

Tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạp B của olanzapin

Lê Thị Thu Cúc^{1*}, Thạch Giang², Trương Ngọc Tuyền³

¹Khoa Dược, Đại học Nguyễn Tất Thành

²Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP. Hồ Chí Minh

³Khoa Dược, Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Summary

Olanzapine related compound B (2-methyl-10H-thieno-[2,3-b][1,5]benzodiazepin-4[5H]-on) is synthesized by hydrolysis of olanzapine in acid medium. The synthesized products have been structurally determined by modern analytical techniques such as UV-Vis, IR, MS and NMR; Determination of the content by standard comparison HPLC method was conducted.

Keywords: Olanzapine amide, 2-methyl-10H-thieno-[2,3-b][1,5]benzodiazepine-4 [5H]-on, olanzapine related compound B.

Đặt vấn đề

Hiện nay, ngoài các thuốc chống loạn thần cổ điển như clopromazin, haldol (haloperidol), v.v đã xuất hiện các thuốc chống loạn thần thuộc thế hệ mới như risperidon, olanzapin,... cho thấy hiệu quả cao hơn và ít tác dụng phụ hơn nên đã góp phần làm bệnh nhân yên tâm điều trị lâu dài. Đa số các nhóm thuốc này được bệnh nhân sử dụng trong một thời gian dài, có thể là suốt đời. Điều này làm cho việc sản xuất thuốc phải được kiểm soát một cách chặt chẽ hàm lượng hoạt chất và tạp chất liên quan, do chỉ cần một sự thay đổi nhỏ hàm lượng hoạt chất chính hoặc có tạp chất phát sinh có thể sẽ thay đổi hiệu quả lâm sàng và đặc tính an toàn của thuốc, hoặc gây ra các tác dụng khác nhau với hậu quả không lường trước được. Hiện nay, Cục Quản lý Dược Việt Nam đã có yêu cầu phải kiểm tra tạp chất liên quan một cách chặt chẽ trong nguyên liệu và thành phẩm đăng ký cho sản xuất và lưu hành tại Việt Nam. Olanzapin là một thuốc thuộc nhóm thienobenzodiazepin được biết đến như một thuốc chống loạn thần không điển hình hay là thuốc chống loạn thần thế hệ thứ hai. Là thuốc được giới thiệu vào những năm 90 và được sử dụng rộng rãi hơn vì ít tác dụng phụ hơn. Olanzapin amid là

một trong các tạp của olanzapin xuất hiện trong quá trình bảo quản mà hiện nay trong các chuyên luận nguyên liệu và thành phẩm của Dược điển bắt buộc phải kiểm soát giới hạn^[1, 2, 5]. Tại Việt Nam, hiện chưa có công trình nghiên cứu tổng hợp olanzapin amid của olanzapin (tạp B) được công bố. Xuất phát từ những lý do trên, nghiên cứu này công bố quy trình tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạp B của olanzapin (olanzapin amid).

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Nguyên liệu olanzapin: Do Công ty Stada cung cấp, số lô JP 16110/UP1, hàm lượng 98,5%.

Chất đối chiếu: Olanzapin Related compound B (USP) - R055G0 - 100%.

Hóa chất và dung môi: Methanol (MeOH) và acetonitril (ACN), trifluoroacetic acid (TFA), natri dodecyl sulfat (SDS) đạt tiêu chuẩn dùng cho **HPLC**.

Dicloromethan (CH₂Cl₂), cloroform (CHCl₃), ammoniac, n-hexan, ethyl acetat, natri sulfat (Na₂SO₄), natri hydroxyd (NaOH) đạt tiêu chuẩn phân tích.

Thiết bị

Các thiết bị phân tích đã được hiệu chuẩn đạt quy định theo GLP và ISO/IEC 17025, bao gồm: Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Shimadzu UFLC LC 20A - PDA, LC/MS IT-TOF Shimadzu, máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Advance III, máy quang phổ hồng ngoại Thermo IS50FT-IR, máy phân tích TGA-DSC Setaram LABSYS evo, cân phân tích Mettler Toledo AE 240, tủ sấy chân

Chịu trách nhiệm: Lê Thị Thu Cúc

Email: thucuc_vkn@yahoo.com.vn

Ngày nhận: 08/12/2020

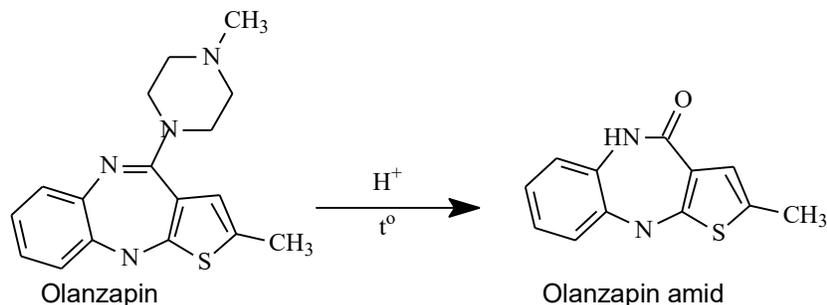
Ngày phản biện: 06/01/2021

Ngày duyệt bài: 25/01/2021

không,... và các dụng cụ thí nghiệm.

