

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



NGUYỄN HỮU TIẾN

**TỔNG HỢP VÀ THIẾT LẬP TẠP CHẤT
ĐỐI CHIẾU CỦA CARVEDILOL SỬ DỤNG
TRONG KIỂM NGHIỆM**

Ngành: Kiểm nghiệm thuốc – 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:

Người hướng dẫn khoa học:

PGS. TS. Trương Ngọc Tuyên

PGS. TS. Trần Hữu Dũng

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

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
- Thư viện Đại học

1. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN:

1.1. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Tạp chất liên quan là những chất được tạo thành trong quá trình sản xuất, bảo quản và lưu thông phân phối của nguyên liệu và thành phẩm. Các tạp chất này dù chỉ tồn tại một lượng nhỏ cũng có thể làm ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm, tác động không nhỏ đến hiệu quả điều trị của thuốc.

Trong khi đó, carvedilol là thuốc tim mạch sử dụng trong điều trị suy tim, bệnh động mạch vành, tăng huyết áp, suy thận, bệnh tiểu đường. Hiện nay ở nước ta có ít nhất 11 đơn vị sản xuất các dạng bào chế khác nhau chứa carvedilol. Đối với dược chất carvedilol, dược điển Mỹ (USP) 43 qui định phải kiểm tra 9 tạp, trong đó 5 tạp yêu cầu có chất chuẩn đối chiếu đơn thành phần, gồm tạp A, B, C, D và E. Trong đó, tạp C là tạp phân hủy và tạp D được xếp vào nhóm có khả năng gây đột biến gen. Đây là các tạp cần được kiểm soát chặt chẽ trong thành phẩm carvedilol. Dược điển Việt Nam (ĐĐVN) V chưa có chuyên luận carvedilol.

Vấn đề kiểm soát các tạp chất liên quan trong nguyên liệu và thành phẩm carvedilol hiện gặp nhiều khó khăn tại Việt Nam vì nhiều lý do. Các tạp chất chuẩn không có sẵn trong ngân hàng chất chuẩn của các Viện Kiểm nghiệm, nên các đơn vị phải mua chất chuẩn bán với giá rất đắt từ nước ngoài và phải chờ đợi trong thời gian dài. Trong khi đó các công trình nghiên cứu từ tài liệu nước ngoài không công bố cụ thể, chi tiết đối với việc tổng hợp và tiêu chuẩn hóa các tạp của carvedilol.

1.2. Mục tiêu nghiên cứu

Mục tiêu của luận án là:

- Tổng hợp các tạp A, B, C, D và E của carvedilol ở qui mô phòng thí nghiệm.
- Thiết lập được các tạp chất đối chiếu A, B, C, D và E của carvedilol dùng cho mục đích định lượng.
- Xây dựng quy trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao và điện di mao quản.

1.3. Những đóng góp mới của nghiên cứu về mặt lý luận và thực tiễn

- Đã tổng hợp và xác định các điều kiện tổng hợp cho hiệu suất cao với các tạp A, B, C, D, E của carvedilol. Trong đó, quy trình tổng hợp tạp B và C từ carvedilol lần đầu tiên được công bố.
- Lần đầu tiên tại Việt Nam đã thiết lập các chất tạp chất đối chiếu A, B, C, D, E của carvedilol.
- Đã cải tiến qui trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp A, B, C, D, E trong nguyên liệu và thành phẩm bằng phương pháp HPLC.
- Lần đầu tiên công bố qui trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp A, B, C, D, E trong nguyên liệu và thành phẩm bằng phương pháp điện di mao quản.

1.4. Bố cục của luận án

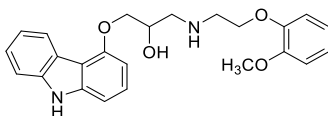
Luận án gồm 150 trang: Đặt vấn đề 2 trang, tổng quan tài liệu 37 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 29 trang, kết quả nghiên cứu 46 trang, bàn luận 33 trang, kết luận và kiến nghị 3

trang. Luận án gồm 15 hình, 25 sơ đồ và 29 bảng; 88 tài liệu tham khảo, 7 phụ lục và 5 bài báo đính kèm minh họa cho kết quả quá trình thực hiện nghiên cứu.

2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1 Carvedilol

Carvedilol (1-(9H-carbazol-4-yloxy)-3-(2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin)propan-2-ol) có công thức phân tử: $C_{24}H_{26}N_2O_4$ và công thức cấu tạo:



Carvedilol được đề cập trong các dược điển USP 2023, EP 11.0 BP 2023, JP 18 và không có chuyên luận trong DĐVN V. Carvedilol **(1)** được tổng hợp lần đầu bởi Fritz Wiedemann và cộng sự vào năm 1979 bằng cách mở vòng oxiran của 4-(2,3-epoxypropoxy)carbazol **(2)** bằng 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin **(3)** trong dung môi monoglyme và môi trường kiềm.

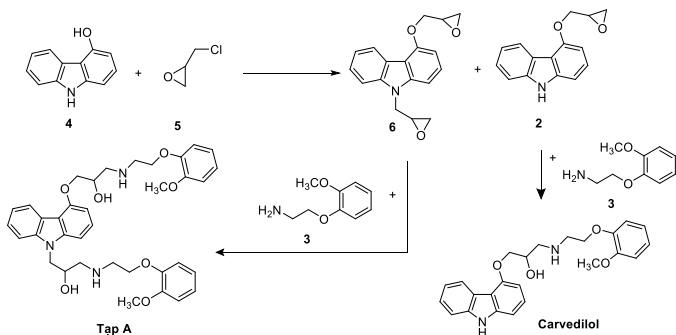
2.2. Các tạp chất liên quan của carvedilol

Các tạp chất liên quan của carvedilol trong các dược điển tham chiếu gồm: Tạp A (USP, BP, EP), tạp B (USP, BP, EP), tạp C (USP, BP, EP), tạp D (USP), tạp E (USP), tạp F (USP), carvedilol bisalkyl-pyrocatechol (USP), N-isopropyl carvedilol (USP), biscarbazol (USP) và tạp D (BP và EP). Trong khuôn khổ luận án, xin được trình bày chi tiết hơn về các tạp A, B, C, D, E của carvedilol theo USP.

