

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

HỨA HOÀNG OANH

PHÂN LẬP MỘT SỐ HỢP CHẤT TAXOID TỪ LÁ
THÔNG ĐỎ LÁ DÀI (*TAXUS WALLICHIANA*
ZUCC.) TRỒNG Ở LÂM ĐỒNG,
ĐỊNH HƯỚNG THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU

Ngành: Kiểm nghiệm thuốc

Mã số: 62720410

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. Hồ Chí Minh, năm 2020

Công trình được hoàn thành tại:
Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học: PGS. TS. Nguyễn Phương Dung

Phản biện 1:

Phản biện 2

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường họp 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. HCM
- Thư viện Đại học Y Dược TP. HCM

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Theo các nhà khoa học, các loài Thông đỏ (*Taxus sp.*) có chứa taxoid là nhóm hợp chất chính yếu gồm cả paclitaxel, 10-deacetyl baccatin III (10-DAB, tiền chất tổng hợp paclitaxel) để sản xuất Taxol® và các dẫn xuất taxoid khác (docetaxel) làm thuốc chữa trị ung thư như: Ung thư buồng trứng, ung thư vú, ung thư phổi, v.v... Do có giá trị kinh tế cao nên Thông đỏ bị lạm dụng khai thác, đặc biệt là ở vùng Himalaya và Trung Quốc, nguồn dược liệu thiên nhiên này trở nên khan hiếm và bị đe dọa tuyệt chủng.

Ở Việt Nam, Trung tâm trồng và chế biến cây thuốc Đà Lạt trồng Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) nhằm cung cấp nguyên liệu phục vụ cho chiết tách taxol và các hợp chất taxoid trong sản xuất thuốc điều trị ung thư. Vì thế, đề tài: “Phân lập một số hợp chất taxoid từ lá Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) trồng ở Lâm Đồng, định hướng thiết lập chất đối chiếu” được thực hiện với các mục tiêu sau:

1. Chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc một số hợp chất taxoid từ lá Thông đỏ lá dài trồng ở Lâm Đồng.
2. Thiết lập một số chất đối chiếu được phân lập từ lá Thông đỏ.
3. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời taxol và một số taxoid phân lập được từ lá Thông đỏ.

2. Tính cấp thiết của đề tài

Theo yêu cầu GMP của WHO trong sản xuất, việc đánh giá chất lượng các cây thuốc và các chế phẩm phải dựa vào hàm lượng hoạt chất (hoặc chất đánh dấu sinh học). Ngoài ra, các lĩnh vực khác như trồng trọt, nghiên cứu cây thông đỏ cũng cần theo dõi, đánh giá chất lượng các mẫu nghiên cứu. Để đánh giá được chất lượng thông đỏ

trồng ở Lâm Đồng và các chế phẩm cần phải có chất chuẩn bao gồm các taxoid chủ yếu: Taxol, 10-deacetyl baccatin III (10-DAB), v.v. và một số tạp chất chuẩn đặc trưng cho thông đo ở Việt Nam. Hiện nay, các nhà khoa học Việt Nam đã thành công trong việc chiết xuất, phân lập được một số hợp chất taxoid. Vì vậy, việc chiết xuất, phân lập, điều chế các hợp chất taxoid chuẩn để kiểm định và nghiên cứu thông đo ở Việt Nam là hết sức cấp thiết, có ý nghĩa khoa học, thực tế và kinh tế. Các hợp chất taxoid chuẩn đặc trưng cho thông đo ở Việt Nam còn có thể ứng dụng để kiểm định chất lượng của các loại thông đo khác trên thị trường trong và ngoài nước. Trong khi các chất chuẩn dùng cho kiểm nghiệm taxol được dụng theo Dược điển Mỹ có giá thành rất cao.

3. Những đóng góp mới của luận án

Về mặt hóa học: Lần đầu tiên công bố việc phân lập được 2 hợp chất taxoid trong lá *Taxus wallichiana* Zucc. gồm có:

- Taxuspin D
- Taxchinin B

Về mặt thiết lập chất đối chiếu: Lần đầu tiên công bố nghiên cứu thiết lập 4 chất đối chiếu: Taxinin B; 10-.deacetyl taxinin B; taxuspin D, taxuspin F.

Về mặt kiểm nghiệm thuốc: Lần đầu tiên công bố các phương pháp RP-HPLC-PDA xác định đồng thời paclitaxel và 4 hợp chất taxoid: Taxinin B; 10-.deacetyl taxinin B; taxuspin D, taxuspin F.

4. Bố cục của luận án

Luận án gồm: 131 trang, đặt vấn đề 2 trang, tổng quan 29 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 13 trang, kết quả 60 trang, bàn luận 20 trang, kết luận 2 trang và kiến nghị 1 trang. Luận án có 37

bảng, 72 hình, 4 sơ đồ, 120 tài liệu tham khảo (14 tiếng Việt, 106 tiếng Anh), và 4 phụ lục.

NỘI DUNG LUẬN ÁN

Chương 1: TỔNG QUAN

Trình bày những vấn đề sau:

- 1.1. Giới thiệu tổng quan về cây Thông đỏ lá dài (*T. wallichiana*).
- 1.2. Thành phần hóa học trong Thông đỏ.
- 1.3. Tác dụng dược lý của Thông đỏ.
- 1.4. Các nghiên cứu chiết xuất, phân lập hợp chất taxoid từ Thông đỏ.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các hợp chất taxoid.

2.2. Nguyên vật liệu

- Lá cây Thông đỏ thu hái ở Lâm Đồng do Trung tâm trồng và chế biến cây thuốc Đà Lạt-Vimedimex cung cấp.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Nguyên liệu - Dung môi, hóa chất - Trang thiết bị

- Dung môi, hóa chất sử dụng loại kỹ thuật dùng cho chiết xuất, loại phân tích và sắc ký (Merck và JT Baker) dùng cho các kỹ thuật SKLM, UV-Vis, IR, NMR, HPLC,
- Thiết bị chiết xuất và phân tích tại Khoa Dược-Đại học Y Dược TP.HCM, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Viện Kiểm nghiệm thuốc TP.HCM.

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu

2.3.2.1. Chiết tách hợp chất taxoid từ lá Thông đỏ lá dài

Khảo sát sơ bộ các thành phần hóa học trong lá Thông đỏ lá dài

Phân tích sơ bộ theo quy trình phân tích của I. Ciuley được cải tiến bởi Bộ môn Dược liệu, Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. HCM.

Chiết xuất taxoid (diterpen)

Phương pháp dùng dung môi hữu cơ thay đổi độ phân cực

Chiết cao toàn phần bằng phương pháp ngâm lạnh với methanol.

