

ĐIỀU CHẾ HỢP CHẤT ETHYL (2S)-2-[(3S,8aS)-3-METHYL -1,4-DIOXOCTAHYDROPYRROLO[1,2- a]PYRAZIN -2-YL]-4-PHENYLBUTANOAT (TẠP D CỦA ENALAPRIL MALEAT THEO USP 2025)

Nguyễn Ái Vy¹, Phạm Lê Ngọc Yến¹,

Lê Nguyễn Trung Nguyên², Nguyễn Đức Tuấn^{1*}

¹Trường Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

²Viện Kiểm nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Trong nghiên cứu này, enalapril diketopiperazin (tạp chất liên quan D của enalapril maleat theo USP 2025) đã được tổng hợp thành công từ enalapril maleat trong môi trường acid acetic băng và dung môi dicloromethan với hiệu suất 78%. Bằng phương pháp HPLC-PDA, độ tinh khiết sắc ký của sản phẩm tổng hợp được xác định trên 99% tính theo nguyên trạng, đáp ứng đầy đủ tiêu chuẩn để thiết lập chất đối chiếu trong kiểm tra tạp chất của enalapril maleat.

Từ khóa: Tạp D của enalapril maleat; enalapril diketopiperazin.

PREPARATION OF ETHYL (2S)-2-[(3S,8aS)-3-METHYL -1,4 DIOXOCTAHYDROPYRROLO [1,2- a]PYRAZIN-2-YL]-4-PHENYLBUTANOATE (ENALAPRIL MALEATE RELATED COMPOUND D AS PER USP 2025)

SUMMARY

In this study, enalapril diketopiperazine (enalapril maleate related compound D as per USP 2025) was successfully synthesized from enalapril maleate, glacial acid acetic, dichloromethane with the yield of 78%. By using HPLC-PDA, its chromatographic purity was determined to be over 99% on the basis, conforming fully to establish reference substance for enalapril maleate impurities testing.

Keywords: Enalapril maleate related compound D; enalapril diketopiperazine.

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Đức Tuấn

Email: ductuan@ump.edu.vn

Ngày nhận: 18/8/2025

Ngày phản biện: 24/10/2025

Ngày duyệt bài: 24/11/2025

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Enalapril maleat là một thuốc thuộc nhóm thuốc ức chế men chuyển angiotensin (ACE-I), được sử dụng trong điều trị bệnh lý tim mạch [1]. Enalapril maleat đã được báo cáo là tạp chất phân hủy có khả năng xuất hiện cao trong thành phẩm thuốc [2-5] với độc tính được cảnh báo là có nguy cơ gây hại đến

khả năng sinh sản hoặc thai nhi [6 - 7]. Chiếu theo quy định của Dược điển Việt Nam V (ĐĐVN) và các dược điển tham chiếu hiện hành, tạp chất liên quan D là tạp bắt buộc phải kiểm soát trong nguyên liệu và thành phẩm chứa enalapril maleat [8 - 11]. Hiện tại, hệ thống kiểm nghiệm thuốc quốc gia chưa cung cấp tạp chuẩn này. Trên thế giới và tại Việt

Nam đã công bố về tổng hợp tạp D bằng phản ứng nhiệt phân với hiệu suất trung bình [12-14]. Vì vậy, đề tài được đặt ra với mục tiêu cải thiện hiệu suất tổng hợp tạp D của enalapril maleat với độ tinh khiết sắc ký tối thiểu 98,0% và xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết tạp D của enalapril maleat bằng kỹ thuật HPLC-PDA, góp phần làm cơ sở cho công tác thiết lập chất đối chiếu.

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu enalapril maleat do Công ty Zhejiang Huahai Pharmaceutical Co.,Ltd. (Trung Quốc) sản xuất.

2.2. Hóa chất và dung môi

Aceton, acid acetic băng, acid citric, acid formic, acid hydrochloric, acid maleic, acid orthophosphoric, acid sulfuric, cloroform, dinatri hydrophosphat, dicloromethan, ethyl acetat, natri hydroxyd, natri sulfat khan, *n*-hexan, methanol, tetrahydrofuran và triethylamin đạt tiêu chuẩn phân tích. Nước tinh khiết, methanol và acetonitril đạt tiêu chuẩn sắc ký lỏng.

2.3. Dụng cụ và thiết bị

Buồng soi UV Spectroline CM-10A, cột sắc ký InertSustain® C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm), máy cô quay chân không RV06 - ML, máy NMR Bruker Advance II, máy đo nhiệt độ nóng chảy Stuart SMP-10, máy khuấy từ gia nhiệt C-Mag HS-7, máy quang phổ hồng ngoại Shimadzu IRAffinity - 1S, máy quang phổ UV-Vis PerkinElmer Lamda 365, máy siêu âm Elma S300H, máy phân tích nhiệt quét vi sai TA Instruments Q20, máy 2 phân tích khối phổ độ phân giải cao Agilent 6200 Series TOF và 6500 Series Q-TOF B.06.01,

tủ sấy Memmert WM500CO và các thiết bị phân tích khác.

2.4. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị dung dịch đối chiếu

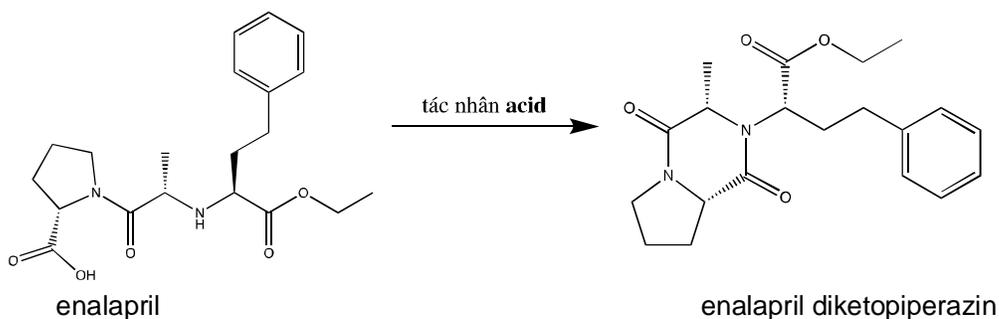
Cân 20 mg enalapril maleat, đun đến khi mẫu có màu vàng, sau đó để nguội, thêm 50 mL acetonitril. Lắc, siêu âm để hòa tan. Vết tạp D trong dung dịch này được xác định là vết tạp duy nhất còn lại, phân biệt với vết nguyên liệu enalapril maleat [8,11].

