

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH



NGUYỄN HỮU TIẾN

**TỔNG HỢP VÀ THIẾT LẬP TẠP CHẤT ĐỐI CHIỀU CỦA
CARVEDILOL SỬ DỤNG TRONG KIỂM NGHIỆM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH, Năm 2024

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN HỮU TIẾN

TỔNG HỢP VÀ THIẾT LẬP TẠP CHẤT ĐỐI CHIẾU CỦA
CARVEDILOL SỬ DỤNG TRONG KIỂM NGHIỆM

NGÀNH: KIỂM NGHIỆM THUỐC – ĐỘC CHẤT

MÃ SỐ: 62720410

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- PGS. TS. TRƯƠNG NGỌC TUYỀN
- PGS. TS. TRẦN HỮU DŨNG

TP. HỒ CHÍ MINH, Năm 2024

LỜI CẢM ƠN

Để hoàn thành luận án này, tôi đã nhận được sự hỗ trợ, hướng dẫn, và động viên quý báu từ rất nhiều người.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới Thầy PGS. TS. Trương Ngọc Tuyên và Thầy PGS. TS. Trần Hữu Dũng, những người đã không ngừng dìu dắt, chỉ bảo, giúp tôi vượt qua nhiều thách thức và khơi dậy trong tôi niềm đam mê học hỏi, khám phá.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành đến Thầy GS. TS. Nguyễn Đức Tuấn và Thầy PGS. TS. Trần Việt Hùng, những người đã đưa ra ý tưởng nghiên cứu và giúp tôi định hình hướng đi cho luận án này, giúp tôi hiểu sâu hơn về lĩnh vực Kiểm nghiệm thuốc.

Bên cạnh đó, tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới quý Thầy Cô trong các hội đồng chấm luận án, những người đã dành thời gian quý báu để đọc, đánh giá và góp ý cho luận án của tôi, giúp tôi hoàn thiện luận án này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn các Thầy Cô Khoa Dược, phòng Sau đại học, đã tạo điều kiện cho tôi được hoàn thành chương trình Nghiên cứu sinh. Tôi xin cảm ơn quý Thầy Cô, anh chị đồng nghiệp, các em sinh viên tại Viện Kiểm nghiệm thuốc TP Hồ Chí Minh, Bộ môn Hóa hữu cơ – Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh và Khoa Dược – trường Đại học Y Dược, Đại học Huế đã hỗ trợ, cùng chia sẻ kiến thức, sẵn sàng giúp đỡ khi tôi gặp khó khăn và đồng hành cùng tôi trong suốt thời gian qua.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới gia đình, những người luôn là nguồn động viên và hậu phương vững chắc của tôi. Sự yêu thương, động viên của Bố Mẹ hai bên, Vợ và hai con gái, anh chị em và những người thân yêu đã cho tôi sức mạnh để vượt qua khó khăn, thách thức trên hành trình học tập và nghiên cứu.

Một lần nữa, xin chân thành cảm ơn tất cả những người đã giúp đỡ, đồng hành và hỗ trợ tôi trong suốt thời gian qua.

TP. Hồ Chí Minh, ngày 6 tháng 11 năm 2024

Tác giả

(Ký tên và ghi rõ họ tên)

LỜI CAM ĐOAN

Tôi tên là Nguyễn Hữu Tiến, là Nghiên cứu sinh ngành Kiểm nghiệm thuốc – Độc chất, khóa 2017 – 2020, xin cam đoan:

(1) Luận án là do chính bản thân tôi thực hiện, dưới sự hướng dẫn khoa học của PGS. TS. Trương Ngọc Tuyên và PGS. TS. Trần Hữu Dũng;

(2) Các tài liệu tham khảo được tôi xem xét, chọn lọc kỹ lưỡng, trích dẫn và liệt kê tài liệu tham khảo đầy đủ;

(3) Kết quả trình bày trong luận án được hoàn thành dựa trên các kết quả nghiên cứu của bản thân tôi và các kết quả của nghiên cứu này chưa được dùng cho bất cứ đề tài cùng cấp nào khác.

Tp. Hồ Chí Minh, ngày 06 tháng 11 năm 2024

Người hướng dẫn
(Ký tên và ghi rõ họ tên)

Tác giả thực hiện
(Ký tên và ghi rõ họ tên)

MỤC LỤC

	Trang
Lời cảm ơn	i
Lời cam đoan.....	ii
Mục lục.....	iii
Danh mục chữ viết tắt và thuật ngữ anh – việt	v
Danh mục hình	vii
Danh mục sơ đồ.....	viii
Danh mục bảng	ix
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Tổng quan về carvedilol.....	3
1.2. Tổng quan các tạp chất liên quan của carvedilol	6
1.3. Kiểm nghiệm tạp chất của carvedilol trong nguyên liệu và thành phẩm.....	21
1.4. Một số công trình phân tích tạp chất liên quan của carvedilol	26
1.5. Thiết lập chất đối chiếu.....	32
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.1. Thiết kế nghiên cứu.....	40
2.2. Đối tượng nghiên cứu	40
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	43
2.4. Cỡ mẫu của nghiên cứu.....	43
2.5. Xác định các biến số độc lập và phụ thuộc	44
2.6. Phương pháp và công cụ đo lường, thu thập số liệu	44
2.7. Quy trình nghiên cứu	66
2.8. Phương pháp phân tích dữ liệu	67
2.9. Đạo đức trong nghiên cứu.....	68
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	69
3.1. Tổng hợp và tinh chế các tạp	69
3.2. Thử tinh khiết và xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp	82

3.3. Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao	89
3.4. Đánh giá và thiết lập chất đối chiếu.....	94
3.5. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao	100
3.6. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm bằng điện di mao quản	108
Chương 4. BÀN LUẬN	115
4.1. Tổng hợp, tinh chế và xác định cấu trúc các tạp.....	115
4.2. Quy trình xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao	133
4.3. Thiết lập chất đối chiếu.....	135
4.4. Xây dựng quy trình định lượng các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm carvedilol bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao	136
4.5. Xây dựng quy trình định lượng các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm carvedilol bằng điện di mao quản.....	141
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	148
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CHỮ VIẾT TẮT VÀ THUẬT NGỮ ANH – VIỆT

Chữ viết tắt	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ACRS	Asean Chemical Reference Substance	Chất đối chiếu hóa học của ASEAN
ACN	Acetonitrile	
ATR	Attenuated total reflectance	Phản xạ toàn phần suy giảm
BGE	Background electrolyte	Chất điện ly nền
BP	British Pharmacopoeia	Dược điển Anh
CAS	Chemical Abstracts Service	Dịch vụ thông tin tóm tắt hóa học
CDC		Chất đối chiếu
CMC	Critical Micelle Concentration	Nồng độ micell tới hạn
CoA	Certificate Of Analysis	Chứng nhận phân tích
CorrA	Corrected area	Diện tích pic được chuẩn hóa
<i>d</i>	doublet	Đỉnh đôi
<i>dd</i>	doublet of doublets	Đỉnh đôi kép
DCM	Dichloromethane	Dicloromethan
ĐĐVN		Dược điển Việt Nam
DMF	Dimethylformamide	Dimethylformamid
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl sulfoxid
DSC	Differential scanning calorimetry	Phân tích nhiệt quét vi sai
EOF	Electroosmotic flow	Dòng điện thẩm
EP	European Pharmacopoeia	Dược điển Châu Âu
EPCRS	European Pharmacopoeial Chemical Reference Substance	Chất đối chiếu hoá học Dược điển Châu Âu
EtOAc	Ethyl acetate	Ethyl acetat
GHS	Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals	Hệ thống hài hoà toàn cầu về phân loại và ghi nhãn hoá chất
GMP	Good manufacturing practices	Thực hành sản xuất tốt
HPLC	High-performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
ICRS	International Chemical Reference Substance	Chất đối chiếu hoá học Quốc tế
IR	Infra-red	Hồng ngoại
JP	Japanese Pharmacopoeia	Dược điển Nhật

LOD	Limit of detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of quantification	Giới hạn định lượng
<i>m</i>	multiplet	Đỉnh đa
MS	Mass spectrometry	Phổ khối
N	Theoretical plates	Số đĩa lý thuyết
NIST	National Institute of Standards and Technology	Viện tiêu chuẩn và công nghệ quốc gia
NMR	Nuclear magnetic resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
PCRS	Primary Chemical Reference Substance	Chất đối chiếu hóa học gốc
PDA	Photodiode Array	Dãy diod quang
PE	Petroleum ether	Ether dầu hỏa
PTN		Phòng thí nghiệm
R_s	Resolution	Độ phân giải
RT	Room temperature	Nhiệt độ phòng
<i>s</i>	singlet	Đỉnh đơn
SCRS	Secondary Chemical Reference Substance	Chất đối chiếu hóa học thứ cấp
<i>t</i>	triplet	Đỉnh ba
t_R	Retention time	Thời gian lưu
TEA	Triethylamine	Triethylamin
THF	Tetrahydrofuran	Tetrahydrofuran
TLTK		Tài liệu tham khảo
USP	United States Pharmacopoeia	Dược điển Mỹ
USPRS	USP Reference Standards	Chất chuẩn đối chiếu Dược điển Mỹ
UV-Vis	Ultraviolet – Visible	Tử ngoại – khả kiến

DANH MỤC HÌNH

	Trang
Hình 1.1. Sắc ký đồ định lượng các tạp của carvedilol trong viên nén trong nghiên cứu của Stojanovic.....	26
Hình 1.2. Sắc ký đồ định lượng các tạp của carvedilol trong viên nén trong nghiên cứu của Sajan.....	27
Hình 1.3. Sắc ký đồ định lượng các tạp của carvedilol trong nguyên liệu và viên nén trong nghiên cứu của Raghava Raju.....	28
Hình 1.4. Sắc ký đồ định lượng các tạp của carvedilol trong viên nén trong nghiên cứu của Samba Siva Rao	29
Hình 1.5. Sắc ký đồ định lượng các tạp của carvedilol trong viên nén trong nghiên cứu của Nitin Mahajan.....	30
Hình 1.6. Điện di đồ định lượng carvedilol và các tạp phân huỷ.....	31
Hình 3.1. Sắc ký đồ định lượng tạp chất liên quan trong nguyên liệu theo quy trình của USP 2023	101
Hình 3.2. Khảo sát thành phần pha động	102
Hình 3.3. Khảo sát tốc độ dòng	103
Hình 3.4. Sắc ký đồ đánh giá tính đặc hiệu	105
Hình 3.5. Biểu đồ độ tinh khiết của píc carvedilol và các tạp.....	105
Hình 3.6. Khảo sát điều kiện điện di.	110
Hình 3.7. Điện di đồ đánh giá tính đặc hiệu.....	112
Hình 3.8. Biểu đồ độ tinh khiết của píc carvedilol và các tạp.....	112
Hình 4.1. Cơ chế sắc ký pha đảo ghép cặp ion của tạp E với acid 1-heptansulfonic.....	139

DANH MỤC SƠ ĐỒ

	Trang
Sơ đồ 1.1. Phản ứng tổng hợp carvedilol.....	6
Sơ đồ 1.2. Con đường phát sinh tạp A.....	9
Sơ đồ 1.3. Sơ đồ tổng hợp tạp A theo G. Madhusudhan	10
Sơ đồ 1.4. Sơ đồ tổng hợp tạp A theo Somisetti Narender Rao	11
Sơ đồ 1.5. Con đường phát sinh tạp B.....	13
Sơ đồ 1.6. Con đường phát sinh tạp C do quá trình tổng hợp	15
Sơ đồ 1.7. Sơ đồ tổng hợp tạp C theo Somisetti Narender Rao	16
Sơ đồ 1.8. Sơ đồ tổng hợp tạp E dạng base theo Thota Giridhar	20
Sơ đồ 2.1. Sơ đồ tổng hợp tạp A carvedilol.....	45
Sơ đồ 2.2. Sơ đồ tổng hợp tạp B carvedilol.....	47
Sơ đồ 2.3. Sơ đồ tổng hợp tạp C carvedilol.....	47
Sơ đồ 2.4. Sơ đồ tổng hợp tạp D carvedilol.....	48
Sơ đồ 2.5. Sơ đồ điều chế tạp E carvedilol	49
Sơ đồ 2.6. Quy trình nghiên cứu của đề tài	67
Sơ đồ 3.1. Cấu trúc hóa học của 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol.....	83
Sơ đồ 3.2. Cấu trúc hóa học của tạp A carvedilol	84
Sơ đồ 3.3. Cấu trúc hóa học của tạp B carvedilol.....	85
Sơ đồ 3.4. Cấu trúc hóa học của tạp C carvedilol.....	86
Sơ đồ 3.5. Cấu trúc hóa học của tạp D carvedilol	87
Sơ đồ 3.6. Cấu trúc hóa học của tạp E carvedilol.....	89
Sơ đồ 4.1. Cơ chế phản ứng giai đoạn tạo hợp chất 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (6).....	115
Sơ đồ 4.2. Cơ chế phản ứng giai đoạn tổng hợp tạp A.....	118
Sơ đồ 4.3. Cơ chế phản ứng giai đoạn tổng hợp tạp B	123
Sơ đồ 4.4. Cơ chế phản ứng giai đoạn tổng hợp tạp C	126
Sơ đồ 4.5. Cơ chế phản ứng giai đoạn tổng hợp tạp D.....	129

DANH MỤC BẢNG

	Trang
Bảng 1.1. Phương pháp định tính carvedilol trong nguyên liệu và thành phẩm viên nén trong các dược điển.....	3
Bảng 1.2. Phương pháp định lượng carvedilol trong nguyên liệu và thành phẩm viên nén trong các dược điển.....	4
Bảng 1.3. Các tạp chất liên quan của carvedilol được đề cập trong các dược điển tham chiếu	6
Bảng 1.4. Một số tạp không được đề cập trong các dược điển tham chiếu.....	20
Bảng 1.5. So sánh quy định định lượng tạp trong nguyên liệu carvedilol trong USP 2023, EP 11 và BP 2023.....	22
Bảng 1.6. So sánh các quy định định lượng tạp trong viên nén carvedilol trong USP 2023 và BP 2023 bằng HPLC	23
Bảng 1.7. Giới hạn cho phép của các tạp trong nguyên liệu và viên nén carvedilol được quy định trong các Dược điển tham chiếu.....	25
Bảng 2.1. Các chất đối chiếu dùng trong nghiên cứu.....	40
Bảng 2.2. Hóa chất và dung môi dùng trong nghiên cứu	41
Bảng 2.3. Các trang thiết bị chính trong nghiên cứu	42
Bảng 3.1. Khảo sát dung môi điều chế tạp E.....	81
Bảng 3.2. Bảng tóm tắt điều kiện sắc ký của các qui trình kiểm tra độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng phương pháp HPLC	90
Bảng 3.3. Kết quả đánh giá tính phù hợp hệ thống của các quy trình xác định độ tinh khiết	91
Bảng 3.4. Kết quả đánh giá tính tuyến tính và độ lặp lại của các quy trình xác định độ tinh khiết.....	93
Bảng 3.5. Độ tinh khiết của các tạp được tổng hợp (n = 12).....	94
Bảng 3.6. Kết quả đánh giá tạp A.....	94
Bảng 3.7. Kết quả đánh giá tạp B	95
Bảng 3.8. Kết quả đánh giá tạp C	96
Bảng 3.9. Kết quả đánh giá tạp D.....	97

Bảng 3.10. Kết quả đánh giá tạp E	97
Bảng 3.11. Khối lượng chất đóng trong 01 lọ và tổng số lọ đóng được	98
Bảng 3.12. Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ.....	99
Bảng 3.13. Kết quả xác định giá trị ấn định và giá trị công bố các chất đối chiếu	100
Bảng 3.14. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình.....	104
Bảng 3.15. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, LOD và LOQ của quy trình. (PL 6.2, 6.3, 6.4, 6.5).....	106
Bảng 3.16. Kết quả định lượng carvedilol và các tạp trong các nguyên liệu và thành phẩm viên nén bằng HPLC	107
Bảng 3.17. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình.....	111
Bảng 3.18. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, LOD và LOQ của quy trình. (PL 7.1, 7.2, 7.3, 7.4).....	113
Bảng 3.19. Kết quả định lượng carvedilol và các tạp trong các nguyên liệu và thành phẩm viên nén bằng CE.....	114

ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo số liệu báo cáo của Cục quản lý Dược, đến nay Việt Nam đã có hơn 232 nhà máy sản xuất đạt tiêu chuẩn Thực hành sản xuất tốt (Good manufacturing practices – GMP) ¹. Mục tiêu đến năm 2030, thị phần của thuốc sản xuất trong nước chiếm tỷ lệ khoảng 80% về số lượng sử dụng và 70% về giá trị thị trường ². Để kiểm soát chất lượng thuốc và nguyên liệu làm thuốc, Bộ Y tế đã ban hành nhiều thông tư ^{3,4}, quy định dược chất làm nguyên liệu thuốc cần kiểm soát nhiều chỉ tiêu như hàm lượng hoạt chất, độ ẩm, kim loại nặng, tạp chất liên quan... Tạp chất liên quan là những chất được tạo thành trong quá trình sản xuất, bảo quản và lưu thông phân phối của nguyên liệu và thành phẩm. Các tạp chất này dù chỉ tồn tại một lượng nhỏ cũng có thể làm ảnh hưởng đến chất lượng sản phẩm, tác động không nhỏ đến hiệu quả điều trị, làm thay đổi hiệu quả lâm sàng và đặc tính an toàn của thuốc hoặc gây các tác dụng không mong muốn của thuốc ⁵⁻⁷.

Trong khi đó, bệnh tim mạch là một trong những nguyên nhân gây tử vong hàng đầu thế giới và đang có xu hướng tăng lên ^{8,9}. Đa số các thuốc điều trị bệnh tim mạch được người bệnh sử dụng hàng ngày, trong thời gian dài hoặc có thể dùng suốt đời ¹⁰. Carvedilol là một chất đối kháng adrenergic với tác dụng chẹn thụ thể beta không chọn lọc, chẹn thụ thể alpha 1 chọn lọc và là một thuốc giãn mạch có hoạt tính chống oxy hóa ^{11,12}. Carvedilol đã cho thấy những lợi ích có ý nghĩa về mặt lâm sàng trong quản lý bệnh nhân suy tim và sau nhồi máu cơ tim. Carvedilol còn góp phần vào điều trị bệnh động mạch vành, tăng huyết áp, suy thận, bệnh tiểu đường ¹². Với những lợi ích trên, carvedilol ngày càng được sử dụng phổ biến trong điều trị các bệnh về tim mạch. Hiện nay ở nước ta có ít nhất 11 đơn vị sản xuất các dạng bào chế khác nhau chứa carvedilol. Việc sản xuất thuốc chứa carvedilol trong nước vẫn còn phụ thuộc nhiều vào nguồn nguyên liệu carvedilol được nhập khẩu từ các công ty nước ngoài.

Đối với dược chất carvedilol, dược điển Mỹ (USP) 43 qui định phải kiểm tra 9 tạp, trong đó 5 tạp yêu cầu có chất chuẩn đối chiếu đơn thành phần, gồm tạp A (1-(9H-carbazol-4-yloxy)-3-(2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin) propan-2-ol), tạp B

(3,3'-(2-(2-methoxyphenoxy)ethylazandiyl)bis(1-(9H-carbazol-4-yloxy)propan-2-ol)), tạp C (1-(9H-carbazol-4-yloxy)-3-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propan-2-ol), tạp D (4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol) và tạp E (2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin)¹³. Trong đó, tạp C là tạp phân hủy¹⁴ và tạp D được xếp vào nhóm có khả năng gây đột biến gen^{15,16}. Đây là các tạp cần được kiểm soát chặt chẽ trong thành phẩm carvedilol. Dược điển Anh (BP) 2023 và dược điển Châu Âu (EP) 11.0 quy định kiểm tra 4 tạp đối với nguyên liệu carvedilol^{17,18}. Dược điển Việt Nam (ĐĐVN) V chưa có chuyên luận carvedilol¹⁹.

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. Tuy nhiên, vấn đề kiểm soát các tạp chất liên quan trong nguyên liệu và thành phẩm carvedilol hiện gặp nhiều khó khăn tại Việt Nam. Mặc dù nhân lực và trang thiết bị các phòng kiểm nghiệm đã được cải thiện đáng kể, vẫn tồn tại vấn đề do thiếu chất đối chiếu cho các tạp chất liên quan. Các tạp chất chuẩn không có sẵn trong ngân hàng chất chuẩn của các Viện Kiểm nghiệm, nên các đơn vị phải mua chất chuẩn bán với giá rất đắt từ nước ngoài, không có sẵn trên thị trường và phải chờ đợi trong thời gian dài. Trong khi đó các công trình nghiên cứu từ tài liệu nước ngoài không công bố cụ thể, chi tiết đối với việc tổng hợp và tiêu chuẩn hóa các tạp của carvedilol.

Xuất phát từ những lý do trên, đề tài “*Tổng hợp và thiết lập tạp chất đối chiếu của carvedilol sử dụng trong kiểm nghiệm*” được thực hiện với mục đích góp phần chủ động trong việc kiểm tra tạp chất của carvedilol trong nguyên liệu và thành phẩm, làm giàu thêm ngân hàng chất chuẩn trong nước để nâng cao công tác kiểm tra đánh giá chất lượng thuốc trong tiến trình hội nhập với ngành dược trên thế giới hiện nay. Mục tiêu cụ thể là:

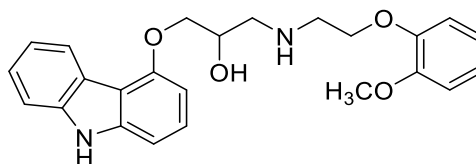
1. Tổng hợp các tạp A, B, C, D và E của carvedilol ở qui mô phòng thí nghiệm.
2. Thiết lập được các tạp chất đối chiếu A, B, C, D và E của carvedilol dùng cho mục đích định lượng.
3. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao và điện di mao quản.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. TỔNG QUAN VỀ CARVEDILOL

1.1.1. Tính chất lý hóa

- Công thức phân tử: $C_{24}H_{26}N_2O_4$, CAS: 72956-09-3.
- Tên hóa học: 1-(9H-carbazol-4-yloxy)-3-(2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin)propan-2-ol.
- Khối lượng phân tử: 406,5 g/mol.
- Công thức cấu tạo:



- Tinh thể trắng hoặc gần trắng.
- Nhiệt độ nóng chảy: 114 – 115 °C.
- Độ tan: thực tế không tan trong nước, ít tan trong methylen clorid, hơi tan trong methanol, ethanol 96° và isopropanol, tan tự do trong dimethyl sulfoxid (DMSO). Thực tế không tan trong các acid loãng, dịch vị và dịch ruột (pH 1,1 và 7,5) ^{17,20,21}.

1.1.2. Định tính

Tóm tắt các phương pháp định tính carvedilol trong nguyên liệu và thành phẩm viên nén trong các dược điển được đề cập trong Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Phương pháp định tính carvedilol trong nguyên liệu và thành phẩm viên nén trong các dược điển

Dược điển	Nguyên liệu	Thành phẩm	TLTK
ĐDVN V	Không có chuyên luận	Không có chuyên luận	19
USP 2023	- Phổ hồng ngoại - Sắc ký lỏng	- Sắc ký lỏng - Phổ UV-Vis	13
EP 11.0	Phổ hồng ngoại	Không có chuyên luận	17

BP 2023	Phổ hồng ngoại	- Phổ hồng ngoại - Sắc ký lỏng	18
JP 18	- Phổ UV-Vis - Phổ hồng ngoại	- Phổ UV-Vis	22

1.1.3. Định lượng

Tóm tắt các phương pháp định lượng carvedilol trong nguyên liệu và thành phẩm viên nén trong các dược điển được đề cập trong Bảng 1.2.

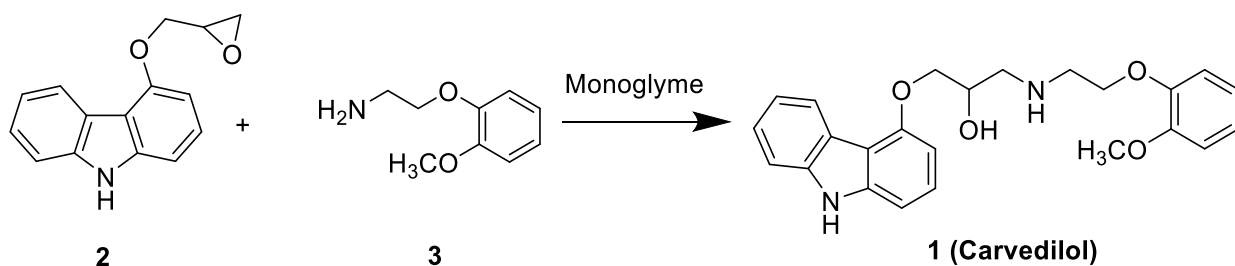
Bảng 1.2. Phương pháp định lượng carvedilol trong nguyên liệu và thành phẩm viên nén trong các dược điển

Dược điển	Nguyên liệu	Thành phẩm	TLTK
ĐDVN V	Không có chuyên luận	Không có chuyên luận	19
USP 2023	Sắc ký lỏng với điều kiện sắc ký: + Đầu dò UV: 240nm + Cột L7 (150 x 4,6 mm, 5µm) + Nhiệt độ cột: 55 °C + Tốc độ dòng: 1 ml/phút + Thời gian phân tích: 60 phút + Thể tích tiêm mẫu: 10 µl + Pha động: Đệm phosphat pH 2,0 - ACN (69:31) + Yêu cầu: hàm lượng carvedilol phải nằm trong khoảng 98,0 đến 102,0% tính theo thành phẩm đã làm khô	Sắc ký lỏng với điều kiện sắc ký: + Đầu dò UV: 240 nm + Cột: L7 (50 x 4,6 mm; 5 µm) + Nhiệt độ cột: 40 °C + Tốc độ dòng: 1 ml/phút + Thời gian phân tích: 30 phút + Thể tích tiêm mẫu: 25 µl + Pha động: Đệm phosphat pH 3,0 (thêm natri dodecyl sulfat) – ACN + Yêu cầu: hàm lượng carvedilol phải nằm trong khoảng 90,0 đến 110,0% so với lượng ghi trên nhãn	13
EP 11.0	Chuẩn độ môi trường khan bằng acid perchloric 0,1 M, xác định điểm tương đương bằng phương pháp đo thế.	Không có chuyên luận	17

BP 2023	Chuẩn độ môi trường khan bằng acid perchloric 0,1 M, xác định điểm tương đương bằng phương pháp đo thế.	Sắc ký lỏng với điều kiện sắc ký: ¹⁸ + Cột C18 (125 x 4,6mm; 10 µm) + Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút + Đầu dò UV: 285 nm + Thể tích tiêm mẫu: 160 µl + Pha động: methanol – đệm phosphat pH 2,0 + Yêu cầu: hàm lượng carvedilol phải nằm trong khoảng từ 95,0 đến 105,0% hàm lượng ghi trên nhãn
JP 18	Chuẩn độ môi trường khan bằng acid perchloric 0,1 M, xác định điểm tương đương bằng phương pháp đo thế.	Sắc ký lỏng với điều kiện sắc ký: ²² + Cột C18 (125 x 4,6mm; 10 µm) + Tốc độ dòng: điều chỉnh để thời gian lưu của carvedilol khoảng 5 phút + Đầu dò UV: 240 nm + Thể tích tiêm mẫu: 10 µl + Pha động: đệm phosphat pH 5–MeOH (45:55) + Yêu cầu: hàm lượng carvedilol phải nằm trong khoảng từ 95,0 đến 105,0% hàm lượng ghi trên nhãn

1.1.4. Tổng hợp carvedilol

Carvedilol được tổng hợp lần đầu bởi Fritz Wiedemann và cộng sự vào năm 1979 bằng cách mở vòng oxiran của 4-(2,3-epoxypropoxy)carbazol (**2**) bằng 2-(2-methoxy phenoxy)ethanamin (**3**) trong dung môi dimethyl ether ethylen glycol (dung môi monoglyme) và môi trường kiềm theo phương trình phản ứng sau: ²³



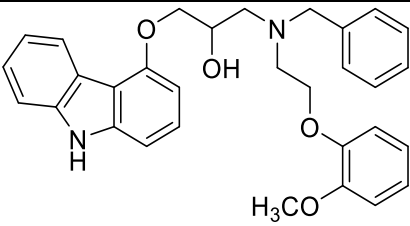
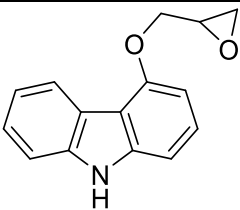
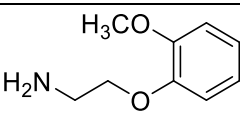
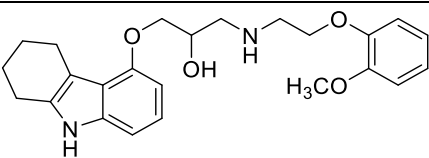
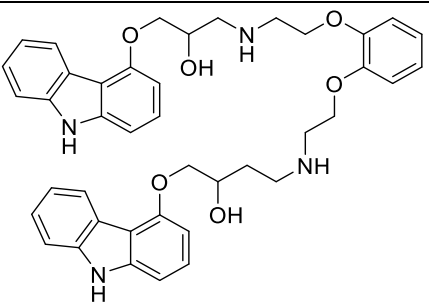
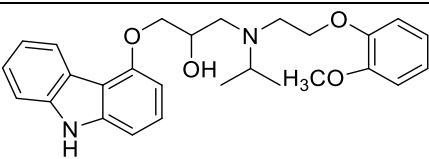
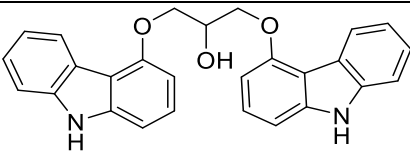
Sơ đồ 1.1. Phản ứng tổng hợp carvedilol

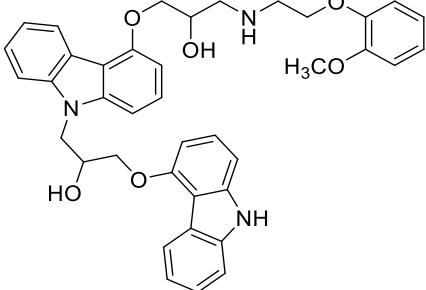
1.2. TỔNG QUAN CÁC TẠP CHẤT LIÊN QUAN CỦA CARVEDILOL

Các tạp chất liên quan của carvedilol trong các dược điển tham chiếu được liệt kê ở Bảng 1.3.

Bảng 1.3. Các tạp chất liên quan của carvedilol được đề cập trong các dược điển tham chiếu

STT	Tên tạp	Công thức hóa học	Khối lượng phân tử (g/mol)	Phân loại tạp chất theo nguồn gốc	TLTK
1	Tạp A (USP) Tạp A (BP, EP)		629,74	Quá trình	13,17,18
2	Tạp B (USP) Tạp B (BP, EP)		645,74	Quá trình	13,17,18

3	Tạp C (USP) Tạp C (BP, EP)		496,60	Quá trình + Phân hủy	13,17,18
4	Tạp D (USP)		239,27	Quá trình	13
5	Tạp E (USP)		167,21	Quá trình	13
6	Tạp F (USP)		410,52	Quá trình	13
7	Carvedilol bisalkyl- pyrocatechol (USP)		674,78	Quá trình	13
8	N-Isopropyl carvedilol (USP)		448,55	Quá trình	13
9	Biscarbazol (USP)		422,48	Quá trình	13

10	Tạp D (BP và EP)		645,76	Quá trình	17,18
----	------------------	--	--------	-----------	-------

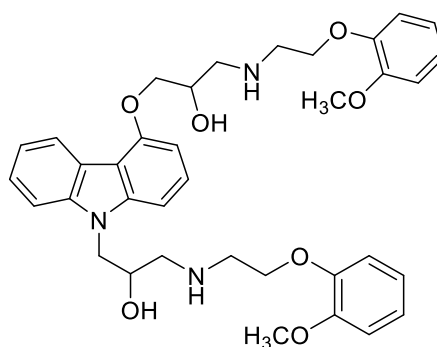
Trong khuôn khổ luận án, xin được trình bày chi tiết hơn về các tạp A, B, C, D, E của carvedilol theo USP.

1.2.1. Tạp A carvedilol

1.2.1.1. Tính chất lý hóa

Công thức phân tử: $C_{36}H_{43}N_3O_7$, CAS: 1198090-73-1

Công thức cấu tạo:



Tên khoa học:

1-(4-(2-Hydroxy-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propoxy)-9H-carbazol-9-yl)-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propan-2-ol ¹³.

1-((9-(2-Hydroxy-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propyl)-9H-carbazol-4-yl)oxy)-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propan-2-ol ^{17,18}.

Khối lượng phân tử: 629,74 g/mol.

Tinh thể màu vàng nhạt, không mùi. Tan tốt trong aceton.

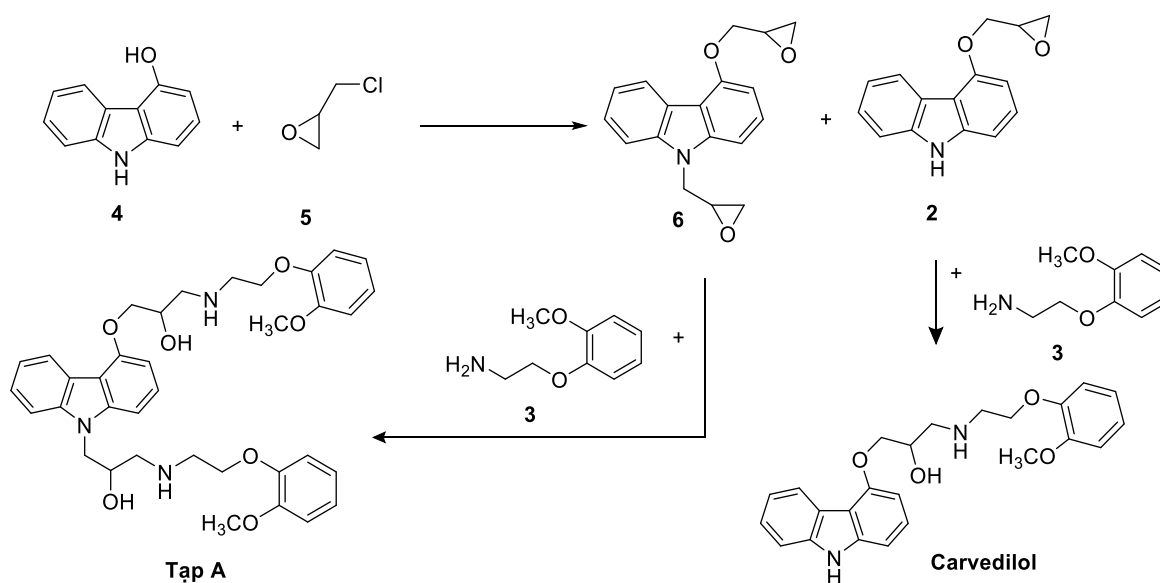
Nhiệt độ nóng chảy: 113-123 °C.

Hệ số phân bố dầu/nước là 3,77 ²⁴.

1.2.1.2. Nguồn gốc phát sinh

Tạp A là tạp xuất hiện trong quá trình tổng hợp carvedilol.

Trong phản ứng của 9H-carbazol-4-ol (**4**) với epichlorohydrin (**5**) để tổng hợp nguyên liệu 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**), có tạo thành một lượng nhỏ 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**). Sau đó 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**) cùng với 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) cùng phản ứng với 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**), 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**) tạo thành carvedilol (**1**) và 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) tạo thành 1-(4-(2-hydroxy-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propoxy)-9H-carbazol-9-yl)-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl) amino)propan-2-ol (tạp A) ²⁵.



Sơ đồ 1.2. Con đường phát sinh tạp A

1.2.1.3. Độc tính, tác dụng phụ

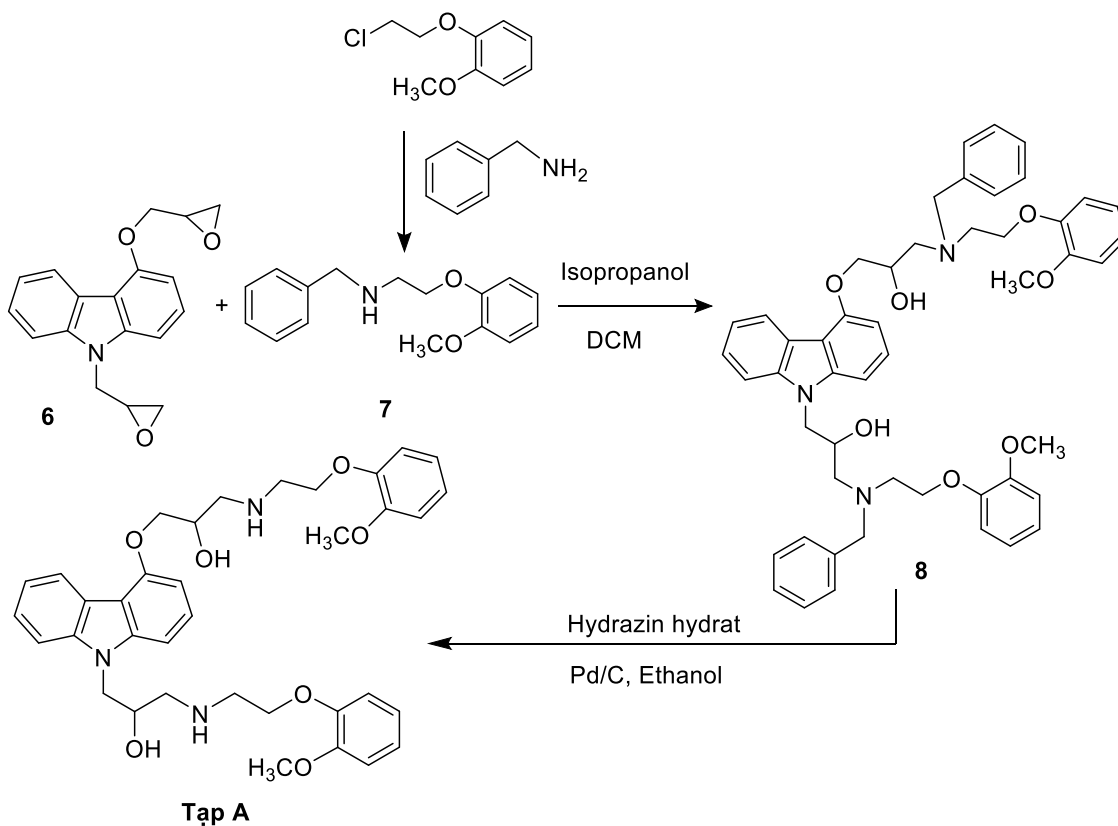
Hệ thống hài hoà toàn cầu về phân loại và ghi nhãn hoá chất (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals – GHS) xếp tạp A vào nhóm GHS 07 có thể gây kích ứng da, kích ứng mắt khi tiếp xúc, có thể gây tổn thương đường tiêu hóa nếu nuốt phải và nhóm GHS 09 rất độc với thủy sinh ²⁴.

1.2.1.4. Một số công trình nghiên cứu tổng hợp tạp A

Cho đến nay, chỉ có một vài công trình nghiên cứu về tạp A.