Phương pháp nghiên cứu

Tổng hợp tạp B của olanzapin amid



Sơ đồ 1. Tổng hợp tạp B của olanzapin (olanzapin amid)

Kiểm tra phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi khai triển là $CHCl_3$ - MeOH - NH_3 (90:10:1) (tt/tt/tt), phát hiện bằng UV 254 nm. Để nguội, trung hoà đến pH 7 bằng NaOH 2 N, làm lạnh, lọc lấy tủa, rửa tủa với 3 x 10 ml H_2O , sấy tủa thu được ở 70 °C trong 4 giờ.

Tinh chế: Sản phẩm được tinh chế bằng sắc ký cột.

Thử tinh khiết sơ bộ

- Nhiệt độ nóng chảy.

- Phương pháp sắc ký lớp mỏng: Tiến hành sắc ký lớp mỏng sản phẩm với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau để thu được 3 sắc ký đồ cho 3 vết có R_f khác nhau. Nếu chỉ có duy nhất một vết sắc ký trên cả 3 hệ dung môi thì sơ bộ kết luận sản phẩm tinh khiết trên sắc ký lớp mỏng.

Xác định cấu trúc

Xác định cấu trúc qua các phương pháp vật lý hiện đại sau: **UV-Vis, MS, IR, NMR.**

Xác định độ tinh khiết bằng HPLC-PDA

Độ tinh khiết của olanzapin amid: Được xác định bằng phương pháp **HPLC-PDA** quy về 100% diện tích pic. Quy trình được tham khảo từ chuyên luận "Viên nén Olanzapin" trong USP 41 [5].

Điều kiện sắc ký: Cột pha đảo C8 (250 x 4,6 mm, 5 μ m). Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút. Bước sóng phát hiện: UV 220 nm. Thể tích tiêm 20 μ l. Nhiệt độ cột: 35 °C. Pha động: dung dịch đệm A và acetonitril, sử dụng chương trình rửa giải gradient.

(Dung dịch đệm A: 3,3 ml H_3PO_4 trong 1000 ml H_2O . Chính về pH 2,5 bằng NaOH 50%. Thêm 8,7 g SDS vào dung dịch đệm đã chỉnh pH trên).

Phản ứng tổng hợp olanzapin amid là phản ứng thủy phân olanzapin trong môi trường acid "HA" - HCl (sơ đồ 1)

Chương trình rửa giải gradient

Thời gian (phút)	Đệm A (% tt/tt)	ACN (% tt/tt)
0	52	48
10	52	48
20	30	70
25	30	70
27	52	48
35	52	48

Dung môi pha mẫu: ACN - 37 mg EDTA/đệm A (40: 60).

Mẫu thử: 0,15 mg/ml trong dung môi pha mẫu.

(Chú ý: mẫu thử ổn định trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng, 48 giờ nếu ở tủ đông).

Kết quả và bàn luận

Tổng hợp tạp B của olanzapin (olanzapin amid)

Cân một lượng olanzapin (2,0 g; 6,4 mmol) cho vào bình cầu, thêm HCl 2 N (30 ml), lắc đều để hoà tan olanzapin. Tiến hành đun hồi lưu cho đến khi phản ứng xảy ra hoàn toàn (8 - 10 giờ). Kiểm tra phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi khai triển là $CHCl_3$ - MeOH - NH_3 (90:10:1) (tt/tt/tt), phát hiện bằng UV 254 nm, để nguội, trung hoà đến pH 7 bằng NaOH 2 N, làm lạnh, lọc lấy tủa, rửa tủa với 3 x 10 ml H_2O , sấy tủa thu được ở 70 °C trong 4 giờ.

