

Tổng hợp và thiết lập chất đối chiếu tạp E của allopurinol

Lữ Thiện Phúc¹, Đào Anh Dũng¹, Trương Ngọc Tuyền²

Trần Việt Hùng³, Nguyễn Đức Tuấn^{2*}

¹Trường Đại học Y Dược TP. Cần Thơ

²Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

³Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh

Summary

In this study, ethyl 5-formylamino-lh-pyrazol-4-carboxylat (allopurinol impurity E) was successfully synthesized from 3-amino-carbethoxypyrazole (allopurinol impurity D) and triethyl orthoformate with the yield approximately 42%. By using HPLC-PDA, its chromatographic purity was determined over 99% on the basis, conforming fully to establish reference substance for allopurinol impurities testing.

Keywords: Allopurinol impurity E, ethyl 5-formylamino-lh-pyrazol-4-carboxylat, triethyl orthoformate.

Đặt vấn đề

Hiện nay, các nhóm thuốc trị gout có cơ chế ứng với giai đoạn khác nhau: Khống chế các đợt viêm cấp, làm hạ và duy trì hàm lượng acid uric ở mức cho phép ở giai đoạn mạn. Trong đó, Allopurinol đã thuốc điều trị bệnh gout duy nhất được Bộ Y tế đưa vào danh mục thuốc thiết yếu hiện hành năm 2018^[1] và được chỉ định thường quy trong điều trị bệnh gout và tăng uric huyết thứ phát do hóa trị bệnh bạch cầu hay ung thư^[2]. Chính vì sự phổ biến của allopurinol trong điều trị bệnh gout nên đặt ra vấn đề cần phải kiểm soát chặt chẽ chất lượng thuốc, đặc biệt là kiểm tra tạp chất liên quan của allopurinol. Các tạp chất xuất hiện trong quá trình tổng hợp, sản xuất và bảo quản allopurinol 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^[3]. Trong chuyên luận nguyên liệu và thành phẩm allopurinol của Dược điển Việt Nam V và BP 2020, tạp A, B, C, D và E là những tạp chất phải kiểm tra và phải sử dụng tạp chuẩn. Tuy nhiên, việc kiểm tra tạp chất liên quan của allopurinol gặp nhiều khó khăn do hệ thống kiểm nghiệm trong nước không cung cấp tạp chuẩn. Trong khi đó các tạp chuẩn được bán với giá rất đắt,

cụ thể tạp E chuẩn USP có giá 775 USD/lô 35 mg^[4]. Tạp E được hình thành từ sản phẩm trung gian là tạp D trong quá trình tổng hợp allopurinol theo quy trình của Jean Druey^[5]. Tạp D sau khi hình thành sẽ phản ứng tiếp với triethyl orthoformat dư để tạo thành tạp E. Cho đến nay chỉ có một nghiên cứu công bố tổng hợp tạp E^[6]. Tại Việt Nam, hiện chưa có công trình nghiên cứu tổng hợp tạp E được công bố. Xuất phát từ những lý do trên, nghiên cứu này công bố quy trình tổng hợp và thiết lập chất đối chiếu tạp E của allopurinol.

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu

3-amino-carbethoxypyrazol được dùng để tổng hợp tạp E, nhà sản xuất Acros Organics – Bỉ, số lô A0273011, hàm lượng 99%.

Hóa chất và dung môi

Triethyl orthoformat, methanol (MeOH), ethanol (EtOH), acid formic và formamid đạt tiêu chuẩn tinh khiết hóa học. Acetonitril (ACN), acid phosphoric và methanol đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng. Bản mỏng silica gel GF₂₅₄.

Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) Hitachi 2000 đầu dò PDA. Máy quang phổ IR Bruker alpha-T. Máy LC-MS Agilent 1200 nguồn ESI. Máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Advance II.

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Đức Tuấn

Email: ductuan@ump.edu.vn

Ngày nhận: 31/12/2020

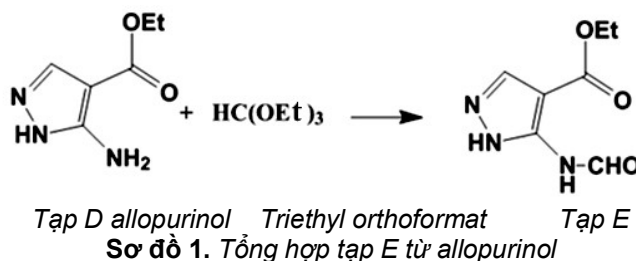
Ngày phản biện: 08/01/2021

Ngày duyệt bài: 22/01/2021

Phương pháp nghiên cứu

Tổng hợp tạp E từ allopurinol

Dựa theo tài liệu tham khảo [6], tạp E được tổng hợp từ 3-amino-carbethoxypyrazol và triethyl orthoformat (sơ đồ 1). Sản phẩm được thử tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM)



Đánh giá tạp E

Tạp E được đánh giá theo các chỉ tiêu cảm quan, độ tan, điểm chảy, hàm ẩm, định tính, độ tinh khiết sắc ký và tạp chất liên quan.