Tổng hợp và tinh chế tạp D

Dựa theo kết quả nghiên cứu độ ổn định của enalapril maleat dưới các điều kiện khắc nghiệt [2-5], và cơ chế phản ứng đóng vòng nội phân tử thông qua liên kết amid, nghiên cứu tổng hợp tạp D bằng cách phân hủy enalapril maleat trong môi trường pH thấp (hình 1). Theo dõi tiến trình phản ứng bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng, sử dụng dung dịch đối chiếu để xác định sự hình thành tạp D. Sản phẩm sau phản ứng được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại.

Thử tinh khiết sản phẩm tinh chế

Sản phẩm tinh chế được thử tinh khiết bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng, sử dụng bản mỏng silica gel F254 với ba hệ dung môi có độ phân cực khác nhau, hệ dung môi 1: *n*-hexan - aceton - dung dịch amoniac 23% (7:3:0,6), hệ dung môi 2: tetrahydrofuran - ethyl acetat - dung dịch amoniac 23% (4:7:0,3), hệ dung môi 3: DCM - methanol - dung dịch amoniac 23% (9:1:0,2); nhiệt độ nóng chảy xác định bằng thiết bị đo điểm chảy và kỹ thuật phân tích nhiệt quét vi sai (DSC); và phương pháp HPLC-PDA với hai hệ pha động khác nhau, được trình bày ở bảng 1.



Hình 1. Sơ đồ phản ứng tổng hợp tạp D của enalapril maleat

Bảng 1. Hệ pha động thử tinh khiết bằng phương pháp HPLC-PDA

Thời gian (phút)	Pha động 1		Pha động 2	
	Methanol (%)	Dung dịch acid phosphoric 0,05% (%)	Acetonitril (%)	Dung dịch acid phosphoric 0,05% (%)
0	5	95	5	95
60	95	5	95	5

Xác định cấu trúc

Sản phẩm tinh chế sẽ được đo phổ UV để xác định các cực đại hấp thụ, đo phổ IR để xác định sự có mặt các đỉnh đặc trưng của các nhóm chức, đo phổ MS để xác định khối lượng phân tử và các mảnh phân tử tương ứng với cấu trúc dự kiến của sản phẩm và đo phổ NMR để xác định cấu trúc.

Xác định hiệu suất của quy trình tổng hợp và tinh chế

Thực hiện lặp lại 3 lần quy trình tổng hợp và tinh chế, xác định hiệu suất trung bình của toàn quy trình.

Xác định độ tinh khiết của tạp D bằng HPLC-PDA

Độ tinh khiết của tạp D được xác định bằng phương pháp HPLC-PDA quy về 100% diện tích pic với điều kiện sắc ký như sau: cột C18 (250 x 4,6 mm; 5 µm), pha động 2, tốc độ dòng 1,0 mL/phút, đầu dò PDA với bước sóng phát hiện 212 nm, thể tích tiêm mẫu 10 µL, nhiệt độ cột: phòng thí nghiệm, mẫu thử có nồng độ khoảng 500 µg/mL pha trong dung dịch acetonitril - nước (50:50, tt/tt).

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tổng hợp tạp D

Kết quả phân tích sắc ký lớp mỏng của sản phẩm sau phản ứng với các tác nhân khảo sát như dung dịch acid hydrocloric 1 N, acid orthorhosphoric đậm đặc, acid acetic băng và acid formic đậm đặc cho thấy trên sắc ký đồ có vết sản phẩm với hình dạng, màu sắc và hệ số lưu giữ tương đương với vết đối chiếu trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu. Tuy nhiên, trong quá trình khảo sát gặp một số khó khăn như: thời gian phản ứng dài; nguyên liệu enalapril maleat không phân hủy hoàn toàn; tạp D có thể tiếp tục bị phân hủy tạo sản phẩm phụ. Vì vậy, nghiên cứu chuyển dạng enalapril maleat thành enalapril base trước khi phản ứng với tác nhân acid nhằm mục đích khắc phục các khó khăn nêu trên.

Từ kết quả thực nghiệm, quy trình tổng hợp tạp D được đề xuất như sau:

- Giai đoạn 1 - Chuyển dạng enalapril base từ enalapril maleat: Hòa tan hoàn toàn 0,8 g enalapril maleat vào 20 mL dung dịch đệm citro - phosphat pH 4,2 ± 0,05. Tiến hành chiết 3 lần ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, mỗi lần với 40 mL dung môi dicloromethan. Toàn bộ dịch chiết hữu cơ được làm khan bằng Na₂SO₄ khan. Cô quay loại dung môi đến khi thu được khoảng 10 mL dung dịch.

- Giai đoạn 2 - Tổng hợp tạp D từ enalapril base: Thêm nhanh 20 mL acid acetic băng vào 10 mL dung dịch trên. Đun hồi lưu cách thủy ở nhiệt độ khoảng 50 - 55°C trong 3 giờ, có kết hợp khuấy từ. Hỗn hợp sau phản ứng được chiết phân bố 3 lần với dung dịch triethylamin 0,5% lạnh, mỗi lần 100 mL. Lọc dung môi hữu cơ sau chiết được rửa nhiều lần với khoảng 150 mL nước lạnh và làm khan bằng Na₂SO₄ khan. Cô quay loại hoàn toàn dung môi, thu được sản phẩm thô là chất rắn vô định hình, có màu trắng hơi ngà.

3.2. Tinh chế sản phẩm tổng hợp

Hòa tan sản phẩm thô thu được trong một thể tích tối thiểu dung môi ở nhiệt độ phòng. Lọc qua giấy lọc thu dịch trong, làm lạnh đến -20°C trong 3 giờ. Kết tinh trong hệ dung môi n-hexan - acetone (8:2), thu được có dạng tinh thể hình kim, màu trắng, rửa với khoảng 50 mL nước lạnh (0 - 5°C), sấy chân không ở 55°C đến khối lượng không đổi. Hiệu suất kết tinh cao (khoảng 84%).

