

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO **BỘ Y TẾ**
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH



LỮ THIÊN PHÚC

**TỔNG HỢP VÀ THIẾT LẬP TẬP CHẤT
ĐỐI CHIẾU CỦA ALLOPURINOL SỬ DỤNG
TRONG KIỂM NGHIỆM**

NGÀNH: KIỂM NGHIỆM THUỐC VÀ ĐỘC CHẤT
MÃ SỐ: 62720410

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH – Năm 2024

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

Người hướng dẫn khoa học:
PGS. TS. Trương Ngọc Tuyền
PGS. TS. Trần Việt Hùng

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 lúc 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
- Thư viện Đại học

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Lý do và tính cấp thiết

Ngày nay, cùng với sự phát triển mạnh mẽ của ngành công nghiệp dược trên thế giới, ngành dược Việt Nam cũng đã phát triển và khẳng định được vị thế của mình. Trên cả nước, với hơn 280 nhà máy sản xuất dược phẩm đạt GMP-WHO; GMP-EU..., sản xuất các thành phẩm, đa phần là thuốc generic.

Trong các nhóm thuốc điều trị bệnh gút mãn tính hay tăng acid uric huyết, allopurinol đã được Bộ Y tế đưa vào danh mục thuốc thiết yếu năm 2018 và được chỉ định thường quy trong điều trị bệnh gút và tăng uric huyết thứ phát do hóa trị bệnh bạch cầu hay ung thư. Trong quá trình tổng hợp, sản xuất, bảo quản, allopurinol vẫn còn tồn tại hoặc phát sinh các tạp chất liên quan có khả năng gây độc tính hoặc đột biến gen, ảnh hưởng không nhỏ đến hiệu quả điều trị lâm sàng và đặc tính an toàn của thuốc đối với bệnh nhân. Các nghiên cứu đã cho thấy tạp A và tạp D của allopurinol là sản phẩm trung gian trong quá trình tổng hợp. Tạp A và tạp B cũng là sản phẩm phân hủy của allopurinol khi gặp tác nhân kiềm hóa. Tạp C, E, F là các sản phẩm phụ được tạo thành từ sản phẩm trung gian trong quá trình tổng hợp allopurinol. Các tạp A, B, C, D, E, F đã được chứng minh có khả năng gây độc tính trên da và gây hội chứng Steven Johnson do tác dụng lên gen HLA-B*5801, trong đó tạp F allopurinol nằm trong nhóm III cấu trúc khả năng gây đột biến gen và ung thư. Hiện nhiều chuyên luận của hầu hết được điển các nước tham chiếu như USP-NF 2023; BP 2023; EP 11.2 và ĐĐVN V, kiểm

tra tạp chất liên quan là một tiêu chuẩn bắt buộc trong kiểm nghiệm nguyên liệu và thành phẩm allopurinol.

Trong khi đó, các chuẩn tạp này đang được bán với giá rất đắt, phải nhập khẩu từ nước ngoài với giá bán trung bình mỗi tạp là 2500 USD/100 mg (USP standard 2023) và một số tạp lại không sẵn có như tạp F. Vì thế gây không ít khó khăn cho công tác kiểm nghiệm nguyên liệu và chế phẩm chứa allopurinol. Trên thế giới hiện chưa có công trình nghiên cứu nào công bố về thiết lập chất chuẩn tạp, cũng như quy trình định lượng đồng thời các tạp chất liên quan trong thành phẩm bằng các kỹ thuật phân tích hiện đại như sắc ký lỏng ghép đầu dò khối phổ 2 lần. Cho đến nay chưa có nghiên cứu nào trong nước công bố quy trình tổng hợp các tạp liên quan allopurinol.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Đề tài: “Tổng hợp và thiết lập tạp chất đối chiếu Allopurinol sử dụng trong kiểm nghiệm” được thực hiện với 3 mục tiêu chính.

Mục tiêu của đề tài là:

1. Tổng hợp 6 tạp chất liên quan của allopurinol A, B, C, D, E, F ở quy mô phòng thí nghiệm.
2. Xây dựng tiêu chuẩn và thiết lập các tạp chất đối chiếu của allopurinol A, B, C, D, E, F đạt yêu cầu chất đối chiếu quốc gia.
3. Xây dựng, thẩm định và ứng dụng quy trình định lượng đồng thời 6 tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol bằng phương pháp LC-MS/MS.

3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

- Đối tượng: tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol.

- Phương pháp: Tổng hợp các tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol bằng phản ứng hóa học ở quy mô phòng thí nghiệm. Xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ nghiệm UV-Vis; IR; HRMS; NMR. Thiết lập chất đối chiếu sản phẩm tổng hợp ở 3 phòng thí nghiệm đạt GLP hoặc ISO 17025, xác định giá trị công bố. Ứng dụng LC-MS/MS định lượng đồng thời 6 tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol trong nguyên liệu, thành phẩm trên thị trường.

4. Những đóng góp mới của luận án

- Lần đầu xây dựng quy trình tổng hợp thành công tạp E allopurinol từ nguyên liệu là tạp D allopurinol và acid formic. Cải tiến trong quy trình tổng hợp tạp A allopurinol dạng muối hemisulfat và quy trình tổng hợp tạp B và C sử dụng nguyên liệu là tạp A allopurinol hemisulfat độ tinh khiết cao so với các công trình nghiên cứu trước về điều kiện phản ứng đơn giản, hiệu suất và độ tinh khiết sản phẩm cao.

- Lần đầu thiết lập 6 tạp chất đối chiếu A, B, C, D, E, F của allopurinol đạt chuẩn quốc gia. Lần đầu xây dựng được quy trình định lượng đồng thời 6 tạp A, B, C, D, E, F bằng LC-MS/MS theo hướng dẫn ICH có ý nghĩa trong nghiên cứu phân tích tạp chất liên quan ở Việt Nam và trên thế giới.

