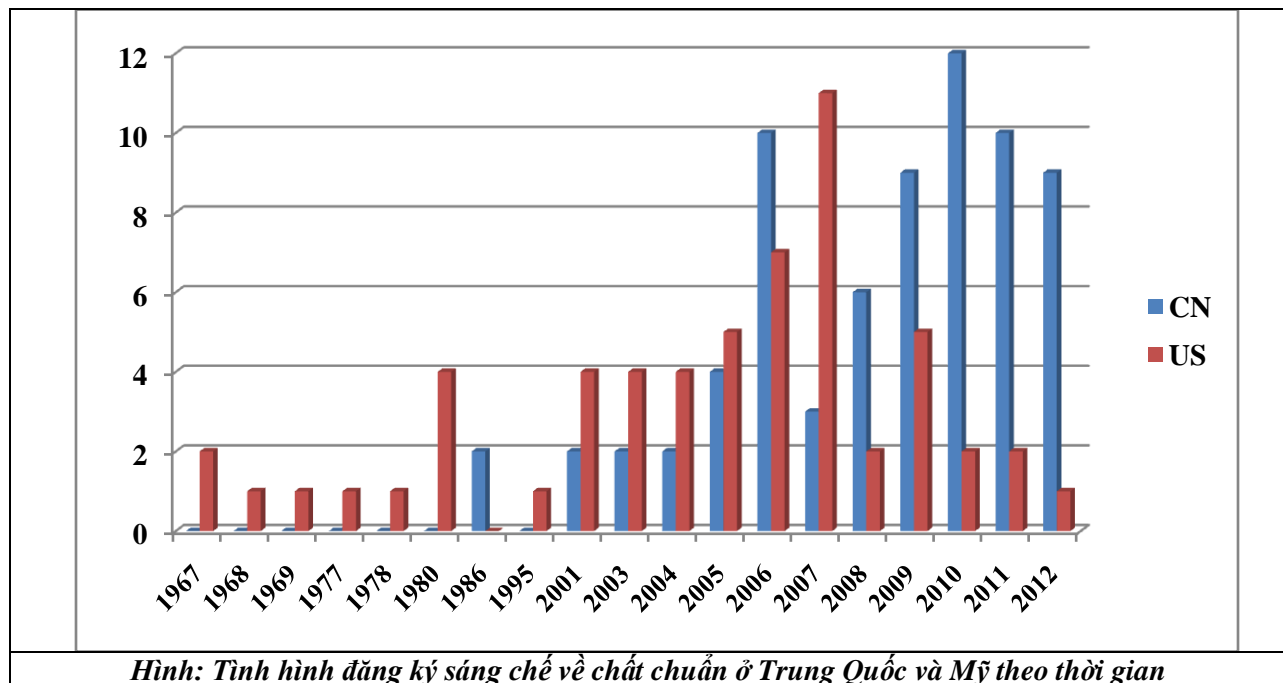
STT	Quốc gia	Sáng chế
1	Trung Quốc	69
2	Mỹ	47
3	Hàn Quốc	12
4	Canada	8
5	Israel	6
6	Úc	5
7	Mexico	3
8	Đức	2
9	Ai - len	2

STT	Quốc gia	Sáng chế
10	Nhật	2
11	Bồ Đào Nha	2
12	Hy Lạp	1
13	Anh	1
14	Cộng hòa Nauru	1
15	Cộng hòa Sec	1
16	Đài Loan	1
17	Hungary	1

Từ năm 2000 cho đến nay, vấn đề nghiên cứu và điều chế chất chuẩn được quan tâm nhiều ở các quốc gia trên thế giới.

Hiện nay, sáng chế về nghiên cứu và điều chế chất chuẩn được đăng ký nhiều nhất ở Trung Quốc và Mỹ.

- ✓ Trung Quốc: 71 sáng chế đăng ký.
- ✓ Mỹ: 58 sáng chế đăng ký.



Theo đồ thị biểu diễn:

- Sáng chế về chất chuẩn được đăng ký ở Mỹ trước Trung Quốc
 - ✓ Cuối thập niên 60: sáng chế đầu tiên đăng ký ở Mỹ
 - ✓ Cuối thập niên 80: sáng chế đầu tiên đăng ký ở Trung Quốc
- Từ 1967-2005: lượng sáng chế đăng ký tại Mỹ nhiều hơn Trung Quốc khoảng 2.3 lần
- Từ 2008-2012: lượng sáng chế đăng ký tại Trung Quốc nhiều hơn Mỹ khoảng 3.8 lần

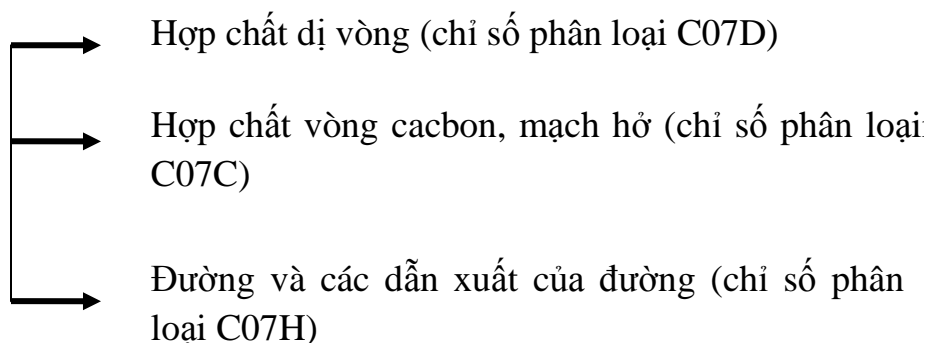
➔ Trung Quốc đi sau Mỹ về đăng ký sáng chế nghiên cứu và điều chế chất chuẩn nhưng trong những năm gần đây, tình hình đăng ký sáng chế tại Trung Quốc có sự tăng nhanh. Hiện nay, Trung Quốc đang là quốc gia dẫn đầu lượng sáng chế đăng ký về chất chuẩn trên thế giới.

3. Các hướng nghiên cứu được quan tâm nhiều về chất chuẩn theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC

Từ hơn 200 sáng chế thu thập được từ cơ sở dữ liệu Wipsglobal, khi đưa vào phân tích theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC (International Patent Classification), nhận thấy các sáng chế đi theo các hướng chính như sau:

Lĩnh vực vật lý → Các phương pháp đo, kiểm nghiệm, phân tích vật liệu (chỉ số phân loại G01N)

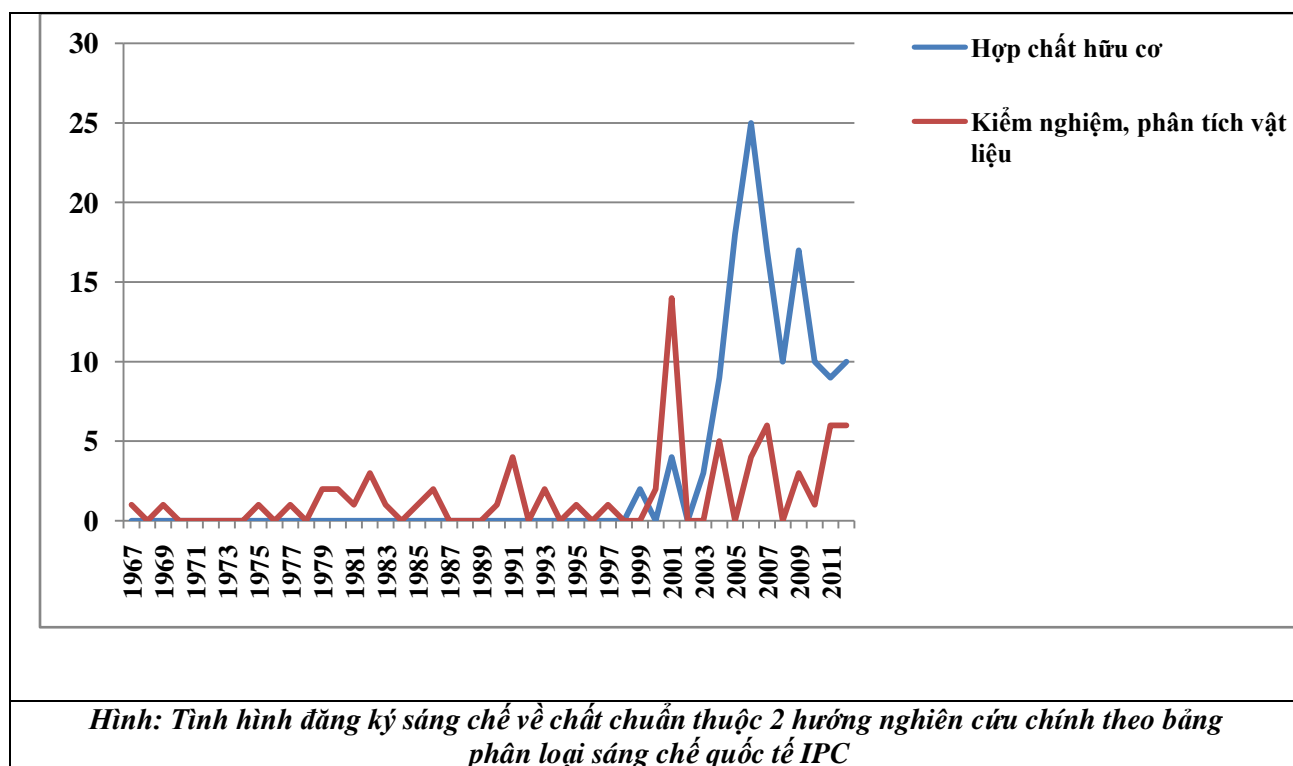
Lĩnh vực hóa hữu cơ



❖ **Nhận xét:**

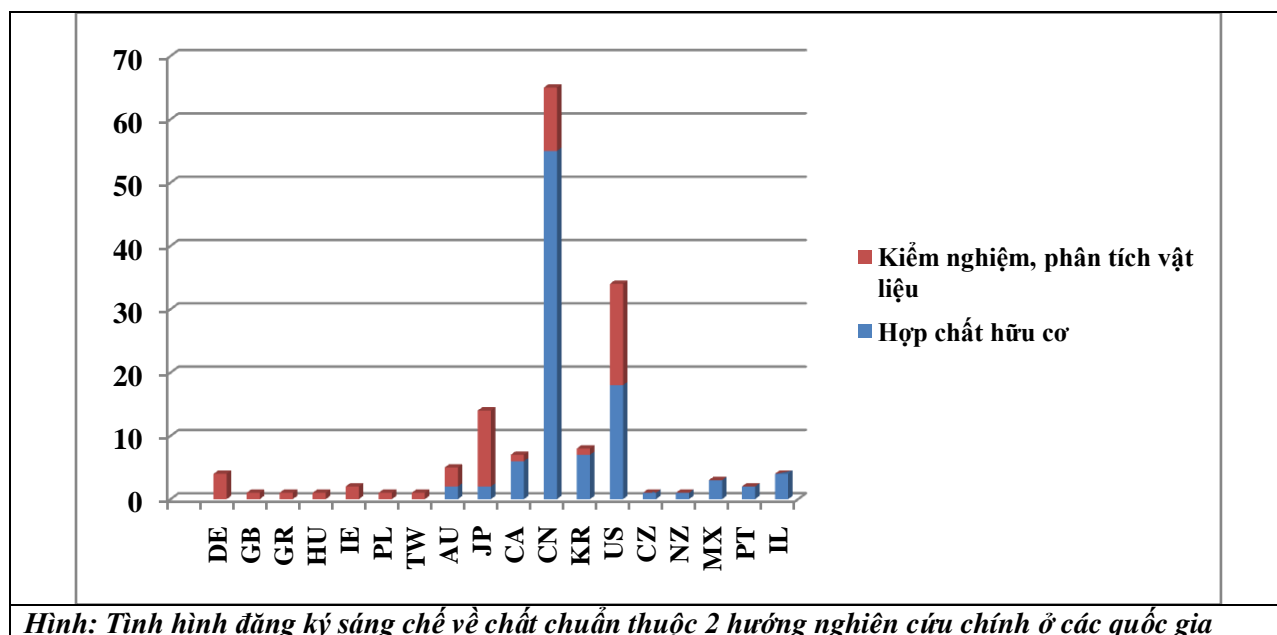
Theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC, các sáng chế đăng ký về chất chuẩn hiện nay tập trung vào 2 hướng chính:

- Hướng nghiên cứu các phương pháp đo, kiểm nghiệm, phân tích vật liệu có sử dụng chất chuẩn.
- Hướng nghiên cứu điều chế chất chuẩn thuộc nhóm hóa hữu cơ, trong đó tập trung vào các nhóm: hợp chất dị vòng; hợp chất vòng cacbon, mạch hở; đường và các dẫn xuất của đường.



