

Thiết lập chất đối chiếu 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (tạp D) và 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin (tạp E) của carvedilol

Nguyễn Hữu Tiến^{1,2*}, Huỳnh Thị Mai Trang³, Nguyễn Đức Tuấn¹
Trương Ngọc Tuyền¹, Trần Hữu Dũng²

¹Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Huế

³Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh

Summary

4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (carvedilol impurity D) and 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamine (carvedilol impurity E) were established as reference standards, basing on the ISO guide. Results showed that the units (vials) were homogeneous in the process of packaging and the chromatographic purity of D and E impurities are 99.96 % and 99.77 %, respectively, with the uncertainties from 0 to 0.00294.

Keywords: Carvedilol impurity, 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazole, 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamine.

Đặt vấn đề

Carvedilol là thuốc tim mạch được sử dụng khá rộng rãi trong điều trị bệnh lý tim mạch như điều trị tăng huyết áp, thiếu máu cục bộ hoặc suy tim [1]. Việc kiểm tra chất lượng nguyên liệu đầu vào cũng như thành phẩm phải được thực hiện nhằm đảm bảo chất lượng các chế phẩm nội địa cũng như ngoại nhập chứa hoạt chất carvedilol, trong đó yêu cầu kiểm soát hàm lượng tạp chất là rất quan trọng. 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (tạp D) và 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin (tạp E) là hai tạp chất liên quan của carvedilol, xuất hiện trong nguyên liệu và thành phẩm bắt nguồn từ việc tồn dư trong quá trình tổng hợp. Dược điển Mỹ quy định giới hạn cho phép của tạp D và E trong nguyên liệu carvedilol là không vượt quá 0,1 % và trong chế phẩm carvedilol là không vượt quá 0,2 % [2]. Trong khi đó, chuẩn tạp D và E đang được bán với giá rất đắt (khoảng 30 triệu đồng/15 mg mỗi tạp) và phải mất thời gian dài trước

khi đưa về Việt Nam nên gây không ít khó khăn cho công tác kiểm nghiệm hai tạp chất này. Trong các nghiên cứu trước, chúng tôi đã tổng hợp thành công tạp D và E của carvedilol [3, 4]. Trong bài báo này, chúng tôi tiếp tục công bố việc thiết lập chất đối chiếu các tạp D và E.

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Tạp D và tạp E (dạng muối hydroclorid) của carvedilol đã được tổng hợp và được xác định độ tinh khiết trên 99 % tính trên chế phẩm nguyên trạng, sử dụng phương pháp **HPLC** quy về 100 % diện tích pic.

Chất chuẩn: Tạp D chuẩn USP RS (số lô R100B0, hàm lượng 100 % tính trên chế phẩm nguyên trạng), tạp E chuẩn USP RS dạng muối 2-(2-methoxyphenoxy) ethylamin hydroclorid monohydrat (số lô R100C0, hàm lượng 100 % tính trên chế phẩm nguyên trạng).

Hóa chất và dung môi: Acetonitril đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng, kali dihydrophosphat, acid orthophosphoric, acid trifluoroacetic và acid-1-heptansulfonic đạt tiêu chuẩn phân tích. Cloroform, dimethyl formamid, dimethyl sulfoxyd và tetrahydrofuran đạt tiêu chuẩn phân tích.

Thiết bị

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu LC-20A kết nối đầu dò PDA, máy phân tích nhiệt

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Hữu Tiến
Email: nhtien@huemed-univ.edu.vn
Ngày nhận: 04/8/2021
Ngày phản biện: 06/8/2021
Ngày duyệt bài: 25/11/2021

vi sai Shimadzu DSC Q20, máy đo điểm chảy Stuart SMP20, cân phân tích 5 số ABT 220 – 5DM (Kern).

Phương pháp nghiên cứu

Đánh giá tạp D và tạp E

Tạp D và tạp E của carvedilol được đánh giá theo các chỉ tiêu sau: Cảm quan, độ tan theo Dược điển Việt Nam V (trong nước, methanol, ethanol và một số dung môi hữu cơ), điểm chảy bằng DSC, định danh bằng các phương pháp phổ nghiệm **IR**, **MS**, **NMR**, hàm ẩm bằng phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) và độ tinh khiết sắc ký.

Định lượng tạp D và tạp E bằng kỹ thuật HPLC-PDA

Điều kiện sắc ký định lượng tạp D: Cột Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), nhiệt độ cột 55 °C, thể tích tiêm 20 μ L, tốc độ dòng 1,0 mL/phút, bước sóng phát hiện 240 nm. Pha động bao gồm acetonitril – dung dịch đệm (31:69), trong đó dung dịch đệm là dung dịch KH₂PO₄ 2,72 g/L được điều chỉnh về pH 2,0 bằng H₃PO₄. Dung môi hòa tan là hỗn hợp acetonitril – nước (1:1).