* Tạp A

Tên khoa học: 1-(4-(2-Hydroxy-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propoxy)-9H-carbazol-9-yl)-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propan-2-ol.

Tạp A là tạp xuất hiện trong quá trình tổng hợp carvedilol, theo sơ đồ dưới.



Cho đến nay, chỉ có một vài công trình nghiên cứu về tạp A.

Năm 2009, G. Madhusudhan và cộng sự đã nghiên cứu tổng hợp tạp A qua các giai đoạn: tổng hợp *N*-benzyl-2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (7), tổng hợp 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (6) từ (2) và epichlorohydrin (5). Từ sản phẩm (6), nghiên cứu đã tổng hợp tạp A theo hai con đường:

+ Cho sản phẩm (6) phản ứng với (7) để tạo thành 1-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)-3-(4-(3-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)-2-hydroxypropoxy)-9H-carbazol-9-yl)propan-2-ol (8), sau đó thực hiện phản ứng debenzyl hóa với tác nhân hydrazin hydrat với xúc tác Pd/C. Hiệu suất tổng hợp theo con đường này là 34,3 %.

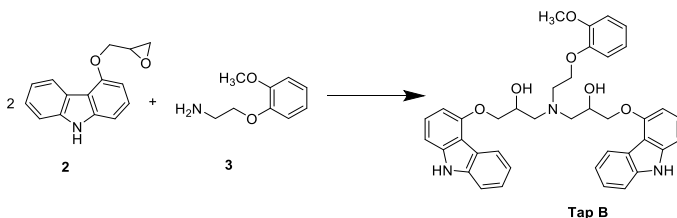
+ Cho sản phẩm **(6)** phản ứng với **(3)** để tạo thành tạp A. Hiệu suất tổng hợp bằng phương pháp này là 32,8%.

Năm 2010, Somisetti Narender Rao và cộng sự nghiên cứu tổng hợp tạp A qua 2 giai đoạn: Tổng hợp **(6)** từ **(2)** và **(5)**; Tổng hợp tạp A từ **(3)** và **(6)**. Hiệu suất phản ứng là 45%.

* Tạp B

Tên khoa học: 3,3'-(2-(2-Methoxyphenoxy)ethylazandiyl)bis(1-(9H-carbazol-4-yloxy) propan-2-ol).

Tạp B là tạp xuất hiện trong quá trình tổng hợp carvedilol, theo sơ đồ dưới.



Năm 2010, Somisetti Narender Rao và cộng sự đã nghiên cứu tổng hợp tạp B theo con đường phát sinh tạp này từ **(3)** và **(2)** trong dung môi monoglyme. Hiệu suất của quy trình là 38,5%. Độ tinh khiết của tạp không được đề cập.

* Tạp C

Tên khoa học: 1-(9H-Carbazol-4-yloxy)-3-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino) propan-2-ol.

Tạp C là vừa là tạp phân hủy vừa là tạp xuất hiện trong quá trình tổng hợp carvedilol, theo sơ đồ dưới. khi tổng hợp carvedilol, để tránh sự hình thành của tạp B, người ta sử dụng *N*-benzyl-2-(2-methoxyphenoxy) ethanamin **(4)** thay **(3)** để mở vòng **(2)**. Sau đó

* Tap D

Tạp D là nguyên liệu tổng hợp carvedilol, xuất hiện trong nguyên liệu và thành phẩm do tồn dư trong quá trình tổng hợp.

Năm 2010 và 2011, Somiseti Narender Rao và K. Suneel Kumar đã nghiên cứu tổng hợp tạp D từ 4-hydroxycarbazol và epichlorohydrin trong DMSO và xúc tác NaOH.

* Tap E

6

Năm 2009, Thota Giridhar đã tổng hợp tạp E qua 3giai đoạn sau: Tổng hợp 1-(2-cloroethoxy)-2-methoxybenzen; tổng hợp dẫn xuất phthalimid của 1-(2-cloroethoxy)-2-methoxybenzen và tổng hợp tạp E.

2.3. Thiết lập chất đối chiếu

Chất đối chiếu (CĐC) là chất đồng nhất đã được xác định là đúng để dùng trong các phép thử đã được quy định về hoá học, vật lý và sinh học. Trong các phép thử đó các tính chất của CĐC được so sánh với các tính chất của chất cần thử.

Chuẩn sơ cấp hay chuẩn đối chiếu hóa học gốc (PCRS) là chuẩn được công nhận rộng rãi, có các chỉ tiêu chất lượng phù hợp với tài liệu công bố, cụ thể và giá trị ấn định của nó được sử dụng làm tiêu chuẩn phân tích mà không cần phải so sánh với chất hóa học khác. Chuẩn đối chiếu hóa học thứ cấp (SCRS) là chuẩn mà các tính chất hay chỉ tiêu chất lượng của nó được thiết lập dựa trên chuẩn sơ cấp.

