

Xây dựng phương pháp định tính nguyên liệu tạp chất C của terazosin bằng sắc ký lớp mỏng

Đỗ Thị Thanh Thủy*, Đoàn Thị Lâm Oanh, Diêm Thị Mến Huyền
Trường Đại học Dược Hà Nội

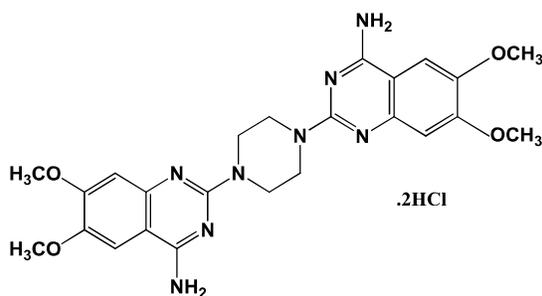
Summary

The purpose of this research is to propose a thin layer chromatography (TLC) method for identification of impurity C of terazosin (ICT). The TLC method is performed on a sheet coated by silica gel 60 F₂₅₄ and the mobile phase is a mixture of ethyl acetate, triethylamine and ammonia solution 25% at the ratio of 21: 6: 7 shaken well, using the upper layer as the solvent phase; the 254 nm ultraviolet light is used for visualizing. The TLC method was validated in specificity which proved that this method was suitable for the intended application.

Keywords : Impurity C, identification, terazosin, terazosin related.

Đặt vấn đề

Từ thế kỷ XX, một số nhà khoa học phát hiện ra nhóm thuốc ức chế chọn lọc thụ thể α_1 -adrenergic là nhóm thuốc được chỉ định trong điều trị tăng huyết áp cũng có tác dụng làm giảm các triệu chứng của phì đại lành tính tuyến tiền liệt [1,3,5,9]. Terazosin là một thuốc điển hình trong nhóm được sử dụng rộng rãi trong điều trị phì đại lành tính tuyến tiền liệt đặc biệt là các trường hợp có kèm theo tăng huyết áp. Để kiểm tra chất lượng nguyên liệu và thành phẩm chứa terazosin, các dược điển [2,6,7,8] đều quy định sử dụng một số tạp chuẩn của terazosin trong đó có tạp chuẩn C (1,4-bis(4-amino-6,7-dimethoxy-2-quinazolinyl) piperazin dihydroclorid – ICT, hình 1) trong phép thử giới hạn tạp chất. Để thiết lập được tạp chuẩn này cần phải có phương pháp định tính nguyên liệu ICT tổng hợp được để đánh giá nguyên liệu thiết lập chuẩn. Nhóm nghiên cứu đã nghiên cứu và tổng hợp thành công nguyên liệu tạp chất C của terazosin tại Việt Nam [4]. Nhằm mục tiêu thiết lập tạp chuẩn ICT dùng trong kiểm nghiệm, chúng tôi tiến hành xây dựng phương pháp định tính nguyên liệu ICT bằng TLC để tiến tới thiết lập tạp chuẩn ICT 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

Cân phân tích METTLER TOLEDO XPE26 có độ chính xác 0,001 mg (Thụy Sĩ).

Các thiết bị phụ trợ: Đèn soi tử ngoại UV-VIS Vilber Lourmart (Pháp), máy đo pH Metrohm 780 (Thụy Sĩ), máy lắc siêu âm ELMASONIC S180 H (Đức), bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄ Merck (Đức), bình triển khai sắc ký lớp mỏng và các dụng cụ thủy tinh cần thiết.

Hóa chất và chất chuẩn

Các chất chuẩn: Tạp chuẩn C của terazosin là chất chuẩn Dược điển Mỹ (ICT chuẩn), lô H0M084 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%.

Chịu trách nhiệm: Đỗ Thị Thanh Thủy
Email: dothanhthuy75@gmail.com
Ngày nhận: 10/5/2021
Ngày phân biên: 26/5/2021
Ngày duyệt bài: 22/6/2021

Các hóa chất và dung môi: 2-cloro-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amino (ACDQ) của Hãng Sigma Aldrich, lô STBC3541, hàm lượng 99,7%, *n*-butanol, cloroform, dicloromethan, ethyl acetat, dung dịch amoniac 25%, isopropanol, methanol, tetrahydrofuran, triethylamin, *n*-hexan, acetonitril đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.

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

Phương pháp TLC: Sử dụng pha tĩnh là bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄, phát hiện vết bằng quan sát dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 254 nm, với các hệ dung môi khai triển gồm:

Hệ 1C: ethyl acetat – triethylamin - dung dịch NH₃ 25% (21 : 6 : 7), lắc kỹ, gạn lấy pha dung môi hữu cơ phía trên làm dung môi khai triển.