Thiết lập chất đối chiếu tạp E

Đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ

Các mẫu được lấy ngẫu nhiên theo công thức $\sqrt{N} + 1$ trong đó N là tổng số lọ. Việc xác định độ tinh khiết của tạp E trong từng lọ được tiến hành theo phương pháp **HPLC**, mỗi lọ được xác định 2 lần. Việc đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ được dựa trên hướng dẫn của ISO Guide 35 [7].

Đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm

Tạp E sau khi được đóng gói và đánh giá đồng nhất lọ đạt yêu cầu sẽ được lấy mẫu ngẫu nhiên và tiến hành xác định độ tinh khiết tại ba phòng thí nghiệm độc lập. Các phòng thí nghiệm được lựa chọn để gửi mẫu phải đạt GLP hoặc ISO/IEC 17025. Mỗi phòng thí nghiệm sẽ nhận được sáu lọ mẫu ngẫu nhiên kèm theo quy trình phân tích và các tài liệu liên quan. Trước khi phân tích, mỗi phòng thí nghiệm sẽ kiểm tra tính phù hợp của hệ thống với yêu cầu hệ số bất đối của pic tạp E nằm trong khoảng 0,8 – 1,5 và RSD giữa 6 lần đo lặp lại không được quá 2%. Nếu đạt yêu cầu, sẽ tiến hành xác định độ tinh khiết tạp E trên 6 mẫu đã nhận, mỗi mẫu được xác định 2 lần. Các phòng thí nghiệm được lựa chọn để gửi mẫu là Khoa Thiết lập chất chuẩn – chất đối chiếu (PTN1), Khoa Nghiên cứu – Phát triển (PTN2) và Khoa Vật lý (PTN3)

và sắc ký lỏng hiệu năng cao (**HPLC**) và được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ nghiệm **UV**, **IR**, **MS** và **NMR**.

Xác định độ tinh khiết tạp E

Độ tinh khiết của tạp E được xác định bằng phương pháp **HPLC** quy về 100% diện tích pic.

thuộc Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh. Việc đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm được tiến hành theo hướng dẫn của ISO 13528 [8], sử dụng phép phân tích phương sai một yếu tố ANOVA.

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

Việc xác định giá trị ấn định trên phiếu kiểm nghiệm tạp E, độ không đảm bảo đo được thực hiện theo hướng dẫn của ISO 13528 [8], dựa theo 18 kết quả xác định độ tinh khiết của tạp E tại 3 phòng thí nghiệm.

Kết quả

Tổng hợp tạp E

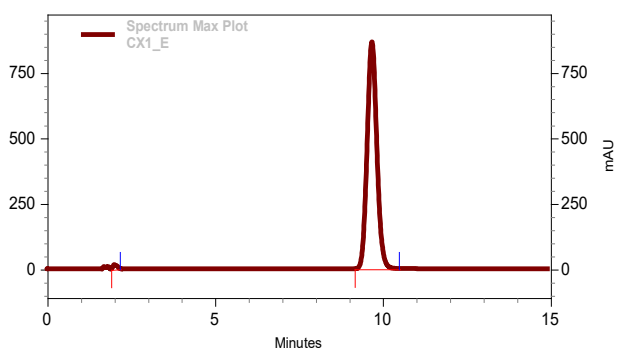
Sau khi khảo sát các điều kiện phản ứng gồm tỷ lệ mol giữa 3-amino-carbethoxypyrazol (tạp D allopurinol) và triethyl orthoformat và thời gian phản ứng, tạp E được tổng hợp như sau: Hòa tan 2,0 g (13 mmol) tạp D trong 40 ml triethyl orthoformat (35,6 mmol). Đun hồi lưu hỗn hợp (khoảng 95°C) trong 4 giờ, theo dõi phản ứng dựa vào sắc ký lớp mỏng. Sau khi kết thúc phản ứng, pha loãng dung dịch thu được với 25 ml ethanol, lắc đều, thêm tiếp 25 ml nước, bốc hơi dung dịch trên bếp cách thủy (khoảng 60°C) đến khi tinh thể bắt đầu xuất hiện. Lọc thu tinh thể. Rửa tinh thể với 15 ml nước (3 x 5 ml). Sấy sản phẩm thu được ở 60°C.