Theo đồ thị biểu diễn, trong 2 hướng nghiên cứu chính, thì:

- Hướng nghiên cứu các phương pháp đo, kiểm nghiệm, phân tích vật liệu có sử dụng chất chuẩn là hướng nghiên cứu có sáng chế sớm hơn nhưng tình hình đăng ký sáng chế không có sự liên tục qua các năm.
- Hướng nghiên cứu điều chế chất chuẩn thuộc nhóm hóa hữu cơ bắt đầu có sáng chế từ những năm cuối thập niên 90, lượng sáng chế đăng ký tăng liên tục, tập trung nhiều vào năm 2006 (25 sáng chế).



Hình: Tình hình đăng ký sáng chế về chất chuẩn thuộc 2 hướng nghiên cứu chính ở các quốc gia

Trong 18 quốc gia tập trung sáng chế đăng ký về chất chuẩn:

- ✓ Hướng nghiên cứu các phương pháp đo, kiểm nghiệm, phân tích vật liệu sử dụng chất chuẩn có sáng chế đăng ký ở 7 quốc gia: Đức, Anh, Hy Lạp, Hungary, Ai-len, Ba Lan, Đài Loan.
 - ✓ Hướng nghiên cứu điều chế chất chuẩn thuộc nhóm hóa hữu cơ có sáng chế đăng ký ở 5 quốc gia: Israel, Bồ Đào Nha, Mexico, Cộng hòa Nauru, Cộng hòa Sec.
 - ✓ 6 quốc gia có sáng chế thuộc cả 2 hướng nghiên cứu chính là: Úc, Nhật, Canada, Trung Quốc, Hàn Quốc, Mỹ.
- ➔ Nhận xét: các quốc gia tập trung nhiều sáng chế đăng ký về chất chuẩn (như Nhật, Canada, Trung Quốc, Hàn Quốc, Mỹ) đều có sáng chế đăng ký thuộc 2 hướng nghiên cứu chính, trong đó quan tâm nhiều về hướng nghiên cứu điều chế chất chuẩn thuộc nhóm hóa hữu cơ, chủ yếu là dạng hợp chất dị vòng.

4. Nhận xét:

Những năm cuối thập niên 60 đã có sáng chế đăng ký liên quan đến nghiên cứu và điều chế chất chuẩn. Tuy nhiên, lượng sáng chế tập trung nhiều từ những năm 2000 cho đến nay.

Hiện nay, sáng chế về chất chuẩn được đăng ký ở 18 quốc gia trên thế giới. Trong đó, Mỹ là quốc gia có sáng chế đăng ký sớm nhất. Trong những năm gần đây, tại Trung Quốc đã có nhiều nghiên cứu và sáng chế đăng ký về vấn đề này.

Theo bảng phân loại sáng chế quốc tế IPC, 2 hướng nghiên cứu về chất chuẩn được quan tâm nhiều là: phương pháp đo, kiểm nghiệm, phân tích vật liệu có sử dụng chất chuẩn và hướng nghiên cứu điều chế chất chuẩn thuộc nhóm hóa hữu cơ. Trong đó, điều chế chất chuẩn dạng hợp chất dị vòng; hợp chất vòng cacbon, mạch hở; đường và các dẫn xuất của đường đang là hướng nghiên cứu có nhiều sáng chế đăng ký trong thời gian gần đây.

III. GIỚI THIỆU MỘT SỐ CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN ĐIỀU CHẾ VÀ THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN TỪ THIÊN NHIÊN

1. Giới thiệu một số sáng chế về điều chế và thiết lập chất chuẩn từ thiên nhiên

a. Phương pháp bào chế chất đối chiếu saponin triterpen từ loài *Clematis* Đông Bắc

Số sáng chế: CN101830997

Ngày nộp đơn: 07/05/2010

Tác giả: Guohe Cui, Fangyan Dong, Wei Wang, Yinghua Zhang

Tóm tắt:

Sáng chế (SC) liên quan đến các dẫn chất polysaccharid. SC cung cấp phương pháp bào chế một chất chuẩn saponin triterpen từ loài *Clematis* Đông Bắc trải qua các bước:

- Chiết xuất các thành phần dược liệu
- Tiến hành sắc ký qua cột resin lỗ lớn
- Bào chế chất 3-O-a-L-rhamnopyranosyl-(1-6)-b-D-glucopyranosyl-(1-4)-b-D-glucopyranosyl-(1-4)--D-ribosepyranosyl-(1-3)-a-L-rhamnopyranosyl-(1-2)-a-L-arabinopyranosyl oleanolic acid-28-O-a-L-rhamnopyranosyl-(1-4)-b-D-glucopyranosyl-(1-6)-b-D-glucopyranosyl bằng HPLC.

Độ tinh khiết được xác định bằng HPLC dung môi gradient với detector ELSD (evaporative light scattering detector) cho thấy chất điều chế chỉ chứa chủ yếu 1 pic chính. Hàm lượng xác định bằng HPLC-ELSD là 98% bằng HPLC-ELSD theo phương pháp bình quân hóa diện tích đỉnh (peak area normalization method), đạt yêu cầu chất đối chiếu hóa học theo Dược điển Trung quốc.

Sáng chế có nhiều ưu điểm như chiết kiệt được toàn bộ thành phần, hiệu suất cao, chỉ dùng ít dung môi hữu cơ và giá thành hạ.

b. Phương pháp điều chế và ứng dụng chất chuẩn đối chiếu peptid hoạt động của nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*)

Số sáng chế: CN102584963

Ngày nộp đơn: 19/01/2012

Tác giả: Saizhen Wang | Zhanxi Lin | Dongmei Lin | Zhibin Lin

Tóm tắt:

Sáng chế trình bày phương pháp điều chế và ứng dụng của một chất chuẩn đối chiếu hoạt động của nấm Linh chi để kiểm nghiệm chất lượng của Linh chi và các chế phẩm. Chất chuẩn đối chiếu có thể sửa chữa các sai lầm của phương pháp xác định polysaccharid bằng cách dùng glucose làm chất chuẩn sau khi thêm tinh bột trong quá trình chế biến. Phương pháp bào chế dùng nguyên liệu là nấm Linh chi trải qua các bước: ngâm nước, đun, thu dung dịch hoạt tính, cô đặc, ly tâm, thẩm tích, bắt giữ polysaccharid protein GL-PP bằng cột phân tử lớn hoạt động. Sau đó tiếp tục tiến hành tách GL-PP bằng cón gradient, ly tâm và thu tủa; cuối cùng tiến hành sắc ký cột để phân lập polysaccharid peptid GL-PPS hoạt tính.

Polysaccharid peptid GL-PPS hoạt tính được dùng làm chất chuẩn để phát hiện các polysaccharid peptid, trong đó chất chuẩn đối chiếu có thể được dùng để định lượng chính xác hàm lượng của một polysaccharide hoạt động dưới dạng vết bằng một thiết bị UV.

Chất chuẩn đối chiếu trong phát minh này có thể dùng để kiểm định chất lượng các sản phẩm nấm Linh Chi và có thể loại sự can thiệp của tinh bột và các chất thêm vào khác trong các chế phẩm, vì thế giúp cải thiện tiêu chuẩn chất lượng của các chế phẩm.

c. Phương pháp điều chế đồng thời các chất chuẩn hóa học magnolosid A và magnolosid B

Số sáng chế: CN102391328

Ngày nộp đơn: 05/09/2011

Tác giả: Yang Bin | Yan Renyi | Yu Shengxian

Tóm tắt:

Sáng chế liên quan đến quy trình điều chế đồng thời các chất chuẩn đối chiếu hóa học magnolosid A và magnolosid B bao gồm các bước chiết xuất *Magnolia officinalis* bằng cón để thu được cao thô, tinh chế hiệu quả bằng các chiết xuất, tách bằng cột resin, HPLC điều chế với pha đảo để thu được 2 chất chuẩn đối chiếu hóa học magnolosid A và magnolosid B với độ tinh khiết cao hơn 98 %. Phương pháp có nhiều ưu điểm như

các bước quy trình đơn giản, độ tinh khiết cao và màu sắc đẹp. Thích hợp áp dụng điều chế trên quy mô lớn.

d. Điều chế các chất chuẩn đối chiếu emodin, emodin-8-O-b-D-glucosid và polydatin

Số sáng chế: CN101462937

Ngày nộp đơn: 18/12/2007

Tác giả: Qi Huanyang | Shi Yanping

Tóm tắt:

Sáng chế liên quan đến điều chế các chất chuẩn đối chiếu emodin, emodin-8-O-b-D-glucosid và polydatin.

Phương pháp bao gồm: thêm dược liệu *Reynoutria ciliinerve* xay nhỏ vào dung môi chiết xuất, lọc dung dịch, bốc hơi thu hồi dung môi. Cao chiết xuất được thêm nước, sau đó lần lượt chiết bằng eter dầu và ethyl acetat. Dịch etyl acetat được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel qua hai bước. Sau khi cô, dịch sắc ký được kết tinh lại trong các dung môi khác nhau và cho frangulic acid, frangulic acid-8-O-b-D-glucosid và polydatin.

Phương pháp có nhiều ưu điểm: hiệu suất cao, độ tinh khiết cao (> 98%), quy trình ngắn gọn, dụng cụ và vận hành đơn, giá thành thấp, ít ô nhiễm, thích hợp sản xuất lớn.

e. Phương pháp và công nghệ điều chế chất chuẩn đối chiếu alliin

Số sáng chế: CN101560174

Ngày nộp đơn: 01/06/2009

Tác giả: Li Xinxia | Chen Jian | Zhu Jin

Tóm tắt:

Sáng chế liên quan đến phương pháp và công nghệ điều chế chất chuẩn đối chiếu alliin, bao gồm các bước sau: chiết xuất alliin từ tỏi tươi; điều chế chất chuẩn đối chiếu alliin bằng 2 phương pháp:

- Kết tinh lại với ethanol
- Kết tinh lại với aceton

Alliin được xác định bằng các hằng số vật lý, phân tích các phổ, xác định độ tinh khiết. Chất chuẩn đối chiếu phù hợp với các tiêu chí chất chuẩn đối chiếu alliin theo yêu cầu “Chất chuẩn đối chiếu chiết từ thực vật” của FDA Trung quốc.

f. Chất chuẩn đối chiếu picrinin trong lá *Alstonia* và phương pháp điều chế

Số sáng chế: CN102040613

Ngày nộp đơn: 3/12/2010

Tác giả: Rao Gaoxiong | Guo Wen | Zhu Liping | Li Jun | Luo Shanshan

Tóm tắt:

Sáng chế liên quan đến điều chế chất chuẩn đối chiếu picrinin từ lá *Alstonia* gồm các bước:

- Chiết xuất alkaloid toàn phần
- Tách phân đoạn -A chứa picrinin, một chất rắn vàng sáng (Ph đoạn-B), một chất xám trắng (Ph đoạn-C) và các tinh thể màu vàng (Ph đoạn-D).
- Điều chế các tinh thể không màu từ Ph đoạn D, sau đó kết tinh lại trong acetone thu được picrinin tinh khiết, được dùng làm chất chuẩn đối chiếu, đạt tiêu chuẩn chất lượng định lượng thuốc cổ truyền Trung Quốc.