Loại tạp và dầu béo dựa vào độ phân cực:

- Chiết lỏng - lỏng dịch chiết MeOH/nước với dicloromethan.
- Sắc ký cột diaion HP-20, rửa giải lần lượt với các dung môi: Nước, MeOH 20%, MeOH 40%, MeOH 60%, MeOH 80%, MeOH 100%.

Phân lập taxoid

Sử dụng các phương pháp:

- Sắc ký cột cỡ điển (với silica gel 0,040-0,063 mm) để tách các phân đoạn nhỏ tập trung hợp chất taxoid, các hợp chất taxoid kết tinh thô.
- Sắc ký cột áp suất trung bình (MPLC) tách các hợp chất taxoid trong phân đoạn nhỏ thu được sau khi triển khai sắc ký cột cỡ điển.

Tinh chế

Sử dụng phương pháp kết tinh lại trong dung môi thích hợp và phương pháp sắc ký lỏng điều chế.

Xác định cấu trúc hóa học

Xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ nghiệm: UV-Vis, IR, MS, NMR (^1H -NMR, ^{13}C -NMR, DEPT, HSQC, HMBC), đối chiếu với các dữ liệu phổ của taxoid đã công bố.

2.3.2.2. Thiết lập chất đối chiếu

Chiết xuất, phân lập, tinh chế

Chất đối chiếu taxoid phân lập từ lá Thông đỏ lá dài bằng các kỹ thuật sắc ký cột cỡ điển, sắc ký cột trung áp, kết tinh lại, sắc ký lỏng điều chế để đạt độ tinh khiết cao nhất.

Định tính

Đối chiếu các phổ UV-Vis; IR; MS; NMR của các chất nghiên cứu với các dữ liệu phổ từ tài liệu tham khảo.

Đánh giá nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu

Điểm chảy: Phương pháp 1 theo ĐĐVN V.

Đánh giá độ tinh khiết: Phương pháp SKLM, HPLC-PDA. Thẩm định phương pháp: Theo hướng dẫn của ICH.

Đánh giá đồng nhất lô trong quá trình đóng gói chất đối chiếu

Lấy mẫu: Sử dụng cách lấy mẫu ngẫu nhiên theo phần mềm Excel, số lọ được lấy để kiểm tra là $g = N + 1$ lọ, N là số lọ đóng được.

Xác định độ tinh khiết: Áp dụng phương pháp HPLC-PDA đã xây dựng và thẩm định theo ICH.

Đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ: Đánh giá bằng kỹ thuật thống kê ANOVA một yếu tố. Các lọ là đồng nhất khi $F_m < F_{tc}$ ($P = 0,05$).

Đánh giá chất đối chiếu thông qua liên phòng thí nghiệm

Tiến hành xác định độ tinh khiết tại ba phòng thí nghiệm độc lập đạt tiêu chuẩn GLP hoặc ISO/IEC17025. Đánh giá kết quả bằng kỹ thuật thống kê ANOVA một yếu tố, so sánh 2 giá trị F_m và F_{tc} .

Xác định giá trị ấn định và độ không đảm bảo đo

Xác định giá trị ấn định và độ không đảm bảo đo theo ISO 13528.

Định lượng

Do không có chất chuẩn nên hàm lượng % tính trên nguyên trạng (theo hướng dẫn của WHO).

2.3.2.3. *Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời các taxoid bằng phương pháp HPLC*

Khảo sát chọn chương trình dung môi: Thay đổi tỷ lệ pha động, chọn điều kiện để pic đạt độ phân giải tối thiểu 1,5.

Khảo sát chọn quy trình phân tích: Thử nghiệm chương trình gradient và đẳng dòng.

Khảo sát bước sóng phát hiện: Gần với cực đại hấp thụ của các chất.

Khảo sát tốc độ dòng: Triển khai trên mẫu thử với tốc độ dòng tăng dần từ 0,8 ml/phút; 1 ml/phút; 1,2 ml/phút để lựa chọn được tốc độ dòng phù hợp.

Thẩm định quy trình

- Tính phù hợp của hệ thống

Yêu cầu: Hệ số đối xứng của pic $0,8 \leq A_s \leq 1,5$; %RSD diện tích pic $\leq 2,0$; số đĩa lý thuyết ≥ 2000 .

- Tính đặc hiệu: Sắc ký đồ pha động và dung môi pha mẫu không xuất hiện tín hiệu trùng với thời gian lưu của chất cần phân tích trong mẫu thử và mẫu đối chiếu. Độ tinh khiết của pic chất cần phân tích trong sắc ký đồ mẫu thử: $> 0,99$. Độ phân giải giữa pic chất cần phân và các pic liền kề trong sắc ký đồ mẫu thử: $\geq 1,5$.

- Tính tuyến tính: $r > 0,995$.

- Độ chính xác:

+ Độ lặp lại: $\%RSD \leq 3,0$

+ Độ chính xác trung gian: Kết quả giữa các kiểm nghiệm viên khác biệt không có ý nghĩa thống kê: F test ($P = 0,05$)

- Độ đúng: Tỷ lệ phục hồi 98% - 102%; $\%RSD \leq 2,0$.

- Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng:

$$LOD = \frac{3,3 \times \delta}{a} \quad \text{và} \quad LOQ = \frac{10 \times \delta}{a}$$

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Chiết xuất, phân lập taxoid trong lá thông đỏ lá dài

3.1.1. Khảo sát sơ bộ thành phần hóa học

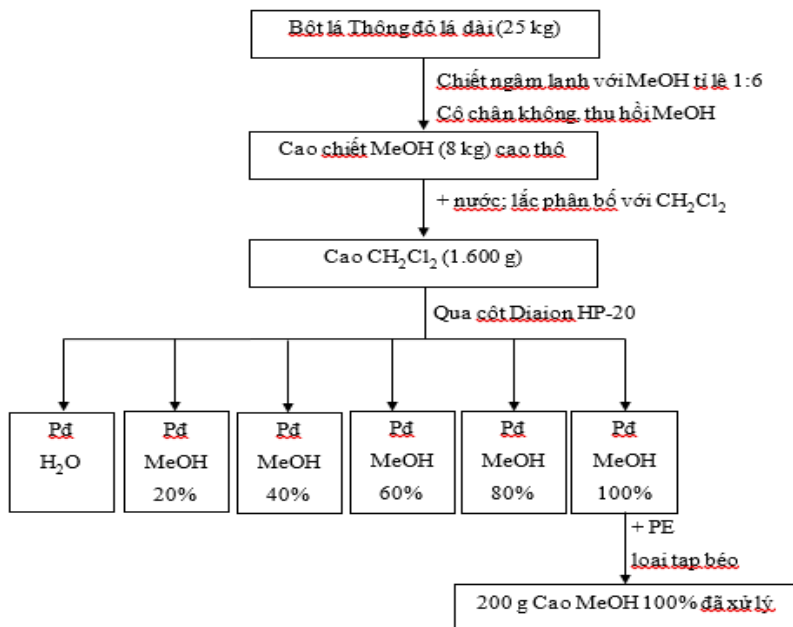
Bảng 3.1. Kết quả định tính thành phần hóa học trên các dịch chiết