Năm 2009, G. Madhusudhan và cộng sự đã nghiên cứu tổng hợp tạp A qua các giai đoạn: tổng hợp *N*-benzyl-2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**7**), tổng hợp 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9*H*-carbazol (**6**) từ 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9*H*-carbazol (**2**) và epichlorohydrin. Từ sản phẩm (**6**), nghiên cứu đã tổng hợp tạp A theo hai con đường:

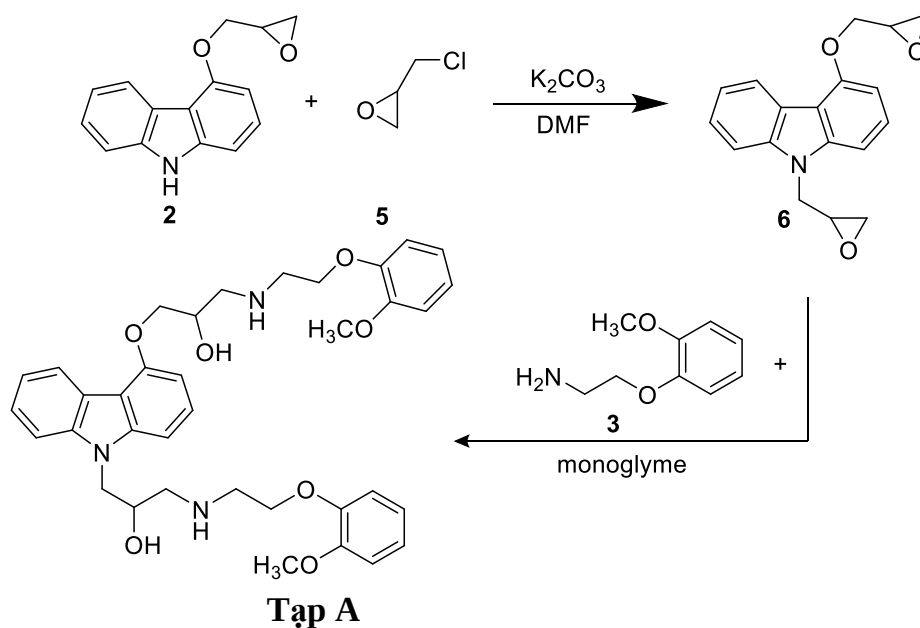
(a) Cho sản phẩm (**6**) phản ứng với (**7**) để tạo thành 1-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)-3-(4-(3-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)-2-hydroxypropoxy)-9*H*-carbazol-9-yl)propan-2-ol (**8**), sau đó thực hiện phản ứng debenzyl hóa với tác nhân hydrazin hydrat với xúc tác Pd/C. Hiệu suất tổng hợp theo con đường này là 34,3%. Quy trình này được mô tả trong sơ đồ 1.3²⁵.



Sơ đồ 1.3. Sơ đồ tổng hợp tạp A theo G. Madhusudhan

(b) Cho sản phẩm **(6)** phản ứng với 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) để tạo thành tập A theo phương trình trong sơ đồ 1.4. Hiệu suất tổng hợp bằng phương pháp này là 32,8%.

Năm 2011, Somiseti Narender Rao và cộng sự nghiên cứu tổng hợp tập A qua 2 giai đoạn theo phương trình trong Sơ đồ 1.4 ²⁶.



Sơ đồ 1.4. Sơ đồ tổng hợp tập A theo Somiseti Narender Rao

- Giai đoạn 1: Tổng hợp 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**).

Thêm kali carbonat (0,163 mol; 22,6 g) vào dung dịch chứa 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**) (0,054 mol; 10 g) trong 30 ml DMF và khuấy trong 10 phút. Thêm từ từ epichlorohydrin (0,082 mol; 7,57 g) ở nhiệt độ 25 °C, duy trì trong 1 giờ ở nhiệt độ này, sau đó đun nóng đến 55 °C. Hỗn hợp phản ứng được duy trì ở mức 55 °C trong 8 giờ. Sau đó hỗn hợp phản ứng được làm mát đến 25 °C, thêm 150 ml nước và chiết 2 lần với EtOAc (200 và 100 ml). Gạn lấy lớp dịch chiết EtOAc, làm khan bằng natri sulfat, và cất bay hơi dung môi hoàn toàn để thu 5 g 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) dưới dạng một căn nâu.

- Giai đoạn 2: Tổng hợp tập A.

Dung dịch chứa 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) (0,067 mol; 11,31 g) trong monoglyme được đun nóng đến 75 °C. Sau đó, dung dịch chứa 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) (0,069 mol; 5 g) trong monoglyme được thêm vào từ từ và giữ ở 80 °C trong 5 giờ. Hỗn hợp sau phản ứng được bốc hơi dung môi đến cạn dưới áp suất giảm ở 60 °C, cặn được hòa tan trong 25 ml EtOAc và đun cho tan hoàn toàn. Dung dịch này được làm nguội về 30 °C, sau đó về 0 °C. Sản phẩm kết tủa được lọc và rửa với 5 ml EtOAc đã làm lạnh để thu tập A. Hiệu suất phản ứng là 45%.

Từ những công trình nghiên cứu trên, có thể nhận thấy rằng:

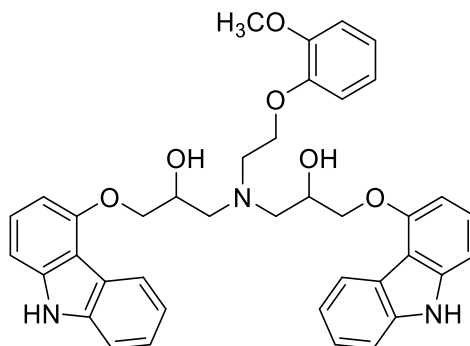
- Các công bố tổng hợp tập A đều đi từ nguyên liệu (**6**), với hiệu suất quy trình tổng hợp từ 30-45%. Độ tinh khiết của tập cũng không được đề cập tới.
- Quy trình của G. Madhusudhan phải qua chất trung gian (**8**) với tác nhân phản ứng (**7**), hiệu suất quy trình không cao ²⁵.
- Quy trình của Somiseti Narender Rao có hiệu suất cao hơn, không sử dụng tác nhân (**7**), điều kiện phản ứng không phức tạp ²⁶.
- Hiện nay chưa có tài liệu nghiên cứu về quy trình tổng hợp tập A được công bố ở Việt Nam.

1.2.2. Tập B carvedilol

1.2.2.1. Tính chất lí hóa

Công thức phân tử: $C_{39}H_{39}N_3O_6$, CAS: 918903-20-5.

Công thức cấu tạo:



Tên khoa học:

3,3'-(2-(2-Methoxyphenoxy)ethylazandiyl)bis(1-(9*H*-carbazol-4-yloxy)propan-2-ol) ¹³.

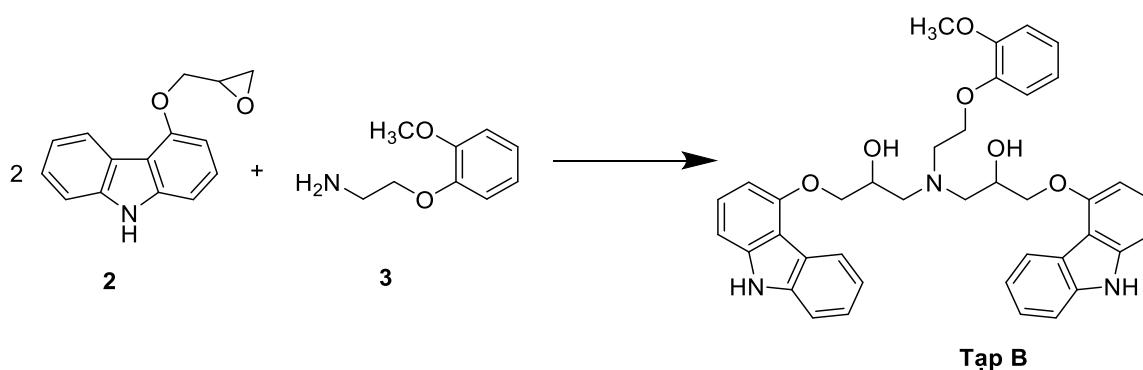
1,1'-((2-(2-Methoxyphenoxy)ethyl)nitrilo)bis(3-9*H*-carbazol-4-yloxy)propan-2-ol) ^{17,18}.

Khối lượng phân tử: 645,74 g/mol.

Tinh thể màu trắng, không mùi ²⁷.

1.2.2.2. Nguồn gốc phát sinh

Tạp B là tạp tạo thành trong quá trình tổng hợp carvedilol. 2-(2-Methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) là amin bậc 1 đóng vai trò tác nhân ái nhân làm mở vòng epoxid của 4-(2,3-epoxypropoxy)carbazol (**2**) để tạo thành carvedilol là amin bậc 2. Amin bậc 2 vẫn còn là tác nhân ái nhân nên tiếp tục lại tấn công vào vòng epoxy thứ 2 để mở thêm 1 vòng epoxid nữa để tạo thành amin bậc 3 (tạp B). Vấn đề này thường được giải quyết bằng cách sử dụng lượng dư của hợp chất amin ²⁵.



Sơ đồ 1.5. Con đường phát sinh tạp B

1.2.2.3. Độc tính

Tạp B có thể gây kích ứng da và mắt khi tiếp xúc, có thể gây tổn thương đường tiêu hóa hoặc đường thở nếu nuốt, hít phải ²⁷. GHS xếp tạp B vào nhóm GHS 09 rất độc với thủy sinh ²⁸.

1.2.2.4. Một số công trình nghiên cứu tổng hợp tạp B

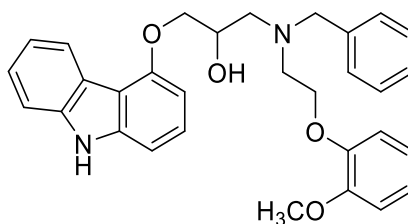
Năm 2011, Somiseti Narendra Rao và cộng sự đã nghiên cứu tổng hợp tạp B theo con đường phát sinh tạp này (Sơ đồ 1.5). Cho 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) (0,027 mol; 4,54 g) vào 20 ml dung dịch chứa 4-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**2**) (0,041 mol; 10 g) trong dung môi monoglyme. Đun nóng đến 65 °C và giữ trong 2 giờ. Dung môi được làm bay hơi dưới áp suất giảm, chất rắn còn lại được tinh chế qua sắc ký cột nhanh để thu được tạp B. Hiệu suất của quy trình là 38,5%. Độ tinh khiết của tạp không được đề cập ²⁶.

1.2.3. Tạp C carvedilol

1.2.3.1. Tính chất lý hóa

Công thức phân tử: $C_{31}H_{32}N_2O_4$, CAS: 72955-94-3 ²⁹

Công thức cấu tạo:



Tên khoa học:

1-(9H-Carbazol-4-yloxy)-3-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propan-2-ol ¹³

(2RS)-1-(Benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)-3-(9H-carbazol-4-yloxy)propan-2-ol ^{17,18}.

Khối lượng phân tử: 496,60 g/mol.

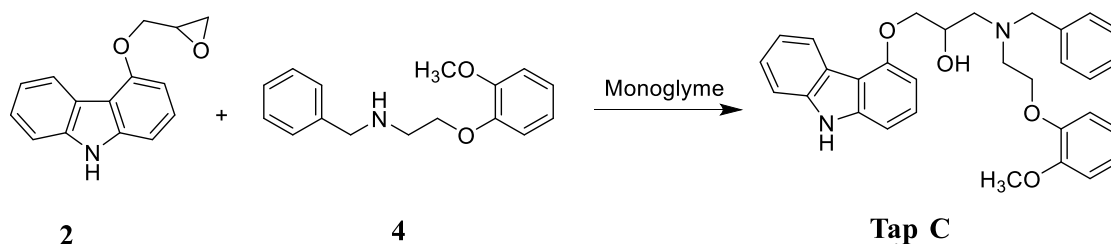
Tạp C là bột màu trắng, không mùi ²⁹.

1.2.3.2. Nguồn gốc phát sinh

Tạp C là tạp tạo thành trong quá trình tổng hợp carvedilol. Theo G. Madhusudhan và cộng sự, khi tổng hợp carvedilol, để tránh sự hình thành của tạp B,

người ta sử dụng *N*-benzyl-2-(2-methoxyphenoxy) ethanamin (**4**) thay vì 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) để mở vòng 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9*H*-carbazol (**2**). Sau đó thực hiện phản ứng *N*-debenzyl hóa để tạo thành carvedilol.

Thực tế phản ứng *N*-debenzyl hóa không xảy ra hoàn toàn nên vẫn còn một lượng 1-(9*H*-carbazol-4-yloxy)-3-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino) propan-2-ol (tạp C) trong nguyên liệu ^{25,30}.



Sơ đồ 1.6. Con đường phát sinh tạp C do quá trình tổng hợp

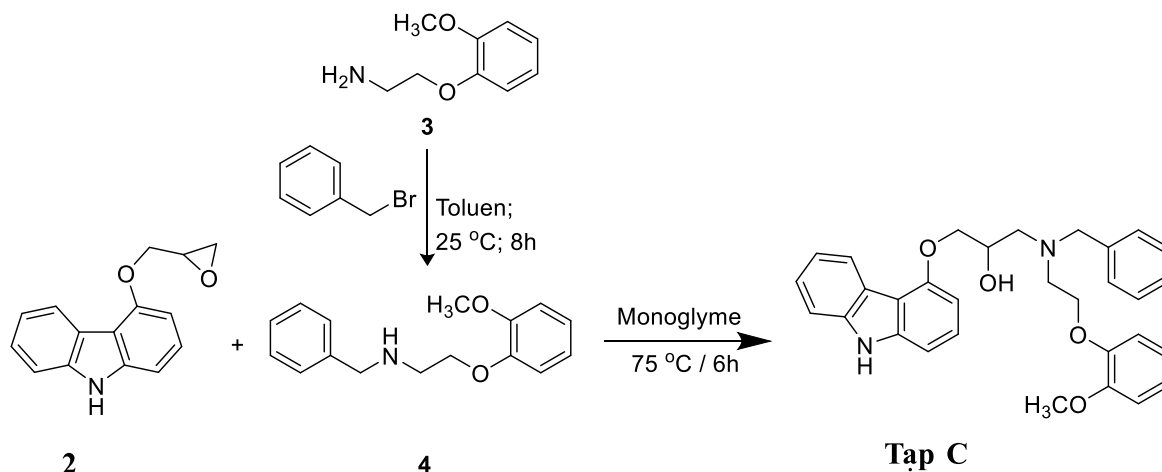
1.2.3.3. Độc tính

Tạp C có thể gây kích ứng da và mắt khi tiếp xúc ²⁹, được xếp vào nhóm GHS 08 có thể gây tổn thương các cơ quan và độc với thủy sinh ³¹.

1.2.3.4. Một số công trình nghiên cứu tổng hợp tạp C

Năm 2011, Somiseti Narender Rao và cộng sự đã nghiên cứu tổng hợp tạp C từ 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**). Triethylamin được thêm vào dung dịch benzyl bromid trong toluen và làm lạnh về 0 °C. Sau đó dung dịch 2-(2-methoxyphenoxy) ethanamin trong toluen được thêm từ từ vào, duy trì nhiệt độ 25 °C và trong 8 giờ, sau đó thêm nước và khuấy trong 15 phút. Lốp dung môi hữu cơ sau khi tách lớp được rửa với nước và loại nước bằng natri sulfat. Dung môi được bốc hơi hoàn toàn dưới áp suất giảm để thu được cặn *N*-benzyl-2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**4**). Sau khi thu được (**4**), tiếp tục thực hiện giai đoạn tổng hợp thứ 2 theo Sơ đồ 1.7 như sau: 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9*H*-carbazol (**2**) được thêm vào dung dịch (**4**) trong monoglyme, đun nóng đến 75 °C và duy trì trong 6 giờ. Dung môi sau đó được bốc hơi hoàn toàn ở 65 °C để thu cặn, trước khi nghiền với

EtOAc. Sau đó tiếp tục lọc và rửa với EtOAc để thu được tạp C. Hiệu suất giai đoạn 1 là 50%, giai đoạn 2 là 85%. Hiệu suất toàn quy trình là 42,5% ²⁶.



Sơ đồ 1.7. Sơ đồ tổng hợp tạp C theo Somisetti Narender Rao

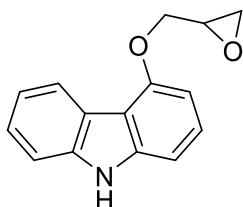
Năm 2015, L. Samba Siva Rao và cộng sự nghiên cứu quy trình định lượng và đánh giá độ ổn định của carvedilol và các tạp liên quan bằng HPLC. Kết quả cho thấy dưới các điều kiện khắc nghiệt (phân hủy bằng hydrogen peroxyd, thủy phân trong môi trường kiềm, phân hủy bằng ánh sáng, bằng nhiệt và thủy phân bằng acid), không quan sát thấy sự biến đổi có ý nghĩa hàm lượng các tạp A, B, C, D, E ¹².

1.2.4. Tạp D carvedilol

1.2.4.1. Tính chất lý hóa

Công thức phân tử: $C_{15}H_{13}NO_2$, CAS: 51997-51-4 ³²

Công thức cấu tạo:



Tên khoa học: 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol; 4-(2,3-epoxypropoxy) carbazol; 4-(2-oxiranylmethoxy)-9H-carbazol.

Khối lượng phân tử: 239,27 g/mol.

Tinh thể màu trắng đến vàng nhạt.

Điểm chảy: 127 -135 °C.

Độ tan: tan trong cloroform, DMF, DMSO và tetrahydrofuran (THF) ^{32,33}.

1.2.4.2. Nguồn gốc phát sinh

Tạp D là nguyên liệu tổng hợp carvedilol, xuất hiện trong nguyên liệu và thành phẩm bắt nguồn từ việc tồn dư trong quá trình tổng hợp ¹¹.

1.2.4.3. Độc tính

Theo phân loại về nguy cơ gây ung thư của các tạp chất trong thuốc của Muller, các tạp được chia thành 5 nhóm. Theo đó, tạp D của carvedilol là một chất có nguy cơ gây ung thư, được xếp vào nhóm 3 (Các tạp có cấu trúc hóa học cảnh báo, không liên quan đến nguyên liệu thuốc, và tiềm năng gây đột biến gen chưa xác định) do có chứa nhóm epoxy, đây là nhóm được biết là có phản ứng với DNA và có tiềm năng gây đột biến chưa xác định ³⁴.

1.2.4.4. Một số công trình nghiên cứu tổng hợp tạp D

Năm 2011, Somiseti Narender Rao và cộng sự đã nghiên cứu tổng hợp tạp D từ 4-hydroxycarbazol như sau: 50 g 4-hydroxycarbazol được hòa tan trong DMSO và được thêm vào dung dịch natri hydroxyd. Sau đó epichlorohydrin được thêm từ từ trong 2 giờ ở nhiệt độ 25 °C và làm ấm đến 45 °C, giữ trong 10 giờ. Tiếp đó, thêm nước và khuấy trộn trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng. Sản phẩm phản ứng được lọc và rửa với nước, sau đó được kết tinh lại trong isopropanol để thu được tạp D. Hiệu suất tổng hợp là 75%, độ tinh khiết sản phẩm không được đề cập ²⁶.

Năm 2011, K. Suneel Kumar và cộng sự nghiên cứu tổng hợp tạp D cũng từ 4-hydroxycarbazol như sau: 100 g 4-hydroxycarbazol (0,545 mol) được thêm vào dung dịch natri hydroxyd trong khoảng 10-15 phút. Sau đó dung dịch được làm lạnh về 10-15 °C và thêm nhỏ giọt 150 ml DMSO trong 45 phút. Sau khi khuấy trộn 15 phút, epichlorohydrin được thêm vào trong 1 giờ, giữ ở nhiệt độ 10-15 °C. Sau đó, tăng nhiệt độ từ từ lên 45 °C và giữ trong 6 giờ dưới điều kiện khuấy trộn. Sau khi hoàn thành phản ứng, kiểm tra sản phẩm bằng sắc ký lớp mỏng, sản phẩm được hòa tan

trong nước, lọc và rửa với nước, sau đó kết tinh lại trong methanol để thu được tạp D. Nghiên cứu không đề cập hiệu suất tổng hợp và độ tinh khiết sản phẩm ¹¹.

Từ những công trình nghiên cứu trên, có thể nhận thấy rằng: các công bố tổng hợp tạp D đều đi từ nguyên liệu 4-hydroxycarbazol, quy trình tổng hợp không khác nhau nhiều, hiệu suất tổng hợp khá cao nhưng độ tinh khiết của tạp không được đề cập tới.

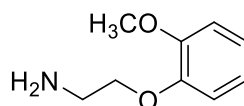
1.2.5. Tạp E carvedilol

1.2.5.1. Tính chất lý hóa

Tên khoa học: 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin, CAS: 1836-62-0.

Công thức phân tử: $C_9H_{13}NO_2$.

Công thức cấu tạo:



Khối lượng phân tử: 167,21 g/mol ³⁵.

Tạp E được thương mại hóa (đạt chuẩn USP) dưới dạng muối 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin hydroclorid monohydrat. Công thức phân tử: $C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl \cdot H_2O$ (M = 221,68 g/mol), CAS: 2057412-43-6 ³⁶.

- Dạng base tồn tại dưới dạng chất lỏng hơi vàng, mùi amoniac. Trọng lượng 1,11 g/cm³, sôi ở 98 °C ³⁵.

- Dạng muối hydroclorid monohydrat tồn tại dưới dạng bột màu trắng, không mùi. Độ tan: tan trong dimethylformamid (DMF), ethanol và methanol. Nhiệt độ nóng chảy 88,7 °C ³⁶.

1.2.5.2. Nguồn gốc phát sinh

Tạp E là nguyên liệu tổng hợp carvedilol, xuất hiện trong nguyên liệu và thành phẩm bắt nguồn từ việc tồn dư trong quá trình tổng hợp.

1.2.5.3. Độc tính

- Khi hít vào: kích thích màng nhầy.

- Khi nuốt: bỏng ở miệng, hầu họng, thực quản và đường tiêu hóa. Nguy cơ thủng thực quản và dạ dày.

- Khi tiếp xúc với da: ăn mòn.

- Khi tiếp xúc bằng mắt: ăn mòn³⁵.

1.2.5.4. Một số công trình nghiên cứu tổng hợp tạp E

Năm 2009, Thota Giridhar và cộng sự được cấp bằng phát minh tổng hợp các hợp chất 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin. Quy trình tổng hợp 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin (tạp E) qua các giai đoạn sau:

- *Giai đoạn 1: Tổng hợp 1-(2-cloroethoxy)-2-methoxybenzen*

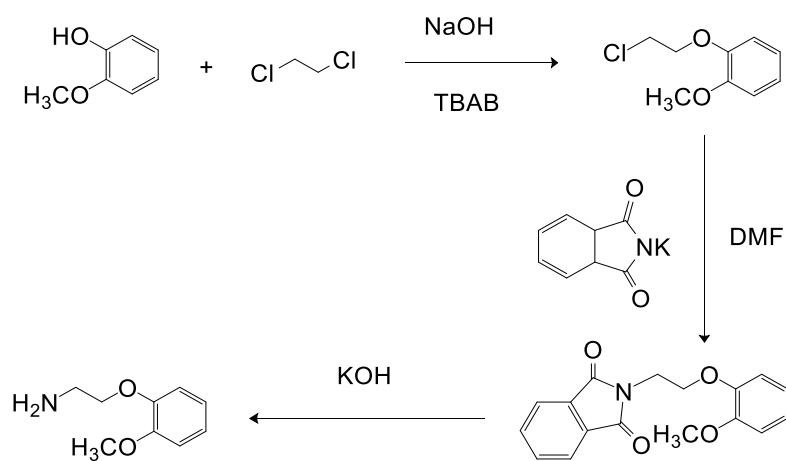
2-methoxyphenol trong 1,2-dicloroethan, dung dịch Natri hydroxyd và tetrabutylamoni bromid (TBAB) được đun hồi lưu và khuấy trộn trong 16 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh về nhiệt độ phòng và chờ tách lớp. Pha nước được chiết lỏng lỏng với dicloroethan. Lớp dung môi hữu cơ được rửa với nước và bốc hơi dung môi dưới áp suất giảm để thu cặn. Cặn này được cất chân không để thu 1-(2-cloroethoxy)-2-methoxybenzen.

- *Giai đoạn 2: Điều chế dẫn xuất phthalimid của 1-(2-cloroethoxy)-2-methoxybenzen*

1-(2-cloroethoxy)-2-methoxybenzen, kali phthalimid và TBAB được đun nóng tới 180 °C và khuấy trộn trong 3 giờ. Hỗn hợp sau phản ứng được thêm nước và lọc rửa rắn. Tủa này được thêm methanol, đun hồi lưu và khuấy trộn trong 1 giờ. Hỗn hợp phản ứng được làm nguội về nhiệt độ phòng và lọc chất rắn. Sấy chất rắn ở 60 – 80 °C để thu được dẫn xuất phthalimid của 1-(2-cloroethoxy)-2-methoxybenzen.

- *Giai đoạn 3: Tổng hợp 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin (tạp E)*

Sản phẩm giai đoạn 2 được thêm vào dung dịch KOH, hỗn hợp được đun đến 130 °C và khuấy trộn trong 13 giờ. Hỗn hợp được làm lạnh về nhiệt độ phòng và chiết lỏng lỏng với DCM. Lớp hữu cơ được thêm vào HCl 36% và khuấy trộn trong 15 phút để chờ tách lớp 1-(2-cloroethoxy)-2-methoxybenzen khô để thu được tạp E. Độ tinh khiết của tạp E là 99,71%. Hiệu suất tổng hợp tạp E không được đề cập tới³⁷.

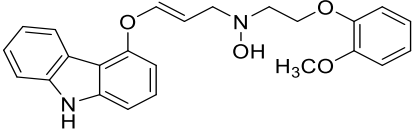
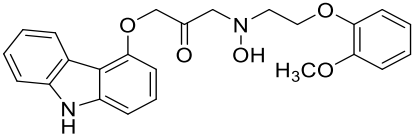


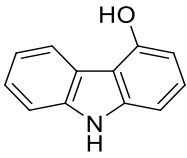
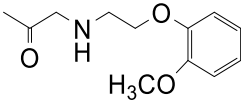
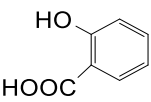
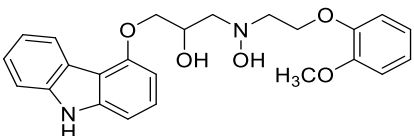
Tạp E

Sơ đồ 1.8. Sơ đồ tổng hợp tạp E dạng base theo Thota Giridhar

1.2.6. Một số tạp khác của carvedilol không được đề cập trong các dược điển tham chiếu

Bảng 1.4. Một số tạp không được đề cập trong các dược điển tham chiếu

STT	Công thức, danh pháp	M (g/mol)	Loại tạp	TLTK
1	 <i>N</i> -(2-(2-methoxyphenoxy) ethyl)-3-(9 <i>H</i> -carbazol-4-yloxy)prop-2-en-1-amin	404,47	Tạp phân hủy	38
2	 1-(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl amino)-3-(9 <i>H</i> -carbazol-4-yloxy)propan-2-on	420,47	Tạp phân hủy	38

STT	Công thức, danh pháp	M (g/mol)	Loại tạp hủy	TLTK
3	 4-hydroxycarbazol	183,21	Tạp phân hủy	38
4	 1-(2-(2-methoxyphenoxy) ethylamino)propan-2-on	223,27	Tạp phân hủy	38
5	 Acid salycilic; acid 2-hydroxybenzoic	138,12	Tạp phân hủy	26
6	 N-((2RS)-3-(9H-carbazol-4-yloxy)-2- hydroxypropyl)-N-(2-(2- methoxyphenoxy)ethyl)hydroxylamin	422,48	Tạp phân hủy	39

1.3. KIỂM NGHIỆM TẠP CHẤT CỦA CARVEDIOL TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM

1.3.1. Nguyên liệu

Được điển Mỹ 2023 qui định: có thể lựa chọn 1 trong 2 quy trình HPLC xác định tạp chất hữu cơ, trong đó quy trình thứ hai được khuyến cáo tiến hành khi tạp chất F

là tạp có khả năng xuất hiện. Quy trình 3 để xác định hàm lượng tạp F. Dược điển Châu Âu EP 11 và dược điển Anh BP 2023 quy định 1 quy trình HPLC để định lượng các tạp trong nguyên liệu. Bảng dưới đây tóm tắt quy định định lượng tạp trong nguyên liệu carvedilol trong các dược điển tham chiếu nói trên.

Bảng 1.5. So sánh quy định định lượng tạp trong nguyên liệu carvedilol trong USP 2023, EP 11 và BP 2023

		USP 2023 ¹³		EP 11 và BP 2023 ^{17,18}	JP 18 ²²
		Quy trình 1	Quy trình 2		
Pha động	ACN – dung dịch phosphat pH 2 (31:69)	Gradient gồm hai hệ: + Dung môi A: acetonitril và acid trifluoroacetic (100:0,1) + Dung môi B: acid trifluoroacetic và nước (0,1:100).	gồm	ACN – dung dịch đệm phosphat pH 2 (35:65)	ACN – dung dịch đệm phosphat pH 2 (35:65)
Dung dịch đối chiếu	Carvedilol, tạp A, B, D và E nồng độ 1 µg/ml mỗi chất và chuẩn tạp C	Dung dịch đánh giá tính phù hợp hệ thống carvedilol (chứa carvedilol và	- Tạp C nồng độ 0,2 µg/ml - Dung dịch đánh giá tính phù hợp hệ thống carvedilol (chứa carvedilol,	Dung dịch carvedilol 0,65 µg/ml	

	nồng độ 0,2 µg/ml.	tạp F) nồng độ 1,0 mg/ml	tạp A và tạp D) nồng độ 100 µg/ml	
Điều kiện sắc ký	+ Cột pha đảo L7 (15 cm x 4,6 mm, 5 µm).	+ Cột L68 (15 cm x 4,6 mm, 5 µm).	+ Cột pha đảo C8 (15 cm x 4,6 mm, 5 µm).	+ Cột pha đảo C8 (15 cm x 4,6 mm, 5 µm).
	+ Nhiệt độ cột: 55 °C.	+ Nhiệt độ cột: 30 °C	+ Nhiệt độ cột: 55 °C	+ Nhiệt độ cột: 55 °C
	+ Đầu dò UV: 220 nm (tạp E) và 240 nm (chất còn lại)	+ Đầu dò UV: 240 nm	+ Đầu dò UV: 240 nm.	+ Đầu dò UV: 240 nm.
	+ Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút	+ Tốc độ dòng: 1,4 ml/phút	+ Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút	+ Thể tích tiêm: 20 µl.
	+ Thể tích tiêm: 20 µl.	+ Thể tích tiêm: 20 µl.	+ Thể tích tiêm: 20 µl.	

1.3.2. Thành phẩm

Dược điển Mỹ 2023 và dược điển Anh BP 2023 đều qui định định lượng tạp chất trong thành phẩm viên nén carvedilol bằng phương pháp HPLC. Bảng dưới đây tóm tắt quy định định lượng tạp trong viên nén carvedilol trong các dược điển tham chiếu nói trên.

Bảng 1.6. So sánh các quy định định lượng tạp trong viên nén carvedilol trong USP 2023 và BP 2023 bằng HPLC

USP 2023 ¹³	BP 2023 ¹⁸	JP 18 ²²
------------------------	-----------------------	---------------------

Pha động	Đệm phosphat pH 3 (thêm triethylamin và natri doceeryl sulfat) – ACN (15:72)	Rửa giải gradient gồm 2 hệ: + Hệ dung môi A: dung dịch natri dodecyl sulfat 0,69% (kl/tt) trong đệm phosphat pH 3 – ACN – nước (75:360:565, tt/tt/tt) + Hệ dung môi B: dung dịch natri dodecyl sulfat 0,69% (kl/tt) trong đệm phosphat pH 3 – ACN – nước (75 : 450 : 475, tt/tt/tt)	Đệm phosphat pH 5– MeOH (45:55)
Dung dịch đối chiếu	Dung dịch carvedilol 1,25 µg/ml	Dung dịch tạp C 0,025 µg/ml và dung dịch đánh giá tính phù hợp hệ thống carvedilol nồng độ 0,1% (kl/tt)	
Điều kiện sắc ký	+ Cột pha đảo L7 (50 mm x 4,6 mm). + Nhiệt độ cột: 40 °C. + Đầu dò UV: 240 nm + Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút	+ Cột thép không gỉ C8 (50 x 4,6 mm, 3 µm) + Nhiệt độ cột 40 °C + Đầu dò UV: 240 nm + Tốc độ dòng 1,0 ml/phút + Thể tích tiêm mẫu: 25 µl	+ Cột thép không gỉ C18 (50 x 4,6 mm, 3 µm) + Nhiệt độ cột 40 °C + Đầu dò UV: 240 nm

+ Thê tích tiêm: 15 μl.	+ Thê tích tiêm: 50 μl
----------------------------	---------------------------

1.3.3. Giới hạn cho phép của các tạp theo Dược điển trong nguyên liệu và thành phẩm

Bảng dưới đây tổng hợp giới hạn cho phép của các tạp trong nguyên liệu và viên nén carvedilol được quy định trong các Dược điển tham chiếu

Bảng 1.7. Giới hạn cho phép của các tạp trong nguyên liệu và viên nén carvedilol được quy định trong các Dược điển tham chiếu

	Nguyên liệu (%)			Thành phẩm (%)		
	USP 2023	BP 2023 & EP 11	JP 18	USP 2023	BP 2023	JP 18 *
Tạp A (USP)	0,1	0,2	-	-	-	-
Tạp B (	0,1	0,1	-	-	-	-
Tạp C	0,02	0,02	-	-	0,02	-
Tạp D (USP)	0,1	-	-	-	-	-
Tạp D (BP & EP)	-	0,15	-	-	-	-
Tạp E	0,1	-	-	-	-	-
Tạp F	0,1	-	-	-	-	-
Carvedilolbisalkyl pyrocatechol	0,15	-	-	-	-	-
N- isopropylcarvedilol	0,1	-	-	-	-	-
Biscarbazol	0,1	-	-	-	-	-
Tạp có thời gian lưu tương đối 1,7-1,9 so với carvedilol	-	-	-	-	-	0,1

Tạp có thời gian lưu tương đối 2,0-3,1 so với carvedilol	-	-	-	-	-	0,4
Tạp riêng lẻ	0,1	0,1	0,15	0,2	0,2	0,1
Tổng tạp (trừ tạp C)	-	0,5	-	-	0,5	-
Tổng tạp	0,5	-	0,5	1,0	-	0,6

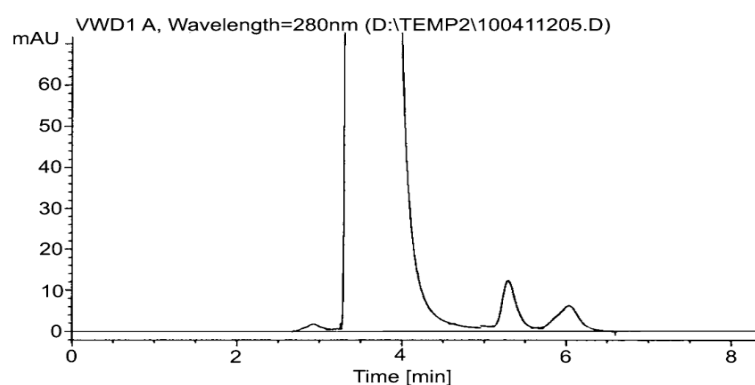
(*) Ghi chú: Viên nén hàm lượng 10 – 20 mg

1.4. MỘT SỐ CÔNG TRÌNH PHÂN TÍCH TẠP CHẤT LIÊN QUAN CỦA CARVEDILOL

1.4.1. Định lượng đồng thời các tạp của carvedilol bằng HPLC

1.4.1.1. Nghiên cứu của Stojanovic và cộng sự (2005):

- Đối tượng định lượng: carvedilol, tạp C và 4-hydroxycarbazol.
- Điều kiện sắc ký:
 - + Pha động: acetonitril : nước, tỷ lệ 45:55, tt/tt, điều chỉnh pH 2,5;
 - + Cột: Chromolit RP 8e (100 x 4,6 mm; 5 µm);
 - + Bước sóng phát hiện: 280 nm;
 - + Tốc độ rửa giải gradient: 0,5 ml/phút;
 - + Nhiệt độ cột: 40 °C ¹⁴;



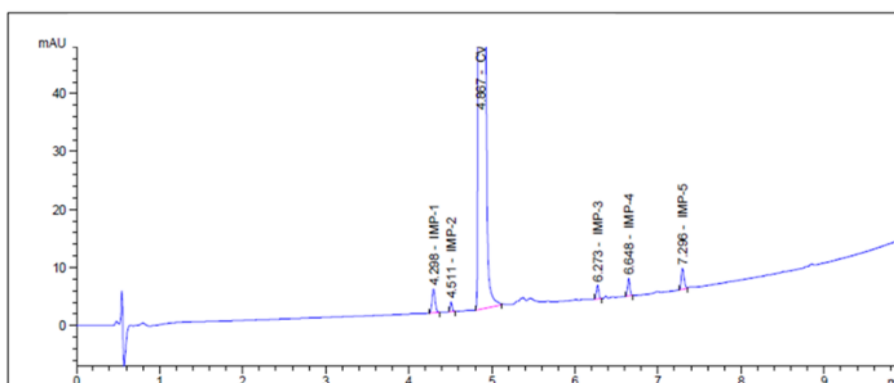
Hình 1.1. Sắc ký đồ định lượng các tạp của carvedilol trong viên nén trong nghiên cứu của Stojanovic

Nguồn: Stojanovic, 2005 ¹⁴

- Nhận xét: Phương pháp có thời gian phân tích ngắn, độ nhạy khá tốt. Tuy nhiên, phương pháp chỉ định lượng đồng thời carvedilol, tạp C và tạp 4-hydroxycarbazol.

1.4.1.2. Nghiên cứu của Sajjan và cộng sự (2014):

- Đối tượng phân tích: carvedilol, các tạp A, B, C và hai tạp 4-hydroxycarbazol, biscarbazol.
- Điều kiện sắc ký:
 - + Pha động: chương trình gradient gồm 2 thành phần: Dung môi A (dung dịch acid trifluoroacetic 0,04% trong nước) và dung môi B (dung dịch acid trifluoroacetic 0,04% trong acetonitril);
 - + Cột Acquity UPLC BEH C18 (100 x 2,1 mm; 1,7 μ m);
 - + Bước sóng phát hiện: 240 nm;
 - + Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút;
 - + Thể tích tiêm: 3 μ l;
 - + Nhiệt độ cột: 60 °C ³⁹;



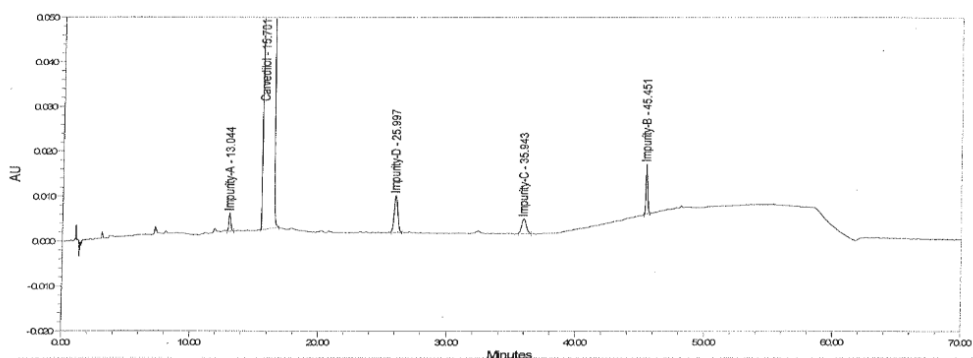
Hình 1.2. Sắc ký đồ định lượng các tạp của carvedilol trong viên nén trong nghiên cứu của Sajjan

Nguồn: Sajjan, 2014 ³⁹

- Nhận xét: Phương pháp có độ nhạy cao, định lượng đồng thời carvedilol và 5 tạp. Tổng thời gian phân tích ngắn (10 phút). Tuy nhiên, phương pháp cần có hệ thống UPLC, đồng thời không định lượng 2 tạp tồn dư là tạp D và tạp E.