Điều kiện sắc ký định lượng tạp E: Cột Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), nhiệt độ cột 40 °C, thể tích tiêm 10 μ L, tốc độ dòng 1,0 mL/phút, bước sóng phát hiện 220 nm. Pha động bao gồm acetonitril – dung dịch TFA 0,05 % và có nồng độ acid-1-heptansulfonic 2,5 mM (30:70). Dung môi hòa tan là hỗn hợp acetonitril – nước (1:1).

Dung dịch thử: Cân khoảng 5,0 mg mẫu thử, cho vào bình định mức 5 mL, bổ sung dung môi hòa tan đến vạch, lắc đều, pha loãng 20 lần dung dịch thu được với dung môi hòa tan, lọc qua màng lọc 0,45 μ m.

Dung dịch chuẩn: Cân khoảng 5,0 mg tạp D/ tạp E chuẩn, cho vào bình định mức 5 mL, sau đó chuẩn bị tương tự dung dịch thử.

Mẫu trắng: Dung môi hòa tan.

Tiến hành sắc ký mẫu trắng, dung dịch chuẩn, dung dịch thử. Ghi nhận sắc ký đồ. Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống. Tính hàm lượng phần trăm tạp D/ tạp E trong mẫu thử dựa vào diện tích pic thu được từ dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng của tạp D/ tạp E carvedilol chuẩn.

Thiết lập chất đối chiếu tạp D và 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. Xác định

độ tinh khiết của tạp D và E trong từng lọ theo quy trình định lượng bằng kỹ thuật **HPLC-PDA**, mỗi lọ được xác định 2 lần. Việc đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ được dựa theo hướng dẫn của ISO 35:2017 [5].

Đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm

Việc đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm được tiến hành dựa theo hướng dẫn của ISO 13528:2015 [6]. Tạp D và 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. Nếu đạt yêu cầu, sẽ tiến hành xác định hàm lượng hai tạp này trên 6 mẫu đã nhận, mỗi mẫu được xác định 2 lần. Các phòng thí nghiệm được lựa chọn để gửi mẫu là Khoa Nghiên cứu và Phát triển (PTN1), Khoa Thiết lập chất chuẩn & chất đối chiếu (PTN2) và Khoa Kiểm nghiệm Mỹ phẩm (PTN3) thuộc Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh. Việc đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm sẽ được thực hiện bằng 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 D và E và độ không đảm bảo đo được thực hiện dựa theo hướng dẫn của ISO 13528:2015 [6], dựa trên 18 kết quả xác định độ tinh khiết của hai tạp D và E tại ba phòng thí nghiệm.

Kết quả và bàn luận

Đánh giá tạp D và tạp E

Kết quả kiểm tra tính phù hợp của hệ thống cho thấy giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích pic tạp A và tạp D carvedilol đều nhỏ hơn 2%, hệ số đối xứng của pic tạp D và tạp E nằm trong khoảng 0,8 – 1,5; pic tạp D và tạp E đạt độ tinh khiết theo phổ **UV-Vis**. Như vậy, quy trình định lượng tạp D và tạp E bằng kỹ thuật **HPLC-PDA** đạt yêu cầu về tính phù hợp của hệ thống.

Bảng 1 và bảng 2 trình bày kết quả đánh giá tạp D và tạp E. Với độ tinh khiết sắc ký trên 99 % nên hai chất này đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu.

Bảng 1. Kết quả đánh giá tạp D carvedilol

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu
Tính chất	Cảm quan	Tinh thể trắng, lấp lánh, không mùi
	Độ tan	Tan trong cloroform, dimethyl formamid (DMF), dimethyl sulfoxyd và tetrahydrofuran (15 ml/g)
Điểm chảy	DSC	138 – 139 °C
Định tính	Phổ hồng ngoại	ν (ATR, cm^{-1}): 3286 (N-H), 1336 (C-N), 1259 (C-O epoxy), 1095 (C-O ether)
	Phổ khối	HR-MS (-) có $m/z = 238,0878$ $[\text{M-H}]^-$
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân	Phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HMBC và HSQC : xem ^[4]
Hàm ẩm	TGA	1,34 %
Độ tinh khiết sắc ký	HPLC (chuẩn hóa diện tích)	$\geq 99,0$ % tính trên chế phẩm nguyên trạng