Nhóm hợp chất	Dich chiết ether	Kết quả định tính trên các dịch chiết				Kết luận
		Dich chiết ethanol		Dich chiết nước		
		Chưa thủy phân	Đã thủy phân	Chưa thủy phân	Đã thủy phân	
Tinh dầu	++					++
Triterpenoid	+++		+++		++	+++
Alkaloid	+	+		-		+
Coumarin	+++	++	+++			+++
Anthraquinon	-		-		-	-
Flavonoid	-	++	-	+++	-	++
Proanthocyanidin		+++		+++		+++
Polyphenol		+++		+++		+++
Tannin		-		+		±
Saponin		+++		+++		+++
Acid hữu cơ		-		-		-

Ghi chú: (-): Không có (+): Có ít (++) : Có nhiều
(±): Không rõ (+++): Có rất nhiều

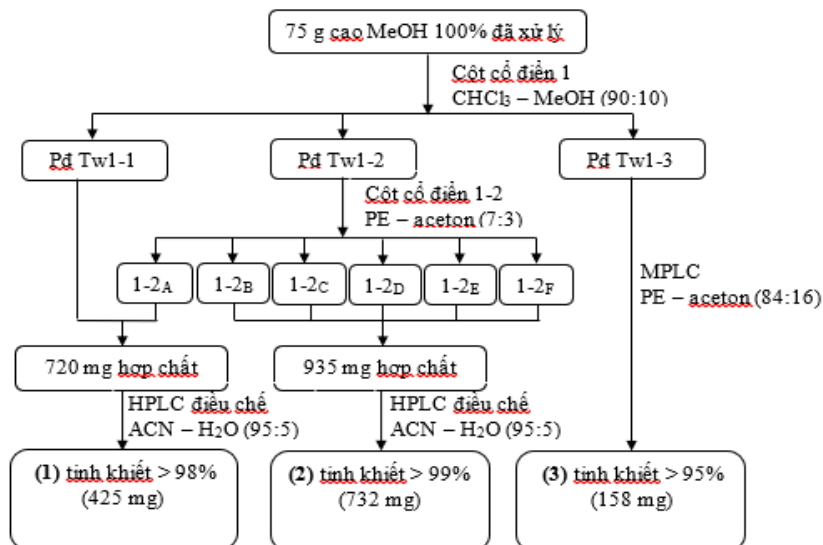
 Có thể có phản ứng nhưng không thực hiện

3.1.1.2. Chiết taxoid thô bằng phương pháp thay đổi độ phân cực dung môi

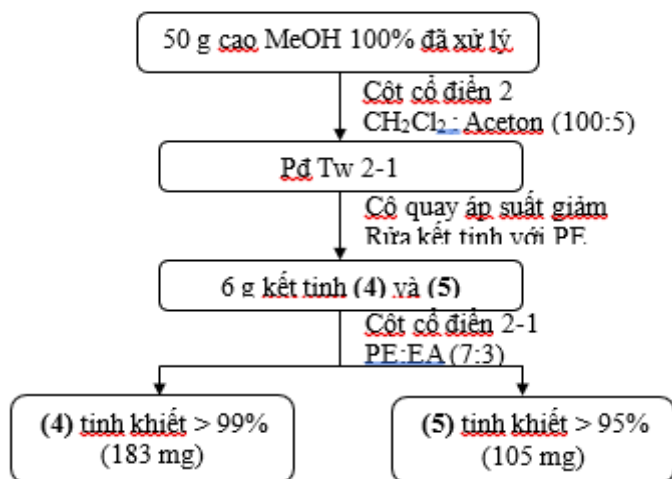


3.1.2. Phân lập các hợp chất taxoid từ lá Thông đỏ lá dài

3.1.2.1. Phân lập bằng phương pháp sắc ký cột cổ điển (SKC) và sắc ký cột áp suất trung bình (MPLC)



Sơ đồ phân lập các hợp chất taxoid bằng SKC cổ điển 1 và MPLC



Sơ đồ phân lập các hợp chất taxoid bằng SKC cổ điển 2

3.1.2.2. *Tinh chế các hợp chất taxoid sau khi phân lập*

Các hợp chất sau phân lập được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại trong dung môi và bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế để đạt độ tinh khiết cao trên HPLC.

3.1.2.3. *Xác định cấu trúc các hợp chất taxoid được phân lập*

Các hằng số vật lý và dữ liệu phổ của hợp chất **(1)**, **(2)** tóm tắt trong bảng sau:

	(1) – taxinin B	(2) – taxuspin F
Mô tả	Bột vô định hình, màu trắng,	Kết tinh dạng bột, màu trắng
Điểm chảy	203 -205 °C	242-244 °C
UV (MeOH)	217 và 279 nm	267 nm
IR (KBr, cm ⁻¹)	1667, 1636, 1128 và 1041	3450, 1747 và 1679, 1199
EI-MS <i>m/z</i>	664, 359, 274, 240	534, 359, 274, 240
¹ H-NMR (δ_H , ppm; <i>J</i> , Hz)	(CDCl ₃ , 500 MHz): 1,15 (s); 1,77 (s); 2,38 (s); 1,03 (s); 6,45 (d; 16,0); 7,69 (d; 16,0); 7,47 (m); 7,78 (d; 7,0); 7,44 (m); 2,08 (s) x 4; 5,63 (dd; 1,5; 6,5); 5,39 (t, 3); 5,45 (dd; 6; 11); 5,94 (d; 10,5); 6,25 (d; 10,5); 1,77 (m); 2,39 (d; 20); 2,85 (dd; 7; 20); 2,25 (d; 1,5; 7); 3,33 (d; 6,5); 4,92 (s); 5,45 (s).	(CDCl ₃ , 500 MHz): 1,74 (s); 1,11 (s); 2,33 (s); 0,98 (s); 2,02 (s); 2,05 (s) x 2; 2,08 (s); 5,60 (dd; 1,5; 6,0); 4,22 (d; 2,5); 5,50 (dd; 5,5; 11,5); 5,90 (d; 11,0); 6,26 (d; 11,0); 1,61 (m); 1,94 (m); 2,33 (d; 19,5); 2,77 (dd; 7,0; 20,0); 2,20 (dd; 2,0; 6,0); 3,53 (d; 6,0); 4,81 (s); 5,23 (s)
¹³ C-NMR (δ_C , ppm)	(CDCl ₃ , 125 MHz): 199,3; 169,3; 169,7; 169,2; 150,5; 138,6; 68,6; 76,2; 69,6; 75,0; 72,8.	(CDCl ₃ , 125 MHz): 199,4; 169,2; 169,3; 169,7; 169,8; 115,5; 139,2; 144,7; 149,8

