

Tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạp chất liên quan acid (2*S*)-2-[(3*S*, 8*aS*)-3-(4-aminobutyl)-1,4-dioxohexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-2(1*H*)-yl]-4-phenylbutanoic (*S,S,S*-diketopiperazin) - tạp C của lisinopril

Đỗ Trường Thanh Minh¹, Trần Việt Hùng¹,
Đỗ Trường Thanh Sơn², Trương Ngọc Tuyền^{3*}
¹Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh
²Bệnh viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh
³Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Summary

In this research, *S,S,S*-diketopiperazine ((2*S*)-2-[(3*S*, 8*aS*)-3-(4-aminobutyl)-1,4-dioxohexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-2(1*H*)-yl]-4-phenylbutanoic acid-lisinopril related compound C - were successfully synthesized by ring closure of lisinopril in formic acid with the yield 41.6%. The structure was confirmed by UV, IR, MS, NMR (¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMBC, HSQC, ROESY, NOESY and COSY). By HPLC-PDA, its chromatographic purity was determined over 98% on the basis, meeting the requirements for establishment reference material for lisinopril impurities testing. Moreover, a HPLC method for purity determination of lisinopril related compound C was developed and validated according to ICH guidelines. The method showed selectivity, wide linearity range, and high precision.

Keywords: *S,S,S*-diketopiperazine, (2*S*)-2-[(3*S*, 8*aS*)-3-(4-aminobutyl)-1,4-dioxohexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-2(1*H*)-yl]-4-phenylbutanoic acid, lisinopril related compound C.

Đặt vấn đề

Acid (2*S*)-2-[(3*S*, 8*aS*)-3-(4-aminobutyl)-1,4-dioxohexahydropyrrolo[1,2-*a*]pyrazin-2(1*H*)-yl]-4-phenylbutanoic (*S,S,S*-diketopiperazin) (tạp C) là tạp chất liên quan của lisinopril, xuất hiện trong quá trình tổng hợp lisinopril cũng như trong quá trình sản xuất, bảo quản và lưu thông phân phối thành phẩm lisinopril, do tách nước tạo nhóm amid vòng^[1]. Theo quy định (EC) số 1272/2008, tạp C của lisinopril có ảnh hưởng đến sức khỏe con người^[4]. Do đó, trong chuyên luận lisinopril của dược điển tham chiếu như BP2019 và USP43 đều quy định phải kiểm tra giới hạn tạp C trong nguyên liệu và thành phẩm^[2, 3].

Trong khi đó, tạp C chuẩn USP đã được thương mại hóa với giá rất đắt và phải nhập từ nước ngoài nên gây không ít khó khăn cho công tác kiểm nghiệm tạp chất này. Trong nước hiện chưa có công bố nào về quy trình tổng hợp tạp C. Từ nhu cầu thực tế, bài báo công bố nghiên cứu quy trình tổng hợp tạp C từ lisinopril đồng thời xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết tạp C bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao nhằm hướng đến việc thiết lập chất đối chiếu tạp C.

Nguyên vật liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Nguyên liệu lisinopril từ Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co., LTD, số lô 5124-18-011, hàm lượng 100,0% tính trên chế phẩm nguyên trạng.

Chuẩn tạp C lisinopril (Chuẩn tạp A theo USP) số lô R079P0.

Chuẩn tạp D lisinopril từ Công ty LGC GmbH - Germany, số lô 137928.

Hóa chất và dung môi: Acetonitril (ACN), natri dihydrogen phosphat (NaH₂PO₄),

Chịu trách nhiệm: Trương Ngọc Tuyền

Email: truongtuyen@ump.edu.vn

Ngày nhận: 26/02/2021

Ngày phản biện: 04/4/2021

Ngày duyệt bài: 20/5/2021

natri hydroxyd, ethanol, propan-1-ol, propan-2-ol, butan-1-ol, isoamyl alcohol, acid sulfuric, acid hydrochloric, acid nitric, acid phosphoric, acid trifluoroacetic, acid formic, acid acetic, *n*-hexan, dicloromethan, bản mỏng silica gel F₂₅₄, silica gel 60 LC60A (40-63), ninhydrin, acetone, phosphor pentoxid đạt tiêu chuẩn phân tích.