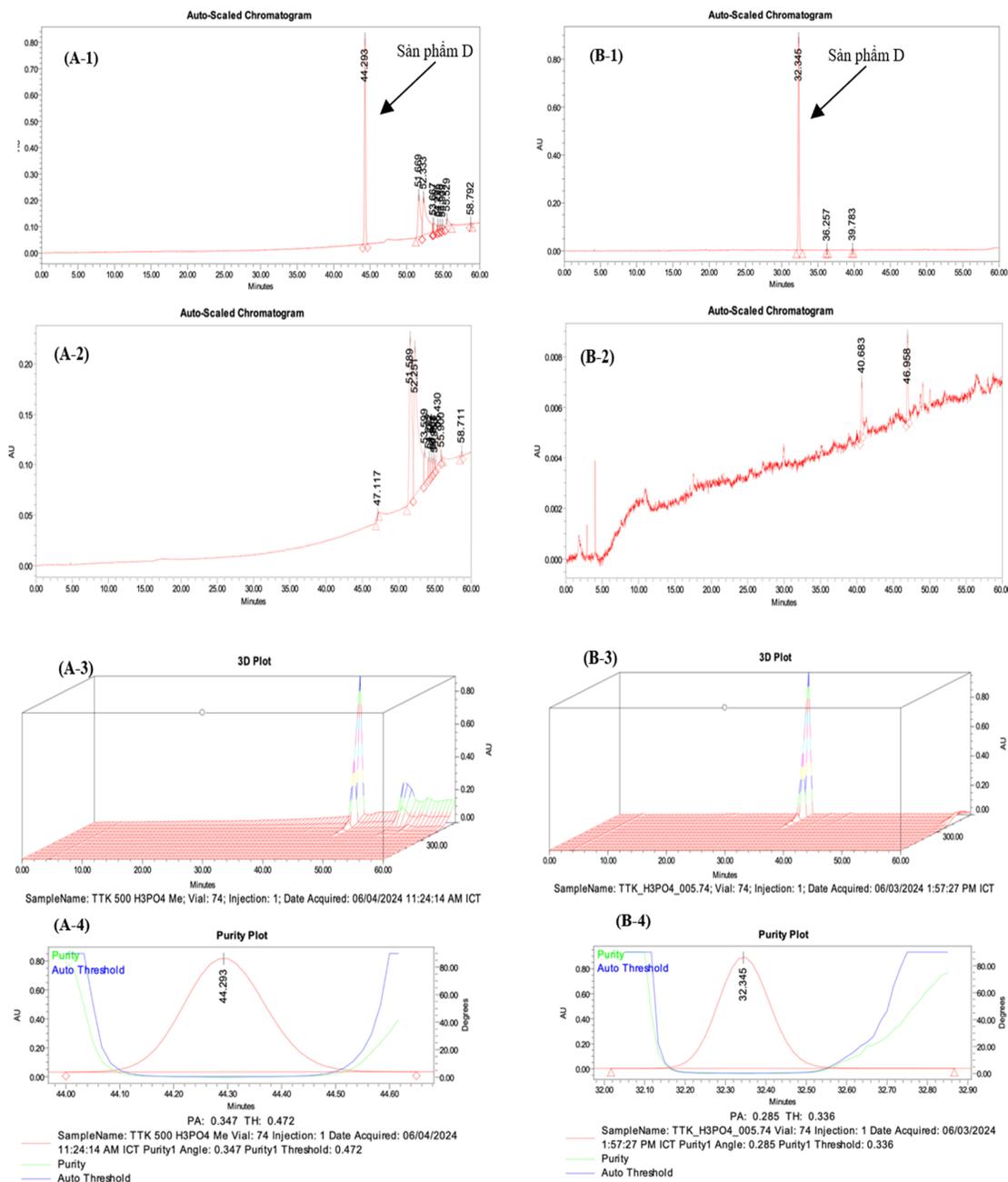
3.3. Thử tinh khiết sản phẩm tinh chế

Kết quả thử tinh khiết sản phẩm tinh chế bằng sắc ký lớp mỏng với ba hệ dung môi có độ phân cực khác nhau đều cho 01 vết chính duy nhất, gọn trên sắc ký đồ. Nhiệt độ nóng chảy của sản phẩm tinh chế khoảng 94 - 96°C và phù hợp với tài liệu tham khảo [6,15].

Ứng dụng phương pháp HPLC-PDA với

hai hệ pha động phương pháp quy về 100% diện tích pic, Kết quả sắc ký đồ tại bước sóng 212 nm và sắc ký 3 chiều (sắc ký đồ tại tất cả bước sóng trong vùng UV từ 200 đến 400 nm)

cho 01 pic chính duy nhất và pic này tinh khiết theo phổ UV-Vis. Kết quả thử tinh khiết sản phẩm tinh chế với hai hệ pha động được trình bày ở hình 2.



Hình 2. Kết quả thử tinh khiết sản phẩm tinh chế

A: Pha động 1 (A-1: sắc ký đồ 2 chiều mẫu thử; A-2: sắc ký đồ 2 chiều mẫu trắng; A-3: sắc ký đồ 3 chiều; A-4: Tinh khiết pic theo phổ UV-Vis)
 B: Pha động 2 (B-1: sắc ký đồ 2 chiều mẫu thử; B-2: sắc ký đồ 2 chiều mẫu trắng; B-3: sắc ký đồ 3 chiều; B-4: Tinh khiết pic theo phổ UV-Vis)

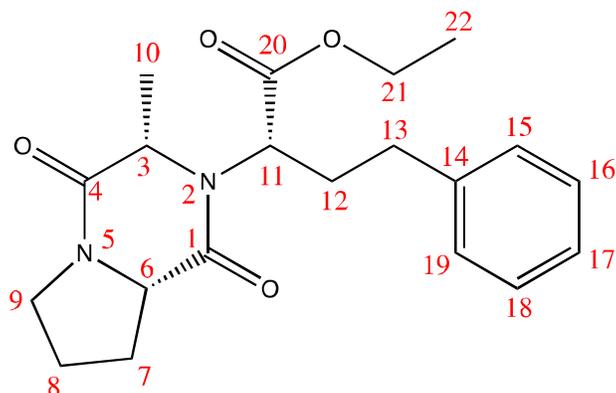
3.4. Xác định cấu trúc sản phẩm tinh chế