Các hằng số vật lý và dữ liệu phổ của **(3)** và **(4)** tóm tắt trong bảng sau:

	(3) - 10-deacetyl taxinin B	(4) - taxuspin D
Mô tả	Tinh thể hình kim, màu trắng	Bột mịn, màu trắng
Điểm chảy	239 - 241 °C	230 – 232 °C
UV (EtOH)	274 nm	217, 278 nm
IR (KBr, cm ⁻¹)	3450, 1665, 1639, 1128, 1041	3450, 1653, 1636, 1131, 1038

EI-MS m/z	<u>622</u> , 526, 359, 288, 137	<u>724</u> , 512, 374, 274, 159
$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H} , ppm; J , Hz)	(CDCl_3 , 500 MHz): 1,23 (s); 1,80 (s); 2,24 (s); 1,02 (s); 2,08 (s) x 3; 5,60 (d; 6,0; 3,2); 5,35 (s); 5,38 (m); 5,83 (d; 10,0); 5,30 (t; 3,0); 1,76 (m); 2,08 (m); 2,38 (d; 20,0); 2,86 (dd; 20,0; 7,0); 2,23 (d; 1,5; 7,0); 3,32 (d; 6,0); 4,90 (s); 5,42 (s); 6,44 (d; 15,5); 7,69 (d; 15,5); 7,44 (m); 7,78 (d; 7,0); 7,42 (m); 2,08 (m)	(CDCl_3 , 500 MHz): 1,49 (s); 1,17 (s); 1,60 (s); 1,53 (s); 1,96 (s); 2,10 (s) x 2; 2,00 (s); 2,02 (s); 2,20 (s); 5,80 (d; 7,0); 5,34 (dd; 9,4; 6,2); 4,85 (m); 4,85 (d; 5,0); 5,60 (d; 5,0); 2,07 (m); 2,36 (d; 18,5); 2,57 (dd; 18,5; 7,5); 1,89 (dd; 1,5; 7,5); 3,70 (d; 7,0); 5,20 (s); 5,08 (s); 6,46 (d; 16,0); 7,70 (d; 16,0); 7,54 (m) x 2; 7,40 (m)
$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C} , ppm)	(CDCl_3 , 75 MHz): 199,3; 169,3; 169,7 (x 2); 150,5 138,6 (x 2); 134,5; 129,0 (x 2); 128,6 (x 2); 130,5; 118,8.	(CDCl_3 , 125 MHz): 170,6; 170,2; 169,3; 170,4; 168,5; 124,3; 144,2; 110,9; 50,4; 40,8; 142,6; 134,2; 128,1 (x 2); 128,9 (x 2); 68,4; 67,4; 70,4; 76,7; 78,5; 77,3.

Các hằng số vật lý và dữ liệu phổ của hợp chất **(5)** tóm tắt trong bảng sau:

(5) – taxchinin B

Mô tả	Tinh thể vô định hình, không màu
Điểm chảy	176 - 178 °C
UV (MeOH)	219, 279 nm
IR (KBr, cm^{-1})	3445, 1710, 1667, 1636, 1173, 1041
EI-MS m/z	<u>802</u> , 512, 318, 274, 159
$^1\text{H-NMR}$ (δ_{H} , ppm; J , Hz)	(CDCl_3 , 500 MHz): 1,19 (s); 1,23 (s); 2,01 (s) x 2; 1,72 (s); 4,39 (d; 8,0); 4,50 (d; 8,0); 2,10 (s); 1,76 (s); 6,17 (d; 8,0); 5,01 (d; 8,0); 5,62 (t; 8,3); 6,22 (d; 11,0); 6,61 (d; 11,0); 1,92 (dd; 9,0; 15,5); 2,60 (m); 1,72 (m); 2,45 (dd; 7,5; 14,8); 3,04 (d; 8,0); 6,50 (d; 16,0); 7,70 (d; 16,0); 7,80 (d; 8,0); 7,56 (m).
$^{13}\text{C-NMR}$ (δ_{C} , ppm)	(CDCl_3 , 125 MHz): 67,9; 84,8; 70,6; 76,4; 68,7; 79,1; 134,1; 129,0 (x 2); 130,7; 128,8 (x 2); 129,1; 129,5; 128,2; 133,4; 135,9; 148,2; 170,3; 169,2; 169,8.

3.2. Thiết lập chất đối chiếu

Chiết xuất, phân lập và tinh chế để thu được chất đối chiếu (CDC) tinh khiết. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng với mức chất lượng, chỉ tiêu, phương pháp thử theo hướng dẫn của WHO và ASEAN.

Bảng 3.1. Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của taxinin B (CDC)

Chỉ tiêu	Mức chất lượng
Cảm quan	Kết tinh dạng bột, màu trắng.
Định tính	
<i>Phổ UV-Vis</i>	Phải có các cực đại hấp thụ ở 217 và 279 nm.
<i>Phổ IR</i>	Phải có các đỉnh có số sóng: 1667, 1636, 1128 và 1041 cm^{-1} .
<i>Phổ khối MS</i>	Phải có các pic có m/z 664 $[\text{M}]^+$ (pic căn bản)
<i>Phổ NMR</i>	$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): 1,15 (s); 1,77 (s); 2,38 (s); 1,03 (s); 6,45 (d); 7,69 (d); 7,47 (m); 7,78 (d); 7,44 (m); 2,08 (s) x 4; 5,63 (dd); 5,39 (t); 5,45 (dd); 5,94 (d); 6,25 (d); 1,77 (m); 2,39 (d); 2,85 (dd); 2,25 (d); 3,33 (d); 4,92 (s); 5,45 (s). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): 199,3; 169,3; 169,7; 169,2; 150,5; 138,6; 68,6; 76,2; 69,6; 75,0 và 72,8.
Điểm chảy	203-205 $^{\circ}\text{C}$.
Định lượng	Không ít hơn 95,0%.

Bảng 3.2. Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của taxuspin F (CDC)

Chỉ tiêu	Mức chất lượng
Cảm quan	Kết tinh dạng bột, màu trắng.
Định tính	
<i>Phổ UV-Vis</i>	Phải có các cực đại hấp thụ ở 267 nm.
<i>Phổ IR</i>	Phải có các đỉnh có số sóng: 3450, 1747 và 1679, 1199 cm^{-1} .
<i>Phổ khối lượng</i>	Phải có các pic có m/z 534 $[\text{M}]^+$.