Bảng 2. Kết quả đánh giá tạp E carvedilol dạng muối hydroclorid

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu
Tính chất	Cảm quan	Tinh thể trắng, lấp lánh, không mùi.
	Độ tan	Dễ tan trong DMF, ethanol và methanol, nước (5 ml/g)
Điểm chảy	DSC	91,2 °C
Định tính	Ion clorid	Cho phản ứng tạo tủa trắng với AgNO_3
	Phổ hồng ngoại	ν (ATR, cm^{-1}): 3084 (N-H), 2808 (C-H aliphatic), 1506 (C=C), 1254 (C-N), 1009 (C-O), 764 (C-H vòng thơm)
	Phổ khối	HR-MS (+) có $m/z = 168,1153$ $[\text{M}+\text{H}]^+$
		$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, δ ppm): 149,5; 147,2; 122,2; 120,7; 115,2; 112,5; 65,8; 55,5; 38,2.
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân	$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 8,36 (s, 3H); 7,04 (dd, 1H, 1Hz, 8 Hz); 7,01 (dd, 1H, 1,5 Hz, 6,5 Hz); 6,97 (dt, 1H, 1,5 Hz, 7 Hz); 6,89 (dt, 1H, 1,5 Hz, 7,5 Hz); 4,18 (t, 2H, 5,5 Hz); 3,77 (s, 3H); 3,15 (t, 2H, 5,5 Hz).
Hàm ẩm	TGA	0,81 %
Độ tinh khiết sắc ký	HPLC (chuẩn hóa diện tích)	$\geq 99,0$ % tính trên chế phẩm nguyên trạng

Thiết lập chất đối chiếu tạp D và E mỗi lọ 10 mg và 11 lọ được lấy ngẫu nhiên để
Đánh giá độ đồng nhất của quá trình kiểm tra độ đồng nhất. Kết quả đánh giá độ
đóng lọ đồng nhất của quá trình đóng lọ được thể hiện ở
 1000 mg tạp D/ tạp E được đóng 100 lọ, bảng 3.

Bảng 3. Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ ($n = 2$)

STT	Kết quả định lượng tạp D (%)	Kết quả định lượng tạp E (%)
1	99,96	99,78
2	99,95	99,77
3	99,94	99,79
4	99,97	99,76
5	99,94	99,76
6	99,96	99,77
7	99,95	99,76
8	99,95	99,79
9	99,96	99,78
10	99,96	99,78
11	99,96	99,78
Trung bình	99,95	99,78
SD	0,01	0,01
RSD (%)	0,01	0,01

Kết quả cho thấy giá trị RSD đều $< 0,5\%$, như vậy các lọ trong quá trình đóng đồng nhất. Từ đó kết luận điều kiện đóng gói ổn định và phù hợp.

Đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm

Kết quả đánh giá độ đồng nhất liên phòng thí nghiệm được thể hiện ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm ($n = 2$)

STT	Kết quả định lượng tạp D (%)			Kết quả định lượng tạp E (%)		
	PTN 1	PTN 2	PTN 3	PTN 1	PTN 2	PTN 3
1	99,95	99,96	99,95	99,78	99,76	99,77
2	99,95	99,95	99,95	99,77	99,79	99,79
3	99,96	99,94	99,96	99,79	99,78	99,77
4	99,96	99,97	99,96	99,76	99,78	99,75
5	99,96	99,94	99,96	99,76	99,78	99,77
6	99,96	99,96	99,96	99,77	99,77	99,77
Trung bình	99,96	99,95	99,96	99,77	99,78	99,77
SD	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
RSD (%)	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
Thống kê	$F_{tn} = 0,333 < F_{tc} = 3,68$			$F_{tn} = 0,537 < F_{tc} = 3,68$		

Kết quả phân tích ANOVA ở bảng 4 cho thấy $F_{tn} = 0,333 < F_{tc} = 3,68$ đối với tạp D và $F_{tn} = 0,537 < F_{tc} = 3,68$ đối với tạp E. Do đó, 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, hàm lượng chất phân tích

không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

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

Bảng 5 trình bày kết quả xác định giá trị ấn định của tạp D và tạp E.