Các chất chuẩn nói chung và đặc biệt là các chất chuẩn tạp ở Việt Nam còn rất hạn chế do số lượng chất chuẩn thiết lập được trong nước còn ít so với lượng hoạt chất đang lưu hành trên thị trường. Tại Việt Nam hiện nay, số lượng tạp chuẩn được thiết lập còn rất ít, khoảng 27 chất, do Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh thiết lập. So sánh với nhu cầu sử dụng chuẩn tạp chất thì số lượng này là quá ít. Bên cạnh đó, tại Việt Nam đã có một số đề tài nghiên cứu tổng hợp tạp chất dùng cho công tác kiểm nghiệm thuốc.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là 5 tạp chất liên quan của carvedilol theo USP: tạp A, B, C, D và E. Các mẫu thử gồm 06 mẫu thành phẩm viên nén khác nhau chứa carvedilol và 03 mẫu nguyên liệu carvedilol.

3.2. Phương pháp nghiên cứu

- Tổng hợp, tinh chế các tạp:

Tạp A được tổng hợp theo 2 giai đoạn sau: Tổng hợp 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**); Tổng hợp tạp A. Trong mỗi giai đoạn, khảo sát các yếu tố ảnh hưởng gồm dung môi, xúc tác,.

Tạp B: được tổng hợp từ carvedilol hoặc 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin phản ứng với 4-(2,3-epoxypropoxy)carbazol. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng gồm tác nhân phản ứng, dung môi, nhiệt độ, thời gian phản ứng.

Tạp C được tổng hợp từ carvedilol và benzyl halid (clorid hoặc bromid). Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng gồm tác nhân phản ứng, dung môi, xúc tác, nhiệt độ, thời gian phản ứng.

Tạp D được tổng hợp từ 4-hydroxycarbazol và epichlorohydrin với xúc tác NaOH. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng gồm dung môi, thời gian, nhiệt độ phản ứng, tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol và tỉ lệ số mol NaOH trên cơ chất 4-hydroxycarbazol.

Tạp E được điều chế dưới dạng muối hydroclorid từ 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin và khí HCl mới điều chế từ

natrisulfat và acid sulfuric đặc. Khảo sát ảnh hưởng của dung môi phản ứng.

Các sản phẩm được tinh chế bằng sắc ký cột với pha tĩnh là silicagel (tạp A, B, C, D), hoặc phương pháp kết tinh (tạp E).

- Xác định cấu trúc các sản phẩm tổng hợp bằng các phương pháp phổ UV-Vis, IR, HRMS, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC và HMBC.

- Xác định độ tinh khiết sắc ký bằng HPLC, theo phương pháp chuẩn hóa diện tích. Đánh giá các tạp trên các tiêu chí tính chất cảm quan, điểm chảy (DSC), định tính (phổ IR, NMR), hàm ẩm (TGA) và độ tinh khiết sắc ký (HPLC).

- Thiết lập chất đối chiếu theo hướng dẫn ISO 13528 với các bước: Đóng lọ; Đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ; Đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm; Xác định giá trị ấn định – giá trị công bố.

- Xây dựng quy trình định lượng các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm carvedilol bằng HPLC - PDA. Khảo sát thành phần pha động, tốc độ dòng để tối ưu điều kiện sắc ký dựa trên tham khảo quy trình của USP 43. Quy trình được thẩm định theo hướng của ICH. Ứng dụng quy trình trên các mẫu thử.

- Xây dựng quy trình định lượng các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm carvedilol bằng CE – PDA. Khảo sát điều kiện điện di gồm: dung môi pha mẫu; loại đệm và pH đệm; dung môi hữu cơ thêm vào; chất diện hoạt; nồng độ đệm; điện thế và chiều dài hiệu dụng cột. Quy trình được thẩm định theo hướng của ICH. Ứng dụng quy trình trên các mẫu thử.

4. KẾT QUẢ

4.1. Tổng hợp và tinh chế các tạp

Quy trình tổng hợp các tạp sau khảo sát lựa chọn điều kiện phản ứng cho hiệu suất tổng hợp và tinh chế tốt nhất như sau:

- Tạp A: Giai đoạn tổng hợp hợp chất 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**): Cho 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**) (12 mmol; 2,94 g) vào epichlorohydrin (**5**) (576 mmol; 45 ml) trong bình cầu 2 cổ 250 ml. Cho thêm kali carbonat (24 mmol; 3,30 g) và TEA (120 mmol; 17,4 ml), khuấy từ, đun ở 75 °C trong 4 h. Để nguội bình phản ứng về nhiệt độ phòng. Đồ dịch phản ứng vào bình lắng gạn 500 ml, thêm nước cất đến vạch 250 ml, chiết 3 lần với EtOAc (150, 100, 100 ml). Dịch chiết EtOAc được làm khan với natri sulfat. Giai đoạn tổng hợp tạp A: Cho 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) (36 mmol, 6,12 g) vào bình cầu hai cổ 100ml, thêm từ từ 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) rắn dạng thô (tương ứng 6 mmol; 1,77 g) và khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 16 h. Hỗn hợp sau phản ứng được rửa với nước, đem lọc dưới áp suất giảm thu được chất rắn. Sản phẩm được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi petroleum ether : EtOAc : methanol (3:4:1). Hiệu suất của toàn quy trình là 62,02%.

- Tạp B: Hòa tan carvedilol (3,5 mmol; 1,44 g) vào ethanol (50 mL), đun nóng cho carvedilol tan hoàn toàn. Thêm 4-(2,3-epoxypropoxy)carbazol (**2**) (3,7 mmol; 0,90 g) vào dung dịch carvedilol trong ethanol. Đun hồi lưu hỗn hợp phản ứng ở 65 °C

trong 8 giờ. Hỗn hợp phản ứng sau đó được làm nguội, cô bay hơi tới gần dưới áp suất giảm ở 55 °C. Sản phẩm tổng hợp tạp B được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi cyclohexan : EtOAc (1:1). Hiệu suất quy trình tổng hợp sau tinh chế: 70,8%.