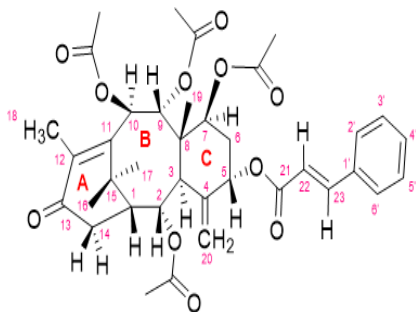
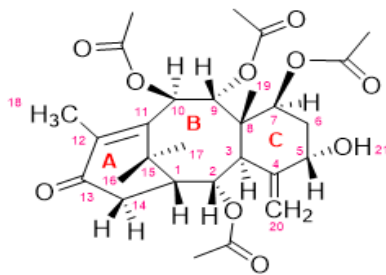
<i>Phổ NMR</i>	$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): 1,74 (s); 1,11 (s); 2,33 (s); 0,98 (s); 2,02 (s); 2,05 (s) x 2; 2,08 (s); 5,60 (dd); 4,22 (d); 5,50 (dd); 5,90 (d); 6,26 (d); 1,61 (m); 1,94 (m); 2,33 (d); 2,77 (dd); 2,20 (d); 3,53 (d); 4,81 (s) và 5,23 (s). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): 199,4; 169,2; 169,3; 169,7; 169,8; 115,5; 139,2; 144,7 và 149,8.
Điểm chảy	242-244 °C.
Định lượng	Không ít hơn 95,0%.

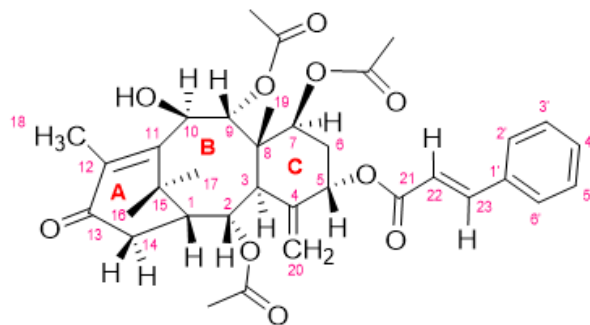
Bảng 3.3. Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của 10-deacetyl taxinin B (CDC)

Chỉ tiêu	Mức chất lượng
Cảm quan	Tinh thể hình kim, màu trắng.
Định tính	
<i>Phổ UV-Vis</i>	Phải có các cực đại hấp thụ ở 274 nm.
<i>Phổ IR</i>	Phải có các đỉnh có số sóng: 3450, 1665, 1639, 1128 và 1041 cm^{-1} .
<i>Phổ khối lượng</i>	Phải có các pic có m/z 622 $[\text{M}]^+$.
<i>Phổ NMR</i>	$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz): 1,23 (s); 1,80 (s); 2,24 (s); 1,02 (s); 2,08 (s) x 3; 5,60 (d); 5,35 (s); 5,38 (m); 5,83 (d); 5,30 (d); 1,76 (m); 2,08 (m); 2,38 (d); 2,86 (dd); 2,23 (d); 3,32 (d); 4,90 (s); 5,42 (s); 6,44 (d); 7,69 (d); 7,44 (m); 7,78 (d); 7,42 (m); 2,08 (m). $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz): 199,3; 169,3; 169,7 (x 2); 150,5 138,6 (x 2); 134,5; 129,0 (x 2); 128,6 (x 2); 130,5 và 118,8.
Điểm chảy	239-241 °C.
Định lượng	Không ít hơn 95,0%.

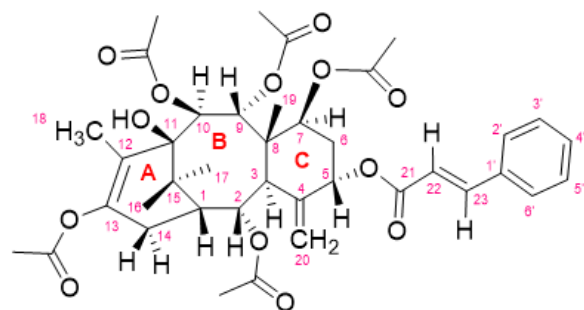
Bảng 3.4. Tóm tắt tiêu chuẩn chất lượng của taxuspin D (CDC)

Chỉ tiêu	Mức chất lượng
Cảm quan	Bột mịn, màu trắng.
Định tính	
Phổ UV-Vis	Phải có các cực đại hấp thụ ở 217 và 278 nm.
Phổ IR	Phải có các đỉnh có số sóng: 3450, 1653, 1636, 1131 và 1038 cm^{-1} .
Phổ khối lượng	Phải có các pic có m/z 724 $[\text{M}]^+$.
Phổ NMR	^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz): 1,49 (s); 1,17 (s); 1,60 (s); 1,53 (s); 1,96 (s); 2,10 (s) x 2; 2,00 (s); 2,02 (s); 2,20 (s); 5,80 (d); 5,34 (dd); 4,85 (m); 4,85 (d); 5,60 (d); 2,07 (m); 2,36 (d); 2,57 (m); 1,89 (d); 3,70 (d); 5,20 (s); 5,08 (s); 6,46 (d); 7,70 (d); 7,54 (m) và 7,40 (m). ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz): 170,6; 170,2; 169,3; 170,4; 168,5; 124,3; 144,2; 110,9; 50,4; 40,8; 142,6; 134,2; 128,1 (x 2); 128,9 (x 2); 68,4; 67,4; 70,4; 76,7; 78,5; và 77,3.
Điểm chảy	230-232 $^{\circ}\text{C}$.
Định lượng	Không ít hơn 95,0%.

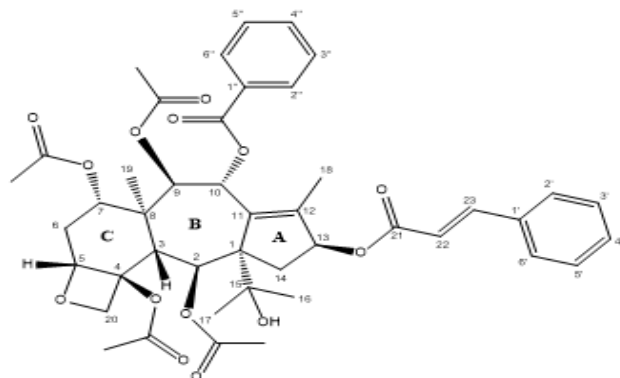
**(1) – Taxinin B****(2) – Taxuspin F**



(3) – 10-Deacetyl taxinin B



(4) – Taxuspin D



(5) – Taxchinin B

Hình 3.1. Cấu trúc hóa học của các hợp chất taxoid được phân lập

3.3. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời các taxoid bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

3.3.1. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời paclitaxel và các taxoid

3.3.1.1. Khảo sát bước sóng phát hiện:

Dựa vào các đỉnh hấp thụ cực đại của paclitaxel và các taxoid để chọn bước sóng phát hiện cho quy trình định lượng: Cột Phenomenex C18, 5 μm , 250 x 4,6 mm, 110 Å. Tốc độ dòng: 1 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu: 10 μl . Nhiệt độ cột: 25 °C. Pha động: ACN – H₂O (60 : 40).