Ưu điểm của sáng chế: chất chuẩn ổn định, phương pháp điều chế dùng các kỹ thuật đơn giản, chi phí thấp, có độ lặp lại cao.

g. Phương pháp điều chế đồng thời các chất chuẩn đối chiếu hóa học parishin, parishin B và parishin C

Số sáng chế: CN102070683

Ngày nộp đơn: 30/11/2010

Tác giả: Hongbin Xiao | Li Wang | Jie Peng

Tóm tắt:

Phương pháp cung cấp sáng chế gồm các bước: chiết xuất thân rễ *Gastrodiae*, để thu cao thô hay dùng trực tiếp cao thân rễ *Gastrodiae* làm nguyên liệu để tinh chế bằng cách tách qua cột resin và HPLC điều chế để thu được các chất chuẩn đối chiếu parishin, parishin B và parishin C, trong đó độ tinh khiết của các chất cao hơn 98%.

Sáng chế có nhiều ưu điểm như quy trình đơn giản, độ tinh khiết cao, màu sắc đẹp và có thể sản xuất trên quy mô lớn.

2. Tình hình điều chế và thiết lập chất chuẩn thiên nhiên ở Việt Nam

Việt Nam có tiềm năng về dược liệu với những khu rừng nhiệt đới, hệ động – thực vật phong phú và đa dạng. Theo thống kê chưa đầy đủ, nước ta có khoảng 10.000 loài thực vật, trong đó có hơn 3.000 loài được sử dụng làm thuốc.

Người dân Việt Nam có truyền thống sử dụng dược liệu, có một nền y học dân tộc và dân gian phong phú, lại chịu phần nào ảnh hưởng của nền y học cổ truyền Trung Quốc nên nhu cầu sử dụng dược liệu thiên nhiên rất lớn.

Hàng năm nước ta cần khoảng 50.000 tấn dược liệu cho ngành dược, nhưng số lượng dược liệu thu hoạch trong nước chỉ đạt 25-30% nhu cầu. Phần còn lại, phải nhập khẩu từ nước ngoài, chủ yếu từ Trung Quốc. Thị trường dược liệu Việt Nam ước tính hàng trăm triệu đô/năm

Gần đây, với sự tăng trưởng của thị trường thực phẩm chức năng, tình hình tiêu thụ dược liệu ngày càng gia tăng một cách sôi động. Tuy nhiên, chất lượng dược liệu và đồng dược rất đáng báo động.

Nhiều dược liệu quý thực chất là... rác!

Nguồn tin từ Bộ Y tế hôm qua 5/9 cho hay: qua kiểm nghiệm mới đây tại Viện Kiểm nghiệm thuốc TỰ đã phát hiện một số dược liệu nhập khẩu như hoàng kỳ, nhân sâm... đã được tách chiết hết hoạt chất trước khi bán sang VN, không còn tác dụng dược lý và đơn thuần chỉ là... rác!

Cũng theo nguồn tin này, giá nhân sâm bán sang VN từ đầu nguồn (loại bị tách chiết hết và gần hết hoạt chất) rất rẻ, có loại chỉ... 2.500 đồng/củ (khoảng 200.000 đồng/kg). Qua kiểm tra tại đầu mối nhập khẩu dược liệu tại Hà Nội cho thấy chỉ có 19/200 hộ kinh doanh có giấy phép hành nghề.

Trước đó, Bộ Y tế có báo cáo cho biết khảo sát tại quận 5, TPHCM cho thấy 50-70% thuốc đông y, đông dược được nhập lậu và trong đó có không ít là giả. Theo báo cáo này, qua kiểm tra 62 cơ sở kinh doanh trong thời gian qua, phát hiện đến 55 cơ sở có vi phạm.

Theo đánh giá của đoàn thanh tra, chất lượng đông dược, dược liệu là không kiểm soát được.

Báo Tuổi Trẻ

Ngày thứ năm 06/09/2007

Dược liệu... rác!

Đường vào xóm 8, xã Ninh Hiệp ngoại thành Hà Nội - vùng mua bán, trung chuyển dược liệu lớn nhất miền Bắc - đây nhóc cam thảo, táo tàu, bạch truật, tam thất, hạt sen và... ruồi. Dược liệu được thái, phơi đầy hai bên lề đường.

Tại huyện Đông Anh, chúng tôi ngỡ ngàng khi chị Nguyễn Thị Anh, chủ một hiệu thuốc lớn, cho biết giá các vị thuốc mà người nghèo ít dám mơ tới lại rẻ như... khoai: giá bán buôn 1kg nhân sâm loại 50 củ/kg tại đây là 280.000đ; nấm linh chi 150.000đ/kg (1kg có bốn củ). Tại đầu nguồn, giá một



Một sâm như một khoai: 1.000 đồng/củ



Nấm linh chi to bằng cái quạt, nhưng chỉ 40.000 đồng/tai Ảnh: LAN ANH

Tù mù "dược liệu quý"

◆ NAM SƠN

Sáng qua, Thanh tra Sở Y tế Hà Nội đã kiểm tra hoạt động kinh doanh dược liệu, thuốc y học cổ truyền tại xã Ninh Hiệp (Gia Lâm, Hà Nội). Đây là đầu mối dược liệu lớn tại phía Bắc, cung cấp cho các cơ sở điều trị, kinh doanh, bốc thuốc tại nhiều tỉnh, thành phố.

Xã Ninh Hiệp hiện có khoảng 200 hộ sao chế nguyên liệu thuốc nam, thuốc bắc và kinh doanh dược liệu. Ngoài việc tự sản xuất nguyên liệu, Ninh Hiệp còn là nơi trung chuyển các mặt hàng dược liệu từ Trung Quốc và các vùng lân cận đến các tỉnh, thành phố khác. Lãnh đạo UBND xã cho biết rất khó quản lý, kiểm soát chất lượng các loại dược liệu nhập khẩu.

Ngày cả đối với loại thuốc quý, đắt tiền như nhân sâm, một số chủ hộ kinh doanh dược liệu

cũng thừa nhận chất lượng hàng nhập qua biên giới rất hạn chế. Theo chủ cơ sở Thăng Đoàn, "người mua lẻ về sử dụng nếu không tạo rất khó phân biệt sâm chất lượng cao từ Hàn Quốc với sâm nhập qua biên giới, có chất lượng thấp hơn". Hồng sâm "Thiên 30" nếu nhập qua biên giới giá chỉ 370.000đ/hộp, trong khi đó loại "xin" của Hàn Quốc lên đến 850.000đ. Nếu chỉ bằng mắt thường, người tiêu dùng sẽ hầu như không phân biệt được.

Thậm chí, bên trong, màu của sâm giả rẻ còn "hồng" đẹp hơn cả sâm cao cấp. Chỉ có người chuyên mua bán mới biết và phân biệt tốt - rẽ qua chất lượng đóng gói. Hoặc khi chế biến, sâm chất lượng thấp sẽ dẻo hơn, còn sâm chất lượng cao có độ giòn". Ông Nguyễn Trọng Lưu (Viện Kiểm

6 tháng đầu năm 2007, Trung tâm Kiểm nghiệm chất lượng thuốc và mỹ phẩm Hà Nội đã kiểm tra 143 mẫu dược liệu và đông dược. Trong đó 9/9 mẫu dược liệu được kiểm tra không đạt chất lượng - chủ yếu về độ ẩm, định lượng hoạt chất; 13/134 mẫu đông dược được kiểm tra không đạt chất lượng về độ nhiễm khuẩn, đồng đều khối lượng.

nghiệm) lưu ý: "Đánh giá chất lượng sâm rất khó, nó phụ thuộc vào tuổi sâm, vùng đất trồng cũng như loại sâm đó được trồng như thế nào - môi cấy mô hay nuôi trồng tự nhiên".

Khảo sát một số cơ sở có bán sâm tại xã Ninh Hiệp, chúng tôi đã được cầm hộp sắt đóng gói sâm mang nhãn hiệu "Korean Red Ginseng" rất đẹp mắt, được in thêm hàng chữ "The Speciality of Republic of Korea", nhưng giá bán chỉ có 45.000đ/hộp 150g. Trong khi đó nếu đúng hàng chất lượng của Hàn Quốc, giá bán trên

200.000đ/hộp. Một chủ kinh doanh dược liệu này cho biết: "Người mua lẻ tại các cửa hiệu sẽ rất khó phân biệt, hầu như chỉ biết chung là hàng cao cấp hay hàng chất lượng vừa thông qua giá cả, chứ khó biết rõ nguồn gốc thật của sâm. Vì khó phân biệt nên không loại trừ, có thể mua giá cao không đúng với chất lượng".

Ngày với nấm linh chi - loại nấm vẫn được coi là thần dược, nhưng tại Ninh Hiệp, có thể mua với giá 150.000đ/kg, đường kính khoảng hơn 20 cm. Năm này thậm chí được phơi

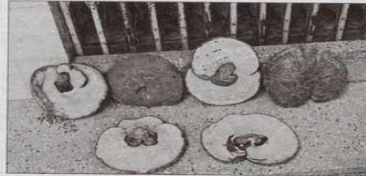


Hộp hồng sâm "nhái" Hàn Quốc

ngay dưới chân cửa sắt, nơi mọi người vẫn qua lại. Chỉ cần nhìn cách phơi hong sơ sài như vậy, cũng có thể thấy được nấm linh chi này "quý, hiếm" như thế nào, so với loại nấm linh chi chất lượng cao có giá tới 1,3 triệu đồng/kg!



Kiểm tra chất lượng dược liệu tại Ninh Hiệp



Nấm linh chi phơi ngay dưới chân cửa sắt



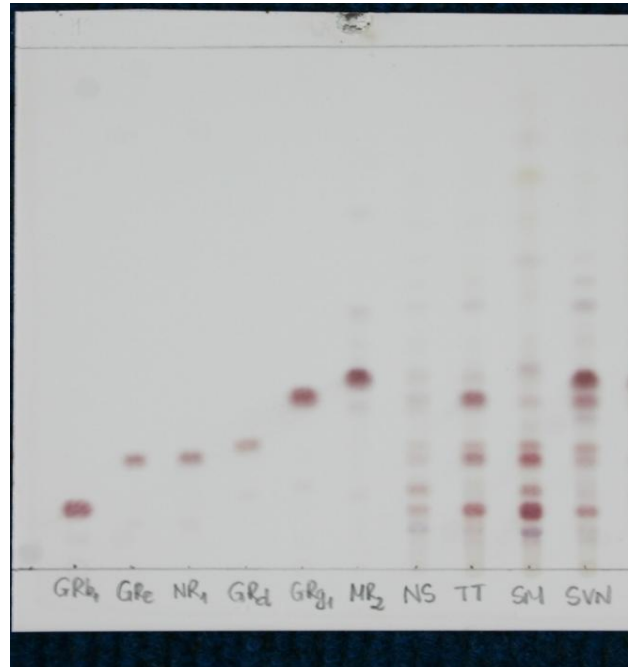
Hồng sâm thật (trái) không khác biệt so với hồng sâm nhập qua biên giới

Các phương pháp kiểm nghiệm thô sơ như dựa vào hình dạng, màu sắc ... có thể dẫn đến những kết luận sai lầm.