- Tạp C: Hòa tan benzyl bromid (3,3 mmol; 0,56 g) trong aceton (45 ml) trong bình cầu hai cổ 100 ml. Thêm vào bình cầu lần lượt K_2CO_3 (6 mmol; 0,83 g) và carvedilol (3 mmol; 1,23 g). Đun hồi lưu hỗn hợp phản ứng trong 6 h. Hỗn hợp phản ứng sau đó được làm nguội, cô quay tới gần dưới áp suất giảm ở 50 °C. Cặn được hòa tan trong DCM, lọc thu dịch. Cô cho bay hơi DCM. Sản phẩm tổng hợp tạp C được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi cyclohexan : EtOAc (2:1). Hiệu suất quy trình tổng hợp sau tinh chế: 78,5%.

- Tạp D: 1 g 4-hydroxycarbazol (5,45 mmol) được thêm vào 3,4 ml dung dịch NaOH 2 M trong bình cầu. Khối phản ứng được làm lạnh về 10-15 °C và thêm nhỏ giọt 15 ml DMSO. Sau khi khuấy trộn 15 phút, epichlorohydrin (10,36 mmol) được thêm vào trong 3 phút, giữ ở nhiệt độ 10-15 °C. Sau đó, tăng nhiệt độ từ từ lên 45 °C và giữ trong 2 h dưới điều kiện khuấy trộn. Sau khi hoàn thành phản ứng, kiểm tra sản phẩm bằng sắc ký lớp mỏng, sản phẩm hòa loãng với 5 ml nước, sau đó được lọc và rửa với nước nhiều lần, sấy ở 45 °C. Sản phẩm tổng hợp tạp D được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexan - EtOAc (4:1). Hiệu suất quy trình tổng hợp sau tinh chế: 80,3%.

- Tập E: Hòa tan 2-(2-methoxyphenoxy) ethylamin (**3**) (8,97 mmol; 1,5 g) trong cloroform (50 mL) vào bình cầu 250 mL, sục khí HCl mới điều chế (bằng cách nhỏ từ từ acid H₂SO₄ vào bình nón chứa NaCl) vào bình đến khi xuất hiện tủa. Để yên qua ngày rồi lọc hỗn hợp phản ứng để thu lấy tủa. Sản phẩm tổng hợp tập E được tinh chế bằng phương pháp rửa tủa nhiều lần với acetone. Hiệu suất quy trình tổng hợp sau tinh chế: 87,64 %.

4.2. Xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp

- Tập A: UV-Vis ($\lambda_{\max}$, nm): 226, 245, 286, 337; IR (ATR, cm⁻¹): 3283, 2839, 1593, 1506, 1252, 1123, 1051, 733, 714; HR-MS (+) có m/z = 630,3183 [M-H]⁺; ¹H-NMR (¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 8,21 (d, 1H, J = 7,5 Hz), 7,44 (d, 1H, J = 8 Hz), 7,39 (t, 1H, J = 8 Hz), 7,32 (t, 1H, J = 8 Hz), 7,19 (t, 1H, J = 8 Hz), 7,09 (d, 1H, J = 8,5 Hz), 6,89-6,95 (m, 2H), 6,84-6,88 (m, 4H), 6,82-6,84 (m, 2H), 6,65 (d, 1H, J = 8 Hz), 4,34 (t, 2H, J = 7 Hz), 4,25-4,31 (m, 2H), 4,18-4,23 (m, 2H), 4,12 (t, 2H, J = 5Hz), 4,02 (t, 2H, J = 5Hz), 3,80 (s, 3H), 3,76 (s, 3H), 3,08-3,11 (m, 3H), 2,94-3,00 (m, 3H), 2,80 (dd, 1H, J = 3,5 Hz, 12,5 Hz), 2,68 (dd, 1H, J = 3,5 Hz, 12,5 Hz); ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ ppm): 155,2, 149,7, 149,6, 148,2, 148,1, 142,4, 140,1, 126,6, 125,0, 123,0, 122,2, 121,73, 121,70, 120,99, 120,96, 119,5, 114,2, 114,1, 112,2, 112,0, 111,9, 108,7, 102,5, 101,2, 70,4, 68,7, 68,6, 68,42, 68,36, 55,83, 55,75, 52,7, 52,0, 48,7, 48,5, 47,3.

- Tập B: UV-Vis ($\lambda_{\max}$, nm): 242,6, 285,2, 331,2; IR (ATR, cm⁻¹): 3283, 2839, 1593, 1506, 1252, 1123, 1051, 733, 714; HR-MS (-) của hợp chất có m/z = 644,2763 [M-H]⁻; ¹H-NMR (DMSO-

d_6 , 500 MHz, δ ppm): 11,19 (s, 2H), 8,26 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz), 7,43 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 7,27-7,31 (m, 2H), 7,17 (t, 2H, $J = 8$ Hz), 7,06-7,10 (m, 2H), 7,04 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 6,84-6,87 (m, 1H), 6,78-6,82 (m, 1H), 6,61-6,67 (m, 1H), 6,53 (d, 2H, $J = 8$ Hz), 5,02 (d, 2H, $J = 4$ Hz), 4,16-4,24 (m, 6H), 3,93-4,05 (m, 2H), 3,61 (s, 3H), 2,98-3,07 (m, 4H), 2,84-2,91 (m, 2H); ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz, δ ppm): 155,0, 148,9, 147,9, 141,1, 138,9, 126,4, 124,4, 122,5, 121,8, 120,7, 120,5, 118,5, 112,8, 112,1, 111,5, 110,2, 103,7, 100,3, 70,2, 67,9, 66,7, 59,0, 55,3, 54,3.