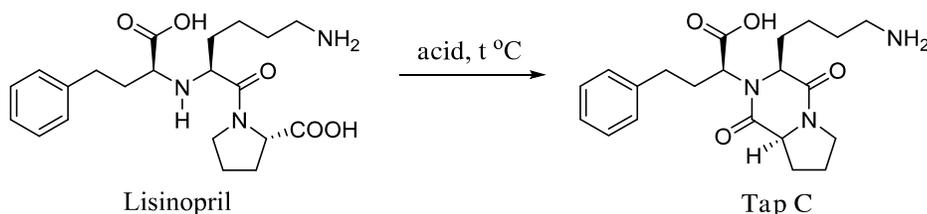
Thiết bị và dụng cụ phân tích

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC 20 A, đầu dò PDA. Máy LC-MS Shimadzu 8040. Máy cộng hưởng từ hạt nhân Ascend™ 400 Bruker Advance – Thụy sĩ. Máy cô quay Rotary Evaporator RE 801 và tủ sấy

chân không Heraeus VT 6025. Máy quang phổ tử ngoại khả kiến (UV-Vis) 2450. Thiết bị cận hồng ngoại Thermo Mode iS50. Máy đo điểm chảy MP90. Máy khuấy từ gia nhiệt Advanced Hotplate-Stirrers và các dụng cụ thủy tinh dùng cho tổng hợp và kiểm nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Tổng hợp tạp C: Theo tài liệu tham khảo [1], tạp C được tổng hợp bằng phản ứng đóng vòng lisinopril trong HCl. Trong quá trình nghiên cứu, thực hiện thêm một số điều kiện trong các acid khác, dung môi và nhiệt độ để tối ưu hóa hiệu suất phản ứng.



Tinh chế sản phẩm tổng hợp: Bằng sắc ký cột.

Xác định cấu trúc: Bằng UV, IR, MS, ¹H-NMR và ¹³C-NMR.

Xác định độ tinh khiết tạp C: Bằng HPLC-PDA, độ tinh khiết của tạp C được xác định bằng phương pháp HPLC quy về 100% diện tích pic.

Điều kiện sắc ký: Cột RP C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), pha động gradient: pha động A: hòa tan 3,12 g NaH₂PO₄ trong 1000 ml nước cất, điều chỉnh đến pH 5,0 bằng natri hydroxyd loãng (TT), pha động B : ACN.

Điều kiện gradient:

Thời gian (phút)	Pha động A (%)	Pha động B (%)
0 – 35	94 – 92	6 – 8
35 – 45	92 – 94	8 – 6
45 – 140	94	6

Tốc độ dòng 1 ml/phút, đầu dò PDA với bước sóng phát hiện 210 nm, thể tích tiêm mẫu 10 μl. Mẫu thử có nồng độ khoảng 200 μg/ml được pha trong hỗn hợp đệm gồm 3,12 g NaH₂PO₄ trong 1000 ml nước cất chỉnh pH 5 – ACN (94 : 6, tt:tt).

Kết quả và bàn luận

Tổng hợp tạp C

Tiến hành theo tài liệu tham khảo [1], đun lisinopril trong HCl đậm đặc ở 80 °C trong butan-

1-ol có xuất hiện tạp C nhưng hiệu suất thấp (trên HPLC) đồng thời xuất hiện nhiều tạp khác gần với tạp C nên sẽ khó tách bằng sắc ký cột. Do vậy tiếp tục đun trong HCl đậm đặc ở 80 °C và thay đổi dung môi là các alcohol từ 2 carbon đến 5 carbon (ethanol, propan-1-ol, propan-2-ol, amyl alcol) thì thực nghiệm cho thấy chỉ có alcol 3 carbon (propan-1-ol, propan-2-ol) mới tạo được tạp C nhưng cũng cho hiệu suất thấp (trên HPLC) và nhiều tạp xuất hiện xung quanh tạp C.