Bảng 5. Kết quả xác định giá trị ấn định của tạp D và tạp E ($n = 18$)

Số lần thay đổi	Tạp D				Tạp E			
	$x^* 0$	$x^* 1$	$x^* 2$	$x^* 3$	$x^* 0$	$x^* 1$	$x^* 2$	$x^* 3$
$\delta = 1,5 s^*$		0	0	0		0	0	0
$x^* - \delta$		99,96	99,96	99,96		99,77	99,77	99,77
$x^* + \delta$		99,96	99,96	99,96		99,77	99,77	99,77
Trung bình	99,96	99,96	99,96	99,96	99,77	99,77	99,77	99,77
x^* mới	99,96	99,96	99,96	99,96	99,77	99,77	99,77	99,77
s^* mới	0	0	0	0	0,01	0,01	0,01	0,01

Nhận xét: Đối với tạt D sau ba chu kỳ thay đổi, $s^* = 0$ không thay đổi, khi đó x^* được chọn là 99,89 %; Do độ lệch thực nghiệm ấn định $s^* = 0$ nên không tính z-score. Vậy giá trị ấn định của tạt D là giá trị x^* mới 99,96 %; Độ không đảm bảo đo: $\mu = 1,25s^*/\sqrt{p} = 1,25 \times 0/\sqrt{18} = 0$.

Đối với tạt E sau ba chu kỳ thay đổi, $s^* = 0,01$ không thay đổi, khi đó x^* được chọn là 99,77 %; Từ kết quả trên tính z-score của 18/18 giá trị có $|z| < 2,0$; Vậy giá trị ấn định của tạt E là 99,77 %; Độ không đảm bảo đo: $\mu = 1,25s^*/\sqrt{p} = 1,25 \times 0,01/\sqrt{18} = 0,0029$.

Như vậy, hai tạt D và E đều đủ điều kiện đăng ký chuẩn Dược điển với hàm lượng được xác định lần lượt là 99,96 % và 99,77 % theo nguyên trạng, độ không đảm bảo đo là 0 với tạt D và 0,0029 với tạt E, độ lệch chuẩn lần lượt là 0,0078 và 0,0113 ($n = 18$).

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

Việc kiểm soát các tạt chất liên quan trong nguyên liệu và đặc biệt là trong thành phẩm ngày càng được quan tâm tại Việt Nam. Tuy nhiên, phần lớn các tạt chất chuẩn vẫn chưa có hoặc nếu có thường rất đắt tiền và phải mua từ nước ngoài. Gần đây, Cục Quản lý Dược Việt Nam đã có yêu cầu phải kiểm tra tạt chất liên quan một cách chặt chẽ trong nguyên liệu và thành phẩm đăng ký cho sản xuất và lưu hành. Hiện nay hệ thống kiểm nghiệm thuốc quốc gia chưa cung cấp được tạt chuẩn D và E của carvedilol nên gây khó khăn cho công tác kiểm nghiệm tạt chất này tại các xí nghiệp dược trong nước có sản xuất thành phẩm carvedilol. Việc đặt mua tạt chuẩn này từ nước ngoài phải mất 1 – 2 tháng với giá thành rất đắt (15 mg tạt D hoặc tạt E của carvedilol chuẩn USP có giá tiền khoảng 30 triệu đồng).

Kết quả đánh giá và thiết lập chất đối chiếu tạt D và E carvedilol cho thấy các chất này đủ điều kiện để đăng ký chuẩn Dược điển với hàm lượng được xác định 99,96 % và 99,77 % theo nguyên trạng, sử dụng làm chất chuẩn thứ cấp tạt D và E của carvedilol theo USP. 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 giàu ngân hàng tạt chuẩn trong công tác kiểm tra chất lượng tạt chất liên quan.

Kết luận

Tạt D và E của carvedilol đã được thiết lập chất đối chiếu với độ tinh khiết lần lượt là 99,96 % và 99,77 % tính trên chế phẩm nguyên trạng, độ không đảm bảo đo là 0 với tạt D và 0,00294 với tạt E.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 465.
2. United States Pharmacopeia 43 (2020), Carvedilol, Carvedilol tablets, pp. 791-795.
3. Nguyễn Thị Quỳnh Như, Nguyễn Hữu Tiến (2019), “Xây dựng quy trình sắc ký pha đảo tạo cặp ion để xác định độ tinh khiết tạt E của carvedilol”, *Tạp chí Dược học*, tháng 11, tr. 144-149.
4. Nguyễn Hữu Tiến, Nguyễn Thị Như Ngọc, Phan Tấn Vương, Trần Hữu Dũng, Nguyễn Đức Tuấn, Trương Ngọc Tuyền (2020), “Tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạt D của carvedilol”, *Tạp chí Dược học*, tháng 5, tr. 28-32.
5. ISO Guide 35:2017 (2017), *Reference materials - Guidance for characterization and assessment of homogeneity and stability*, pp. 9-26, 63-65.
6. ISO 13528:2015 (2015), *Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparisons*, pp. 13-19.