- Tạp C: UV-Vis (λ_{max} , nm): 242,4, 286,0, 331,8; IR (ATR, cm^{-1}): 3405, 2874, 2841, 1590, 1506, 1253, 1122, 1102, 1026, 740, 726; HR-MS (-) của hợp chất có $m/z = 495,2287$ [M-H] $^{-}$; ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 8,21 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 8,07 (s, 1H), 7,33-7,38 (m, 4H), 7,26-7,33 (m, 3H), 7,21-7,25 (m, 1H), 7,15-7,18 (m, 1H), 7,01 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 6,90-6,93 (m, 1H), 6,81-6,87 (m, 3H), 6,61 (d, 1H, $J = 8$ Hz), 4,26-4,30 (m, 2H), 4,17-4,19 (m, 1H), 4,10-4,12 (t, 2H, $J = 5,5$ Hz), 3,94 (d, 1H, $J = 14$ Hz), 3,81 (s, 3H), 3,77 (d, 1H, $J = 14$ Hz), 3,15-3,20 (m, 1H), 3,00-3,07 (m, 2H), 2,93-2,97 (m, 1H), ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ ppm): 155,3, 149,7, 148,2, 140,9, 138,8, 138,7, 129,0, 128,4, 127,2, 126,6, 124,9, 123,0, 122,6, 121,3, 120,8, 119,7, 113,3, 112,7, 111,7, 109,9, 103,6, 101,2, 70,2, 67,3, 67,2, 59,9, 58,0, 55,7, 53,3.

- Tạp D: UV-Vis (λ_{max} , nm): 241,6, 285,6, 331,8; IR (ATR, cm^{-1}): 3286, 2927, 1259, 1608, 1585, 1508, 1336, 1095; HR-MS (-) của hợp chất có $m/z = 238,0878$ [M-H] $^{-}$; ^1H -NMR (CDCl_3 , 500

MHz, δ ppm): 8,32 (*d*, 1H, $J = 7,5$ Hz), 8,02 (*s*, 1H), 7,38 (*dd*, 1H, $J = 8$ Hz, 1 Hz), 7,34-7,36 (*m*, 1H), 7,28 (*t*, 1H, $J = 8$ Hz), 7,22-7,25 (*m*, 1H), 7,01 (*d*, 1H, $J = 8$ Hz), 6,63 (*d*, 1H, $J = 8$ Hz), 4,43 (*dd*, 1H, $J = 3$ Hz, 11 Hz), 4,23 (*dd*, 1H, $J = 5,5$ Hz, 11 Hz), 3,51-3,54 (*m*, 1H), 2,96 (*t*-like, 1H, $J = 4,5$ Hz), 2,86 (*dd*, 1H, $J = 2,5$ Hz, 5,5 Hz); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ ppm): 155,0, 141,0, 138,8, 126,6, 125,1, 123,2, 122,5, 119,7, 112,9, 110,0, 104,1, 101,4, 68,8, 50,4, 44,8.

- Tập E: UV-Vis (λ_{max} , nm): 201,2, 222,2, 272,6; IR (ATR, cm^{-1}): 3084, 2808, 1506, 1254, 1009, 764; HR-MS (+) của hợp chất có $m/z = 168,1153$ $[\text{M}+\text{H}]^+$; ^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 6,97 (*dt*, 1H, $J = 1,5\text{Hz}$, 7Hz), 6,89 (*dt*, 1H, $J = 1,5\text{Hz}$, 7,5Hz), 7,04 (*dd*, 1H, $J = 1\text{Hz}$, 8Hz), 7,01 (*dd*, 1H, $J = 1,5\text{Hz}$, 6,5Hz), 4,18 (*t*, 2H, $J = 5,5\text{Hz}$), 3,77 (*s*, 3H), 3,15 (*t*, 2H, $J = 5,5\text{Hz}$), 8,36 (*s*, *br*, 3H); ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ ppm): 149,5, 147,2, 122,2, 120,7, 115,2, 112,5, 65,8, 55,5, 38,2. Sản phẩm cho phản ứng tạo tủa dương tính với AgNO_3 cho thấy dạng muối tạo thành là muối hydroclorid. Kết quả phân tích nhiệt trọng lượng (TGA), cho thấy trong phân tử có nước kết tinh, có thể mất đi một phần ở nhiệt độ thấp. Cùng với thông tin dạng muối hydroclorid của tập E thường tồn tại dưới dạng có một phân tử nước kết tinh (monohydrat) nên có thể khẳng định được công thức phân tử của sản phẩm điều chế là $\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2 \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$.

4.3. Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng HPLC

Điều kiện sắc ký để xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp được tóm tắt ở bảng 4.1.

Tạp	Nồng độ (µg/ml)	Cột sắc ký	Pha động	Nhiệt độ cột (°C)	Thể tích tiêm (µl)	Tốc độ dòng (ml/ph)	Detector
A	400	Zorbax Eclipse XDB- C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm);	gradient: 0 phút: 100% acid formic 0,05%; 60 phút: 100% ACN; 64 – 70 phút: 100% acid formic 0,05%;	55	10	0,8	PDA, Max plot (190nm – 800nm)
B	200		gradient: 0 phút: 100% acid formic 0,05%; 60 phút: 100% ACN; 64 – 70 phút: 100% acid formic 0,05%;	40	5	1,0	
C	200		ACN – đệm phosphat pH 2,0 (50:50)	55	5	1,0	
D	200		ACN – đệm phosphat pH 2,0 (31:69)	55	20	1,0	
E	200		ACN – TFA pH 2,3, thêm acid-1-heptansulfonic 2,5mM (30:70).	40	5	1,0	

Quy trình xác định độ tinh khiết của 05 tạp của carvedilol bằng phương pháp HPLC có tính đặc hiệu, tính tuyến tính và độ chính xác cao.

Kết quả xác định độ tinh khiết của các tạp: Tạp A 99,14%, tạp B 99,26%, tạp C 99,92%, tạp D 99,86%, tạp E 99,96%.