1.4.1.3. Nghiên cứu của T. V. Raghava Raju và cộng sự (2015):

- Đối tượng định lượng: Carvedilol và các tạp A, B, C, D.
- Điều kiện sắc ký:
 - + Pha động: kênh A gồm acid trifluoroacetic, acetonitril và nước (0,1:10:90, tt/tt/tt); kênh B gồm acid trifluoroacetic, acetonitril và nước (0,1:90:10, tt/tt/tt). Chương trình rửa giải gradient: thời gian (phút) / % kênh B: 00,01/19, 5/19, 25/30, 37/30, 47/49, 57/49, 60/19, 70/19;
 - + Cột pha đảo Inertsil C8-3 (150 x 4,6 mm; 3 μ m);
 - + Bước sóng phát hiện: 240 nm;
 - + Tốc độ dòng: 1,4 ml/phút;
 - + Nhiệt độ cột: 50 °C⁴⁰;



Hình 1.3. Sắc ký đồ định lượng các tạp của carvedilol trong nguyên liệu và viên nén trong nghiên cứu của Raghava Raju

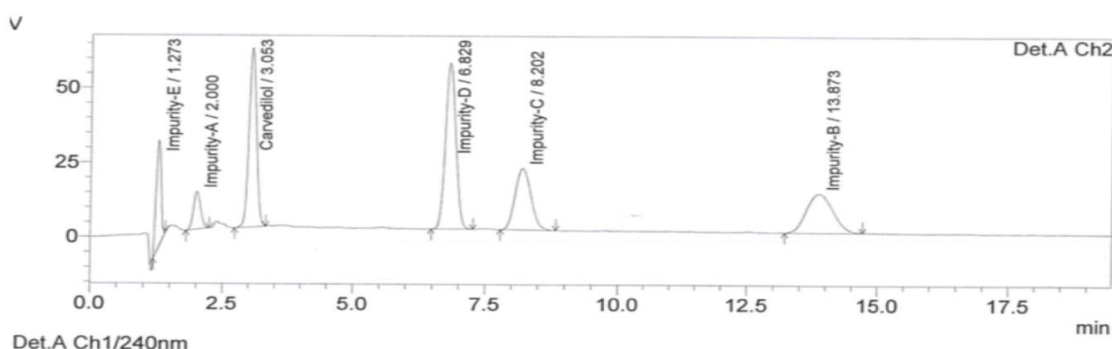
Nguồn: Raju, 2015⁴⁰

- Nhận xét: Các pic tách tốt, pic đối xứng. Phương pháp có độ nhạy tốt với giá trị LOD và LOQ thấp. Tuy nhiên, sắc ký đồ có đường nhiễu nền lớn, thời gian phân tích lớn (gần 50 phút), không định lượng tạp E.

1.4.1.4. Nghiên cứu của L. Samba Siva Rao và cộng sự (2015):

- Đối tượng phân tích: carvedilol và các tạp A, B, C, D, E.
- Điều kiện sắc ký:
 - + Pha động: acid trifluoroacetic 0,1% : methanol : acetonitril (50:30:20);

- + Cột pha đảo Inertsil ODS 3V (150 x 4,6 mm; 5 μ m);
- + Bước sóng phát hiện: 220 nm đối với tạp E, 240 nm đối với carvedilol và các tạp khác;
- + Nhiệt độ cột: 55 °C;
- + Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút;
- + Thể tích tiêm: 20 μ l ¹²;



Hình 1.4. Sắc ký đồ định lượng các tạp của carvedilol trong viên nén trong nghiên cứu của Samba Siva Rao

Nguồn: Samba Siva Rao, 2015

- Nhận xét: Các pic trên sắc ký đồ tách tốt, pic đối xứng. Độ đúng và độ chính xác của phương pháp tốt, đã định lượng đủ 5 tạp A, B, C, D, E. Phương pháp có thời gian phân tích ngắn (20 phút). Tuy nhiên, độ nhạy của phương pháp còn thấp (trung bình các tạp có LOD và LOQ tương ứng là 1,5 và 4,6 μ g/ml).

1.4.1.5. Nghiên cứu của Kang Tie-chun và cộng sự (2015):

- Đối tượng phân tích: carvedilol và các tạp D, E.
- Điều kiện sắc ký:
 - + Pha động: chương trình gradient dung môi gồm acetonitril và đệm kali dihydrophosphat 0,02 M pH 2,0;
 - + Cột: YMC-Pack Pro C8 (150 mm×4.6 mm, 5 μ m);
 - + Bước sóng phát hiện: 220 nm đối với tạp E, 240 nm đối với carvedilol và tạp D;
 - + Nhiệt độ cột: 30 °C;

+ Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút ⁴¹.

- Nhận xét: Phương pháp có khoảng tuyến tính phù hợp, độ đúng và độ lặp lại cao. Tuy nhiên, giá trị LOD và LOQ của phương pháp cao, đồng thời chỉ định lượng 2 tạp D và E.

1.4.1.6. Nghiên cứu của Nitin Mahajan và cộng sự (2021):

- Đối tượng định lượng: Carvedilol và các tạp A, B, C, D.

- Điều kiện sắc ký:

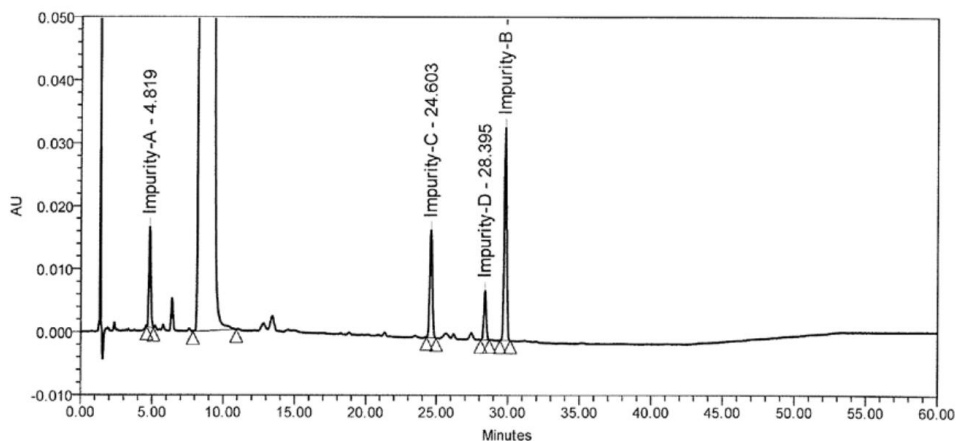
+ Pha động: chương trình gradient gồm dung môi A (nước : acetonitril : acid trifluoroacetic, 80:20: 0,1, tt/tt/tt, pH 2); dung môi B (nước : acetonitril, 10:90, tt/tt);

+ Cột: Inertsil ODS 3V (150 x 4,6 mm; 5 µm);

+ Bước sóng phát hiện: 240 nm;

+ Tốc độ rửa giải gradient: 1,0 ml/phút;

+ Nhiệt độ cột: 40 °C ⁴²;



Hình 1.5. Sắc ký đồ định lượng các tạp của carvedilol trong viên nén trong nghiên cứu của Nitin Mahajan

Nguồn: Nitin Mahajan, 2021 ⁴²

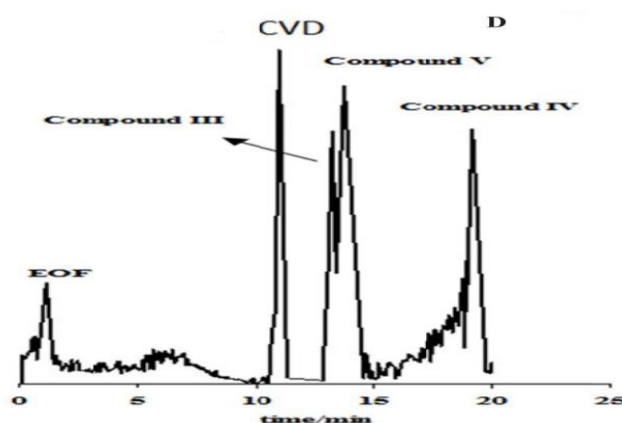
- Nhận xét: Các pic phân giải tốt, pic đối xứng. Độ nhạy của phương pháp tốt, thể hiện ở giá trị LOD và LOQ của carvedilol và các tạp thấp. Tuy nhiên, thời gian phân tích dài (60 phút), phương pháp không định lượng tạp E.

1.4.2. Định lượng đồng thời các tạp của carvedilol bằng điện di mao quản

Nghiên cứu của Abolghasem Jouyban và cộng sự đã đánh giá sự tạo thành các tạp của carvedilol dưới các điều kiện khắc nghiệt bằng điện di mao quản³⁸.

- Điều kiện điện di:

- + Cột mao quản silica (Chiều dài tổng: 57 cm, đường kính trong: 75 μ m)
- + Dung dịch chất điện ly nền (BGE): Đệm acetat 80 mM pH 4 pha trong methanol/ethanol (65:35% tt/tt)
- + Điện thế 19 kV
- + Nhiệt độ 20 °C
- + Tiêm mẫu 50 mBar – 6 giây
- + Bước sóng phát hiện: 200-350 nm



Hình 1.6. Điện di đồ định lượng carvedilol và các tạp phân huỷ

Nguồn: Stojanovic, 2014³⁸

- Nhận xét: Phương pháp điện di mao quản trên mới chỉ định lượng carvedilol và định tính các tạp phân huỷ tạo thành mà chưa định lượng các tạp đó. Đồng thời, nhiễu đường nền của điện di đồ còn cao.

1.4.3. Nhận xét chung

Qua tổng quan tài liệu cho thấy, chưa có nhiều công trình nghiên cứu định lượng đồng thời các tạp A, B, C, D, E của carvedilol. USP 2023 quy định kiểm tra các tạp trong nguyên liệu carvedilol bằng HPLC, nhưng quy trình định lượng khá phức tạp, rửa giải bằng chương trình gradient dung môi với thời gian phân tích dài.

USP cũng quy định đánh giá tổng các tạp và các tạp riêng lẻ trong viên nén carvedilol mà không sử dụng chất đối chiếu để đánh giá các tạp cụ thể. Trong các nghiên cứu định lượng carvedilol và tạp chất bằng HPLC, chỉ có nghiên cứu của L. Samba Siva Rao và cộng sự¹² định lượng đầy đủ cả 5 tạp A, B, C, D, E và carvedilol trong thành phẩm, trong khi các nghiên cứu còn lại chỉ định lượng đồng thời từ 2 đến 4 tạp. Tuy có thời gian phân tích ngắn, quy trình phân tích đơn giản nhưng độ nhạy của phương pháp chưa tốt, với các giá trị LOD và LOQ khá cao.

Đặc biệt, tổng quan tài liệu cũng cho thấy chưa có nghiên cứu nào định lượng đồng thời các tạp của carvedilol bằng phương pháp điện di mao quản. Nghiên cứu của Abolghasem Jouyban và cộng sự chỉ đánh giá sự tạo thành các tạp của carvedilol dưới các điều kiện khắc nghiệt bằng điện di mao quản³⁸. Các tạp được đề cập không phải là tạp A, B, C, D, E theo USP 2023.

1.5. THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU

1.5.1. Định nghĩa và phân loại

1.5.1.1. Định nghĩa chất đối chiếu

CĐC là chất đồng nhất đã được xác định là đúng để dùng trong các phép thử đã được quy định về hoá học, vật lý và sinh học. Trong các phép thử đó các tính chất của CĐC được so sánh với các tính chất của chất cần thử. CĐC phải có độ tinh khiết phù hợp với mục đích sử dụng¹⁹.

CĐC được dùng trong các phép thử sau:

Định tính bằng phương pháp quang phổ hấp thụ hồng ngoại.

Định lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến, quang phổ huỳnh quang.

Các phép thử định tính tạp chất và định lượng bằng phương pháp sắc ký.

Định lượng bằng phương pháp vi sinh vật.

Các phép chuẩn độ đo thể tích, phân tích khối lượng.

Các phép thử sinh học.

1.5.1.2. Phân loại chất đối chiếu

Chất đối chiếu sơ cấp hay chất đối chiếu hóa học gốc (PCRS) là chất đối chiếu được công nhận rộng rãi, có các chỉ tiêu chất lượng phù hợp với tài liệu công bố, cụ thể và giá trị ổn định của nó được sử dụng làm tiêu chuẩn phân tích mà không cần phải so sánh với chất hóa học khác.

Một số chất đối chiếu được coi là chất đối chiếu hóa học gốc như chất đối chiếu hóa học Quốc tế (ICRS), chất đối chiếu hóa học Dược điển Mỹ (USPRS), chất đối chiếu hóa học Dược điển châu Âu (EPCRS), chất chất đối chiếu hóa học do Viện tiêu chuẩn và công nghệ quốc gia Mỹ (NIST) thiết lập.

Chất đối chiếu hóa học thứ cấp (SCRS) là chuẩn mà các tính chất hay chỉ tiêu chất lượng của nó được thiết lập dựa trên chuẩn sơ cấp. SCRS lại được chia thành hai loại:

- Chuẩn thứ cấp - SCRS “chính thức”: là một SCRS khu vực hay quốc gia. Ví dụ như chất đối chiếu hóa học Asean (ACRS), chất đối chiếu Dược điển Việt Nam.
- Chuẩn làm việc: là một SCRS do một nhà sản xuất hoặc một phòng thí nghiệm cung cấp.

SCRS được dùng làm chất chuẩn đối chiếu cho các phân tích thường ngày của phòng thí nghiệm⁴³⁻⁴⁶.

1.5.2. Mục đích sử dụng của chất chuẩn đối chiếu

Trong lĩnh vực kiểm tra chất lượng của ngành dược, chất chuẩn đối chiếu có thể được sử dụng trong các phép thử sau:

- Định tính bằng phương pháp phổ hấp thụ hồng ngoại.
- Định lượng bằng phương pháp quang phổ hấp thụ tử ngoại và khả kiến, quang phổ huỳnh quang.
- Các phép thử định tính và định lượng bằng phương pháp sắc ký.
- Định lượng bằng phương pháp vi sinh vật.
- Các phương pháp chuẩn độ đo thể tích, phân tích khối lượng.
- Các phép thử sinh học.

- Hiệu chuẩn thiết bị, thẩm định phương pháp.
- Một số phép thử khác có hướng dẫn trong các chuyên luận riêng ^{47,48}.

1.5.3. Thiết lập, bảo quản và phân phối chất đối chiếu gốc

1.5.3.1. Đánh giá nhu cầu

Việc sản xuất, xác nhận, duy trì và phân phối các CDC hóa học là một công việc tốn kém và mất thời gian. Do đó, điều quan trọng là phải xác định chắc chắn liệu có nhu cầu về một CDC không. Vấn đề đầu tiên cần đánh giá là liệu có thể áp dụng một quy trình thay thế, thỏa mãn yêu cầu mà không yêu cầu CDC hay không ⁴⁹.

1.5.3.2. Lựa chọn nguồn nguyên liệu dùng để thiết lập CDC từ nhà cung cấp

Nguyên liệu nguồn có chất lượng đạt yêu cầu có thể được chọn từ một lô chất có nguồn gốc từ quá trình sản xuất thông thường, nếu độ tinh khiết chấp nhận được. Các yêu cầu về độ tinh khiết đối với chất chuẩn hóa học phụ thuộc vào mục đích sử dụng của nó. CDC hóa học được sử dụng cho phép thử định tính hoặc sắc ký lớp mỏng không yêu cầu độ tinh khiết thật cao, vì sự hiện diện của một tỷ lệ nhỏ tạp chất trong chất thường không có ảnh hưởng đáng chú ý đến phép thử. Mặt khác, các CDC được sử dụng trong định lượng phải có độ tinh khiết cao, nên từ 99,5% trở lên. Cần xem xét ảnh hưởng của các tạp chất trong CDC, có thể các tạp chất có các đặc tính hóa lý tương tự như của thành phần chính nhưng không ảnh hưởng tới giá trị sử dụng của CDC hóa học, trong khi có những vết tạp chất có các đặc tính khác chất chính nhưng có thể khiến chất đó không phù hợp để làm CDC nữa ⁴⁹.

1.5.3.3. Đánh giá mục đích sử dụng của CDC gốc

- Sử dụng cho phép định tính: thông thường chỉ cần đánh giá từ tối thiểu 1 PTN đạt tiêu chuẩn.

- Sử dụng cho phép thử tinh khiết: Các đặc tính cần được đánh giá đầy đủ hơn so với phép thử định tính, đặc biệt trong các phép thử giới hạn. Với kỹ thuật sắc ký lớp mỏng, thì độ tinh khiết tối thiểu có thể chấp nhận thường là 90%, nhưng với sắc ký lỏng hoặc sắc ký khí, độ tinh khiết phải ít nhất đạt 95%. Thông thường chỉ cần

một PTN đánh giá CDC được sử dụng trong các phép thử độ tinh khiết. Nếu CDC được điều chế hoặc cô lập lần đầu tiên, thì các phép thử hóa lý và hóa học thích hợp như cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), khối phổ (MS) và phân tích nguyên tố phải được áp dụng để xác định đặc tính của nó.

- Sử dụng cho phép thử định lượng: Các phép thử cần đánh giá nhiều hơn, sử dụng nhiều kỹ thuật đã được thiết lập và thẩm định, bao gồm cả kỹ thuật để đánh giá tiêu chuẩn chất lượng được quy định trong dược điển. Cần tối thiểu ba PTN tham gia đánh giá. Với các phương pháp định lượng không đặc hiệu như so màu hay quang phổ UV, chỉ cần kiểm tra khả năng phản ứng hoặc hấp thụ của các tạp chất ảnh hưởng đến CDC. Với các phương pháp định lượng đặc hiệu, việc xác định hàm lượng của các tạp chất là cần thiết. Đối với hầu hết các CDC gốc dùng trong định lượng, hàm lượng có thể được biểu thị dưới dạng “nguyên trạng”. Do đó, khi thiết lập CDC gốc, điều cần thiết là xác định hàm lượng nước và dung môi tồn dư⁴⁹.

- Sử dụng cho hiệu chuẩn thiết bị: yêu cầu tương tự CDC dùng trong định lượng⁴⁹.

1.5.3.4. Phương pháp phân tích để đánh giá chất đối chiếu gốc

+ Nhóm các phương pháp định tính: Trong trường hợp CDC có cấu trúc đã được xác định thỏa đáng, chỉ cần phổ IR để định tính. Các kỹ thuật đặc hiệu cao khác, chẳng hạn như quang phổ NMR, MS, hoặc nhiễu xạ tia X, cũng có thể được sử dụng để so sánh như vậy.

+ Nhóm các phương pháp định lượng: cần xem xét đến mục đích sử dụng của CDC, có thể chia thành 3 nhóm: các phương pháp cần CDC ngoài như sắc ký, quang phổ; các phương pháp chỉ phụ thuộc vào tính chất động học nội tại của chất như phân tích độ tan pha, quét nhiệt vi sai; các phương pháp khác (quang phổ, chuẩn độ, xác định lượng nước và thành phần bay hơi...) ⁴⁹.

1.5.3.5. Xác định giá trị ấn định

Giá trị ấn định được xác định thông qua một chương trình hợp tác liên PTN sử dụng các phương pháp phân tích khác nhau. Giá trị thu được bằng thực nghiệm này được xử lý thống kê và đại diện cho ước tính tốt nhất về giá trị thực⁴⁹.

1.5.3.6. Đóng gói, bảo quản, phân phối và đánh giá độ ổn định

- Đóng gói

Việc đóng gói các CDC phải được kiểm soát, để tránh nhiễm bẩn mẫu, dán nhãn sai hoặc bất kỳ trường hợp nào khác có thể dẫn đến việc xử lý sai. Vật liệu chứa CDC phải ngăn được ẩm, ánh sáng và oxy. Lượng CDC đóng vào chỉ nên đủ cho một lần sử dụng, đặc biệt với các chất dễ hút ẩm. Một số CDC hóa học phải được đóng gói trong khí trơ hoặc trong điều kiện độ ẩm được kiểm soát.

- Bảo quản

Về mặt lý thuyết, nhiệt độ bảo quản càng thấp thì độ ổn định của chất càng tăng, nhưng đối với các chất có chứa nước, việc bảo quản dưới 0 °C có thể làm giảm độ ổn định. Điều kiện bảo quản CDC ở khoảng 5 °C, với đồ bao gói chống ẩm và ánh sáng là phù hợp với hầu hết CDC. Chỉ mở lọ CDC khi đã đạt được nhiệt độ phòng để ngăn chặn xâm nhập độ ẩm do ngưng tụ ⁴⁹.

- Phân phối

Việc phân phối các CDC trong cùng một quốc gia thường không có vấn đề gì. Tuy nhiên, việc phân phối CDC từ quốc gia này đến quốc gia khác có thể gặp khó khăn do các quy định về bưu chính và hải quan không phù hợp. Việc cung cấp các CDC hóa học cho người sử dụng phải có sự chậm trễ tối thiểu và nên chọn phương tiện vận chuyển nhanh nhất.

- Đánh giá độ ổn định

Điều quan trọng của CDC là độ ổn định, do đó phải giám sát thường xuyên độ ổn định của CDC và phải thay thế ngay khi có một “thay đổi đáng kể” (tính theo mục đích sử dụng của CDC) trong bất kỳ chỉ tiêu nào được ghi nhận.

Tần suất và mức độ đánh giá lại CDC phụ thuộc vào nhiều yếu tố: độ ổn định, bao bì, bảo quản, tính thấm ẩm, dạng tinh thể và mục đích sử dụng. Tần suất và phương pháp thử nghiệm áp dụng phải được ghi thành hồ sơ ⁴⁹.

1.5.4. Đóng gói, bảo quản và phân phối chất đối chiếu thứ cấp

Thiết lập CDC thứ cấp là nhu cầu thực tế do số lượng CDC gốc không đủ để cung cấp cho nhu cầu của các quốc gia. Hơn nữa, sự sẵn có của CDC thứ cấp sẽ làm

giảm chi phí và thời gian giao nhận CĐC. Trên cơ sở tham khảo quy trình thiết lập CĐC gốc, các hội đồng được điển quốc gia hay khu vực hoặc các PTN được ủy quyền của cơ quan quản lý được quốc gia xây dựng quy trình thiết lập CĐC thứ cấp của quốc gia / khu vực đó.

Khi dự định thiết lập CĐC thứ cấp để sử dụng trong phép định lượng nguyên liệu hay thành phẩm, nguồn cung cấp có thể là nguyên liệu được dùng. Trong trường hợp CĐC là tạp chất liên quan, nguyên liệu có thể được lấy từ các nhà cung cấp thương mại, với điều kiện là độ tinh khiết phần trăm lớn hơn 95% (hoặc 90% nếu để sử dụng trong SKLM). Yêu cầu và quy trình đóng gói SCRS tương tự với PSCR⁴⁹.

Việc phân phối các CĐC thứ cấp được thực hiện sao cho duy trì tính toàn vẹn của chất và tránh sự chậm trễ không cần thiết. Các yếu tố sau được tính đến gồm sự phù hợp với các yêu cầu về an toàn và vận chuyển, thủ tục xuất khẩu và nhập khẩu, các quy định hải quan, và phương tiện vận chuyển⁴⁹.

Việc phân loại SCRS mang ý nghĩa tương đối. Một SCRS của khu vực hay quốc gia có thể được coi là chất chuẩn sơ cấp để thiết lập chất chuẩn PTN của các PTN hoặc các NSX được phẩm. Trong trường hợp này, các chất chuẩn khu vực hay quốc gia được gọi là chuẩn liên kết. Theo qui định của ASEAN, chương trình đánh giá lại CĐC ASEAN (ACRS) được thiết kế để phát hiện các dấu hiệu sớm của quá trình phân hủy bằng các kỹ thuật phân tích phù hợp. Các kỹ thuật này phải đáp ứng được các yêu cầu: sử dụng lượng mẫu ít, tiến hành nhanh, độ nhạy cao^{48,50}.

Tần suất và cỡ mẫu dùng cho đánh giá lại phụ thuộc một số yếu tố như độ ổn định của CĐC, đồ bao gói, nút đóng của đồ bao gói, điều kiện bảo quản, độ ẩm, tính chất vật lý và mục đích sử dụng của CĐC. Đối với ACRS tần suất đánh giá lại được qui định như sau: 3 năm đối với CĐC dùng cho phép thử hóa học, 2 năm đối với CĐC dùng cho phép thử vi sinh, 1 năm đối với các chất đặc biệt nhạy cảm⁵⁰.

1.5.5. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng đánh giá chất đối chiếu và yêu cầu của quy trình phân tích

Tiêu chuẩn chất lượng của một CĐC được xây dựng dựa trên tiêu chuẩn chất lượng của các hợp chất được sử dụng làm CĐC được công bố trong được điển hoặc

tiêu chuẩn chất lượng của NSX, các đặc điểm thuộc về bản chất của vật lí, hóa học của chất nghiên cứu và mục đích sử dụng của CDC.

Phương pháp phân tích sử dụng để đánh giá các chỉ tiêu chất lượng của CDC phải là các phương pháp chính thống trong dược điển, và là phương pháp dự kiến sẽ sử dụng để đánh giá mẫu bằng CDC đó. Chẳng hạn một CDC dự kiến thiết lập cho mục đích định lượng bằng vi sinh vật thì giá trị ấn định hay hàm lượng của CDC đó phải được xác định bằng chính phương pháp định lượng vi sinh sau khi hợp chất đó đã được sơ bộ đánh giá bằng các phép thử hóa học đạt yêu cầu.

Các chỉ tiêu chất lượng thông thường hay được công bố trên chứng chỉ phân tích của CDC: mô tả, định tính, pH, kim loại nặng, hàm lượng nước, năng suất quay cực, cặn sau khi nung, điểm chảy, độ trong và màu sắc dung dịch, giảm khối lượng do sấy khô, tro sulfat, tạp hữu cơ bay hơi, tạp chất liên quan, định lượng.

Một số phương pháp phân tích chính thống trong dược điển hay dùng để xác định các chỉ tiêu chất lượng của hoạt chất hoặc thành phẩm thuốc:

- + Định tính: IR; HPLC; SKLM; UV-Vis; điểm chảy.

- + Độ tinh khiết: các kĩ thuật sắc ký như HPLC, SKLM dùng để xác định tạp chất liên quan, GC dùng để xác định dung môi hữu cơ bay hơi hoặc tồn dư dung môi; xác định góc quay cực riêng; đo pH; quét nhiệt vi sai; xác định kim loại nặng; xác định tro sulfat; độ ẩm; giảm khối lượng do sấy (sấy thường/sấy chân không); hàm lượng nước.

- + Định lượng: HPLC; UV-Vis; chuẩn độ thể tích; định lượng bằng phương pháp vi sinh

Các CDC dự kiến được thiết lập là CDC thứ cấp, tuân theo hướng dẫn của WHO, ASEAN trong quá trình thiết lập chuẩn⁴⁸⁻⁵⁰.

1.5.6. Tình hình thiết lập chất đối chiếu tại Việt Nam

Các chất chuẩn nói chung và đặc biệt là các chất chuẩn tạp ở Việt Nam còn rất hạn chế do số lượng chất chuẩn thiết lập được trong nước còn ít so với lượng hoạt chất đang lưu hành trên thị trường. Tại Việt Nam hiện nay, số lượng tạp chuẩn được thiết lập còn rất ít, khoảng 27 chất, do Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện

kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh thiết lập. So sánh với nhu cầu sử dụng chuẩn tạp chất thì số lượng này là quá ít. Đồng thời các chất chuẩn đã thiết lập chủ yếu là chuẩn làm việc, chưa phải là chuẩn Dược điển Việt Nam ^{51,52}.

Bên cạnh đó, tại Việt Nam đã có một số đề tài nghiên cứu tổng hợp tạp chất dùng cho công tác kiểm nghiệm thuốc như:

- Tổng hợp 8-cloro-1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion (8-clorocafein) tạp E của dimenhydrinat ⁵³.
- Tổng hợp và thiết lập chuẩn đối chiếu tạp chất A của diclofenac ⁵⁴.
- Thiết lập tạp chất đối chiếu A và C của fluconazol ⁵⁵.
- Tổng hợp 2-methyl-4-nitroimidazol, tạp chất A của metronidazol làm chất đối chiếu ⁵⁶.
- Tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạp chất liên quan 2-azaspiro[4.5]decan-3-on của gabapentin ⁵⁷.
- Tổng hợp và thiết lập tạp chất đối chiếu captopril disulfid ^{58,59}.
- Tổng hợp và tiêu chuẩn hóa tạp chất liên quan 4-methylbenzensulfonamid (tạp A) và 2-nitroso-octahydrocyclopentapyrrol (tạp B) của gliclazid ⁶⁰.
- Tổng hợp và xây dựng tiêu chuẩn tạp glimepirid sulfonamid (tạp B) và glimepirid urethan (tạp C) của glimepirid ⁶¹.
- Tổng hợp và tiêu chuẩn hóa tạp chất L-cystin và N,N'-diacetyl-L-cystin của N-acetylcystein ⁶².
- Tổng hợp tạp chuẩn D của amlodipin từ amlodipin besylat ⁶³.
- Thiết lập tạp chất đối chiếu N-butyryl-N-([2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl)-L-valin (tạp B của valsartan) ⁶⁴.
- Tổng hợp và thiết lập tạp chuẩn A, B và C của terazosin ^{65,66}.
- Tổng hợp và thiết lập tạp chuẩn captopril disulfid, tạp 7-ADCA và D-phenylglycin của cephalixin, tạp D của amlodipin, tạp A và B của nifedipin ⁶⁷.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. THIẾT KẾ NGHIÊN CỨU

Thiết kế nghiên cứu trong đề tài là nghiên cứu quan sát phân tích.

2.2. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

2.2.1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 5 chất hóa học là tạp chất liên quan của carvedilol theo USP:

- Tạp A carvedilol: 1-(4-(2-hydroxy-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propoxy)-9H-carbazol-9-yl)-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propan-2-ol.
- Tạp B carvedilol: 3,3'-(2-(2-methoxyphenoxy)ethylazandiyl)bis(1-(9H-carbazol-4-yloxy)propan-2-ol).
- Tạp C carvedilol: 1-(9H-Carbazol-4-yloxy)-3-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propan-2-ol.
- Tạp D carvedilol: 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol; 4-(2,3-epoxypropoxy)carbazol; 4-(2-oxiranylmethoxy)-9H-carbazol.
- Tạp E carvedilol: 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin.
- 06 mẫu thành phẩm viên nén khác nhau chứa carvedilol (hàm lượng 6,25 mg và 12,5 mg) đang được lưu hành trên thị trường Việt Nam được ký hiệu M1, M2, M3, M4, M5, M6 và 03 mẫu nguyên liệu carvedilol được ký hiệu NL1, NL2, NL3.

2.2.2. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Bảng 2.1. Các chất đối chiếu dùng trong nghiên cứu

Stt	Chất đối chiếu	Số lô / Số kiểm soát	Xuất xứ	Độ tinh khiết
1	Carvedilol	10-SCC-93-1	TRC, Canada	98,0%
2	Tạp A carvedilol	R037U0	USP	100%
3	Tạp B carvedilol	R100J0	USP	100%
4	Tạp C carvedilol	R038F0	USP	100%
5	Tạp D carvedilol	R100B0	USP	100%
6	Tạp E carvedilol	R100C0	USP	100%

Bảng 2.2. Hóa chất và dung môi dùng trong nghiên cứu

Stt	Hóa chất – dung môi	Xuất xứ	Độ tinh khiết
1	4-(Oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol	Energy chemical	98%
2	4-hydroxycarbazol	Energy chemical	98%
3	Epiclorohydrin	Acros Organics	99%
4	2-(2-Methoxyphenoxy)ethanamin	Energy chemical	98%
5	Monoglyme (99%)	Xilong	99,5%
6	Dimethyl sulfoxid (DMSO)	Energy chemical	99%
7	Benzyl bromid	Xilong	99%
8	Benzyl clorid	Acros Organics	99%
9	Carvedilol	Oceanic Pharmachem	100%
10	Silica gel 60	Merck	
11	Triethylamin (TEA)	Merck	99%
12	Acid-1-heptansulfonic	MP Biomedicals	98 %
13	Acid trifluoroacetic (TFA)	Merck	99,9 %
14	Acetonitril	Merck	99,9%
15	Methanol	Merck	99,9%
16	Acid phosphoric	Merck	85%
17	Kali dihydrophosphat	Merck	99,5%
18	Natri tetraborat decahydrat	Merck	99%
19	Acid boric	Merck	99%
20	Natri dodecyl sulfat (SDS)	Merck	85%
21	Tween 20	Merck	99,5%
22	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromid (CTAB)	Merck	99,5%
23	Natri hydroxyd	Agilent	100%
24	H ₂ O deion	Agilent	100%
25	Kali carbonat	Daejung	99,5%
26	Natri hydroxid	Xilong	99,5%
27	Natri sulfat	Xilong	99%
28	Natri clorid	Xilong	99%

29	Cloroform	Xilong	99,5%
30	Ethanol (EtOH)	J.T. Baker	99,9%
31	Ethyl acetat (EtOAc)	Xilong	99,5%
32	Hexan	Xilong	99,5%
33	Methanol (MeOH)	Xilong	99,5%
34	Petroleum ether 60-90 (PE)	VN-Chemsol	
35	Acid sulfuric	Xilong	98 %

2.2.3. Trang thiết bị

Bảng 2.3. Các trang thiết bị chính trong nghiên cứu

Stt	Trang thiết bị	Xuất xứ	Mã hiệu
1	Bể siêu âm	Elmasonic – Đức	S100H
2	Micropipet	Labnet – Mỹ	Biopette A TM
3	Cân phân tích (5 số lẻ)	Sartorius - Đức	Quintix125D-1S
4	Cân phân tích (4 số lẻ)	AND - Hàn Quốc	HR-250AZ
5	Máy cô mẫu chân không	Eyela, Nhật Bản	CVE-2200
6	Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) - đầu dò PDA	Shimadzu – Nhật	LC-20A
7	Máy điện di mao quản	Agilent - Mỹ	CE 7100
8	Máy quét nhiệt vi sai DSC	TA Instrument, Mỹ	Q20
9	Máy phân tích nhiệt đồng thời TGA-DSC	Mettler Toledo, Thụy Sĩ	TGA-DSC 3+
10	Máy đo điểm chảy	Stuart - Anh	SMP20
11	Máy đo pH	Hanna - Rumani	HI 2550-02
12	Máy quang phổ hồng ngoại FT-IR	Shimadzu, Nhật	AFFINITY-1S

Stt	Trang thiết bị	Xuất xứ	Mã hiệu
13	Máy quang phổ UV-Vis	Jasco, Nhật Bản	V730
14	Hệ thống LC-MS nguồn phân giải cao	SCIEX – Mỹ	X500R QTOF
15	Máy cộng hưởng từ hạt nhân	Bruker – Thụy Sĩ	Advance II 500 MHz
16	Đèn soi UV-Vis	Taisite – Trung Quốc	WFH-203B
17	Máy khuấy từ gia nhiệt	IKA - Malaysia	RET basic
18	Máy khuấy từ gia nhiệt	Mrclab, Israel	HSCD-7
19	Máy lắc xoay Vortex	Labnet – Mỹ	VX-200
20	Tủ hút khí độc	ESCO - Indonesia	EBC-4A0
21	Tủ sấy	Memmert – Đức	UF55
22	Máy cất nước 2 lần	Aquatron - Anh	A400D
23	Các dụng cụ thủy tinh chính xác	Isolab - Anh	
Các thiết bị phân tích được hiệu chuẩn định kỳ.			

2.3. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

- Thời gian nghiên cứu: từ tháng 09 / 2017 đến tháng 03 / 2023
- Địa điểm nghiên cứu: Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh; Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Huế và Viện kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh.

2.4. CỖ MẪU CỦA NGHIÊN CỨU

Cỡ mẫu được tính toán để phù hợp với các bước của thiết kế nghiên cứu.

- Khảo sát điều kiện tổng hợp các tạp chất: lặp lại thí nghiệm 3 lần ở mỗi điều kiện.
- Thiết lập chất đối chiếu: số mẫu tuân theo hướng dẫn của ICH.
- Thẩm định các quy trình phân tích: số mẫu tuân theo hướng dẫn của ICH.

2.5. XÁC ĐỊNH CÁC BIẾN SỐ ĐỘC LẬP VÀ PHỤ THUỘC

Các biến số trong mỗi bước nghiên cứu được xác định như sau:

- Khảo sát điều kiện tổng hợp các tạp chất: biến số độc lập là các điều kiện phản ứng, biến số phụ thuộc là hiệu suất toàn quy trình tổng hợp (gồm hiệu suất tổng hợp và hiệu suất tinh chế).
- Khảo sát các điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao và điện di mao quan để định lượng các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm carvedilol: biến số độc lập là các điều kiện sắc ký và điện di mao quản, biến số phụ thuộc là các thông số sắc ký, điện di.

2.6. PHƯƠNG PHÁP VÀ CÔNG CỤ ĐO LƯỜNG, THU THẬP SỐ LIỆU

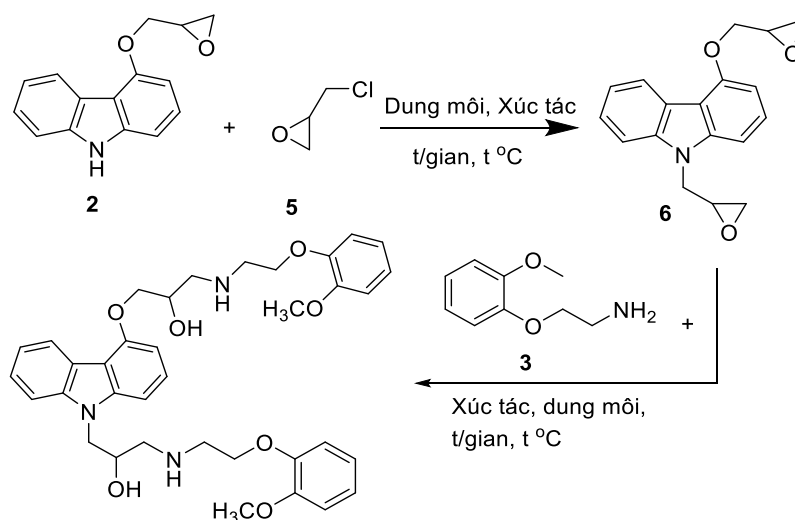
2.6.1. Tổng hợp và tinh chế các tạp

Dựa trên tài liệu công bố, quá trình tổng hợp các tạp chất được thực hiện nhằm tối ưu hóa hiệu suất sau khi tinh chế. Cải tiến hiệu suất các quy trình (nếu đã công bố) bằng phương pháp “thay đổi lần lượt từng yếu tố một” (One factor at a time) với các biến độc lập gồm dung môi, tỷ lệ số mol, xúc tác, thời gian, nhiệt độ phản ứng... để đạt hiệu suất tổng hợp cao nhất. Các điều kiện khảo sát được lặp lại 3 lần, lấy giá trị trung bình. Kiểm tra sự khác biệt giá trị trung bình giữa điều kiện tốt nhất với điều kiện khác dựa vào t-test với ngưỡng thống kê $p = 0,05$.