Nhưng với tiên bộ của các phương pháp kiểm nghiệm hiện đại như các phương pháp sắc ký, đặc biệt là sắc ký lỏng hiệu năng cao có sử dụng các chất chuẩn, việc kiểm nghiệm dược liệu và đông dược được thực hiện một cách dễ dàng và chính xác hơn.

Ví dụ 1: Kiểm nghiệm các loại sâm bằng SKLM

- Bản mỏng: Silica gel F254 (Merck).
- Dung dịch sắc ký: Các chất chuẩn G-Rb₁, G-Rg₁, G-Rd, G-Re, N-R₁, M-R₂ và các saponin toàn phần pha trong MeOH.
- Cao toàn phần Nhân sâm (NS), Tam thất (TT), Sâm Mỹ (SM), Sâm Việt nam (SVN)
- Hệ dung môi: CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:10, lớp dưới).
- Thuốc thử hiện màu: H₂SO₄ 20%/EtOH 50%, sấy 105°C đến khi



(N.M. Đức và CS, 2010)

Ví dụ 2: Kiểm nghiệm Sâm Việt Nam



Mẫu 1



Mẫu 2



Mẫu 3



Mẫu 4



Mẫu 5

(N.M. Đức và CS, 2012)

Ví dụ 3: Kiểm nghiệm Sâm Việt Nam bằng SKLM

- Bản mỏng: Silica gel F₂₅₄ (Merck).

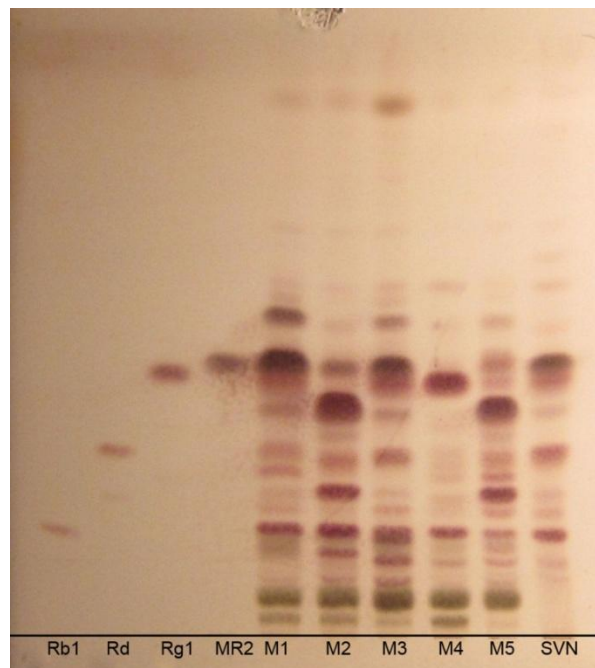
- Dung dịch sắc ký:

Các chất chuẩn G-Rb₁, G-Rg₁, G-Rd, G-Re, N-R₁, M-R2 và các saponin toàn phần các mẫu thử pha trong MeOH. Sâm Việt nam (SVN)

- Hệ dung môi: CHCl₃-MeOH-H₂O (65:35:10, lớp dưới).

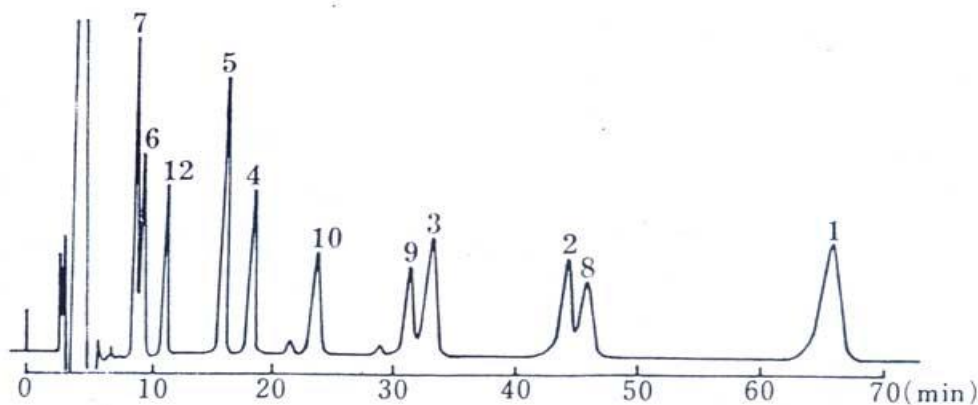
- Thuốc thử hiện màu: H₂SO₄ 20%/EtOH 50%, sấy 105°C đến khi hiện màu.

→ Kết quả: nhiều mẫu kiểm nghiệm không phải là Sâm Việt nam



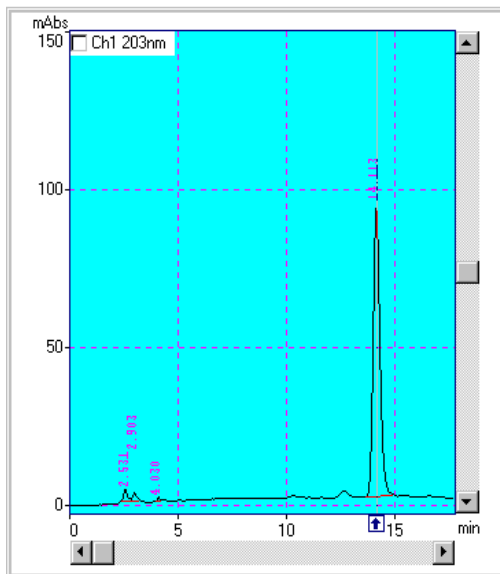
(N.M. Đức và CS, 2012)

Ví dụ 4: Kiểm nghiệm Nhân sâm bằng HPLC với các chất chuẩn ginsenosid

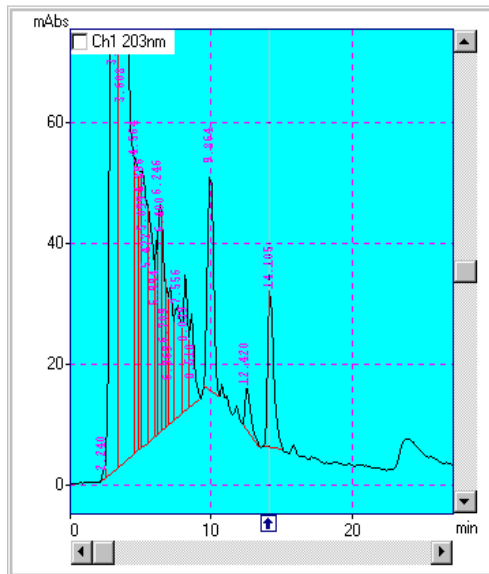


Điều kiện: cột Ultron NH₂ (Nhật), kích thước tiểu phân 7 μ m, kích thước cột 4.6x150 mm, pha động (mobile phase): CH₃CN -1.0% H₃PO₄ (83:17 v/v), tốc độ: 1.0 ml/phút, phát hiện bằng UV (202 nm). Các pic: 1 (G-Rb₁), 2(G-Rb₂), 3(G-Rc), 4(G-Rd), 5(G-Rf), 8(Malonyl G-Rb₁), 9 (Malonyl G-Rb₂), 10 (Malonyl G-Rd), 12(G-Ro)

Ví dụ 5: Kiểm nghiệm cao Rau má bằng HPLC với chất chuẩn asiaticosid



(a)



(b)

Sắc ký đồ HPLC của asiaticosid chuẩn (a) và cao Rau má (b)

Cột Supelcosil LC 18 (250x4,6 mm), $5\pm 0,3 \mu\text{m}$; Detector: Photodiode Array (UV 203 nm); Pha động: $\text{CH}_3\text{CN} - \text{MeOH} - \text{H}_2\text{O}$ (25 : 20 : 55); Tốc độ dòng: 0,55 ml/phút.; Thể tích bơm 20 μl , Nhiệt độ cột: 25 – 30 °C

(NM Đức và TT Như Phượng, 2011)

Hiện nay, trên thế giới việc nghiên cứu và phân phối chất chuẩn chủ yếu phát triển mạnh ở các nước có nền công nghiệp dược phẩm tiên tiến như Anh, Mỹ, Đức, Nhật Bản, Trung quốc ... các chất chuẩn được thiết lập bằng con đường tổng hợp hóa học hoặc điều chế từ nguồn dược liệu thô ban đầu. Danh mục của các công ty này chủ yếu là các chất chuẩn hóa học, chuẩn hợp chất tự nhiên còn hạn chế và thậm chí là chưa có như majonosid - R2 trong Sâm Việt Nam (*Panax vietnamensis* Ha et Grushv., Araliaceae), damnacanthol trong Nhàu (*Morinda citifolia* L., Rubiaceae), crinamidin trong TNHC

Tuy nhiên, giá thành chất chuẩn mà các công ty này cung cấp cho các phòng thí nghiệm trên thế giới phần lớn rất đắt và thời gian đặt hàng cho một sản phẩm tương đối dài từ vài tuần thậm chí vài tháng gây ảnh hưởng không nhỏ đến công tác kiểm nghiệm và nghiên cứu khoa học.

Dưới đây là giá một số chất chuẩn (triệu đồng), chưa kể thuê và phí vận chuyển:

Chất chuẩn Tên nhà cung cấp	Sigma-Aldrich (Đức)	Wako Pure Chemicals (Nhật)	Chromadex (Hoa kỳ)
Ginsenosid-Rb ₁ (10 mg)	18,2 (P)	7,7	5,8 (AHP)
Ginsenosid-Rd (10 mg)	---	3,5	6,9 (AHP)
Ginsenosid-Re (10 mg)	---	3,8	5,8 (AHP)
Ginsenosid-Rg ₁ (10 mg)	18,2 (P)	4,9	5,8 (AHP)
Notoginsenosid-R1(10 mg)	---	---	5,6 (SH, không có chuẩn P)

Ghi chú:

P (Primary): Chuẩn gốc; SH (Secondary): Chuẩn làm việc.

AUH (American Herbal Pharmacopoeia): Chuẩn DD Dược liệu Mỹ.

AS (Analytical Standard): Chuẩn phân tích.

Một số nhà cung cấp chất chuẩn:

- ✓ USP (Mỹ) cung cấp chất chuẩn gốc phục vụ cho yêu cầu kiểm nghiệm theo các chuyên luận USP/NF.
- ✓ Sigma-Aldrich (Đức).
- ✓ Dalton, Atkin ...

Tuy nhiên, các công ty nói trên chủ yếu cung cấp các chất chuẩn có một nguồn gốc tổng hợp, số lượng các chất chuẩn từ thiên nhiên rất hạn chế. Các công ty chuyên cung cấp chất chuẩn thiên nhiên là:

- ✓ Chromadex (Mỹ, chất chuẩn được phân loại P, SH, AUP).
- ✓ Wako Chemicals (Nhật Bản)

Gần đây, do xu hướng và nhu cầu phát triển thuốc từ thiên nhiên, Trung quốc đã nghiên cứu phát triển nguồn chất chuẩn thiên nhiên để cung cấp cho công tác nghiên cứu và kiểm nghiệm dược liệu.

Tại Việt Nam, hai đơn vị cung cấp chất chuẩn chính thức là Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương và Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. HCM.

- ✓ Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương hiện cung cấp 10 chất chuẩn từ dược liệu gồm acid chlorogenic, conessin, holothurin B, kaemferol, malloapeita, myricetin, nuciferin, phyllanthin và sylibin bên cạnh hàng trăm chất chuẩn tân dược (8/2013).