4.4. Đánh giá và thiết lập chất đối chiếu

Bảng 4.2. Kết quả đánh giá tạp A

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	K/quả
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Tinh thể trắng, không mùi.	Đạt
	<i>Độ tan</i>	Tan trong aceton, ethyl acetat	Đạt
Điểm chảy	<i>DSC</i>	69 - 70 °C	Đúng
Định tính	<i>UV-Vis</i>	Xem phần 4.2	Đúng
	<i>IR</i>		
	<i>MS</i>		
	<i>NMR</i>		
Hàm ẩm	<i>TGA</i>	≤ 1%	Đạt (0,7581%)
Độ tinh khiết	<i>HPLC</i>	≥ 99,0 %	Đạt (99,14%)

Bảng 4.3. Kết quả đánh giá tạp B

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	K/quả
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Tinh thể trắng, không mùi.	Đạt
	<i>Độ tan</i>	Tan trong aceton, ethyl acetat, ethanol.	Đạt
Điểm chảy	<i>DSC</i>	83 - 84 °C	Đúng
Định tính	<i>UV-Vis</i>	Xem phần 4.2	Đúng

	<i>IR</i>		
	<i>MS</i>		
	<i>NMR</i>		
Hàm ẩm	<i>TGA</i>	$\leq 1\%$	Đạt (0,4928%)
Độ tinh khiết	<i>HPLC</i>	$\geq 99,0 \%$	Đạt (99,26%)

Bảng 4.4. Kết quả đánh giá tạp C

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	K/quả
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Tinh thể trắng, không mùi.	Đạt
	<i>Độ tan</i>	Tan trong aceton, methanol	Đạt
Điểm chảy	<i>DSC</i>	100 - 101 °C	Đúng
Định tính	<i>UV-Vis</i>		Đúng
	<i>IR</i>	<i>Xem phần 4.2</i>	
	<i>MS</i>		
	<i>NMR</i>		
Hàm ẩm	<i>TGA</i>	$\leq 1\%$	Đạt (0,009%)
Độ tinh khiết	<i>HPLC</i>	$\geq 99,0 \%$	Đạt (99,92%)

Bảng 4.5. Kết quả đánh giá tạp D

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	K/quả
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Tinh thể trắng, không mùi.	Đạt
	<i>Độ tan</i>	Tan trong cloroform, DMF, DMSO và THF	Đạt
Điểm chảy	<i>DSC</i>	138 – 139 °C	Đúng

Định tính	<u>UV-Vis</u>	Đúng	
	<u>IR</u>	<i>Xem phần 4.2</i>	
	<u>MS</u>		
	<u>NMR</u>		
Hàm ẩm	TGA	$\leq 2\%$	Đạt (1,3419 %)
Độ tinh khiết	HPLC	$\geq 98,0 \%$	Đạt (99,86%)
Bảng 4.6. Kết quả đánh giá tạp E			
Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	K/quả
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Tinh thể trắng, lấp lánh, không mùi.	Đạt
	<i>Độ tan</i>	Dễ tan trong DMF, ethanol và methanol.	Đạt
Điểm chảy	DSC	85 - 86 °C	Đúng
Định tính	<i>Ion clorid</i>	Cho phản ứng tạo tủa trắng với AgNO_3	Đúng
	<u>UV-Vis</u>	<i>Xem phần 4.2</i>	
	<u>IR</u>		
	<u>MS</u>		
	<u>NMR</u>	Đúng	
Hàm ẩm	TGA	$\leq 1\%$	Đạt (0,807 %)
Độ tinh khiết	HPLC	$\geq 99,0 \%$	Đạt (99,96%)

Tiến hành đóng lọ, đánh giá đồng nhất đóng lọ, độ đồng nhất liên phòng ở 3 phòng thí nghiệm đạt GLP và ISO/IEC 17025 và sử dụng phân tích thống kê Robust analysis: Algorithm A để xác định giá trị ấn định thu được tạp A (100 lọ, 99,36%), tạp B (100 lọ, 99,70%), tạp C (100 lọ, 99,60%), tạp D (100 lọ, 99,96%), tạp E (100 lọ, 99,77%).

4.5. Xây dựng quy trình định lượng các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm carvedilol bằng HPLC

Sau khi khảo sát, điều kiện sắc ký tối ưu dùng để định lượng đồng thời carvedilol và các tạp như sau: Pha động: ACN – dung dịch đệm phosphat (43:57) trong đó dung dịch đệm là dung dịch natri dihydrophosphat 2,76 g/l được điều chỉnh về pH 2,0 bằng acid phosphoric và thêm acid 1-heptansulfonic nồng độ 1,5 mM; Dung môi pha mẫu: ACN – nước (1:1, tt:tt); Cột sắc ký: Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m); Đầu dò PDA: bước sóng 220 nm để định lượng tạp E, bước sóng 240 nm để định lượng carvedilol và các tạp khác; Tốc độ dòng: 0,7 ml/phút; Thể tích tiêm mẫu: 5 μ l; Nhiệt độ cột: 40 $^{\circ}$ C.