Tinh chế sản phẩm

Sản phẩm sau tổng hợp được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh, với hệ dung môi rửa giải là *n*-hexan - ethyl acetat (85 : 15 tăng dần đến 80 : 20). Các phân đoạn được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng, hệ dung môi khai triển

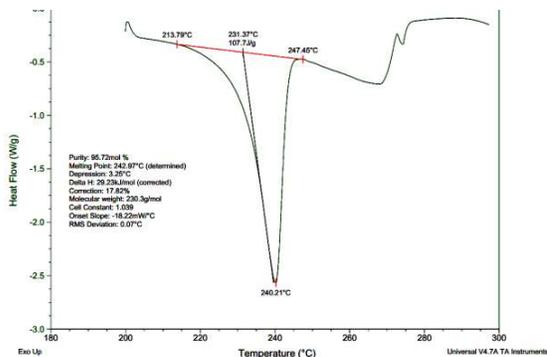
CHCl₃ - MeOH - NH₃ (90:10:1) (tt/tt/tt), phát hiện vết bằng UV 254 nm.

Các phân đoạn chứa olanzapin amid được cô đặc bằng cô quay chân không.

Thử tinh khiết

Nhiệt độ nóng chảy

Sử dụng phương pháp phân tích nhiệt vi sai (DSC) cho thấy: nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm tạp B là 231,4 °C và độ tinh khiết là 95,72% (hình 1).



Hình 1. Biểu đồ phân tích DSC của tạp B

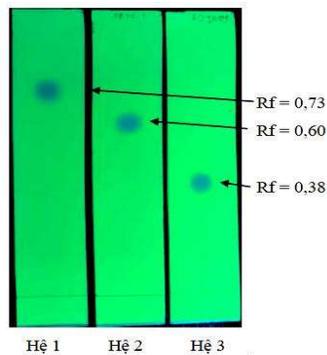
Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Kết quả cho thấy sản phẩm tinh chế tạp B cho 1 vết duy nhất, cho thấy sản phẩm tạp B của olanzapin tinh khiết trên sắc ký lớp mỏng (hình 2).

Hệ 1: MeOH - NH₃ (99:1) (tt/tt).

Hệ 2: CHCl₃ - MeOH - NH₃ (90:10:1) (tt/tt/tt).

Hệ 3: *n*-hexan - ethyl acetat- NH₃ (60:40:1) (tt/tt/tt).

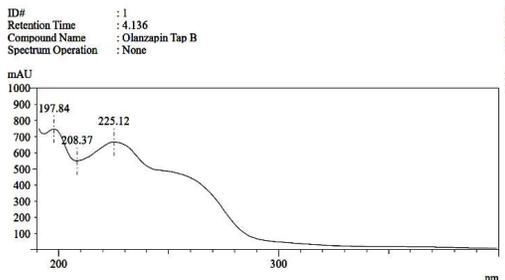


Hình 2. Sắc ký đồ kiểm tra độ tinh khiết tạp B

Xác định cấu trúc

Phổ UV-Vis

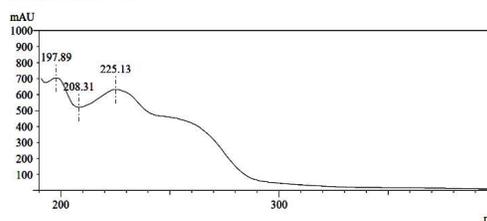
Phổ hấp thụ UV-Vis của sản phẩm tạp B



Hình 3. Phổ UV-Vis của chuẩn tạp B

olanzapin (olanzapin amid) có đỉnh hấp thụ cực đại tại 225,13 nm, đỉnh này phù hợp với dữ liệu của phổ chuẩn tạp B olanzapin.

ID# : 1
Retention Time : 4,128
Compound Name : Olanzapin Tap B
Spectrum Operation : None



Hình 4. Phổ UV-Vis của sản phẩm tổng hợp

Phổ IR

Phổ IR của sản phẩm tạp B có các đỉnh đặc trưng phù hợp với công thức cấu tạo của olanzapin amid (tạp B của olanzapin): 1632 cm⁻¹ (C=O), 3030 cm⁻¹ (=C-H vòng thơm), 3279 cm⁻¹ (N-H).

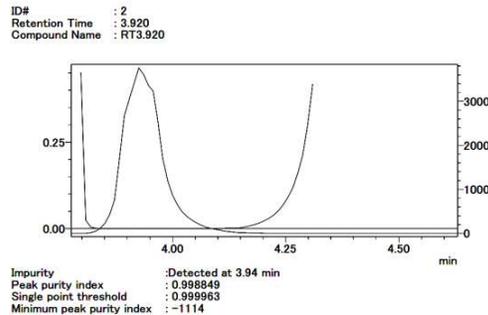
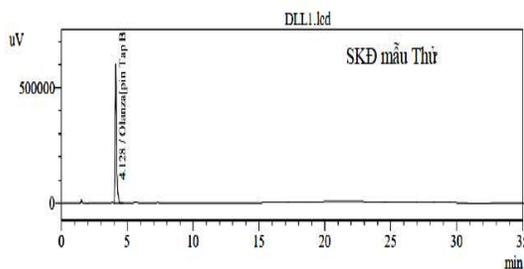
Phổ MS

Khối phổ ESI-MS (+) của sản phẩm tạp B có m/z = 231,0531 [M+H]⁺, Phổ ESI-MS (-) có

m/z = 229,0420 [M-H]⁻, Phù hợp với công thức phân tử của olanzapin amid (tạp B của olanzapin) (C₁₂H₁₀N₂OS, M = 230,0514) [3].