Nhằm thu được tạp C với hiệu suất cao và ít xuất hiện các tạp khác để có thể dễ dàng tách bằng sắc ký cột, nghiên cứu tiếp tục khảo sát với các acid từ mạnh đến yếu trong phòng thí nghiệm như acid sulfuric, acid nitric, acid fluoroacetic, acid phosphoric, acid formic và acid acetic trong một số alcol và thay đổi nhiệt độ thì nhận thấy với acid formic, dung môi là ethanol và đun hồi lưu thì tạp C được tạo thành với hiệu suất cao nhất. Do vậy sau khảo sát thì điều kiện để thu được tạp C với hiệu suất tối ưu như sau:

Cho vào bình cầu một cỡ lisinopril (250 mg; 0,62 mmol), acid formic (0,3 ml; 7,95 mmol) và 100 ml ethanol, đun hồi lưu trong 33 giờ. Kiểm tra phản ứng bằng SKLM và HPLC. Sau phản ứng, cô quay đuổi dung môi, thu được sản phẩm thô.

Tinh chế

Sản phẩm được tinh chế bằng sắc ký cột với hệ dung môi dicloromethan – methanol (7:1).

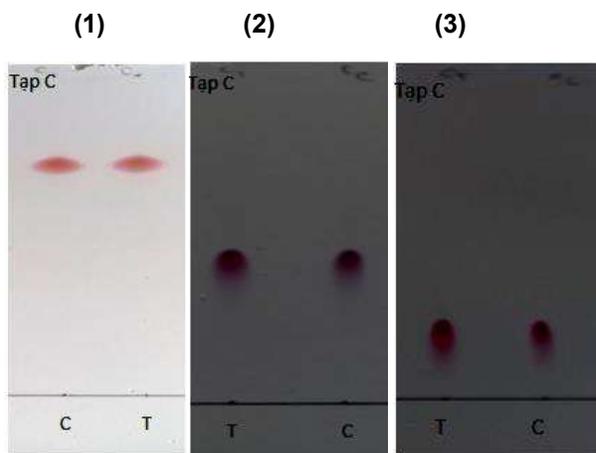
Sản phẩm sau khi loại dung môi sắc ký được hòa tan trong dicloromethan vừa đủ, thêm acetone đến tủa hoàn toàn, lọc. Sản phẩm được sấy chân không ở 60 °C đến khối lượng không đổi, rồi được bảo quản trong khí nitơ. Hiệu suất sau tinh chế 41,6%.

Thử tinh khiết sơ bộ

Nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm tinh chế là 159,2 °C so với chuẩn tạp C là 160,1 °C.

Sản phẩm tinh chế được hòa tan trong dicloromethan, sau đó triển khai **SKLM** với 3 hệ

dung môi khác nhau. Kết quả cho thấy sản phẩm tinh chế chỉ cho một vết duy nhất. Kết quả thử tinh khiết bằng **HPLC**, áp dụng phương pháp quy về 100% diện tích pic để xác định độ tinh khiết cho thấy sắc ký đồ 3 chiều và sắc ký đồ 2 chiều tại bước sóng 210 nm xuất hiện một pic chính duy nhất và một vài pic tạp có diện tích pic rất nhỏ, pic chính đạt độ tinh khiết theo phổ **UV-Vis**. Hình 1, hình 3 và bảng 1 lần lượt minh họa sắc ký đồ **SKLM** và **HPLC** kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm tinh chế.



Hình 1. Sắc ký đồ SKLM kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm tinh chế

Điều kiện sắc ký: Bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄; Phát hiện: phun thuốc thử ninhydrin; Hệ dung môi: **(1)** *n*-butanol-acid acetic-nước (60:20:20), R_f = 0,57; **(2)** *n*-butanol-acid acetic-methanol (60:20:20), R_f = 0,34; **(3)** *n*-butanol-acid acetic (70:30), R_f = 0,15. (C) Dung dịch chuẩn tạp C; (T) sản phẩm tinh chế (đều được pha 1 mg/ml trong dicloromethan).