3.3.1.2. Khảo sát pha động:

Mẫu thử được triển khai trên cùng điều kiện sắc ký với các pha động ACN - H₂O có tỷ lệ lần lượt là: 70 : 30; 60 : 40 với cùng tốc độ dòng 1 ml/phút.

3.3.1.3. Khảo sát chương trình triển khai gradient

Các điều kiện: cột Phenomenex C18, 5 μm , 250 x 4,6 mm, 110 Å. Tốc độ dòng: 1 ml/phút. Thể tích tiêm mẫu: 10 μl . Nhiệt độ cột: 25 °C. Pha động: ACN – H₂O với chương trình triển khai gradient:

Thời gian (phút)	H ₂ O (%)	ACN (%)	Chương trình triển khai
0-35	35	65	Đẳng dòng
35-60	35→80	65→20	Gradient
60-70	80→35	20→65	Gradient
70-80	35	65	Đẳng dòng

3.3.1.4. Khảo sát tốc độ dòng

Khảo sát theo chiều tăng của tốc độ dòng: 0,8; 1; 1,2 ml/phút với cùng tỷ lệ pha động ACN – H₂O (60:40).

Dựa vào kết quả khảo sát các điều kiện như trên, quy trình định lượng đồng thời được đề nghị như sau:

Bảng 3.5. Các điều kiện triển khai quy trình định lượng đồng thời

Điều kiện sắc ký	HPLC
Pha tĩnh	Cột Phenomenex C18, 5 μm , 250 x 4,6 mm, 110 Å
Pha động	ACN – H ₂ O (60 : 40)
Nhiệt độ cột	25 °C
Bước sóng phát hiện	227 nm và 280 nm
Tốc độ dòng	1 ml/phút
Thể tích tiêm mẫu	10 μl

3.3.2. Thẩm định quy trình

Thẩm định quy trình theo các chỉ tiêu:

- *Tính phù hợp của hệ thống*

Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống cho thấy sau 6 lần sắc ký các thông số đều nằm trong giới hạn cho phép, $\text{RSD} < 2\%$, $A_s < 1,5$; $N > 2000$.

- *Tính đặc hiệu:* Quy trình có tính đặc hiệu.

- *Tính tuyến tính:* Kết quả khảo sát tính tuyến tính cho thấy có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ các chất đối chiếu và paclitaxel chuẩn cũng như các chất thử trong mẫu và diện tích pic tương ứng với hệ số tương quan $r > 0,995$.

- *Độ chính xác và độ đúng*

Kết quả thống kê cho thấy các quy trình có tỷ lệ hồi phục nằm trong giới hạn cho phép của tỷ lệ hồi phục lý thuyết 90% - 107%; $\text{RSD} <$

2% và RSD < 2% đối với độ lặp lại; RSD < 3% đối với độ chính xác trung gian.

Bảng 3.6. *Kết quả khảo sát tính tuyến tính, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng*

	Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	R²	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
Taxuspin F	25 – 75	1	0,30	1,00
Paclitaxel	25 – 75	0,9997	0,075	0,25
10-deacetyl taxinin B	25 – 75	0,9996	0,06	0,20
Taxuspin D	25 – 75	0,9994	0,075	0,25
Taxinin B	25 – 75	1	0,06	0,20

Ứng dụng

Áp dụng quy trình định lượng đồng thời đã xây dựng và thẩm định để phân tích mẫu thử TW được chiết từ thông đỏ lá dài trồng ở Lâm Đồng.

Tiến hành định lượng mẫu thử thông đỏ. Mỗi mẫu thử tiến hành 3 lần lấy giá trị trung bình.

Bảng 3.7. *Hàm lượng taxoid trong mẫu thử TW*

STT	Tên chất	Diện tích pic	Hàm lượng (mg/g)
1	Taxuspin F	82021	404,49 $\pm$ 7,36
2	Paclitaxel	651359	268,88 $\pm$ 0,81
3	10-deacetyl taxinin B	308751	373,90 $\pm$ 0,71
4	Taxuspin D	282929	459,40 $\pm$ 3,54
5	Taxinin B	394229	431,98 $\pm$ 1,43

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. Chiết xuất, phân lập, xác định cấu trúc và định tính, định lượng taxoid trong lá Thông đỏ lá dài

Luận án đã dùng phương pháp chiết xuất từ lá Thông đỏ lá dài bằng các dung môi hữu cơ có độ phân cực thay đổi như MeOH, CH₂Cl₂ để phân lập được các hợp chất taxoid. Do trong lá Thông đỏ có nhiều tạp như diệp lục tố, dầu béo nên cần xử lý tạp bằng thay đổi dung môi, triển khai qua cột daion HP-20, lắc với ether dầu hỏa. Đề tài đã phân lập và xác định được cấu trúc của 5 hợp chất taxoid trong lá Thông đỏ lá dài: Taxinin B, 10-deacetyl taxinin B, taxuspin D, taxuspin F, taxchinin B. Đây đều là các taxoid có tác dụng dược lý và có triển vọng làm thuốc. Đặc biệt, hai hợp chất taxuspin D và taxchinin B chưa được công bố tìm thấy trong lá Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.).

Để định tính các taxoid trong lá Thông đỏ lá dài trồng ở Lâm Đồng, luận án đã áp dụng hầu hết các phương pháp phổ biến và độ tin cậy cao. Những phương pháp phân tích định tính đã được sử dụng như: SKLM, HPLC-PDA, phổ nghiệm (UV, IR, MS, NMR), điểm chảy của từng hợp chất so sánh với dữ liệu trong tài liệu tham khảo.

Định lượng các taxoid trong nguyên liệu được liệu thường gặp những khó khăn: (1) là hàm lượng taxol rất thấp trong các cây *Taxus*; (2) là chiết xuất từ dược liệu chứa nhiều hợp chất nội sinh khác nhau, và (3), cấu trúc của mỗi taxoid khác nhau rất ít. Vì vậy, định lượng các taxoid bằng HPLC thường các đỉnh phân tách kém và đòi hỏi thời gian phân tích dài. Do đó, các kỹ thuật khác bao gồm SKLM cải tiến, sắc ký điện di MEKC, điện di mao quản, cũng được nghiên cứu.

Nghiên cứu này đã xây dựng phương pháp định lượng các taxoid bằng phương pháp HPLC với cột C18, đầu dò PDA. Do cấu trúc và tính chất lý hóa của các taxoid cần phân tích là những hợp chất mang tính base hữu cơ do có sự hiện diện của nhóm alkanoyl trong cấu trúc và độ phân cực từ trung bình đến phân cực do có các nhóm -OH. Do đó, nghiên cứu định tính, định lượng các taxoid của luận án đã sử dụng kỹ thuật HPLC/PDA pha đảo với cột Phenomenex Gemini RP-C18 (250 x 4,6 mm, 5 μ m) và hệ pha động: ACN – H₂O. Mẫu được chạy theo chương trình đẳng dòng với thời gian phân tích 40 phút/ mẫu, thể tích tiêm mẫu 10 μ l, bước sóng phát hiện: 280 nm.

