

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

TRẦN VĂN MƯỜI

**TỔNG HỢP VÀ THIẾT LẬP TẠP CHUẨN
CAPTOPRIL DISULFID, 7-ADCA,
D-PHENYLGLYCIN,
TẠP D CỦA AMLODIPIN,
TẠP A VÀ B CỦA NIFEDIPIN
DÙNG TRONG KIỂM NGHIỆM THUỐC**

NGÀNH: KIỂM NGHIỆM THUỐC

MÃ SỐ: 62720410

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH, Năm 2021

Công trình được hoàn thành tại:

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. NGUYỄN ĐỨC TUẤN

PGS.TS. ĐẶNG VĂN TỊNH

Phản biện 1:

Phản biện 2

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường
hợp tại

vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

Về ứng dụng kết quả nghiên cứu đánh giá tạp trong một số mẫu thử nguyên liệu và thành phẩm trên thị trường

Các quy trình kiểm tạp chất của captopril, cephalixin, amlodipin và nifedipin đều đạt yêu cầu tính phù hợp hệ thống. Đã ứng dụng các quy trình trên và chất đối chiếu được thiết lập để kiểm tra tạp tương ứng trong một số mẫu thử nguyên liệu và thành phẩm trên thị trường.

Ngoại trừ captopril có một số mẫu có hàm lượng captopril disulfid vượt yêu cầu cho phép, các mẫu còn lại cephalixin, amlodipin và nifedipin đều có hàm lượng tạp dưới mức qui định.

KIẾN NGHỊ

Trong hướng nghiên cứu tiếp theo, đề tài cần thực hiện các nội dung:

- 1) 06 tạp chuẩn: captopril disulfid, 7-ADCA và *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin được đăng ký chất chuẩn quốc gia.
- 2) Tiếp tục nghiên cứu độ ổn định của các tạp chất đối chiếu trên nhằm cải tiến quy trình tổng hợp, tinh chế đã xây dựng.
- 3) Ứng dụng quy trình kiểm tra tạp captopril disulfid, 7-ADCA, *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin trên các mẫu nguyên liệu và thành phẩm tương ứng khác đang lưu hành trên thị trường.
- 4) Tăng cường kiểm tra, kiểm soát chất lượng thuốc, nguyên liệu lưu hành trên thị trường đối với chỉ tiêu giới hạn các tạp chất để đảm bảo chất lượng thuốc theo đúng các tiêu chuẩn đã đăng ký.
- 5) Tiếp tục đầu tư trang thiết bị, cơ sở vật chất phục vụ cho công tác điều chế, chuẩn hóa các chất sử dụng làm chất chuẩn, đặc biệt là các tạp chuẩn để phục vụ nhu cầu sử dụng trong nước, hạn chế nhập khẩu từ nước ngoài.

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kiểm nghiệm tạp chất trong thuốc là một trong các chỉ tiêu bắt buộc phải kiểm mà được điển các nước và được điển Việt Nam đều đã qui định. Tuy nhiên, tạp chất chuẩn của thuốc nói chung không đầy đủ như hoạt chất của thuốc. Lĩnh vực tổng hợp, thiết lập và phân tích tạp chất trong thuốc chỉ mới phát triển từ đầu thập niên 20. Vì vậy, ở nước ta, những nghiên cứu về tạp chuẩn trong thuốc hiện nay vẫn là lĩnh vực được các nhà khoa học tập trung; đồng thời nhà quản lý thúc đẩy nhằm giải quyết các khó khăn trong công tác kiểm nghiệm thuốc.

Kháng sinh cephalixin và thuốc tim mạch captopril, amlodipin, nifedipin đã được đa số các nhà máy trong nước sản xuất. Tuy nhiên, nguồn cung cấp các tạp chất đối chiếu này đang khan hiếm.

Đề tài “*Tổng hợp và thiết lập tạp chuẩn captopril disulfid, 7-ADCA, D-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và B của nifedipin dùng trong kiểm nghiệm thuốc*” được thực hiện với 5 mục tiêu chính:

1. Xây dựng quy trình tổng hợp 6 tạp chất của thuốc: captopril disulfid, 7-ADCA, *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin ở qui mô phòng thí nghiệm.
2. Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.
3. Thiết lập được các tạp chuẩn captopril disulfid, 7-ADCA, *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin đạt yêu cầu chất đối chiếu quốc gia.
4. Xây dựng và thẩm định qui trình định lượng tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm captopril bằng phương pháp sắc ký lỏng.

5. Ứng dụng các tạp chuẩn đã thiết lập trong kiểm nghiệm tạp captopril disulfid, 7-ADCA, *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin trong một số nguyên liệu và thành phẩm tương ứng đang lưu hành trên thị trường.

2. TÍNH CẤP THIẾT CỦA ĐỀ TÀI

Kết quả nghiên cứu của luận án đóng góp cho ngành Kiểm nghiệm thuốc các quy trình tổng hợp và các tạp chất của thuốc. Các đóng góp này giúp cho Hệ thống kiểm nghiệm thuốc nhà nước trong việc sản xuất, cung cấp chất đối chiếu tạp chất được ổn định; các cơ sở kiểm nghiệm có đủ nguồn tạp chuẩn pháp lý để thực hiện chỉ tiêu tạp chất liên quan trong các Tiêu chuẩn chất lượng.

3. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

Các quy trình tổng hợp tạp chất

- Tạp captopril disulfid: tối ưu hóa quy trình tổng hợp captopril disulfid với tác nhân H_2O_2 là nội dung chưa được công bố trong các công trình nghiên cứu trong và ngoài nước.
- Tạp 7-ADCA và *D*-phenylglycin: thủy phân cephalixin bằng enzym PGA, enzym được tái sử dụng nên ít ảnh hưởng môi trường và giảm giá thành và cũng là ưu điểm so với tổng hợp hóa học.
- Tạp D: phthaloyl amlodipin được lựa chọn để rút ngắn quy trình còn 2 giai đoạn, hạn chế sử dụng các dung môi, hóa chất độc hại.
- Tạp A của nifedipin: việc oxy hóa vòng 1,4-dihydropyridin của các chất có khung tương tự, phương pháp này hiện chưa được công bố.