Phổ UV của sản phẩm tinh chế có một cực đại hấp thụ ở khoảng 211,85 nm, thuộc vùng UV C xa và thuộc dải hấp thụ E2, phù hợp với cấu trúc có nhân benzen; và một cực đại hấp thụ ở khoảng 261,20 nm thuộc dải hấp thụ B, phù hợp với sự dịch chuyển $\pi \rightarrow \pi^*$ trong cấu trúc nhân thơm. Phổ IR của sản phẩm tinh chế có một số đỉnh đặc trưng tại 2980,02 cm^{-1} (-CH); 1737,86 cm^{-1} (-C=O); 1658,74 cm^{-1} (-C=O); 1602,85 cm^{-1} (-C=C-); 1249,87 cm^{-1} (-C-N-), 1215,15 cm^{-1} (-C=O). Phổ MS-ESI(+) của sản phẩm tinh chế có tín

hiệu [M+H]⁺ với m/z = 359,19821 phù hợp với khối lượng lý thuyết tính theo IUPAC của tạp D ($\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4 = 358,189270 \text{ g/mol}$). Phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của sản phẩm tinh chế đo trong dung môi DMSO-d₆. Kết quả được thể hiện trong bảng 2. Phân tích dữ liệu phổ NMR cho thấy số lượng và vị trí proton và carbon của sản phẩm tinh chế phù hợp với công thức cấu tạo ethyl (2S)-2-[(3S,8aS)-3-methyl-1,4-dioxooctahydropyrrolo [1,2- a]pyrazin-2-yl]-4-phenylbutanoat (tạp D của enalapril maleat). Các dữ liệu phổ UV, IR và MS cũng tương đồng và phù hợp với cấu trúc tạp D. Hình 3 minh họa cấu trúc của tạp D.

Bảng 2. Dữ liệu phổ NMR của sản phẩm tinh chế

Vị trí	Nguyên tử	¹³ C-NMR (150 MHz, DMSO)	¹ H-NMR (600 MHz, DMSO)	
		δ_c (ppm)	δ_H (ppm)	Số H, hình dạng đỉnh
1	>C=O	165,32	-	-
3	-CH-	55,93	4,225 – 4,290	1H, q
4	>C=O	167,99	-	-
6	-CH-	55,93	4,139 – 4,203	1H, m
7	-CH ₂ -	27,79	2,120 – 2,200; 1,834 – 1,904	2H, m
8	-CH ₂ -	22,20	1,793 – 1,825	2H, m
9	-CH ₂ -	44,86	3,293 – 3,333; 3,456 – 3,500	2H, m
10	-CH ₃	15,01	1,284 – 1,295	3H, d
11	-CH-	57,83	4,139 – 4,162	1H, m
12	-CH ₂ -	29,99	2,238 – 2,331; 2,127 – 2,234	2H, m
13	-CH ₂ -	31,76	2,592 – 2,642; 2,670 – 2,709	2H, m
14	CIV	141,31		
15,19	-CH-	128,30	7,273 – 7,298	2H, m
16,18	-CH-	128,12	7,183 – 7,209	2H, m
17	-CH-	125,84	7,170 – 7,172	1H, m
20	>C=O	169,95		
21	-CH ₂ -	60,28	3,957 – 4,011 4,058 – 4,110	2H, m
22	-CH ₃	13,88	1,093 – 1,116	3H, t



Hình 3. Công thức cấu tạo tạp D của enalapril maleat

3.5. Xác định hiệu suất của quy trình tổng hợp và tinh chế

Kết quả tóm tắt hiệu suất phản ứng được thể hiện trong bảng 3.

Bảng 3. Hiệu suất của quy trình tổng hợp và tinh chế tạp D enalapril maleat

Thí nghiệm	Khối lượng nguyên liệu enalapril maleat (g)	Khối lượng tạp D lý thuyết (g)	Khối lượng tạp D thực tế (g)	Hiệu suất toàn quy trình (%)	Hiệu suất trung bình (%)
1	0,8038	0,5826	0,4622	79,33	78,57
2	0,8102	0,5872	0,4541	77,33	
3	0,8057	0,5840	0,4617	79,06	

3.6. Quy trình xác định độ tinh khiết tạp D

Quy trình xác định độ tinh khiết tạp D được xây dựng dựa trên điều kiện sắc ký với chương trình rửa giải gradient pha động 2, thời gian phân tích là 20 phút, trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Chương trình rửa giải gradient với pha động 2 (acetonitril và dung dịch H₃PO₄ 0,05%)

Thời gian (phút)	Acetonitril (%)	Dung dịch H ₃ PO ₄ 0,05% (%)
0	25	75
5	45	55
12,5	70	30
15	85	15
15,1	25	75
20	25	75

Quy trình được thẩm định theo hướng dẫn của ICH, gồm: khảo sát tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, độ tuyến tính, độ chính xác [16]. Kết quả tóm tắt ở bảng 5, hình 4, bảng 6.

Bảng 5. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống (n = 6)

	Thời gian lưu (t _R) (phút)	Diện tích pic (μV x giây)	Hệ số kéo đuôi
TB	11,681	7997032	1,08
RSD (%)	1,65	0,56	-