5. Bố cục của luận án

Luận án gồm 150 trang, các nội dung tương ứng với số trang như sau: Mở đầu 2; Tổng quan: 38; Đối tượng – phương pháp: 23; Kết quả: 45; Bàn luận: 40; Kết luận – Kiến nghị: 2. Luận án có 48 bảng biểu; 27 Hình minh họa; 39 sơ đồ; 127 tài liệu (tài liệu tiếng việt; tiếng anh; trang web); 5 Bộ phụ lục (150 trang).

NỘI DUNG LUẬN ÁN

Chương 1: Tổng quan tài liệu

1.1. Tổng quan về allopurinol và nguồn gốc hình thành các tạp liên quan A, B, C, D, E, F. Các công trình nghiên cứu liên quan đến tổng hợp các tạp allopurinol.

1.2. Kiểm nghiệm tạp chất liên quan của allopurinol theo Dược điển Việt Nam V và các dược điển tham chiếu: BP 2023; EP 11.2; USP-NF 2023.

1.3. Một số phương pháp xác định độ tinh khiết.

Phương pháp sắc ký lớp mỏng, phương pháp nhiệt vi sai DSC, phương pháp nhiệt nóng chảy, phương pháp HPLC-DAD.

1.4. Chất đối chiếu: Khái niệm và quy trình thiết lập.

1.5. Tổng quan về thẩm định quy trình theo ICH Q2(R2) và phương pháp LC-MS/MS trong định lượng tạp chất liên quan.

Chương 2: Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Thiết kế nghiên cứu

Trình tự nội dung nghiên cứu được trình bày theo các bước: Tổng hợp 6 tạp chất liên quan A, B, C, D, E, F của allopurinol → Xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp bằng phổ nghiệm UV-Vis; IR; HRMS; NMR có so chuẩn → Khảo sát điều kiện tăng hiệu suất và độ tinh khiết tạp tổng hợp → thiết lập chất đối chiếu 6 tạp allopurinol → Xây dựng thẩm định và ứng dụng định lượng đồng thời 6 tạp allopurinol bằng LC-MS/MS.

2.2. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 6 tạp chất liên quan A, B, C, D, E, F của allopurinol.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Thời gian: Từ Tháng 5/2017 đến Tháng 5/2023.

Địa điểm: Bộ môn Hóa phân tích – Kiểm nghiệm Đại học Y
Dược Cần Thơ; Viện Kiểm nghiệm thuốc TP.HCM

2.4. Cỡ mẫu của nghiên cứu

- Tập A, B, C, D, E, F được tổng hợp tối thiểu 200 lọ; mỗi lọ 10mg. Nguyên liệu hoạt chất allopurinol 2000g được cung cấp từ Honor Bio – Pharm (Trung Quốc) và nguyên liệu hóa chất cơ bản trong tổng hợp và phân tích.

2.5. Xác định các biến số độc lập và biến phụ thuộc

2.6. Phương pháp và công cụ đo lường thu thập số liệu

- Phương pháp tổng hợp hóa học bao gồm tổng hợp từ các nguyên liệu hoặc phân hủy trong các điều kiện tỷ lệ mol tham gia phản ứng, nhiệt độ và thời gian phản ứng.

- Phương pháp phổ nghiệm xác định cấu trúc bằng UV-Vis; IR; HRMS; NMR.

- Phương pháp phân tích xác định độ tinh khiết và định lượng bằng kỹ thuật hiện đại HPLC – DAD; LC-MS/MS.

2.7. Quy trình thu thập và cách phân tích số liệu

Tổng hợp 6 tập A, B, C, D, E, F của allopurinol

- Tổng hợp tập A từ phân hủy allopurinol với các tác nhân kiềm hóa NH_3 ; NaHCO_3 ; NaOH .

- Tổng hợp tập B từ tập A allopurinol hemisulfat và acid formic.

- Tổng hợp tập C từ tập A allopurinol hemisulfat và hydrazin hydrat 80%.

- Tổng hợp tập D từ ethyl (ethoxymethylen) cyanoacetat và hydrazin hydrat.

- Tổng hợp tạp E theo 2 phương pháp.

Phương pháp 1: phản ứng tạp D allopurinol và triethyorthoformat

Phương pháp 2: phản ứng tạp D allopurinol và acid formic.

- Tổng hợp tạp F theo 2 phương pháp

Phương pháp 1: phản ứng ethyl (ethoxymethylen) cyanoacetate, triethyl orthoformat và ethyl 2-cyanoacetat.

Phương pháp 2: phản ứng ethyl (ethoxymethylen) cyanoacetat và hydrazin hydrat 50%.

- Xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp bằng UV-Vis; IR; HRMS; NMR so với chuẩn. Cải tiến quy trình tổng hợp: khảo sát tỷ lệ mol; nhiệt độ phản ứng, thời gian phản ứng, phương pháp kết tinh, loại tạp để có hiệu suất và độ tinh khiết cao nhất.

- Thiết lập chất đối chiếu tạp chất liên quan allopurinol.

- Xây dựng, thẩm định và ứng dụng quy trình định lượng đồng thời 6 tạp chất liên quan A, B, C, D, E, F trong một số nguyên liệu và thành phẩm allopurinol có trên thị trường bằng phương pháp LC-MS/MS.

