

# Xây dựng phương pháp xác định tạp chất liên quan trong nguyên liệu tạp chất C của terazosin bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Đỗ Thị Thanh Thủy<sup>1\*</sup>, Nguyễn Hải Nam<sup>1</sup>, Đoàn Cao Sơn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Dược Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương

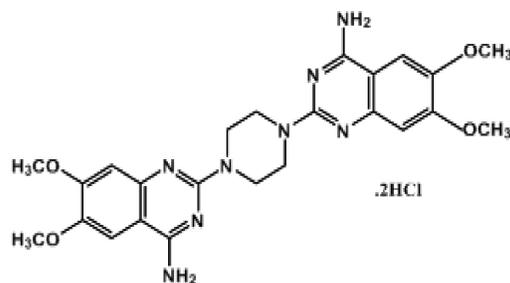
## Summary

A high performance liquid chromatography (HPLC) method was developed to determine related substances of impurity C of terazosin (ICT) with the chromatography was operated under the following condition: A column (250 x 4.6 mm; 5.0 μm) packed with octylsilyl silica gel for chromatography, kept at the temperature of 40°C; a mixture of acetonitrile and citrate buffer solution was used as the mobile phase in gradient elution mode with a flow rate of 1.0 ml per minute; the signal was detected at the wavelength of 254 nm. The result of the validation showed that the HPLC method was specific, the limit of detection was low and it was suitable for determining limit of related substances in this material.

**Keywords :** Impurity C, terazosin related compound, related substance.

## Đặt vấn đề

Hiện nay, số lượng tạp chuẩn được thiết lập dùng cho công tác kiểm tra chất lượng thuốc tại Việt Nam vẫn còn rất hạn chế [3, 4]. Một số đề tài nghiên cứu tổng hợp các nguyên liệu tạp chất đã được triển khai để cung cấp nguyên liệu thiết lập tạp chuẩn trong nước trong đó có nghiên cứu tổng hợp nguyên liệu tạp chất C của terazosin (1,4-bis(4-amino-6,7-dimethoxy-2-quinazoliny) piperazin dihydroclorid (ICT), hình 1) [2]. Để tiến tới thiết lập tạp chuẩn ICT tại Việt Nam thì cần xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu tạp chất này. Vì vậy, nhóm nghiên cứu tiến hành xây dựng phương pháp xác định tạp chất liên quan trong nguyên liệu ICT để góp phần xây dựng tiêu chuẩn chất lượng cho nguyên liệu ICT tổng hợp được và tiến tới thiết lập tạp chuẩn C của terazosin tại Việt Nam.



Hình 1. Công thức cấu tạo tạp chất C của terazosin theo USP

## Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Thiết bị, hóa chất, chất chuẩn, mẫu nghiên cứu

### Thiết bị và dụng cụ

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao SHIMADZU diode array UV-VIS SPD- M20A (Nhật Bản). Cột sắc ký Shimadzu C8 (250 x 4,6 mm, 5 μm). Cân phân tích METTLER TOLEDO XPE26 có độ chính xác 0,001 mg (Thụy Sĩ). Các thiết bị phụ trợ: Máy đo pH Metrohm 780 (Thụy Sĩ), máy lắc siêu âm ELMASONIC S180 H (Đức) và các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

Chịu trách nhiệm: Đỗ Thị Thanh Thủy

Email: dothanhthuy75@gmail.com

Ngày nhận: 14/12/2020

Ngày phản biện: 27/12/2020

Ngày duyệt bài: 22/01/2021

### Hóa chất và chất chuẩn

**Các chất chuẩn:** Tạp chuẩn C của terazosin là chất chuẩn Dược điển Mỹ (ICT chuẩn), lô HOM084 hàm lượng 95,0%. Tạp chuẩn A của terazosin là chuẩn chính Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương (IAT chuẩn), lô WS.0117344.01, hàm lượng 97,26%. Chất chuẩn terazosin của Dược điển Mỹ (TEZ chuẩn), lô G0F290, hàm lượng 91,9%.

**Các hóa chất và dung môi:** 2-cloro-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amino (ACDQ) của Hãng Sigma Aldrich, lô STBC3541, hàm lượng 99,7%; acetonitril dùng cho **HPLC**, acid citric khan, methanol, natri citrat dihydrat, triethylamin đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

**Dung dịch đệm citrat:** Được chuẩn bị bằng cách hòa tan 3,63 g natri citrat dihydrat và 8,63 g acid citric khan trong nước cất, thêm nước cất vừa đủ 1.000 ml, lọc qua màng 0,45 µm rồi thêm 0,25 ml triethylamin.