Quy trình được thẩm định đạt yêu cầu theo ICH trên các tiêu chí: Độ phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, khoảng xác định, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

Bảng 4.7. Kết quả định lượng carvedilol và các tạp trong các nguyên liệu và thành phẩm viên nén bằng HPLC

Mẫu	Hàm lượng (%)					
	Carvedilol	Tạp A	Tạp B	Tạp C	Tạp D	Tạp E
M1	100,24	0,086	-	-	-	-
M2	101,42	0,187	-	-	-	-
M3	100,99	+	-	-	-	-
M4	99,46	+	-	-	-	-
M5	100,56	-	-	-	-	-
M6	99,94	0,059	-	-	-	-
NL1	100,15	0,047	-	-	-	-
NL2	100,76	+	-	-	-	-
NL3	99,89	0,055	-	-	-	-

Ghi chú: (-) Dưới LOD của phương pháp, (+) Dưới LOQ của phương pháp

4.6. Xây dựng quy trình định lượng các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm carvedilol bằng CE

Sau khi khảo sát, điều kiện điện di tối ưu dùng để định lượng đồng thời carvedilol và các tạp như sau: Chiều dài cột hiệu dụng 40 cm; chiều dài cột tổng 48,5 cm; đường kính ngoài: 360 μm ; đường kính trong 75 μm ; BGE gồm đệm acetat 100 mM pH 5 chứa SDS 7 mM trong hỗn hợp ACN : nước (50: 50); điện thế 20 kV; dòng điện 150 μA ; nhiệt độ cassette 20 $^{\circ}\text{C}$; tiêm mẫu 35 mBar trong 4 giây; bước sóng phát hiện 220 nm cho tạp E và 242 nm cho các tạp còn lại. Dung môi pha mẫu: MeOH : BGE (1:3).

Quy trình được thẩm định đạt yêu cầu theo ICH trên các tiêu chí: Độ phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, khoảng xác định, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

Bảng 4.8. Kết quả định lượng carvedilol và các tạp trong các nguyên liệu và thành phẩm viên nén bằng CE

Mẫu	Hàm lượng (%)					
	Carvedilol	Tạp A	Tạp B	Tạp C	Tạp D	Tạp E
M1	98,67	-	-	-	-	-
M2	100,37	0,09	-	-	-	-
M3	97,46	-	-	-	-	-
M4	101,38	-	-	-	-	-
M5	98,39	-	-	-	-	-
M6	100,78	-	-	-	-	-
NL1	101,50	0,05	-	-	-	-
NL2	99,58	-	-	-	-	-
NL3	99,79	-	-	-	-	-

Ghi chú: (-) Dưới LOD của phương pháp

5. BÀN LUẬN

5.1. Tổng hợp, tinh chế và xác định cấu trúc các tạp

Nghiên cứu đã đề xuất các quy trình tổng hợp các tạp A, B, C, D, E với hiệu suất cao. Trong đó, quy trình tổng hợp các tạp B, C là các quy trình lần đầu tiên công bố. Cụ thể, tạp B được tổng hợp từ carvedilol thay vì 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin như trong nghiên cứu của Somisetti Narender Rao. Hiệu suất tổng hợp và tinh chế tạp B là 70,8%, tăng gần gấp đôi so với công trình của Somisetti Narender Rao. Quy trình tổng hợp và tinh chế trong đề tài đơn giản, dễ thực hiện tại các phòng thí nghiệm và cho hiệu suất tổng hợp cao và độ tinh khiết của tạp B tổng hợp đạt yêu cầu để thiết lập tạp chuẩn đối chiếu ($\geq 98,0\%$).

Cũng như tạp B, tạp C cũng được tổng hợp từ chính dược chất carvedilol qua 1 phản ứng, và cho đến nay vẫn chưa có công trình nghiên cứu nào trên thế giới công bố tổng hợp tạp C từ carvedilol. Hiệu suất của phản ứng tổng hợp tạp C trong nghiên cứu này cao hơn nghiên cứu của Somisetti Narender Rao (78,5% so với 17,7%). Do đó quy trình tổng hợp tạp C trong nghiên cứu này đơn giản, hiệu suất cao, tạp C sau tinh chế đạt độ tinh khiết phù hợp để thiết lập tạp chuẩn đối chiếu.

Các quy trình tổng hợp tạp A, D, E được khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất, gồm dung môi, xúc tác, nhiệt độ, thời gian phản ứng. So với các nghiên cứu trước, hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế các tạp đã được cải thiện đáng kể. Hiệu suất của phản ứng tổng hợp tạp A qua 2 giai đoạn trong nghiên cứu này lần lượt là 86,5% và 71,7%, hiệu suất toàn quy trình là 62,02%,

cao hơn nhiều so với nghiên cứu của G. Madhusudhan và Somiseti Narender Rao với hiệu suất tổng hợp là 32,8% và 45%. Hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế tạp D đã tăng lên 80,3% so với 75% trong nghiên cứu của Somiseti Narender Rao. Về xác định cấu trúc hóa học, các phổ UV-Vis, IR, MS và NMR cho phép khẳng định cấu trúc sản phẩm tổng hợp là các tạp A, B, C, D, E của carvedilol. Trên phổ IR, các đỉnh đặc trưng phù hợp với phổ IR của các tạp. Trên phổ khối HR-MS của các tạp có mảnh m/z phù hợp với giá trị m/z dự kiến và phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến của các tạp. Các tín hiệu trên phổ ^1H -NMR, ^{13}C -NMR và phổ 2 chiều HMBC, HSQC đều cho thấy số lượng, vị trí và các tương tác J^3 và J^1 giữa ^1H và ^{13}C là phù hợp với công thức cấu tạo của các tạp.

5.2. Thiết lập chất đối chiếu

Kết quả đánh giá và thiết lập chất đối chiếu các tạp A, B, C, D, E carvedilol cho thấy các chất này đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia với hàm lượng được xác định lần lượt là 99,34; 99,68; 99,56; 99,95; 99,77% tính theo nguyên trạng. Với quy trình tổng hợp và thiết lập chất chuẩn trên có thể cung cấp đủ cho các xí nghiệp dược trong nước có nhu cầu, góp phần làm tăng nguồn tạp chuẩn trong công tác kiểm tra chất lượng tạp chất liên quan.