Hệ 2C: dicloromethan – triethylamin - dung dịch NH₃ 25% - methanol (25 : 7 : 12 : 1), lắc kỹ, gạn lấy pha dung môi hữu cơ phía trên làm dung môi khai triển.

Hệ 3C: *n*-butanol – triethylamin - dung dịch NH₃ 25% (20: 4: 1).

Hệ 4C: isopropanol – triethylamin - dung dịch NH₃ 25% (16: 4: 1).

Hệ 5C: tetrahydrofuran – triethylamin - dung dịch NH₃ 25% (10: 4: 1).

Hệ 6C: cloroform – ethyl acetat – methanol - triethylamin (7: 3: 2: 1).

Hệ 7C: acetonitril - cloroform - *n*-hexan - methanol (9: 8: 2: 2).

Hệ 8C: ethyl acetat – methanol - dung dịch NH₃ 25% (12: 2: 1).

Hệ 9C: cloroform – tetrahydrofuran - methanol (6: 3: 1).

Hệ 10C: dicloromethan – acetonitril - methanol H (4: 4: 1).

Các dung dịch chấm sắc ký

Dung dịch chuẩn ICT: Pha tạp chuẩn ICT trong methanol để được dung dịch có nồng độ 0,05 mg/ml.

Dung dịch thử ICT: Pha nguyên liệu ICT trong methanol để được dung dịch có nồng độ 0,05 mg/ml.

Dung dịch chuẩn IAT: Pha tạp chuẩn IAT trong methanol để được dung dịch có nồng độ 0,05 mg/ml.

Dung dịch chuẩn TEZ: Pha chuẩn TEZ trong methanol để được dung dịch có nồng độ 0,025 mg/ml.

Dung dịch ACDQ: Pha 2-cloro-6,7-dimethoxyquinazolin-4-amino (ACDQ) trong methanol để được dung dịch có nồng độ 0,025 mg/ml.

Dung dịch phân giải: Dung dịch hỗn hợp 4 chất ICT, IAT, TEZ, ACDQ trong MeOH với nồng độ lần lượt là 0,05 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,025 mg/ml, 0,025 mg/ml.