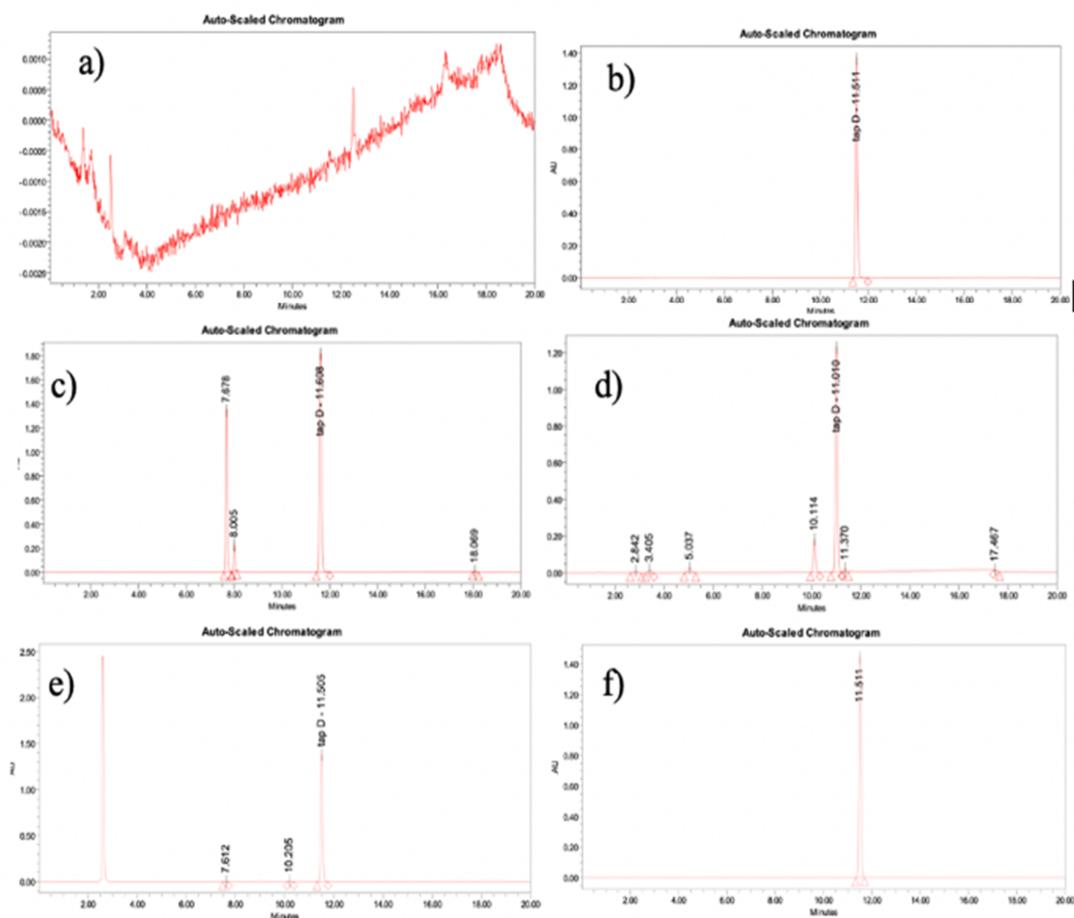
Giá trị RSD của thời gian lưu và diện tích pic đều nhỏ hơn 2,0% và hệ số kéo đuôi của pic tạp D nằm trong khoảng 0,8 – 1,5. Như vậy, quy trình xác định độ tinh khiết của tạp D đạt tính phù hợp của hệ thống.

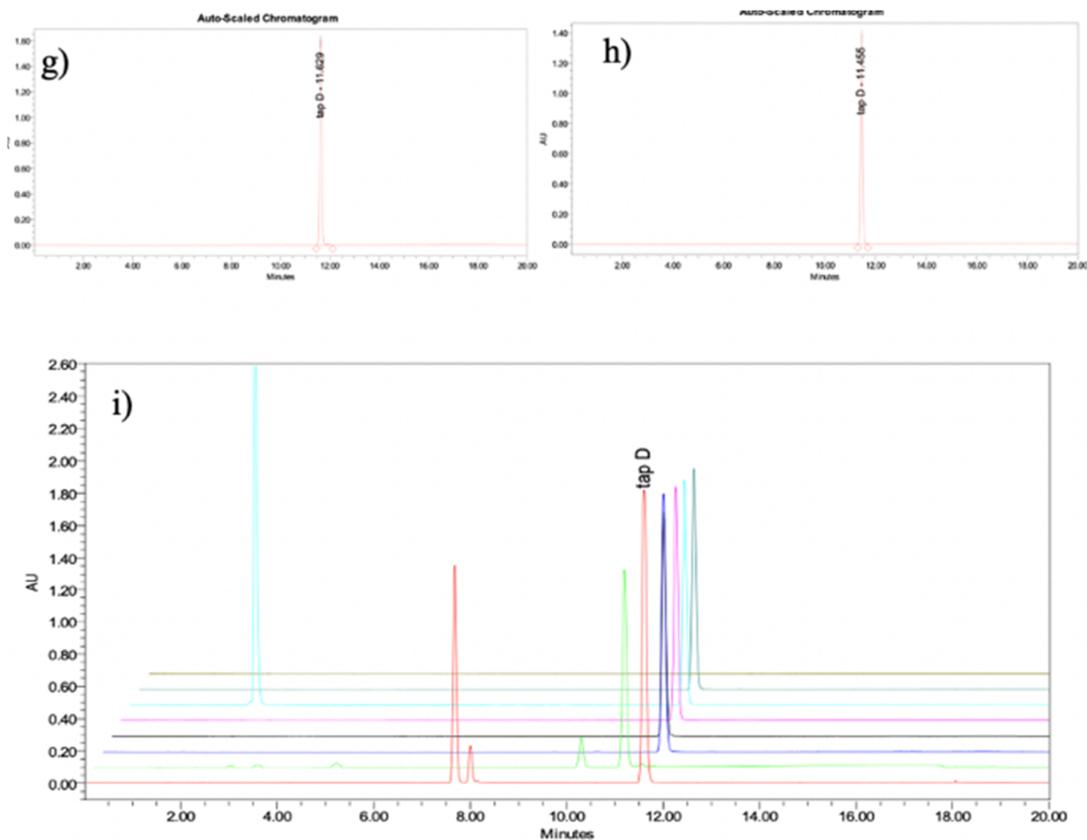
Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương đương với thời gian lưu của pic tạp D trong sắc ký đồ mẫu thử. Sắc ký đồ các mẫu phân hủy có xuất hiện các pic phân hủy và các pic này đều tách hoàn toàn với pic tạp D. Pic tạp D trong sắc ký đồ của các mẫu thử, mẫu phân hủy đều tinh khiết theo phổ UV-Vis. Như vậy quy trình xác định

độ tinh khiết tạp D đạt tính đặc hiệu.

Kết quả phân tích tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác được trình bày ở bảng 6.

Giá trị RSD của độ tinh khiết sắc ký tạp D được xác định từ 6 mẫu trong 1 ngày và 12 mẫu trong 2 ngày đều nhỏ hơn 2,0% và không khác nhau giữa 2 ngày. Vậy quy trình xác định độ tinh khiết tạp D đạt độ chính xác. Các kết quả thẩm định đã chứng minh quy trình xác định độ tinh khiết tạp D bằng phương pháp HPLC-PDA có tính đặc hiệu, độ chính xác cao và khoảng tuyến tính rộng. Độ tinh khiết sắc ký của tạp D theo phương pháp phần trăm diện tích pic là trên 99%.