Phương pháp phân tích: luận án đóng góp mới quy trình định lượng captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm chứa bằng HPLC.

Thiết lập tạp đối chiếu: 6 đối tượng nghiên cứu của luận án là 7-ADCA, *D*-phenylglycin, captopril disulfid, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin đạt yêu cầu chất đối chiếu quốc gia.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Đề tài đã hoàn thành các mục tiêu đề ra của luận án, cụ thể như sau:

Về quy trình tổng hợp tạp chất:

Đã tổng hợp và xác định các điều kiện tổng hợp cho hiệu suất cao đối với các tạp chất captopril disulfid, 7-ADCA, *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin, đồng thời xác định cấu trúc của sản phẩm bằng phương pháp phổ nghiệm (UV, IR, MS và NMR). Độ tinh khiết được xác định bằng phương pháp HPLC, các sản phẩm có độ tinh khiết cao có thể dùng làm chất đối chiếu trong kiểm nghiệm.

Về xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp:

Đã xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu quy trình xác định độ tinh khiết của captopril disulfid, 7-ADCA, *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin bằng phương pháp HPLC.

Về thiết lập chất đối chiếu các tạp tổng hợp:

Đã đánh giá các tạp 7-ADCA, *D*-phenylglycin, captopril disulfid, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin bao gồm các chỉ tiêu tính chất, điểm chảy, định tính, hàm ẩm, độ tinh khiết, mức chất lượng của từng chỉ tiêu và phương pháp thử.

Tất cả các chất tổng hợp đều đủ điều kiện đăng ký chuẩn quốc gia phục vụ cho công tác kiểm nghiệm, phù hợp yêu cầu, điều kiện và kinh tế của Việt Nam.

Về quy trình kiểm nghiệm captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm chứa captopril:

Đã xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu quy trình định lượng tạp captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm captopril bằng phương pháp sắc ký lỏng. Quy trình có giới hạn phát hiện thấp hơn mức chất lượng cho phép theo ĐDVN.

Trong quá trình thử nghiệm, thời gian tiến hành sắc ký tạp A và tạp B là 60 phút, tuy nhiên trên sắc ký đồ các pic tạp A, tạp B và tạp khác chỉ có thời gian lưu khoảng dưới 10 phút, thời gian từ 10 phút tới 60 phút không phát hiện pic lạ trên sắc ký đồ 2 chiều cũng như 3 chiều, như vậy việc tiến hành sắc ký với thời gian 15 phút là phù hợp.

4.3. ĐÁNH GIÁ VÀ THIẾT LẬP TẠP CHẤT ĐỐI CHIẾU

Kết quả của luận án cho thấy các sản phẩm tổng hợp đều đủ điều kiện đăng ký chuẩn quốc gia, với độ tinh khiết sắc ký:

Captopril disulfid (99,32%),	7-ADCA (99,42%),
D-phenylglycin (99,97%),	Tạp D của amlodipin (99,62%),
Tạp A của nifedipin (100%),	Tạp B của nifedipin (99,75%)

tính theo chế phẩm nguyên trạng.

4.4. QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CAPTOPRIL DISULFID TRONG NGUYÊN LIỆU, THÀNH PHẨM CHỨA CAPTOPRIL

Quy trình định lượng captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm chứa captopril tương tự quy trình xác định độ tinh khiết, được thẩm định đạt yêu cầu. Nội dung trình bày ở Mục 4.2.1.

4.5 KIỂM TRA TẠP TRONG CÁC MẪU THỬ

Điều kiện sắc ký để xác định độ tinh khiết captopril disulfid cũng chính là điều kiện định lượng tạp captopril disulfid trong nguyên liệu và chế phẩm captopril. Điều kiện này cũng phù hợp khi định lượng đồng thời hoạt chất captopril và tạp chất captopril disulfid. Điều này rất thuận lợi trong công tác kiểm tra chất lượng chế phẩm này.

Trong kiểm nghiệm nifedipin, lưu ý chỉ pha dung dịch thử ngay trước khi dùng vì nifedipin dung dịch dễ bị hủy thành tạp A và B.

Các quy trình tổng hợp 6 tạp chất và 6 sản phẩm tổng hợp được từ kết quả nghiên cứu của luận án đã được Hội đồng đánh giá nghiệm thu - Sở Khoa học và Công nghệ Tp.HCM nghiệm thu kết quả (23/03/2016). Trong số đó có 3 quy trình và 3 chất đối chiếu được Viện Kiểm nghiệm thuốc TpHCM đã ứng dụng vào thực tế sản xuất, lưu thông như chất đối chiếu quốc gia: captopril disulfid; tạp A và tạp B của nifedipin.

4. BỐ CỤC CỦA LUẬN ÁN

Luận án gồm 151 trang, các nội dung tương ứng với số trang như sau: Mở đầu: 2; Tổng quan: 33; Đối tượng - Phương pháp: 30; Kết quả nghiên cứu: 64; Bàn luận: 19; Kết luận và Kiến nghị: 3. Luận án có 57 Bảng biểu; 75 Hình ảnh minh họa; 8 Sơ đồ; 81 tài liệu (gồm 18 TL tiếng Việt; 61 TL tiếng Anh; 2 trang web) và 103 Phụ lục.

NỘI DUNG LUẬN ÁN

Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Tạp chất captopril disulfid: là sản phẩm phân hủy của captopril dưới tác động ánh sáng, oxy không khí; từ những tính chất này có thể nghiên cứu các con đường tổng hợp.

1.2. Tạp chất 7-ADCA và D-phenylglycin: cephalixin bị nhiễm các tạp này từ các nguyên liệu tổng hợp cephalixin. Độc tính kích ứng đường hô hấp, mắt, da nếu hít hoặc nuốt phải.

1.3. Tạp chất D của amlodipin: được hình thành khi amlodipin bị oxy hóa thành pyridin do tác động ánh sáng trong quá trình bảo quản.

1.4. Tạp chất A và B của nifedipin: nguyên nhân hình thành là do sự oxy hóa nifedipin. Các chất gây ra độc những người dùng nifedipin và tiếp xúc với ánh sáng, gây đỏ rát mặt và vùng da tiếp xúc.