Chương 3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Tổng hợp và tinh chế tạp chất liên quan của allopurinol

Quy trình tổng hợp tạp A allopurinol hemisulfat

Hòa tan 2,0 g allopurinol (14,7 mmol) vào 50 ml dung dịch NaOH 1 M (50 mmol). Đun hồi lưu dung dịch ở nhiệt độ 180 °C trong 5 giờ. Để nguội, sau đó điều chỉnh pH của dung dịch đến giá trị pH = 5 bằng dung dịch H₂SO₄ 10%, lọc lấy dịch. Tiếp tục điều chỉnh pH dịch lọc thu được đến giá trị pH = 1,5 bằng dung dịch H₂SO₄ 10%. Để dung dịch qua đêm ở nhiệt độ phòng, lọc

cẩn thận để thu lấy tủa. Rửa tủa bằng nước cất lạnh (3 ml/lần x 3 lần). Sấy ở 60 °C để thu lấy sản phẩm. Tinh chế, loại tạp: cho sản phẩm tổng hợp vào cốc có mỏ 100 ml, thêm khoảng 80 ml hỗn hợp ethanol 96° – nước (4:1) đã làm lạnh, khuấy đều hỗn hợp khoảng 3 phút, sau đó lọc qua giấy lọc thu lấy sản phẩm. Sấy sản phẩm ở 60 °C đến khối lượng không đổi. Hiệu suất toàn bộ quy trình sau tinh chế: 48,8%.

Quy trình tổng hợp tạp B allopurinol

Cân 2,5 g tạp A allopurinol hemisulfat (14,27 mmol) cho vào 20 ml formamid ($\approx 0,5$ mol), thêm tiếp vào 0,2 ml acid formic, đun hồi lưu trong 2 giờ. Sau khi kết thúc phản ứng, cho sản phẩm tổng hợp vào 30 ml nước cất khuấy đều, lọc lấy tủa. Rửa tủa bằng nước cất lạnh (3 ml/lần x 3 lần). Sấy ở 60°C để thu lấy sản phẩm. Tinh chế, loại tạp: cho sản phẩm vào cốc có mỏ 50 ml, thêm vào khoảng 25 ml hỗn hợp ethanol 96°– nước (4:1) đã làm lạnh, khuấy đều hỗn hợp khoảng 3 phút, lọc qua giấy lọc thu lấy sản phẩm. Sấy sản phẩm ở 60 °C đến khối lượng không đổi. Hiệu suất toàn bộ quy trình sau tinh chế: 69,35%.

Quy trình tổng hợp tạp C allopurinol

Cho khoảng 6,0 ml hydrazin hydrat 80% ($\approx 0,15$ mol) vào bình cầu 2 cổ. Hút chính xác khoảng 11,5 ml acid formic ($\approx 0,30$ mol) vào bình cầu, lắc đều, đun hoàn lưu trong 30 phút. Cho từ từ 1,75 g nguyên liệu tạp A allopurinol hemisulfat ($\approx 0,01$ mol), khuấy đều cho đến khi tan hoàn toàn. Đun hồi lưu (≈ 95 °C) trong 5 giờ. Để nguội, dùng methanol loại tủa vô cơ lần đầu. Dịch lọc tiếp tục được cô quay ở áp suất 160-180 mBar ở 65 °C để loại nước và

methanol. Thu sản phẩm, sấy ở 60 °C. Tinh chế, loại tạp: cho sản phẩm vào cốc có mỏ 50 ml, hòa tan với lượng vừa đủ methanol, tiếp tục lọc loại tủa vô cơ, cô quay ở nhiệt độ 40 °C loại bỏ dung môi methanol, kết tinh lại tủa, rửa nhanh tủa với nước cất lạnh; sản phẩm sấy ở 60 °C đến khối lượng không đổi. Hiệu suất toàn bộ quy trình sau tinh chế: 68,73%.

Quy trình tổng hợp tạp D allopurinol

Lấy 1,70 g ethyl (ethoxymethylen)cyanoacetat (0,01 mol), thêm vào 40 ml ethanol. Lắc đều cho tan, thêm vào 1,2 ml hydrazin hydrat 80% (0,02 mol). Đun hồi lưu trong 3 giờ. Cô quay dịch sau phản ứng cho hết dung môi. Thu sản phẩm và sấy ở 60 °C.

Cho sản phẩm vào cốc có mỏ 50 ml, hòa tan bằng 40 ml diethyl eter; lọc bỏ tạp; cô quay thu hồi dung môi. Rửa tủa nhanh bằng 5 ml ethyl acetat. Sấy ở 50 °C đến khối lượng không đổi. Hiệu suất toàn bộ quy trình sau tinh chế: 66,12%.

Quy trình tổng hợp tạp E allopurinol

Cho 1,55 g tạp D allopurinol ($\approx 0,01$ mol) vào bình cầu 2 cổ. Hòa tan tạp D bằng lượng methanol tối thiểu, thêm vào 38 ml HCOOH (≈ 1 mol), lắc đều. Đun hồi lưu trong 4 giờ. Lọc lấy tủa thu được. Sấy ở 60 °C. Tinh chế, loại tạp: cho sản phẩm tổng hợp vào cốc có mỏ 50 ml. Hòa tan tủa trong 100 ml ethanol 96°. Cô quay áp suất thấp ở 60 °C thu tủa. Rửa tủa bằng 15 ml nước cất lạnh x 3 lần. Sấy sản phẩm thu được ở 50 °C đến khối lượng không đổi. Hiệu suất toàn bộ quy trình sau tinh chế: 64%.

Quy trình tổng hợp tạp F allopurinol

Cho 3,5 g nguyên liệu ethyl (ethoxymethylen)cynoacetat ($\approx 0,02$ mol) vào bình cầu 2 cổ và cho vừa đủ ethanol 96° khuấy tan, cho vào 0,5 ml hydrazin hydrat 50% ($\approx 0,005$ mol) đun hồi lưu hỗn hợp trên bếp khuấy từ kết hợp hệ thống sinh hàn. Cho phản ứng xảy ra trong 30 phút. Lọc và rửa rửa 3 lần, mỗi lần với 20 ml hỗn hợp ethanol nước (1:1). Thu sản phẩm và sấy ở 60 °C.

Tinh chế, loại tạp: rửa sản phẩm với ethanol - nước lạnh (1:1). Thu sản phẩm, tiếp tục sấy chân không 60 °C trong 3 giờ. Hiệu suất toàn bộ quy trình sau tinh chế: 60%.

