

Xây dựng các quy trình xác định độ tinh khiết sắc ký các tạp B và C của carvedilol

Nguyễn Hữu Tiến^{1,2*}, Nguyễn Thảo Trang², Trịnh Hoàng Dương³
Chương Ngọc Nãi³, Trương Ngọc Tuyền¹, Trần Hữu Dũng², Nguyễn Đức Tuấn¹

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

In this paper, two HPLC-PDA methods were developed to determine the purity of carvedilol related compound B and C for establishment reference materials. The HPLC conditions were optimized as follow: Zorbax Eclipse XDB-C8 (4.6 mm x 150 mm, 5 μm) column; examined wavelength: 190 - 800 nm; mobile phase for impurity B composed of 0.05 % formic acid and acetonitrile with the gradient elution, mobile phase for impurity C composed of acetonitrile - phosphate buffer pH 2.0 (50:50, v:v). The methods were validated with parameters: system suitability, specificity, linearity, and accuracy. These procedures can be applied to evaluate the purity of carvedilol related compound B and C.

Keywords: Carvedilol related compound B, carvedilol related compound C, HPLC.

Đặt vấn đề

Carvedilol là một hỗn hợp racemic có tác dụng chẹn không chọn lọc thụ thể beta - adrenergic nhưng có tác dụng chẹn chọn lọc alpha1 – adrenergic, được sử dụng khá rộng rãi trong điều trị tăng huyết áp, suy tim mạn tính, rối loạn chức năng thất trái sau nhồi máu cơ tim^[1]. Hiện nay ở nước ta có ít nhất 11 đơn vị sản xuất các dạng bào chế khác nhau chứa carvedilol^[2, 3]. Việc sản xuất thuốc chứa carvedilol trong nước vẫn còn phụ thuộc nhiều vào nguồn nguyên liệu carvedilol được nhập từ các công ty nước ngoài. Do đó, việc kiểm tra chất lượng nguyên liệu đầu vào cũng như thành phẩm là hết sức quan trọng nhằm đảm bảo chất lượng của các chế phẩm trong nước.

Đối với dược chất carvedilol, Dược điển Mỹ 43 quy định phải kiểm tra 9 tạp, trong đó 5 tạp yêu cầu có chất chuẩn đối chiếu (tạp A, B, C, D, E)^[4]. Trong đó, tạp B (3,3'-(2-(2-methoxyphenoxy)ethylazandiyl) bis(1-(9H-carbazol-4-yloxy) propan-2-ol)) và tạp C (1-(9H-Carbazol-4-yloxy)-3-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl) amino)propan-2-ol) được tạo thành trong quá trình tổng hợp carvedilol, riêng tạp C còn là tạp hình thành do quá trình phân hủy carvedilol^[5, 6]. Dược điển Mỹ 43 quy định giới hạn cho phép của tạp B và tạp C trong chế phẩm carvedilol là không vượt quá 0,2 %, giới hạn trong nguyên liệu với tạp B là 0,1% và tạp C là 0,02%^[4]. Để xác định các tạp này cần có chất chuẩn được mua từ nước ngoài với giá thành rất cao và không chủ động về thời gian. Trong khi đó, ngân hàng chất chuẩn quốc gia hiện chưa có tạp chất đối chiếu của carvedilol nói chung và tạp B, C nói riêng. Hiện nhóm nghiên cứu chúng tôi đã tổng hợp thành