2.6.1.1. Tổng hợp và tinh chế tạp A carvedilol

Tạp A được tổng hợp theo 2 giai đoạn sau:

- Giai đoạn 1: Tổng hợp 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**).
- Giai đoạn 2: Tổng hợp 1-(4-(2-hydroxy-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propoxy)-9H-carbazol-9-yl)-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propan-2-ol (tạp A).



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ tổng hợp tạp A carvedilol

Tổng hợp 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (6)

Dựa trên nghiên cứu của Somisetti Narender Rao và cộng sự²⁶, tiến hành phản ứng tổng hợp 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (6) như sau: cho xúc tác kiềm vào dung dịch chứa 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (2) trong dung môi, thêm từ từ epichlorohydrin (5), sau đó để phản ứng ở nhiệt độ và thời gian khảo sát. Để nguội hỗn hợp phản ứng về nhiệt độ phòng, thêm nước và chiết với EtOAc. Dịch chiết EtOAc được loại nước bằng natri sulfat và được cô quay dưới áp suất để bay hơi dung môi. Tiến hành sắc ký cột với pha tĩnh silica gel 60, pha động là hệ PE : EtOAc (5 : 3) để tách các sản phẩm tạo thành.

* *Khảo sát điều kiện phản ứng:* Thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế. Mỗi điều kiện được lặp lại 3 lần để đánh giá thống kê.

- Khảo sát dung môi phản ứng: dimethyl formamid (DMF); aceton; dimethyl sulfoxid (DMSO) và không sử dụng dung môi.

- Khảo sát tỷ lệ số mol epichlorohydrin (5) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (2): 30:1; 40:1; 50:1; 60:1; 70:1.

- Khảo sát xúc tác: calci hydroxyd; natri hydroxyd; triethylamin; kali carbonat + triethylamin, kali carbonat + natri hydroxyd; kali carbonat.

- Khảo sát thời gian phản ứng: 1 h; 2 h; 4 h; 8 h; 10 h; 12 h.

- Khảo sát nhiệt độ phản ứng: nhiệt độ phòng (RT); 35; 45; 55; 65; 75; 85 °C.

Tổng hợp 1-(4-(2-hydroxy-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propoxy)-9H-carbazol-9-yl)-3-((2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propan-2-ol (tạp A)

Dựa trên nghiên cứu của Somisetti Narender Rao và cộng sự ²⁶, tạp A được tổng hợp từ phản ứng mở vòng epoxy giữa 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) và 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) theo quy trình sau: Cho 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) vào bình cầu hai cổ 100 ml, thêm từ từ 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) trong dung môi và khuấy từ ở nhiệt độ và thời gian khảo sát. Hỗn hợp sau phản ứng được rửa bằng nước thu được chất rắn. Tiến hành sắc ký cột với pha tĩnh silica gel 60, pha động là hệ PE : EtOAc : MeOH (3 : 4 : 1) tách các sản phẩm tạo thành.

* *Khảo sát điều kiện phản ứng*: Thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế. Mỗi điều kiện được lặp lại 3 lần để đánh giá thống kê.

- Khảo sát dung môi phản ứng: monoglyme; ethanol; dimethyl formamid (DMF); dimethyl sulfoxid (DMSO); isopropanol; isoamyl alcohol và không sử dụng dung môi.

- Khảo sát tỷ lệ số mol 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**): 4:1; 5:1; 6:1; 7:1.

- Khảo sát xúc tác: silica gel, magnesi oxyd và không sử dụng xúc tác.

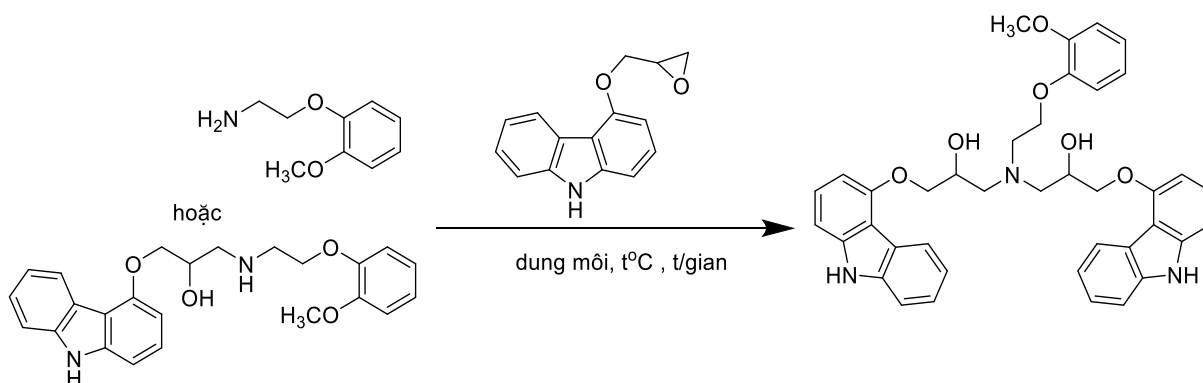
- Khảo sát nhiệt độ phản ứng: RT; 40; 50; 60; 70; 80 °C.

- Khảo sát thời gian phản ứng: 2 h; 5 h; 8 h; 12 h; 16 h; 20 h.

2.6.1.2. Tổng hợp và tinh chế tạp B carvedilol

Tạp B được tổng hợp theo sơ đồ ở Sơ đồ 2.2. Tiến hành: Hòa tan carvedilol hoặc 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin trong dung môi, đun nóng cho tan hoàn toàn. Thêm 4-(2,3-epoxypropoxy)carbazol vào dung dịch carvedilol hoặc 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin, phản ứng ở nhiệt độ và thời gian khảo sát. Hỗn hợp phản ứng sau đó được làm nguội, cô bay hơi tới gần dưới áp suất giảm. Tiến hành

tách tạp B bằng sắc ký cột với pha tĩnh silica gel 60 sử dụng hệ dung môi cyclohexan - EtOAc (1 : 1).



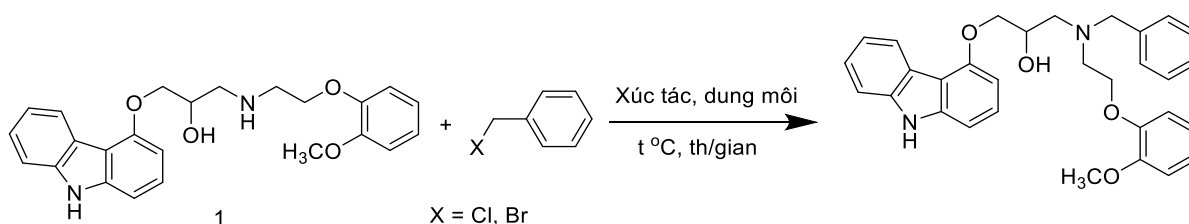
Sơ đồ 2.2. Sơ đồ tổng hợp tạp B carvedilol

* *Khảo sát điều kiện phản ứng:* Thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế. Mỗi điều kiện được lặp lại 3 lần để đánh giá thống kê.

- Khảo sát tác nhân phản ứng: carvedilol; 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin.
- Khảo sát dung môi phản ứng: monoglyme; ethanol; isopropanol; methanol.
- Khảo sát nhiệt độ phản ứng: 45; 55; 65; 75 °C.
- Khảo sát thời gian phản ứng: 4 h; 6 h; 8 h; 10 h; 12 h.

2.6.1.3. Tổng hợp và tinh chế tạp C carvedilol

Tạp C được tổng hợp theo sơ đồ ở Sơ đồ 2.3. Tiến hành: Hòa tan carvedilol (1) vào dung dịch benzyl halid trong dung môi khảo sát. Thực hiện phản ứng ở nhiệt độ khảo sát. Hỗn hợp phản ứng sau đó được làm nguội, cô quay tới gần dưới áp suất giảm. Tiến hành sắc ký cột để tách lấy tạp C, sử dụng pha tĩnh silica gel 60 và hệ dung môi cyclohexan : EtOAc (2:1).



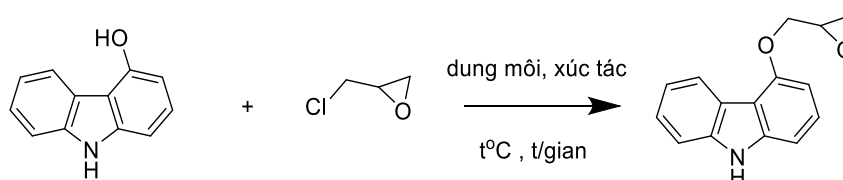
Sơ đồ 2.3. Sơ đồ tổng hợp tạp C carvedilol

* *Khảo sát điều kiện phản ứng*: Thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế. Mỗi điều kiện được lặp lại 3 lần để đánh giá thống kê.

- Khảo sát tác nhân phản ứng: benzyl clorid; benzyl bromid.
- Khảo sát dung môi phản ứng: ethanol, methanol, aceton, toluen.
- Khảo sát xúc tác: triethylamin; kali carbonat; calci hydroxyd; natri hydroxyd.
- Khảo sát nhiệt độ phản ứng: RT; 40; 50; 55 °C.
- Khảo sát thời gian phản ứng: 1 h; 2 h; 4 h; 6 h; 8 h; 10 h.

2.6.1.4. Tổng hợp và tinh chế tạp D carvedilol

Tạp D được tổng hợp theo sơ đồ ở Sơ đồ 2.4. Tiến hành: 4-hydroxycarbazol trong dung môi khảo sát được thêm vào xúc tác base. Thêm epichlorohydrin vào và thực hiện phản ứng ở nhiệt độ và thời gian khảo sát. Sau khi kết thúc phản ứng, hỗn hợp phản ứng được lọc và rửa với nước nhiều lần. Sản phẩm thô được sấy ở 45 °C trong 8 tiếng, để nguội và tiến hành sắc ký cột để tách lấy tạp D, sử dụng pha tĩnh silica gel 60 và hệ dung môi *n*-hexan : EtOAc (4:1).



Sơ đồ 2.4. Sơ đồ tổng hợp tạp D carvedilol

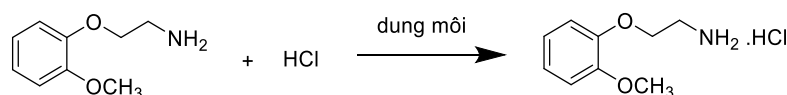
* *Khảo sát điều kiện phản ứng*: Thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế. Mỗi điều kiện được lặp lại 3 lần để đánh giá thống kê.

- Khảo sát dung môi phản ứng: aceton, dimethyl sulfoxid (DMSO), acetonitril, dimethyl formamid (DMF).
- Khảo sát thời gian phản ứng từ 0,5 h; 1,0 h; 1,5 h; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 h.
- Khảo sát nhiệt độ phản ứng: 30, 35, 40, 45, 48, 50, 55, 60 °C.
- Khảo sát tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol: 1:1; 1,25:1; 1,5:1; 1,75; 1,9:1; 2:1; 2,25:1.

- Khảo sát tỉ lệ số mol natri hydroxyd trên cơ chất 4-hydroxycarbazol: 0,875:1; 0,9625:1; 1,100:1; 1,230:1; 1,325:1; 1,5125:1; 1,650:1.

2.6.1.5. Điều chế và tinh chế tạp E carvedilol

Tạp E được điều chế theo sơ đồ ở Sơ đồ 2.5. Tiến hành: Hòa tan 2-(2-methoxyphenoxy) ethylamin trong dung môi khảo sát vào bình cầu, sục khí HCl mới điều chế vào bình đến khi xuất hiện tủa. Để yên qua ngày rồi lọc hỗn hợp phản ứng để thu lấy tủa, rửa tủa nhiều lần với aceton. Tạp E được tinh chế bằng phương pháp kết tinh trong dung môi.



Sơ đồ 2.5. Sơ đồ điều chế tạp E carvedilol

Khảo sát dung môi phản ứng gồm cloroform, ethyl acetat, aceton và acetonitril, đánh giá hiệu suất của quá trình điều chế. Mỗi điều kiện được lặp lại 3 lần để đánh giá thống kê.

2.6.2. Thử tinh khiết và xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp

2.6.2.1. Thử tinh khiết

Các sản phẩm tổng hợp được kiểm tra độ tinh khiết sơ bộ bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM). Các sản phẩm được hòa tan trong methanol, tiến hành khảo sát các hệ dung môi và lựa chọn ba hệ có khả năng rửa giải tốt nhất, đảm bảo sự tách biệt rõ ràng giữa các thành phần và giúp phát hiện tạp chất, nếu có. Các yếu tố tỷ lệ dung môi, độ phân cực được điều chỉnh để tối ưu hóa khả năng phân tách trên bản mỏng.

Bản mỏng sau khi khai triển được quan sát dưới đèn UV 254 nm. Để sản phẩm được coi là tinh khiết, mỗi sắc ký đồ từ ba hệ dung môi khác nhau phải cho một vết gọn duy nhất. Các vết này phải có giá trị R_f trong khoảng tương ứng là 0,25; 0,50; và 0,75 (trong 3 hệ dung môi khác nhau). Nếu có bất kỳ tạp chất nào, sẽ xuất hiện thêm các vết khác trên bản mỏng, điều này cho thấy sản phẩm chưa tinh khiết.

2.6.2.2. Xác định cấu trúc

Các sản phẩm được tổng hợp được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ:

- Quang phổ hấp thụ UV-Vis: mẫu được hòa tan trong dung môi phù hợp, tiến hành đo phổ để xác định khung cấu trúc của sản phẩm tổng hợp được.

- Quang phổ hấp thụ hồng ngoại (IR) để xác định sự có mặt của các đỉnh đặc trưng các nhóm chức trong phân tử.

- Phổ khối lượng (HRMS): được đo trên thiết bị khối phổ phân giải cao kết nối sắc ký lỏng (X500R QTOF), để xác định khối lượng chính xác và công thức nguyên của hợp chất.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (^1H -NMR, ^{13}C -NMR) và hai chiều (HSQC, HMBC): hòa tan mẫu trong dung môi phù hợp (có tham khảo tài liệu) với nội chuẩn là TMS rồi ghi phổ trên thiết bị có tần số 500 MHz.

Các phổ trên được so sánh với phổ của các hợp chất đã biết công bố trong các tài liệu.

2.6.3. Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

2.6.3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

- * Cô định các yếu tố:

Cột sắc ký Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 μm); Đầu dò: PDA, sử dụng chế độ Max plot (190 – 800 nm); Dung môi pha mẫu: Nước - ACN (1:1); Nhiệt độ cột; Thể tích tiêm mẫu; Tốc độ dòng.

- * Khảo sát các yếu tố pha động gồm: thành phần dung môi, nồng độ các thành phần, phương thức rửa giải (đẳng dòng hoặc gradient).

- * Mẫu trắng: dung môi hòa tan và pha động.

- * Các mẫu thử được pha tới nồng độ cho tín hiệu pic lớn (chiều cao pic trên 500 mAu).

* Yêu cầu: Trên sắc ký đồ mẫu thử, các chất phải được rửa giải và tách rời nhau.

2.6.3.2. Tính toán độ tinh khiết trên HPLC

Tính kết quả độ tinh khiết của tạp trên HPLC bằng phương pháp chuẩn hóa diện tích trên các sắc ký đồ ở chế độ Max plot mẫu trắng, pha động và mẫu thử. Trên sắc ký đồ mẫu thử, trừ đi diện tích các pic phụ có thời gian lưu tương ứng với các pic trong mẫu trắng và pha động. Độ tinh khiết sắc ký tính theo thành phẩm nguyên trạng của tạp được tính theo công thức sau:

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

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).

2.6.3.3. Thẩm định quy trình phân tích

Thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp được thực hiện theo hướng dẫn của ICH ⁶⁸, bao gồm một số chỉ tiêu:

- Tính phù hợp hệ thống

Chuẩn bị các dung dịch mẫu thử tạp A 400 µg/ml, tạp B 200 µg/ml, tạp C 200 µg/ml, tạp D 200 µg/ml, tạp E 200 µg/ml, tiến hành sắc ký 6 lần.

Yêu cầu: giá trị RSD% của thời gian lưu và diện tích pic của các tạp phải ≤ 2,0%; Hệ số đối xứng của pic chính phải trong khoảng 0,8 - 1,5; Độ phân giải giữa pic chính và pic phụ phải lớn hơn 1,5 ($R_s \geq 1,5$).

- Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký trong cùng điều kiện mẫu trắng, mẫu pha động và mẫu thử.

Yêu cầu:

- Sắc ký đồ mẫu pha động, mẫu trắng: không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic chính của tạp trong sắc ký đồ mẫu thử.
- Sắc ký đồ mẫu thử: pic chính của tạp phải tách hoàn toàn các pic khác (nếu có).
- Pic chính của tạp phải tinh khiết theo phổ UV-Vis.

- Tính tuyến tính

Tiến hành sắc ký các dung dịch tạp ở các nồng độ khác nhau (tạp A: 50-800 µg/ml, tạp B: 52,1 – 833,8 µg/ml, tạp C: 24,2 – 773,8 µg/ml, tạp D: 50 – 500 µg/ml, tạp E: 100 – 500), mỗi dung dịch tiêm 2 lần, xác định diện tích pic, tính giá trị trung bình.

Xây dựng phương trình đường thẳng hồi quy và hệ số tương quan R^2 để đánh giá sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ dung dịch trong khoảng nồng độ khảo sát.

Yêu cầu: $R^2 \geq 0,995$

- Độ chính xác

Độ chính xác của phương pháp thể hiện ở độ lặp lại và độ chính xác trung gian.

- Độ lặp lại

Thực hiện bằng cách chuẩn bị 6 mẫu thử ở nồng độ thích hợp trong miền giá trị đã khảo sát. Mỗi mẫu tiến hành sắc ký 1 lần.

- Độ chính xác trung gian

Tiến hành như độ lặp lại và làm trong 2 ngày liên tiếp với cùng điều kiện làm việc và người thực hiện.

Yêu cầu: giá trị RSD% của độ tinh khiết các tạp phải $\leq 2,0\%$.

2.6.4. Đánh giá và thiết lập tạp chất đối chiếu

2.6.4.1. Phương pháp đánh giá sản phẩm tổng hợp

a) Tính chất

Dựa vào cảm quan để xác định hình dạng, màu sắc và mùi của chất thử. Độ tan sẽ được đánh giá theo quy định của Dược điển Việt Nam V¹⁹.

b) Điểm chảy

Xác định điểm chảy bằng máy phân tích nhiệt vi sai DSC.

Mẫu được cân bằng nhiệt ở 40 °C, gia nhiệt mẫu với tốc độ 10 °C/phút cho đến 250 °C. Lưu lượng dòng khí nitơ trong suốt quá trình thực hiện là 50,0 ml/phút. Cân khoảng 2 - 10 mg mẫu thử vào chén đựng mẫu. Tiến hành đo nhiệt độ nóng chảy bằng máy DSC.

Xác định khoảng nóng chảy theo quy định của Dược điển Việt Nam V¹⁹.

c) Định tính

Tiến hành đo các phổ như mục 2.6.2.2.

- Phổ UV-Vis: xác định cực đại hấp thụ $\lambda_{\max}$.
- Phổ IR: Tiến hành đo phổ IR bằng kỹ thuật ATR, xác định số sóng của các nhóm chức đặc trưng trong công thức cấu tạo của chất thử.
- Phổ khối: xác định pic cơ bản (m/z).
- Phổ NMR: xác định các tín hiệu tương ứng với độ dịch chuyển hóa học đặc trưng của chất thử trong phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HSQC, HMBC.

d) Mất khối lượng do làm khô

Xác định hàm ẩm bằng phân tích nhiệt trọng lượng (TGA).

Mẫu được cân bằng ở nhiệt độ 30 °C, gia nhiệt mẫu với tốc độ 10 °C/phút cho đến 160 °C. Lưu lượng dòng khí nitơ trong suốt quá trình thực hiện là 50,0 ml/phút. Cân một lượng bột khoảng 2 – 10 mg cho vào dụng cụ chứa mẫu. Tiến hành đo độ

âm bằng máy TGA. Xác định hàm ẩm có trong mẫu dựa vào sự thay đổi phần trăm trọng lượng mẫu.

e) Độ tinh khiết

Áp dụng phương pháp chuẩn hóa diện tích HPLC như mục 2.6.3.

2.6.4.2. Thiết lập chất đối chiếu

Các tạp sau khi được đánh giá đạt yêu cầu chất lượng được đóng thành từng lọ nhỏ có khối lượng thích hợp. Sử dụng lọ thủy tinh nâu hàn kín, có lớp đệm teflon đạt tiêu chuẩn chất lượng theo quy định, dán nhãn tạm ghi tên hoạt chất và đánh số thứ tự từng lọ. Việc đóng gói được thực hiện trong Glove-box:

- Nạp khí nitơ 99,99%.
- Độ ẩm tương đối trong buồng đóng $\approx 40\%$.

a) Đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ

Lấy mẫu ngẫu nhiên theo công thức $\sqrt{N} + 1$, trong đó N là tổng số lọ. Tiến hành định lượng từng lọ theo phương pháp đã xây dựng.

Mẫu thử được xem là đồng nhất khi độ lệch chuẩn các lọ $\leq 0,3\sigma$ ⁶⁹, với σ là độ lệch chuẩn kỳ vọng trong lĩnh vực sản xuất chất chuẩn ($\sigma = 1\%$).

b) Đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm

Tiến hành dựa theo hướng dẫn của ISO 13528.⁶⁹

Thành phẩm sau khi đóng gói và đánh giá đồng nhất lô đạt yêu cầu được lấy mẫu ngẫu nhiên và tiến hành định lượng tại ba phòng thí nghiệm độc lập.

Các phòng thí nghiệm được lựa chọn để gửi mẫu phải đạt GLP hoặc ISO/IEC 17025. Mỗi phòng thí nghiệm sẽ nhận được 06 lọ mẫu ngẫu nhiên kèm theo qui trình phân tích và các tài liệu liên quan. Trước khi phân tích, mỗi phòng thí nghiệm sẽ đánh giá lại tính phù hợp của hệ thống. Nếu đạt yêu cầu, tiến hành xác định độ tinh khiết trên 6 mẫu đã nhận, mỗi mẫu nên được kiểm tra 2 lần để tránh sai số.

Các phòng thí nghiệm được lựa chọn để gửi mẫu là Khoa Nghiên cứu và phát triển (PTN1), Khoa Thiết lập chất chuẩn & chất đối chiếu (PTN2) và Khoa Kiểm nghiệm Mỹ phẩm (PTN3) thuộc Viện kiểm nghiệm thuốc Tp.HCM.

Mỗi phòng thí nghiệm sẽ trả lời kết quả độc lập trên sáu lọ mẫu gởi. Tập hợp các kết quả của hai phòng thí nghiệm tham gia ($n = 18$), đánh giá kết quả theo ANOVA, so sánh 2 giá trị F_{tn} và F_{tc} .

Trường hợp 1: $F_{tn} \leq F_{tc} \rightarrow$ kết quả trung bình của 3 phòng thí nghiệm khác nhau không có ý nghĩa, qui trình phân tích có độ lặp lại cao, độ tinh khiết chất phân tích không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

Trường hợp 2: $F_{tn} \geq F_{tc} \rightarrow$ kết quả trung bình của 3 phòng thí nghiệm khác nhau có ý nghĩa, qui trình phân tích có độ lặp lại thấp, độ tinh khiết chất phân tích thay đổi tùy vào mỗi phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

c) *Xác định giá trị ấn định – giá trị công bố*

Tiến hành dựa theo hướng dẫn của ISO 13528. ⁶⁹

Giá trị ấn định được xác định từ 18 kết quả của ba phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

Quy ước: Giá trị trung bình thực (Robust average): $\bar{X}_{(n)}^*$

Độ lệch chuẩn (Robust standard deviation): $S_{(0)}$

Việc xác định giá trị ấn định bao gồm các bước sau:

- Bước 1. Nhập số liệu x_i là tập hợp số liệu của 3 PTN theo thứ tự tăng dần
- Bước 2: Tính giá trị $\bar{X}_0$ và $S_{(0)}$

$|X_i - \bar{X}_{(0)}|$ Giá trị trung vị của dãy kết quả theo thứ tự tăng dần

$\bar{X}_{(0)}$ là giá trị chính giữa dãy số nếu dãy kết quả giữa 2 PTN là số lẻ

$\bar{X}_{(0)} = \frac{x_{\frac{p}{2}} + x_{\frac{p}{2}+1}}{2}$ nếu dãy kết quả của 2 PTN là số chẵn

$S_{(0)} = 1,483 \cdot \text{trung vị của dãy } |X_i - \bar{X}_{(0)}|$, (với $i = 1, 2, \dots, p$)

Cập nhật giá trị $U = \frac{S}{\sqrt{n}} \times 2$ như sau

Tính $\delta_{(1)} = 1,5 S_{(0)}$ với mỗi giá trị $X_{(i)}$ trong dãy tính $\bar{X}_{(0)} - \delta_{(1)} X_{i(1)}^* = \bar{X}_{(0)} - \delta_{(1)}$

$$X_{i(1)}^* = \bar{X}_{(0)} + \delta_{(1)} \text{ nếu } X_{(i)} < X_{(0)} - \delta_{(1)}$$

$$X_{i(1)}^* = \bar{X}_0 + \delta_{(1)} \text{ nếu } X_{(i)} > X_{(0)} + \delta_{(1)}$$

$$X_{i(1)}^* = X_1 \text{ khi } X_{(0)} - \delta_{(1)} < x_{(i)} < X_{(0)} + \delta_{(1)}$$

Tính giá trị $X_{i(1)}^*$ theo công thức

$$X_{i(1)}^* = \frac{\sum_{i=1}^p X_{i(1)}^*}{p}$$

$$S_{(1)}^* = 1,134 \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^p (X_{i(1)}^* - \bar{X}_{(1)}^*)^2}{p-1}}$$

Với p: tổng các giá trị có kết quả z – score $\leq 2,0$

– Bước 3: Tiến hành tính toán lặp lại bước 2 cho đến khi giá trị $S_{(n)}^*$ không thay đổi số thứ ba sau dấu phẩy và $\bar{X}_{(n)}^*$ không đổi thì giá trị này là giá trị ấn định.

$$\text{Xác định độ không đảm bảo đo: } U_x = 1,25 s^* / \sqrt{p}$$

Sử dụng giá trị ấn định $x^*(n)$ để đánh giá từng kết quả phân tích theo test-z, loại bỏ các kết quả phân tích có $|z| > 2,0$. Chọn các giá trị $|z| \leq 2,0$; tính giá trị trung bình và giá trị này chính là *giá trị công bố*.

Lập hồ sơ chất chuẩn, dán nhãn lọ chuẩn và kèm theo phiếu kiểm nghiệm theo ISO Guide 31⁷⁰. Bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8 °C, tránh ánh sáng.

2.6.5. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

2.6.5.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Dùng phương pháp HPLC pha đảo để định lượng đồng thời các tạp A, B, C, D, E trong thành phẩm carvedilol. Qua tham khảo tài liệu của dược điển Mỹ 2023, nghiên cứu cố định các điều kiện sắc ký như sau:

- Cột sắc ký: cột Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m);
- Đầu dò PDA: bước sóng 220 nm để định lượng tạp E, 240 nm để định lượng carvedilol và các tạp còn lại.
- Nhiệt độ cột: 40 °C;
- Thể tích tiêm mẫu: 5 μ l;

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát các điều kiện sau:

- Khảo sát pha động về thành phần, tỷ lệ và chương trình dung môi pha động: đã khảo sát hệ dung môi ACN – H₂O với acid phosphoric và TFA với các tỷ lệ khác nhau.
- Khảo sát tốc độ dòng: 0,5 ml/phút; 0,7 ml/phút và 1,0 ml/phút.

Yêu cầu: Trên sắc ký đồ, các pic phải cân đối, được tách nhau hoàn toàn ($R_s \geq 1,5$), các pic có độ tinh khiết trên UV-Vis và thời gian phân tích không quá dài.

2.6.5.2. Thẩm định quy trình phân tích

a) Chuẩn bị mẫu

- *Dung dịch chuẩn gốc carvedilol*: Cân chính xác khoảng 20 mg carvedilol cho vào bình định mức 5 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng ACN. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 4000 μ g/ml.
- *Dung dịch chuẩn gốc tạp A*: Cân chính xác khoảng 10 mg tạp A cho vào bình định mức 5 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng ACN. Lọc qua màng lọc 0,45 μ m. Lấy 0,1 ml dung dịch trên cho vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch bằng ACN ta thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 20 μ g/ml.

- *Dung dịch chuẩn gốc tap B:* Cân chính xác khoảng 10 mg tap B cho vào bình định mức 5 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng ACN. Lọc qua màng lọc 0,45 μm . Lấy 0,1 ml dung dịch trên cho vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch bằng ACN ta thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$.
- *Dung dịch chuẩn gốc tap C:* Cân chính xác khoảng 10 mg tap C cho vào bình định mức 5 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng ACN. Lọc qua màng lọc 0,45 μm . Lấy 0,1 ml dung dịch trên cho vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch bằng ACN ta thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$.
- *Dung dịch chuẩn gốc tap D:* Cân chính xác khoảng 10 mg tap D cho vào bình định mức 5 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng ACN. Lọc qua màng lọc 0,45 μm . Lấy 0,1 ml dung dịch trên cho vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch bằng ACN ta thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$.
- *Dung dịch chuẩn gốc tap E:* Cân chính xác khoảng 10 mg tap E cho vào bình định mức 5 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng MeOH. Lọc qua màng lọc 0,45 μm . Lấy 0,1 ml dung dịch trên cho vào bình định mức 10 ml, định mức đến vạch bằng MeOH ta thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 20 $\mu\text{g/ml}$.
- *Dung dịch chuẩn hỗn hợp: Carvedilol 2000 $\mu\text{g/ml}$ – Các tap với nồng độ mỗi tap 4 $\mu\text{g/ml}$ (tương ứng với tỷ lệ cho phép của mỗi tap trong thành phẩm carvedilol là 0,2%) :* Từ các dung dịch chuẩn gốc pha loãng bằng pha động thành dung dịch chuẩn hỗn hợp chứa carvedilol nồng độ khoảng 2000 $\mu\text{g/ml}$ và các tap nồng độ 4 $\mu\text{g/ml}$.
- *Dung dịch thử:* Cân chính xác lượng bột nguyên liệu / thành phẩm tương ứng khoảng 10 mg carvedilol cho vào bình định mức 10 ml, thêm khoảng 6 ml ACN, siêu âm trong 15 phút. Thêm ACN đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm .
- *Dung dịch thử giả lập :* Từ dung dịch thử thêm vào chuẩn gốc tap B, C, D, E theo đúng tỷ lệ cho phép của mỗi tap trong thành phẩm là 0,2%.

b) Tính phù hợp hệ thống

- Tiến hành : Từ dung dịch chuẩn gốc 2000 µg/ml pha loãng thành dung dịch chuẩn làm việc có nồng độ 500 µg/ml. Tiêm sắc ký 6 lần lặp lại dung dịch chuẩn 500 µg/ml.
- Yêu cầu : RSD% của các thông số thời gian lưu, diện tích pic không quá 2%, số đĩa lý thuyết $N \geq 1000$, hệ số bất kéo đuôi T_f từ 0,8 – 1,2 và hệ số rửa giải $R_s \geq 1,5$.

c) Tính đặc hiệu

- Tiến hành phân tích sắc ký mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn.
- Yêu cầu: Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của carvedilol và các tạp trong sắc ký đồ mẫu chuẩn. Các pic carvedilol và tạp đều đạt độ tinh khiết trên phổ UV-Vis.

d) Tính tuyến tính

- Từ dung dịch chuẩn gốc pha loãng với pha động để có dãy dung dịch chuẩn thứ cấp có nồng độ từ 250 – 1500 µg/ml. Tiến hành phân tích sắc ký dãy dung dịch chuẩn trên. Xây dựng phương trình đường hồi quy và hệ số tương quan hồi quy R^2 để đánh giá sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic và nồng độ dung dịch trong khoảng nồng độ khảo sát.
- Yêu cầu: $R^2 \geq 0,995$.

e) Độ chính xác

* Độ lặp lại

- Chuẩn bị 6 mẫu thử và 6 mẫu thử giả lập theo quy trình chuẩn bị dung dịch thử ở mục a, tiến hành định lượng bằng HPLC với cùng điều kiện đã chọn. Xác định độ chính xác trong ngày thông qua RSD% của hàm lượng carvedilol và các tạp có trong thành phẩm.

- Yêu cầu: $RSD \leq 3,7\%$ với các tạp (tương ứng với mức nồng độ 0,1 – 1% trong nền mẫu) và $RSD \leq 2\%$ với carvedilol ⁷¹.

* Độ chính xác trung gian

- Lặp lại quy trình trên vào ngày tiếp theo để xác định độ chính xác trung gian.
- Yêu cầu: $RSD \leq 3,7\%$ với các tạp (tương ứng với mức nồng độ 0,1 – 1% trong nền mẫu) và $RSD \leq 2\%$ với carvedilol ⁷¹.

Hàm lượng phần trăm so với hàm lượng ghi nhãn viên nén carvedilol được xác định bằng công thức:

$$C\% = \frac{S_t}{S_c} \times C_c \times V \times \frac{\bar{m} \times k}{m_c \times A} \times 100\%$$

Trong đó

S_t là diện tích pic carvedilol trong dung dịch thử;

S_c là diện tích pic carvedilol trong dung dịch chuẩn;

C_c là nồng độ carvedilol (mg/ml) trong dung dịch chuẩn;

V là thể tích của dung dịch thử (ml);

m_c là khối lượng bột viên cân được (mg);

$\bar{m}$ là khối lượng trung bình viên (mg);

k là hệ số pha loãng;

A là hàm lượng carvedilol ghi trên nhãn (mg).

- Hàm lượng phần trăm của các tạp trong thành phẩm carvedilol được tính theo công thức:

$$C\% = \frac{r_u}{r_s} \times \frac{C_s}{C_u} \times 100\%$$

Trong đó:

C_s là nồng độ (mg/ml) của carvedilol trong dung dịch chuẩn;

C_u là nồng độ (mg/ml) của carvedilol trong dung dịch thử;

r_u là diện tích pic của tạp trong dung dịch thử;

r_s là diện tích pic của carvedilol trong dung dịch đối chiếu.

* Độ chính xác trung gian

f) Độ đúng

- Thêm chính xác một lượng chuẩn gốc vào các mẫu thử với các tỷ lệ lần lượt là 80%, 100% và 120% so với giới hạn cho phép (tương ứng với 500 µg/ml carvedilol và 1 µg/ml với mỗi tạp). Mỗi nồng độ được tiến hành 3 lần trong cùng điều kiện khảo sát. Tính tỉ lệ thu hồi dựa vào lượng chuẩn thêm vào ban đầu và lượng carvedilol và các tạp tìm lại.
- Yêu cầu: Tỷ lệ thu hồi trong khoảng: 95-105% với các tạp (tương ứng với mức nồng độ 0,1 – 1% trong nền mẫu) và 98-102% với carvedilol ⁷¹.

g) Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

- Dựa trên tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N). Pha loãng dung dịch chuẩn hỗn hợp nồng độ giảm dần, tiến hành sắc ký và tính tỷ số S/N. Nồng độ mỗi tạp tương ứng S/N = 3 là LOD, S/N = 10 là LOQ. Đánh giá độ chính xác và độ đúng tại nồng độ tương ứng LOQ.
- Yêu cầu:
 - S/N = 3 cho LOD, S/N = 10 cho LOQ
 - RSD của 6 lần lặp lại $\leq 3,7\%$ (tương ứng với mức nồng độ 0,1 – 1% trong nền mẫu) ⁷¹.
 - Độ đúng tại LOQ đạt với độ thu hồi trong khoảng 95-105% (tương ứng với mức nồng độ 0,1 – 1% trong nền mẫu) ⁷¹.

h) Khoảng xác định

- Khoảng xác định của quy trình được xác định từ các thông số thẩm định tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác và giới hạn định lượng.
- Yêu cầu: Khoảng xác định là khoảng nồng độ đảm bảo tính tuyến tính, độ đúng và độ chính xác.

2.6.5.3. Ứng dụng

Tiến hành định lượng hàm lượng carvedilol và các tạp có trong 06 mẫu viên nén và 03 mẫu nguyên liệu theo phương pháp HPLC đã được xây dựng.

2.6.6. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm bằng điện di mao quản

2.6.6.1. Khảo sát quy trình định lượng

Điều kiện điện di ban đầu:

- BGE: Đệm acetat 100 mM pH 4; Cột mao quản fused silica (Chiều dài hiệu dụng: 40 cm, chiều dài tổng: 48,5 cm, đường kính ngoài: 360 μ m, đường kính trong: 75 μ m); Nhiệt độ cassette: 20 ± 1 °C; Điện thế nguồn: 20 kV; Cường độ dòng: 150 μ A; Đầu dò PDA: 190 – 600 nm; Tiêm mẫu: 35 mBar – 4 giây.
- Xử lý cột:
 - Giữa các lần tiêm: natri hydroxyd 0,1 M 2 phút - Nước 2 phút - BGE 2 phút
 - Hoạt hóa mao quản lần đầu: natri hydroxyd 1 M 30 phút - natri hydroxyd 0,1 M 30 phút - Nước 5 phút - BGE 5 phút
 - Đầu ngày: Nước 5 phút - natri hydroxyd 0,1 M 15 phút - Nước 5 phút - BGE 5 phút
 - Cuối ngày: Nước 2 phút - natri hydroxyd 0,1 M 10 phút - Nước 10 phút.

Từ điều kiện điện di ban đầu, tiến hành khảo sát các yếu tố:

- Khảo sát dung môi pha mẫu: ACN, MeOH, các tỷ lệ khác nhau của MeOH với BGE.
- Khảo sát loại đệm và pH đệm: Đệm acetat, đệm phosphat, đệm Tris, đệm citrat ở các pH 3 – 4 – 5 – 6 – 7 – 8 – 9;
- Khảo sát dung môi hữu cơ thêm vào: Thêm ACN, MeOH thay thế nước trong đệm với các tỉ lệ khác nhau;
- Khảo sát chất diện hoạt thêm vào: SDS, Tween20, CTAB, natri heptan-1-sulfonat với các nồng độ trên, dưới và tại nồng độ micell tới hạn;
- Khảo sát nồng độ đệm: 60, 80, 100, 120, 140 mM;
- Khảo sát điện thế: 10 kV, 15 kV, 20 kV;
- Khảo sát chiều dài hiệu dụng cột: 40 cm, 50 cm, 60 cm.

Yêu cầu: Trên điện di đồ, các pic phải cân đối, được tách nhau hoàn toàn ($R_s \geq 1,5$), các pic có độ tinh khiết trên UV-Vis và thời gian phân tích không quá dài.

2.6.6.2. *Thẩm định phương pháp*

Thẩm định phương pháp theo hướng dẫn của ICH 2005 bao gồm các tiêu chí: Tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), khoảng xác định.