### Mẫu nghiên cứu

Nguyên liệu tạp chất C của terazosin (ICT) được tổng hợp tại phòng thí nghiệm Bộ môn Hóa Dược, Trường Đại học Dược Hà Nội.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Điều kiện sắc ký

Cột C8 (250 x 4,6 mm, 5 µm), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, nhiệt độ cột 40°C, thể tích tiêm mẫu 50 µl, detector **UV** 254 nm, pha động là hỗn hợp acetonitril và đệm citrat với tỷ lệ thay đổi theo thời gian (bảng 1).

**Bảng 1.** Chương trình gradient dung môi pha động

Thời gian (phút)	Acetonitril	Đệm acetat	Chế độ
0 → 7	8	92	Đẳng dòng
7 → 15	8 → 17	92 → 83	Gradient
15 → 35	17	83	Đẳng dòng
35 → 36	17 → 8	83 → 92	Gradient
36 → 45	8	92	Đẳng dòng

#### Các dung dịch tiêm sắc ký:

- Dung dịch thử ICT có nồng độ 50 µg/ml trong methanol.

- Dung dịch so sánh được chuẩn bị bằng cách pha loãng 1 ml dung dịch thử thành 100 ml với methanol.

- Dung dịch phân giải là hỗn hợp các chất pha trong methanol gồm IAT, TEZ, ACDQ, ICT với nồng độ lần lượt là 4 µg/ml, 2 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml.

**Tính kết quả:** % tạp chất trong mẫu thử ICT được tính theo công thức:

$$(r_U/r_S) \times (C_S/C_U) \times 100$$

Trong đó:  $r_U$  là diện tích mỗi tạp chất trong dung dịch thử ICT;  $r_S$  là diện tích pic ICT trong dung dịch so sánh;  $C_S$  là nồng ICT trong dung dịch so sánh (mg/ml);  $C_U$  là nồng độ ICT trong dung dịch thử (mg/ml).

#### Yêu cầu của hệ thống sắc ký:

- Sắc ký đồ dung dịch phân giải cho hệ số phân giải giữa pic IAT và TEZ  $\geq 10$ , hệ số phân giải giữa pic TEZ và ACDQ  $\geq 4$ , hệ số phân giải giữa pic ACDQ và ICT  $\geq 2$ .

- Sắc ký đồ dung dịch so sánh cho hệ số đối xứng pic ICT  $\leq 3$ , số đĩa lý thuyết  $\geq 5000$ . Giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích pic ICT khi tiêm lặp lại dung dịch so sánh  $\leq 2\%$ .

#### Kết quả nghiên cứu

#### Xây dựng phương pháp xác định giới hạn tạp chất liên quan trong nguyên liệu ICT bằng HPLC

Phương pháp xác định giới hạn tạp chất liên quan trong nguyên liệu ICT bằng **HPLC** được xây dựng như đã nêu ở phần "Phương pháp thử" qua tham khảo một số tài liệu [1, 5, 6, 7] và qua khảo sát thực nghiệm.

#### Khảo sát dung môi pha mẫu

Sử dụng dung môi pha ICT theo BP 2017 là hỗn hợp methanol - nước (7 : 3) hay theo USP 40 gồm nước - acetonitril - methanol (60 : 30 : 10) thì thấy ICT rất khó tan. Khảo sát thêm một số dung môi khác như *n*-propanol, isopropanol, dimethyl sulfoxid, methanol, ethylacetat, acetonitril thì thấy độ tan của ICT trong methanol và dimethyl sulfoxid là tốt nhất. Lựa chọn methanol làm dung môi hòa tan là dung môi hay dùng trong kiểm nghiệm lại rẻ tiền hơn dimethyl sulfoxid và không gây kích ứng da như dimethyl sulfoxid. Mặt khác, khi tiêm mẫu trắng là methanol vào chương trình sắc ký không lên nhiều pic dung môi như dimethyl sulfoxid.

#### Khảo sát chương trình pha động

Khảo sát một số chương trình pha động đẳng dòng theo các tài liệu tham khảo thì nhận thấy với chương trình pha động theo BP 2017 thì pic IAT là một thành phần trong hỗn hợp phân giải bị trùng vào pic dung môi methanol; với chương trình pha động theo USP 40 thì pic ICT thu được có chiều cao quá thấp không thể áp dụng cho 1 phương pháp phân tích tạp chất, nếu tăng

nồng độ mẫu thì ICT không tan trong dung môi pha mẫu theo USP. Khi pha trong methanol để tăng nồng độ mẫu ICT thì pic IAT cũng bị trùng vào pic dung môi và pic ICT không tách khỏi pic ACDQ ( $R_s = 1,081$ ).