Chịu trách nhiệm: Nguyễn Hữu Tiến

Email: nhtien@huemed-univ.edu.vn

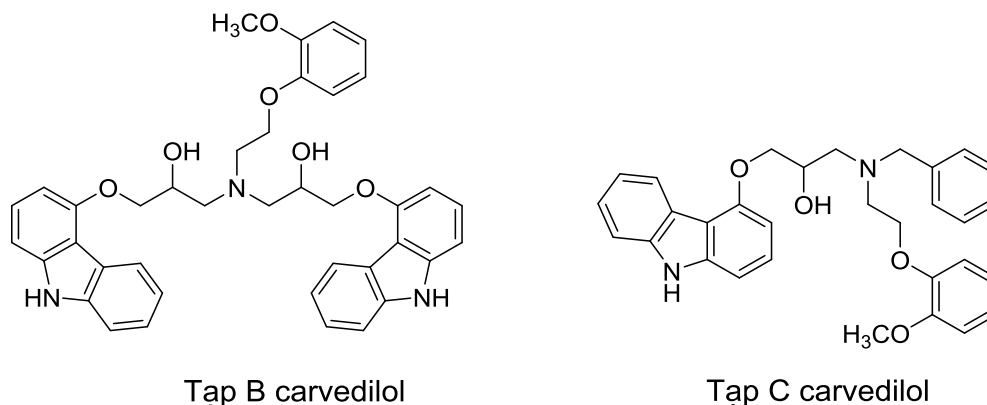
Ngày nhận: 12/4/2022

Ngày phản biện: 17/4/2022

Ngày duyệt bài: 25/6/2022

công các tạp trên và cần tiếp tục xác định độ tinh khiết sắc ký, hướng đến việc thiết lập chất đối chiếu từ các sản phẩm tổng hợp được.

Bài báo này giới thiệu về quy trình sắc ký để xác định độ tinh khiết tạp B và C của carvedilol, để định hướng thiết lập chất đối chiếu.



Hình 1. Công thức cấu tạo tạp B và tạp C của carvedilol

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Đối tượng nghiên cứu

Tạp B carvedilol (3,3'-(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)azandiyl)bis(1-(9H-carbazol-4-yloxy)propan-2-ol)) và tạp C carvedilol 1-(9H-Carbazol-4-yloxy)-3-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl) amino)propan-2-ol).

Hoá chất - dung môi

Mẫu thử: Tạp B carvedilol tổng hợp được (hàm ẩm: 0,13%), tạp C carvedilol tổng hợp được (hàm ẩm: 0,087%). Cấu trúc các sản phẩm tổng hợp được xác định bằng các phương pháp phổ **IR**, **UV-Vis**, **HR-MS**, **¹H-NMR**, **¹³C-NMR**, **HSQC** và **HMBC**. Lượng nước kết tinh và độ ẩm được xác định bằng kỹ thuật phân tích nhiệt trọng lượng (TGA).

Acetonitril (ACN), methanol (MeOH), acid trifluoroacetic (TFA), acid phosphoric, kali dihydrophosphat (Hãng Merck, Đức).

Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC-PDA LC 20A (Shimadzu, Nhật).

Cân điện tử phân tích HR-250AZ (Hàn

Quốc), máy khuấy từ gia nhiệt HSCD-7 (Mrclab, Israel), máy đo pH để bàn HI 2550-03 (Hanna, Ý), micropipet Labnet (Mỹ) và các dụng cụ thủy tinh chính xác khác.

Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị các dung dịch

Dung dịch thử gốc: Cân chính xác khoảng 20 mg tạp B hoặc tạp C vào các bình định mức 10,0 ml, thêm khoảng 7 ml ACN, lắc đến tan hoàn toàn, sau đó định mức đến vạch bằng ACN.

Dung dịch thử làm việc: Từ dung dịch thử gốc pha loãng bằng dung môi pha mẫu (nước - acetonitril (1:1, v:v)) thành dung dịch có nồng độ thích hợp. Các dung dịch này được lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi tiêm vào hệ thống sắc ký.

Mẫu trắng: Dung dịch pha mẫu.

Khảo sát điều kiện sắc ký xác định độ tinh khiết các tạp

Có định điều kiện cột sắc ký Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm), đầu dò PDA (chế độ Max plot 190 – 800 nm) và khảo sát các điều kiện thành phần, tỷ lệ pha động, chế độ rửa giải.

Thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết các tạp

Quy trình được thẩm định theo hướng dẫn của ICH [7] về tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính và độ chính xác.

Phương pháp xác định độ tinh khiết

Độ tinh khiết được tính theo công thức:

$$X(\%) = \frac{S_a}{S_a + \sum S_x} \times 100\%$$

Trong đó:

$X(\%)$: Độ tinh khiết tạp của carvedilol.

S_a : Diện tích pic chính trong mẫu thử.

$\sum S_x$: Tổng diện tích của các pic phụ trong mẫu thử (ngoại trừ các pic phụ trong mẫu thử có thời gian lưu tương ứng các pic trong mẫu trắng và pha động).