Chuẩn bị dung dịch mẫu:

- *Dung dịch chuẩn gốc carvedilol:* Cân chính xác khoảng 150 mg carvedilol cho vào bình định mức 10 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng MeOH. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , thu được dung dịch chuẩn gốc carvedilol có nồng độ 15000 $\mu\text{g/mL}$.
- *Dung dịch chuẩn gốc tap A:* Cân chính xác khoảng 5 mg tap A cho vào bình định mức 5 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng MeOH. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , thu được dung dịch chuẩn gốc tap A có nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$.
- *Dung dịch chuẩn gốc tap B:* Cân chính xác khoảng 5 mg tap B cho vào bình định mức 5 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng MeOH. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , thu được dung dịch chuẩn gốc tap B có nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$.
- *Dung dịch chuẩn gốc tap C:* Cân chính xác khoảng 5 mg tap C cho vào bình định mức 5 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng MeOH. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , thu được dung dịch chuẩn gốc tap C có nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$.
- *Dung dịch chuẩn gốc tap D:* Cân chính xác khoảng 5 mg tap D cho vào bình định mức 5 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng MeOH. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , thu được dung dịch chuẩn gốc tap D có nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$.
- *Dung dịch chuẩn gốc tap E:* Cân chính xác khoảng 5 mg tap D cho vào bình định mức 5 ml, hòa tan và định mức đến vạch bằng MeOH. Lọc qua màng lọc 0,45 μm , thu được dung dịch chuẩn gốc tap D có nồng độ 1000 $\mu\text{g/mL}$.
- *Mẫu hỗn hợp chuẩn:* Carvedilol 2500 $\mu\text{g/mL}$, tap A 5 $\mu\text{g/mL}$, tap B 5 $\mu\text{g/mL}$, tap C 5 $\mu\text{g/mL}$, tap D 5 $\mu\text{g/mL}$, tap E 5 $\mu\text{g/mL}$ (tương ứng với tỷ lệ cho phép mỗi tap trong thành phẩm là 0,2% theo USP 2023) Từ các dung dịch chuẩn gốc pha loãng bằng dung môi thành dung dịch chuẩn hỗn hợp chứa carvedilol nồng độ khoảng 2500 $\mu\text{g/mL}$ và các tap nồng độ 5 $\mu\text{g/mL}$.

- *Dung dịch thử*: Cân chính xác lượng bột nguyên liệu / thành phẩm tương ứng khoảng 25 mg carvedilol cho vào bình định mức 10 ml, thêm khoảng 6 ml dung môi pha mẫu, siêu âm trong 15 phút. Thêm dung môi đến vạch, lắc đều. Lọc qua màng lọc 0,45 μm .
- *Dung dịch thử giả lập* : Từ dung dịch thử thêm vào chuẩn gốc các tạp theo đúng tỷ lệ cho phép của mỗi tạp trong thành phẩm là 0,2%.

a) *Tính phù hợp hệ thống*

Tiến hành:

Tiến hành điện di 6 lần mẫu hỗn hợp chuẩn. Tính RSD% của các thông số thời gian điện di, diện tích pic được chuẩn hóa (CorrA), hệ số bất đối xứng T_f và hệ số phân giải R_s .

Yêu cầu:

- Độ lệch chuẩn của thời gian điện di và diện tích pic $\leq 3\%$
- Các pic phải đạt các thông số khác ($0,8 \leq A_s \leq 1,5$; $R_s \geq 1,5$, $N \geq 2000$).

b) *Tính đặc hiệu*

- Tiến hành phân tích điện di các mẫu: Dung dịch điện ly nền, dung môi pha mẫu, các dung dịch chuẩn đơn tạp A, tạp B, tạp C, tạp D, tạp E, carvedilol, mẫu hỗn hợp chuẩn carvedilol tạp A, tạp B, tạp C, tạp D, tạp E và mẫu thử giả lập.
- Yêu cầu: Điện di đồ mẫu dung dịch điện ly nền, dung môi pha mẫu không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của carvedilol và các tạp trong điện di đồ mẫu chuẩn. Các pic đạt độ tinh khiết pic trên phổ UV-Vis.

c) *Tính tuyến tính*

- Từ dung dịch chuẩn gốc pha loãng để có dãy dung dịch chuẩn thứ cấp có nồng độ carvedilol từ 1000 – 6000 $\mu\text{g/ml}$ và các tạp từ 2 – 8 $\mu\text{g/ml}$. Tiến hành phân tích điện di dãy dung dịch chuẩn trên. Xây dựng phương trình đường hồi quy

và hệ số tương quan hồi quy R^2 để đánh giá sự tương quan tuyến tính giữa diện tích pic chuẩn hóa và nồng độ dung dịch trong khoảng nồng độ khảo sát.

- Yêu cầu: $R^2 \geq 0,995$.

d) Độ chính xác

- Độ lặp lại

Tiến hành điện di 6 mẫu thử giả lập ở nồng độ mỗi tap 5 µg/mL. Xác định giới hạn các tap trong các mẫu, tính RSD kết quả của các mẫu.

Yêu cầu: RSD hàm lượng < 3,7% (tương ứng với mức nồng độ 0,1 – 1% trong nền mẫu) ⁷¹.

- Độ chính xác trung gian

Tiến hành: Tương tự như độ lặp lại nhưng khác ngày hoặc khác người hoặc khác thiết bị.

Yêu cầu: RSD hàm lượng < 3,7% (tương ứng với mức nồng độ 0,1 – 1% trong nền mẫu) ⁷¹.

e) Độ đúng

- Thêm chính xác một lượng chuẩn gốc vào các mẫu thử với các tỷ lệ lần lượt là 80%, 100% và 120% so với giới hạn cho phép (tương ứng với 2500 µg/ml carvedilol và 5 µg/ml với mỗi tap). Mỗi nồng độ được tiến hành 3 lần trong cùng điều kiện khảo sát. Tính tỉ lệ thu hồi dựa vào lượng chuẩn thêm vào ban đầu và lượng carvedilol và các tap tìm lại.
- Yêu cầu: 95-105% với các tap (tương ứng với mức nồng độ 0,1 – 1% trong nền mẫu) và 98-102% với carvedilol ⁷¹.

f) Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

- Dựa trên tỷ lệ tín hiệu trên nhiễu (S/N). Pha loãng dung dịch thử giả lập nồng độ giảm dần, tiến hành điện di và tính tỷ số S/N. Nồng độ mỗi tap tương ứng

$S/N = 3$ là LOD, $S/N = 10$ là LOQ. Đánh giá độ chính xác và độ đúng tại nồng độ tương ứng LOQ.

- Yêu cầu:
 - $S/N = 3$ cho LOD, $S/N = 10$ cho LOQ;
 - RSD của 6 lần lặp lại $\leq 3,7\%$ (tương ứng với mức nồng độ 0,1 – 1% trong nền mẫu) ⁷¹;
 - Độ đúng tại LOQ đạt với độ thu hồi trong khoảng 95-105% (tương ứng với mức nồng độ 0,1 – 1% trong nền mẫu) ⁷¹.

g) Khoảng xác định

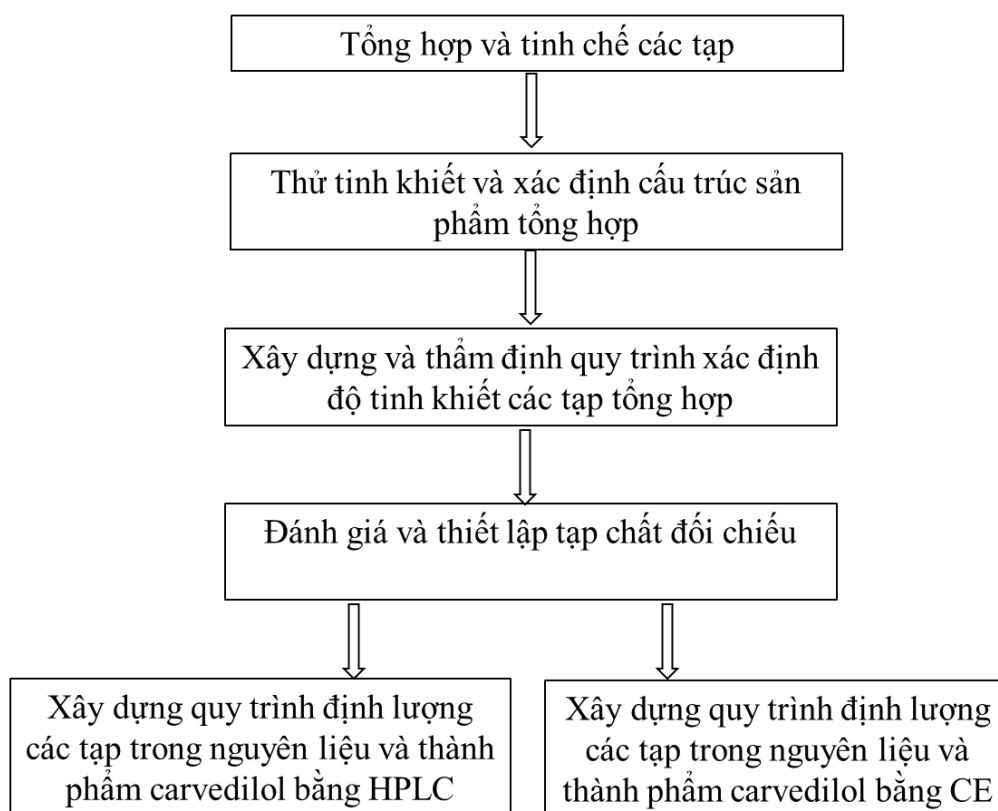
- Khoảng xác định của quy trình được xác định từ các thông số thẩm định tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác và giới hạn định lượng.
- Yêu cầu: Khoảng xác định là khoảng nồng độ đảm bảo tính tuyến tính, độ đúng và độ chính xác.

2.6.6.3. Ứng dụng

Tiến hành định lượng hàm lượng carvedilol và các tạp có trong 06 mẫu viên nén và 03 mẫu nguyên liệu theo phương pháp CE đã được xây dựng.

2.7. QUY TRÌNH NGHIÊN CỨU

Quy trình nghiên cứu được tóm tắt ở sơ đồ 2.6.



Sơ đồ 2.6. Quy trình nghiên cứu của đề tài

2.8. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH DỮ LIỆU

Phần xử lý kết quả phân tích sử dụng phần mềm Lab solution của Shimadzu (với sắc ký lỏng hiệu năng cao) và phần mềm OpenLab của Agilent (với điện di mao quản).

Các số liệu được phân tích và xử lý trên phần mềm Microsoft Excel 2016, sử dụng công cụ phân tích dữ liệu Data Analysis Toolpak được tích hợp trong phần mềm Excel.

Công thức tính giá trị trung bình: $\bar{x} = \frac{\sum x}{n}$

Công thức tính độ lệch chuẩn: $SD = \sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n - 1}}$

Công thức tính độ lệch chuẩn tương đối: $RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100$

Kiểm định t-test: two-sample assuming equal variances hoặc t-test: two-sample assuming unequal variances để so sánh giá trị trung bình hai nhóm; kiểm định F-test để kiểm tra sự khác biệt về phương sai giữa các nhóm và ý nghĩa của phương trình hồi quy. Công cụ Regression được sử dụng để đánh giá đường hồi quy tuyến tính. Giá trị $p = 0,05$ được sử dụng để xác định mức độ ý nghĩa thống kê.

2.9. ĐẠO ĐỨC TRONG NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu thực hiện hoàn toàn trên *in vitro*, các số liệu thu thập là trung thực và khách quan. Kết quả nghiên cứu chỉ nhằm phục vụ học tập, nghiên cứu và không dùng cho mục đích khác.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. TỔNG HỢP VÀ TINH CHẾ CÁC TẠP

3.1.1. Tổng hợp và tinh chế tạp A carvedilol

3.1.1.1. Khảo sát cải tiến quy trình tổng hợp hợp chất 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (6)

Dựa theo tài liệu tham khảo về tổng hợp tạp A của carvedilol ²⁵, hợp chất (6) được tổng hợp từ phản ứng thế S_N^2 giữa 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (2) và epichlorohydrin (5).

Tiến hành khảo sát sơ bộ điều kiện của phản ứng ở quy mô mẻ 2,94 g (12 mmol) 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (2) bằng cách bố trí thí nghiệm cổ điển Gaus-Geidell, thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại, đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất quy trình để lựa chọn ra điều kiện phản ứng tối ưu nhất.

a) Khảo sát dung môi phản ứng

Cố định các điều kiện gồm thời gian phản ứng 10h; nhiệt độ phản ứng 55 °C; xúc tác kali carbonat; tỉ lệ số mol epichlorohydrin (5) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (2) là 40:1; khảo sát các dung môi phản ứng gồm DMF, DMSO, aceton và không sử dụng dung môi (sử dụng epichlorohydrin là chất lỏng thay dung môi).

Kết quả được trình bày ở Phụ lục 1.1 cho thấy, khi tiến hành phản ứng trong điều kiện không sử dụng dung môi, hiệu suất quy trình cao nhất (50,6%) và cao hơn hẳn so với khi thực hiện trong các dung môi DMF, DMSO và aceton. Do đó nghiên cứu quyết định tiến hành phản ứng trong điều kiện không sử dụng dung môi.

b) Khảo sát tỷ lệ số mol epichlorohydrin (5) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (2)

Cố định các điều kiện bao gồm thời gian phản ứng 10h; xúc tác kali carbonat; nhiệt độ phản ứng 55 °C và tiến hành phản ứng trong điều kiện không sử dụng dung môi như đã khảo sát ở trên. Khảo sát sự thay đổi hiệu suất quy trình theo tỷ lệ số mol epichlorohydrin (5) và 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (2).

Kết quả được trình bày ở Phụ lục 1.1 cho thấy, hiệu suất quy trình tăng lên khi tỷ lệ số mol epichlorohydrin (**5**) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**) thay đổi từ 30 – 50. Hiệu suất quy trình thay đổi không đáng kể khi tiếp tục tăng tỷ lệ số mol epichlorohydrin (**5**) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**). Vì epichlorohydrin là một chất rất độc và để đảm bảo tính kinh tế nên quyết định tiến hành phản ứng với tỷ lệ là 50:1 (tương ứng với hiệu suất quy trình là 60,4 %).

c) Khảo sát xúc tác

Tiến hành khảo sát quy trình phản ứng với các xúc tác calci hydroxyd; natri hydroxyd; triethylamin; kali carbonat + triethylamin, kali carbonat + natri hydroxyd; kali carbonat cố định các điều kiện bao gồm thời gian phản ứng 10 h; nhiệt độ phản ứng 55 °C; với tỷ lệ số mol epichlorohydrin (**5**) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**) là 50:1 và không sử dụng dung môi. Khảo sát ảnh hưởng của các xúc tác calci hydroxyd; natri hydroxyd; triethylamin; kali carbonat + triethylamin, kali carbonat + natri hydroxyd; kali carbonat đến hiệu suất quy trình.

Kết quả được trình bày ở Phụ lục 1.1 cho thấy, khi tiến hành phản ứng với xúc tác kali carbonat + triethylamin thì cho hiệu suất của quy trình là cao nhất (68,3%) và cao hơn hẳn khi tiến hành phản ứng với các xúc tác khác. Do đó, để thuận lợi cho quá trình tổng hợp quyết định sử dụng cặp xúc tác là kali carbonat + triethylamin để khảo sát các yếu tố tiếp theo.

d) Khảo sát thời gian phản ứng

Tiến hành khảo sát thay đổi thời gian phản ứng từ 1 h đến 12 h và cố định các điều kiện còn lại gồm nhiệt độ phản ứng 55 °C; tỷ lệ số mol epichlorohydrin (**5**) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**) là 50:1; không sử dụng dung môi; xúc tác phản ứng kali carbonat + triethylamin. Khảo sát sự thay đổi hiệu suất quy trình theo thời gian phản ứng (1 h; 2 h; 4 h; 8 h; 10 h; 12 h).

Kết quả được trình bày ở Phụ lục 1.1 cho thấy, hiệu suất của quy trình tổng hợp hợp chất (**6**) tăng lên theo thời gian từ 1 đến 4 h. Từ thời điểm 4 h trở đi hiệu suất toàn quy trình thay đổi không đáng kể. Do đó, để thuận lợi cho quá trình tổng hợp,

tiết kiệm thời gian và đảm bảo tính kinh tế, nghiên cứu quyết định tiến hành phản ứng trong thời gian 4 h.

e) Khảo sát nhiệt độ phản ứng

Tiến hành khảo sát nhiệt độ tiến hành phản ứng ở các mức: RT; 35; 45; 55; 65; 75; 85 °C và cố định tỷ lệ số mol epichlorohydrin (**5**) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**) là 50:1; xúc tác kali carbonat + triethylamin; thời gian phản ứng là 4 h và không sử dụng dung môi. Khảo sát sự thay đổi hiệu suất quy trình theo nhiệt độ phản ứng nhiệt độ phòng (RT); 35; 45; 55; 65; 75; 85 °C.

Kết quả được trình bày ở Phụ lục 1.1 cho thấy, hiệu suất của quy trình tăng khi thay đổi nhiệt độ phản ứng từ nhiệt độ phòng (RT) đến 75 °C và cao nhất ở 75 °C. Sau đó hiệu suất của quy trình giảm dần khi tiếp tục tăng nhiệt độ. Do đó, nghiên cứu chọn nhiệt độ phản ứng là 75 °C.

*** Kết luận:**

Quy trình tổng hợp hợp chất 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) sau khi tối ưu như sau: Cho 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**) (12 mmol; 2,94 g) vào epichlorohydrin (**5**) (576 mmol; 45 ml) trong bình cầu 2 cổ 250 ml. Cho thêm kali carbonat (24 mmol; 3,30 g) và triethylamin (120 mmol; 17,4 ml), khuấy từ, đun ở 75 °C trong 4 h. Để nguội bình phản ứng về nhiệt độ phòng. Đổ dịch phản ứng vào bình lắng gạn 500 ml, thêm nước cất đến vạch 250 ml, chiết 3 lần với EtOAc (150, 100, 100 ml). Dịch chiết EtOAc được làm khan với natri sulfat.

3.1.1.2. Khảo sát quy trình tổng hợp tạp A (giai đoạn 2)

Dựa theo tài liệu tham khảo về tổng hợp tạp A của carvedilol²⁵, tạp A được tổng hợp từ phản ứng mở vòng epoxy giữa 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) và 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**).

Tiến hành khảo sát sơ bộ điều kiện phản ứng ở quy mô mẻ 1,77 g (6 mmol) 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) bằng cách bố trí thí nghiệm cổ điển Gaus-Geidell, thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại, đánh giá dựa trên hiệu suất quy trình để lựa chọn ra điều kiện phản ứng tối ưu nhất.

a) Khảo sát dung môi phản ứng

Khảo sát lần lượt các dung môi phản ứng: monoglyme, ethanol, DMF, DMSO, isopropanol, isoamyl alcohol và không sử dụng dung môi, cố định các điều kiện còn lại gồm thời gian phản ứng 5h; nhiệt độ phản ứng 80 °C; tỷ lệ số mol **(3)** / **(6)** là 5:1 và không sử dụng xúc tác. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo dung môi được thể hiện ở Phụ lục 1.8.

Kết quả cho thấy, phản ứng tổng hợp tạp A của carvedilol không xảy ra khi tiến hành phản ứng trong dung môi ethanol; isopropanol; isoamyl alcohol. Khi tiến hành phản ứng trong điều kiện không sử dụng dung môi hiệu suất toàn quy trình cao nhất và cao hơn hẳn so với khi thực hiện trong các dung môi còn lại. Do đó nghiên cứu chọn không sử dụng dung môi khi tiến hành phản ứng.

b) Khảo sát tỷ lệ số mol 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (3) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (6)

Tiến hành khảo sát tỷ lệ số mol 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin **(3)** / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol **(6)** cố định các điều kiện còn lại bao gồm thời gian phản ứng 5 h; nhiệt độ phản ứng 80 °C; không sử dụng xúc tác và tiến hành phản ứng trong điều kiện không sử dụng dung môi như đã khảo sát ở trên. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo tỷ lệ số mol **(3)** / **(6)** được thể hiện ở Phụ lục 1.8.

Kết quả cho thấy, hiệu suất của quy trình tăng lên khi tỷ lệ số mol giữa 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin **(3)** và 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol **(6)** thay đổi từ 4 đến 6, khi tiếp tục tăng thì hiệu suất quy trình giảm. Hiệu suất quy trình cao nhất khi tỷ lệ số mol 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin **(3)** và 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol **(6)** là 6:1 (33,9%).

c) Khảo sát xúc tác

Tiến hành khảo sát quy trình phản ứng với các xúc tác: silica gel, magnesi oxyd và không sử dụng xúc tác. Cố định tỷ lệ số mol giữa nguyên liệu **(3)** và nguyên liệu **(6)** là 6:1; không sử dụng dung môi khi tiến hành phản ứng; thời gian phản ứng

5 h và nhiệt độ phản ứng 80 °C. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo xúc tác được thể hiện ở Phụ lục 1.8.

Kết quả cho thấy, hiệu suất của quy trình khi sử dụng xúc tác silica gel là cao nhất (34,1%), tuy nhiên không chênh lệch nhiều so với hiệu suất khi không sử dụng xúc tác (33,9%). Đồng thời, khi sử dụng silica gel làm xúc tác cho phản ứng thì sẽ gây khó khăn trong quá trình xử lý sản phẩm nên nghiên cứu quyết định chọn không sử dụng xúc tác cho phản ứng.

d) Khảo sát nhiệt độ phản ứng

Tiến hành khảo sát nhiệt độ phản ứng ở các mức: nhiệt độ phòng (RT), 40, 50, 60, 70, 80 °C và cố định tỷ lệ số mol giữa nguyên liệu **(3)** và nguyên liệu **(6)** là 6:1; không sử dụng dung môi khi tiến hành phản ứng; thời gian phản ứng 5 h; không sử dụng xúc tác. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo nhiệt độ được thể hiện ở Phụ lục 1.8.

Kết quả cho thấy, khi tăng từ nhiệt độ phòng (RT) lên các mức đến 80 °C thì hiệu suất của quy trình tổng hợp tạp A hầu như giảm dần. Hiệu suất của quy trình cao nhất khi tiến hành phản ứng ở nhiệt độ phòng (48,3%).

e) Khảo sát thời gian phản ứng

Tiến hành khảo sát thời gian phản ứng từ 2 h đến 20 h, cố định tỷ lệ số mol giữa nguyên liệu **(3)** và nguyên liệu **(6)** là 6:1; không sử dụng dung môi khi tiến hành phản ứng; tiến hành phản ứng ở nhiệt độ phòng; không sử dụng xúc tác. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo thời gian phản ứng được thể hiện ở Phụ lục 1.8.

Kết quả cho thấy, hiệu suất của quy trình tăng lên theo thời gian phản ứng trong khoảng thời gian từ 2 đến 16 h. Từ thời điểm 16 h trở đi, hiệu suất quy trình có xu hướng giảm. Hiệu suất của quy trình cao nhất khi tiến hành phản ứng trong 16 giờ.

*** Kết luận:**

Quy trình tổng hợp tạp A sau khi tối ưu như sau: Cho 2-(2-methoxyphenoxy) ethanamin **(3)** (36 mmol, 6,12 g) vào bình cầu hai cổ 100ml, thêm từ từ 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol **(6)** rắn dạng thô (tương ứng 6 mmol;

1,77 g) và khuấy từ ở nhiệt độ phòng trong 16 h. Hỗn hợp sau phản ứng được rửa với nước, đem lọc dưới áp suất giảm thu được chất rắn.

3.1.1.3. Tinh chế sản phẩm tổng hợp

a) Tinh chế sản phẩm tổng hợp hợp chất 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (6)

Sản phẩm tổng hợp hợp chất (6) được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi petroleum ether : EtOAc (5:3).

Hiệu suất tinh chế bằng sắc ký cột:

- Lượng sản phẩm theo lý thuyết: 3,63 g.
- Lượng thu được trước khi tinh chế (sản phẩm thô (6)): 3,94 g.
- Lượng thu được sau khi tinh chế (sản phẩm kết tinh (6)): 3,14 g.
- Hiệu suất quy trình tổng hợp hợp chất (6): 86,5%.

b) Tinh chế sản phẩm tổng hợp tạp A

Sản phẩm tổng hợp tạp A được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi petroleum ether : EtOAc : methanol (3:4:1).

Hiệu suất tinh chế bằng sắc ký cột:

- Lượng sản phẩm theo lý thuyết: 3,778 g.
- Lượng thu được trước khi tinh chế (sản phẩm tạp A thô): 6,78 g.
- Lượng thu được sau khi tinh chế (sản phẩm kết tinh tạp A): 2,709 g.
- Hiệu suất quy trình tổng hợp sau tinh chế: 71,7%.

Hiệu suất của toàn quy trình là 62,02%

3.1.2. Tổng hợp và tinh chế tạp B carvedilol

3.1.2.1. Khảo sát cải tiến quy trình tổng hợp tạp B carvedilol

Tiến hành khảo sát sơ bộ điều kiện của phản ứng ở quy mô mẻ 0,90 g (3,7 mmol) 4-(2,3-epoxypropoxy)carbazol (2) bằng cách bố trí thí nghiệm cổ điển Gaus-Geidell, thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại, đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất quy trình để lựa chọn ra điều kiện phản ứng tối ưu nhất.

a) Khảo sát tác nhân phản ứng

Cố định các điều kiện gồm dung môi monoglyme; nhiệt độ phản ứng 55 °C; xúc tác kali carbonat; thời gian phản ứng 6h; khảo sát hai tác nhân phản ứng gồm carvedilol, 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin (**3**).

Kết quả cho thấy tác nhân carvedilol cho hiệu suất cao hơn so với 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin (**3**) (33,9 % và 20,5%), quy trình tinh chế tạp B từ carvedilol đơn giản hơn. Do đó nghiên cứu tiến hành phản ứng với tác nhân carvedilol.

b) Khảo sát dung môi phản ứng

Cố định các điều kiện gồm tác nhân phản ứng carvedilol; nhiệt độ 55 °C; thời gian phản ứng 6h; khảo sát các dung môi phản ứng gồm monoglyme, ethanol, isopropanol, methanol. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo dung môi phản ứng được thể hiện ở Phụ lục 2.1.

Kết quả cho thấy, trong các dung môi khảo sát, ethanol cho hiệu suất phản ứng cao nhất (59,3%), do đó ethanol được lựa chọn làm dung môi phản ứng.

c) Khảo sát nhiệt độ phản ứng

Cố định các điều kiện gồm tác nhân phản ứng carvedilol, dung môi ethanol, thời gian phản ứng 6h; khảo sát nhiệt độ phản ứng 45 °C, 55 °C, 65 °C, 75 °C. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo nhiệt độ phản ứng được thể hiện ở Phụ lục 2.1.

Kết quả cho thấy, hiệu suất quy trình tăng theo chiều tăng nhiệt độ từ 45 °C đến 65 °C, sau đó giảm nhẹ khi tăng nhiệt độ lên 75 °C. Do đó nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ phản ứng là 65 °C.

d) Khảo sát thời gian phản ứng

Cố định các điều kiện gồm tác nhân phản ứng carvedilol, dung môi ethanol, nhiệt độ phản ứng 65 °C; khảo sát thời gian phản ứng 4h, 6h, 8h, 10h và 12h. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo thời gian phản ứng được thể hiện ở Phụ lục 2.1.

Kết quả cho thấy, hiệu suất quy trình tăng theo thời gian phản ứng từ 4 h đến 8 h, sau đó gần như không đổi khi tăng thời gian đến 12 h. Do đó nghiên cứu lựa chọn thời gian phản ứng là 8 h.

*** Kết luận:**

Quy trình tổng hợp tạp B sau khi tối ưu như sau: Hòa tan carvedilol (3,5 mmol; 1,44 g) vào ethanol (50 mL), đun nóng cho carvedilol tan hoàn toàn. Thêm 4-(2,3-epoxypropoxy)carbazol (**2**) (3,7 mmol; 0,90 g) vào dung dịch carvedilol trong ethanol. Đun hồi lưu hỗn hợp phản ứng ở 65 °C trong 8 giờ. Hỗn hợp phản ứng sau đó được làm nguội, cô bay hơi tới gần dưới áp suất giảm ở 55 °C.

3.1.2.2. Tinh chế sản phẩm tổng hợp

Sản phẩm tổng hợp tạp B được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi cyclohexan : EtOAc (1:1).

Hiệu suất tinh chế bằng sắc ký cột:

- Lượng sản phẩm theo lý thuyết: 2,288 g.
- Lượng thu được sau khi tinh chế: 1,6201 g.
- Hiệu suất quy trình tổng hợp sau tinh chế: 70,8%.

3.1.3. Tổng hợp và tinh chế tạp C carvedilol

3.1.3.1. Khảo sát cải tiến quy trình tổng hợp tạp C carvedilol

Tiến hành khảo sát sơ bộ điều kiện của phản ứng ở quy mô mẻ 1,23 g (3,0 mmol) carvedilol bằng cách bố trí thí nghiệm cổ điển Gaus-Geidell, thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại, đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất quy trình để lựa chọn ra điều kiện phản ứng tối ưu nhất.

a) Khảo sát tác nhân phản ứng

Cố định các điều kiện gồm dung môi toluen, xúc tác triethylamin, nhiệt độ phản ứng ở RT, thời gian phản ứng 8 h; khảo sát hai tác nhân phản ứng gồm benzyl clorid, benzyl bromid.

Kết quả được trình bày ở Phụ lục 3.1 cho thấy, tác nhân benzyl bromid cho hiệu suất cao hơn so với benzyl clorid (46,0 % và 38,1 %). Do đó nghiên cứu tiến hành phản ứng với tác nhân benzyl bromid.

b) Khảo sát dung môi phản ứng

Cố định các điều kiện gồm tác nhân phản ứng benzyl bromid, xúc tác triethylamin, nhiệt độ phản ứng ở RT, thời gian phản ứng 8 h; khảo sát các dung môi phản ứng gồm ethanol, methanol, aceton, toluen.

Kết quả được trình bày ở Phụ lục 3.1 cho thấy, trong các dung môi khảo sát, aceton cho hiệu suất phản ứng cao nhất (60,5%), do đó aceton được lựa chọn làm dung môi phản ứng.

c) Khảo sát xúc tác

Cố định các điều kiện gồm tác nhân phản ứng benzyl bromid, dung môi aceton, nhiệt độ phản ứng ở RT, thời gian phản ứng 8 h; khảo sát xúc tác phản ứng gồm calci hydroxyd; natri hydroxyd; triethylamin; kali carbonat.

Kết quả được trình bày ở Phụ lục 3.1 cho thấy, trong các xúc tác khảo sát, kali carbonat cho hiệu suất phản ứng cao nhất (67,6%), do đó kali carbonat được lựa chọn làm xúc tác phản ứng.

d) Khảo sát nhiệt độ phản ứng

Cố định các điều kiện gồm tác nhân phản ứng benzyl bromid, dung môi aceton, xúc tác kali carbonat, thời gian phản ứng 8 h; khảo sát nhiệt độ phản ứng gồm RT, 40 °C, 50 °C, 55 °C.

Kết quả được trình bày ở Phụ lục 3.1 cho thấy, hiệu suất quy trình tăng theo chiều tăng nhiệt độ từ nhiệt độ phòng đến 55 °C. Do nhiệt độ sôi của aceton từ 56 – 57 °C nên nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ phản ứng là 55 °C.

e) Khảo sát thời gian phản ứng

Cố định các điều kiện gồm tác nhân phản ứng benzyl bromid, dung môi aceton, xúc tác kali carbonat, nhiệt độ phản ứng 55 °C; khảo sát thời gian phản ứng 1 h; 2 h;

4 h; 6 h; 8 h, 10 h. Sự thay đổi hiệu suất quy trình thời gian phản ứng được thể hiện ở Phụ lục 3.1.

Kết quả cho thấy, hiệu suất quy trình tăng theo thời gian phản ứng từ 1 h đến 6 h, sau đó gần như không đổi khi tăng thời gian đến 10 h. Do đó nghiên cứu lựa chọn thời gian phản ứng là 6 h.

*** Kết luận:**

Quy trình tổng hợp tạp C sau khi tối ưu như sau: Hòa tan benzyl bromid (3,3 mmol; 0,56 g) trong acetone (45 ml) trong bình cầu hai cổ 100 ml. Thêm vào bình cầu lần lượt kali carbonat (6 mmol; 0,83 g) và carvedilol (3 mmol; 1,23 g). Đun hồi lưu hỗn hợp phản ứng trong 6 h. Hỗn hợp phản ứng sau đó được làm nguội, cô quay tới cạn dưới áp suất giảm ở 50 °C. Cặn được hòa tan trong DCM, lọc thu dịch. Cô cho bay hơi DCM.

3.1.3.2. Tinh chế sản phẩm tổng hợp

Sản phẩm tổng hợp tạp C được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi cyclohexan : EtOAc (2:1).

Hiệu suất tinh chế bằng sắc ký cột:

- Lượng sản phẩm theo lý thuyết: 1,5027 g.
- Lượng thu được sau khi tinh chế: 1,1802 g.
- Hiệu suất quy trình tổng hợp sau tinh chế: 78,5%.

3.1.4. Tổng hợp và tinh chế tạp D carvedilol

3.1.4.1. Khảo sát cải tiến quy trình tổng hợp tạp D carvedilol

Tiến hành khảo sát sơ bộ điều kiện của phản ứng ở quy mô mẻ 1,0 g (5,45 mmol) 4-hydroxycarbazol bằng cách bố trí thí nghiệm cổ điển Gaus-Geidell, thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại, đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất quy trình để lựa chọn ra điều kiện phản ứng tối ưu nhất.

a) Khảo sát dung môi phản ứng

Cố định các điều kiện gồm thời gian phản ứng 6h, nhiệt độ 45 °C, tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol là 1,5, tỉ lệ số mol natri hydroxyd trên cơ chất 4-hydroxycarbazol là 1,1, khảo sát các dung môi phản ứng gồm aceton, DMSO, acetonitril, DMF. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo dung môi phản ứng được thể hiện ở Phụ lục 4.1.

Kết quả cho thấy, trong các dung môi khảo sát, DMSO cho hiệu suất phản ứng cao nhất (66,4%), do đó DMSO được lựa chọn làm dung môi phản ứng.

b) Khảo sát thời gian phản ứng

Cố định các điều kiện gồm dung môi DMSO, nhiệt độ 45 °C, tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol là 1,5:1, tỉ lệ số mol natri hydroxyd trên cơ chất 4-hydroxycarbazol là 1,1:1, khảo sát các thời gian phản ứng gồm 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5h. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo thời gian phản ứng được thể hiện ở Phụ lục 4.1.

Kết quả cho thấy, hiệu suất quy trình tăng theo thời gian phản ứng từ 0,5 h đến 2 h, sau đó gần như không đổi trước khi giảm nhẹ khi tăng thời gian đến 3,5 h. Do đó nghiên cứu lựa chọn thời gian phản ứng là 2 h.

c) Khảo sát nhiệt độ phản ứng

Cố định các điều kiện gồm dung môi DMSO, thời gian phản ứng 2 h, tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol là 1,5:1, tỉ lệ số mol natri hydroxyd trên cơ chất 4-hydroxycarbazol là 1,1:1, khảo sát các nhiệt độ phản ứng gồm RT, 35, 40, 45, 48, 50, 55, 60 °C. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo nhiệt độ phản ứng được thể hiện ở Phụ lục 4.1.

Kết quả cho thấy, hiệu suất quy trình tăng theo chiều tăng nhiệt độ từ RT đến 48 °C, sau đó giảm nhẹ khi tăng nhiệt độ lên 60 °C. Do đó nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ phản ứng là 48 °C.

d) Khảo sát tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol

Cố định các điều kiện gồm dung môi DMSO, thời gian phản ứng 2 h, nhiệt độ 48 °C, tỉ lệ số mol natri hydroxyd trên cơ chất 4-hydroxycarbazol là 1,1:1, khảo sát các tỉ lệ số mol gồm 1:1; 1,25:1; 1,5:1; 1,75:1; 1,9:1; 2:1; 2,2:1. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol được thể hiện ở Phụ lục 4.1.

Kết quả cho thấy, hiệu suất quy trình tăng theo chiều tăng tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol từ 1 đến 1,9, sau đó giảm nhẹ khi tăng tỷ lệ mol lên 2,25. Do đó nghiên cứu lựa chọn tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol là 1,9.

e) Khảo sát tỉ lệ số mol natri hydroxyd và cơ chất 4-hydroxycarbazol

Cố định các điều kiện gồm dung môi DMSO, thời gian phản ứng 2 h, nhiệt độ 48 °C, tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol là 1,9:1, khảo sát các tỉ lệ số mol gồm 0,875:1; 0,9625:1; 1,1:1; 1,23:1; 1,325:1; 1,5125:1; 1,65:1. Sự thay đổi hiệu suất quy trình theo tỉ lệ số mol natri hydroxyd và cơ chất 4-hydroxycarbazol được thể hiện ở Phụ lục 4.1.

Kết quả cho thấy, hiệu suất quy trình tăng theo chiều tăng tỉ lệ số mol natri hydroxyd và cơ chất 4-hydroxycarbazol từ 0,875:1 đến 1,230:1, sau đó giảm nhẹ khi tăng tỷ lệ mol lên 1,650:1. Do đó nghiên cứu lựa chọn tỉ lệ số mol natri hydroxyd và cơ chất 4-hydroxycarbazol là 1,230:1.

*** Kết luận:**

Quy trình tổng hợp tạp D sau khi tối ưu như sau: 1 g 4-hydroxycarbazol (5,45 mmol) được thêm vào 3,4 ml dung dịch natri hydroxyd 2 M trong bình cầu. Khối phản ứng được làm lạnh về 10-15 °C và thêm nhỏ giọt 15 ml DMSO. Sau khi khuấy trộn 15 phút, epichlorohydrin (10,36 mmol) được thêm vào trong 3 phút, giữ ở nhiệt độ 10-15 °C. Sau đó, tăng nhiệt độ từ từ lên 45 °C và giữ trong 2 h dưới điều kiện khuấy trộn. Sau khi hoàn thành phản ứng, kiểm tra sản phẩm bằng sắc ký lớp mỏng,

sản phẩm hòa loãng với 5 ml nước, sau đó được lọc và rửa với nước nhiều lần, sấy ở 45 °C.

3.1.4.2. Tinh chế sản phẩm tổng hợp

Sản phẩm tổng hợp tạp D được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexan - EtOAc (4:1).

Hiệu suất tinh chế bằng sắc ký cột:

- Lượng sản phẩm theo lý thuyết: 1,3060 g.
- Lượng thu được sau khi tinh chế: 1,0490 g.
- Hiệu suất quy trình tổng hợp sau tinh chế: 80,3%.

3.1.5. Điều chế và tinh chế tạp E carvedilol

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của dung môi phản ứng đến hiệu suất điều chế ở quy mô mẻ 1,5 g (8,97 mmol) 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Khảo sát dung môi điều chế tạp E

Dung môi	Hiệu suất	Nhận xét
Cloroform	87,64 %	Tủa hình kim, màu trắng
EtOAc	70,78 %	Tủa mịn, màu trắng
Aceton		Không thu được tủa và dung dịch chuyển sang màu nâu đỏ
Acetonitril		Thu được tủa không bền, chảy ở nhiệt độ thường

Nhận xét: kết quả khảo sát cho thấy sử dụng cloroform cho hiệu suất cao nhất. Do đó, nghiên cứu lựa chọn cloroform làm dung môi để điều chế tạp E.