1.5. Phương pháp kiểm nghiệm và giới hạn các tạp chất trong nguyên liệu và thành phẩm thuốc tương ứng.

1.6. Chất đối chiếu: khái niệm và qui định về thiết lập chất đối chiếu.

Chương 2: ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

Gồm 6 chất hóa học là tạp chất liên quan:

- Tạp captopril disulfid của captopril
- Tạp 7-ADCA của cephalixin
- Tạp *D*-phenylglycin của cephalixin
- Tạp D của amlodipin
- Tạp A của nifedipin
- Tạp B của nifedipin

Nguyên vật liệu thử nghiệm

TT	Tên chất	Nguồn gốc	Tinh khiết
1	Captopril	Viện KNT Tp HCM	99,1%
2	7-ADCA	EP	99,5%
3	<i>D</i> -phenylglycin	Sigma	99,0%
4	Captopril	C.Pharmaceutical	100,6%
5	Dehydronifedipin	USP	99,5%
6	Dehydronitrosonifedipin	USP	99,5%
7	Amlodipin	Viện KNT Tp.HCM	100,0%
8	D-amlodipin	LGC	91,5%
9	Nifedipin	Viện KNT Tp.HCM	99,5%
10	Cephalixin	Lupin	99,5%
11	Amlodipin	Ercros	99,5%

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Tổng hợp và tinh chế các tạp chất

2.2.1.1. Tạp captopril disulfid của captopril

Captopril disulfid: oxy hóa captopril với tác nhân H₂O₂. Sản phẩm được tinh chế bằng phương pháp kết tinh nóng với methanol – nước.

2.2.1.2. Tạp D của amlodipin

Tạp D của amlodipin được tổng hợp qua 2 giai đoạn:

4.2.2. Tạp 7-ADCA và *D*-phenylglycin

Kết quả định tính bằng năng suất quay cực riêng đã khẳng định hợp chất tổng hợp phenylglycin là *D*-phenylglycin, tiến hành xác định độ tinh khiết của sản phẩm. Quy trình xác định độ tinh khiết của các tạp chất tổng hợp được tham khảo theo chuyên luận cephalixin monohydrat của BP 2019 phần tạp chất liên quan. Việc xác định độ tinh khiết của *D*-phenylglycin với tốc độ dòng 1 ml/phút và chương trình gradient cùng với bước sóng cài đặt 220 nm, *D*-phenylglycin tách hoàn toàn 7-ADCA và ở bước sóng này 7-ADCA hấp thu rất ít nên diện tích pic không ảnh hưởng đến độ tinh khiết của tạp chất *D*-phenylglycin. Việc xác định độ tinh khiết của 7-ADCA theo cùng điều kiện sắc ký với *D*-phenylglycin nhưng thay đổi tốc độ dòng 2 ml/phút nhằm mục đích chỉ xác định một hợp chất có độ tinh khiết theo phần trăm diện tích pic vì ở tốc độ dòng này *D*-phenylglycin sẽ bị rửa giải nhanh ra khỏi cột.

4.2.3. Tạp D của amlodipin

Quy trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin được tham khảo USP 43, việc thay đổi chiều dài cột (250 x 4,6 mm) so với USP 43 (150 x 3,9 mm). Quy trình đạt tất cả các yêu cầu thẩm định.

4.2.4. Tạp A và tạp B của nifedipin

Quy trình xác định độ tinh khiết hai tạp A và tạp B của nifedipin bằng HPLC - PDA đơn giản, thời gian lưu của pic tạp A từ 5,9 tới 6,2 phút và thời gian lưu của pic tạp B từ 7,2 cho tới 8,0 phút, hệ dung môi acetonitril – nước, không cần thêm đệm hay phải điều chỉnh pH giúp rửa hệ thống sắc ký nhanh và an toàn cho hệ thống, cột sắc ký.

Đối với tạp B của nifedipin, sắc ký đồ thường xuất hiện một pic tạp đó là do tạp B bị oxy hóa tạo tạp A khi ở dạng dung dịch, do đó mẫu để định lượng tạp B phải được pha ngay trước khi định lượng.

Tinh chế tạp A bằng kỹ thuật sắc ký cột với dung môi ethyl acetat - *n*-hexan (2 : 8), thời gian thử nghiệm dài nhưng hiệu quả tách cao.

Tinh chế tạp B bằng sắc ký cột cần thận trọng vì công thức có nhóm nitroso gắn vào vòng thơm, nhóm này có dễ bị oxy hóa nên hạn chế việc tiếp xúc với không khí và các chất có tính oxy hóa. Cần loại oxy trong quá trình sắc ký và bay hơi dung môi dưới dòng khí argon.

4.2. XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT TẠP CHẤT BẰNG HPLC

4.2.1. Tạp captopril disulfid

Điều kiện nhiệt độ ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu năng cột, hệ số đối xứng không đạt khi nhiệt độ cột < 40 °C. Khi tăng nhiệt độ lên 50 - 60 °C, As pic captopril disulfid được cải thiện. Khi nhiệt độ tăng, độ nhớt pha động giảm nên giảm thời gian rửa giải, dẫn đến chiều rộng pic hẹp. Ngoài ra nhiệt độ cao cũng làm giảm hiện tượng chuyển khối, dẫn đến hiệu năng cột tăng theo phương trình Van Deemter. Tuy nhiên nhiệt độ cũng không nên > 60 °C vì làm bay hơi pha động và phân hủy mẫu. Trong nghiên cứu này, nhiệt độ 50 °C là phù hợp. Pha động acetonitril và acid phosphoric với pH 2, không cần sử dụng đệm nên thời gian rửa hệ thống nhanh, không gây ăn mòn do muối kết tủa. Ngoài ra ở pH này, hiệu năng cột sắc ký cũng thích hợp ở pH từ 1 đến 13 của cột C₁₈. Thời gian lưu của pic captopril và captopril disulfid đều dưới 5 phút, đồng thời xuất hiện một pic tạp trong quá trình tổng hợp khoảng 7 phút, có khả năng là sản phẩm phụ trong quá trình tổng hợp captopril disulfid. Khi tiến hành sắc ký với thời gian đến 60 phút vẫn không thấy xuất hiện pic lạ khác và khi xem sắc ký đồ trong không gian 3 chiều đều không phát hiện 1 pic tạp nào khác. Tất cả các đánh giá trên đã chứng tỏ các thành phần trong sản phẩm tổng hợp sau khi tinh chế đã được rửa giải khi tiến hành sắc ký nên độ tinh khiết của sản phẩm tính theo phương pháp phần trăm diện tích pic đạt trên 99% là tin cậy.