Các số liệu thống kê được tính toán dựa vào phần mềm Microsoft Excel 2016.

Kết quả và bàn luận

Khảo sát điều kiện sắc ký xác định độ tinh khiết tạp B

Với mục tiêu rửa giải hết các thành phần có thể có trong mẫu thử, nghiên cứu tiến hành khảo sát chương trình rửa giải theo gradient với các hệ dung môi khác nhau, gồm ACN – nước, MeOH – nước, acid formic 0,05% - MeOH, acid formic 0,05% - ACN. Thành phần các hệ dung môi được thay đổi theo gradient tuyến tính từ 100% dung môi hữu cơ đến 100% dung môi phân cực trong thời gian 60 phút. Kết quả cho thấy với các hệ dung môi có nước, đường nền thu được không ổn định, pic thu được không cân đối. Với chương trình dung môi acid formic 0,05% - ACN, đường nền ổn định, pic sắc nhọn. Do đó hệ pha động được lựa chọn gồm dung môi acid formic 0,05% - ACN với chương trình dung môi trong 70 phút.

Điều kiện sắc ký để xác định độ tinh khiết tạp B được tối ưu bao gồm:

- Cột sắc ký: Zorbax Eclipse XDB-C8 (150

x 4,6 mm; 5 μ m);

- Pha động: Chương trình gradient dung môi, cụ thể: 0 phút: 100% dung dịch acid formic 0,05%; 60 phút: 100% ACN; 64 – 70 phút: 100% dung dịch acid formic 0,05%;
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút;
- Nhiệt độ cột: 40 °C;
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μ l;
- Detector PDA, sử dụng chế độ Max plot phát hiện trên toàn thang sóng 190 – 800 nm;

Khảo sát điều kiện sắc ký xác định độ tinh khiết tạp C

Tương tự tạp B, nghiên cứu tiến hành khảo sát chương trình rửa giải theo gradient với các hệ dung môi khác nhau, gồm ACN – nước, MeOH – nước, acid formic 0,05% - MeOH, acid formic 0,05% - ACN. Kết quả cho thấy với các hệ dung môi trên, đường nền không ổn định, tín hiệu pic không tốt. Do đó, tiếp tục khảo sát với hệ pha động gồm dung dịch đệm phosphat pH 2 – ACN với các tỷ lệ khác nhau. Kết quả cho thấy tỷ lệ tối ưu cho pic cân đối, thời gian lưu phù hợp là 50:50 (v:v). Thời gian phân tích mẫu là 10 phút.

Điều kiện sắc ký để xác định độ tinh khiết tạp C được tối ưu bao gồm:

- Cột sắc ký: Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Pha động: ACN – dung dịch đệm (50:50, v:v), trong đó dung dịch đệm là dung dịch KH_2PO_4 2,72 g/l được điều chỉnh về pH 2,0 bằng H_3PO_4 ;
- Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút;
- Nhiệt độ cột: 55 °C;
- Thể tích tiêm mẫu: 5 μ l;
- Detector PDA, sử dụng chế độ Max plot phát hiện trên toàn thang sóng 190 – 800 nm.

Thẩm định quy trình phân tích

Tính phù hợp hệ thống

Chuẩn bị các mẫu thử tạp B với nồng độ khoảng 200 μ g/ml hoặc tạp C với nồng

độ 200 µg/ml; tiến hành tiêm lặp lại 6 lần vào hệ thống sắc ký. Tín hiệu được ghi trên toàn thang sóng 190 - 800 nm (chế độ

Max plot). Kết quả được trình bày tại bảng 1a và bảng 1b.