- ✓ Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. HCM cung cấp 213 chất chuẩn tân dược và 18 chất chuẩn từ dược liệu gồm acid aristolochic, acid gallic, acid oleanolic, asiaticosid, berberin HCl, colchicin, curcumin, damnacanthal, diacerein, diosgenin, epigallocatechin (ECGC), ginsenosid-Rb1, ginsenosid-Rg1, hesperidin, majonosid-R2, quercetin, rutin, syllibin (8/2013).

Số lượng chất chuẩn thiên nhiên trên chỉ đáp ứng được phần rất nhỏ nhu cầu kiểm định dược liệu và đông dược trong tình hình chất lượng có nhiều bất cập hiện nay.

Việt Nam là một nước có thế mạnh về dược liệu, vì vậy các nghiên cứu về hóa hợp chất thiên nhiên rất phong phú, trong đó có nhiều công trình chiết xuất, phân lập các hợp chất từ thiên nhiên. Tuy nhiên, việc chiết xuất, phân lập, xác định cấu trúc đa phần ngừng lại ở việc công bố, số chất chiết được đưa vào ứng dụng làm chất chuẩn còn hạn chế, vì để trở thành chất chuẩn cần phải đáp ứng một số yếu tố:

- ✓ Lượng phải đủ lớn để đánh giá thẩm định đầy đủ theo yêu cầu chất chuẩn (hàng trăm mg, hàng gam trở lên), đặt biệt là tính đồng nhất của lô hợp chất phân lập (thường nghiên cứu hóa HC thiên nhiên không đặt yêu cầu phải thu lượng lớn, nhất là các hợp chất hàm lượng thấp trong dược liệu).
- ✓ Có độ tinh khiết cao (thường yêu cầu > 90%).
- ✓ Dược phẩm định đầy đủ trước khi phân phối lưu hành như một chất chuẩn.

Từ 2005-2008, GS.TS. Nguyễn Minh Đức và Cộng sự tiến hành nghiên cứu đề tài: “Chiết xuất điều chế một số hợp chất thiên nhiên để làm chất chuẩn phục vụ tiêu chuẩn hóa, kiểm nghiệm, nghiên cứu cây thuốc và chế phẩm từ cây thuốc”, trong khuôn khổ đề tài cấp Bộ (Bộ Y tế).

Trong khuôn khổ đề tài này, nhóm nghiên cứu đã chiết xuất phân lập hơn 24 chất chuẩn thông dụng từ dược liệu với hàm lượng cao (> 95%) bao gồm:

TT	Chất chuẩn	Nguồn điều chế	Số lượng (mg)	Hàm lượng (%)	KQ Viện KN TP.HCM
1	Acid asiatic	Rau má	150	98,75	--
2	Acid oleanolic	Cỏ xước	1.500	100,77	98,26
3	Allicin	Tỏi	Tùy ý	99,14	--
4	Berberin clorid	Berberin thô	4.820	99,28	99,24
5	Curcumin I	Nghệ	1.000	100,0	--
6	Damnacanthal	Rễ Nhàu	230	99,0	--
7	Eleutherin	Sâm đại hành	1.500	98,0	--

8	Eleutherol	Sâm đại hành	700	100,0	--
9	Eucalyptol	Tinh dầu Tràm	50.000	99,99	--
10	Ginsenosid-Rb ₁	Sâm VN	800	98,85	98,80
11	Ginsenosid-Rd	Sâm VN	310	99,71	98,47
12	Ginsenosid-Re	Tam thất	200	98,37	98,37
13	Ginsenosid-Rg ₁	Sâm VN	3.000	99,76	--
14	Isoeleutherin	Sâm đại hành	150	98,00	--
15	Majonosid-R2	Sâm VN	300	98,52	--
16	1-metoxyl-2-metyl-3-hydroxy antraquinon	Quả Nhàu	20	98,65	--
17	Narigin	Vỏ bưởi	6.000	100,0	--
18	Nor-damnacanthol	Rễ Nhàu	100	98,00	--
19	Quercetin	Rutin	6.500	99,85	--
20	Rotundin sulfat	Bình vôi	12.600	99,99	99,95
21	Rutin	Hoa hòe	3.200	101,2	100,32
22	Scopoletin	Quả Nhàu	140	97,26	--
23	Soranjidiol	Quả Nhàu	40	98,40	--
24	Strychnin sulfat	Strychnin thô	8.630	99,38	99,95

Từ 2007-2010, Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương (Hà Nội) tiến hành đề tài nghiên cứu điều chế chất chuẩn từ thiên nhiên trong khuôn khổ chương trình KC10, đã điều chế được 10 chất chuẩn, thẩm định tại 2 phòng Thí nghiệm, với lượng 2 g cho mỗi chất chuẩn bao gồm: acid chlorogenic, conessin, holothurin B, kaemferol, malloapeita, myricetin, nuciferin, phyllanthin và sylibin. Hiện nay, các chất chuẩn này đang được Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương phân phối.

Từ 2008-2012 GS.TS. Nguyễn Minh Đức và Cộng sự tiến hành nghiên cứu dự án cấp Sở (Sở KH&CN TP. HCM): “*Điều chế chất chuẩn đối chiếu phục vụ kiểm nghiệm dược liệu và đông dược*”, đã điều chế thẩm định được 10 chất chuẩn từ dược liệu gồm acid oleanolic, asiaticosid, berberin chlorid, curcumin I, damnacanthol, diosgenin, hesperidin, ginsenosid-Rb₁, ginsenosid-Rg₁ và majonosid-R2. Các chất chuẩn được điều

chế với lượng lớn và được thẩm định theo tiêu chí của chuẩn gốc, có đủ điều kiện đăng ký chất chuẩn quốc gia.

3. Kết quả nghiên cứu điều chế và thiết lập chất chuẩn thiên nhiên tại Đại học Y-Dược TP. HCM

Giới thiệu dự án cấp Sở (Sở KH&CN TP. HCM): “Điều chế chất chuẩn đối chiếu phục vụ kiểm nghiệm dược liệu và đông dược” (2008-2012)

3.1. Nội dung:

– Sản xuất 10 chất chuẩn từ dược liệu bao gồm: acid oleanolic, asiaticosid, berberin clorid, curcumin, damnacanthal, diosgenin, ginsenosid-Rb₁, ginsenosid-Rg₁, hesperidin và majonosid-R2 với số lượng 10 – 20 g (trừ majonosid-R2 là 1 g, ginsenosid-Rb₁ và -Rg₁ và 2 g) có hàm lượng $\geq 97\%$ tính theo khối lượng khan và đủ điều kiện đăng ký xét công nhận chất chuẩn quốc gia.

– Xây dựng quy trình sản xuất và TCCS 10 chất chuẩn để sản xuất phục vụ yêu cầu kiểm nghiệm dược liệu và đông dược.

3.2. Nguyên liệu điều chế:

– Chất chuẩn acid oleanolic từ rễ cây Nguu Tắt (*Achyranthes bidentata* L. – Amaranthaceae).

– Chất chuẩn asiaticosid: Cao rau má chuẩn hóa do Ban NCKH – TV, Khoa Dược sản xuất.

– Chất chuẩn berberin chlorid từ berberin chlorid (Án độ, 98%).

– Chất chuẩn curcumin I từ cao Nghệ chuẩn hóa do Ban NCKH– TV, Khoa Dược sản xuất.

– Chất chuẩn ginsenosid-Rb₁ và ginsenosid-Rg₁ từ cao Tam thất chuẩn hóa do Ban NCKH – TV, Khoa Dược sản xuất.

– Chất chuẩn damnacanthal từ cao rễ Nhàu chuẩn hóa do Ban NCKH – TV, Khoa Dược sản xuất.

– Chất chuẩn majonosid-R2 từ saponin toàn phần Sâm Việt Nam do Ban NCKH – TV Khoa Dược sản xuất.

– Chất chuẩn hesperidin từ hesperidin thô (Merck, Đức, 80%).

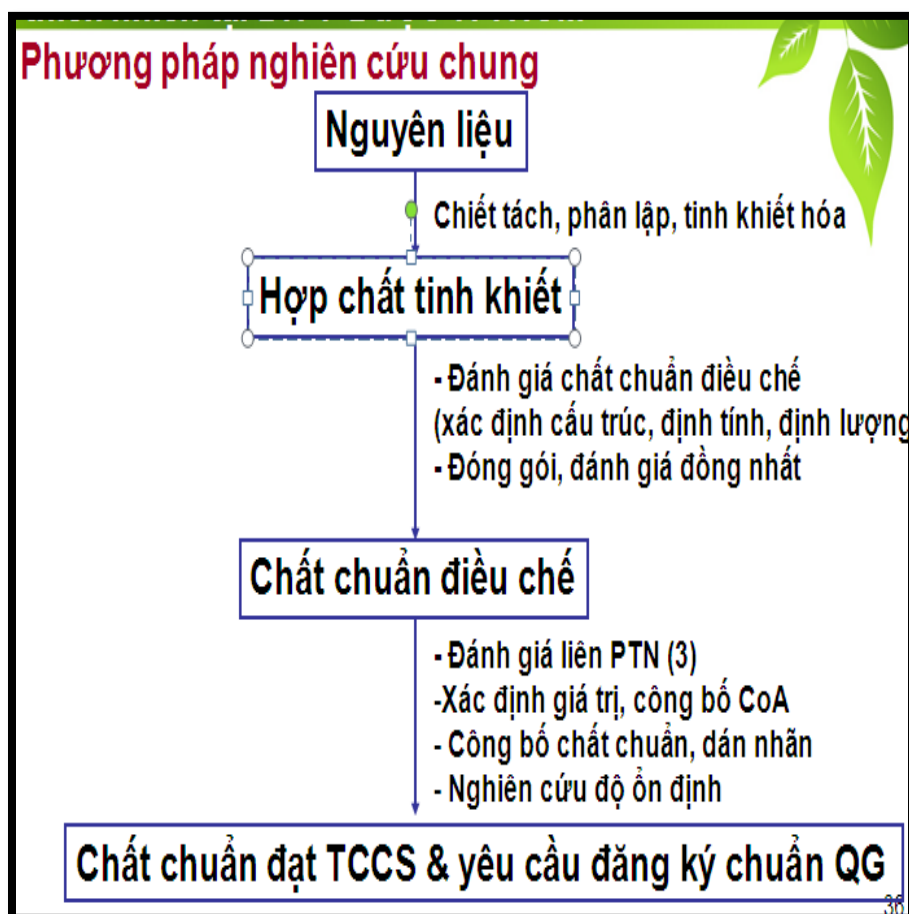
– Chất chuẩn diosgenin từ cao Mía dò do Ban NCKH – TV Khoa Dược sản xuất.