Phổ NMR

Phân tích dữ liệu phổ NMR cho thấy số lượng và vị trí của proton và carbon của sản phẩm tạp B phù hợp với công thức cấu tạo của olanzapin amid (2-methyl-10H-thieno-[2,3-b][1,5] benzodiazepin-4[5H]-on) [3].



Hình 7. SKĐ tính đặc hiệu (mẫu trắng, mẫu chuẩn tạp B của olanzapin, mẫu thử tạp B tổng hợp và biểu đồ độ tinh khiết của pic tạp B)

Nhận xét: Trên sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic tạp B. Pic tạp B có độ tinh khiết 99,99%. Kết quả thẩm định cho thấy quy trình đạt tính phù hợp hệ thống, độ chính xác cao, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ và diện tích pic. Kết quả thẩm định được trình bày trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả thẩm định phương pháp

Tính phù hợp hệ thống	Thời gian lưu (phút)	Trung bình	4,12
		RSD (%)	0,28
Tính tuyến tính	Diện tích pic	Trung bình	4582815
		RSD (%)	0,17
Độ chính xác	25 – 75 (µg/ml)	PT hồi quy	$\hat{y} = 90509x$
		Hệ số r	0,9999
Độ chính xác	Độ lặp lại (n = 6)	Trung bình (%)	95,4
		RSD (%)	0,14
	Độ chính xác trung gian (n = 12)	Trung bình (%)	95,6
		RSD (%)	0,21

Độ tinh khiết sản phẩm tạp B của olanzapin tổng hợp được xác định là 95,6% đủ tiêu chuẩn để thiết lập chất đối chiếu.

Bàn luận

Trong cấu trúc olanzapin có chứa liên kết enamin đặc thù (C4) dễ bị phân hủy trong môi trường acid HA tạo hợp chất ceton hay tạp B olanzapin. Tuy nhiên trong quá trình thực nghiệm, nồng độ HA, nhiệt độ ảnh hưởng nhiều đến quá trình phân hủy.

Với nồng độ HCl lớn hơn 2 N tỷ lệ tạp B sinh ra thấp đồng thời các tạp khác phát sinh nhiều hơn. Có thể là ở nồng độ cao của acid HA, các liên kết amid khác bị ảnh hưởng dẫn đến phân hủy thành các tạp khác. Tăng nhiệt độ

giúp đẩy nhanh quá trình phân hủy olanzapin thành tạp B, do đó phản ứng được thực hiện trong điều kiện đun hồi lưu.

Ngoài ra trong quá trình tổng hợp tạp B thêm MeOH sẽ làm tăng hiệu suất phản ứng vì tạp B sinh ra sẽ tạo liên kết H với MeOH bền hơn trong môi trường acid. Tạp B sinh ra được tinh chế bằng sắc ký cột nhanh, thu được sản phẩm có độ tinh khiết tương đối cao: trên 98%.

Quy trình **HPLC** xác định độ tinh khiết đã được thẩm định và kết quả cho thấy sản phẩm tạp B của olanzapin có đủ điều kiện đưa vào thiết lập chất đối chiếu để sử dụng trong việc kiểm tra tạp của nguyên liệu olanzapin và các chế phẩm chứa olanzapin.

Kết luận

Tạp B của olanzapin đã được tổng hợp thành công với hiệu suất cao (98%). Sản phẩm được chứng minh cấu trúc bằng các phương pháp phổ **UV-vis**, **IR**, **MS**, **NMR**. Độ tinh khiết của sản phẩm đạt được 95,6%, đủ điều kiện đưa vào thiết lập chất đối chiếu.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, PL-2.5, NXB Y học, Hà Nội, tr. 445 - 448
2. Commission B. P. (2017), "Olanzapine", *British Pharmacopoeia 2018*.
3. Djordjević Filijović N., Antonijević M. D., Pavlović A. *et al.* (2015), "The stress stability of olanzapine: Studies of interactions with excipients in solid state pharmaceutical formulations", *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 41 (3), pp. 502-514.
4. ICH Harmonized tripartite guideline (2005), Validation of analytical procedures: Text and methodology, pp. 1-13.
5. *United States Pharmacopeia 41* (2018), pp. 3002 - 3005.