Bảng 1a. Kết quả tính phù hợp hệ thống quy trình xác định độ tinh khiết tạp B (n = 6)

Lần tiêm	t_R (phút)	S (mAu.s)	T_f	N
1	32,339	15691584	0,93	22927
2	32,317	15797989	0,93	22966
3	32,393	15527155	0,90	22658
4	32,372	15571793	0,92	22904
5	32,348	15640326	0,93	23161
6	32,348	15670169	0,93	23185
Trung bình	32,353	15649836		
RSD %	0,08%	0,61%		

Bảng 1b. Kết quả tính phù hợp hệ thống quy trình xác định độ tinh khiết tạp C (n = 6)

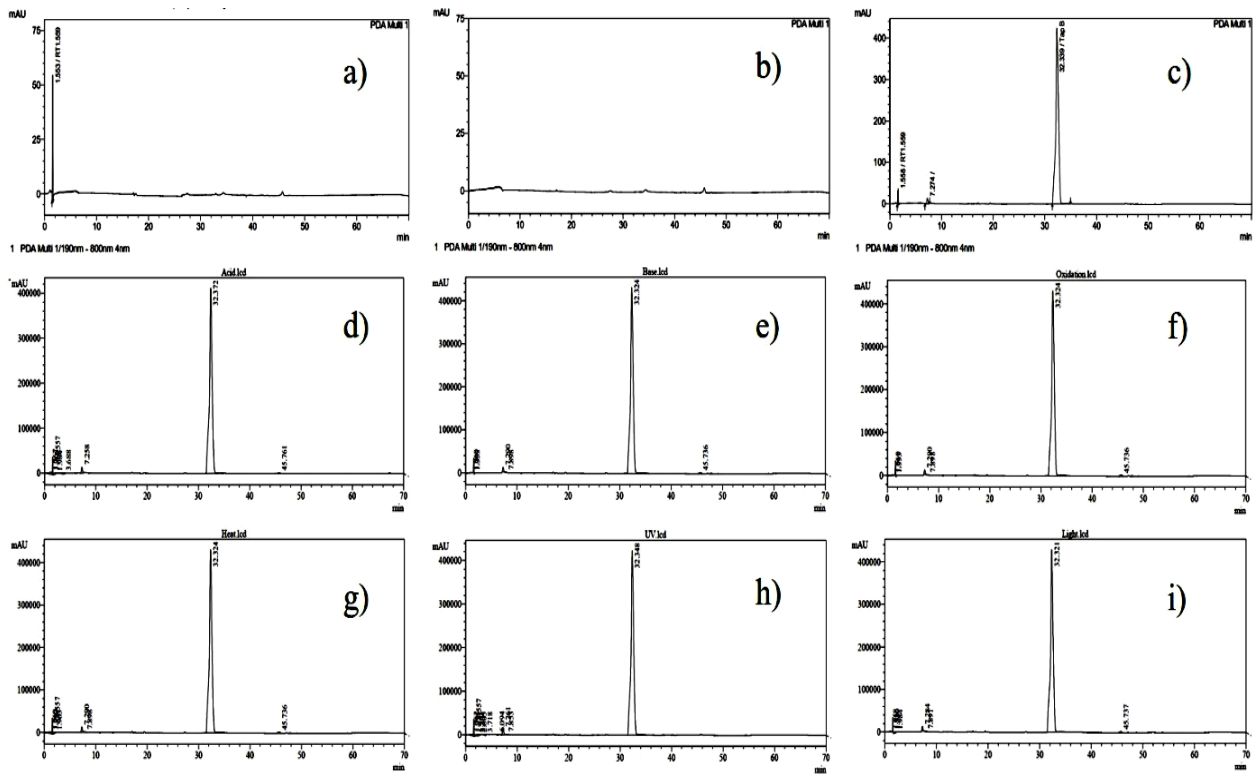
Lần tiêm	t_R (phút)	S (mAu.s)	T_f	N
1	3,073	9402922	1,27	2162
2	3,07	9428961	1,29	2156
3	3,069	9417286	1,32	2136
4	3,068	9409968	1,33	2139
5	3,066	9415790	1,34	2124
6	3,069	9409703	1,34	2145
Trung bình	3,069	9414105		
RSD %	0,08 %	0,09%		

Kết quả cho thấy RSD % của thời gian lưu và diện tích pic đều nhỏ hơn 2 %; T_f trong khoảng 0,8 – 1,5 và N lớn hơn 1000. Như vậy, các quy trình đạt tính phù hợp hệ thống.