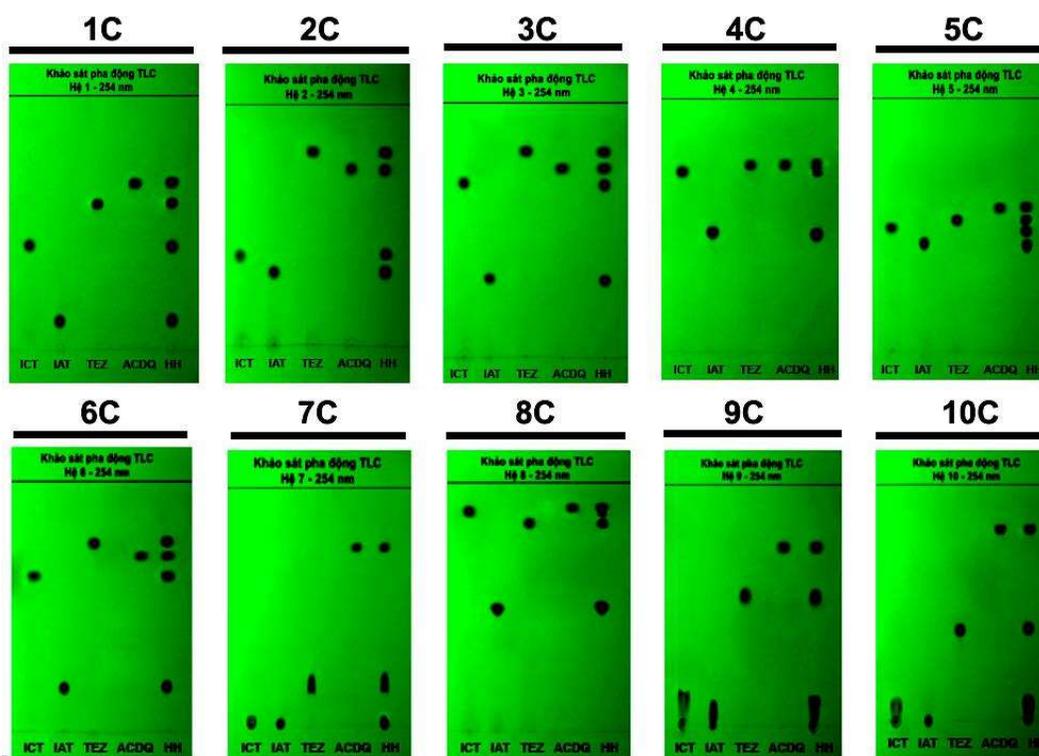
Kết quả nghiên cứu

Khảo sát lựa chọn hệ dung môi khai triển phù hợp

Chấm lên trên bản mỏng đồng lượng 100 µl các dung dịch ICT, IAT, TEZ, ACDQ và dung dịch hỗn hợp cả 4 chất này trong MeOH với nồng độ ICT, IAT, TEZ, ACDQ lần lượt là 0,05 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,025 mg/ml, 0,025 mg/ml. Triển khai sắc ký, phát hiện vết bằng soi đèn UV 254 nm. Kết quả trên sắc ký đồ cho thấy trong số 10 hệ khảo sát có thể lựa chọn một trong 4 hệ 1C, 2C, 3C, 6C. Tuy nhiên hệ 1C được lựa chọn vì cho bốn vết ICT, IAT, TEZ, ACDQ có giá trị R_f cách xa nhau, thời gian chạy sắc ký khá ngắn và không có mùi khó chịu của *n*-butanol (bảng 1, hình 2).

Bảng 1. Giá trị R_f của các vết sắc ký khi khảo sát các hệ dung môi khai triển

Hệ Vết	1C	2C	3C	4C	5C	6C	7C	8C	9C	10C
ICT	0,41	0,37	0,68	0,71	0,49	0,59	0,00	0,89	0,00	0,00
IAT	0,11	0,30	0,31	0,49	0,43	0,16	0,00	0,50	0,00	0,00
TEZ	0,57	0,74	0,75	0,76	0,51	0,73	0,18	0,86	0,53	0,57
ACDQ	0,64	0,80	0,8	0,73	0,57	0,70	0,74	0,92	0,74	0,81

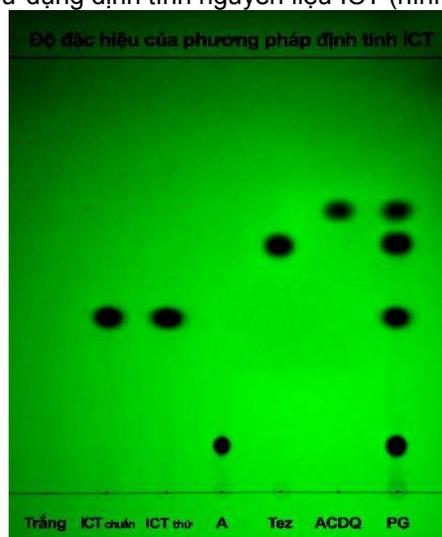


Hình 2. Sắc ký đồ khảo sát pha động định tính ICT bằng TLC (1C). Hệ 1C, 2C). Hệ 2C, 3C). Hệ 3C, 4C). Hệ 4C, 5C). Hệ 5C,6C). Hệ 6C, 7C). Hệ 7C, 8C). Hệ 8C, 9C). Hệ 9C, 10C). Hệ 10C

Thẩm định phương pháp

Tiến hành chấm riêng biệt đồng lượng lên bản mỏng 100 μ l các dung dịch gồm: dung dịch tạp chuẩn ICT USPRS nồng độ 0,05 mg/ml; dung dịch thử ICT nồng độ 0,05 mg/ml; dung dịch tạp chuẩn IAT chuẩn chính của Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương nồng độ 0,05 mg/ml; dung dịch chất chuẩn TEZ USPRS nồng độ 0,025 mg/ml; dung dịch ACDQ nồng độ 0,025 mg/ml; dung dịch phân giải là hỗn hợp IAT, ICT, TEZ, ACDQ với nồng độ lần lượt là 0,05 mg/ml; 0,05 mg/ml; 0,025 mg/ml và 0,025 mg/ml, dung dịch mẫu trắng là methanol. Triển khai sắc ký với hệ dung môi khai triển đã lựa chọn (Hệ 1C) gồm: ethyl acetat - triethylamin - dung dịch ammoniac 25% (21 : 6 : 7), lắc kỹ, gạn lấy pha dung môi phía trên làm dung môi khai triển. Phát hiện vết bằng soi đèn **UV** 254 nm. Kết quả cho thấy dung dịch mẫu trắng không cho vết sắc ký nào, vết sắc ký của dung dịch thử ICT có vị trí và màu sắc tương tự vết tạp chuẩn C ($R_f = 0,41$), dung dịch phân giải cho 4 vết tách khỏi nhau hoàn toàn có vị trí và màu sắc lần lượt tương ứng với 4 vết gồm tạp chuẩn C ($R_f \approx 0,41$),

tạp chuẩn A ($R_f \approx 0,11$), terazosin ($R_f \approx 0,57$), ACDQ ($R_f \approx 0,64$). Vậy phương pháp **TLC** đã xây dựng đạt yêu cầu về độ đặc hiệu, phù hợp để sử dụng định tính nguyên liệu ICT (hình 3).