3.3. Chất chuẩn đối chiếu:

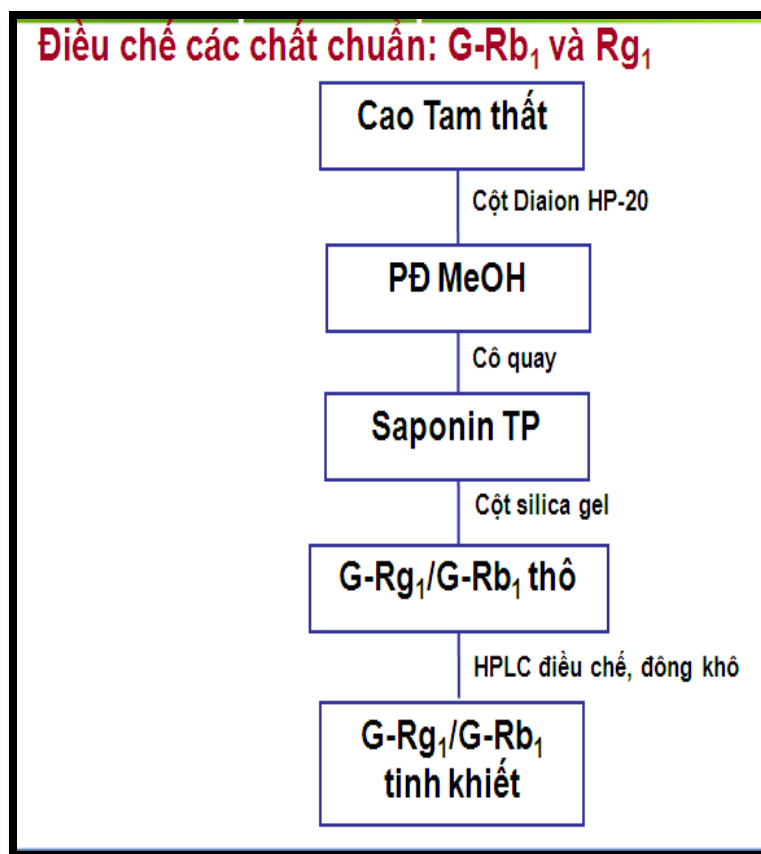
– Acid oleanolic: Chuẩn gốc (Primary) của công ty Chromadex (Mỹ), số lô 15303-109, hàm lượng 93,40%.

- Asiaticosid: Chuẩn gốc (Primary) của công ty Chromadex (Mỹ), số lô 11030-905, hàm lượng 74,20%.
- Berberin chlorid: Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. HCM, số lô QT122 030910, hàm lượng 90,62%.
- Curcumin I: Chuẩn của USP, hàm lượng 99,0%.
- Diosgenin: Chromadex (Mỹ), hàm lượng 98,5%.
- Ginsenosid-Rg1: Chuẩn gốc (Primary) của hãng Tauto Biotech (Trung Quốc), hàm lượng 99,30%.
- Ginsenosid-Rb1: Chuẩn gốc (Primary) của hãng Tauto Biotech (Trung Quốc), hàm lượng 97,28%.
- Hesperidin: Chuẩn gốc (Primary) của công ty Chromadex (Mỹ), hàm lượng 87,4%.

3.4. Phương pháp nghiên cứu chung



Điều chế các chất chuẩn: G-Rb₁ và Rg₁



Thẩm định các chất chuẩn điều chế

- SKLM, điểm chảy, HPLC
- IR, MS, NMR
- Hàm lượng nước: K-F (berberin clorid)
- Tạp chất liên quan: HPLC
- Định lượng: HPLC

Hợp chất	Cột	Pha động	Detector	Tiêu chuẩn
Berberin.HCl	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 μm	ACN-đậm	UV 345	ĐĐVN IV
A. oleanolic		ACN-H ₂ O	UV 203	TCCS
Curcumin I		ACN - H ₃ PO ₄	UV 428	TCCS
G-Rg ₁		ACN-H ₂ O	UV 203	TCCS
G-Rb ₁		ACN-H ₂ O	UV 203	TCCS

Thẩm định các chất chuẩn điều chế

– Định lượng: HPLC

Hợp chất	Cột	Pha động	Detector	Tiêu chuẩn
Asiaticosid	C ₁₈ , 250 x 4,6 mm, 5 μm	ACN-MeOH-H ₂ O	UV 203	TCCS
Damnacanthal		ACN-H ₂ O	UV 255	TCCS
Diosgenin		ACN - H ₂ O	UV 203	TCCS
Hesperidin		ACN-MeOH-H ₂ O	UV 275	TCCS
Majonosid-R2		ACN-H ₂ O	RI	TCCS

3.5. Đóng gói:

- Tại Viện kiểm nghiệm Thuốc TP.HCM, trong điều kiện khí trơ 99,9
- Lọ 10 mg/20 mg nâu, hàn kín.
- Đánh giá đồng nhất giữa các lọ (ISO Guide 35)
- Số lọ cần lấy: $g = + 1$, ngẫu nhiên (Excel)
- Mỗi lọ kiểm tra hai lần $\rightarrow x_1, x_2$
- Loại giá trị bất thường (Dixon)

$$\frac{S_r}{\sqrt{n}} < u_{bb} \quad (1) \quad \frac{MS_{among} - MS_{within}}{n} \leq u_{bb}^2 \leq S_{bb}^2 + \frac{S_r^2}{n} \quad (2)$$

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \sqrt[4]{\frac{2}{vMS_{within}}} \quad (3)$$

40

3.6. Thẩm định:

Thẩm định liên Phòng thí nghiệm (3 PTN; $n = 6$)

X: có tham gia đánh giá

Tên phòng thí nghiệm	Chất điều chế				
	<i>Berberin</i>	<i>A. oleanolic</i>	<i>Curcumin I</i>	<i>G-Rg₁</i>	<i>G-Rb₁</i>
Phòng KTCL (Mekophar)	X	X	X	X	X
Phòng KTCL (OPC)		X			
Khoa TLCC & CĐC (VKN thuốc TP. HCM)	X	X	X	X	X
Khoa KN CDBC (VKN thuốc)	X		X	X	X

Tên phòng thí nghiệm	Chất điều chế				
	<i>Asiaticosid</i>	<i>Damna-canthal</i>	Diosgenin	<i>Hes-peridin</i>	<i>M-R2</i>
Phòng KTCL (Mekophar)	X	X	X	X	X
Phòng KTCL (OPC)					
Khoa TLCC & CĐC (VKN thuốc TP. HCM)	X	X	X	X	X
Khoa KN CDBC (VKN thuốc)	X	X	X	X	X

❖ **Đánh giá kết quả của 3 PTN (n = 6 x 3 = 18):**

Phân tích phương sai một yếu tố (Anova)

- $F_{tn} \leq F_{tc} \rightarrow$ khác nhau không có nghĩa
- $F_{tn} > F_{tc} \rightarrow$ khác nhau có nghĩa

❖ **Xác định giá trị ấn định (ISO 13528)**

- Tính x^* và s^* theo ISO 13528
- Chọn x^* khi s^* không đổi

$$\text{Tính } z = \frac{\bar{x} - x^*}{s}$$

- Chọn x : $|z| < 2 \rightarrow$ tính trung bình

3.7. Điều chế Ginsenosid-Rb₁

3.7.1. Điều chế:

Cao tam thất Sắc ký cột silica gel 11 phân đoạn

PD K $\xrightarrow[\text{ODS}]{\text{HPLC điều chế}}$ 3,5 g G-Rb₁
(Bột màu trắng)

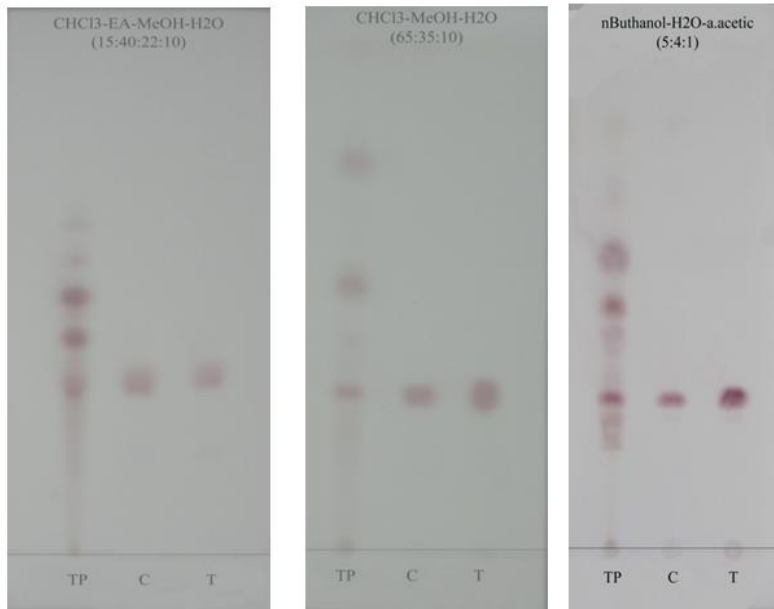


Ginsenosid-Rb₁

3.7.2. Định tính và xác định cấu trúc:

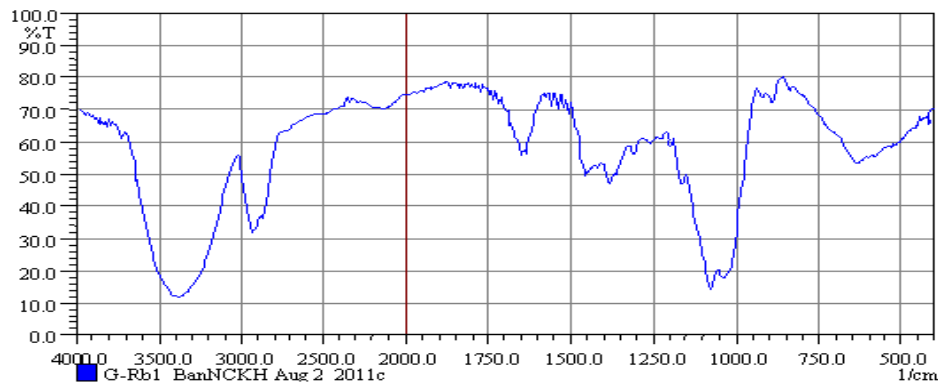
SKLM	Kiểm tra với 3 hệ dung môi \rightarrow 1 vết
HPLC	t_R (thử) \equiv t_R (chuẩn)
IR	Phổ IR: phổ thử tương đồng phổ chuẩn
HR-MS	$[M+Na] = 1131,5887 \rightarrow C_{54}H_{92}O_{23}$
NMR	Phổ ^{13}C -NMR: Phổ thử tương đồng phổ chuẩn

❖ **SKLM:**

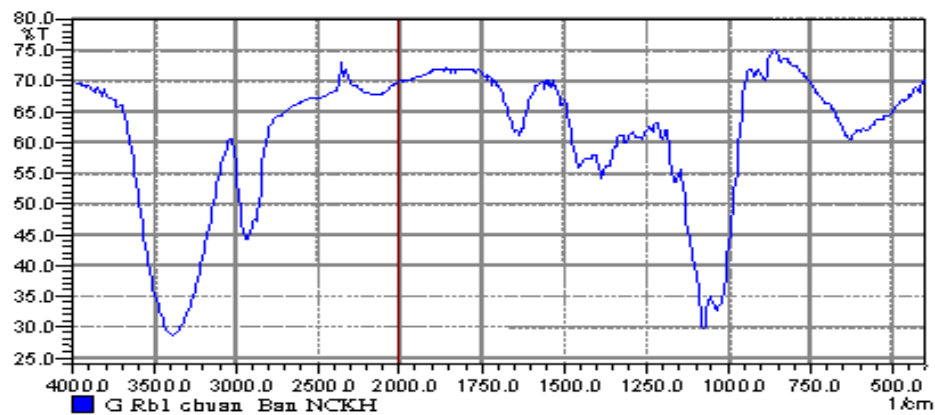


TP: Toàn phần
 C: Chuẩn G-Rb₁
 T: G-Rb₁ điều chế
 Phát hiện:
 TT H₂SO₄ 20%/EtOH
 50%, sấy 110°C trong
 10-15 phút