Thử tinh khiết sản phẩm tổng hợp

Sản phẩm tổng hợp được hòa tan trong methanol, sau đó được triển khai sắc ký lớp mỏng với 3 hệ dung môi khác nhau. Kết quả cho thấy sản phẩm tổng hợp chỉ cho một vết

duy nhất và tinh khiết trên **SKLM**. Kết quả thử tinh khiết bằng phương pháp **HPLC**, áp dụng phương pháp quy về 100% diện tích pic để xác định độ tinh khiết sản phẩm tổng hợp cho thấy sắc ký đồ 2 chiều tại bước sóng 220 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 minh họa sắc ký đồ **HPLC** kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm.



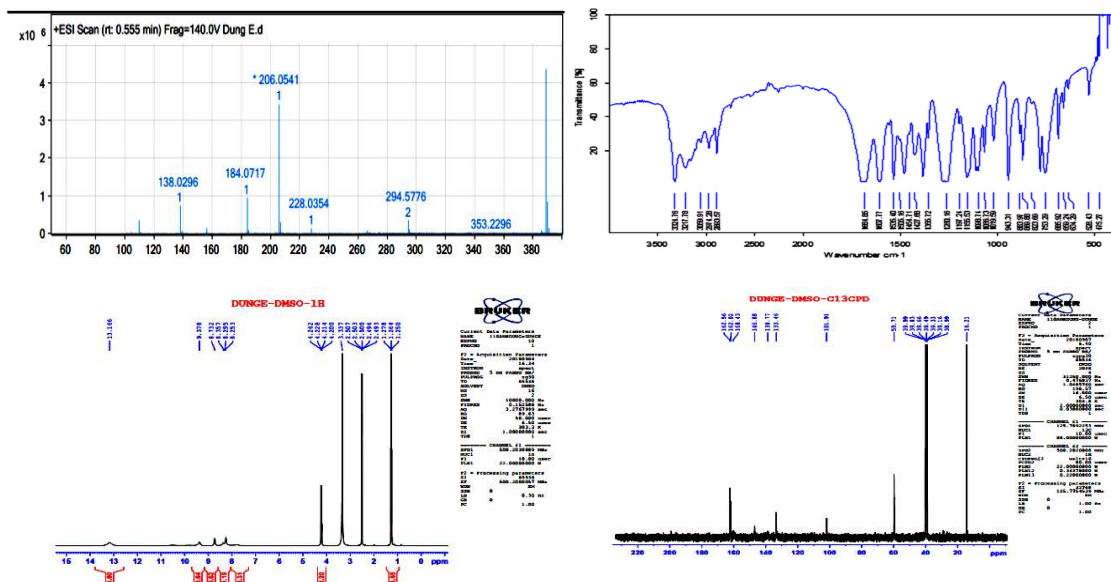
Hình 1. Sắc ký đồ **HPLC** kiểm tra độ tinh khiết sắc ký của sản phẩm tổng hợp.

Điều kiện sắc ký: Cột Phenomenex Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), pha động ACN - nước acid phosphoric pH 3 (10:90), tốc độ dòng 1 ml/phút, đầu dò DAD với bước sóng phát hiện 220 nm, thể tích tiêm mẫu 10 μ l, nhiệt độ cột 25°C. Mẫu thử có nồng độ 500 μ g/ml pha động.

Xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp

Kết quả phổ **UV-Vis** cho thấy sản phẩm tổng hợp (được hòa tan trong methanol) có bước sóng hấp thụ cực đại tại 208 nm, 233 nm và 247 nm. Kết quả phổ **IR** (KBr: $\nu_{\max}$ (cm⁻¹)) cho thấy sản phẩm tổng hợp có một số đỉnh đặc trưng tại 1607,77 (-NHCHO), 3217,78 (-NH-thơm), 1664,85 (-C=O). Phổ khối **ESI-MS(+)** của sản phẩm tổng hợp có m/z = 206,15395 [M+Na]⁺; M phù hợp với khối lượng phân tử