- Tổng hợp 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat qua quá trình oxy hóa phthaloyl amlodipin và tinh chế bằng hỗn hợp acetone – nước (2 : 1).

- Tổng hợp tạp D từ sản phẩm trung gian: thủy phân 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat với chất xúc tác hydrazin. Sản phẩm được tinh chế bằng qua dạng muối với acid hydrochloric, chuyển dạng kiềm với natri hydroxyd, dạng kiềm được chiết bằng dicloromethan.

2.2.1.3. Tạp 7-ADCA và D-phenylglycin của cephalixin

Tạp 7-ADCA và D-phenylglycin: thủy phân cephalixin bằng enzym PGA. Các sản phẩm tổng hợp được tinh chế bằng kỹ thuật HPLC điều chế trên cột C₁₈, pha động methanol – nước.

2.2.1.4. Tạp A của nifedipin

Tạp A nifedipin: oxy hóa nifedipin với acid nitric. Sản phẩm được tinh chế bằng sắc ký cột và kết tinh lại trong acetone – nước.

2.2.1.5. Tạp B của nifedipin

Tạp B được tổng hợp bằng cách chiếu tia UV_A trên nifedipin. Sản phẩm được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột.

2.2.2. Xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp

Cấu trúc của các sản phẩm tổng hợp được xác định bằng phương pháp đối chiếu các dữ liệu phổ UV-Vis; IR; MS và NMR với các dữ liệu đã được công bố trong các tài liệu khoa học uy tín.

2.2.3. Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

2.2.3.1. Chuẩn bị mẫu và khảo sát các điều kiện sắc ký

Khảo sát nồng độ mẫu và các điều kiện sắc ký để tách hoàn toàn pic cần phân tích với pic lân cận có trong thành phần của mẫu, và đạt tất cả các thông số sắc ký cho một quy trình phân tích định lượng.

2.2.3.2. Thẩm định quy trình

Sau thử nghiệm tính phù hợp hệ thống, quy trình xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp được thẩm định theo hướng dẫn của ICH.

2.2.4. Đánh giá và thiết lập tạp chất đối chiếu

2.2.4.1. Xây dựng phương pháp đánh giá các tạp tổng hợp

- *Tính chất cảm quan*: quan sát bằng cảm quan hình dạng, màu, mùi và độ tan của mẫu thử.

- *Điểm chảy*: xác định điểm chảy bằng các thiết bị đo điểm chảy.

- *Định tính*: phổ hồng ngoại, phổ khối và phổ NMR.

- *Giảm khối lượng do sấy khô*: phân tích nhiệt trọng lượng.

- *Độ tinh khiết hoặc hàm lượng*: phương pháp sắc ký lỏng.

2.2.4.2. Thiết lập chất đối chiếu

Các công đoạn thiết lập tạp đối chiếu bao gồm:

- *Đóng gói*: trong Glove-box: khí nitơ 99,99%, độ ẩm tương đối 40%.

- *Đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ*: theo ISO Guide 35.

- *Đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm*: theo ISO 13528.

- *Xác định giá trị ấn định – giá trị công bố*: theo ISO 13528.

2.2.5. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng tạp captopril disulfid trong nguyên liệu và chế phẩm chứa captopril

Pha chế các dung dịch mẫu thử:

- Dung dịch chuẩn gốc captopril disulfid: 0,1 mg/ml trong methanol.

- Mẫu chuẩn (1): captopril 1000 và captopril disulfid 10 (ppm).

- Mẫu chuẩn (2): captopril 1000 và captopril disulfid 20 (ppm).

- Mẫu thử: nguyên liệu/chế phẩm captopril 1 mg/ml trong methanol.

- Mẫu thử giả lập: hỗn hợp nguyên liệu/chế phẩm captopril 1 mg/ml; và 0,01 mg/ml captopril disulfid với mẫu giả lập nguyên liệu/hoặc 0,02 mg/ml tạp captopril disulfid với mẫu giả lập chế phẩm.

- Mẫu giả được: tương đương 1 mg/ml captopril trong methanol.

4.1.2. Tổng hợp và tinh chế 7-ADCA và D-phenylglycin

Enzym penicillin G acylase (PGA) xúc tác phản ứng tổng hợp cephalixin từ D-phenylglycin và 7-ADCA. Enzym này cũng tham gia quá trình thủy giải nhóm N-acyl để cho lại sản phẩm ban đầu. Tuy nhiên, PGA có giá thành cao, khó bảo quản, vận chuyển và không thể tái sử dụng. Một sản phẩm từ công nghệ mới của enzym là việc cố định hóa các enzym này trên phức hợp polymer giúp giải quyết các trở ngại trên. Sản phẩm thu được dễ tinh chế, có độ tinh khiết cao đáp ứng yêu cầu làm chất chuẩn. Điểm quan trọng là sau khi xúc tác phản ứng, có thể tách loại enzym này dễ dàng bằng cách lọc thu hồi và tái sử dụng được nhiều lần. Đây là một điểm nổi trội so với việc tổng hợp bằng con đường hóa học, đồng thời cũng làm giảm giá thành của sản phẩm tổng hợp. Nghiên cứu này cũng hứa hẹn khả năng tổng hợp các tạp chất của các kháng sinh nhóm cephalosporin.

4.1.3. Tổng hợp và tinh chế tạp D của amlodipin

Tạp chất D của amlodipin là dạng dầu màu vàng nâu và rất dễ bị oxy hóa ngoài không khí do đó rất khó bảo quản sau khi tinh chế. Vì vậy phương pháp tinh chế sản phẩm bằng cách tạo muối với HCl đơn giản, ít tốn thời gian, và có thể áp dụng với lượng sản phẩm lớn.