3.2. Xây dựng tiêu chuẩn và thiết lập tạp chất đối chiếu của allopurinol

3.2.1. Xây dựng quy trình định lượng tạp chất đối chiếu của allopurinol

Tính tương thích hệ thống

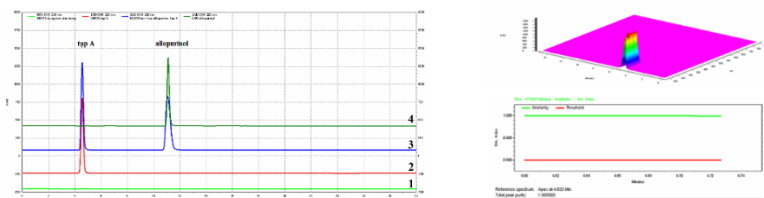
Quy trình định lượng		t _R (phút)	S (μ V.s)	As	N
Tạp A allopurinol	TB	4,77	51702575	1,17	3506
	RSD %	0,44	0,62	0,38	1,92
Tạp B allopurinol	TB	3,65	25400776	1,30	5037
	RSD %	0,50	1,74	1,80	1,74
Tạp C allopurinol	TB	6,15	26546996	1,05	5115
	RSD %	1,83	0,77	0,98	0,98
Tạp D allopurinol	TB	15,77	16804805	1,28	9446
	RSD %	0,22	0,18	0,98	1,36
Tạp E allopurinol	TB	17,55	7327598	1,18	12062
	RSD %	0,12	0,5	1,18	0,65
Tạp F allopurinol	TB	9,24	114199002	1,09	6164
	RSD %	0,84	1,12	1,90	1,92

Bảng 3. 1. Tóm tắt điều kiện sắc ký các quy trình định lượng các tạp allopurinol bằng phương pháp HPLC-DAD

Tên tạp	Nồng độ (µg/ml)	Pha tĩnh	Pha động	Nhiệt độ cột (° C)	Bước sóng (nm)	Tốc độ dòng (ml/phút)	Thể tích tiêm mẫu (µl)
Tạp A allopurinol	50	Cột Gemini NX C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril – acid phosphoric pH 2,5 (2 : 98)	25	220	0,5	10
Tạp B allopurinol	50	Cột Gemini NX C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril – acid phosphoric pH 2,0 (2 : 98)	25	220	1,0	10
Tạp C allopurinol	50	Cột Synergi 4u MAX RP 80R (25 cm; 4,6 mm; 4 µm).	Acetonitril – acid phosphoric pH 2,0 (2 : 98)	25	200	1,0	20
Tạp D allopurinol	50	Cột Gemini NX C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril – acid phosphoric pH 2,5 (30 : 70)	40	254	1,0	10
Tạp E allopurinol	50	Cột Gemini NX C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril – acid phosphoric pH 3,0 (10 : 90)	25	220	1,0	10
Tạp F allopurinol	50	Cột Gemini NX C ₁₈ (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Acetonitril – acid phosphoric pH 2,5 (35 : 65)	25	254	1,0	10

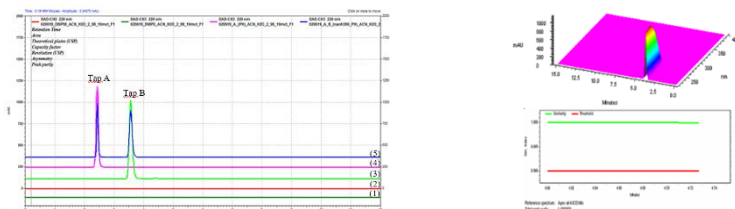
Tính đặc hiệu

Tính đặc hiệu tạp A allopurinol



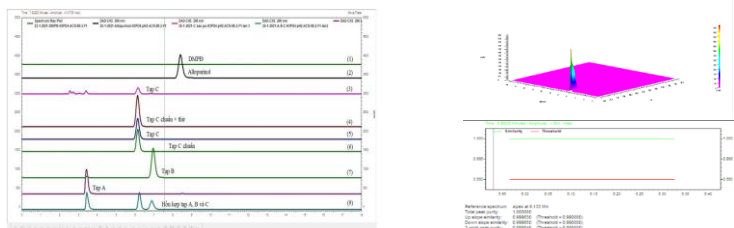
Hình 3. 3. Sắc ký đồ 3 chiều và độ tinh khiết pic tạp A allopurinol

Tính đặc hiệu tạp B allopurinol

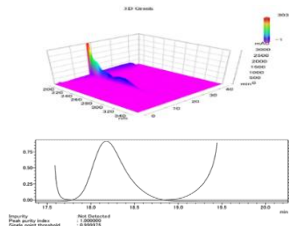


Hình 3. 5. Sắc ký đồ 3 chiều và độ tinh khiết pic tạp B allopurinol

Tính đặc hiệu tạp C allopurinol

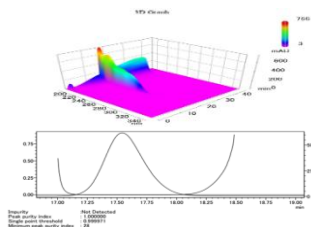


Hình 3. 7. Sắc ký đồ 3 chiều và độ tinh khiết pic tạp C allopurinol



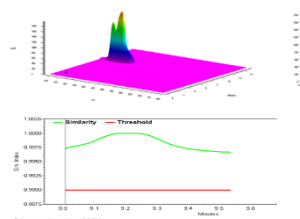
Hình 3.10.Sắc ký đồ 3 chiều và độ tinh khiết pic tạp D allopurinol

Tính đặc hiệu tại E allopurinol



Hình 3.13.Sắc ký đồ 3 chiều và độ tinh khiết pic tạp E allopurinol

Tính đặc hiệu tại F allopurnol



Hình 3.15.Sắc ký đồ 3 chiều và độ tinh khiết pic tạp F allopurinol

Miền giá trị, độ đúng, độ chính xác

Bảng 3. 2. Kết quả xác định miền giá trị, độ đúng, độ chính xác các quy trình phân tích các tạp chất