Bảng 1. Kết quả xác định độ tinh khiết sản phẩm tinh chế bằng **HPLC-PDA**

Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (μV x giây)	Diện tích pic (%)	Độ tinh khiết pic (theo phổ UV-Vis)
47,965	424934	98,613	Đạt

Xác định cấu trúc sản phẩm tinh chế C

Kết quả phổ **UV-Vis** cho thấy sản phẩm tinh chế có hình dạng phổ giống với phổ **UV-Vis** của tạp C chuẩn ở bước sóng 210 nm.

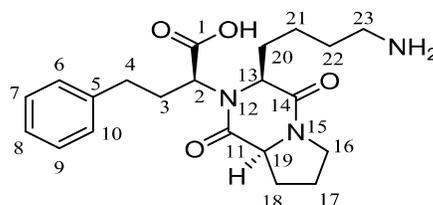
Phổ **IR** của sản phẩm tinh chế tương đồng so với phổ **IR** của tạp C chuẩn và có các đỉnh đặc trưng phù hợp với tạp C. Phương pháp đập viên KBr: ν_{max} (cm⁻¹): 3417 (OH), 2943 (C-H), 1651 (C=O acid), 1581 (C=O amid), 1380 (C=O amid).

Phổ **MS-ESI** của sản phẩm tinh chế cho tín hiệu ion giả phân tử [M+H]⁺ có m/z = 388,20 phù hợp với khối lượng phân tử của tạp C (C₂₁H₂₉N₃O₄, M = 387,22).

Dựa vào kết quả phổ **¹H-NMR**, **¹³C-NMR**, **HMBC**, **HSQC**, **ROSY**, **NOSY** và **COSY**, các dao động của sản phẩm tinh chế được xác định như sau: **¹H-NMR** (400 MHz, D₂O) δ (ppm): 0,75–0,79 (m, 1H, H₂₁); 1,32–2,03 (m, 9H, H₁₇, H₁₈, H₂₀, H₂₁, H₂₂); 2,23–2,80 (m, 6H, H₃, H₄,

H₂₃); 2,99–3,46 (m, 3H, H₁₆, H₁₉); 3,69 (dd, J = 4,4 Hz; 10 Hz, 1H, H₂); 3,79 (s, 1H, H₁₃); 7,06–7,17 (m, 5H, H_{Ar}). **¹³C-NMR** (100 MHz, D₂O) δ (ppm): 19,5 (C₂₁); 20,9 (C₁₇); 26,0 (C₂₂); 28,3 (C₃, C₁₈); 29,2 (C₂₀); 32,8 (C₄); 38,5 (C₂₃); 44,3 (C₁₆); 58,8 (C₁₉); 62,7 (C₁₃); 63,5 (C₂); 126,0 (C₈); 127,9 (C₆, C₁₀); 128,6 (C₇, C₉); 141,6 (C₅); 165,8 (C₁₄); 167,0 (C₁₁); 176,4 (C₁).

Từ kết quả trên so với TLTK^[1] có thể khẳng định sản phẩm tinh chế chính là tạp C của lisinopril với cấu trúc như sau:



Hình 2. Công thức cấu tạo tạp C lisinopril

Để có thể thiết lập chất chuẩn tạp C, tiến hành xác định độ tinh khiết tạp C. Quy trình xác định độ tinh khiết tạp C bằng **HPLC-PDA** được thẩm định theo hướng dẫn của ICH [5], bao gồm

khảo sát tính phù hợp của hệ thống, tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, độ chính xác. Kết quả thẩm định được thể hiện ở bảng 2 và bảng 3.