4.1.4. Tổng hợp và tinh chế tạp A và B của nifedipin

Trong quá trình tổng hợp tạp A của nifedipin cần chú ý tới lượng HNO₃ cho vào phản ứng và thời gian phản ứng, nên dừng phản ứng sớm để tránh việc tạo quá nhiều tạp gây khó khăn cho quá trình tinh chế. Sau khi tổng hợp tạp A của nifedipin, việc loại bỏ HNO₃ chỉ nên rửa bằng nước cất, không nên rửa bằng nước có tính base vì sẽ gây biến đổi cấu trúc của tạp A, tạo chất có màu đỏ.

Để tổng hợp tạp B của nifedipin có thể sử dụng đèn UV_A công suất lớn hơn để có thời gian phản ứng được rút ngắn.

Bảng 3.10 Kết quả kiểm tra tạp D của amlodipin trong một số nguyên liệu và chế phẩm trên thị trường (n = 6)

Chế phẩm	Hạn dùng	D của amlodipin
Nguyên liệu 464/15, lô ALK5AQA23B	03/2016	0,062%
Nguyên liệu 776/14, lô ALK5APA28B	02/2016	0,047%
Viên nén amlodipin 5 mg (A)	05/2016	0,154%
Viên nang amlodipin 5 mg (B)	01/2017	0,082%

Bảng 3.10 Kết quả kiểm tra tạp A và tạp B của nifedipin trong một số nguyên liệu và chế phẩm nifedipin trên thị trường (n = 6)

Chế phẩm	Hạn dùng	% tạp A	% tạp B
Viên nén Nifedipin 10 mg (lô 030815 - C)	010817	0,0043	0,102
Viên nén Nifedipin 10 mg (lô 030815 - D)	171017	0,0039	0,152
NL Nifedipin (lô 205)	052018	0,0041	0,077
NL Nifedipin (lô 249)	092018	0,0036	0,074

CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. PHƯƠNG PHÁP TỔNG HỢP CÁC TẠP CHẤT

4.1.1. Tổng hợp và tinh chế tạp captopril disulfid

Tổng hợp captopril disulfid với tác nhân H_2O_2 thành công do khả năng oxy hóa của oxy sinh ra từ H_2O_2 mạnh hơn so với oxy không khí. Do sản phẩm sinh ra là nước nên captopril disulfid tách dễ dàng và sau khi tinh chế đạt độ tinh khiết cao, phù hợp với mục tiêu tạo sản phẩm làm chất đối chiếu và hạn chế ô nhiễm môi trường.

Khảo sát điều kiện sắc ký: từ điều kiện sắc ký trong thử nghiệm xác định độ tinh khiết captopril disulfid, tiếp tục khảo sát điều kiện để tách hoàn toàn captopril, captopril disulfid và các tạp khác (nếu có).

Thẩm định quy trình: tính đặc hiệu, tính tuyến tính ($R^2 > 0,998$); độ chính xác ($RSD \leq 2\%$) và độ đúng (tỷ lệ phục hồi 98 % - 102 %).

2.6. Ứng dụng:

Đánh giá các tạp trong một số nguyên liệu và chế phẩm tương ứng.

Chương 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. TỔNG HỢP VÀ TINH CHẾ TẠP CHẤT

3.1.1. Tổng hợp và tinh chế captopril disulfid

Quy trình tổng hợp captopril disulfid: hòa tan 5 g (0,023 mol) captopril vào 100 ml nước cất, siêu âm 5 phút ở 30 °C. Thêm 10 ml H_2O_2 30%, khuấy đều, điều chỉnh pH dung dịch phản ứng bằng HCl đến pH 2,2. Để yên hỗn hợp và tránh ánh sáng trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng. Lọc sản phẩm sau phản ứng, thu kết tủa và phân tán tủa vào 100 ml nước. Siêu âm 10 phút ở 30 °C, lọc lấy tủa và sấy ở nhiệt độ 55 °C trong 12 giờ. Dự kiến kết tủa này là captopril disulfid.

Tối ưu hóa quy trình tổng hợp captopril disulfid: bằng mô hình Box-Behnken, hiệu suất phản ứng tổng hợp là 63,0%.

Tinh chế captopril disulfid: sản phẩm tổng hợp được tinh chế bằng phương pháp kết tinh nóng với hỗn hợp nước-methanol, nhiệt độ tinh chế 65 °C. Lọc dưới áp suất giảm, sấy kết tinh ở 55 °C trong 12 giờ.

3.1.2. Tổng hợp và tinh chế 7-ADCA và D-phenylglycin

Quy trình tổng hợp 7-ADCA và D-phenylglycin: cho 24 g cephalixin cho vào bình phản ứng, thêm 630 ml nước và 24 g enzym PGA. Điều chỉnh nhiệt độ phản ứng ở 37 °C, điều chỉnh pH dung dịch phản ứng đến pH 8,0 bằng amoniac 5%. Khi pH ổn định, ngưng phản ứng và lọc

lấy dịch lọc, điều chỉnh dịch lọc đến pH 4 bằng HCl 3M, khuấy đều liên tục đến khi kết tủa hoàn toàn. Tiếp tục lọc hỗn hợp sau phản ứng dưới áp suất giảm, thu được 11,58 g kết tủa B; phần dịch lọc được tiếp tục làm lạnh và điều chỉnh đến pH 6,5; khuấy đều đến khi kết tủa hoàn toàn, lọc lấy kết tủa, thu được 1,44 g chất A.

Phương pháp tinh chế:

Phương pháp kết tinh lại: hòa tan kết tủa B trong HCl 0,2 M, đun nóng, thêm 1,5 g than hoạt, khuấy đều và lọc nóng. Dịch lọc được điều chỉnh pH 4 bằng amoniac 5%. Khuấy đều và để yên đến khi kết tủa hoàn toàn, lọc lấy tủa, thu được 4,38 g sản phẩm B dạng tinh thể.

Phương pháp HPLC điều chế: kết tủa A và B được tiếp tục tinh chế bằng HPLC với cột C₁₈, pha động methanol – nước (10 : 90). Lọc áp suất giảm thu được 1,14 g sản phẩm A và 3,504 g B tinh khiết.

3.1.3. Tổng hợp và tinh chế tạp D của amlodipin

Giai đoạn 1: tổng hợp và tinh chế sản phẩm trung gian.