	Tạp A allopurinol	Tạp B allopurinol	Tạp C allopurinol	Tạp D allopurinol	Tạp E allopurinol	Tạp F allopurinol
Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 999246x$	$\hat{y} = 713781x$	$\hat{y} = 494223x$	$\hat{y} = 335081x$	$\hat{y} = 144916x$	$\hat{y} = 2 \cdot 10^6 x$
Hệ số R^2	0,9967	0,9975	0,9977	0,9998	0,9998	1,0000
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	30 - 70	30 - 70	25 - 100	30 - 70	30 - 70	35 - 65
Độ lặp lại RSD (%) (n = 6)	0,23	0,08	0,08	0,15	0,14	0,10
Độ chính xác trung gian RSD (%) (n = 12)	0,15	0,17	0,34	0,11	0,14	1,17
Độ đúng (n = 9)	98,0 - 101,3	98,2 - 101,67	99,8 - 101,4	99,1 - 100,7	99,1 - 100	99,2 - 99,7

3.2.2. Đánh giá và thiết lập chất đối chiếu tạp chất liên quan allopurinol

Đánh giá tạp tổng hợp đạt các yêu cầu theo mức chất lượng.

Bảng 3.5. Kết quả đánh giá chất lượng tạp A allopurinol

Chỉ tiêu	Phương pháp	Mức chất lượng
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Bột màu trắng
	<i>Độ tan</i>	Tan trong nước, tan tốt trong methanol, DMSO
Định tính	<i>Phổ UV</i>	$\lambda_{\max}$ (NaOH 0,1M): 222 nm, 250 nm
	<i>Phổ IR</i>	3444,33 và 3399,99 cm^{-1} (-NH- amin), 1665,53 cm^{-1} (-C=O amid), 1119,67 cm^{-1} (N-N pyrazol)
	<i>Phổ MS</i>	ESI-MS(+) m/z =127,06123 $[\text{M}+\text{H}]^+$
	<i>Phổ NMR</i>	Phổ ^{13}C NMR, ^1H NMR
Điểm chảy	<i>DSC</i>	237 – 238 °C
Hàm ẩm	<i>Mất khối lượng do làm khô</i>	$\leq 0,5\%$
Định lượng	<i>HPLC</i>	$\geq 95\%$ (99,72%)

Bảng 3.6. Kết quả đánh giá chất lượng tạp B allopurinol

Chỉ tiêu	Phương pháp	Mức chất lượng
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Bột màu trắng
	<i>Độ tan</i>	Tan trong nước, methanol, DMSO.
Định tính	<i>Phổ UV</i>	$\lambda_{\max}$ (NaOH 0,1M) 245,8 nm
	<i>Phổ IR</i>	3403,3 và 3218,2 ($\nu_{\text{N-H}}$, amin); 1707,9 ($\nu_{\text{C=O}}$, carbonyl), 1599,5 ($\nu_{\text{C=N}}$)
	<i>Phổ MS</i>	ESI-MS(+) m/z =177,0389 $[\text{M}+\text{Na}]^+$
	<i>Phổ NMR</i>	Phổ ^{13}C NMR, ^1H NMR

Điểm chảy	Máy đo điểm chảy	284-285 °C
Hàm ẩm	Mất khối lượng do làm khô	≤ 0,5%
Định lượng	HPLC	≥ 95% (99,6%)

Bảng 3.7. Kết quả đánh giá chất lượng tạp C allopurinol

Chỉ tiêu	Phương pháp	Mức chất lượng
Tính chất	Cảm quan	Bột màu trắng
	Độ tan	Ít tan trong nước, tan tốt trong methanol, DMSO.
Định tính	Phổ UV	$\lambda_{\max}$ (NaOH 0,1M): 200 nm
	Phổ IR	NH (3353,5 cm^{-1}); C=O (1688,9 cm^{-1}); -NH ₂ (3196,3 cm^{-1} ; 3072,8 cm^{-1}); -C=N (1626,9 cm^{-1})
	Phổ MS	ESI-MS(+) m/z = 179,06798 [M+H] ⁺
	Phổ NMR	Phổ ¹³ C NMR, ¹ H NMR
Điểm chảy	Máy đo điểm chảy	231 – 233°C
Hàm ẩm	Mất khối lượng do làm khô	≤ 0,5%
Định lượng	HPLC	≥ 95% (99,72%)

Bảng 3.8. Kết quả đánh giá chất lượng tạp D allopurinol

Chỉ tiêu	Phương pháp	Mức chất lượng
Tính chất	Cảm quan	Bột màu trắng
	Độ tan	Tan trong methanol, DMSO.
Định tính	Phổ UV	$\lambda_{\max}$ (MeOH) 224 nm và 257 nm
	Phổ IR	3481,1 (ν_{N-H} ; amin); 1671,4 ($\nu_{C=O}$; carbonyl), 1620,1 ($\nu_{C=N}$; pyrazol), 1195,9 và 1033,4 (ν_{C-O-} ; ester)
	Phổ MS	ESI-MS(+) m/z = 156,07775 [M+H] ⁺
	Phổ NMR	Phổ ¹³ C NMR, ¹ H NMR

Điểm chảy	<i>DSC</i>	106 – 108°C
Hàm ẩm	<i>Mất khối lượng do làm khô</i>	$\leq 0,5\%$
Định lượng	<i>HPLC</i>	$\geq 95\%$ (99,8%)