Như vậy quy trình điều chế tạp E như sau: Hòa tan 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin (**3**) (8,97 mmol; 1,5 g) trong cloroform (50 mL) vào bình cầu 250 mL, sục khí HCl mới điều chế (bằng cách nhỏ từ từ acid H₂SO₄ vào bình nón chứa NaCl) vào bình đến khi xuất hiện tủa. Để yên qua ngày rồi lọc hỗn hợp phản ứng để thu lấy tủa. Sản phẩm tổng hợp tạp E được tinh chế bằng phương pháp rửa tủa nhiều lần với acetone.

Hiệu suất tinh chế:

- Lượng sản phẩm theo lý thuyết: 1,9886 g.
- Lượng thu được sau khi tinh chế: 1,7428 g.
- Hiệu suất quy trình tổng hợp sau tinh chế: 87,64 %.

3.2. THỬ TINH KHIẾT VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC SẢN PHẨM TỔNG HỢP

3.2.1. Thử tinh khiết

Các phụ lục 1.8, 2.2, 3.2, 4.2, 5.1 minh họa sắc ký đồ từng sản phẩm tổng hợp với ba hệ dung môi khai triển khác nhau. Kết quả cho thấy sản phẩm tổng hợp đều cho một vết duy nhất và khác với vết nguyên liệu. Như vậy các sản phẩm tổng hợp tạp A, B, C, D và E tinh khiết trên SKLM.

3.2.2. Xác định cấu trúc

3.2.2.1. Tạp A carvedilol

a) Hợp chất 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (6)

- Phổ hồng ngoại IR (ATR, cm^{-1}): 3053, 2872, 1585, 1504, 1462, 1273 (Phụ lục 1.2). Các đỉnh đặc trưng phù hợp với phổ IR của hợp chất (6) theo công trình nghiên cứu của Kumar. K. S và cộng sự¹¹ (IR (KBr, cm^{-1}): 3051, 2871, 1585, 1504, 1463, 1273).

- Phổ khối lượng (MS) (Phụ lục 1.3): Phổ HR-MS (+) của hợp chất (6) có $m/z = 296,1522$ $[\text{MH}]^+$ và $m/z = 318,1361$ $[\text{MNa}]^+$ phù hợp với giá trị m/z dự kiến là 296,1287 $[\text{MH}]^+$; 318,1106 $[\text{MNa}]^+$ phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến của hợp chất (6) ($\text{C}_{18}\text{H}_{17}\text{NO}_3$; $M = 295,34$).

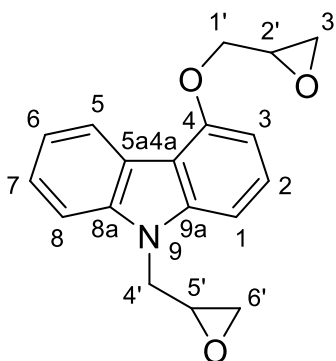
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (Phụ lục 1.4, 1.5):

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 8,34 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H5); 7,40-7,45 (m, 2H, H7, H8); 7,35 (t, 1H, $J = 8$ Hz, H2); 7,23-7,27 (m, 1H, H6); 7,07 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H1); 6,66 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H3); 4,56 (dd, 1H, $J = 3,5$ Hz, 16 Hz, H4'a); 4,43 (dd, 1H, $J = 3,5$ Hz, 11 Hz, H1'a); 4,35 (dd, 1H, $J = 5$ Hz, 16 Hz, H4'b); 4,23 (dd, 1H, $J = 5,5$ Hz, 11 Hz, H1'b); 3,51-3,53 (m, 1H, H2'); 3,29-3,31 (m, 1H, H5'); 2,96 (t-

like, 1H, $J = 4,5$ Hz, H3'a); 2,86 (dd, 1H, $J = 2,5$ Hz, 5,5 Hz, H3'b); 2,76 (t-like, 1H, $J = 4,5$ Hz, H6'a); 2,52 (dd, 1H, $J = 2,5$ Hz, 4,5 Hz, H6'b).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ ppm): 155,1; 142,3; 140,4; 126,6; 125,2; 123,3; 122,3; 119,8; 112,4; 108,3; 102,4; 101,5; 68,9; 50,6; 50,4; 45,3; 44,82; 44,75.

Phân tích dữ liệu phổ ^{13}C -NMR, ^1H -NMR cho thấy thấy số lượng và vị trí của proton, carbon của sản phẩm tinh chế hợp chất **(6)** phù hợp với TLTK²⁵ và công thức cấu tạo của 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**Sơ đồ 3.1**).



Sơ đồ 3.1. Cấu trúc hóa học của 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol

b) Tập A

- Phổ tử ngoại – khả kiến UV-Vis (λ_{max} , nm): 226; 245; 286; 337 (Phụ lục 1.9).

- Phổ hồng ngoại FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3283, 2839, 1593, 1506, 1252, 1123, 1051, 733, 714 (Phụ lục 1.10). Các đỉnh đặc trưng phù hợp với phổ IR của tập A carvedilol theo công trình nghiên cứu của Somiseti Narender Rao và các cộng sự²⁶ (IR (KBr, cm^{-1}): 3281, 2833, 2835, 1593, 1505, 1253, 1124, 1053, 743, 715).

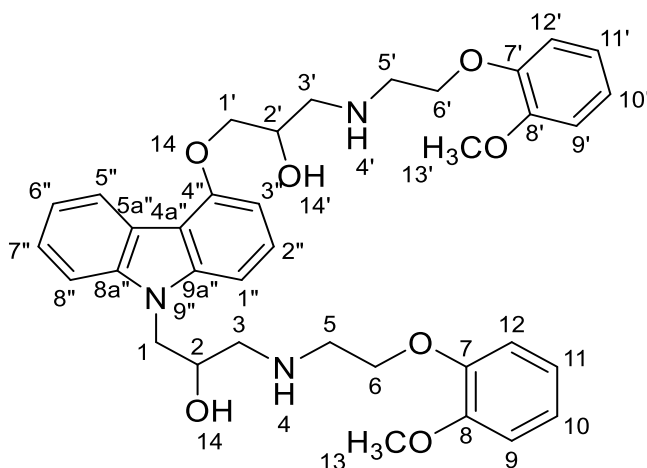
- Phổ khối lượng (Phụ lục 1.11): Phổ khối HR-MS (+) của tập A có $m/z = 630,3183$ $[\text{MH}]^+$ và $m/z = 652,3048$ $[\text{MNa}]^+$ phù hợp với giá trị m/z dự kiến là 630,3181 $[\text{MH}]^+$; 652,3000 $[\text{MNa}]^+$ và phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến và cấu trúc có chứa nhóm amin ($-\text{NH}-$) của tập A ($\text{C}_{36}\text{H}_{43}\text{N}_3\text{O}_7$; $M = 629,74$). Độ lệch xác định được là 0,3 ppm.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (Phụ lục 1.12, 1.13, 1.14, 1.15)

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 8,21 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, H5''); 7,44 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H8''); 7,39 (t, 1H, $J = 8$ Hz, H7''); 7,32 (t, 1H, $J = 8$ Hz, H2''); 7,19 (t, 1H, $J = 8$ Hz, H6''); 7,09 (d, 1H, $J = 8,5$ Hz, H1''); 6,89-6,95 (m, 2H, H10 , H10'); 6,84-6,88 (m, 4H, H9 , H11 , H11' , H12); 6,82-6,84 (m, 2H, H9' , H12'); 6,65 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H3''); 4,34 (t, 2H, $J = 7$ Hz, H1); 4,25-4,31 (m, 2H, H1'a , H2'); 4,18-4,23 (m, 2H, H1'b , H2); 4,12 (t, 2H, $J = 5\text{Hz}$, H6); 4,02 (t, 2H, $J = 5\text{Hz}$, H6'); 3,80 (s, 3H, H13); 3,76 (s, 3H, H13'); 3,08-3,11 (m, 3H, H3'a , H5'); 2,94-3,00 (m, 3H, H3'b , H5); 2,80 (dd, 1H, $J = 3,5$ Hz, 12,5 Hz, H3a); 2,68 (dd, 1H, $J = 3,5$ Hz, 12,5 Hz, H3a).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz, δ ppm): 155,2; 149,7; 149,6; 148,2; 148,1; 142,4; 140,1; 126,6; 125,0; 123,0; 122,2; 121,73; 121,70; 120,99; 120,96; 119,5; 114,2; 114,1; 112,2; 112,0; 111,9; 108,7; 102,5; 101,2; 70,4; 68,7; 68,6; 68,42; 68,36; 55,83; 55,75; 52,7; 52,0; 48,7; 48,5; 47,3.

Phân tích dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$, $^1\text{H-NMR}$, HSQC, HMBC cho thấy thấy số lượng và vị trí của proton, carbon của sản phẩm tinh chế tạp A phù hợp với TLTK^{25,26} và công thức cấu tạo của tạp A (**Sơ đồ 3.2**).



Sơ đồ 3.2. Cấu trúc hóa học của tạp A carvedilol

3.2.2.2. Tạp B carvedilol

- Phổ tử ngoại – khả kiến UV-Vis (λ_{max} , nm): 242,6; 285,2; 331,2 (Phụ lục 2.3).
- Phổ hồng ngoại FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3528, 3456, 3401, 2926, 2872, 1605, 1587, 1504, 1252, 1123, 750 (Phụ lục 2.4). Các đỉnh đặc trưng phù hợp với phổ IR

của tạp B carvedilol theo công trình nghiên cứu của Somiseti Narender Rao và các cộng sự ²⁶ (IR (KBr, cm⁻¹): 3530, 3461, 3403, 2938, 2917, 2870, 1604, 1589, 1506, 1252, 1124, 1104, 752, 717, 735).

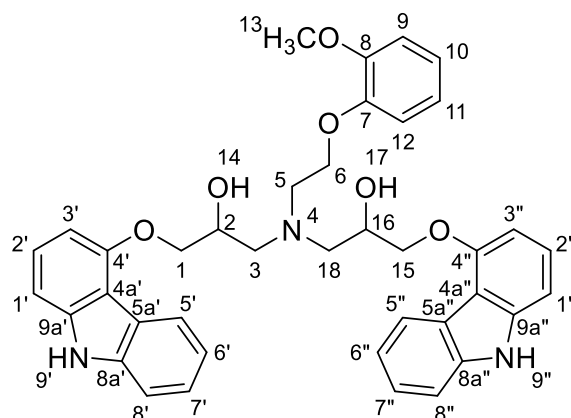
- Phổ khối lượng (Phụ lục 2.5): Phổ khối HR-MS (-) của tạp B có m/z = 644,2763 [MH]⁺ phù hợp với giá trị m/z dự kiến là 644,2761 [MH]⁺ và phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến và cấu trúc có chứa nhóm hydroxy (-OH) của tạp B (C₃₉H₃₉N₃O₆; M = 645,74). Độ lệch xác định được là 0,3 ppm.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (Phụ lục 2.6, 2.7, 2.8, 2.9)

¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 500 MHz, δ ppm): 11,19 (s, 2H, NH); 8,26 (d, 2H, J = 8,5 Hz, H5', H5''); 7,43 (d, 2H, J = 8 Hz, H8', H8''); 7,27-7,31 (m, 2H, H7', H7''); 7,17 (t, 2H, J = 8 Hz, H2', H2''); 7,06-7,10 (m, 2H, H6', H6''); 7,04 (d, 2H, J = 8 Hz, H1', H1''); 6,84-6,87 (m, 1H, H9); 6,78-6,82 (m, 1H, H10); 6,61-6,67 (m, 1H, H11); 6,53 (d, 2H, J = 8 Hz, H3', H3''); 5,02 (d, 2H, J = 4 Hz, OH); 4,16-4,24 (m, 6H, H1, H2, H15, H16); 3,93-4,05 (m, 2H, H6); 3,61 (s, 3H, H13); 2,98-3,07 (m, 4H, H3a, H18a, H5); 2,84-2,91 (m, 2H, H3b, H18b).

¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz, δ ppm): 155,0; 148,9; 147,9; 141,1; 138,9; 126,4; 124,4; 122,5; 121,8; 120,7; 120,5; 118,5; 112,8; 112,1; 111,5; 110,2; 103,7; 100,3; 70,2; 67,9; 66,7; 59,0; 55,3; 54,3.

Phân tích dữ liệu phổ ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HSQC, HMBC cho thấy thấy số lượng và vị trí của proton, carbon của sản phẩm tinh chế tạp B phù hợp với TLTK ³⁹ và công thức cấu tạo của tạp B (Sơ đồ 3.3).



Sơ đồ 3.3. Cấu trúc hóa học của tạp B carvedilol

3.2.2.3. Tạp C carvedilol

- Phổ tử ngoại – khả kiến UV-Vis ($\lambda_{\max}$, nm): 242,4; 286,0; 331,8 (Phụ lục 3.3).
- Phổ hồng ngoại FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3405, 2874, 2841, 1590, 1506, 1253, 1122, 1102, 1026, 740, 726 (Phụ lục 3.43). Các đỉnh đặc trưng phù hợp với phổ IR của tạp C carvedilol theo công trình nghiên cứu của Rao và các cộng sự²⁶.

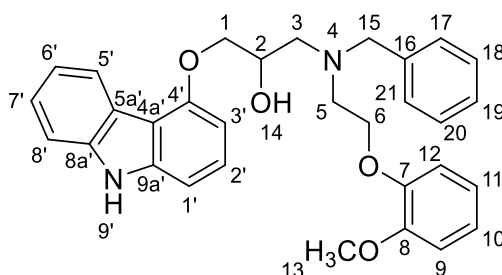
- Phổ khối lượng (Phụ lục 3.5): Phổ khối HR-MS (-) của tạp C có $m/z = 495,2287$ $[\text{MH}]^+$ phù hợp với giá trị m/z dự kiến là 495,2284 $[\text{MH}]^+$ và phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến và cấu trúc có chứa nhóm hydroxy ($-\text{OH}$) của tạp C ($\text{C}_{31}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_4$; $M = 496,60$). Độ lệch xác định được là 0,6 ppm.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (Phụ lục 3.6, 3.7, 3.8, 3.9)

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 8,21 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H5'); 8,07 (s, 1H, NH); 7,33-7,38 (m, 4H, H17, H21, H7', H8'); 7,26-7,33 (m, 3H, H18, H20, H2'); 7,21-7,25 (m, 1H, H19); 7,15-7,18 (m, 1H, H6'); 7,01 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H1'); 6,90-6,93 (m, 1H, H10); 6,81-6,87 (m, 3H, H11, H12, H9); 6,61 (d, 1H, $J = 8$ Hz, H3'); 4,26-4,30 (m, 2H, H1a, H2); 4,17-4,19 (m, 1H, H1b); 4,10-4,12 (t, 2H, $J = 5,5$ Hz, H6); 3,94 (d, 1H, $J = 14$ Hz, H15a); 3,81 (s, 3H, H13); 3,77 (d, 1H, $J = 14$ Hz, H15b); 3,15-3,20 (m, 1H, H5a); 3,00-3,07 (m, 2H, H5b, H3b); 2,93-2,97 (m, 1H, H3a).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ ppm): 155,3; 149,7; 148,2; 140,9; 138,8; 138,7; 129,0; 128,4; 127,2; 126,6; 124,9; 123,0; 122,6; 121,3; 120,8; 119,7; 113,3; 112,7; 111,7; 109,9; 103,6; 101,2; 70,2; 67,3; 67,2; 59,9; 58,0; 55,7; 53,3.

Phân tích dữ liệu phổ ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, HSQC, HMBC cho thấy số lượng và vị trí của proton, carbon của sản phẩm tinh chế tạp C phù hợp với TLTK²⁶ và công thức cấu tạo của tạp C (Sơ đồ 3.4).



Sơ đồ 3.4. Cấu trúc hóa học của tạp C carvedilol

3.2.2.4. Tạp D carvedilol

- Phổ tử ngoại – khả kiến UV-Vis ($\lambda_{\max}$, nm): 241,6; 285,6; 331,8 (Phụ lục 4.3).
- Phổ hồng ngoại FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3286, 2927, 1259, 1608, 1585, 1508, 1336, 1095 (Phụ lục 4.4). Các đỉnh đặc trưng phù hợp với phổ IR của tạp D theo các nghiên cứu của Rao và Kumar ^{11,26}.

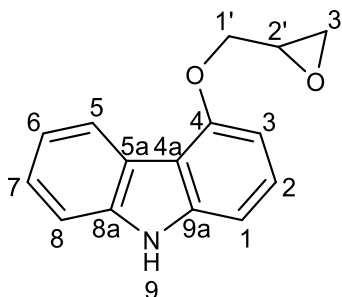
- Phổ khối lượng (Phụ lục 4.5): Phổ khối HR-MS (-) của tạp D có m/z = 238,0878 [MH]⁺, phù hợp với giá trị m/z lý thuyết là 238,0874 và phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến của tạp D (C₁₅H₁₃NO₂, M=239,27). Độ lệch xác định được là 1,7 ppm.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (Phụ lục 4.6, 4.7, 4.8, 4.9)

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz, δ ppm): 8,32 (*d*, 1H, J = 7,5 Hz, H5); 8,02 (*s*, 1H, NH); 7,38 (*dd*, 1H, J = 8 Hz, 1 Hz, H8); 7,34-7,36 (*m*, 1H, H7); 7,28 (*t*, 1H, J = 8 Hz, H2); 7,22-7,25 (*m*, 1H, H6); 7,01 (*d*, 1H, J = 8 Hz, H1); 6,63 (*d*, 1H, J = 8 Hz, H3); 4,43 (*dd*, 1H, J = 3 Hz, 11 Hz, H1'); 4,23 (*dd*, 1H, J = 5,5 Hz, 11 Hz, H1'); 3,51-3,54 (*m*, 1H, H2'); 2,96 (*t*-like, 1H, J = 4,5 Hz, H3'); 2,86 (*dd*, 1H, J = 2,5 Hz, 5,5 Hz, H3').

¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz, δ ppm): 155,0; 141,0; 138,8; 126,6; 125,1, 123,2; 122,5; 119,7; 112,9; 110,0; 104,1; 101,4; 68,8; 50,4; 44,8.

Phân tích dữ liệu phổ ¹³C-NMR, ¹H-NMR, HSQC, HMBC cho thấy số lượng và vị trí của proton, carbon của sản phẩm tinh chế tạp D phù hợp với TLTK ²⁶ và công thức cấu tạo của tạp D (**Sơ đồ 3.5**).



Sơ đồ 3.5. Cấu trúc hóa học của tạp D carvedilol

3.2.2.5. Tạp E carvedilol

- Phổ tử ngoại – khả kiến UV-Vis ($\lambda_{\max}$, nm): 201,2; 222,2; 272,6 (Phụ lục 5.2).
- Phổ hồng ngoại FT-IR (ATR, cm^{-1}): 3084, 2808, 1506, 1254, 1009, 764 (Phụ lục 5.3). Các đỉnh đặc trưng phù hợp với phổ IR của tạp E theo TLTK ⁷² (IR (ATR, cm^{-1}): 3134, 2819, 1504, 1249, 1101, 762).

- Phổ khối lượng (Phụ lục 5.4): Phổ khối HR-MS (+) của tạp E có $m/z = 168,1153$ $[\text{MH}]^+$, phù hợp với giá trị m/z lý thuyết là 168,1025 và phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến và cấu trúc có chứa nhóm amin ($-\text{NH}_2-$) của tạp E ($\text{C}_9\text{H}_{13}\text{NO}_2$, $M = 167,21$).

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (Phụ lục 5.5, 5.6, 5.7, 5.8)

^1H -NMR (CDCl_3 , 500 MHz, δ ppm): 6,97 (dt, 1H, $J = 1,5\text{Hz}$, 7Hz); 6,89 (dt, 1H, $J = 1,5\text{Hz}$, 7,5Hz); 7,04 (dd, 1H, $J = 1\text{Hz}$, 8Hz); 7,01 (dd, 1H, $J = 1,5\text{Hz}$, 6,5Hz); 4,18 (t, 2H, $J = 5,5\text{Hz}$); 3,77 (s, 3H); 3,15 (t, 2H, $J = 5,5\text{Hz}$); 8,36 (s, br, 3H).

^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz, δ ppm): 149,5; 147,2; 122,2; 120,7; 115,2; 112,5; 65,8; 55,5; 38,2.

Phân tích dữ liệu phổ ^{13}C -NMR, ^1H -NMR, HSQC, HMBC cho thấy thấy số lượng và vị trí của proton, carbon của sản phẩm tinh chế tạp E phù hợp với TLTK ⁷³ và công thức cấu tạo của tạp E (**Sơ đồ 3.6**). Trên phổ ^1H -NMR, tín hiệu 8,36 (s, br, 3H) cho thấy có tạo muối ở nhóm chức NH_2 (R-NH_3^+). Sản phẩm cho phản ứng tạo tủa dương tính với AgNO_3 cho thấy dạng muối tạo thành là muối hydroclorid.

Kết quả phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) (PL 5.16), cho thấy trong khoảng nhiệt độ 30 – 120 °C có hai khoảng giảm khối lượng mẫu:

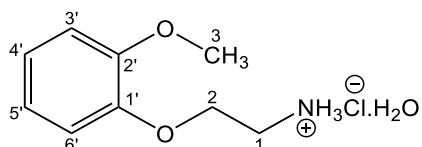
- Ở nhiệt độ 30,90 – 76,41 °C, mẫu giảm khối lượng với phần trăm được xác định là 3,7522 %. Điều này chứng tỏ trong phân tử có nước kết tinh, có thể mất đi một phần ở nhiệt độ thấp ⁷⁴.

- Ở nhiệt độ 76,41 – 113,52 °C, mẫu giảm khối lượng với phần trăm được xác định là 5,1810 %.

Tổng phần trăm khối lượng giảm: 8,9332 %.

Cùng với thông tin dạng muối hydroclorid của tạp E thường tồn tại dưới dạng có một phân tử nước kết tinh (monohydrat) nên có thể khẳng định được công thức phân tử của sản phẩm điều chế là $C_9H_{13}NO_2 \cdot HCl \cdot H_2O$ ($M = 221,68 \text{ g/mol}$). Lượng nước kết tinh trong sản phẩm là 8,1267 %.

Độ ẩm của mẫu là: 0,807 %.



Sơ đồ 3.6. Cấu trúc hóa học của tạp E carvedilol

3.3. XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT CÁC TẠP TỔNG HỢP BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

3.3.1. Lựa chọn điều kiện sắc ký

Sau khi khảo sát các yếu tố, điều kiện sắc ký được lựa chọn để xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp được tóm tắt ở bảng 3.2.

Bảng 3.2. Bảng tóm tắt điều kiện sắc ký của các qui trình kiểm tra độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng phương pháp HPLC

Tạp	Nồng độ (µg/ml)	Cột sắc ký	Pha động	Nhiệt độ cột (°C)	Thể tích tiêm (µl)	Tốc độ dòng (ml/ph)	Detector
A	400		gradient: 0 phút: 100% dung dịch acid formic 0,05%; 60 phút: 100% ACN; 64 – 70 phút: 100% dung dịch acid formic 0,05%;	55	10	0,8	
B	200	Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm);	gradient: 0 phút: 100% dung dịch acid formic 0,05%; 60 phút: 100% ACN; 64 – 70 phút: 100% dung dịch acid formic 0,05%;	40	5	1,0	PDA, chế độ Max plot (190nm – 800nm)
C	200		ACN – dung dịch đệm phosphat pH 2,0 (50:50)	55	5	1,0	
D	200		ACN – dung dịch đệm phosphat pH 2,0 (31:69)	55	20	1,0	
E	200		ACN – dung dịch TFA pH 2,3, thêm acid-1-heptansulfonic 2,5mM (30:70).	40	5	1,0	

Chuẩn bị các dung dịch thử đảm bảo yêu cầu tín hiệu pic tạp đủ lớn, chiều cao pic tối thiểu khoảng 500 mAu), cụ thể như sau:

- Dung dịch mẫu thử tạp A: cân chính xác khoảng 4 mg tạp A, cho vào bình định mức 10 ml, thêm dung môi hòa tan (nước - ACN (1:1)) vừa đủ, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .
- Dung dịch mẫu thử tạp B: cân chính xác khoảng 2 mg tạp B, cho vào bình định mức 10 ml, thêm dung môi hòa tan (nước - ACN (1:1)) vừa đủ, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .
- Dung dịch mẫu thử tạp C: cân chính xác khoảng 2 mg tạp C, cho vào bình định mức 10 ml, thêm dung môi hòa tan (nước - ACN (1:1)) vừa đủ, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .
- Dung dịch mẫu thử tạp D: cân chính xác khoảng 2 mg tạp D, cho vào bình định mức 10 ml, thêm dung môi hòa tan (nước - ACN (1:1)) vừa đủ, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 μm .
- Dung dịch mẫu thử tạp E: cân chính xác khoảng 20,0 mg tạp E vào bình định mức 10 ml, thêm 5 ml dung môi pha mẫu (nước - ACN (1:1)) để hòa tan hoàn toàn tạp E, sau đó định mức lên tới vạch bằng dung môi pha mẫu. Lấy chính xác 1 ml dung dịch này pha loãng bằng dung môi pha mẫu thành 10 ml. Dung dịch được lọc qua màng 0,45 μm .

3.3.2. Thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết

3.3.2.1. Tính phù hợp hệ thống

Kết quả đánh giá tính phù hợp hệ thống của các quy trình xác định độ tinh khiết được thể hiện qua bảng và các phụ lục (Phụ lục 1.17, 2.11, 3.11, 4.11, 5.10)

Bảng 3.3. Kết quả đánh giá tính phù hợp hệ thống của các quy trình xác định độ tinh khiết

		t_R (phút)	S (mAU.s)	N	T_f	R_s
Tạp A	TB	15,681	37294160,2	1702	2,092	16,74
	RSD %	0,15	0,38			
Tạp B	TB	32,353	15649836	22967	0,923	

	RSD %	0,08	0,61			
Tập C	TB	3,069	9414105	2144	1,314	
	RSD %	0,08	0,09			
Tập D	TB	18,989	37860446,5	8033	1,063	26,63
	RSD %	0,12	0,13			
Tập E	TB	2,895	12609727	1201	1,203	2,424
	RSD %	0,06	0,15			

Ghi chú: t_R : thời gian lưu; S: diện tích pic; N: số đĩa lý thuyết; T_f : Hệ số kéo đuôi;
 R_s : Độ phân giải

3.3.2.2. Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký các mẫu dung môi pha mẫu, pha động, và các tạp (tạp A 400 $\mu\text{g/ml}$, tạp B 200 $\mu\text{g/ml}$, tạp C 200 $\mu\text{g/ml}$, tạp D 200 $\mu\text{g/ml}$, tạp E 250 $\mu\text{g/ml}$). Kết quả được trình bày ở các phụ lục 1.18, 2.12, 3.12, 4.12, 5.11 cho thấy :

- Trên sắc ký đồ mẫu trắng và pha động không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic tạp trên sắc ký đồ mẫu thử.
- Trên sắc ký đồ mẫu thử không xuất hiện pic tạp trùng với pic tạp.
- Các pic tạp tinh khiết theo phổ UV-Vis thu được trên detector PDA.

Như vậy các quy trình phân tích có tính đặc hiệu.

3.3.2.3. Tính tuyến tính, độ lặp lại

Tính tuyến tính, độ lặp lại của các quy trình xác định độ tinh khiết các tạp được trình bày tóm tắt ở bảng 3.4 và các phụ lục 1.19, 1.20, 1.21, 2.13, 2.14, 2.15, 3.13, 3.14, 3.15, 4.13, 4.14, 4.15, 5.12, 5.13, 5.14.

Bảng 3.4. Kết quả đánh giá tính tuyến tính và độ lặp lại của các quy trình xác định độ tinh khiết

	Tạp A	Tạp B	Tạp C	Tạp D	Tạp E
Tính tuyến tính					
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	50-800	52,1 – 833,8	24,2 – 773,8	50 - 500	100 - 500
Hệ số tương quan (R^2)	0,9986	0,9997	0,9999	0,9997	0,9960
Phương trình	$\hat{y} = 80374x - 3577132,8$	$\hat{y} = 79143x - 1494308,7$	$\hat{y} = 39493,2x - 362283$	$\hat{y} = 187990x + 888612$	$\hat{y} = 35814,7x + 2929496$
t_a	53,16	120,8	192,85	120,22	27,24
t_b	5,26	-4,87	-4,85	1,92	6,89
Độ lặp lại					
Trung bình (%)	99,14	99,17	99,92	99,89	99,94
RSD %	0,03	0,07	0,09	0,03	0,01
Độ chính xác trung gian					
Trung bình (%)	99,15	99,35	99,91	99,82	99,99
RSD %	0,027	0,28	0,13	0,069	0,021

Nhận xét: Quy trình xác định độ tinh khiết của 05 tạp của carvedilol bằng phương pháp HPLC có tính đặc hiệu, tính tuyến tính và độ chính xác cao. Do đó có thể áp dụng các qui trình này để tiến hành xác định độ tinh khiết của các tạp chất đã tổng hợp.

3.3.3. Kết quả xác định độ tinh khiết của các tạp bằng HPLC

Kết quả xác định độ tinh khiết của các tạp tổng hợp được trình bày ở bảng 3.5.

Bảng 3.5. Độ tinh khiết của các tạp được tổng hợp (n = 12)

	Tạp A	Tạp B	Tạp C	Tạp D	Tạp E
Độ tinh khiết (%)	99,14	99,26	99,92	99,86	99,96
SD	0,03	0,22	0,11	0,06	0,03
RSD (%)	0,029	0,218	0,11	0,060	0,03

3.4. ĐÁNH GIÁ VÀ THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU

3.4.1. Đánh giá các tạp tổng hợp

Việc đánh giá các tạp chất làm chất đối chiếu gồm các chỉ tiêu, phương pháp thử và yêu cầu được tóm tắt trong các bảng 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 3.10:

Bảng 3.6. Kết quả đánh giá tạp A

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	Kết quả
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Tinh thể trắng, không mùi.	Đạt
	<i>Độ tan</i>	Tan trong aceton, ethyl acetat.	Đạt
Nhiệt độ nóng chảy	<i>DSC, DĐVN V</i>	69 - 70 °C	Đúng
Định tính	<i>Phổ UV-Vis</i>	$\lambda_{\max}$ (nm): 226; 245; 286; 337.	Đúng
		$\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3283 (N-H), 2839 (C-H),	Đúng
	<i>Phổ hồng ngoại</i>	1593, 1506 (C=C), 1252 (C-N), 1123, 1051 (C-O), 733, 714 (Ar-H).	

	<i>Phổ khối</i>	ESI-HRMS (+) có $m/z = 630,3183$ [MH] ⁺ và $m/z = 652, 3048$ [MNa] ⁺	Đúng
	<i>Phổ cộng hưởng từ hạt nhân</i>	Phổ ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, HMBC và HSQC: xem PL 1.12, 1.13, 1.14, 1.15.	Đúng
Hàm ẩm	TGA	≤ 1%	Đạt (0,7581%)
Độ tinh khiết	HPLC	≥ 99,0 %	Đạt (99,14%)

Bảng 3.7. Kết quả đánh giá tạp B

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	Kết quả
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Tinh thể trắng, không mùi.	Đạt
	<i>Độ tan</i>	Tan trong aceton, ethyl acetat, ethanol.	Đạt
Nhiệt độ nóng chảy	<i>DSC, DĐVN</i> <i>V</i>	83 - 84 °C	Đạt
Định tính	<i>Phổ UV-Vis</i>	$\lambda_{\max}$ (nm): 242,6; 285,2; 331,2	Đúng
	<i>Phổ hồng ngoại</i>	$\nu_{\max}$ (cm ⁻¹) 3528, 3456 (O-H), 3401 (N-H), 1605, 1587, 1504 (C=C), 1252 (C-N, 1123, 1098 (C-O)	
	<i>Phổ khối</i>	ESI-HRMS (-) có $m/z = 644,2763$ [MH] ⁻	Đúng
	<i>Phổ cộng hưởng từ hạt nhân</i>	Phổ ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, HMBC và HSQC: xem PL 2.6, 2.7, 2.8, 2.9.	Đúng

Hàm ẩm	TGA	$\leq 1\%$	Đạt (0,4928%)
Độ tinh khiết	HPLC	$\geq 99,0 \%$	Đạt (99,26%)

Bảng 3.8. Kết quả đánh giá tạp C

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	Kết quả
Tính chất	Cảm quan	Tinh thể trắng, không mùi.	Đạt
	Độ tan	Tan trong acetone, methanol.	Đạt
Nhiệt độ nóng chảy	DSC, DĐVN	100 - 101 °C	Đạt
Định tính	Phổ UV-Vis	$\lambda_{\max}$ (nm): 242,4; 286,0; 331,8.	Đúng
		$\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3405 (O-H), 2874, 2841	
	Phổ hồng ngoại	(C-H), 1590, 1506 (C=C), 1253 (C-N), 1122, 1102, 1026 (C-O), 740, 726 (Ar-H)	
	Phổ khối	ESI-HRMS (-) có $m/z = 495,2287$ [MH] ⁻	Đúng
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân	Phổ ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, HMBC và HSQC: xem PL 3.6, 3.7, 3.8, 3.9.	Đúng
Hàm ẩm	TGA	$\leq 1\%$	Đạt (0,009%)
Độ tinh khiết	HPLC	$\geq 99,0 \%$	Đạt (99,92%)

Bảng 3.9. Kết quả đánh giá tạp D

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	Kết quả
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Tinh thể trắng, không mùi.	Đạt
	<i>Độ tan</i>	Tan trong cloroform, DMF, DMSO và tetrahydrofuran (THF)	Đạt
Nhiệt độ nóng chảy	DSC, <i>DDVN V</i>	138 – 139 °C	Đạt
Định tính	<i>Phổ UV-Vis</i>	$\lambda_{\max}$ (nm): 241,6; 285,6; 331,8.	Đúng
	<i>Phổ hồng ngoại</i>	$\nu_{\max}$ (cm^{-1}) 3286 (N-H), 1336 (C-N), 1259 (C-O epoxy), 1095 (C-O ether)	
	<i>Phổ khối</i>	ESI-HRMS (-) có $m/z = 238,0871$ [MH] ⁻	Đúng
	<i>Phổ cộng hưởng từ hạt nhân</i>	Phổ ¹ H-NMR, ¹³ C-NMR, HMBC và HSQC: xem PL 4.6, 4.7, 4.8, 4.9.	Đúng
Hàm ẩm	TGA	≤ 2%	Đạt (1,3419 %)
Độ tinh khiết	HPLC	≥ 98,0 %	Đạt (99,86%)

Bảng 3.10. Kết quả đánh giá tạp E

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	Kết quả
Tính chất	<i>Cảm quan</i>	Tinh thể trắng, lấp lánh, không mùi.	Đạt
	<i>Độ tan</i>	Dễ tan trong DMF, ethanol và methanol.	Đạt

Nhiệt độ nóng chảy	DSC, DĐVN V	85 - 86 °C	Đạt
Định tính	<i>Ion clorid</i>	Cho phản ứng tạo tủa trắng với AgNO ₃	Đúng
	<i>Phổ UV-Vis</i>	$\lambda_{\max}$ (nm): 201,2; 222,2; 272,6.	Đúng
		ν (ATR, cm ⁻¹): 3084 (N-H), 2808 (C-H aliphatic), 1506 (C=C), 1254 (C-N), 1009 (C-O), 764 (C-H vòng thơm)	Đúng
	<i>Phổ khối</i>	HR-MS (+) có m/z = 168,1153 [MH] ⁺	Đúng
	<i>Phổ cộng hưởng từ hạt nhân</i>	Phổ ¹ H-NMR và ¹³ C-NMR: xem PL 5.5, 5.6, 5.7, 5.8.	Đúng
Hàm ẩm	TGA	≤ 1%	Đạt (0,807 %)
Độ tinh khiết	HPLC	≥ 99,0 %	Đạt (99,96%)

3.4.2. Thiết lập chất đối chiếu

3.4.2.1. Đóng gói

Các tạp sau khi được đánh giá sẽ được đóng vào các lọ thủy tinh kín màu nâu, khối lượng đóng lọ và tổng số lọ đóng được theo bảng 3.11.

Bảng 3.11. Khối lượng chất đóng trong 01 lọ và tổng số lọ đóng được

STT	Tên chất	Khối lượng chất / lọ (mg)	Tổng số lọ
1	Tạp A carvedilol	10	100
2	Tạp B carvedilol	10	100
3	Tạp C carvedilol	10	100
4	Tạp D carvedilol	10	100
5	Tạp E carvedilol	10	100

Các lọ được bảo quản ở 2 – 8 °C, tránh ánh sáng.

3.4.2.2. Đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ

Lấy ngẫu nhiên 11 lọ mỗi tập để phân tích. Mỗi lọ được phân tích 2 lần để lấy kết quả trung bình. Kết quả được trình bày ở bảng 3.12.

Bảng 3.12. Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ

Lọ	Tập A	Tập B	Tập C	Tập D	Tập E
1	99,32	99,79	99,51	99,95	99,79
2	99,34	99,67	99,57	99,98	99,78
3	99,37	99,65	99,70	99,92	99,77
4	99,35	99,76	99,61	99,96	99,76
5	99,34	99,65	99,44	99,92	99,78
6	99,35	99,84	99,63	99,96	99,77
7	99,34	99,56	99,44	99,97	99,77
8	99,37	99,60	99,60	99,94	99,79
9	99,30	99,68	99,42	99,91	99,77
10	99,36	99,73	99,54	99,96	99,75
11	99,32	99,56	99,73	99,95	99,76
Trung bình	99,34	99,68	99,56	99,95	99,77
SD	0,02	0,09	0,10	0,02	0,01
RSD (%)	0,02	0,09	0,10	0,02	0,01

Kết quả độ lệch chuẩn giữa các lọ của các tập đều dưới 0,3, cho thấy quá trình đóng gói không ảnh hưởng đến độ đồng nhất hàm lượng giữa các lọ.

3.4.2.3. Đánh giá độ đồng nhất liên phòng thí nghiệm

Các lọ sau khi đánh giá độ đồng nhất được gửi tới 03 phòng thí nghiệm đạt GLP/ ISO 17025, mỗi phòng gửi 6 lọ.

Kết quả phân tích ANOVA một yếu tố trên 18 lọ mỗi chất được thể hiện ở các Phụ lục 1.25, 2.19, 3.19, 4.19, 5.18.

Giá trị F tính được so với F tra cứu (F_{crit}) của mỗi tập như sau:

Tập A: $F = 0,555 < F_{crit} = 3,682$;

Tập B: $F = 1,538 < F_{crit} = 3,682$;

Tập C: $F = 0,077 < F_{crit} = 3,682$;

Tập D: $F = 0,333 < F_{crit} = 3,682$;

Tập E: $F = 0,537 < F_{crit} = 3,682$.

Nhận xét: Các giá trị F đều $< F_{crit}$. Như vậy, kết quả định lượng giữa các phòng thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Hàm lượng chất phân tích không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

3.4.2.4. Xác định giá trị ấn định và giá trị công bố

Kết quả phân tích theo phương pháp Robust analysis Algorithm A các tạp được trình bày ở các Phụ lục 1.26, 2.20, 3.20, 4.20, 5.19 và tóm tắt giá trị ấn định, giá trị công bố ở bảng 3.13.