Cân 5,39 g phthaloyl amlodipin (1) cho vào bình phản ứng và thêm 15 ml DCM, 1,5 g hỗn hợp SiO₂ – HNO₃. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Kiểm tra quá trình phản ứng đến khi không còn vết nguyên liệu (1) thì kết thúc phản ứng. Hỗn hợp sau phản ứng được chiết với NaHCO₃ bão hòa cho đến khi lớp dịch nước sau khi chiết không còn màu vàng. Lớp DCM được chiết tiếp với NaCl bão hòa và làm khan bằng Na₂SO₄. Lọc và thu hồi DCM, kết tủa thu được là sản phẩm trung gian. Hiệu suất phản ứng đạt 85%.

Giai đoạn 2: tổng hợp và tinh chế tạp D của amlodipin.

Cho 5,37 g sản phẩm trung gian và 10 ml toluen vào bình cầu, khuấy đến tan và thêm 0,4 ml hydrazin 50%/0,7 ml methanol, tiếp tục khuấy ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ. Lọc lấy dịch lọc, thu hồi dung môi, thu được 1,9 g kết tủa, dự kiến là tạp D.

3.5. ỨNG DỤNG KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ TẠP CHẤT TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM THUỐC TƯƠNG ỨNG

Các sản phẩm tổng hợp sau khi được đánh giá chất lượng đạt yêu cầu chất đối chiếu; các quy trình định lượng đạt yêu cầu thẩm định được ứng dụng kiểm tra một số mẫu nguyên liệu và thành phẩm tương ứng trên thị trường. Các kết quả được trình bày ở bảng từ 3.8 đến 3.11:

Bảng 3.8. Kết quả định lượng captopril disulfid trong một số mẫu nguyên liệu và thành phẩm chứa captopril trên thị trường.

Chế phẩm	Mã hóa	Hạn dùng	Captopril disulfid
Nguyên liệu captopril, lô 1	NL01	03/2016	0,13%
Nguyên liệu captopril, lô 2	NL02	09/2016	0,13%
Viên nén captopril 25 mg (ngoại nhập, công ty A)	CPNNA	05/2016	20,41%
Viên nén captopril 25 mg (ngoại nhập, công ty B)	CPNNB	01/2017	8,49%
Viên nén captopril 25 mg (trong nước, công ty C)	CPTNC	02/2016	2,82%
Viên nén captopril 25 mg	CPTND	02/2017	0,59%
Viên nén captopril 25 mg	CPTNE	04/2016	30,60%
Viên nén captopril 25 mg	CPTNF	12/2016	3,02%

Bảng 3.9 Kết quả kiểm tra tạp 7-ADCA và D-phenylglycin trong một số nguyên liệu và chế phẩm cephalixin trên thị trường (n = 6)

Chế phẩm	Hạn dùng	D-phenylglycin	7-ADCA
NL cephalixin 0391, B5000405	03/2018	không phát hiện	không phát hiện
NL cephalixin 0392, B5000631	09/2018	không phát hiện	không phát hiện

Bảng 3.7. Kết quả thẩm định quy trình định lượng captopril disulfid trong mẫu thử nguyên liệu và thành phẩm chứa captopril

Yêu cầu thẩm định	Kết Quả
Phương trình hồi qui	$\hat{y} = 33441x$
Hệ số tương quan (R^2)	0,9992
Khoảng tuyến tính	0,5 – 40 (ppm)
Giới hạn phát hiện (LOD)	0,17 µg/ml
Giới hạn định lượng (LOQ)	0,50 µg/ml
Độ lặp lại RSD (%) (n = 6)	
Mẫu thử nguyên liệu	0,79
Mẫu thử thành phẩm	1,47
Mẫu thử giả lập nguyên liệu	1,07
Mẫu thử giả lập thành phẩm	0,80
Độ chính xác trung gian (n = 12)	
Mẫu thử nguyên liệu	0,81
Mẫu thử thành phẩm	1,97
Mẫu thử giả lập nguyên liệu	1,66
Mẫu thử giả lập thành phẩm	0,56
Độ đúng (n = 9)	
Tỷ lệ phục hồi (%) RSD	
Mẫu NL captopril + chuẩn captopril disulfid	98,5 - 101,6 (RSD = 1,23%)
Mẫu giả dược + NL captopril + chuẩn captopril disulfid	99,4 - 101,9 (RSD = 0,74%)

3.1.4. Tổng hợp và tinh chế tạp A và tạp B của nifedipin

- *Tổng hợp tạp A* của nifedipin bằng phương pháp oxy hóa nifedipin với acid nitric. Cho 346 mg nifedipin (1 mM) + 10 ml DCM vào bình nón, thêm 250 mg hỗn hợp $\text{SiO}_2 - \text{HNO}_3$ và khuấy đều 10 phút. Lọc lấy dịch lọc cho vào bình lắng gạn, thêm 10 ml nước, chiết bằng DCM đến khi lớp nước trung tính. Lớp DCM được thu hồi dung môi, kết tủa dự kiến là tạp A của nifedipin, được sấy ở nhiệt độ $< 50^\circ\text{C}$.

Sản phẩm được bảo quản trong lọ nâu, nhiệt độ khoảng 4°C .

- *Tổng hợp tạp B* của nifedipin bằng phương pháp chiếu tia UV_A . Cho 2,5 g nifedipin (0,007 M) vào cốc có mỏ và 50 ml methanol, khuấy từ liên tục. Chiếu đèn UV_A , khoảng cách từ đèn tới bề mặt dung dịch khoảng 10 cm, tránh ánh sáng. Chiếu đèn trong khoảng 15 giờ, lấy mẫu mỗi 3 giờ, kiểm tra phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng. Dung dịch sau phản ứng được loại nước bằng Na_2SO_4 , chuyển dung dịch thu được vào bình cầu, rửa cốc bằng methanol, cho nước rửa vào bình cầu. Thu hồi dung môi, kết tủa dự kiến là tạp B nifedipin, sấy chân không ở không quá 50°C .

Tinh chế: tạp A và tạp B đều được tinh chế bằng sắc ký cột với hệ dung môi ethyl acetat – *n*-hexan và kết tinh lại trong acetone – nước.

Tóm tắt: hiệu suất tổng hợp **(1)**; hiệu suất tinh chế **(2)** và hiệu suất toàn quy trình **(3)** của các tạp chất tổng hợp.