4.2. Thiết lập chất chuẩn đối chiếu

Các hợp chất taxoid được phân lập trong luận án: Taxinin B, 10-deacetyl taxinin B, taxuspin D, taxuspin F có hàm lượng cao (hơn 150g) và độ tinh khiết trên 95% được chọn để làm nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu. Hiện nay, các hợp chất này cũng chưa thấy có nhà sản xuất hay phân phối chất chuẩn đối chiếu như ChromaDex, Sigma Aldrich, USP, Cerilliant hoặc hai Viện kiểm nghiệm thuốc trung ương và TP.HCM cung cấp.

Luận án đã xây dựng được quy trình chiết xuất, phân lập chất đối chiếu các taxoid trong lá Thông đỏ có tính ổn định, hiệu quả. Các chất được phân lập có độ tinh khiết cao, được xác định bằng phương pháp phổ nghiệm và phân tích HPLC có các giá trị tin cậy cao. Quy trình định lượng các taxoid được xây dựng bằng phương pháp HPLC được thẩm định độ đặc hiệu, tính phù hợp hệ thống, độ lặp lại, khoảng tuyến tính.

4.3. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời

Phương pháp HPLC-PDA

Dược điển Mỹ (từ USP 30 trở đi) là có chuyên luận paclitaxel, đề cập đến định lượng taxol và các tạp chất liên quan. Theo USP (hiện đang lưu hành là USP 42), đối với nguyên liệu được dán nhãn là được phân lập từ nguồn tự nhiên, việc kiểm tra độ tinh khiết và xác định tạp chất liên quan của paclitaxel được tiến hành bằng phương pháp HPLC với điều kiện sắc ký: Cột sắc ký L43 (4,6 mm x 25 cm, 5 μ m), nhiệt độ cột: 30 °C, bước sóng phát hiện: 227 nm, tốc độ dòng: 2,6 ml/phút, thể tích tiêm mẫu: 15 μ l, hệ pha động MeOH-ACN triển khai theo chương trình gradient trong 80 phút/ mẫu.

Luận án xây dựng quy trình định lượng đồng thời bằng HPLC dựa trên chuyên luận paclitaxel của USP 41 và các tài liệu tham khảo. USP sử dụng cột L43 (cột Pentafluorophenyl) là cột chuyên biệt cho taxoid, tuy nhiên giá thành còn cao so với điều kiện trang bị thiết bị ở các phòng thí nghiệm của nước ta. Vì vậy, nghiên cứu này tiến hành xây dựng quy trình định lượng trên cột C18, quy trình định lượng đạt các chỉ tiêu thẩm định về độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ lặp lại, độ đúng.

Kỹ thuật HPLC/PDA trong nghiên cứu này giống với các nghiên cứu đã công bố. Tuy nhiên, nghiên cứu này đã sử dụng pha tĩnh cột C18, pha động ACN-H₂O với chương trình đẳng dòng, thời gian phân tích dưới 30 phút/ mẫu phù hợp hơn để tách đồng thời 05 taxoid (taxinin B, 10-deacetyl taxinin B, taxuspin D, taxuspin F và paclitaxel) trong lá Thông đỏ. Đây là quy trình định tính, định lượng đồng thời trên các taxoid có trong lá Thông đỏ lá dài bằng phương pháp HPLC/PDA mà chưa được công bố bởi tài liệu nào.

Qua khảo sát các yếu tố ảnh hưởng lên khả năng phân tách giữa các pic thì hệ dung môi triển khai đóng vai trò quan trọng. Quy

trình định lượng của luận án triển khai với hệ pha động ACN-H₂O, không sử dụng các hệ đệm có muối vô cơ hay acid để điều chỉnh pH giúp bảo vệ cột phân tích, kéo dài tuổi thọ cột và rút ngắn thời gian vệ sinh hệ thống trước và sau khi phân tích, có hiệu quả về mặt kinh tế.

Trong quy trình định lượng đồng thời, luận án sử dụng 2 bước sóng phát hiện ở 227 nm để định lượng paclitaxel và bước sóng 280 nm để định lượng các taxoid còn lại. Đó là do ở bước sóng 227 nm thì diện tích và chiều cao của paclitaxel xuất hiện rõ nhưng các pic còn lại có sự khác nhau không rõ rệt. Còn định lượng ở bước sóng 280 nm thì các pic của các taxoid còn lại xuất hiện rõ nhưng pic của paclitaxel lại thấp. Vì vậy, luận án chọn đầu dò PDA với 2 bước sóng phát hiện ở 227 nm và bước sóng 280 nm để định lượng đồng thời paclitaxel với taxinin B, 10-deacetyl taxinin B, taxuspin D và taxuspin F.

Phương pháp phân tích HPLC trong đề tài đã cho phép định tính và xác định đồng thời các taxoid trong lá *T. wallichiana*. Với sự trợ giúp của dữ liệu phổ UV của các taxoid có sẵn, phương pháp cho phép xác định nhanh chóng các taxoid trong trường hợp thiếu các chất tham chiếu tương ứng. Phương pháp này cũng phù hợp để phân tích thường quy taxoid trong dược liệu hoặc dịch chiết mà không cần lấy mẫu phức tạp. Phương pháp phân tích cung cấp một quy trình nhanh chóng, thông thường và đáng tin cậy để định tính và định lượng đồng thời một nhóm các taxoid trong lá *Taxus wallichiana* có thể ứng dụng trong kiểm nghiệm nguồn nguyên liệu và các chế phẩm liên quan đến dược liệu này.

Kết quả thẩm định quy trình định lượng đồng thời 04 taxoid (taxinin B, 10-deacetyl taxinin B, taxuspin D và taxuspin F) và paclitaxel cho thấy quy trình có tính đặc hiệu cao, $R^2 > 0,9995$ trong khoảng nồng độ khảo sát và đạt yêu cầu về độ chính xác và độ đúng.

Kết quả thẩm định này chứng tỏ rằng qui trình chuẩn bị mẫu thử là ổn định, các chất phân tích hầu như không bị mất đi nhiều trong quá trình xử lý mẫu. Điều này sẽ giúp những kết quả phân tích khi áp dụng quy trình này là có độ chính xác, độ đúng cao và tin cậy.