Hình 4. Sắc ký đồ mẫu trắng, mẫu thử và các mẫu phân hủy khảo sát độ đặc hiệu với chương trình gradient rút gọn 20 phút

Chú thích:

- a) Sắc ký đồ mẫu trắng;
- b) Sắc ký đồ mẫu thử;
- c) Sắc ký đồ mẫu phân hủy base được thêm tạp D;
- d) Sắc ký đồ mẫu phân hủy acid;
- e) Sắc ký đồ mẫu phân hủy oxy hóa;
- f) Sắc ký đồ mẫu phân hủy nhiệt;
- g) Sắc ký đồ mẫu phân hủy âm;
- h) Sắc ký đồ mẫu phân hủy ánh sáng;
- i) Sắc ký đồ mẫu trắng, mẫu thử và các mẫu phân hủy.

Bảng 6. Phân tích tính tuyến tính, độ lặp lại, độ chính xác quy trình xác định độ tinh khiết tạp D

Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 15987x.$
Khoảng nồng độ tuyến tính	50 - 600 $\mu\text{g/mL}$
Hệ số tương quan	0,9992
Độ lặp lại (RSD, n = 6)	0,00%
Độ chính xác trung gian (RSD, n = 12)	0,00%
Độ tinh khiết sắc ký*	100,0%

*Được xác định từ kết quả độ chính xác.

4. BÀN LUẬN

4.1. Tổng hợp tạp D

Dựa vào cấu trúc nguyên liệu và tạp chất mục tiêu và nguồn gốc phát sinh của tạp D [2 - 5], nghiên cứu đã tiến hành tổng hợp tạp D bằng cách thủy phân enalapril maleat trong môi trường pH thấp hướng mục tiêu cải thiện hiệu suất tổng hợp và hạn chế sinh ra các sản phẩm phụ, đây là những vấn đề thường gặp ở phản ứng nhiệt phân do nhiệt độ kiểm soát thật sự cao hơn so với nhiệt độ cần cho phản ứng. Nghiên cứu khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng thủy phân như loại và lượng tác nhân acid, nhiệt độ và thời gian thủy phân. Tuy nhiên, khi thực hiện thủy phân trực tiếp từ enalapril maleat cho kết quả thủy phân không hoàn toàn, thời gian phản ứng rất dài và việc theo dõi tiến độ phản ứng trong môi trường nước khá khó khăn. Mặt khác, sự cản trở về mặt không gian của cấu trúc phân tử cũng là một yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả đóng vòng [17]. Vì vậy, nghiên cứu chuyển dạng enalapril maleat thành enalapril base trước khi thực hiện phản ứng thủy phân.

Đề tài tiến hành lựa chọn dung dịch đệm có pH phù hợp tạo điều kiện cho việc thay đổi dạng tồn tại trong dung dịch của enalapril maleat, sau đó sử dụng dung môi thích hợp chiết lấy enalapril base. Giá trị pI của enalapril được tính toán như sau: $pI = (pKa1 + pKa2) : 2 = (3,0 + 5,4) : 2 = 4,2$.

Vì vậy, pH dung dịch đệm mục tiêu là $4,2 \pm 0,05$. Ngoài ra, dựa trên nguồn gốc xuất hiện của tạp D và tạp C của enalapril maleat khi thay đổi pH môi trường [2 - 5], nghiên cứu ưu tiên lựa chọn dung dịch đệm sử dụng acid hữu cơ làm chất điều chỉnh pH bởi sự có mặt của bất kỳ acid hoặc base vô cơ sẽ làm giảm hiệu suất chuyển dạng do phát sinh sản phẩm phụ. Từ 2 tiêu chí trên, nghiên cứu lựa chọn dung dịch đệm là đệm citro - phosphat pH 4,2.

Enalapril base tan tốt trong dung môi hữu

cơ, nghiên cứu tiến hành khảo sát với 3 dung môi chiết: cloroform (CF), dicloromethan (DCM), ethyl acetat (EA) ở nhiệt độ phòng. Dung môi thích hợp được lựa chọn dựa trên 2 tiêu chí: hiệu suất chiết và tính chọn lọc. Kết quả cho thấy dung môi DCM cho hiệu suất chiết cao (trên 95%), các dung môi còn lại cho hiệu suất chiết không quá cao (khoảng 54% và 62% với EA và CF) và đều có sự hiện diện của acid maleic trong dịch chiết.

Nghiên cứu tiếp tục khảo sát tác nhân acid thích hợp để thủy phân hoàn toàn enalapril base đồng thời hạn chế tối đa phát sinh sản phẩm phụ. Kết quả khảo sát với các tác nhân acid như acid hydrochloric 1 N, acid sulfuric đậm đặc cho thấy nguyên liệu enalapril base chưa phản ứng hết, có sự xuất hiện của vết tạp lạ (khác với Rf của vết đối chiếu tạp D). Với acid acetic băng, kết quả SKLM cho thấy nguyên liệu enalapril base được thủy phân hoàn toàn, chỉ xuất hiện một vết duy nhất (ngoại trừ vết acid ngay tại vị trí chấm mẫu), vết đậm và giá trị Rf tương đương với vết đối chiếu tạp D. Đồng thời, với tác nhân acid là một acid hữu cơ, hỗn hợp sau phản ứng có thể dễ dàng được trung hoà và loại bỏ acid bằng phương pháp chiết lỏng - lỏng. Nhiệt độ phản ứng cũng ảnh hưởng đáng kể đến thời gian phản ứng. Dựa trên tính chất nhiệt độ sôi của dung môi môi trường phản ứng (DCM) và acid acetic băng, đề tài khảo sát ở các mốc: nhiệt độ phòng (không kiểm soát nhiệt độ), nhiệt độ 40 - 45°C, nhiệt độ 50 - 55°C và 80 - 85°C. Kết quả thực nghiệm cho thấy, ở mốc 80 - 85°C, dung môi bay hơi rất nhanh, và xuất hiện sản phẩm phụ ngay cả khi nguyên liệu chưa được thủy phân hoàn toàn; ở 3 điều kiện nhiệt độ còn lại, thể tích dung môi thay đổi không đáng kể và không xuất hiện tạp chất lạ, mặt khác, song song với việc tăng nhiệt độ phản ứng, tốc độ phản ứng càng tăng. Vì vậy, nghiên cứu lựa chọn kiểm