Khảo sát các chương trình gradient dung môi: 12 chương trình gradient dung môi đã được khảo sát để lựa chọn chương trình pha động phù hợp và kết quả đã lựa chọn được chương trình gradient dung môi (bảng 1) cho khả năng tách tốt nhất cả 4 pic IAT, TEZ, ACDQ, ICT trong dung dịch phân giải, đặc biệt 2 pic ICT và ACDQ tách khỏi nhau hoàn toàn với hệ số phân giải lớn hơn 2.

### Thẩm định phương pháp

#### Tính thích hợp của hệ thống sắc ký

Tiến hành tiêm sắc kí lặp lại 6 lần dung dịch so sánh. Kết quả cho thấy giá trị độ lệch chuẩn tương đối (RSD) của thời gian lưu (0,23%) và của diện tích pic (0,81%) đều nhỏ hơn 2%, hệ số đối xứng dao động từ 1,699 đến 1,913; số đĩa lý thuyết > 5000 (bảng 2). Ngoài ra, kết quả đánh giá tính thích hợp của hệ thống sắc ký cũng được khẳng định qua độ phân giải của các pic trong dung dịch phân giải ở phần thẩm định độ đặc hiệu. Với các thông số trên, hệ thống HPLC đã thích hợp để phân tích tạp chất trong nguyên liệu ICT.

**Bảng 2.** Kết quả khảo sát độ thích hợp của hệ thống sắc ký khi phân tích tạp chất trong ICT

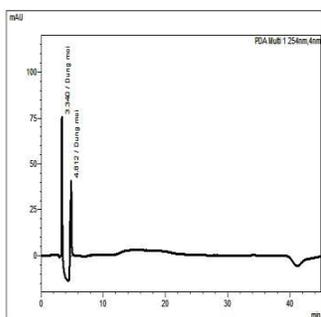
TT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng pic
1	34,078	218322	11935	1,699
2	34,010	219259	13026	1,913
3	33,944	219770	10589	1,828
4	33,885	219489	13504	1,802
5	33,888	222218	13461	1,871
6	33,898	216845	13875	1,834
<b>TB</b>	33,951	219317		
<b>RSD (%)</b>	0,23	0,81		

#### Độ đặc hiệu

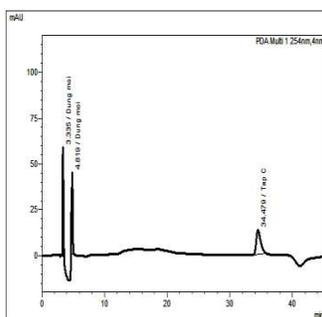
Tiêm các dung dịch sau vào hệ thống sắc ký: Mẫu trắng (methanol), dung dịch phân giải là hỗn hợp IAT, TEZ, ACDQ và ICT có nồng độ lần lượt là 4,026 µg/ml; 1,700 µg/ml; 1,992 µg/ml và 4,061 µg/ml. Kết quả cho thấy:

- Sắc kí đồ của mẫu trắng (hình 2.a) có các pic dung môi nhưng không xuất hiện pic ở trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic chính (hình 2.b).

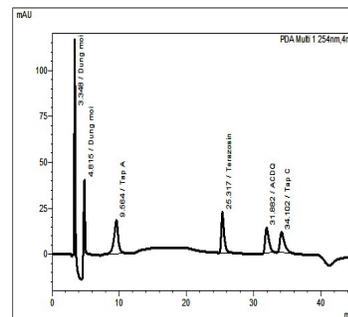
- Sắc kí đồ của dung dịch phân giải (hình 2.c) cho các pic IAT ở 9,654 phút, TEZ ở 25,317 phút, ACDQ ở 31,882 phút và ICT ở 34,102 phút. Các pic này tách khỏi nhau hoàn toàn và tách khỏi pic dung môi với độ phân giải của pic dung môi và IAT là 6,805; độ phân giải của IAT và TEZ là 17,391; độ phân giải của TEZ và ACDQ là 7,436; độ phân giải của ACDQ và ICT là 2,933 (hình 2).