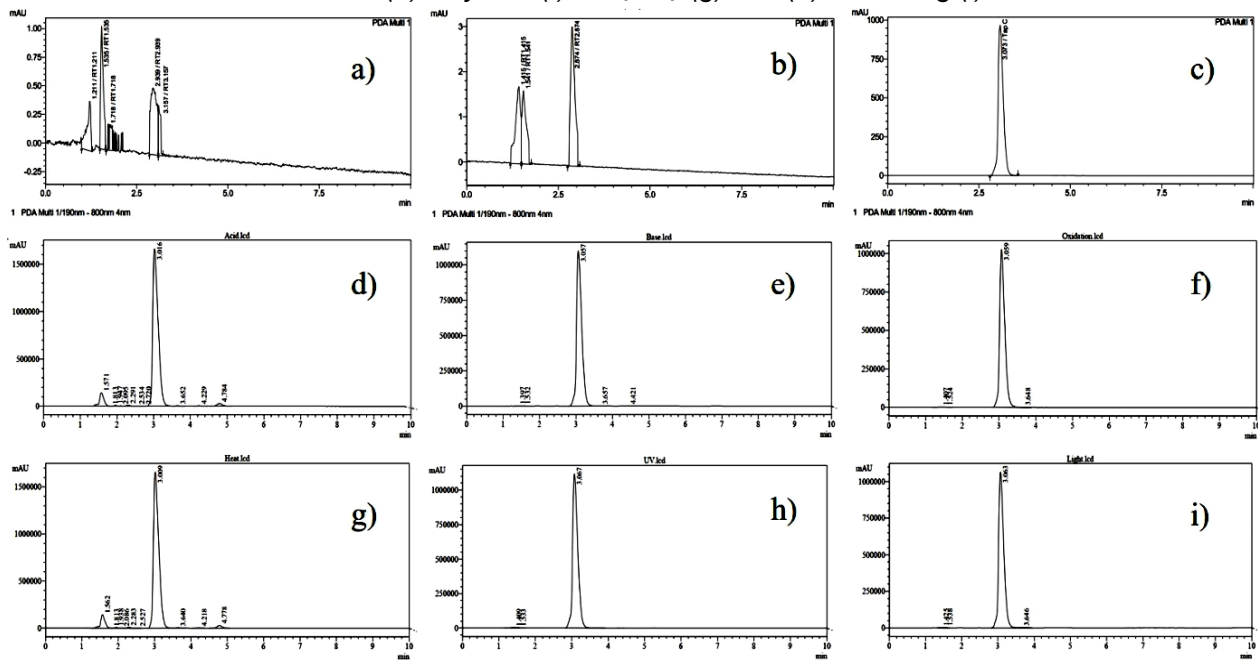
Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký mẫu trắng (dung môi pha mẫu), pha động, các mẫu thử làm việc có nồng độ 200 µg/ml. Nhằm mục đích chứng minh quy trình có tính đặc hiệu trong trường hợp có các sản phẩm phân hủy, các tạp được để trong một

số điều kiện khắc nghiệt sau (mẫu phân hủy): thủy phân bằng dung dịch HCl 0,1 N trong 24 giờ, thủy phân bằng dung dịch NaOH 0,1 N trong 24 giờ, oxy hóa bằng dung dịch H₂O₂ 10 % trong 24 giờ, đặt mẫu trong tủ sấy ở 80 °C trong 24 giờ, đặt mẫu dưới đèn UV 254 nm trong 1 giờ, đặt mẫu dưới ánh sáng trong 24 giờ. Sắc ký đồ của các mẫu được trình bày ở hình 2 và hình 3.



Hình 2. Sắc kí đồ của mẫu trắng (a), pha động (b), mẫu thử tập B 200 µg/ml (c) và các mẫu phân hủy trong điều kiện khắc nghiệt: acid (d), base (e), oxy hóa (f), nhiệt độ (g), UV (h), ánh sáng (i)



Hình 3. Sắc kí đồ của mẫu trắng (a), pha động (b), mẫu thử tập C 200 µg/ml (c) và các mẫu phân hủy trong điều kiện khắc nghiệt: acid (d), base (e), oxy hóa (f), nhiệt độ (g), UV (h), ánh sáng (i)

Kết quả cho thấy pic sắc gọn, cân đối, tách rời, trên sắc ký đồ mẫu trắng và mẫu pha động không xuất hiện pic trùng với thời gian lưu của pic các tạp. Kiểm tra độ tinh khiết pic bằng công cụ Purity peak trên phần mềm đi kèm cho giá trị Purity Index đạt 1,0000, chứng tỏ pic các tạp không lẫn các chất khác. Sắc ký đồ các mẫu phân hủy có xuất hiện các pic phân hủy, các pic này đều tách hoàn toàn với

pic tạp B hoặc C. Như vậy phương pháp có độ đặc hiệu tốt.