Bảng 3.9. Kết quả đánh giá chất lượng tạp E allopurinol

Chỉ tiêu	Phương pháp	Mức chất lượng
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Bột hoặc tinh thể màu trắng, không mùi
	<i>Độ tan</i>	Không tan trong nước, tan trong MeOH, DMSO
Định tính	<i>Phổ UV</i>	$\lambda_{\max}$ (MeOH): 208 nm, 233 nm, 247 nm
	<i>Phổ IR</i>	1607,77 (-NH-), 3217,78 (-NH- thơm), 1664,85 (-C=O)
	<i>Phổ MS</i>	ESI-MS(+) m/z =206,15395 [M+Na] ⁺
	<i>Phổ NMR</i>	Phổ ¹ H NMR và ¹³ C NMR
Điểm chảy	<i>Máy đo điểm chảy</i>	198 ± 1°C
Hàm ẩm	<i>Mất khối lượng do làm khô</i>	$\leq 0,05\%$
Định lượng	<i>HPLC</i>	$\geq 95\%$ (99,67%)

Bảng 3.10. Kết quả đánh giá chất lượng tạp F allopurinol

Chỉ tiêu	Phương pháp	Mức chất lượng
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Bột màu trắng
	<i>Độ tan</i>	Ít tan trong nước, tan tốt trong Chloroform, DMSO, ethanol
Định tính	<i>Phổ UV</i>	$\lambda_{\max}$ (NaOH 0,1 M) 254 nm; 295 nm
	<i>Phổ IR</i>	(KBr, cm-1): 3438,7 (-NH-); 2235,5 (-C≡N); 1712,7 (-C=O)
	<i>Phổ MS</i>	ESI-MS(+) m/z =301,09189 [M+Na] ⁺

	<i>Phổ NMR</i>	Phổ ^{13}C NMR; ^1H NMR
Điểm chảy	<i>Máy đo điểm chảy</i>	247-248 °C
Hàm ẩm	<i>Mất khối lượng do làm khô</i>	$\leq 0,5\%$
Định lượng	<i>HPLC</i>	$\geq 95\%$ (99,53%)

3.2.3. Thiết lập chất đối chiếu

Tất cả các tạp chất đối chiếu đều có độ tinh khiết sắc ký trên 99% tính theo nguyên trạng, đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia.

3.3. Xây dựng, thẩm định và ứng dụng quy trình định lượng đồng thời 6 tạp allopurinol bằng LC-MS/MS

3.3.1. Khảo sát điều kiện khối phổ tối ưu

Kết quả khảo sát điều kiện khối phổ tối ưu quy trình định lượng đồng thời 6 tạp allopurinol bằng phương pháp LC/MS/MS.

Chất phân tích	$[\text{M}+\text{H}]^+$	Mảnh	Nhiệt độ khí hoá hơi (°C)	Tốc độ khí hoá hơi (L/h)	Thế Cone (V)	Thế mao quản (kV)	Năng lượng buồng khí va chạm (V)	Ghi chú
Tạp A	126,9	109,9	400	900	15	4	13	đl
		53,9	400	900	15	4	18	đt
Tạp B	155,1	138	400	900	10	4	12	đl
		109,9	400	900	10	4	20	đt
Tạp C	178,8	78,9	400	900	20	4	25	đl
		109,9	400	900	20	4	20	đt
Tạp D	155,86	127,9	400	900	15	4	12	đl
		109,9	400	900	15	4	15	đt
Tạp E	183,87	109,9	400	900	8	4	14	đl

		138	400	900	8	4	10	đt
Tập F	279,1	187	400	900	10	4	25	đl
		233	400	900	10	4	15	đt

3.3.2. Khảo sát điều kiện sắc ký tối ưu định lượng đồng thời 6 tạp allopurinol và định lượng allopurinol

Pha tĩnh: Cột Gemini – NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m).

Pha động: Acetonitril – dung dịch acid formic 0,05%.

Tốc độ dòng: 0,8 mL/phút. Thể tích tiêm mẫu: 10 μ l.

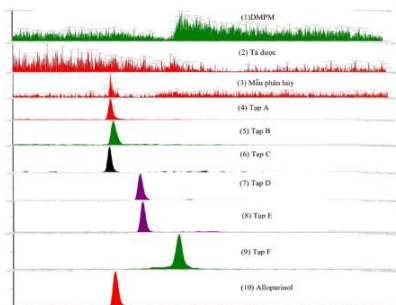
Điều kiện pha động: chương trình gradient.

Thời gian (phút)	0	0,6	1,2	7	7,1	12
Acetonitril (%)	50	70	100	100	50	50
Acid formic 0,05 (%)	50	30	0	0	50	50

Thẩm định quy trình định lượng đồng thời 6 tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol theo ICH Q2(R2).

Tính tương thích hệ thống: RSD < 2%.

Tính đặc hiệu



Hình 3. 1. Sắc ký đồ dung môi pha mẫu, tá dược, mẫu phân hủy, tạp A, B, C, D, E, F và allopurinol trong mẫu chuẩn

Khoảng tuyến tính và phương trình hồi quy

Chất phân tích	Khoảng tuyến tính (ppb)	Phương trình hồi quy	Hệ số tương quan (r^2)
Tạp A	20-200	$120,708x + 526,113$	0,998
Tạp B	10-200	$171,203x - 635,259$	0,995
Tạp C	10-200	$80,682x - 176,712$	0,997
Tạp D	10-200	$218,260x + 563,684$	0,999
Tạp E	10-200	$109,144x - 182,179$	0,996
Tạp F	20-200	$136,392x - 197,289$	0,998

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

(ppb)	Tạp A	Tạp B	Tạp C	Tạp D	Tạp E	Tạp F	Allopurinol
LOD	6	3	3	3	3	6	3
LOQ	20	10	10	10	10	20	10

Độ chính xác và độ chính xác trung gian; độ đúng đạt yêu cầu theo ICH Q2(R2).

3.3.3. Ứng dụng quy trình để định lượng đồng thời tạp A, B, C, D, E, F trong mẫu nguyên liệu và thành phẩm allopurinol trên thị trường.