❖ **Phổ IR – Ginsenosid-Rb1:**

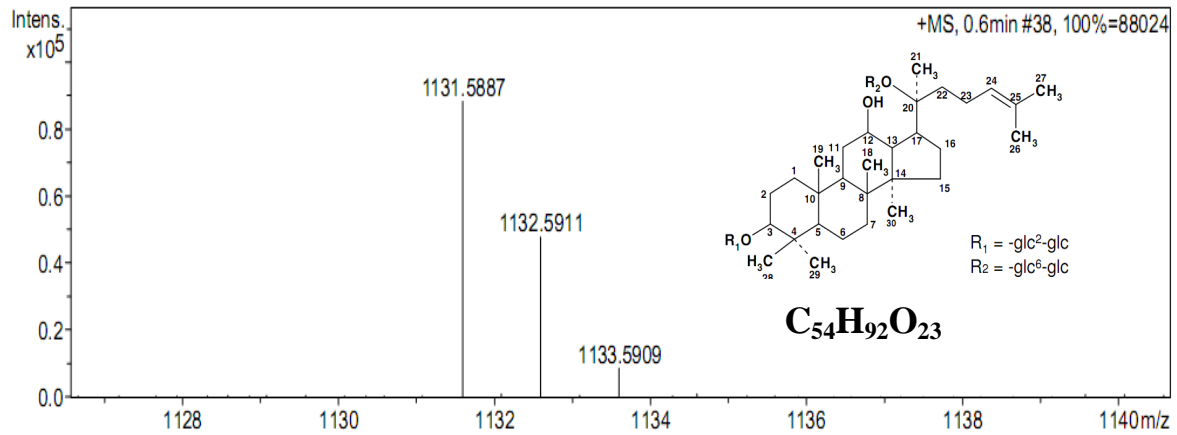


Mẫu thử



**Mẫu chuẩn
 (Chromadex, Hoa
 kỳ)**

❖ **HR-MS Ginsenosid-Rb₁:**



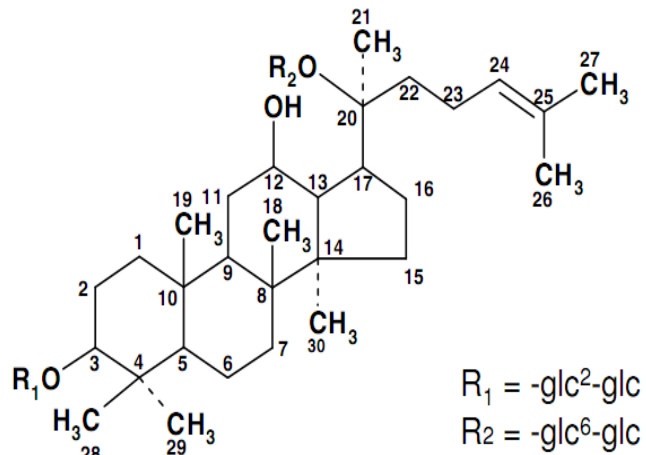
Resolving power: 2264

Isotope threshold [%]: 0.1

Hill sorted sum formula: C₅₄H₉₂Na₁O₂₃

Elemental composition: C 57.28% H 8.19% Na 2.03% O 32.50%

❖ **NMR – Ginsenosid-Rb₁ :**



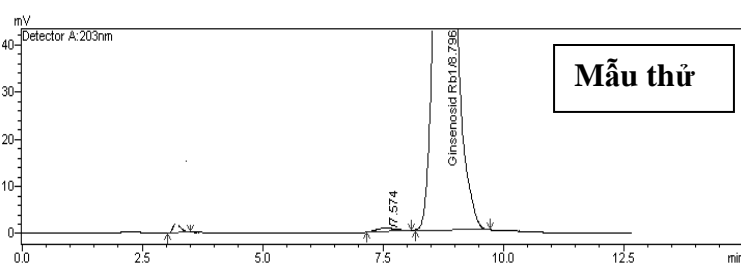
Aglycon			Đường		
Vị trí	G-Rb ₁ [19]	G-Rb ₁ đ chế	Vị trí	G-Rb ₁ [19]	G-Rb ₁ đ chế
1	39,2	40,3	3-Glc1	105,0	104,7
2	26,6	25,9	2	83,4	81,5
3	89,0	91,3	3	77,9 ^{a)}	78,0
4	39,7	40,6	4	71,6	71,8
5	56,4	57,6	5	78,0 ^{a)}	78,2
6	18,4	19,2	6	62,7 ^{b)}	62,9
7	35,1	35,9	Glc 1	105,9	105,4
8	40,0	41,0	2	77,0	77,7
9	50,2	51,2	3	79,2 ^{a)}	79,0
10	36,9	36,9	4	71,6	71,7
11	30,7	30,9	5	78,2 ^{a)}	78,1
12	70,1	70,4	6	62,8 ^{b)}	63,1
13	49,5	49,8	20-Glc1	98,0	98,1
14	51,4	51,1	2	75,1	75,3
15	30,7	31,5	3	77,9 ^{a)}	77,9
16	26,7	27,3	4	71,6	71,7
17	51,6	52,5	5	77,0 ^{a)}	76,9
18	16,2 ^{a)}	16,7	6	71,5	71,7
19	16,0 ^{a)}	16,4	Glc 1	105,4	105,0
20	83,5	85,0	2	75,1	75,2
21	22,4	22,6	3	78,3 ^{a)}	78,5
22	36,2	36,8	4	71,6	71,8
23	23,2	23,9	5	78,2 ^{a)}	78,6

24	125,9	126,0	6	62,8 ^{b)}	63,1
25	131,0	132,2			
26	25,8	25,9			
27	17,9 ^{a)}	17,4			
28	28,1	28,4			
29	16,6 ^{a)}	16,7			
30	17,9 ^{a)}	18,1			

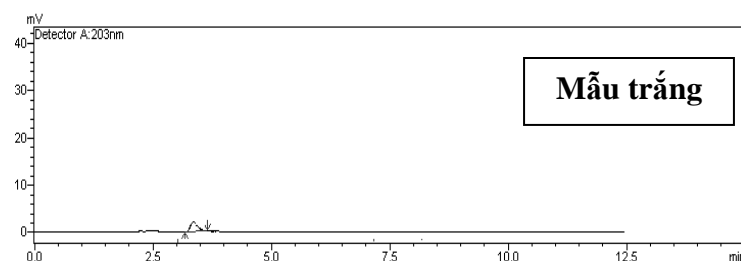
3.7.3. Đánh giá ginsenosid-Rg₁ điều chế

Thẩm định quy trình định lượng:

Tương thích hệ thống	RSD(t _R) = 0,61% < 1% RSD(S _{pic}) = 0,43% < 2%
Tính đặc hiệu	Đạt
Độ lặp lại	RSD = 0,71% < 2,0%
Tính tuyến tính	R ² = 0,998 > 0,995
Độ đúng	100,30%
Tạp chất liên quan	0,45% (< 2%)
Định lượng	98,80%



Sắc ký đồ xác định tạp chất trong G-Rb₁



→ G-Rb₁ đủ điều kiện thiết lập chất chuẩn

3.7.4. Đóng lọ và đánh giá đồng nhất lọ

Khối lượng ban đầu	3,5 g
Khối lượng đóng lọ	10 mg/lọ
Số lọ đóng được	100 lọ
Khối lượng còn lại	2,5 g

→ Số lọ cần lấy đánh giá đồng nhất lọ $\sqrt{N} - 1 = 11$ lọ

→ Số thứ tự các lọ đã lấy mẫu đánh giá đồng nhất:

03, 11, 12, 32, 33, 40, 64, 72, 74, 81, 83 (ngẫu nhiên)

Lọ	X ₁ (%)	X ₂ (%)
3	100,19	99,22
11	98,75	99,72
12	99,89	98,94
32	100,27	99,49
33	98,74	99,68
40	99,85	100,72
64	100,53	99,19
72	99,54	99,47
74	100,28	99,38
81	99,30	98,70
83	99,92	98,04

Dixon: Không có giá trị bất thường



$$0,091 < U_{bb}^2 = 0,112 < 0,353$$



→ Các lọ GINSENOSID-Rb₁ đồng nhất

3.7.5. Đánh giá liên phòng thí nghiệm

Mẫu	PTN1 (%)	PTN2 (%)	PTN3 (%)
1	100,19	99,7	98,94
2	98,75	99,58	99,45
3	99,89	98,73	98,66
4	100,27	98,66	98,65
5	98,74	99,02	98,97
6	99,85	98,96	100,3
TB	99,62	99,11	99,16

$$F_{tn} = 3,189$$

$$F_{tc} = 3,682$$

$$F_{tn} < F_{tc}$$

PTN 1: Phòng KTCL, Cty Cổ phần Mekophar.

PTN 2: Khoa thiết lập CC&CDC, Viện KNT TP. HCM.

PTN 3: Khoa KNCác DBC, Viện KNTTP. HCM.

→ **Kết quả 3 phòng thí nghiệm khác nhau không có ý nghĩa**

3.7.6. Xác định giá trị ấn định:

Số lần thay đổi: 2

x^* : 99.20%

s^* : 0.529

z : loại $x=100.27$ và $x=100.30$

Hàm lượng trung bình : $X = 99,17\%$ ($n = 16$)

Độ lệch : $s = 0,52$

Độ không đảm bảo đo : $\mu = 0,156$

→ **GINSENOSID-Rb₁ điều chế đạt TCCS (p) và đủ điều kiện đăng ký chuẩn quốc gia**

3.7.7. Công bố chất chuẩn, dán nhãn:

Nhãn chất chuẩn gồm những thông tin:

- ✓ Tên chất chuẩn
- ✓ Khối lượng
- ✓ Hàm lượng
- ✓ Số lô
- ✓ Hạn dùng



- ✓ Xuất xứ
- ✓ “CHỈ DÙNG CHO NGHIÊN CỨU”

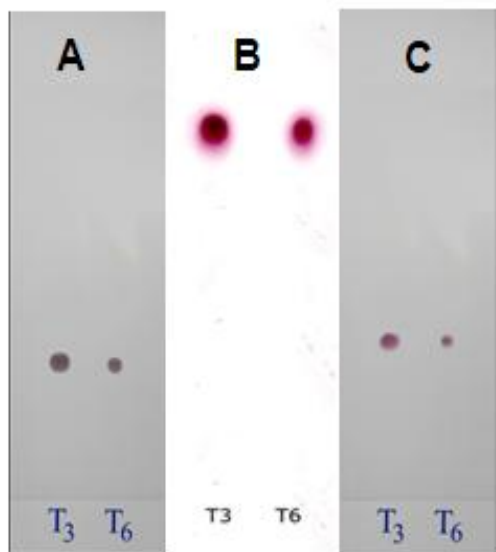
Bảo quản: 2 – 8 °C, tránh ánh sáng, lọ kín

Hạn tái kiểm: 2 năm (điều chỉnh theo thực tế khi có kết quả thử độ ổn định)

3.7.8. Theo dõi độ ổn định:

Ở điều kiện lão hóa cấp tốc t°: 40 ± 2 °C; RH: 75 ± 5%.

❖ SKLM



(A) CHCl₃ – MeOH – H₂O (65:35:10, lớp dưới).

(B) CHCl₃– Et₂OAc – MeOH– H₂O (15:40:22:10).

(C) n-BuOH – H₂O – CH₃COOH (5:4:1, lớp trên).