Bảng 3.13. Kết quả xác định giá trị ấn định và giá trị công bố các chất đối chiếu

STT	Chất đối chiếu	Giá trị ấn định (%)	SD	Độ không đảm bảo đo
1	Tạp A carvedilol	99,36	0,012	0,004
2	Tạp B carvedilol	99,70	0,085	0,025
3	Tạp C carvedilol	99,60	0,068	0,021
4	Tạp D carvedilol	99,96	$1,5 \times 10^{-14}$	$9,5 \times 10^{-15}$
5	Tạp E carvedilol	99,77	0,011	0,003

Tất cả các tạp chất đối chiếu đều có độ tinh khiết sắc ký trên 99% tính theo nguyên trạng, đủ điều kiện để đăng ký chất đối chiếu quốc gia. Tiến hành lập hồ sơ chất đối chiếu, dán nhãn. Bảo quản ở nhiệt độ 2-8 °C, tránh ánh sáng.

Như vậy, có thể sử dụng các tạp đối chiếu vào thực tế để kiểm tra tạp chất của các nguyên liệu và thành phẩm chứa carvedilol.

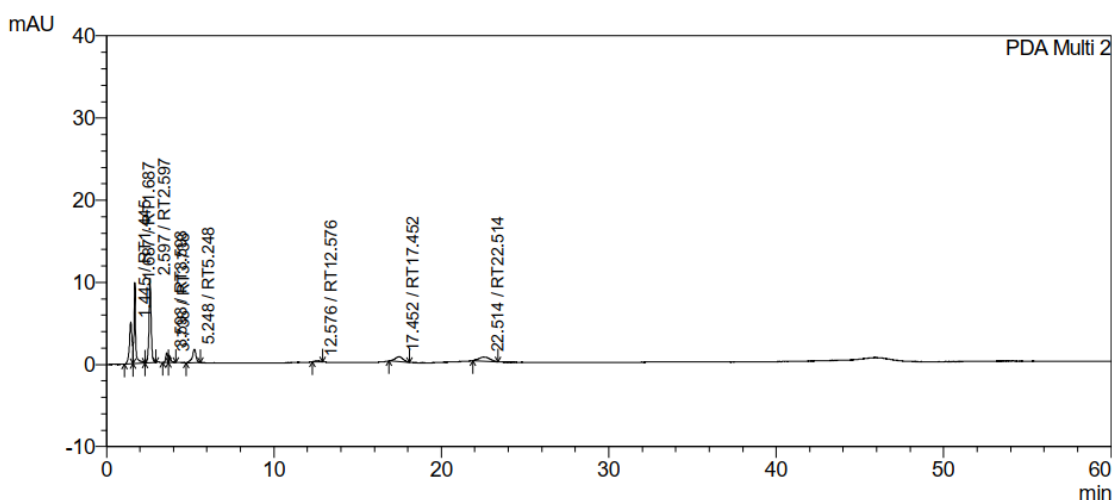
3.5. XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI CARVEDILOL VÀ CÁC TẠP TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Áp dụng quy trình kiểm nghiệm tạp chất liên quan của carvedilol trong nguyên liệu theo USP 2023 để đánh giá hàm lượng các tạp trong nguyên liệu và viên nén carvedilol. Điều kiện sắc ký bao gồm:

- Pha động: ACN – dung dịch đệm phosphat pH 2 (31:69).
- Cột sắc ký: cột Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m);

- Đầu dò PDA: bước sóng 220 nm dùng để định lượng tạp E, 240 nm dùng để định lượng carvedilol và các tạp còn lại;
- Thể tích tiêm mẫu: 5 μ l;
- Nhiệt độ cột: 40 $^{\circ}$ C.

Kết quả trình bày ở hình dưới cho thấy đường nền không ổn định, thời gian phân tích dài, các pic không cân đối và pic tạp A, E chưa tách khỏi nhau.



Hình 3.1. Sắc ký đồ định lượng tạp chất liên quan trong nguyên liệu theo quy trình của USP 2023

Do đó, nghiên cứu đã khảo sát để lựa chọn quy trình sắc ký tối ưu để định lượng đồng thời carvedilol và các tạp trong nguyên liệu và viên nén.

3.5.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Tham khảo quy trình kiểm nghiệm tạp chất liên quan theo USP 2023, nghiên cứu cố định các điều kiện sắc ký gồm: Cột sắc ký: cột Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m); Đầu dò PDA: bước sóng 220 nm dùng để định lượng tạp E, 240 nm dùng để định lượng carvedilol và các tạp còn lại; Nhiệt độ cột: 40 $^{\circ}$ C; Thể tích tiêm mẫu: 5 μ l.

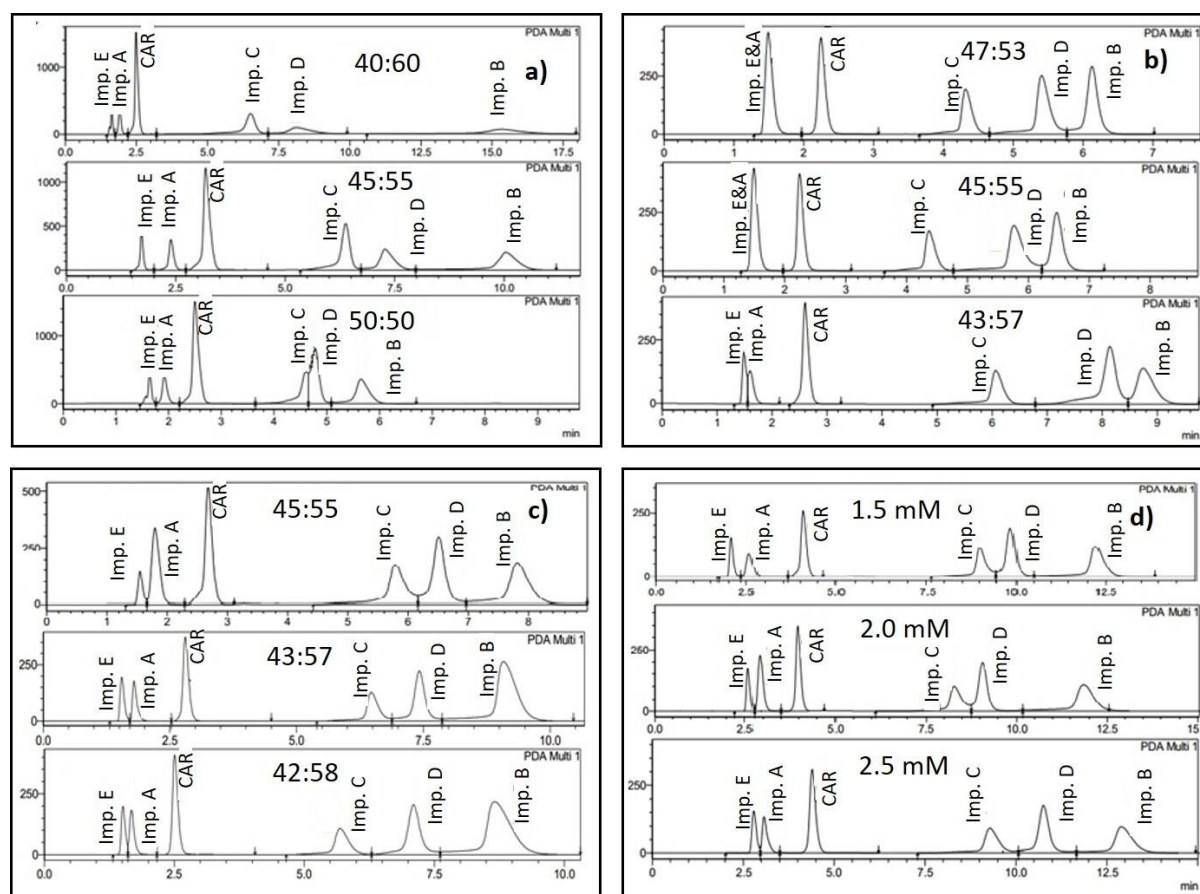
3.5.1.1. Khảo sát thành phần pha động

Khảo sát hệ pha động gồm ACN : dung dịch TFA pH 2 ở các tỷ lệ 40:60, 45:55 và 50:50 cho thấy ở tỷ lệ 45:55, các pic cân xứng, tách nhau tốt. Tuy nhiên độ tinh khiết của các pic thấp, do đó, việc sử dụng dung dịch TFA là không phù hợp.

Khảo sát hệ pha động gồm ACN : đệm phosphat pH 2 ở các tỷ lệ 47:53, 45:55, và 43:57 cho thấy pic tạp A và tạp E chưa tách nhau được. Do đó, nghiên cứu đã bổ sung thêm chất tạo cặp ion acid 1-heptansulfonic để tăng khả năng phân giải của tạp E. Các tỷ lệ được khảo sát gồm 45:55, 43:57 và 42:58. Kết quả cho thấy ở tỷ lệ 43:57 các pic tách nhau tốt nhất.

Khảo sát nồng độ thêm vào của chất tạo cặp ion acid 1-heptansulfonic ở 1,5 mM; 2,0 mM và 2,5 mM, kết quả cho thấy nồng độ acid 1-heptansulfonic càng tăng thì khả năng tách của tạp A và tạp E càng giảm. Ở nồng độ 1,5 mM, tạp A và E tách nhau hoàn toàn.

Do đó, hệ pha động cuối cùng được lựa chọn là hệ ACN – đệm phosphat pH 2 + acid 1-heptansulfonic 1,5 mM (43:57).



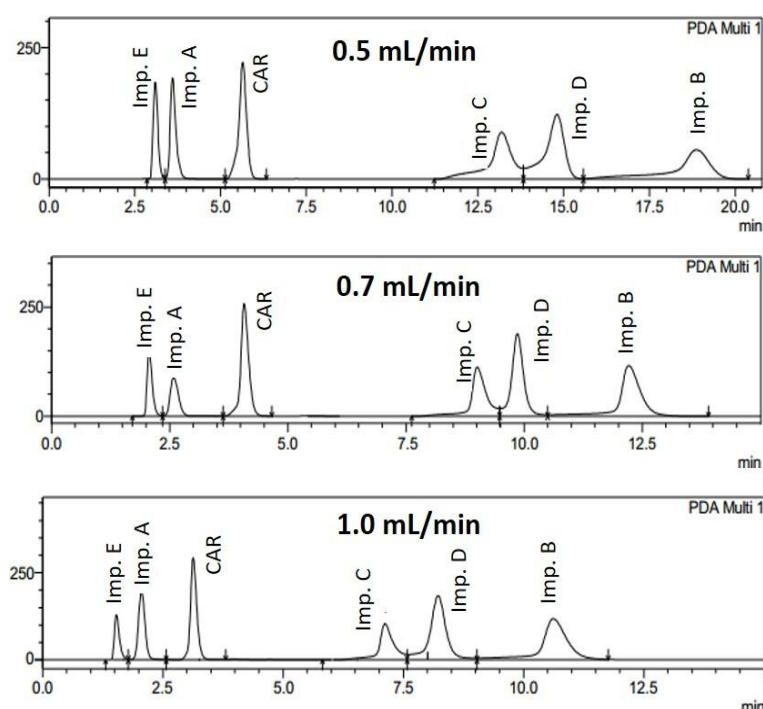
Hình 3.2. Khảo sát thành phần pha động: a) ACN : dung dịch TFA pH 2; b) ACN : đệm phosphat pH 2; c) ACN : đệm phosphat pH 2 thêm acid 1-heptansulfonic; d) ACN : đệm phosphat pH 2 (43:57) thêm acid 1-heptansulfonic ở các tỷ lệ khác nhau.

3.5.1.2. Khảo sát tốc độ dòng

Với hệ pha động được lựa chọn như trên, tiến hành khảo sát tốc độ dòng để cho thời gian phân tách tối ưu. Kết quả cho thấy:

Ở 0,5 ml/phút, tổng thời gian phân tích bị kéo dài, tốc độ dòng nhỏ làm doãng pic gây ra hiệu ứng kéo đuôi.

Ở tốc độ dòng 0,7 ml/phút và 1 ml/phút, nhận thấy các pic tách nhau ổn, hệ số kéo đuôi tốt. Tuy nhiên, để tiết kiệm dung môi và đảm bảo không làm tăng áp suất quá cao của cột, chúng tôi lựa chọn tốc độ dòng 0,7 ml/phút để tiến hành thẩm định.



Hình 3.3. Khảo sát tốc độ dòng

Sau khi khảo sát, điều kiện sắc ký tối ưu dùng để định lượng đồng thời carvedilol và các tạp như sau:

- Pha động: ACN – dung dịch đệm phosphat (43:57) trong đó dung dịch đệm là dung dịch natri dihydrophosphat 2,76 g/l được điều chỉnh về pH 2,0 bằng acid phosphoric và thêm acid 1-heptansulfonic nồng độ 1,5 mM;
- Dung môi pha mẫu: ACN – nước (1:1, tt:tt).
- Cột sắc ký: Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m) ;

- Đầu dò PDA: bước sóng 220 nm để định lượng tạp E, bước sóng 240 nm để định lượng carvedilol và các tạp khác;
- Tốc độ dòng: 0,7 ml/phút;
- Thể tích tiêm mẫu: 5 μ l;
- Nhiệt độ cột: 40 °C.

3.5.2. Thẩm định quy trình định lượng carvedilol và các tạp bằng HPLC

3.5.2.1. Tính phù hợp hệ thống

Tính phù hợp hệ thống được xác định bằng cách tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp gồm carvedilol nồng độ 500 μ g/ml và các tạp nồng độ 1 μ g/ml. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống được trình bày tại bảng 3.14.

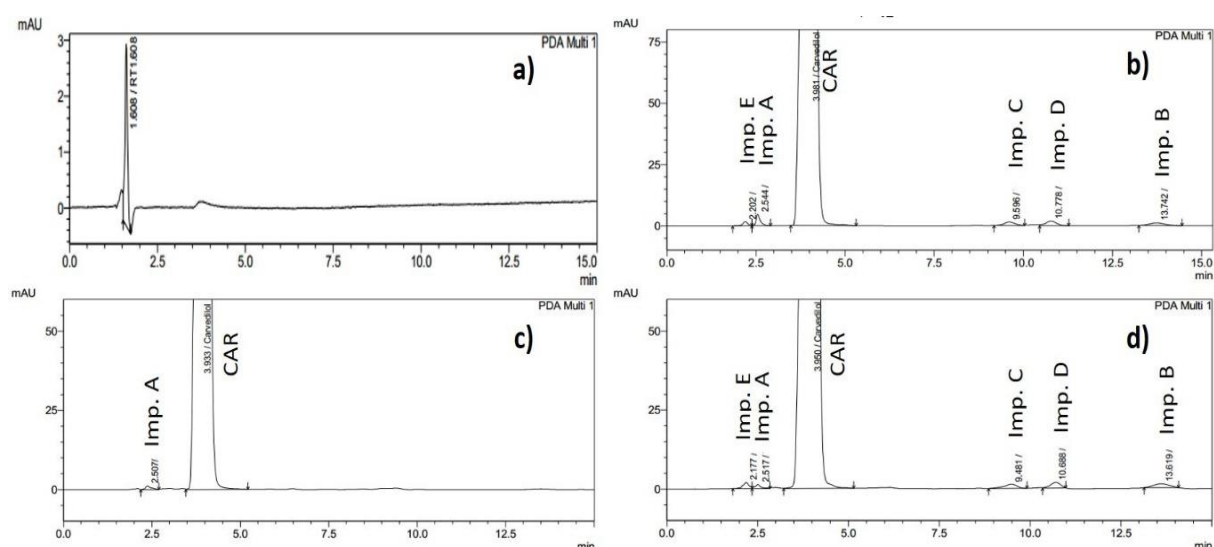
Bảng 3.14. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình

		t_R (phút)	S (mAU.s)	R_s	N	T_f
Carvedilol	TB	3,985	22623276	5,18	2209	1,04
	RSD%	0,13	0,05			
Tạp A	TB	2,548	41798	-	2247	1,46
	RSD%	0,17	1,30			
Tạp B	TB	13,735	47993	4,35	4870	1,13
	RSD%	0,17	1,82			
Tạp C	TB	9,609	50649	11,72	3840	1,16
	RSD%	0,15	1,75			
Tạp D	TB	10,771	67162	1,94	5623	1,03
	RSD%	0,06	0,65			
Tạp E	TB	2,207	17976	-	1159	1,03
	RSD%	0,22	0,81			

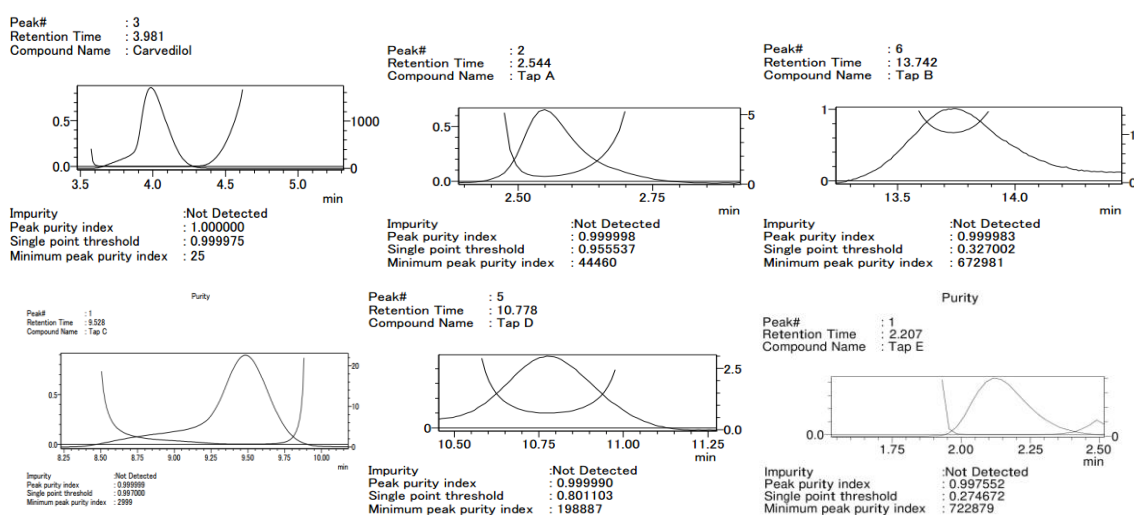
Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy RSD của thời gian lưu và diện tích pic đều nhỏ hơn 2%; $R_s > 1,5$; T_f nằm trong khoảng 0,8 – 1,5 và $N > 1000$. Như vậy, quy trình đạt tính phù hợp hệ thống.

3.5.2.2. Tính đặc hiệu

Tiến hành sắc ký đồng thời mẫu trắng, các mẫu đơn thành phần, mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử giả lập và mẫu thử thêm chuẩn. Kết quả được trình bày ở hình 3.48 và phụ lục 6.1.



Hình 3.4. Sắc ký đồ đánh giá tính đặc hiệu: mẫu trắng (a), hỗn hợp chuẩn (b), mẫu thử (c) và mẫu thử giả lập (d)



Hình 3.5. Biểu đồ độ tinh khiết của pic carvedilol và các tạp

Nhận xét:

- Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của carvedilol và các tạp trong sắc ký đồ mẫu chuẩn.
- Sắc ký đồ mẫu thử giả lập và mẫu thử thêm chuẩn xuất hiện pic carvedilol và các tạp có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu trong sắc ký đồ mẫu chuẩn.
- Các phổ UV-Vis của pic mẫu thử và mẫu chuẩn có sự tương đồng cao. Độ tinh khiết của các pic đều đạt 0,998 – 1,000.

Như vậy, quy trình phân tích có tính đặc hiệu cao.

3.5.2.3. Khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, LOD và LOQ

Bảng 3.15. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, LOD và LOQ của quy trình. (PL 6.2, 6.3, 6.4, 6.5)

	Carvedilol	Tạp A	Tạp B	Tạp C	Tạp D	Tạp E
Tuyến tính						
Khoảng tuyến tính (µg/ml)	0,01–1500	0,04–3	0,1–3	0,1–3	0,1–3	0,1–3
r^2	0,9996	0,9957	0,9972	0,9983	0,9967	0,9985
Độ dốc $\pm$ SD	45181 $\pm$ 334	26897 $\pm$ 721	50976 $\pm$ 1198	54293 $\pm$ 1001	90707 $\pm$ 2348	20760 $\pm$ 359
p_a	3,38.10 ⁻¹⁶	2,48.10 ⁻⁸	1,35.10 ⁻⁷	4,04.10 ⁻⁸	2,19.10 ⁻⁷	2,91.10 ⁻⁸
Hệ số chặn $\pm$ SD	368390 $\pm$ 207377	- 1837 $\pm$ 1054	- 2639,5 $\pm$ 1871	- 4733,3 $\pm$ 1564	- 4200,9 $\pm$ 3666	- 1386,5 $\pm$ 560
p_b	0,109	0,132	0,217	0,029	0,304	0,056
Độ chính xác						
Độ lặp lại						
Mẫu thử ^a						
TB (%) ^b	99,86	0,087				
SD	1,029	0,003				
RSD %	1,03	3,12				
Mẫu giả lập						
TB (%) ^b	99,89	0,086	0,205	0,187	0,213	0,104
SD	1,126	0,002	0,002	0,004	0,002	0,002
RSD %	1,13	2,58	1,00	1,90	1,12	2,04
Độ CXTG						
Mẫu thử ^a						
TB (%) ^b	100,24	0,086				
SD	0,313	0,002				
RSD %	0,31	2,75				
Mẫu giả lập						
TB (%) ^b	100,18	0,085	0,195	0,179	0,206	0,115
SD	0,468	0,002	0,003	0,004	0,002	0,002
RSD %	0,47	2,33	1,39	2,03	0,92	1,72
Độ đúng						
% thu hồi ^c	100,38	99,92	100,16	100,30	99,95	100,30
RSD %	1,04	1,69	1,16	0,89	0,86	1,37
LOD (µg/ml)	0,003	0,013	0,033	0,033	0,033	0,033
LOQ (µg/ml)	0,01	0,04	0,1	0,1	0,1	0,1
Khoảng xác định (µg/ml)	400–1000	0,5–1,2	0,5–1,2	0,5–1,2	0,5–1,2	0,5–1,2

^a Các tạp B, C, D, E không có trong mẫu thử; ^b n = 6; ^c n = 9

3.5.3. Ứng dụng quy trình sắc ký đã xây dựng nhằm xác định hàm lượng carvedilol và các tạp trong một số nguyên liệu và thành phẩm carvedilol

Ứng dụng quy trình đã thẩm định để xác định hàm lượng carvedilol và các tạp trong 09 mẫu. Kết quả được trình bày ở bảng 3.16.

Bảng 3.16. Kết quả định lượng carvedilol và các tạp trong các nguyên liệu và thành phẩm viên nén bằng HPLC

Mẫu	Hàm lượng (%)					
	Carvedilol	Tạp A	Tạp B	Tạp C	Tạp D	Tạp E
M1	100,24	0,086	-	-	-	-
M2	101,42	0,187	-	-	-	-
M3	100,99	+	-	-	-	-
M4	99,46	+	-	-	-	-
M5	100,56	-	-	-	-	-
M6	99,94	0,059	-	-	-	-
NL1	100,15	0,047	-	-	-	-
NL2	100,76	+	-	-	-	-
NL3	99,89	0,055	-	-	-	-

Ghi chú: (-) Dưới LOD của phương pháp, (+) Dưới LOQ của phương pháp

Nhận xét:

- Trong 6 mẫu thành phẩm có 5 mẫu phát hiện được tạp A, trong đó có 2 mẫu tạp A có hàm lượng dưới giới hạn định lượng của phương pháp, 3 mẫu còn lại hàm lượng tạp A đều nằm trong giới hạn cho phép của tạp trong thành phẩm carvedilol theo USP 2023 là 0,2%. Trong 03 mẫu nguyên liệu đều phát hiện tạp A và trong giới hạn cho phép theo USP 2023, trong đó có 01 mẫu có hàm lượng dưới giới hạn định lượng của phương pháp.
- Các tạp B, C, D, E trong 09 mẫu đều nằm dưới giới hạn phát hiện.

3.6. XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI CARVEDILOL VÀ CÁC TẠP TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM BẰNG ĐIỆN DI MAO QUẢN

3.6.1. Khảo sát quy trình định lượng

3.6.1.1. Khảo sát dung môi pha mẫu

Tiến hành pha mẫu trong MeOH 100%, ACN 100% và các tỷ lệ khác nhau của MeOH với BGE (1:1; 1:2; 1:3). Kết quả định lượng carvediol trong các dung môi khác nhau không có ý nghĩa thống kê. Tuy nhiên khả năng tách của píc tạp D ra khỏi píc trong nền mẫu tốt hơn, đồng thời độ lặp lại cũng tốt khi sử dụng dung môi pha mẫu là MeOH : BGE (1:3) so với các dung môi còn lại. Do đó lựa chọn dung môi pha mẫu là MeOH : BGE (1:3).

3.6.1.2. Khảo sát pH và các loại đệm

Tiến hành khảo sát dung dịch điện di nền trong khoảng pH từ 3-9 và các loại đệm khác nhau như phosphat, borat, acetat, citrat. Kết quả cho thấy khi sử dụng đệm acetat pH 5 cho kết quả tách các píc tốt hơn so với các pH và các đệm còn lại, do đó dung dịch điện ly nền được chọn sẽ là đệm acetat pH 5. Tuy nhiên nền nhiều, các píc kéo chân và píc tạp D chưa tách ra khỏi píc dòng điện thẩm (EOF).

3.6.1.3. Khảo sát dung môi hữu cơ thêm vào

Tiến hành thêm vào dung dịch điện ly nền ACN, MeOH thay thế nước trong đệm acetat với các tỉ lệ khác nhau. Kết quả cho thấy khi dùng ACN 50% thay thế nước để pha đệm acetat cho các píc tốt hơn, độ phân giải giữa píc carvedilol và píc tạp C lớn hơn so với các tỷ lệ khác (ACN 60% và ACN 70%). Do đó chọn tỷ lệ ACN 50% thay thế nước để pha đệm acetat, tuy nhiên píc tạp D vẫn bị trùng píc của EOF.

3.6.1.4. Khảo sát chất điện hoạt thêm vào

Tiếp tục thêm vào dung dịch điện di nền các chất điện hoạt ở nồng độ trên, dưới và tại nồng độ micell tới hạn (CMC - Critical Micelle Concentration). Các chất điện hoạt được sử dụng gồm cetyl trimethyl ammonium bromid (CTAB) với CMC =

0,9 mM, tween 20 với CMC = 0,5 mM, natri 1-heptansulfonat với CMC = 302 mM, natri dodecyl sulfat (SDS) với CMC = 8,2 mM. Kết quả cho thấy: Khi thêm SDS 7 mM dưới ngưỡng CMC thì pic tạp D đã tách khỏi pic EOF với $R_s > 1,5$. Do đó SDS 7 mM được sử dụng làm chất điện hoạt.

3.6.1.5. Khảo sát nồng độ đệm

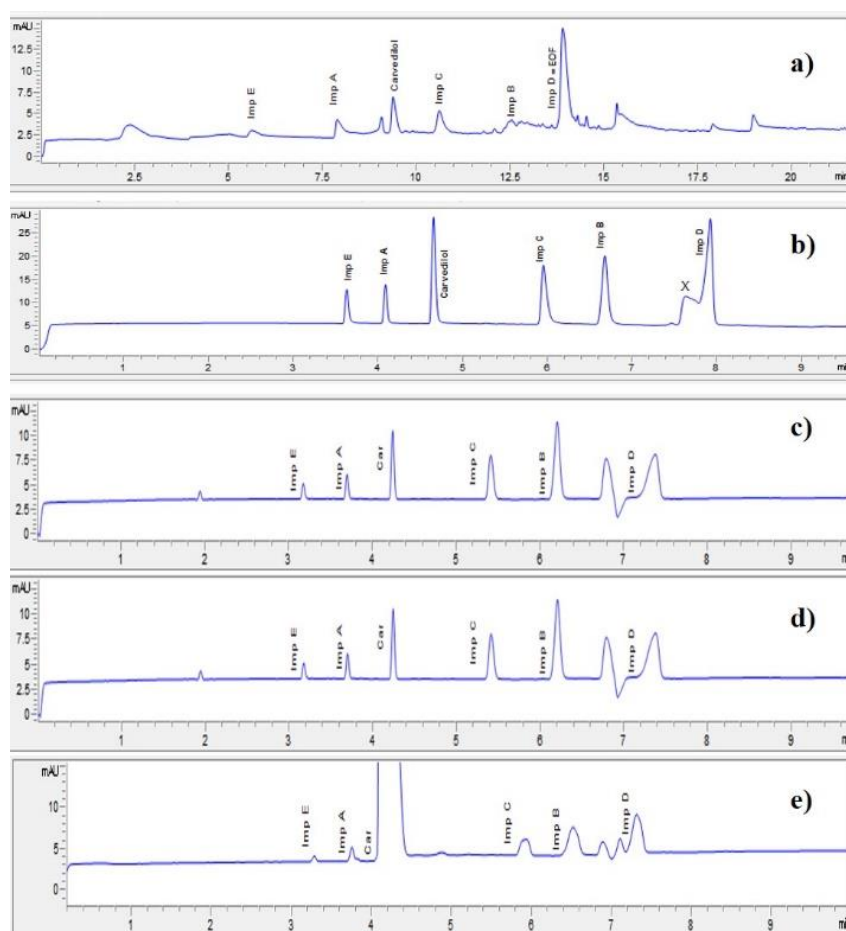
Tiến hành khảo sát đệm acetat ở các nồng độ 60, 80, 100, 120, 140 mM. Kết quả cho thấy nồng độ đệm càng cao thì thời gian lưu càng tăng, nồng độ đệm thấp thì ngược lại. Ở nồng độ đệm acetat 100 mM và 120 mM thì pic tạp D tách ra khỏi pic EOF với độ phân giải đều xấp xỉ $R_s \approx 1,8$. Nồng độ tối ưu chọn được là 100 mM vì cho thời gian lưu không quá dài và hình dạng pic vẫn tốt.

3.6.1.6. Khảo sát điện thế

Tiến hành khảo sát ở các điện thế 10 kV, 15 kV, 20 kV. Kết quả cho thấy khi giảm điện thế làm tăng thời gian lưu và có khả năng tăng khả năng tách giữa các pic. Tuy nhiên khi giảm điện thế từ 20 kV xuống 15 kV, 10 kV, ngoài việc tăng thời gian lưu gây kéo dài thời gian phân tích, pic carvedilol bị chệch và các pic có xu hướng doãng rộng. Do đó điện thế được chọn là 20 kV.

3.6.1.7. Khảo sát chiều dài hiệu dụng cột

Tiến hành khảo sát ở các chiều dài cột hiệu dụng 40 cm, 50 cm, 60, cm. Kết quả cho thấy khi tăng chiều dài cột làm tăng thời gian lưu của các pic, tuy nhiên độ phân giải giữa pic tạp D với pic EOF không khác nhau nhiều. Mặc khác với chiều dài cột hiệu dụng 50 cm và 60 cm thì chân pic carvedilol bị thấp dưới đường nền. Do đó lựa chọn chiều dài cột hiệu dụng 40 cm để tiết kiệm chi phí phân tích.



Hình 3.6. Khảo sát điều kiện điện di: a) Đệm: acetat pH 5; b) Dung môi hữu cơ: ACN : nước (1:1); c) Chất điện hoạt: natri dodecylsulfat 7 mM; d) Nồng độ đệm acetat: 100 mM; e) Điện thế: 20 kV.

Sau khi khảo sát, điều kiện điện di tối ưu dùng để định lượng đồng thời carvedilol và các tạp như sau:

Chiều dài cột hiệu dụng 40 cm; chiều dài cột tổng 48,5 cm; đường kính ngoài: 360 μm ; đường kính trong 75 μm ; BGE gồm đệm acetat 100 mM pH 5 chứa SDS 7 mM trong hỗn hợp ACN : nước (50: 50); điện thế 20 kV; dòng điện 150 μA ; nhiệt độ casset 20 $^{\circ}\text{C}$; tiêm mẫu 35 mBar trong 4 giây; bước sóng phát hiện 220 nm cho tạp E và 242 nm cho các tạp còn lại. Dung môi pha mẫu: MeOH : BGE (1:3).

3.6.2. Thẩm định quy trình định lượng carvedilol và các tạp bằng CE

3.6.2.1. Tính phù hợp hệ thống

Tiến hành tiêm lặp lại 6 lần dung dịch chuẩn hỗn hợp gồm carvedilol nồng độ 2500 µg/ml và các tạp nồng độ 5 µg/ml. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống được trình bày tại bảng 3.17.

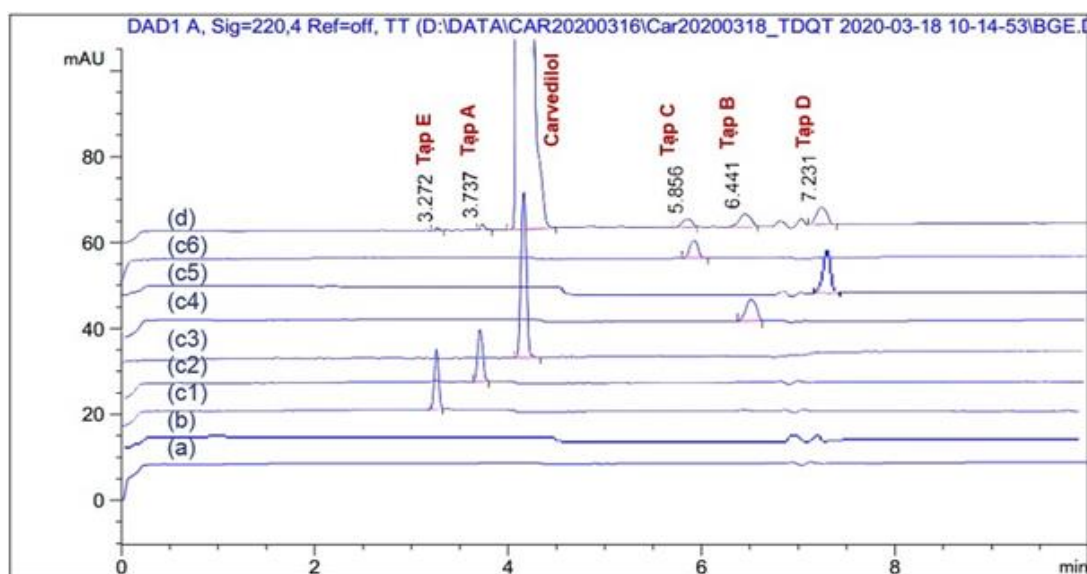
Bảng 3.17. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình

		tr (phút)	CorrA	T _f	N	R _s
Carvedilol	TB	4,124	1153,30	2,00	7113	2,68
	RSD%	0,61	1,46			
Tạp A	TB	3,744	1,40	1,40	30432	5,35
	RSD%	0,56	0,89			
Tạp B	TB	6,466	4,41	1,00	12755	2,63
	RSD%	1,20	3,07			
Tạp C	TB	5,882	2,62	0,92	12238	8,57
	RSD%	1,22	1,94			
Tạp D	TB	7,258	4,96	1,00	17150	3,52
	RSD%	1,22	1,36			
Tạp E	TB	3,278	0,62	0,98	22387	-
	RSD%	0,53	2,18			

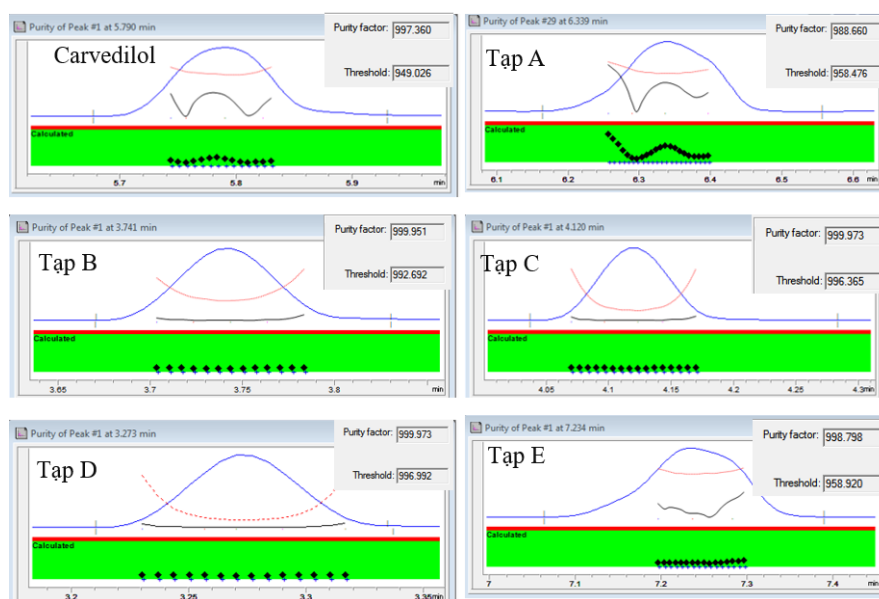
Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy RSD của thời gian điện di và CorrA đều không quá 3%; R_s >1,5; T_f nằm trong khoảng 0,8 – 2,0 và N > 1000. Như vậy, quy trình đạt tính phù hợp hệ thống.

3.6.2.2. Tính đặc hiệu

Tiến hành điện di mẫu dung dịch BGE, dung môi pha mẫu, chuẩn đơn tạp A, B, C, D, E, carvedilol và mẫu thử giả lập.



Hình 3.7. Điện di đồ đánh giá tính đặc hiệu: BGE (a), Dung môi pha mẫu (b), Chuẩn tập E (c1), Chuẩn tập A (c2), Chuẩn carvedilol (c3), Chuẩn tập B (c4), Chuẩn tập D (c5), Chuẩn tập C (c6), Thử giả lập (d)



Hình 3.8. Biểu đồ độ tinh khiết của pic carvedilol và các tập

Nhận xét:

- Điện di đồ mẫu dung dịch điện ly nền, dung môi pha mẫu không xuất hiện pic trong khoảng thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của carvedilol và các tập trong điện di đồ mẫu chuẩn.

- Trên điện di đồ của mẫu thử giả lập thì pic carvedilol và tạp tách hoàn toàn (độ phân giải $R_s \geq 1,5$);
- Phổ UV-Vis của pic mẫu thử và mẫu chuẩn tương đồng nhau, các pic đạt độ tinh khiết pic cao.

Như vậy, quy trình phân tích có tính đặc hiệu cao.