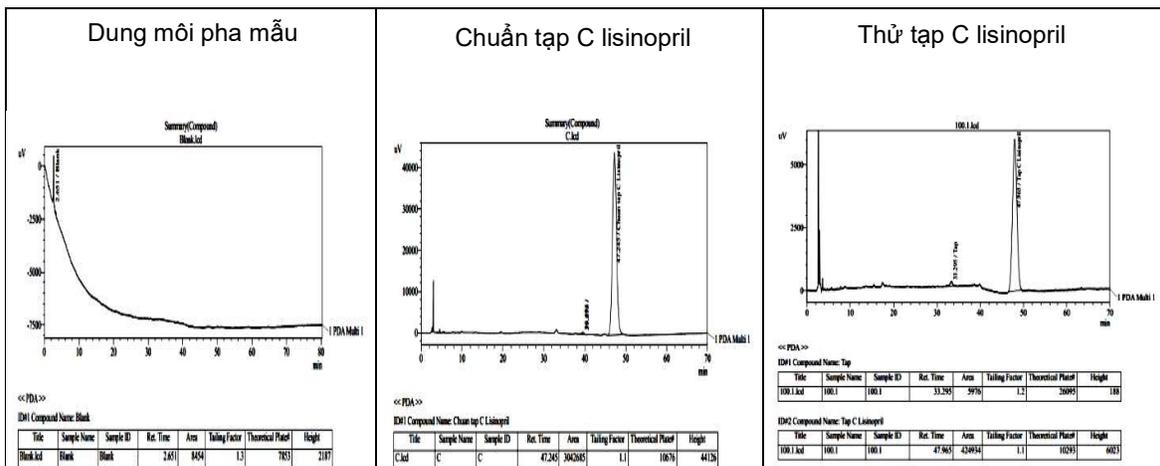
Bảng 2. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống của phương pháp (n = 6)

	Giá trị thống kê	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mV × giây)	Hệ số bất đối	Số đĩa lý thuyết biểu kiến
Tạp C	Trung bình	47,964	424004	1,044	10632
	RSD	0,09	0,62	0,018	0,0207

Nhận xét: RSD của các thông số sắc ký đều ≤ 2% và hệ số bất đối của pic tạp C nằm trong khoảng 0,8 – 1,5. Như vậy quy trình xác định độ tinh khiết tạp C đạt tính phù hợp của hệ thống.

Kết quả khảo sát tính chọn lọc cho thấy trong cùng điều kiện phân tích: Sắc ký đồ của pha động và dung môi pha mẫu không xuất hiện pic

có thời gian lưu tương ứng với pic tạp C trong mẫu thử; Trên SKĐ mẫu thử, pic tạp C tách hoàn toàn các pic tạp khác và các pic từ mẫu trắng và dung môi pha mẫu; tạp C đạt độ tinh khiết theo phổ **UV-Vis**. Vậy quy trình có tính chọn lọc. Hình 3 minh họa sắc ký đồ khảo sát tính chọn lọc.



Hình 3. Sắc ký đồ của dung môi, tạp C chuẩn và thử của lisinopril

Bảng 3. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính và độ chính xác tạp C

Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 2143,5 x$
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	100 - 300
Hệ số tương quan (R)	0,9998
Độ chính xác (RSD, n = 6)	0,09%
Độ tinh khiết sắc ký	98,59%

: Được xác định từ kết quả khảo sát độ chính xác

Kết quả thẩm định cho thấy quy trình xác định độ tinh khiết tạp C có khoảng tuyến tính rộng với giá trị của hệ số tương quan cao, đạt

yêu cầu về độ chính xác. Kết quả xác định độ tinh khiết sắc ký tạp C theo phương pháp quy về 100% diện tích pic là trên 98% tính trên chế phẩm nguyên trạng.

Bàn luận

Theo tài liệu tham khảo thì tạp C được hình thành khi đun trong HCl đậm đặc, tuy nhiên lại xuất hiện nhiều tạp làm hiệu suất giảm và khó tinh chế. Do vậy đã nghiên cứu thực hiện thay đổi môi trường acid, dung môi và nhiệt độ nhằm làm giảm tạp, dễ tinh chế và tăng hiệu suất. Cuối cùng nhận thấy khi đun hoàn lưu với acid formic trong môi trường ethanol thì cho

hiệu suất cao nhất. Hiệu suất toàn bộ quy trình tổng hợp và tinh chế là 41,6%. Độ tinh khiết sắc ký trên 98% tính trên chế phẩm. So với việc tổng hợp tạp D trong nghiên cứu trước [6] thì việc điều kiện tạo tạp C dễ dàng hơn, nhưng lại xuất hiện khá nhiều tạp. Do vậy khảo sát điều kiện phản ứng tối ưu để tạo tạp C sao cho dễ tinh chế và hiệu suất phản ứng cao mất khá nhiều dung môi, hóa chất, số lần thí nghiệm và thời gian khảo sát.