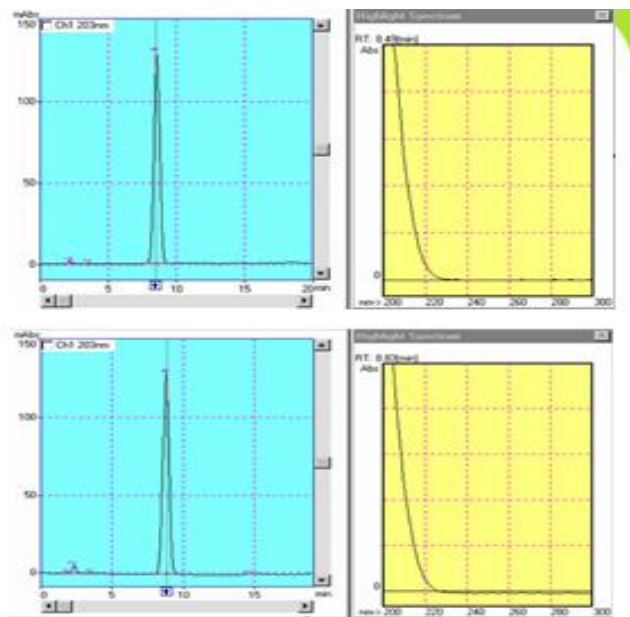
T₃: ginsenosid-Rb₁ ở thời điểm 3 tháng

T₆: ginsenosid-Rb₁ ở thời điểm 6 tháng

Thuốc thử phát hiện: Acid sulfuric
20%/EtOH 50%, sấy 110°C

→ Ở thời điểm T₃ và T₆ ginsenosid-Rb₁ chỉ cho 1 vết duy nhất trên sắc đồ SKLM

❖ HPLC:



Sắc ký đồ HPLC của G-Rb₁ ở thời điểm T₃ (trên) và T₆ (dưới) chỉ cho 1 pic duy nhất

Thời gian (tháng)	Hàm lượng (%)
0	99,55
3	99,29
6	97,23

Đánh giá sự khác biệt về hàm lượng bằng test Student ($n = 6/\text{mẫu thử}$) → Không có sự khác biệt có ý nghĩa.

Kết luận: Chất chuẩn G-Rb₁, lọ 10 mg, lô GRb₁.Ref.012011, hàm lượng: 99,17%, ổn định ở điều kiện lão hóa cấp tốc ($t: 40 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{RH} = 75 \pm 5\%$) trong 6 tháng. Độ ổn định G-Rb₁ đang được tiếp tục theo dõi.

3.8. Kết luận:

– Đã chiết xuất, phân lập, điều chế được 10 hợp chất tinh khiết từ dược liệu gồm acid oleanolic, asiaticosid, berberin chlorid, curcumin I, damnacanthal, diosgenin, hesperidin, ginsenosid-Rb₁, ginsenosid-Rg₁ và majonosid-R2 đạt yêu cầu số lượng & chất lượng dự án đã đặt ra.

– Đã thẩm định 10 chất chuẩn trên theo đầy đủ các tiêu chí của chất chuẩn gốc (primary standards) theo TCCS và tiến tới đăng ký chất chuẩn quốc gia.

Thông tin chung các chất chuẩn đã điều chế:

TT	Chất chuẩn	Khối lượng (g)/chỉ tiêu dự án (g)	Hàm lượng hiện trạng (%)	Số lọ đã đóng	Lượng còn lại (g)	Thẩm định liên PTN	Độ ổn định (PP lão hóa cấp tốc) đạt yêu cầu
1	Acid oleanolic	10,77/10	105,0	100 lọ x 10 mg	9,77	Đạt	T ₃ , T ₆
2	Asiaticosid	10,44/10	98,64	100 lọ x 10 mg	9,44	Đạt	T ₃
3	Berberin chlorid	10,93/10	93,73 (101,8 khan)	100 lọ x 20 mg	8,93	Đạt	T ₃ , T ₆
4	Curcumin I	11,97/10	98,9	100 lọ x 20 mg	9,97	Đạt	T ₃ , T ₆
5	Damnacanthal	11,87/10	97,78	100 lọ x 10 mg	10,87	Đạt	T ₃
6	Diosgenin	15,54/10	98,68	100 lọ x 10 mg	14,54	Đạt	T ₃
7	Hesperidin	10,67/10	94,43	100 lọ x 10 mg	6,67	Đạt	T ₃
8	Ginsenosid-Rb ₁	3,50/2	99,1	100 lọ x 10 mg	2,50	Đạt	T ₃ , T ₆
9	Ginsenosid-Rg ₁	3,30/2	96,43	100 lọ x 10 mg	2,30	Đạt	T ₃ , T ₆
10	Majonosid-R2	1,09/1	98,86	80 lọ x 10 mg	0,29	Đạt	T ₃

– Đã xây dựng thiết lập quy trình điều chế ổn định, kinh tế, có tính lặp lại cao cho 10 chất chuẩn. Đặc biệt, đã áp dụng phương pháp HPLC điều chế đã được áp dụng một cách hiệu quả để tinh chế majonosid-R2, asiaticosid, ginsenosid-Rb₁, ginsenosid-Rg₁ ... giúp tiết kiệm thời gian, chi phí và thu được các chất chuẩn có độ tinh khiết cao.

– Quá trình điều chế các chất chuẩn trên còn giúp thu được các phân đoạn giàu chất hoặc các chất khá sạch có tầm quan trọng như nordamnacanthal, acid asiatic, madecassosid, ginsenosid-Rd... Các phân đoạn hoặc các chất này sẽ được tiếp tục sử dụng để điều chế chất chuẩn phục vụ nghiên cứu, kiểm nghiệm dược liệu và đông dược.

– Đã xây dựng và thẩm định phương pháp định lượng HPLC cho 7 hợp chất chưa được đề cập trong Dược điển Việt Nam IV gồm acid oleanolic, asiaticosid, curcumin I, diosgenin, hesperidin, damnacanthal và majonosid – R2. Kết quả này có thể đóng góp cho việc xây dựng các chuyên luận dược điển trong thời gian đến.

– Đã xây dựng quy trình thiết lập các chất chuẩn gốc (P) theo TCCS, áp dụng đầy đủ các tiêu chí đánh giá:

- ✓ Bộ dữ liệu hóa lý (điểm chảy, các phổ UV, IR, NMR và MS)
- ✓ Đánh giá tạp chất
- ✓ Định tính & Định lượng
- ✓ Xác định độ đồng nhất giữa các lọ chuẩn trong một lô
- ✓ Thẩm định liên phòng thí nghiệm (lần đầu tiên tiến hành tại 3 phòng thí nghiệm độc lập, đạt tiêu chuẩn GLP/ISO).

– SAPHARCEN đã ký kết hợp đồng với Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. HCM “Nghiên cứu Khoa học và Phát triển Công nghệ Sản xuất Chất đối chiếu”, số 232/HĐ-VKNT, ngày 01/6/2012, để phân phối độc quyền 10 chất chuẩn trên phạm vi toàn quốc để phục vụ nhu cầu nghiên cứu, tiêu chuẩn hóa, kiểm nghiệm dược liệu và các chế phẩm đông dược.



– Hiện các chất chuẩn của dự án đã được đưa vào phân phối tại Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP HCM và đã mang lại nguồn thu cho dự án.

– Danh sách các chất chuẩn thiết lập đạt yêu cầu đăng ký chất chuẩn quốc gia (thẩm định liên phòng TN)

STT	Tên chất chuẩn	Dùng nghiên cứu kiểm định DL và các chế phẩm chứa
1	Acid oleanolic	Nhiều DL, nhất là các dược liệu họ Araliaceae
2	Asiaticosid	Rau má, Ngũ gia bì chân chim
3	Berberin sulfat	Vàng đắng, Hoàng liên, <i>Hydrastis</i> spp, <i>Tinospora</i> spp ...

4	Curcumin I	Nghệ (lượng sử dụng rất lớn, hàng nghìn tấn/năm)
5	Damnacanthal	Rễ nhàu
6	Diosgenin	Mía dò, Tỳ giải, các loài Củ mài (<i>Dioscorea spp.</i>)
7	Hesperidin	Các dược liệu thuộc chi <i>Citrus</i>
8	Ginsenosid-Rb ₁	Nhân sâm, Tam thất, Sâm Mỹ, Sâm Việt nam, <i>Panax spp</i>
9	Ginsenosid-Rg ₁	Nhân sâm, Tam thất, Sâm Mỹ, Sâm Việt nam, <i>Panax spp</i>
10	Majonosid-R2	Sâm Việt nam, <i>P. japonicus var major ...</i>

NM Đức và CS. (từ 2003-2012)

– Danh sách các chất chuẩn khác đạt chuẩn làm việc (HL ≥ 95%):

STT	Tên chất chuẩn	Dùng nghiên cứu kiểm định DL và các chế phẩm chứa
1	Acid asiatic	Rau má
2	Allicin	Tỏi
3	Eleutherin	Sâm đại hành
4	Eleutherol	Sâm đại hành
5	Eucalyptol	Bạch đàn, <i>Eucalytus spp.</i>
6	Ginsenosid-Rd	Nhân sâm, Tam thất, Sâm Mỹ, Sâm Việt nam, <i>Panax spp</i>
7	Ginsenosid-Re	Nhân sâm, Tam thất, Sâm Mỹ, Sâm Việt nam, <i>Panax spp</i>
8	Isoeleutherin	Sâm đại hành
9	Madecassosid	Rau má
10	Notoginsenosid-R1	Tam thất, Sâm Việt nam, <i>Panax spp</i>
11	1-metoxo-2-metyl-3-hydroxyantraquinon	Quả Nhàu
12	Naringin	Các loài <i>Citrus spp</i>
13	Nor-damnacanthal	Rễ Nhàu
14	Phyllanthin	Diệp hạ châu
15	Quercetin	Các loài <i>Citrus</i> , nhiều rau, quả
16	Rotundin sulfat	Bình vôi
17	Rutin	Hoa hòe, Lúa mạch ba góc ...
18	Scopoletin	Quả Nhàu
19	Soranjidiol	Quả Nhàu

20	Tanshinon IIA	Đan sâm
21	Acid salvianolic B	Đan sâm
22	Glycyrrhizin	Cam thảo
23	Acid glycyrrhetic	Cam thảo
24	Bacalein	
25	Baicalin	
26	Isovitexin	Kim Tiền Thảo
27	Afzelin	Rau sam
..

– Hiện nay Ban NCKH-TV Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. HCM đang hợp đồng sản xuất chất chuẩn cho các đơn vị như Công ty Thiên Dược, Danapha ...

– Bên cạnh điều chế chất chuẩn theo hợp đồng, Ban NCKH-TV Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. HCM còn xây dựng phương pháp kiểm nghiệm dược liệu và đông dược dựa vào chất chuẩn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. GS.TS.Nguyễn Minh Đức; *Tổng quan chất chuẩn*; 2013.
2. Trung tâm Thông tin Khoa học & Công nghệ TP.HCM; *Phân tích xu hướng nghiên cứu điều chế và thiết lập chất chuẩn để phục vụ công tác nghiên cứu và kiểm nghiệm trên cơ sở số liệu sáng chế quốc tế*; 2013.
3. GS.TS.Nguyễn Minh Đức; *Tình hình điều chế và thiết lập chất chuẩn thiên nhiên ở Việt Nam*; 2013.
4. GS.TS.Nguyễn Minh Đức; *Kết quả nghiên cứu điều chế và thiết lập chất chuẩn thiên nhiên phục vụ công tác nghiên cứu, kiểm nghiệm và tiêu chuẩn hóa dược liệu và đông dược tại Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh*; 2013.
5. CN101830997 - Phương pháp bào chế chất đối chiếu saponin triterpen từ loài *Clematis* Đông Bắc.
6. CN102584963 - Phương pháp điều chế và ứng dụng chất chuẩn đối chiếu peptid hoạt động của nấm Linh chi (*Ganoderma lucidum*).
7. CN102391328 - Phương pháp điều chế đồng thời các chất chuẩn hóa học magnolosid A và magnolosid B.
8. CN101462937 - Điều chế các chất chuẩn đối chiếu emodin, emodin-8-O-b-D-glucosid và polydatin.
9. CN101560174 - Phương pháp và công nghệ điều chế chất chuẩn đối chiếu alliin.
10. CN102040613 - Chất chuẩn đối chiếu picrinin trong lá *Alstonia* và phương pháp điều chế.
11. CN102070683 - Phương pháp điều chế đồng thời các chất chuẩn đối chiếu hóa học parishin, parishin B và parishin C.