Hình 3. Sắc ký đồ **TLC** thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp định tính ICT

Bàn luận

Việc khảo sát hệ pha động để định tính nguyên liệu ICT bằng **TLC** được tiến hành với 10 hệ dung môi pha động khác nhau để lựa chọn hệ pha động cho các vết sắc ký đẹp, gọn và sắc ký đồ dung dịch phân giải cho các vết ICT, IAT, TEZ và ACDQ tách khỏi nhau hoàn toàn (hình 2). Dung dịch phân giải gồm 4 thành phần là ICT, IAT, TEZ và ACDQ trong đó IAT và ACDQ là nguyên liệu để tổng hợp ICT, còn IAT và ICT là tạp chất của TEZ. Những chất này đều có những phần cấu trúc hóa học tương tự nhau nên việc các vết sắc ký tách nhau hoàn toàn giúp khẳng định độ đặc hiệu của phương pháp định tính đã xây dựng. Nhận thấy có thể lựa chọn 1 trong 4 hệ 1C, 2C, 3C, 6C, tuy nhiên lựa chọn hệ 1C vì các vết sắc ký đẹp tách xa nhau, có thời gian chạy sắc ký ngắn và không có mùi khó chịu do *n*-butanol gây ra. Kết quả thẩm định cũng cho thấy phương pháp đạt yêu cầu về độ đặc hiệu (hình 3). Khi chuẩn bị các hệ dung môi khai triển 1C, 2C để định tính ICT có 1 thao tác cần lưu ý là sau khi trộn đều các thành phần trong các pha động này cần phải lắc kỹ hỗn hợp để bão hòa NH₃ trong pha dung môi sau đó gạn lấy pha dung môi phía trên đã được bão hòa NH₃ làm dung môi khai triển vì dung dịch NH₃ phân cực không đồng tan trong hỗn hợp các dung môi không phân cực còn lại trong các hệ dung môi này. Tỷ lệ dung dịch NH₃ cho mỗi hệ pha động khác nhau cũng được xác định khi bão hòa hỗn hợp dung môi vì thực tế khi khảo sát nếu không lượng hóa dung dịch NH₃ thì hệ dung môi khai triển thu được không ổn định và khi triển khai sắc ký giá trị R_f các vết cũng không ổn định. Với đặc điểm ICT rất khó tan dù đã được hòa tan trong methanol là dung môi mà ICT dễ tan nhất trong nhiều dung môi pha mẫu đã khảo sát, tuy nhiên chỉ có thể pha được dung dịch nồng độ 0,05 mg/ml nên để đảm bảo lượng ICT chấm lên bản mỏng cho các vết có thể quan sát rõ ràng phù hợp với phép thử định tính, thể tích chấm sắc ký đã lên tới 100 µl. Tuy nhiên dung môi methanol là 1 chất

dễ bay hơi ở nhiệt độ phòng thí nghiệm nên khá thuận lợi cho việc đưa 100 µl dung dịch ICT lên trên bản mỏng.

Kết luận

Phương pháp định tính ICT bằng **TLC** được xây dựng đơn giản, có khả năng ứng dụng ở hầu hết các phòng thí nghiệm và có độ đặc hiệu cao, là 1 phương pháp sử dụng để xây dựng tiêu chuẩn chất lượng nguyên liệu ICT và tiến tới thiết lập tạp chuẩn ICT tại Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

1. Brawer Michael K., Adams George, et al. (1993), "Terazosin in the treatment of benign prostatic hyperplasia", *Archives of Family Medicine*, 2 (9), pp. 929.
2. Council of Europe (2016), *European Pharmacopoeia 9.0*, pp. 3022-3024.
3. Chon Joanna K., Borkowski Andrew, et al. (1999), "Alpha1 - adrenoceptor antagonists terazosin and doxazosin induce prostate apoptosis without affecting cell proliferation in patients with benign prostatic hyperplasia", *The Journal of Urology*, 161 (6), pp. 2002-2008.
4. Đỗ Thị Thanh Thủy, Diêm Thị Mến 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.
5. Keledjian Kaspar, Borkowski Andrew, et al. (2001), "Reduction of human prostate tumor vascularity by the α 1-adrenoceptor antagonist terazosin", *The Prostate*, 48 (2), pp. 71-78.
6. The British medicines commission (2017), *British Pharmacopoeia*, pp. 1021-1023.
7. The Korea Food and Drug Administration (2013), *Korean Pharmacopoeia X*, pp. 1140-1143.
8. The United States Pharmacopoeia Convention (2017), *USP 40*, Vol. 3, pp. 6364-6370.
9. Wilt T. J., Howe W., et al. (2002), "Terazosin for treating symptomatic benign prostatic obstruction: A systematic review of efficacy and adverse effects", *BJU International*, 89 (3), pp. 214-225.