2.a) Mẫu trắng



2.b) Mẫu chuẩn ICT



2.c) Mẫu phân giải

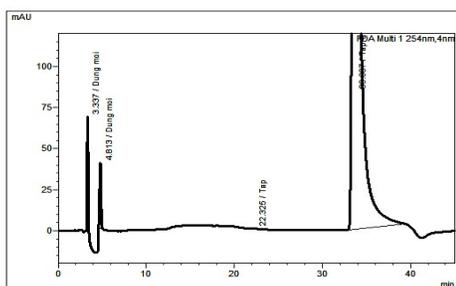
**Hình 2.** Sắc kí đồ độ đặc hiệu của phương pháp phân tích tạp chất trong ICT

Tiêm dung dịch thử ICT nồng độ 49,830 µg/ml và các dung dịch thử ICT được phân hủy ở các điều kiện khác nhau: **UV** trong 24 giờ, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% trong 5 giờ, nhiệt độ 60 °C trong 4 giờ; thêm NaOH 0,5 N trong 4 giờ; thêm HCl 0,5 N trong 4 giờ vào hệ thống sắc ký. Kết quả thể hiện ở bảng 3 và hình 3 cho thấy: Trên sắc ký đồ dung dịch thử xuất hiện 1 pic tạp. Trên sắc ký đồ của các dung dịch thử phân hủy bởi các tác nhân lý hóa ngoài 1 pic tạp tương tự như dung dịch thử còn xuất hiện thêm các pic tạp khác.

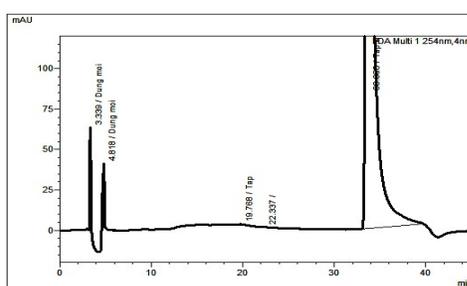
Dung dịch thử phân hủy bằng NaOH và HCl đều xuất hiện thêm 1 pic tạp. Dung dịch phân hủy bằng H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> xuất hiện thêm 3 pic tạp mới và không có vết tạp như trong dung dịch thử. Dung dịch phân hủy bằng **UV** xuất hiện thêm 2 pic tạp. Dung dịch phân hủy bởi nhiệt độ xuất hiện thêm 4 pic tạp. Tất cả các pic tạp trong từng sắc ký đồ đều tách khỏi các pic ICT, pic dung môi và tách khỏi nhau với hệ số phân giải (Rs) của 2 pic liền kề đều lớn hơn 1,5. Như vậy, phương pháp phân tích đạt yêu cầu về độ đặc hiệu.

**Bảng 3.** Số liệu phân tích dung dịch thử ICT và dung dịch ICT phân hủy

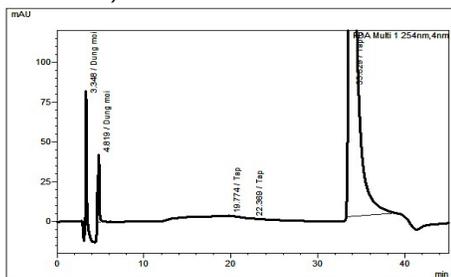
<b>Tạp</b>	<b>Dung dịch Thử</b>	<b>Thử + NaOH</b>	<b>Thử + HCl</b>	<b>Thử + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	<b>Thử/UV</b>	<b>Thử/nhiệt độ</b>
<b>Tạp 1 (phút)</b>	22,325	22,237	22,369	-	22,461	22,315
<b>Tạp 2 (phút)</b>	-	-	-	-	-	15,776
<b>Tạp 3 (phút)</b>	-	-	-	16,873	16,954	16,852
<b>Tạp 4 (phút)</b>	-	-	-	18,070	-	18,041
<b>Tạp 5 (phút)</b>	-	19,768	19,774	19,753	19,804	19,740
<b>Rs nhỏ nhất</b>	5,591	4,947	5,116	2,241	5,270	1,795