	Captopril disulfid	7- ADCA	D- phenylglycin	Tạp D amlodipin	Tạp A nifedipin	Tạp B nifedipin
(1)	63,0%	82,3%	14,5%	42,0%	89,2%	95,5%
(2)	57,1%	30,2%	79,2%	63,2%	34,8%	76,8%
(3)	35,97%	24,85%	11,48%	26,54%	31,04%	73,34%

3.1.5. Xác định cấu trúc các sản phẩm tổng hợp

Bảng 3.1 Cấu trúc các tạp tổng hợp trong luận án

Cấu trúc sản phẩm	Danh pháp
	Acid (2S,2'S)-1,1'-disulphanediylbis(methyl-1-oxopropan-3,1-diyl)-bis[pyrrolidine-2-carboxylic]
	Acid (2R)-2-amino-2-phenylacetic
	Acid (6R,7R)-7-amino-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic (acid 7-aminodesacetoxycephalosporanic)
	3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat
	Dimethyl-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-pyridin-3,5-dicarboxylat
	Dimethyl-2,6-dimethyl-4-(2-nitrosophenyl)-pyridin-3,5-dicarboxylat

Bảng 3.6 Kết quả đánh giá tạp D của amlodipin

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu
Tính chất	Cảm quan	Dung dịch màu vàng nâu
Định tính	- Phổ IR	IR (KBr/cm ⁻¹): 1238 (C-O); 1733 (C=O); 3523 (N-H)
	- Phổ khối	MS-ESI(+): m/z 407,1328 [M+H] ⁺
	- Phổ NMR	¹ H-NMR, δ (500 MHz, CDCl ₃ , ppm): 7,41; 7,31; 7,27; 7,17; 4,80; 3,99; 3,52; 3,48; 2,84; 2,64; 0,92.
Độ tinh khiết	Sắc ký lỏng	≥ 99,0% (nguyên trạng)

3.4. QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG TẠP CAPTOPRIL DISULFID TRONG MẪU THỬ NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM CHỨA CAPTOPRIL

Các điều kiện sắc ký:

Nồng độ mẫu thử: 1000 µg/ml

Cột C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)

Pha động: acetonitril – acid phosphoric pH 2 (30 : 70)

Bước sóng phát hiện: 220 nm

Nhiệt độ cột 50 °C

Tốc độ dòng 1 ml/phút

Thể tích tiêm 10 µl

Quy trình định lượng captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm captopril đạt yêu cầu về thẩm định của các chỉ tiêu tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu.

Kết quả xác định miền giá trị, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác được trình bày ở bảng 3.7.

Bảng 3.5 Kết quả đánh giá tạp A và B của nifedipin

Chỉ tiêu/ phương pháp	Tạp A	Tạp B
Tính chất (Cảm quan)	Tinh thể trắng ngà. Dễ tan trong methanol, ethanol, aceton	Tinh thể xanh nhạt. Dễ tan trong methanol, ethanol, aceton
Điểm chảy (DSC)	105 °C	93,5 °C
Hàm ẩm (TGA)	≤ 0,1%	≤ 0,1%
Định tính	<i>Phổ IR (KBr/cm⁻¹):</i> 1728; 1524; 1378 và 1111	<i>Phổ IR (KBr/cm⁻¹):</i> 3084; 3001–2852; 1729; 1492; 1374 và 1110
	<i>Phổ MS: ESI-MS(+)</i> <i>m/z</i> 367,0908 [M+Na] ⁺	<i>Phổ MS: ESI-MS(+)</i> <i>m/z</i> 351,0956 [M+Na] ⁺
	<i>Phổ NMR:</i> ¹ H-NMR, δ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm): 8,26; 7,81; 7,73; 7,29; 3,44; 2,55. ¹³ C-NMR, δ (125 MHz, DMSO - <i>d</i> ₆ , ppm): 166,54; 156,05; 156,05; 146,81; 144,67; 133,80; 130,81; 130,60; 130,35; 124,46; 124,35; 124,35; 52,23; 23,09.	<i>Phổ NMR:</i> ¹ H-NMR, δ (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm): 7,72; 7,52; 7,44; 6,55; 3,39; 2,67. ¹³ C-NMR, δ (125 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆ , ppm): 167,71 (C=O ester); 161,64; 156,46; 144,40; 139,95; 135,01; 130,68; 128,86; 127,27; 107,86; 107,86; 52,03; 23,52.
Độ tinh khiết (Sắc ký lỏng)	≥ 99,0% (nguyên trạng)	≥ 99,0% (nguyên trạng)

3.2. KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT TẠP TỔNG HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

Đã xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu các quy trình xác định độ tinh khiết của các tạp tổng hợp được, bao gồm: captopril disulfid, 7-ADCA, *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.

Riêng mẫu thử tạp A và B của nifedipin sử dụng nồng độ 250 µg/ml; các mẫu thử còn lại trong các quy trình là 1000 µg/ml.

3.2.1. Quy trình đánh giá captopril disulfid: cột Gemini NX C₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm), pha động là hỗn hợp acetonitril – acid phosphoric pH 2 (30 : 70), bước sóng phát hiện 220 nm, nhiệt độ cột 50 °C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µl.

3.2.2. Quy trình đánh giá *D*-phenylglycin: cột Gemini C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm), pha động là hỗn hợp đệm phosphat pH 5 – methanol, rửa giải gradient, bước sóng phát hiện 220 nm, nhiệt độ cột 30 °C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µl.

3.2.3. Quy trình đánh giá 7-ADCA: cột Gemini C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm), pha động là hỗn hợp đệm phosphat pH 5 – methanol, kỹ thuật rửa giải gradient, bước sóng phát hiện 220 nm, nhiệt độ cột 30 °C, tốc độ dòng 2 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µl.

3.2.4. Quy trình đánh giá tạp D của amlodipin: cột C₁₈ (250 x 4,6 mm; 5 µm), pha động acetonitril – dung dịch acid pH 3 (7,0 ml TEA/1000 ml nước và điều chỉnh pH đến 3,0 bằng acid phosphoric) (15 : 35 : 50), bước sóng phát hiện 237 nm, nhiệt độ cột 35 °C, tốc độ dòng 1 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 µl.