Độ chính xác

Tiến hành sắc ký 6 mẫu thử tạp B hoặc tạp C có nồng độ khoảng 200 µg/ml (độ lặp lại) và thực hiện trong 2 ngày liên tiếp với cùng điều kiện làm việc và người thực hiện (độ chính xác trung gian). Kết quả được thể hiện trong bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá độ chính xác quy trình xác định độ tinh khiết tạp B và tạp C

		Tạp B	Tạp C
<i>Độ lặp lại</i>	Số lần thực nghiệm (n)	n = 6	n = 6
	Giá trị hàm lượng trung bình X_{TB} (%)	99,17	99,92
	Độ lệch chuẩn SD	0,07	0,09
	RSD%	0,07 %	0,09 %
	Giới hạn tin cậy e ($p = 0,95$; $t = 2,571$)	0,07	0,10
	Khoảng tin cậy μ	99,10 – 99,24	99,82 – 100,02
<i>Độ chính xác trung gian</i>	Số lần thực nghiệm (n)	6	6
	Giá trị hàm lượng trung bình X_{TB} (%)	99,35	99,91
	Độ lệch chuẩn SD	0,28	0,14
	RSD%	0,003 %	0,14 %
	Giới hạn tin cậy e ($p = 0,95$; $t = 2,571$)	0,30	0,15
	Khoảng tin cậy μ	99,05 – 99,65	99,76 – 100,06

Các quy trình có độ chính xác tốt với giá trị RSD đều dưới 2 %. Độ tinh khiết tạp B và C được xác định lần lượt là 99,26 % và 99,92 % tính theo chế phẩm nguyên trạng (n = 12).

Khoảng nồng độ tuyến tính

Chuẩn bị một dãy mẫu thử với các nồng độ tăng dần, xử lý và tiến hành sắc ký theo điều kiện đã xác định. Kết quả được trình bày ở bảng 3a và bảng 3b.

Bảng 3a. Kết quả tính tuyến tính của quy trình xác định độ tinh khiết tạp B

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)			Các giá trị thống kê	
	Lần tiêm 1	Lần tiêm 2	Trung bình		
52,1	3075831	3080424	3078127,5	R^2	0,9997
104,2	6610997	6629878	6620437,5	F_{tn}	14593,2
208,4	14668954	14869514	14769234	$F_{0,05}$	7,7086
416,9	31534153	31511333	31522743	t_a	120,802
625,3	47343955	47488765	47416360	t_b	-4,868
833,8	64807467	65117947	64962707	$t_{0,05}$	2,7764
Phương trình hồi quy				$y = 79142,88x - 1494308$	
Khoảng tuyến tính				52,1 – 833,8 $\mu\text{g/ml}$	

Bảng 3b. Kết quả tính tuyến tính của quy trình xác định độ tinh khiết tạp C

Nồng độ ($\mu\text{g/ml}$)	Diện tích pic (mAU.s)			Các giá trị thống kê	
	Lần tiêm 1	Lần tiêm 2	Trung bình		
24,2	668675	654865	661770	R^2	0,9999
48,4	1501002	1486333	1493667,5	F_{tn}	37192,44
96,8	3444460	3444873	3444666,5	$F_{0,05}$	7,7086
193,4	7457839	7356280	7407059,5	t_a	192,853
386,9	14733289	14707253	14720271	t_b	-4,850
773,8	30274467	30258964	30266715,5	$t_{0,05}$	2,7764
Phương trình hồi quy				$y = 39493,2x - 362283$	
Khoảng tuyến tính				24,2 – 773,8 $\mu\text{g/ml}$	

Kết quả cho thấy, trong khoảng nồng độ khảo sát có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ với tỷ lệ diện tích pic (với $R^2 > 0,995$).

Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Giá trị giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng được suy ra từ phương trình đường chuẩn, lần lượt là 12,8 và 38,8 $\mu\text{g/ml}$ đối với tạp B; 6,2 và 18,9 $\mu\text{g/ml}$ đối với tạp C.

Bàn luận

Để xác định độ tinh khiết của sản phẩm tổng hợp bằng **HPLC**, nghiên cứu đã tiến hành khảo sát các điều kiện pha động khác nhau, trong đó ưu tiên các chương trình dung môi theo gradient để rửa giải toàn bộ các thành phần có thể có

trong mẫu thử. Với tạp B carvedilol, nghiên cứu đã lựa chọn được thành phần dung môi phù hợp gồm acid formic 0,05 % và ACN, rửa giải theo gradient từ 0 đến 100% dung môi hữu cơ trong 60 phút. Với tạp C, do các điều kiện rửa giải theo gradient đều không phù hợp nên nghiên cứu đã lựa chọn chế độ rửa giải đẳng dòng hỗn hợp dung dịch đệm phosphat và ACN.

Nghiên cứu sử dụng detector PDA ở chế độ Max plot giúp phát hiện các pic tạp chất trên toàn thang sóng 190 – 800 nm. Ngoài ra còn hỗ trợ kiểm tra độ tinh khiết pic, từ đó đánh giá tính chọn lọc của phương pháp **HPLC**.

Các quy trình **HPLC** đều có tính phù hợp hệ

thống xét trên các tiêu chí thời gian lưu (t_R), diện tích pic (S), số đĩa lý thuyết (N) và hệ số kéo đuôi (T_f), có khoảng nồng độ tuyến tính được xây dựng khá rộng, độ chính xác nằm trong giới hạn cho phép theo hướng dẫn của ICH [7].

Như vậy phương pháp xây dựng đạt độ tin cậy nên có thể áp dụng để xác định độ tinh khiết tạp B và C carvedilol. Độ tinh khiết tạp B và C của mẫu thử tự tổng hợp được xác định lần lượt là 99,26 % và 99,92 % ($n = 12$) tính theo chế phẩm nguyên trạng, đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu.

Kết luận

Như vậy, quy trình xác định độ tinh khiết tạp B và tạp C carvedilol bằng **HPLC** kết nối đầu dò PDA đã được xây dựng và thẩm định. Các quy trình đạt tính phù hợp hệ thống, có khoảng tuyến tính khá rộng, tính chọn lọc và độ chính xác cao. Các quy trình này có thể áp dụng để xác định độ tinh khiết của tạp B và C của carvedilol, là một bước quan trọng trong quá trình thiết lập chất đối chiếu.

Tài liệu tham khảo

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, NXB. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. Cục quản lý Dược (2019), *Tổng hợp kê khai giá thuốc nhập khẩu tính đến ngày*

11/11/2018, truy cập ngày 9/5/2019-2019, tại trang web <https://dav.gov.vn/tong-hop-ke-khai-gia-thuoc-nhap-khau-tinh-den-ngay-11112018-n2185.html>.

3. Cục quản lý Dược (2019), *Tổng hợp kê khai giá thuốc sản xuất trong nước tính đến ngày 11/11/2018*, truy cập ngày 9/5/2019-2019, tại trang web <https://dav.gov.vn/tong-hop-ke-khai-gia-thuoc-san-xuat-trong-nuoc-tinh-den-ngay-11112018-n2182.html>.

4. US Pharmacopeial Convention (2020), *The United States Pharmacopeia 43: Carvedilol, Carvedilol tablets*.

5. G. Madhusudhan, K. Chinnam Naidu, B. Anand Kumar, R. Satyanarayana, Balraju, V. (2009), "Synthesis of impurity A in Carvedilol: a β -adrenergic receptor", *Indian Journal of Chemistry*, 48B, pp. 741-745.

6. Stojanović, J., Marinković, V., Vladimirov, S., Veličković, D., Sibinović, P. (2005), "Determination of carvedilol and its impurities in pharmaceuticals", *Chromatographia*. 62 (9), pp. 539-542.

7. ICH Harmonised Tripartite Guideline (CPMP/ICH/381/95), *Validation of analytical procedures: Methodology*, The European Medicines Agency.