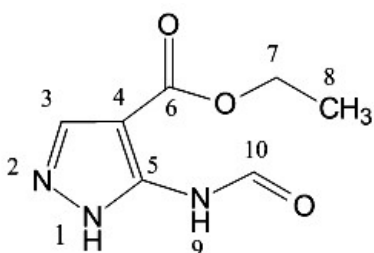
lý thuyết của tạp E (C₇H₉N₃O₃, M = 183,16480). Phân tích dữ liệu phổ **NMR** (bảng 1) cho thấy số lượng và vị trí của proton và carbon của sản phẩm tổng hợp phù hợp với công thức cấu tạo của ethyl 5-formylamino-1H-pyrazol-4-carboxylat (tạp E allopurinol). Các dữ liệu phổ **UV**, **IR** và **MS** cũng tương đồng và phù hợp với tạp E. Cấu trúc tạp E được trình bày ở hình 3. Hiệu suất tổng hợp tạp E được trình bày trong bảng 2.



Hình 2. Phổ khối, phổ hồng ngoại, phổ ¹H-NMR và phổ ¹³C-NMR của sản phẩm tổng hợp

Bảng 1. Dữ liệu phổ NMR của sản phẩm tổng hợp

Vị trí	Nguyên tử	¹³ C-NMR (125 MHz, (CD ₃) ₂ SO)	¹ H-NMR (500 MHz, (CD ₃) ₂ SO)	
		δ _C (ppm)	δ _H (ppm)	Số H, hình dạng đỉnh
1	-N(H)-		13,166	1H, br
2	=N-			
3	=C(H)-	146,9	8,357-8,253	1H, br
4	C _{IV}	101,9		
5	C _{IV}	133,5		
6	-C(=O)-	162,6		
7	-C(H ₂)-	59,7	4,242-4,2	2H, q (J = 7 Hz)
8	-C(H ₃)	14,2	1,278-1,250	3H, t (J = 7 Hz)
9	-N(H)-		9,378	1H, br
10	-CH(=O)	162,0	8,732	1H, br



Hình 3. Công thức cấu tạo của tạp E

Bảng 2. Hiệu suất tổng hợp tạp E

	Tạp E
Khối lượng tạp D (g)	2,0
Khối lượng sản phẩm lý thuyết (g)	3,6
Khối lượng sản phẩm tổng hợp (g)	1,5
Hiệu suất tổng hợp	41,7%

Xác định độ tinh khiết tạp E bằng HPLC-PDA

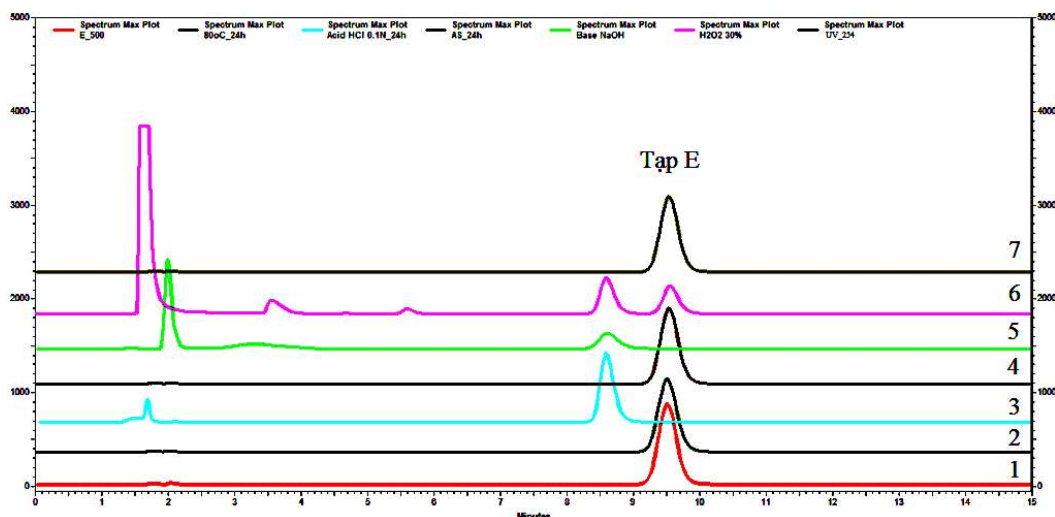
Quy trình xác định độ tinh khiết tạp E bằng **HPLC-PDA** được thẩm định theo hướng dẫn của ICH^[9], bao gồm khảo sát tính phù hợp của hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ chính xác. Kết quả thẩm định được thể hiện ở bảng 3 và bảng 4.