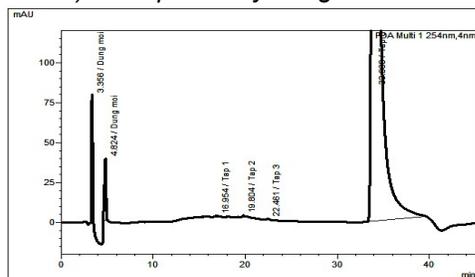
3.a.) Mẫu thử



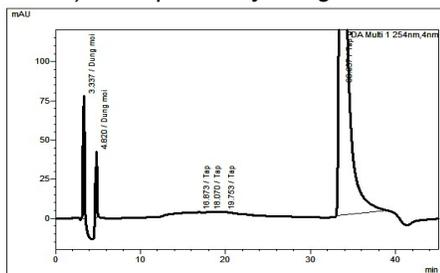
3.b.) Mẫu phân hủy trong NaOH



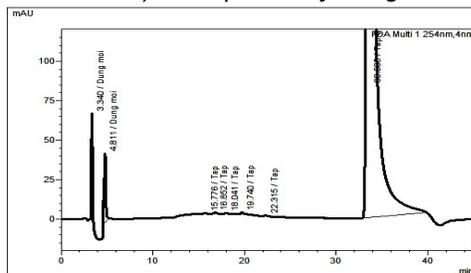
3.c.) Mẫu phân hủy trong HCl



3.d.) Mẫu phân hủy trong UV



3.e.) Mẫu phân hủy trong H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



3.f.) Mẫu phân hủy ở 60°C

**Hình 3.** Sắc ký đồ dung dịch thử ICT và các dung dịch ICT phân hủy

### **Giới hạn phát hiện**

Tiêm các dung dịch ICT được pha loãng dần, nồng độ thấp nhất mà còn xuất hiện pic sắc ký chính là giới hạn phát hiện (tỷ số S/N  $\approx$  3). Kết quả LOD của tạp không định danh tính theo ICT là 0,063  $\mu\text{g/ml}$  (tỷ số S/N là 3,39).

### **Bàn luận**

Phương pháp **HPLC** sử dụng để phân tích tạp chất trong ICT chưa từng được công bố trong bất kỳ tài liệu nào và đã được thẩm định theo đúng quy định của ICH. Do trong ICT có các tạp không định danh nên theo quy định chỉ cần tiến hành thẩm định độ thích hợp hệ thống, độ đặc hiệu, và giới hạn phát hiện. Kết quả cho thấy phương pháp có độ đặc hiệu cao, LOD thấp (0,063  $\mu\text{g/ml}$ ). Độ đặc hiệu của phương pháp được khẳng định qua việc tách khỏi nhau hoàn toàn của các chất ICT, IAT, TEZ, ACDQ trong hỗn hợp phân giải. Trong đó 4 chất ICT, IAT, TEZ, ACDQ có những phần cấu trúc giống nhau, IAT và, ACDQ là nguyên liệu dùng để tổng hợp ICT, ICT là tạp chất của TEZ. Ngoài ra, độ đặc hiệu còn được đánh giá trên các dung dịch thử ICT được phân hủy ở các điều kiện hóa lý khác nhau cũng khẳng định tính đặc hiệu cao của phương pháp. Với đặc điểm ICT rất khó tan trong nhiều dung môi khác nhau đã được khảo sát, chúng tôi đã đưa ra nồng độ cao nhất mà ICT có thể hòa tan được trong dung môi methanol là dung môi dễ tan nhất.

### **Kết luận**

Phương pháp **HPLC** được xây dựng để xác định giới hạn tạp chất liên quan trong nguyên liệu ICT có độ đặc hiệu, cao, LOD thấp, có khả năng ứng dụng ở hầu hết các phòng thí nghiệm, góp phần xây dựng chỉ tiêu chất lượng cho nguyên liệu ICT tổng hợp được.

### **Tài liệu tham khảo**

1. Council of Europe (2016), *European Pharmacopoeia 9.0*, pp. 3022-3024.
2. Đỗ Thị Thanh Thủy, Diêm Thị Mên Huyền, Nguyễn Hải Nam, Đoàn Cao Sơn (2019), "Tổng hợp tạp chất C của terazosin dùng trong kiểm nghiệm", *Tạp chí Dược học*, 59 (514), tr. 51-54.
3. <http://www.idqc-hcm.gov.vn/cac-don-vi/khoa-thiet-lap-chat-chuan-va-chat-doi-chieu/38-danh-muc-chat-doi-chieu/83-danh-muc-chat-doi-chieu.html>, ngày truy cập 30 tháng 3 năm 2019.
4. <http://www.nidqc.org.vn/danh-sach-chuan-cap-nhat-2932019>, ngày truy cập 30 tháng 3 năm 2019.
5. The British medicines commission (2017), *British Pharmacopoeia*, pp. 1021-1023.
6. The Korea Food and Drug Administration (2013), *Korean Pharmacopoeia X*, pp. 1140-1143.
7. The United States Pharmacopoeial Convention (2017), *USP 40*, vol. 3, pp. 6364-6370.