Quy trình phân tích được áp dụng để phân tích ba mẫu nguyên liệu allopurinol và mười mẫu thành phẩm trong đó hai mẫu thành phẩm nhập khẩu có lượng tạp A cao hơn giới hạn cho phép theo quy trình phân tích và giới hạn quy định trong dược điển.

Chương 4. Bàn luận

4.1. Bàn luận về quy trình tổng hợp tinh chế 6 tạp của allopurinol

Bản về tạp A allopurinol hemisulfat: các công trình nghiên cứu đều tổng hợp dạng base tạp A của allopurinol là 3-aminopyrazol-4-carboxamid. Đề tài cung cấp quy trình tổng hợp đầy đủ về tạp A allopurinol dạng muối hemisulfat bằng tác nhân kiềm hoá NaOH chỉ qua 1 giai đoạn và dễ tinh chế.

Bàn về tạp B allopurinol: tạp B được tổng hợp từ nguyên liệu tạp A allopurinol hemisulfat có độ tinh khiết cao trên 99% làm tác nhân tham gia phản ứng formyl hóa với acid formic thực hiện ở điều kiện nhiệt độ không quá 100 °C và không cần thực hiện trong lò vi sóng, hạn chế tạp phát sinh.

Bàn về tạp C allopurinol: so với công trình nghiên cứu của Yuan Huxing (2014), nghiên cứu sử dụng nguyên liệu là tạp A allopurinol hemisulfat dễ tan trong dung môi phân cực nên phản ứng không cần sử dụng dung môi hữu cơ độc hại như DMSO hay toluen, đồng thời phản ứng diễn ra nhanh, thời gian phản ứng ngắn, nhiệt độ không quá cao (khoảng 30 phút ở 95°C).

Bàn về tạp D allopurinol: tổng hợp từ nguyên liệu ethyl (ethoxymethylen)cyanoacetat và hydrazin hydrat 80 rút ngắn giai đoạn phản ứng so với nghiên cứu của Jean Druey, giúp quá trình phản ứng diễn ra nhanh, hạn chế tạp phát sinh.

Bàn về tạp E allopurinol: nghiên cứu tổng hợp tạp E allopurinol bằng 2 phương pháp khác nhau đều có kết quả sản phẩm tạo thành phù hợp với tính chất tạp E allopurinol chuẩn. Trong đó phương pháp 2 tổng hợp tạp E allopurinol từ nguyên liệu tạp D allopurinol với acid formic lần đầu tiên được thực hiện.

Bàn về tạp F allopurinol: phản ứng chọn lọc trong điều kiện lượng dư ethyl (ethoxymethylen)cyanoacetat (EEMCA) với tỷ lệ mol EEMCA và hydrazin hydrat 50% tối ưu là ($\approx 4:1$) giúp phản ứng chuyển dịch mạnh theo chiều thuận tạo thành tạp F.

4.2. Bàn luận về xây dựng và đánh giá tạp chất đối chiếu của allopurinol

Dược điển Việt Nam V; BP 2023 và USP-NF-2023 có các quy trình xác định giới hạn tạp chất liên quan A, B, C, D, E, F của allopurinol, tuy nhiên các quy trình chỉ dừng lại ở xác định phần trăm tạp chất so với nguyên liệu allopurinol với diện tích pic các chất A, B, C, D, E, F thấp (không quá 0,2% so với allopurinol), dẫn đến quy trình chưa phù hợp để xác định độ tinh khiết sản phẩm là nguyên liệu tổng hợp các tạp. Đề tài lần đầu đã xây dựng và thẩm định quy trình định lượng các tạp A, B, C, D, E, F bằng HPLC đầu dò dải diod quang (DAD) theo hướng dẫn của ICH Q2(R1) hướng đến thiết lập chất chuẩn tạp đối chiếu.

4.2.1. Về xây dựng và thiết lập chất đối chiếu của allopurinol

Quy trình thiết lập chất chuẩn tạp A, B, C, D, E, F theo USP-NF 2023 được thực hiện theo đúng thủ tục thiết lập và hiệu chuẩn chất chuẩn của Viện kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh cũng như quy trình thiết lập một chất chuẩn đối chiếu quốc gia. Các nguyên liệu thiết lập chuẩn được kiểm tra chất lượng và đều đạt tiêu chuẩn làm nguyên liệu để thiết lập chất chuẩn. Toàn bộ quá trình sản xuất chuẩn đã được thực hiện trong điều kiện nghiêm ngặt, đóng chuẩn trong điều kiện khí Nitơ (99,99%), độ ẩm $\leq 2\%$, ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, sau đó bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8 °C.

4.2.2. Bàn luận về xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết các tạp allopurinol

Quy trình xác định độ tinh khiết tạp A, B, C, D, E, F allopurinol sử dụng pha tĩnh là cột Phenomidex Gemini NX và Synergi 4u vì khả năng chịu được khoảng pH rộng (từ 1-12) trong các điều kiện pha động là acid có pH thấp. Thành phần pha động là acetonitril và acid phosphoric hoặc acid formic đều là những dung môi dễ bay hơi giúp hệ thống không bị tủa muối, làm ổn định áp suất ưu điểm hơn so với quy trình trong Dược điển Việt Nam V và các dược điển tham chiếu.

4.3. Bàn luận về xây dựng, thẩm định và ứng dụng quy trình định lượng đồng thời 6 tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol bằng LC-MS/MS

So sánh với quy trình trong Dược điển Việt Nam V; BP 2023 và USP NF-2023 và các nghiên cứu, quy trình định lượng 6 tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol bằng LC-MS/MS nhiều ưu điểm

- + Không phải sử dụng nhiều quy trình để thực hiện định lượng từng nhóm tạp khác nhau như Dược điển Việt Nam V, BP 2023.
- + Không bị ảnh hưởng bởi hệ số phân giải các pic như USP-NF 2023 và nghiên cứu Sajjan PG.
- + Không sử dụng các đệm muối vô cơ KH_2PO_4 như trong ĐĐVN V; BP 2023; USP-NF 2023, nghiên cứu Sukhdev nên không gây tắc hệ thống, làm tăng áp suất.
- + Quy trình LC-MS/MS định lượng được đồng thời 6 tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol trong thành phẩm mà ĐĐVN V; BP 2023; USP-NF 2023 chưa có.