Bảng 3. 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 (mAU x giây)	Hệ số bất đối
Trung bình	9,34	77.295.527	1,08
RSD	0,27%	0,60%	

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

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy trong cùng điều kiện phân tích: Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic tạp E trong sắc ký đồ mẫu thử; trên sắc ký đồ mẫu khảo sát (tạp E được để ở nhiệt độ 80°C/24 giờ (2), pha trong dung dịch HCl 0,1 N và để 24 giờ (3), dưới ánh sáng mặt trời trong 24 giờ (4), pha trong dung dịch NaOH 0,1 N và để 24 giờ (5), pha trong dung dịch H₂O₂ 30% và để 24 giờ (6), dưới đèn UV 254 nm/1 giờ (7)), pic tạp E tách hoàn toàn. Pic tạp E đạt độ tinh khiết theo phổ **UV-Vis**. Như vậy, quy trình đạt tính đặc hiệu. Hình 4 minh họa sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu.



Hình 4. Sắc ký đồ mẫu thử (1) và các mẫu khảo sát (2-7) khi khảo sát tính đặc hiệu

Bảng 4. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính và độ chính xác

	Tạp E
Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 139223x - 2429625$
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	300 – 700 $\mu\text{g/ml}$
Hệ số tương quan (R)	0,9989
Độ chính xác (RSD, n = 12)	0,05%
Độ tinh khiết sắc ký*	99,81%

* 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 E có khoảng tuyến tính rộng, hệ số tương quan cao, đạt yêu cầu về độ chính xác. Kết quả xác định độ tinh khiết sắc ký tạp E theo phương pháp quy về 100% diện tích pic là trên 99% tính trên chế phẩm nguyên trạng.

Đánh giá tạp E

Bảng 5 trình bày kết quả đánh giá tạp E. Với độ tinh khiết trên 99% nên hợp chất này đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu.

Bảng 5. Kết quả đánh giá tạp E

Chỉ tiêu	Phương pháp	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất	Cảm quan	Bột hoặc tinh thể màu trắng, không mùi	Đạt
	Độ tan	Không tan trong nước, tan trong MeOH, cloroform, DMSO	
Định tính	Phổ UV	λ_{max} (MeOH) 208 nm, 233 nm và 247 nm	Đúng
	Phổ IR	1607,77 (-NHCHO), 3217,78 (-NH- thơm), 1664,85 (-C=O)	
	Phổ MS	ESI-MS(+) $m/z = 206, 15395 [M+Na]^+$	
	Phổ NMR	Phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$: xem bảng 1	
Điểm chảy	DSC	$198 \pm 1^\circ\text{C}$	Đạt ($198,4^\circ\text{C}$)
Hàm ẩm	TGA	$\leq 0,05\%$	Đạt (0,03%)
Tạp chất liên quan	HPLC	$\leq 1\%$	Đạt (0,19%)
Độ tinh khiết sắc ký	HPLC	$\geq 99\%$	Đạt (99,81%)

Thiết lập chất đối chiếu tạp E

900 mg tạp E được đóng 30 lọ, mỗi lọ 30 mg và 6 lọ được lấy ngẫu nhiên theo phần mềm

Excel. Kết quả xác định tính phù hợp của hệ thống tại ba phòng thí nghiệm đều đạt yêu cầu về hệ số bất đối của pic tạp E và RSD

của diện tích pic tạp E nên có thể tiếp tục tiến hành xác định độ tinh khiết tạp E. Bảng 6 và bảng 7 minh họa kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ và độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm. Dựa vào kết quả phân tích ANOVA cho thấy các lọ đóng gói có hàm lượng đồng nhất, điều kiện đóng gói ổn định và phù hợp, kết quả định lượng giữa 3 phòng thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê, quy trình phân tích có độ lặp lại cao, độ tinh khiết chất phân tích không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ (n=2)

Số thứ tự lọ	Độ tinh khiết tạp E (%)
8	99,55
28	99,84
19	99,76
7	99,50
23	99,71
15	99,73

Bảng 7. Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm

Mẫu	Độ tinh khiết tạp E (%)		
	PTN1	PTN2	PTN3
1	99,55	99,78	99,58
2	99,84	99,86	99,60
3	99,76	99,70	99,71
4	99,50	99,60	99,65
5	99,71	99,34	99,82
6	99,73	99,43	99,56

Bảng 8. Kết quả xác định giá trị ấn định của tạp E (n=18)