soát nhiệt độ phản ứng ở 50 - 55°C và tiếp tục khảo sát tỉ lệ các chất tham gia phản ứng. Kết quả khảo sát cho thấy, với lượng DCM càng ít (dung dịch enalapril base càng đậm đặc) và acid acetic băng càng nhiều, tức nghĩa tỷ lệ phần trăm phân tử enalapril base được tiếp xúc với acid acetic băng càng lớn, tốc độ phản ứng càng nhanh. Tuy nhiên, để tạo sự thuận lợi cho giai đoạn tinh chế, đề tài đặt giới hạn trên cho sự chênh lệch này là lượng thể tích acid acetic băng không gấp quá 2 lần so với thể tích DCM; khảo sát ở các tỷ lệ DCM: acid acetic băng là 2:1, 1,5:1 và 1:2. Từ đó, nghiên cứu xác định ở tỷ lệ nguyên liệu dạng base (mol), dung môi DCM (mL) và tác nhân acid acetic (mL) là 1:6,25:12,5, nhiệt độ kiểm soát trong khoảng 50 - 55°C, thời gian phản ứng khoảng 3 giờ là điều kiện phản ứng phù hợp nhất. Sản phẩm tạo thành có mùi giấm đặc trưng, đồng thời, phân tích bằng SKLM, phát hiện 1 vết tạp khác không di chuyển (giá trị R_f gần bằng 0 trên cả 3 hệ dung môi khảo sát). Do đó, trước khi loại hoàn toàn dung môi, lần lượt chiết phân bố sản phẩm sau phản ứng với dung dịch triethylamin 0,5% lạnh và nước lạnh.

4.2. Tinh chế sản phẩm tổng hợp

Tiếp tục được tinh chế sản phẩm rắn bằng phương pháp kết tinh lại ở nhiệt độ lạnh (0 - 5°C). Khi khảo sát với đa số đơn dung môi như ethanol, EA, CF, acetone, hợp chất này không tạo được tinh thể có cấu trúc ổn định; tinh thể tạo thành có thể chất mỏng, nhẹ, bám thành và khó phân lập khỏi dung dịch sau kết tinh. Vì vậy, đề tài tiến hành khảo sát kết tinh trong hỗn hợp dung môi. Với các hệ dung môi có thành phần là EA hoặc CF, sản phẩm tạo thành là tinh thể mỏng nhẹ, cấu trúc kém ổn định; hệ dung môi chứa *n*-hexan cho kết tinh có thể chất ổn định, tuy nhiên, sản phẩm D ít tan trong *n*-hexan, gợi ý trong thành phần hệ dung môi cần thêm một dung môi có

khả năng hoà tan tốt sản phẩm D. Do đó, hệ dung môi *n*-hexan - acetone (8:2) được lựa chọn. Sản phẩm tinh chế tạp D thu được là tinh thể màu trắng, hình kim, hiệu suất kết tinh cao (khoảng 84%).

4.3. Thử tinh khiết sản phẩm tinh chế

Sản phẩm tinh chế được xác định nhiệt độ nóng chảy bằng thiết bị đo điểm chảy và kỹ thuật DSC. Kết quả từ 2 phương pháp này cho thấy sản phẩm tinh chế có khoảng nóng chảy hẹp và phù hợp với tài liệu tham khảo [6,15]. Kết quả thử tinh khiết trên sắc ký lớp mỏng với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau cho 01 vết duy nhất. Kết quả thử tinh khiết bằng kỹ thuật HPLC-PDA, áp dụng phương pháp quy về 100% diện tích pic, kiểm tra trên 2 hệ pha động khác nhau về thành phần dung môi hữu cơ là acetonitril và methanol, thành phần phân cực là dung dịch acid phosphoric 0,05%. Sắc ký trong thời gian 60 phút, chương trình rửa giải gradient tăng dần nồng độ dung môi hữu cơ nhằm phát hiện các chất có độ phân cực khác nhau trong sản phẩm tinh chế. Kết quả kiểm tra bằng HPLC-PDA đã chứng minh độ tinh khiết sắc ký của sản phẩm tinh chế là trên 99%.

Do tạp D có cấu trúc chứa vòng 2,5-diketopiperazin (DKP) tương tự với cấu trúc của các dipeptit (tại nối amid). Vì vậy, để đóng vòng nội phân tử một cách có hiệu quả, liên kết amid này cần phải ở cấu dạng *cis* và không bị cản trở không gian bởi các phân tử lớn [17] (gốc acid maleic trong nguyên liệu enalapril maleat). Trong môi trường acid, enalapril thực hiện chuyển vị H+ sang nhóm -COOH, nhóm amin bậc 2 dễ dàng tấn công vào nhóm acid carboxylic theo cơ chế ái nhân, kèm theo loại 1 phân tử nước, tạo thành tạp D của enalapril maleat.

Dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ cho thấy có 17 trên 20 tín hiệu carbon theo lý thuyết, điều này có thể được lý giải dựa trên sự đối xứng trong

nhân phenyl; sự chồng tín hiệu của C₃ và C₆ trong vòng DKP do có môi trường hóa học rất tương cận hoặc bị trung bình hóa động học. Kết hợp với các kết quả phân tích dữ liệu phổ UV, MS, IR, ¹H-NMR có thể kết luận sản phẩm tinh chế phù hợp với công thức cấu tạo ethyl (2S)-2-[(3S,8aS)-3-methyl-1,4-dioxooctahydropyrrolo [1,2- a]pyrazin-2-yl]-4-phenylbutanoat (tạp D của enalapril maleat), có công thức phân tử C₂₀H₂₆N₂O₄, khối lượng phân tử 358,4 g/mol.