Tính mới của đề tài

1. Hợp chất taxuspin D và taxchinin B lần đầu được công bố phân lập được từ lá *Taxus wallichiana* Zucc. Tuy nhiên, các taxoid phân lập trong nghiên cứu này đã được công bố cấu trúc trong các nghiên cứu trước đây. Các taxoid được phân lập là những chất có tác dụng dược lý được quan tâm: Taxinin B, taxuspin D, taxuspin F và taxchinin B. Cụ thể: Hợp chất taxinin B có tác dụng chống kết tập tiểu cầu, taxuspin D và taxchinin B có khả năng chống lại sự đề kháng thuốc kháng ung thư, taxuspin F có tác dụng ức chế các tế bào Hela. Ngoài ra, các hợp chất này còn có thể làm nguyên liệu tổng hợp paclitaxel và các dẫn xuất do tương đồng cấu trúc khung cơ bản.

2. Lần đầu tiên thiết lập được 4 hợp chất taxoid làm chất đối chiếu, đây là nguyên liệu cần thiết trong kiểm nghiệm dược liệu, góp phần kiểm tra, đánh giá chất lượng của dược liệu và các chế phẩm liên quan.

3. Đã sử dụng phương pháp HPLC để định lượng đồng thời paclitaxel cùng 04 loại taxoid được phân lập từ *T. wallichiana*. Đề tài không chỉ lần đầu tiên thiết lập phương pháp xác định đồng thời hàm lượng taxinin B, 10-deacetyl taxinin B, taxuspin D, taxuspin F và taxol, mà còn phát hiện ra rằng cột Phenomenex Gemini RP-C18 có thể tách riêng các hợp chất này với độ phân giải cao.

KẾT LUẬN

Sau thời gian thực hiện, đề tài: “Phân lập một số hợp chất taxoid từ lá Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) trồng ở Lâm Đồng, định hướng thiết lập chất đối chiếu” đã đạt được các mục tiêu nghiên cứu được đặt ra:

1. Phân lập được 5 hợp chất taxoid tinh khiết từ lá Thông đỏ lá dài được trồng ở Lâm Đồng

Với các phương pháp sắc ký cột cổ điển, sắc ký cột trung áp, sắc ký lớp mỏng, HPLC, HPLC điều chế và các phương pháp phổ nghiệm như: UV, IR, MS, NMR, luận án đã phân lập, tinh chế và xác định cấu trúc của một số hợp chất taxoid trong lá Thông đỏ lá dài trồng ở Lâm Đồng:

- Từ 75 g phân đoạn cao MeOH 100% phân lập được 425 mg hợp chất **(1)** được xác định là taxinin B và 732 mg hợp chất **(2)** được xác định là taxuspin F và 158 mg hợp chất **(3)** - 10-deacetyl taxinin B.
 - Từ 50 g phân đoạn cao MeOH 100% phân lập được 183 mg hợp chất **(4)** là taxuspin D và 105 mg taxchinin B - hợp chất **(5)**.
2. Thiết lập chất đối chiếu

Trong 5 hợp chất được phân lập thì 4 hợp chất đạt tiêu chuẩn nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu: Độ tinh khiết > 95% và có khối lượng > 150 mg. Vì vậy, đề tài đã thiết lập 4 hợp chất taxoid làm chất đối chiếu: taxinin B, 10-deacetyl taxinin B, taxuspin D, taxuspin F. Quy trình thiết lập chất đối chiếu theo hướng dẫn của ASEAN, mỗi chất đối chiếu có các thông tin: dữ liệu phổ, điểm chảy, độ tinh khiết,...

3. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời paclitaxel và 4 hợp chất taxoid bằng phương pháp HPLC

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời paclitaxel và 4 hợp chất taxoid bằng phương pháp HPLC với cột C18, đầu dò PDA, chế độ phân tích đẳng dòng. Quy trình định lượng đạt các chỉ tiêu thẩm định về độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại.

KIẾN NGHỊ

Các hướng nghiên cứu tiếp theo của luận án được đề xuất như sau:

1. Áp dụng các quy trình phân lập, phân tích taxoid đã xây dựng để đánh giá các nguồn Thông đỏ khác nhau về tuổi, về nguồn gốc, về thời điểm thu hái, ...
2. Xây dựng tiêu chuẩn cho nguồn dược liệu Thông đỏ lá dài trồng ở Lâm Đồng để xuất khẩu tạo nguồn cung nguyên liệu bào chế thuốc chữa ung thư hiện có nhu cầu cao.
3. Nghiên cứu tổng hợp paclitaxel và các dẫn xuất làm nguyên liệu thuốc chữa ung thư từ các hợp chất taxoid đã phân lập trong luận án này do tương đồng cấu trúc khung cơ bản để khai thác tối đa giá trị tiềm năng của các hợp chất tự nhiên trong loại dược liệu quý này.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN

1. Hua Hoang Oanh, Tran Ngoc Thuy Duong, Bui Thi Bich Tram, Ha Dieu Ly, Bui The Vinh, Tran Cong Luan, Nguyen Duc Tuan (2013), Isolation and identification of two taxoids from the needles of *Taxus wallichiana* Zucc. cultivated in Lam Dong province, Proceeding Pharma Indochina VIII, 917-922.
2. Hua Hoang Oanh, Nguyen Duc Tuan, Ha Dieu Ly, Bui The Vinh, Tran Cong Luan (2013), Establishment of reference standard taxuspine F for quality control of herbal medicinal products from cultivated *Taxus wallichiana*, Proceeding Pharma Indochina VIII, 328-332.
3. Hứa Hoàng Oanh, Nguyễn Thị Nhài, Nguyễn Thị Trúc Phương, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, Nguyễn Phương Dung (2014), Phân lập một số hợp chất taxoid trong phân đoạn cao methanol 100% từ lá Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) trồng ở Lâm Đồng, Tạp chí Kiểm nghiệm, số 3A.2014: 139-143.
4. Hứa Hoàng Oanh, Nguyễn Thị Nhài, Nguyễn Thị Trúc Phương, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, Nguyễn Phương Dung (2015), Thành phần hóa học của lá Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) trồng ở Lâm Đồng, Tạp chí Y học Tp. HCM, tập 19, phụ bản số 01/2014, 342 - 347.
5. Hứa Hoàng Oanh, Trần Ngọc Bảo Trân, Lê Đăng Khương, Hà Diệu Ly, Bùi Thế Vinh, Trần Công Luận, Nguyễn Phương Dung (2016), Thiết lập một chất chuẩn đối chiếu taxoid từ lá Thông đỏ lá dài (*Taxus wallichiana* Zucc.) trồng ở Lâm Đồng, Tạp chí Y học Tp. HCM, tập 20, số 06/2016, 45-50.
6. Hứa Hoàng Oanh, Trần Ngọc Trí, Lê Đăng Khương, Hà Diệu Ly, Trần Công Luận, Nguyễn Phương Dung (2017), Xây dựng quy trình định lượng đồng thời một số hợp chất taxoid, Tạp chí Y học Tp. HCM, tập 21, số 06/2017, 231-237.