Số lần thay đổi	Tạp E		
	$x^* 0$	$x^* 1$	$x^* 2$
$\delta = 1,5s^*$	0,22	0,22	0,22
$x^* - \delta$	99,44	99,44	99,44
$x^* + \delta$	99,88	99,88	99,88
x^* mới	99,66	99,66	99,66
s^* mới	0,15	0,15	0,15

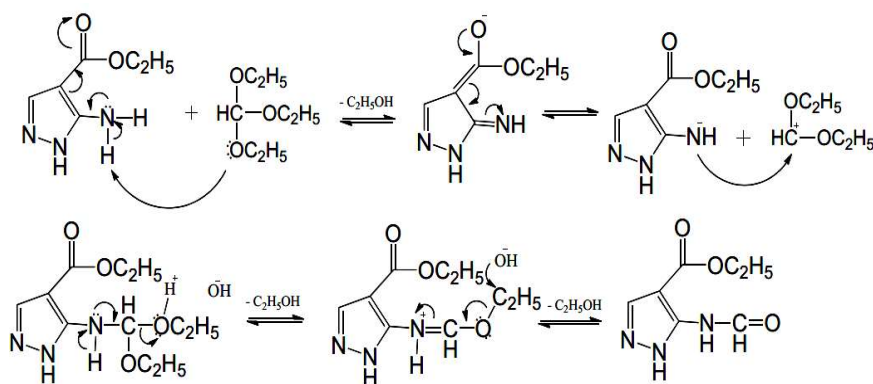
Với tạp E, sau hai lần thay đổi, $s^* = 0,02$ không thay đổi, khi đó x^* được chọn là 99,66%. Vậy giá trị ấn định của tạp E là 99,66% và độ không đảm bảo đo:

$$U_x = 1,25s^*/\sqrt{n} = 1,25 \times 0,15 / \sqrt{18} = 0,1.$$

Như vậy tạp E đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia với hàm lượng được xác định là 99,66% tính trên nguyên trạng. Tiến hành lập hồ sơ chất chuẩn, dán nhãn lọ chuẩn và kèm theo phiếu kiểm nghiệm. Bảo quản các lọ chuẩn ở nhiệt độ 2 - 8°C, tránh ánh sáng.

Bàn luận

Hình 5 minh họa cơ chế phản ứng tổng hợp tạp E của allopurinol. Phản ứng tổng hợp tạp E gồm 2 giai đoạn thế và thủy phân. Các chất tham gia phản ứng và sản phẩm mục tiêu đều chứa các nhóm chức dễ tham gia phản ứng như nhóm cyano, nhóm ester nên hỗn hợp phản ứng sau 2 - 3 giờ có nhiều sản phẩm phụ. Đó là các hợp chất ethoxymethylen, khi tiếp tục đun nóng các hợp chất ethoxymethylen không bền dễ bị thủy phân cho ra sản phẩm cuối cùng là tạp E.



Hình 5. Cơ chế phản ứng tổng hợp tạp E

Kết luận

Tạp E đã được tổng hợp và được đánh giá để làm chất đối chiếu sử dụng trong kiểm nghiệm tạp chất liên quan của allopurinol. Quy trình tổng hợp tạp E có hiệu suất khoảng 42% với độ tinh khiết sắc ký trên 99% tính trên nguyên trạng, đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2018), *Ban hành danh mục thuốc thiết yếu tân dược*, Thông tư 19/2018/TT-BYT ngày 30/08/2018.
2. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 162-165.
3. Debabrata Sanyal, Jitendra Verdia, Narendra Joshi (2015), "Gentoxic impurities in active pharmaceutical ingredients", *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 2, pp. 973-989.

4. U.S. Pharmacopeial Convention (2019), *USP Reference Standards Catalog*.

5. Druey J., Riehen, Schmidt P. (1959), "New pyrazoles and method of preparing same", *United States Patent Office* 2868803.

6. Peter Finlander, Erik B. Pedersen (1985), "Synthesis of 1,5 - dihydro - 5 - (4-methoxyphenyl) - 4H - pyrazolo [3,4-d] pyrimidin4 - ones and their ribosides and mannich bases", *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 318, pp. 452-459.

7. ISO Guide 35:2006 (2006), *Reference materials – General and statistical principles for certification*, pp. 48.

8. ISO 13528:2005 (2005), *Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparisons*, pp. 64.

9. ICH Harmonized tripartite guideline (2005), *Validation of analytical procedures: Text and methodology*, pp. 1-13.