+ Quy trình có thời gian phân tích ngắn tối đa 10 phút so với ĐDVN V là 25 phút; BP 2023: 25 phút và USP-NF 2023: 46 phút, đồng thời đạt các yêu cầu theo hướng dẫn ICH Q2(R2).

Chương 5. Kết luận và kiến nghị

KẾT LUẬN

Đề tài đã đạt được các mục tiêu đề ra của luận án, cụ thể:

Về tổng hợp 6 tạp chất liên quan của allopurinol A, B, C, D, E, F ở quy mô phòng thí nghiệm

Nghiên cứu đã tổng hợp thành công 6 tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol ở quy mô phòng thí nghiệm. Xây dựng quy trình tổng hợp và tinh chế thành công 6 mẻ liên tiếp với khối lượng sản phẩm mỗi mẻ lớn hơn 1000 mg, độ tinh khiết lớn hơn 99%.

Về thiết lập tạp chuẩn A, B, C, D, E, F đạt yêu cầu chất đối chiếu quốc gia

Xây dựng 6 quy trình định lượng 6 tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol bằng phương pháp HPLC-DAD đạt yêu cầu theo ICH Q2(R1). Đánh giá chất đối chiếu theo hướng dẫn WHO và xử lý thống kê theo ISO 13528 và 17043, đề tài đã thiết lập 6 tạp chuẩn của allopurinol đạt tiêu chuẩn quốc gia, thành phẩm mỗi tạp 200 lọ (10mg/lọ). Cụ thể:

STT	Tên tạp chất allopurinol	Bán thành phẩm (lọ)	Thành phẩm (lọ)	HL (%)
1	Tạp A	250	200	99,7
2	Tạp B	250	200	99,6
3	Tạp C	250	200	99,7
4	Tạp D	250	200	99,8

5	Tạp E	250	200	99,7
6	Tạp F	250	200	99,5

Về xây dựng, thẩm định và ứng dụng quy trình định lượng đồng thời 6 tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol bằng phương pháp LC-MS/MS

Xây dựng được quy trình định lượng đồng thời 6 tạp Allopurinol đạt tính tương thích hệ thống; độ đặc hiệu, độ chính xác $RSD \leq 2\%$; tính tuyến tính có $R^2 \geq 0,995$; LOQ thấp 10 ppb – 20 ppb, độ đúng có tỷ lệ hồi phục đạt 95% - 105% theo hướng dẫn của ICH Q2(R2). Ứng dụng quy trình định lượng 3 mẫu nguyên liệu và 10 mẫu thành phẩm allopurinol khác nhau trên thị trường; kết quả cho thấy có 2 thành phẩm nhập khẩu có tỷ lệ tạp A vượt giới hạn cho phép theo quy định của Dược điển Việt Nam V; BP 2023 và USP-NF-2023.

KIẾN NGHỊ

- Thực hiện đánh giá độ ổn định các tạp allopurinol và đánh giá lại chuẩn tạp.
- Nghiên cứu về định tính và định lượng các tạp phát sinh hoặc phân hủy của các tạp A, B, C, D, E, F allopurinol trong quá trình tổng hợp và bảo quản.
- Ứng dụng quy trình định lượng phân tích thêm các tạp allopurinol trong nguyên liệu và thành phẩm có trên thị trường.

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

1. **Lữ Thiện Phúc**, Trương Ngọc Tuyền, Trần Việt Hùng. Tổng hợp và thiết lập chất đối chiếu tạp F của allopurinol (ethyl-(e/z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethenyl)amino-1H-pyrazol-4-carboxylat. *Tạp chí Y học Việt Nam*. 2024;534(1):286-292.
2. **Lữ Thiện Phúc**, Nguyễn Duy Gia Bảo, Vương Vinh Hưng, Trương Lê Minh Thư, Trương Ngọc Tuyền, Trần Việt Hùng, Nguyễn Đức Tuấn. Xây dựng và định lượng đồng thời tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol bằng phương pháp LC-MS/MS. *Tạp chí Y dược học Cần Thơ*. 2023;9:147-153.
3. **Lữ Thiện Phúc**, Trần Lý Tường, Nguyễn Thanh Hà, Nguyễn Thị Phương Tuyền, Lâm Tuấn Nghĩa. Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết tạp C allopurinol bằng phương pháp sắc ký lỏng với đầu dò dãy diod quang. *Tạp chí Y Dược học Cần Thơ*. 2021;7(36):161-167.
4. **Lữ Thiện Phúc**, Đào Anh Dũng, Trương Ngọc Tuyền, Trần Việt Hùng, Nguyễn Đức Tuấn. Tổng hợp và thiết lập chất đối chiếu tạp E của allopurinol. *Tạp chí Y Dược học*. 2021;13:22-28.
5. **Lữ Thiện Phúc**, Cao Thị Kim Tuyền, Nguyễn Mỹ Hân, Nguyễn Mạnh Quân, Trương Ngọc Tuyền, Trần Việt Hùng, Nguyễn Đức Tuấn. Tối ưu hóa quy trình tổng hợp tạp B và E của allopurinol bằng mô hình Box – Behnken. *Tạp chí Y Dược học Cần Thơ*. 2020;26:142–150.
6. Nguyễn Trần Văn Anh, **Lữ Thiện Phúc**, Phạm Lê Ngọc Yến, Nguyễn Đức Tuấn. Tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạp chất liên quan D (ethyl 5-amino-1H-pyrazol-4-carboxylat) của allopurinol. *Tạp chí Dược học*. 2018;512:32-35.