4.4. Xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết tạp D bằng phương pháp HPLC-PDA

Dựa vào kết quả sắc ký đồ với 2 hệ pha động được sử dụng thử tinh khiết sản phẩm sau tinh chế, hệ pha động có sử dụng methanol cho kết quả đường nền kém ổn định, có xu hướng đi lên. Vì vậy, đề tài đã lựa chọn hệ pha động acetonitril và dung dịch acid phosphoric 0,05% (pha động 2) để phát triển quy trình xác định độ tinh khiết tạp D. Đồng thời, kết quả kiểm tra độ đặc hiệu cho thấy trên sắc ký đồ các mẫu thử và mẫu phân hủy của tạp D trong các điều kiện khác nhau, tạp D được rửa giải tại thời gian lưu khoảng 32 phút, tương ứng với tỷ lệ pha động khoảng 53% acetonitril, mặt khác, từ phút 0 đến phút thứ 13,3 (tương ứng từ 5% đến khoảng 25% acetonitril) và từ phút 53 đến phút thứ 60 (tương ứng từ khoảng 85% đến 95% acetonitril) không xuất hiện các pic lạ. Vì vậy chương trình rửa giải đề xuất rút gọn thời gian sắc ký như bảng 4. Cụ thể, 5 phút đầu trong quy trình rút gọn được thiết kế với mục đích đẩy toàn bộ các thành phần khác trong sản phẩm được rửa giải ở tỷ lệ acetonitril khoảng 25 – 45% ra khỏi cột trước khi tạp D được rửa giải. Ở đoạn 5 - 12,5 phút, tốc độ thay đổi tỉ lệ thành phần pha động giảm xuống còn khoảng 3,3%/phút để đảm bảo sự rửa giải của tạp D, hạn chế trường hợp pic chính và pic khác không đạt độ phân giải. Tỷ lệ gradient được

tăng nhanh ở phút thứ 12,5 - 15 nhằm rút ngắn thời gian phân tích nhưng vẫn đảm bảo các thành phần kém phân cực hơn tạp D được rửa giải và phát hiện.

Quy trình phân tích đề xuất với chương trình rửa giải rút gọn đã được kiểm tra độ đặc hiệu trên mẫu thử và các mẫu phân hủy ở điều kiện khác nhau, kết quả cho thấy, độ tinh khiết của pic tạp D theo phổ UV-Vis ghi nhận giá trị Purity Angle nhỏ hơn Purity Threshold.

Kết hợp với kết quả thẩm định theo hướng dẫn ICH^[16] các thông số sắc ký của pic chính tạp D đều đạt theo quy định. Quy trình xác định độ tinh khiết rút gọn đã rửa giải tốt tạp D, đồng thời khắc phục nhược điểm là sử dụng pha động có hệ đệm phosphat vô cơ có khả năng ăn mòn thiết bị, giảm hiệu lực cột, giảm nguy cơ ăn mòn hệ thống HPLC-PDA và đảm bảo tuổi thọ cột.

5. KẾT LUẬN

Tạp D của enalapril maleat được tổng hợp thành công từ enalapril maleat với tác nhân phản ứng là acid acetic băng. Hiệu suất trung bình toàn quy trình trên 78% và sản phẩm thu được có độ tinh khiết sắc ký trên 99%. Sản phẩm đủ điều kiện để thiết lập chất chuẩn đối chiếu trong kiểm nghiệm tạp chất liên quan của enalapril maleat.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO, Bệnh tim mạch (CVD). <https://www.who.int/vietnam/vi/health-topics/cardiovascular-disease>
2. Lin S. Y., Wang S. L., Chen T. F., Hu T. C. (2002), "Intramolecular cyclization of diketopiperazine formation in solid-state enalapril maleate studied by thermal FT-IR microscopic system", *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 54(2), pp. 249 - 254.
3. Bhardwaj S. P., Singh S. (2008), "Study of forced degradation behavior of enalapril

maleate by LC and LC–MS and development of a validated stability-indicating assay method”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46(1), pp. 113 - 120.

4. Chen J., Zhang L. H., Xu R. J., Bu N. J., Zhang L. (2014), “Proposal of a new degradation mechanism of enalapril maleate and improvement of enalapril maleate stability in tablet formulation with different stabilizers”, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 69(4), pp. 277 - 280.

5. Bouabdallah S., Trabelsi H., Driss M. R., Touil S. (2017), “Determination and degradation study of enalapril maleate by high performance liquid chromatography”, *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 51, pp. 735 - 741.

6. PubChem. “Enalapril Diketopiperazine: GHS classification”. Accessed 04/06/2025. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Enalapril_Diketopiperazine#section=GHS-Classification1.

7. Standards L. “Safety Data Sheets”. *Enalapril diketopiperazine*. Accessed 04/06/2025.

https://assets.lgcstandards.com/sysmaster%2Fpdfs%2Fhbc%2Fh9a%2F10568627716126%-2FSDS_TRC-E555270-25MG_ST-WB-MSDS-5199657-1-1-1.PDF

8. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội; tr. 373 - 375, PL-107.

9. British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia 2025*. Monograph: Enalapril Maleate, Enalapril Tablets. Accessed 31/07/2025.

10. *European Pharmacopoeia 11.0*. Monograph: Enalapril Maleate; Accessed 31/07/2025.

11. *Convention USP. United States Pharmacopeia 2025*. Monograph: Enalapril Maleate, Enalapril Maleate Tablets. Accessed 31/07/2025.

12. Tania Márquez CONDE, Ilsa Corrales ALVAREZ, Manuel Gil APAN, Luis Martinez ALVAREZ (2007). “Obtención de Enalapril Diketopiperacino como Sustancia de Referencia”. *Latin American Journal of Pharmacy*.

13. Lick I. D., Villalba M. L., Gavernet L. (2012), “Synthesis of diketopiperazine: A kinetic study by means of thermoanalytical methods”, *Thermochimica Acta*, 527, pp. 143 - 147.

14. Lê Thanh Hoàng (2017), “Tổng hợp và thiết lập tạp chất đối chiếu D của enalapril maleat”, Khóa luận tốt nghiệp Dược sĩ Đại học. Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh, tr. 15 - 26.

15. LCG Standards. COA Enalapril diketopiperazine. 2025.

https://assets.lgcstandards.com/sysmaster%2Fpdfs%2Fhad%2Fhc8%2F10529160790046%2FCOA_MM0010.06-0025_ST-WB-CERT-4760617-1-1-1.PDF

16. ICH Harmonised Tripartite Guideline (2023). Guideline on validation of analytical procedures. pp. 1 - 33.

17. ACS Publications (2012): 2,5-Diketopiperazines: Synthesis, Reactions, Medicinal Chemistry, and Bioactive Natural Products.

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr200398y>.