5.3. Quy trình định lượng các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm bằng HPLC và CE

Nghiên cứu đã xây dựng quy trình cho phép định lượng đồng thời carvedilol và một số tạp trong chế phẩm thuốc chứa carvedilol đang lưu hành trên thị trường bằng hai phương pháp HPLC và

CE. Bằng việc sử dụng chung một quy trình phân tích để định lượng đồng thời carvedilol và các tạp như vậy đã giúp tiết kiệm được thời gian, công sức, dung môi hóa chất và chi phí. Nghiên cứu đã khảo sát các yếu tố về điều kiện sắc ký và điện di để tối ưu hóa các quy trình. So với quy trình của Dược điển Mỹ 43, quy trình HPLC có thời gian phân tích ngắn, cải thiện độ phân giải các píc tạp A và E, định lượng đồng thời carvedilol và các tạp mà phải thay đổi thể tích tiêm. Với quy trình CE, đây là công bố đầu tiên về định lượng đồng thời các chất trên bằng phương pháp điện di mao quản trong nguyên liệu và thành phẩm chứa carvedilol. Các quy trình đã được thẩm định các tiêu chí theo yêu cầu của ICH. Kết quả áp dụng các quy trình để định lượng các tạp trong các mẫu chế phẩm và nguyên liệu cho thấy các mẫu đều đạt giới hạn theo USP.

6. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

a) Kết luận: Luận án đã đạt được các mục tiêu đề ra như sau:

- Đã tổng hợp và xác định các điều kiện tổng hợp cho hiệu suất cao đối với các tạp A, B, C, D, E của carvedilol, đồng thời xác định cấu trúc của sản phẩm bằng phương pháp phổ nghiệm (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: Tạp A carvedilol với độ tinh khiết 99,14 %, hiệu suất toàn qui trình 62,02 %; Tạp B carvedilol với độ tinh khiết 99,26 %, hiệu suất toàn qui trình 70,80 %; Tạp C carvedilol với độ tinh khiết 99,92 %, hiệu suất toàn qui trình 78,50 %; Tạp D carvedilol với độ tinh khiết 99,86 %, hiệu suất toàn qui trình 80,30 %; Tạp E carvedilol với độ tinh khiết

99,96 %, hiệu suất toàn qui trình 87,64 %. Trong đó, quy trình tổng hợp tạp B và tạp C từ carvedilol lần đầu tiên được công bố. Đã xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu qui trình xác định độ tinh khiết của các tạp A, B, C, D và E của carvedilol bằng phương pháp HPLC.

- Đã đánh giá chất lượng các tạp A, B, C, D và E của carvedilol tổng hợp. Từ đó, đã thiết lập các chất đối chiếu từ các tạp trên: Chất đối chiếu tạp A carvedilol có giá trị ấn định 99,36 %; tạp B carvedilol có giá trị ấn định 99,70 %; tạp C carvedilol có giá trị ấn định 99,60 %; tạp D carvedilol có giá trị ấn định 99,96 %; tạp E carvedilol có giá trị ấn định 99,77 %.

- Đã xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu qui trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp A, B, C, D, E trong nguyên liệu và thành phẩm bằng phương pháp HPLC.

- Đã xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu qui trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp A, B, C, D, E trong nguyên liệu và thành phẩm bằng phương pháp điện di mao quản. Đây là công bố đầu tiên về định lượng đồng thời các chất trên bằng phương pháp điện di mao quản trong nguyên liệu và thành phẩm chứa carvedilol.

b) Kiến nghị

Luận án đề xuất tiếp tục nghiên cứu độ ổn định của các tạp chất đối chiếu trên để có thể tính toán chu kỳ đánh giá lại chất chuẩn; Ứng dụng quy trình kiểm tra các tạp A, B, C, D, E của carvedilol trên các mẫu nguyên liệu và thành phẩm tương ứng khác đang lưu hành trên thị trường; và tiếp tục nghiên cứu tổng hợp các tạp chất liên quan của các dược chất khác để bổ sung vào ngân hàng chất đối chiếu tạp chất trong nước.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN

- 1) **Nguyễn Hữu Tiến**, Trần Thị Ngọc Uyên, Chương Ngọc Nãi, Trần Việt Hùng, Trần Hữu Dũng, Nguyễn Đức Tuấn, Trương Ngọc Tuyền. Tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạp B của carvedilol. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2019; Số 2-2019 (23): 70-76
- 2) Nguyễn Thị Quỳnh Như, **Nguyễn Hữu Tiến**. Xây dựng quy trình sắc ký pha đảo tạo cặp ion để xác định độ tinh khiết tạp E của carvedilol. *Tạp chí Y dược học*. 2019; Số đặc biệt 11/2019: 144-149.
- 3) **Nguyễn Hữu Tiến**, Huỳnh Thị Mai Trang, Nguyễn Đức Tuấn, Trương Ngọc Tuyền, Trần Hữu Dũng. Thiết lập chất đối chiếu 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9h-carbazol (tạp D) và 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin (tạp E) của carvedilol. *Tạp chí Y dược học*. 2021; 34 tháng 11/2021: 35-39.
- 4) **Nguyễn Hữu Tiến**, Nguyễn Thảo Trang, Trịnh Hoàng Dương, Chương Ngọc Nãi, Trương Ngọc Tuyền, Trần Hữu Dũng, Nguyễn Đức Tuấn. Xây dựng các quy trình xác định độ tinh khiết sắc ký các tạp B và C của carvedilol. *Tạp chí Y dược học*. 2022; 50 tháng 06/2022: 65-72.
- 5) **Nguyen, T. H.**, Ho, A. N. L., Truong, T. N., Tran, D. H. Simultaneous Determination of Carvedilol and its Impurities in Tablets by High Performance Liquid Chromatography. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022; 84(6):1498-1505.