3.2.5. Quy trình đánh giá A và B nifedipin: cột Phenomenex Gemini NX (150 x 4,6 mm; 3 µm), pha động là hỗn hợp nước – acetonitril (50 : 50), bước sóng phát hiện 254 nm, nhiệt độ cột 30 °C, tốc độ dòng 0,8 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 µl.

3.3. ĐÁNH GIÁ VÀ THIẾT LẬP TẠP CHẤT ĐỐI CHIẾU

3.3.1 Kết quả thiết lập chất đối chiếu

Bảng 3.2. Kết quả xác định giá trị ấn định μ_x và giá trị công bố (%) tinh khiết) các tạp đối chiếu tổng hợp

STT	Tên chất đối chiếu	KL(mg)	μ_x	% tinh khiết
1	Captopril disulfid	20	0,0052	99,45
2	7-ADCA	20	0,0187	99,90
3	D-phenylglycin	10	0,0068	99,94
4	Tạp D của amlodipin	20	0,0018	99,92
5	Tạp A của nifedipin	20	0,0970	99,56
6	Tạp B của nifedipin	20	0,0650	99,71

3.3.2 Bộ dữ liệu - Kết quả đánh giá các tạp tổng hợp

Các chỉ tiêu, phương pháp thử và kết quả đánh giá các tạp tổng hợp được trình bày ở các bảng 3.3 đến 3.6 như sau:

Bảng 3.3 Kết quả đánh giá tạp captopril disulfid

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu
Tính chất	Cảm quan	Tinh thể trắng, dễ tan trong pyridin, hơi tan trong ethanol, tan trong methanol.
Điểm chảy	ĐĐVN V	235 – 236 °C
Hàm ẩm	TGA	≤ 0,5%
Định tính	Phổ hồng ngoại	IR (KBr/cm ⁻¹): 1747 (HO-C=O), 1601(-N-C=O) và 490 (-S-S-)
	Phổ khối	ESI-MS(-): m/z 431,1319 [M-H] ⁻
	Phổ NMR	¹ H-NMR, δ (500 MHz, DMSO-d ₆ , ppm): 4,22; 3,58; 2,60 – 2,70; 2,87–3,00; 1,81–2,18; 1,92; 1,09.
		¹³ C-NMR, δ (125 MHz, DMSO-d ₆ , ppm): 173,3; 58,3; 46,5; 41,2; 36,9; 28,6; 24,3; 16,5.
Độ tinh khiết	Sắc ký lỏng	≥ 99,0% (nguyên trạng)

Bảng 3.4 Kết quả đánh giá D-phenylglycin và 7-ADCA

Chỉ tiêu/ phương pháp	D-phenylglycin	7-ADCA
Tính chất	Bột kết tinh trắng	Bột kết tinh trắng ngà
Điểm chảy (DSC)	242 ± 1 °C	306 ± 1 °C
Định tính	Phổ IR (KBr/cm ⁻¹): 2933 (N-H); 2617 (C-H), 1612 (C-N) 1508 (C=C)	Phổ IR (KBr/cm ⁻¹): 3151 (N-H); 2933 (C-H); 1800 (C=O); 1618 (C-N) và 1539 cm ⁻¹ (C=C)
	Phổ MS: m/z 152,0707 [M+H] ⁺	Phổ MS: m/z 237,03 [M+Na] ⁺
	Phổ NMR: ¹ H-NMR, δ (500 MHz, D ₂ O, ppm): 7,48; 7,47; 7,47; 7,44; 7,44; 5,02.	Phổ NMR: ¹ H-NMR, δ (500 MHz, DMSO-d ₆ , ppm): 4,91; 4,70; 3,55; 3,29; 1,98.
	¹³ C-NMR, δ (125 MHz, D ₂ O, ppm): 171,6; 132,4; 130,1; 129,6; 129,6; 128,0; 128,0; 57,2.	¹³ C-NMR, δ (125 MHz, DMSO-d ₆ , ppm): 169,5; 163,8; 127,9; 122,8; 63,3; 58,5; 28,4; 19,4.
Năng suất quay cực riêng: [α] _D ²⁵ = -156 ° (C = 2, HCl 3 N)		
Độ tinh khiết (Sắc ký lỏng)	≥ 99,0% (nguyên trạng)	≥ 99,0% (nguyên trạng)

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. Tran Van Muoi, Tran Linh Phuong, Ha Dieu Ly, Nguyen Duc Tuan, Dang Van Tinh (2013), "Synthesis of 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridine-3,5-dicarboxylate as amlodipine impurity D", *The Eighth Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences, Ho Chi Minh City, Vietnam*, 4-5, 531-534.
2. Trần Văn Mười, Mai Kim Cường, Nguyễn Đức Tuấn, Đặng Văn Tịnh (2015), "Tổng hợp và xác định độ tinh khiết quang hoạt của D- α -phenylglycine", *Tạp chí Y học TP.HCM*, tập 19, phụ bản số 3, 459-465.
3. Lữ Thiện Phúc, Trần Văn Mười, Nguyễn Tấn Đạt, Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ, Đặng Văn Tịnh, Nguyễn Đức Tuấn (2015), "Thiết lập chất đối chiếu captopril disulfide và xây dựng quy trình HPLC định lượng tạp chất captopril disulfide trong nguyên liệu và chế phẩm captopril", *Tạp chí Dược học*, số 466, 18-23.
4. Trần Văn Mười, Nguyễn Xuân Thanh, Văn Kim Thành, Nguyễn Đức Tuấn (2016), "Tổng hợp và xác định độ tinh khiết của dehydronifedipine (tạp A) và dehydroso nifedipine (tạp B) của nifedipine", *Tạp chí Y học TP.HCM*, phụ bản tập 20, số 2, 170-176.
5. Trần Văn Mười, Nguyễn Xuân Thanh, Văn Kim Thành, Nguyễn Đức Tuấn (2016), "Thiết lập chất đối chiếu dehydronifedipine (tạp A) và dehydroso nifedipine (tạp B) và ứng dụng quy trình HPLC kiểm tra tạp A và tạp B chế phẩm nifedipine", *Tạp chí Dược học*, số 4, 56-60.