Về khẳng định cấu trúc tạp, các thông tin trên phổ **IR**, **HPLC**, **MS** và **NMR** (**¹H-NMR**, **¹³C-NMR**, **HMBC**, **HSQC**, **ROESY**, **NOESY** và **COSY**) đều cho phép khẳng định cấu trúc chất tổng hợp được là tạp C của lisinopril. Trên phổ **IR** đều có các dao động của các nhóm liên kết đặc trưng gồm OH, CH, C=O (acid), C=O (amid). Phổ **MS** sản phẩm tinh chế có m/z = 388,22 [M-H]⁺, phù hợp với khối lượng phân tử tạp C (C₁₅H₁₃NO₂, M = 387,22). Kết quả phân tích phổ **¹H-NMR** nhận thấy số lượng proton, độ dịch chuyển, độ bội của tín hiệu là phù hợp với tạp C. Phổ **¹³C-NMR** cho phép khẳng định số carbon, độ dịch chuyển hóa học của các pic là phù hợp tạp C. Các phổ 2 chiều **HMBC**, **HSQC**, **ROESY**, **NOESY** và **COSY** lần lượt khẳng định các vị trí các H và C là phù hợp với công thức cấu tạo của tạp C của lisinopril.

Quy trình **HPLC** xác định độ tinh khiết tạp C được xây dựng và đã được thẩm định đạt các tiêu chí theo ICH [5]. Kết quả xác định độ tinh khiết tạp C cho thấy sản phẩm tổng hợp được đủ điều kiện để đưa vào thiết lập chất đối chiếu.

Kết luận

Tạp C đã được tổng hợp thành công từ lisinopril bằng phản ứng đóng vòng trong môi trường acid formic với hiệu suất toàn bộ quy trình là 41,6% và có độ tinh khiết sắc ký trên 98% tính trên chế phẩm nguyên trạng, đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu trong kiểm nghiệm tạp chất liên quan của lisinopril. Nghiên cứu đang được tiếp tục mở rộng tăng số lượng lớn hơn để nhân chuẩn và cung cấp cho Viện Kiểm nghiệm thuốc cũng như các công ty dược trong việc kiểm soát chất lượng thuốc.

Tài liệu tham khảo

1. Ambati V. Raghava Reddy, Srinivas Garaga, Chandiran Takshinamoorthy, Andra Naidu, and Ramesh Dandala (2016), "Synthesis and Characterization of Compounds Related to Lisinopril ", *Scientia Pharmaceutica*, pp. 269 - 278.
2. British Pharmacopoeia (2019), CD-ROMs, monographs II-119-II120, III823-III824.
3. USP NP (2018), CD-ROMs, Official monographs.
4. Britishpharmacopoeia, safety data sheet according to 1907/2006/EC, Article 31.
5. ICH Harmonized tripartite guideline (2005), Validation of analytical procedures: Text and methodology, pp. 1 - 13.
6. Đỗ Trường Thanh Minh, Trần Việt Hùng, Đỗ Trường Thanh Sơn, Trương Ngọc Tuyền (2021), "Tổng hợp acid (2S)-2-[(3S, 8aR)-3-(4-aminobutyl)-1,4 dioxohexahydropyrrolo [1,2-a]pyrazin-2 (1H) -yl] -4-phenylbutanoic (R,S,S-diketopiperazin) (tạp D) của lisinopril", *Tạp chí Y Dược học*, số 19 tháng 4, tr. 36-40.