3.6.2.3. Khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, LOD và LOQ

Bảng 3.18. Kết quả khảo sát khoảng nồng độ tuyến tính, độ đúng, độ chính xác, LOD và LOQ của quy trình. (PL 7.1, 7.2, 7.3, 7.4)

	Carvedilol	Tạp A	Tạp B	Tạp C	Tạp D	Tạp E
Tuyến tính						
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$)	1000–6000	2-8	2-8	2-8	2-8	2-8
R^2	0,9937	0,9948	0,9973	0,9954	0,9954	0,9971
Độ dốc $\pm$ SD	$0,4716 \pm 0,0154$	$0,2793 \pm 0,0091$	$1,1708 \pm 0,0273$	$0,5250 \pm 0,0159$	$1,2966 \pm 0,0392$	$0,1374 \pm 0,0033$
p_a	$7,94 \cdot 10^{-8}$	$6,73 \cdot 10^{-7}$	$1,30 \cdot 10^{-7}$	$4,84 \cdot 10^{-7}$	$4,76 \cdot 10^{-7}$	$1,52 \cdot 10^{-7}$
Hệ số chặn $\pm$ SD	$51,57 \pm 50,60$	$0,0243 \pm 0,0488$	$-0,2842 \pm 0,1470$	$0,0377 \pm 0,0858$	$-0,0835 \pm 0,2112$	$-0,0371 \pm 0,0178$
p_b	1,02	0,64	0,11	0,68	0,71	0,09
Độ chính xác						
Độ lặp lại						
TB (%) ^a	96,88	0,200	0,201	0,205	0,195	0,205
SD	1,80	0,004	0,001	0,004	0,004	0,004
RSD %	1,86	1,86	0,69	1,78	1,92	1,79
Độ CXTG						
TB (%) ^a	98,23	0,203	0,210	0,216	0,209	0,206
SD	1,76	0,001	0,004	0,004	0,005	0,005
RSD %	1,80	0,66	1,69	1,89	2,30	2,42
Độ đúng						
% thu hồi ^b	100,17	100,00	96,90	98,81	100,34	99,63
RSD %	1,53	2,84	3,00	2,82	1,27	4,03
LOD ($\mu\text{g/ml}$)		0,175	0,125	0,125	0,100	0,400
LOQ ($\mu\text{g/ml}$)		0,50	0,35	0,35	0,30	1,50
Khoảng xác định ($\mu\text{g/ml}$)	2000-3000	4-6	4-6	4-6	4-6	4-6

^a n = 6; ^b n = 9

3.6.3. Ứng dụng quy trình điện di đã xây dựng nhằm xác định hàm lượng carvedilol và các tạp trong một số nguyên liệu và thành phẩm carvedilol

Ứng dụng quy trình đã thẩm định để xác định hàm lượng carvedilol và các tạp trong 09 mẫu. Kết quả được trình bày ở bảng 3.19.

Bảng 3.19. Kết quả định lượng carvedilol và các tạp trong các nguyên liệu và thành phẩm viên nén bằng CE

Mẫu	Hàm lượng (%)					
	Carvedilol	Tạp A	Tạp B	Tạp C	Tạp D	Tạp E
M1	98,67	-	-	-	-	-
M2	100,37	0,09	-	-	-	-
M3	97,46	-	-	-	-	-
M4	101,38	-	-	-	-	-
M5	98,39	-	-	-	-	-
M6	100,78	-	-	-	-	-
NL1	101,50	0,05	-	-	-	-
NL2	99,58	-	-	-	-	-
NL3	99,79	-	-	-	-	-

Ghi chú: (-) Dưới LOD của phương pháp

Nhận xét:

- Trong 06 mẫu thành phẩm có 01 mẫu phát hiện được tạp A hàm lượng 0,09%, trong giới hạn cho phép trong viên nén là 0,2% theo USP 2023. Trong 03 mẫu nguyên liệu có 01 mẫu phát hiện được tạp A hàm lượng 0,05%, và trong giới hạn cho phép trong nguyên liệu là 0,1% theo USP 2023.
- Các tạp B, C, D, E trong 09 mẫu đều nằm dưới giới hạn phát hiện.

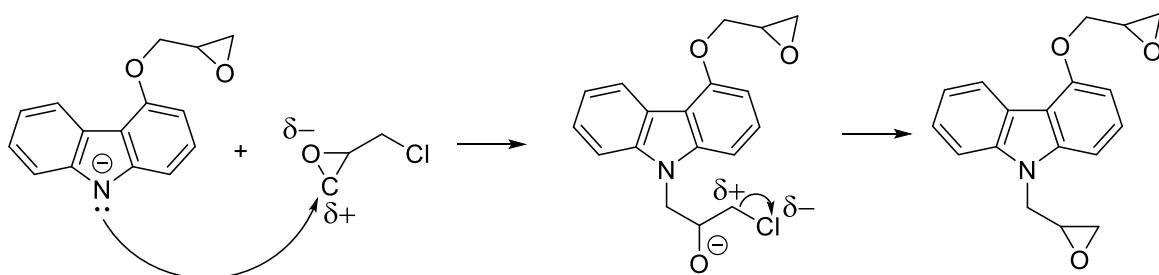
CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

4.1. TỔNG HỢP, TINH CHẾ VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC CÁC TẠP

4.1.1. Tổng hợp, tinh chế và xác định cấu trúc tạp A

Tạp A được tổng hợp theo con đường phát sinh tạp trong quá trình tổng hợp nguyên liệu carvedilol theo 2 giai đoạn: tổng hợp 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) và tổng hợp tạp A.

Ở giai đoạn thứ nhất, 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) được tổng hợp từ phản ứng giữa 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**) và epichlorohydrin (**5**). Căn cứ vào cấu trúc của halogen sử dụng là epichlorohydrin có gốc hydrocarbon là một alkyl bậc 1 và halogen là clo nên phản ứng có chiều hướng xảy ra theo cơ chế thế lưỡng phân tử (S_N2). Phản ứng có một giai đoạn, sự hình thành liên kết mới và cắt đứt liên kết cũ diễn ra đồng thời thông qua trạng thái chuyển tiếp có năng lượng cao nhất trong quá trình phản ứng. Quá trình hình thành trạng thái chuyển tiếp là bước quyết định tốc độ của phản ứng ⁷⁵.



Sơ đồ 4.1. Cơ chế phản ứng giai đoạn tạo hợp chất 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**)

Tiến hành khảo sát điều kiện của phản ứng bằng cách thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại, đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế. Khảo sát dung môi phản ứng, tiến hành phản ứng không sử dụng dung môi và trong các dung môi aprotic khác nhau, đây là các dung môi tạo điều kiện thuận lợi cho phản ứng S_N2 vì không tạo liên kết hydro với tác nhân ái nhân ⁷⁵. Kết quả khảo sát thực tế cho thấy hiệu suất của phản ứng cao nhất (50,6%) khi tiến hành

phản ứng trong điều kiện không sử dụng dung môi. Khảo sát sự ảnh hưởng của tỉ lệ số mol epichlorohydrin (**5**) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**), kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất quy trình tăng lên khi tỷ lệ số mol giữa epichlorohydrin (**5**) và 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**) thay đổi từ 30 – 50. Hiệu suất quy trình thay đổi không đáng kể khi tiếp tục tăng tỷ lệ số mol epichlorohydrin (**5**) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**). Trong phản ứng thế S_N2 , việc hình thành trạng thái chuyển tiếp là bước quyết định tốc độ phản ứng, có sự tham gia của cả 2 chất phản ứng nên tốc độ và hiệu suất phản ứng phụ thuộc vào tỉ lệ nồng độ của 2 chất ⁷⁵. Vì epichlorohydrin (**5**) là một chất rất độc và để đảm bảo tính kinh tế nên quyết định tiến hành phản ứng với tỷ lệ là 50:1.

Khảo sát xúc tác, tiến hành phản ứng với sự xúc tác của các base và cặp base khác nhau. Các base trong phản ứng tổng hợp hợp chất (**6**) có vai trò là một chất xúc tác đồng thể, giúp làm mạnh tác nhân ái nhân trong phản ứng S_N2 , từ đó làm tăng hiệu suất của phản ứng. Kết quả khảo sát cho thấy khi sử dụng cặp xúc tác là kali carbonat + triethylamin thì cho hiệu suất của quy trình là cao nhất (68,3%) và cao hơn hẳn khi sử dụng các xúc tác khác.

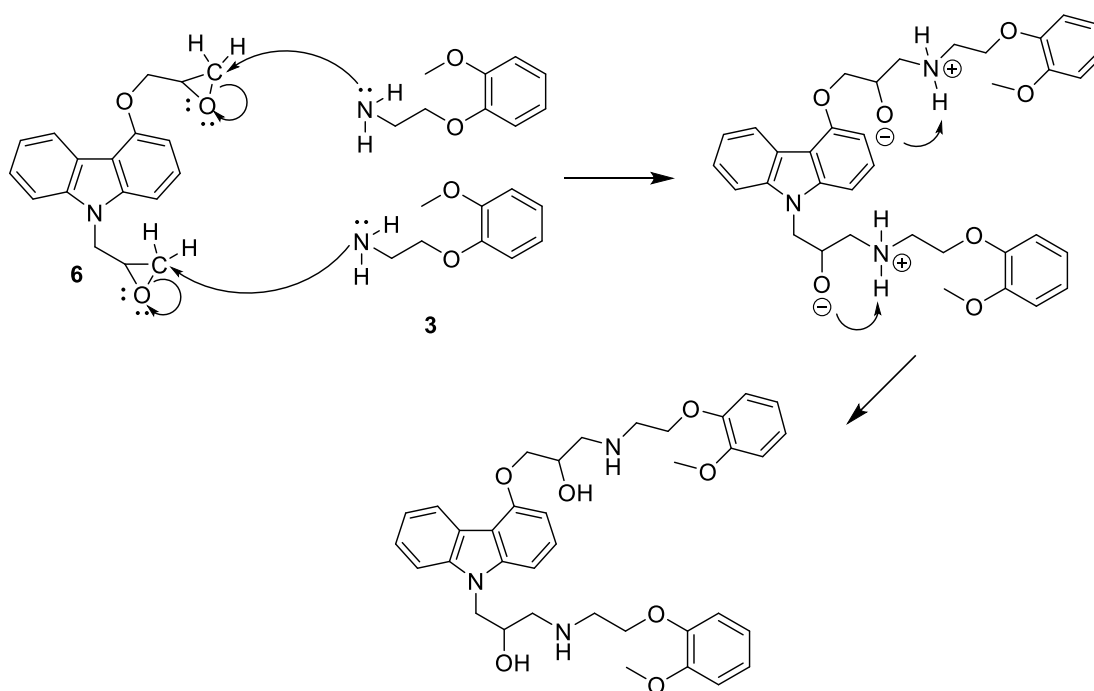
Khảo sát thời gian phản ứng, hiệu suất của quy trình tổng hợp hợp chất (**6**) tăng lên theo thời gian phản ứng từ 1 đến 4 h. Từ thời điểm 4 h trở đi hiệu suất toàn quy trình giảm nhẹ. Điều này có thể do khi gia nhiệt phản ứng ở thời gian dài trong môi trường kiềm, vòng epoxy có thể bị mở vòng để tạo ra sản phẩm phụ. Do đó, để thuận lợi cho quá trình tổng hợp, tiết kiệm thời gian và đảm bảo tính kinh tế, nghiên cứu quyết định tiến hành phản ứng trong thời gian 4 h.

Khảo sát nhiệt độ phản ứng, hiệu suất của quy trình tăng khi thay đổi nhiệt độ phản ứng từ nhiệt độ phòng (RT) đến 75 °C và cao nhất ở 75 °C (86,5%). Sau đó hiệu suất của quy trình giảm dần khi tiếp tục tăng nhiệt độ. Nhiệt độ phản ứng là một yếu tố cần thiết trong cơ chế của phản ứng S_N2 , việc gia nhiệt giúp cung cấp năng lượng cho hỗn hợp phản ứng, có vai trò quan trọng trong việc hình thành trạng thái chuyển

tiếp hay phức hoạt động. Đây là phức không bền có thời gian tồn tại rất ngắn ứng với trạng thái có mức năng lượng cao nhất trong quá trình phản ứng. Trong phản ứng trên, khi tăng nhiệt độ lên trên 75 °C, hiệu suất của phản ứng giảm. Nguyên nhân giảm hiệu suất có thể do nhiệt độ phản ứng quá cao làm phân hủy một phần epichlorohydrin (**5**), làm giảm hiệu suất phản ứng, đồng thời hợp chất (**6**) sau khi được tổng hợp cũng có thể bị mở vòng epoxy, tạo ra tạp chất trong sản phẩm.

Cấu trúc của hợp chất (**6**) được xác nhận bằng các phương pháp phổ hồng ngoại, phổ khối và cộng hưởng từ hạt nhân. Trên phổ IR (PL 1.2) so với phổ của tạp D (PL4.4) không xuất hiện tín hiệu đỉnh 3286 đặc trưng cho liên kết N-H, chứng tỏ H liên kết với N đã bị thay thế. Trên phổ NMR, số lượng proton và carbon, độ dịch chuyển, độ bội của tín hiệu đều phù hợp với cấu trúc hóa học của hợp chất (**6**). Đặc biệt, khi so với tài liệu tham khảo ²⁵, tín hiệu một số đỉnh trên phổ proton của hợp chất (**6**) trong nghiên cứu này rõ ràng hơn. Ví dụ, đỉnh doublet ở nguyên tử H1 thay vì multiplet, các nguyên tử H ở các vị trí 1', 3', 4', 6' đều được gán cụ thể cho mỗi tín hiệu H_α và H_β. Điều này là nhờ đối chiếu với phổ NMR của tạp D để gán vị trí cho nguyên tử H cụ thể và phổ cộng hưởng từ hạt nhân được đo trên máy có tần số cao hơn (500 MHz so với 400 MHz) nên độ phân giải phổ tốt hơn.

Ở giai đoạn 2, nghiên cứu tổng hợp tạp A từ phản ứng mở vòng epoxy giữa 4-(oxiran-2ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9*H*-carbazol (**6**) và 2-(2methoxyphenoxy)ethanamin (**3**). Trong phân tử hợp chất (**6**) có nhóm epoxyd nên có thể tham gia phản ứng mở vòng với tác nhân nucleophin ở đây là 2-(2methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) ⁷⁶.



Sơ đồ 4.2. Cơ chế phản ứng giai đoạn tổng hợp tạp A

Tiến hành khảo sát sơ bộ điều kiện của phản ứng bằng cách thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại, đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế. Khảo sát dung môi phản ứng, tiến hành phản ứng không sử dụng dung môi và trong các dung môi protic, aprotic khác nhau. Kết quả khảo sát cho thấy phản ứng tổng hợp tạp A của carvedilol không xảy ra khi tiến hành phản ứng trong các dung môi protic và phản ứng đạt hiệu suất cao nhất (27,7%) khi tiến hành trong điều kiện không sử dụng dung môi.

Khảo sát sự ảnh hưởng của tỉ lệ số mol 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) / 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**), vì trong phân tử hợp chất (**6**) có 2 vòng epoxy nên trong quá trình tiến hành phản ứng cộng mở vòng phải đảm bảo amin (**3**) luôn dư để hạn chế tạo ra sản phẩm phụ. Kết quả nghiên cứu cho thấy hiệu suất của quy trình tăng lên khi tỷ lệ số mol giữa (**3**) và (**6**) thay đổi từ 4:1 đến 6:1, khi tiếp tục tăng thì hiệu suất quy trình giảm. Hiệu suất quy trình cao nhất khi tỷ lệ số mol giữa (**3**) và (**6**) là 6:1.

Khảo sát xúc tác, tiến hành phản ứng lần lượt với xúc tác silica gel; magnesi oxyd và không sử dụng xúc tác. Theo tài liệu tham khảo, silica gel và magnesi oxyd là các chất xúc tác hiệu quả cho quá trình mở vòng epoxy bằng amin thơm trong điều kiện không có dung môi^{77,78}. Tuy nhiên, kết quả khảo sát thực tế cho thấy hiệu suất của phản ứng khi không sử dụng xúc tác cao hơn khi sử dụng xúc tác là magnesi oxyd. Hiệu suất của quy trình khi sử dụng xúc tác là silica gel là cao nhất (34,1%), tuy nhiên không chênh lệch nhiều so với hiệu suất khi không sử dụng xúc tác (33,9%), sự khác biệt này cũng không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Đồng thời, khi sử dụng silica gel làm xúc tác cho phản ứng thì sẽ gây khó khăn trong quá trình xử lý sản phẩm nên nghiên cứu quyết định chọn không sử dụng xúc tác cho phản ứng.

Khảo sát nhiệt độ phản ứng, khi tăng từ nhiệt độ phòng (RT) lên các mức đến 80 °C thì hiệu suất của quy trình tổng hợp tạp A hầu như giảm dần. Điều này cho thấy tạp A khá nhạy cảm với nhiệt độ. Khi tăng nhiệt độ phản ứng, tạp A có thể bị phân hủy một phần, đồng thời xuất hiện các sản phẩm phụ của phản ứng. Ví dụ mỗi vòng epoxy trên 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) có thể bị tấn công 2 lần bởi 2 phân tử 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) để tạo thành các sản phẩm phụ, làm giảm hiệu suất tổng hợp. Do đó, hiệu suất của quy trình cao nhất khi tiến hành phản ứng ở nhiệt độ phòng (48,3%).

Khảo sát thời gian phản ứng, hiệu suất của quy trình tăng lên theo thời gian phản ứng trong khoảng thời gian từ 2 đến 16 giờ. Từ thời điểm 16 giờ trở đi, hiệu suất giảm có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Điều này có thể do khi tăng thời gian phản ứng từ 2 giờ lên 16 giờ, khả năng mở vòng epoxy của 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) để tạo thành tạp A tăng dần, tuy nhiên khi tiếp tục phản ứng, các sản phẩm phụ tạo thành do tạp A tiếp tục phản ứng với 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**). Do đó, hiệu suất của quy trình cao nhất khi tiến hành phản ứng trong 16 giờ (71,7%).

Sản phẩm thô sau khi tổng hợp sẽ được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi petroleum ether : ethyl acetat : methanol (3:4:1) thu được sản phẩm tinh chế có độ tinh khiết cao (trên 98%).

Như vậy, qua quá trình khảo sát, đánh giá dựa trên hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế, nghiên cứu đã lựa chọn được điều kiện tối ưu cho quá trình tổng hợp tạp A của carvedilol. Hiệu suất của phản ứng tổng hợp tạp A qua 2 giai đoạn trong nghiên cứu này lần lượt là 86,5% và 71,7%, hiệu suất toàn quy trình là 62,02%. Cho đến nay đã có một số công trình nghiên cứu tổng hợp tạp chất A của carvedilol, tuy nhiên các công trình nghiên cứu này có hiệu suất của quy trình tổng hợp khá thấp và độ tinh khiết của các tạp tổng hợp được chưa được đề cập. Với điều kiện tối ưu tìm được, hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế tạp A đã được cải thiện đáng kể so với các nghiên cứu trước đó của G. Madhusudhan (2009) và Somisetti Narender Rao (2011) với hiệu suất tổng hợp là 32,8% và 45%. Cả hai nghiên cứu đều không đề cập đến hiệu suất của giai đoạn 1 và độ tinh khiết của sản phẩm^{25,26}. Trong nghiên cứu của G. Madhusudhan, tác nhân mở vòng epoxid là *N*-benzyl-2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**7**), do đó sau khi mở vòng cần thực hiện phản ứng debenzyl hóa với tác nhân hydrazin hydrat với xúc tác Pd/C. Điều này có thể làm giảm hiệu suất toàn quy trình tổng hợp. Quy trình tổng hợp trong nghiên cứu này tương tự với nghiên cứu của Somisetti Narender Rao, trong đó có khảo sát cải tiến các yếu tố ảnh hưởng để tối ưu hiệu suất phản ứng. Các điều kiện phản ứng trong nghiên cứu của Somisetti Narender Rao được khảo sát lại và đều cho hiệu suất thấp hơn các điều kiện được lựa chọn trong nghiên cứu này. Đặc biệt, việc sử dụng chính tác nhân phản ứng để làm môi trường phân tán (epichlorohydrin (**5**) trong giai đoạn tổng hợp (**6**) và 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) trong giai đoạn tổng hợp tạp A) so với việc sử dụng dung môi DMF và monoglyme giúp quá trình xử lý sau phản ứng dễ hơn, giảm khả năng tạo thành tạp chất không mong muốn và tăng sự tương tác giữa các phân tử tham gia phản ứng, giúp tăng hiệu suất tổng hợp.

Các nguyên liệu sử dụng trong đề tài là các hóa chất dễ tìm: là các nguyên liệu tổng hợp carvedilol trong công nghiệp như 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9H-carbazol (**2**), epichlorohydrin (**5**), 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**). Quy trình tổng hợp và tinh chế trong đề tài đơn giản, dễ thực hiện tại các phòng thí nghiệm và cho hiệu suất tổng hợp tương đối cao so với các công trình nghiên cứu đã công bố và độ tinh khiết của tạp A tổng hợp đạt yêu cầu để thiết lập tạp chất chuẩn đối chiếu ($\geq 98,0\%$).

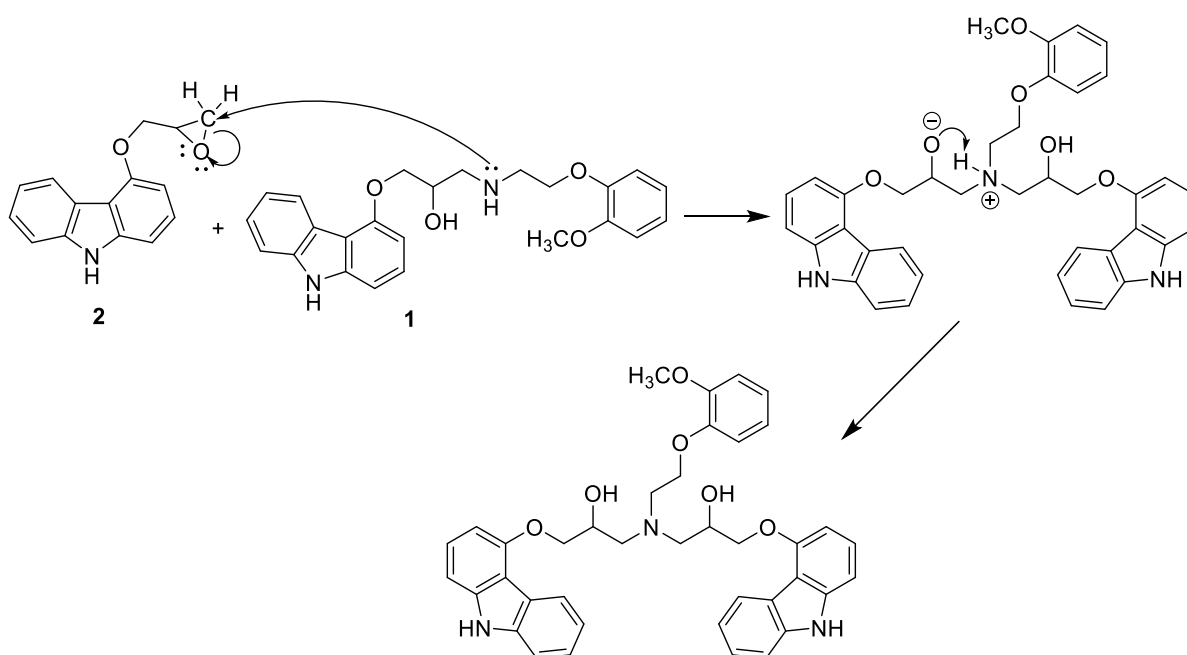
Về xác định cấu trúc, các thông tin trên phổ tử ngoại – khả kiến (UV-Vis), hồng ngoại (IR), khối phổ (HRMS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) của sản phẩm tổng hợp đều phù hợp với công thức cấu tạo của tạp A. Trên phổ IR đều có dải hấp phụ ở số sóng ứng với các dao động của các nhóm liên kết đặc trưng. Trong đó, dao động của các liên kết C – H (no), C=C (nhân thơm) là các dao động đặc trưng cho tạp A của carvedilol và phù hợp với phổ IR của tạp A carvedilol theo TLTK²⁶. Phổ khối HR-MS (+) của tạp A có $m/z = 630,3183$ $[MH]^+$ và $m/z = 652, 3048$ $[MNa]^+$ phù hợp với giá trị m/z dự kiến là $630,3181$ $[MH]^+$; $652,3000$ $[MNa]^+$ và phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến của tạp A ($C_{36}H_{43}N_3O_7$; $M = 629,74$). Trên phổ NMR, kết quả phân tích phổ 1H -NMR về độ dịch chuyển và cường độ pic nhận thấy số lượng proton, độ dịch chuyển, độ bội của tín hiệu là phù hợp với cấu trúc hóa học của tạp A. Phổ ^{13}C -NMR cho phép khẳng định dạng carbon và số lượng carbon thông qua độ dịch chuyển và cường độ pic, nhận thấy số carbon, độ dịch chuyển hóa học của các pic là phù hợp với công thức cấu tạo của tạp A. Phổ HMBC và phổ HSQC lần lượt khẳng định các tương tác J^3 và J^1 giữa 1H và ^{13}C cho phép chỉ ra vị trí gắn chính xác của các nguyên tử carbon, hydro và cho thấy sự phù hợp với công thức cấu tạo của tạp A của carvedilol. Để dễ dàng so sánh phổ tạp A tổng hợp được với các tài liệu tham khảo, nghiên cứu đã lựa chọn dung môi đo phổ NMR là $CDCl_3$ như nghiên cứu của Rao²⁶. Cấu trúc hóa học của tạp A khá cồng kềnh, đồng thời hai nhánh gắn trên nhân carbazole giống nhau nên tín hiệu trên phổ NMR rất dễ bị chập nếu độ phân giải máy không cao. Điều này thể hiện khá rõ khi so sánh phổ đo được trong nghiên cứu

này với các nghiên cứu của Rao và Madhusudhan^{25,26}. Trên phổ ^{13}C -NMR, các cặp tín hiệu C2 – C2', C6 – C6', C10 – C10', C11 – C11', C13 – C13' được tách khỏi nhau, trong khi các tài liệu tham khảo đều cho tín hiệu chập. Tương tự, trên phổ ^1H -NMR, các tín hiệu H3, H3' hay H6, H6' đều là các đỉnh đôi kép (doublet of doublets - *dd*) hay triplet thay vì multiplet như các nghiên cứu khác. Điều này là nhờ máy NMR trong nghiên cứu này có tần số cao hơn dẫn đến độ phân giải tốt hơn (500 MHz so với 400 và 300 MHz).

4.1.2. Tổng hợp, tinh chế và xác định cấu trúc tạp B

Tạp B được tổng hợp theo con đường phát sinh tạp trong quá trình tổng hợp nguyên liệu carvedilol. Tạp B là tạp dimer, tạo thành do sự tấn công mở vòng epoxy 2 lần: 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) mở vòng epoxy để tạo thành carvedilol, sau đó carvedilol đóng vai trò amin bậc 1 tiếp tục mở vòng epoxy thứ 2 để tạo thành tạp B. Do đó nghiên cứu đã khảo sát hai tác nhân gồm 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**) và carvedilol. Với tác nhân 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**), khi tiến hành cần phải cho từ từ tác nhân amin và dung dịch của 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9*H*-carbazol (**2**) trong ethanol. Nếu cho quá nhanh hoặc cho hết nguyên liệu amin cùng một lúc vào dung dịch của 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9*H*-carbazol (**2**) trong ethanol thì sẽ tạo một lượng lớn carvedilol. Trong khi đó, khi dùng tác nhân carvedilol, quy trình thực hiện đơn giản hơn, không cần phải cho từ từ nguyên liệu trong quá trình tổng hợp, hạn chế được việc tạo một số tạp so với sử dụng tác nhân 2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**3**). Bước tinh chế khi sử dụng carvedilol cũng đơn giản hơn, phản ứng xảy ra nhanh hơn và ưu tiên tạo tạp B hơn do carvedilol là sản phẩm trung gian trong quá trình tạo tạp B. Kết quả cũng cho thấy tác nhân carvedilol cho hiệu suất cao hơn so với 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin (**3**) (33,9 % và 20,5%). Do đó nghiên cứu tiến hành phản ứng với tác nhân carvedilol.

Phản ứng mở vòng tạp B xảy ra theo cơ chế $\text{S}_{\text{N}}2$.



Sơ đồ 4.3. Cơ chế phản ứng giai đoạn tổng hợp tạp B

Tiến hành khảo sát điều kiện của phản ứng bằng cách thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại, đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế. Khảo sát dung môi phản ứng, kết quả cho thấy ethanol cho hiệu suất phản ứng cao hơn hẳn so với các dung môi monoglyme, isopropanol và methanol. Sự khác biệt về hiệu suất khi sử dụng các dung môi monoglyme, isopropanol và methanol so với ethanol đều có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Bên cạnh đó, so với monoglyme và isopropanol, nhiệt độ sôi của ethanol thấp hơn, giúp thuận lợi quá trình cô thu sản phẩm thô. Do đó ethanol được lựa chọn làm dung môi phản ứng.

Khảo sát nhiệt độ phản ứng từ 45 đến 75 °C, kết quả cho thấy hiệu suất phản ứng phụ thuộc vào nhiệt độ. Hiệu suất quy trình tăng theo chiều tăng nhiệt độ từ 45 °C đến 65 °C, sự khác biệt về hiệu suất có ý nghĩa thống kê. Sau đó hiệu suất giảm nhẹ khi tăng nhiệt độ lên 75 °C, đồng thời hiệu suất ở nhiệt độ 65 và 75 °C là không có khác biệt có ý nghĩa ($p > 0,05$). Để giảm lượng tạp chất không mong muốn, nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ phản ứng là 65 °C.

Khảo sát thời gian phản ứng từ 4 h đến 12 h, kết quả cho thấy, hiệu suất quy trình tăng theo thời gian phản ứng từ 4 h đến 8 h, sau đó gần như không đổi khi tăng

thời gian đến 12 h. Bên cạnh đó, khi kéo dài thời gian phản ứng, phản ứng vẫn xảy ra không hoàn toàn, mặt khác còn tạp ra nhiều sản phẩm phụ khác. Do đó nghiên cứu lựa chọn thời gian phản ứng là 8 h.

Sản phẩm thô sau khi tổng hợp sẽ được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi cyclohexan : EtOAc (1:1) thu được sản phẩm tinh chế có độ tinh khiết cao (trên 98%).

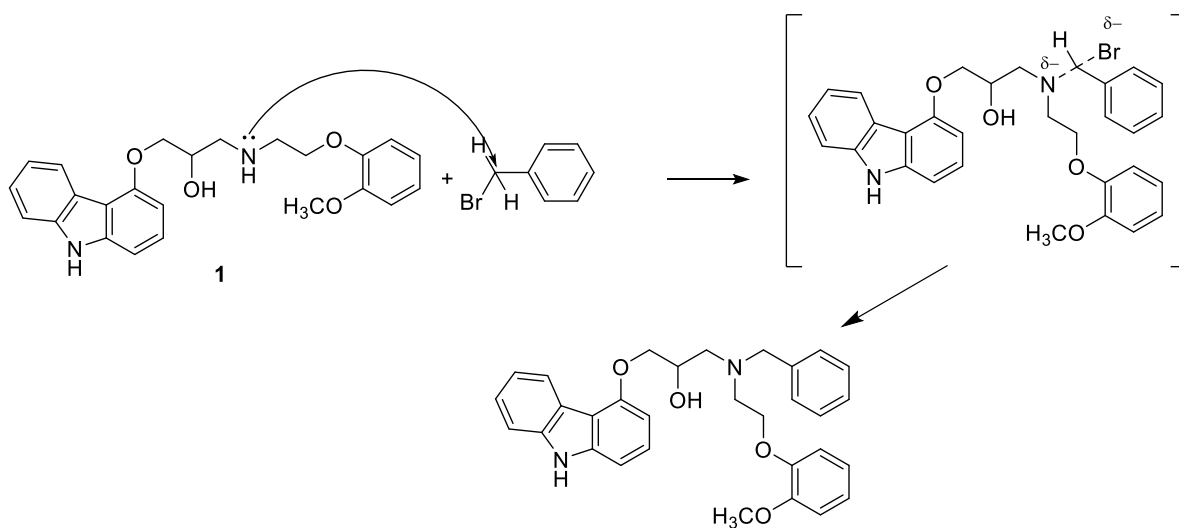
Theo tổng quan tài liệu, đây là lần đầu tiên công bố quy trình tổng hợp tạp B đi từ carvedilol và 4-(oxiran-2-ylmethyl)-9*H*-carbazol (**2**) thay vì 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin (**3**) và (**2**) như trong nghiên cứu của Somiseti Narender Rao. Quy trình đơn giản, dễ xử lý hỗn hợp phản ứng nên hiệu suất tổng hợp và tinh chế tạp B là 70,8%, tăng gần gấp đôi so với công trình của Somiseti Narender Rao²⁶. Mặt khác, độ tinh khiết của tạp B tổng hợp đã được xác định và phù hợp để thiết lập tạp chuẩn đối chiếu trong khi công trình của S. N. Rao không đề cập đến độ tinh khiết của tạp B. Quy trình tổng hợp và tinh chế trong đề tài đơn giản, dễ thực hiện tại các phòng thí nghiệm và cho hiệu suất tổng hợp cao và độ tinh khiết của tạp B tổng hợp đạt yêu cầu để thiết lập tạp chất chuẩn đối chiếu ($\geq 98,0\%$).

Về xác định cấu trúc hóa học, tương tự tạp A, các phổ UV-Vis, IR, MS và NMR cho phép khẳng định sản phẩm tổng hợp là tạp B carvedilol. Trên phổ IR, các dao động đặc trưng phù hợp với phổ IR của tạp B carvedilol trong nghiên cứu của Sajan và cộng sự³⁹. Trên phổ khối HR-MS (-) của tạp B có $m/z = 644,2763$ [MH]⁻ phù hợp với giá trị m/z dự kiến là 644,2761 [MH]⁻ và phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến của tạp B (C₃₉H₃₉N₃O₆; M = 645,74). Trên phổ NMR, do công thức cấu tạo của tạp B có tính đối xứng nên trên phổ ¹H-NMR các cặp H và C đối xứng sẽ cho cùng một tín hiệu, như các H và C trên vòng carbazol. Tín hiệu của H của nhóm Ar-OCH₃ (H13) luôn là một đỉnh đơn ở khoảng 3,6 ppm nhưng có thể thấy trong nghiên cứu của Rao²⁶ H này cho một đỉnh đôi, và trong phổ đồ của nghiên cứu xuất hiện một mũi nhỏ cách bên mũi 3,61 ppm. Tương tự, trên phổ ¹H-NMR, bên cạnh các mũi

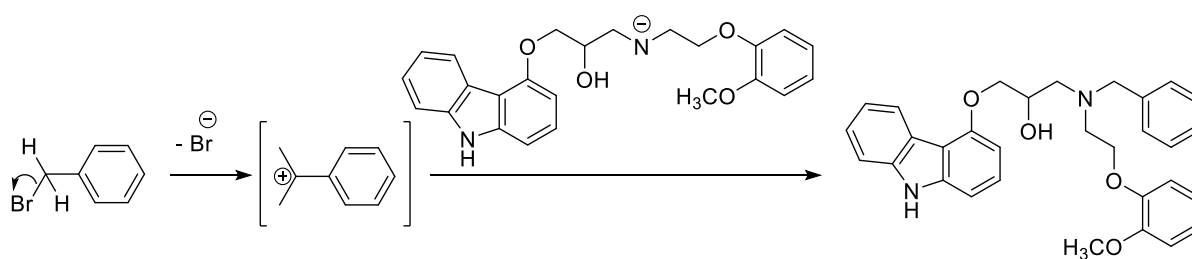
chính ở 7,17 (H2', H2''); 5,02 ppm (-OH) đều thấy có các mũi phụ. Điều này có thể giải thích là do cấu trúc hóa học của tạp B có 2 carbon bất đối nên tạp B là một hỗn hợp các đồng phân và tùy tỉ lệ của các đồng phân này sẽ cho tín hiệu H của Ar-OCH₃ khác nhau. Phổ ¹³C-NMR cho phép khẳng định dạng carbon và số lượng carbon thông qua độ dịch chuyển và cường độ pic, nhận thấy số carbon, độ dịch chuyển hóa học của các pic là phù hợp với công thức cấu tạo của tạp B. Cụ thể, trong công thức cấu tạo tạp B có 39 nguyên tử C, nhưng trên phổ ¹³C-NMR chỉ có 24 tín hiệu C, chứng tỏ 15 tín hiệu thuộc về 30 nguyên tử C đối xứng. Phổ HMBC và phổ HSQC lần lượt khẳng định các tương tác J^3 và J^1 giữa ¹H và ¹³C cho phép chỉ ra vị trí gần chính xác của các nguyên tử carbon, hydro và cho thấy sự phù hợp với công thức cấu tạo của tạp B của carvedilol.

4.1.3. Tổng hợp, tinh chế và xác định cấu trúc tạp C

Theo G. Madhusudhan và cộng sự, tạp C hình thành do phản ứng *N*-debenzyl hóa sản phẩm 1-(9*H*-carbazol-4-yloxy)-3-(benzyl(2-(2-methoxyphenoxy)ethyl)amino)propan-2-ol để tạo thành carvedilol xảy ra không hoàn toàn^{25,30}. Do đó nghiên cứu đã thực hiện tổng hợp tạp C đi từ carvedilol, thực hiện phản ứng *N*-benzyl hóa. Phản ứng xảy ra theo cơ chế S_N2 hoặc S_N1 hoặc cả hai. Tuy nhiên, trong điều kiện dung môi aceton và xúc tác kiềm kali carbonat, cơ chế được ưu tiên có thể là cơ chế S_N2 do khó tạo ra nhiều carbocation trung gian để thực hiện cơ chế S_N1.



Cơ chế S_N2



Cơ chế S_N1

Sơ đồ 4.4. Cơ chế phản ứng giai đoạn tổng hợp tạp C

Tiến hành khảo sát điều kiện của phản ứng bằng cách thay đổi một yếu tố và cố định các yếu tố còn lại, đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế. Kết quả khảo sát hai tác nhân phản ứng gồm benzyl clorid, benzyl bromid cho thấy tác nhân benzyl bromid cho hiệu suất cao hơn so với benzyl clorid (46,0 % và 38,1 %). Do đó nghiên cứu tiến hành phản ứng với tác nhân benzyl bromid.

Khảo sát các dung môi phản ứng gồm ethanol, methanol, aceton, toluen cho thấy phản ứng trong dung môi aceton cho hiệu suất phản ứng cao nhất (60,5%). Aceton là một dung môi aprotic, không có khả năng tạo liên kết hidro mạnh với các tác nhân nucleophile, nên thường thúc đẩy phản ứng S_N2. Đồng thời, aceton có kích

thước phân tử nhỏ, giúp giảm cản trở không gian trong quá trình tấn công của nucleophile vào tác nhân. Do đó aceton được lựa chọn làm dung môi phản ứng.

Khảo sát xúc tác là các tác nhân base. Vai trò của các xúc tác này là tạo ra môi trường kiềm, giúp tăng tính nucleophilic của tác nhân ái nhân, làm cho quá trình tấn công nucleophile vào tác nhân trở nên dễ dàng hơn. Kết quả cho thấy trong các base calci hydroxyd, natri hydroxyd, triethylamin, kali carbonat thì kali carbonat cho hiệu suất phản ứng cao nhất (67,6%), do đó kali carbonat được lựa chọn làm xúc tác phản ứng.

Khảo sát nhiệt độ phản ứng gồm RT, 40 °C, 50 °C, 55 °C cho thấy hiệu suất quy trình tăng theo chiều tăng nhiệt độ từ nhiệt độ phòng đến 55 °C. Do nhiệt độ sôi của aceton từ 56 °C nên nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ phản ứng là 55 °C.

Khảo sát thời gian phản ứng sau 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 8 h, 10 h. Kết quả cho thấy hiệu suất quy trình tăng theo thời gian phản ứng từ 1 h đến 6 h, sau đó hiệu suất có tăng nhẹ từ 6 h đến 8 h nhưng không có ý nghĩa ($p > 0,05$) và giảm khi tăng thời gian đến 10 h. Do đó nghiên cứu lựa chọn thời gian phản ứng là 6 h.

Sản phẩm thô sau khi tổng hợp sẽ được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi cyclohexan : EtOAc (2:1) thu được sản phẩm tinh chế có độ tinh khiết cao (trên 98%).

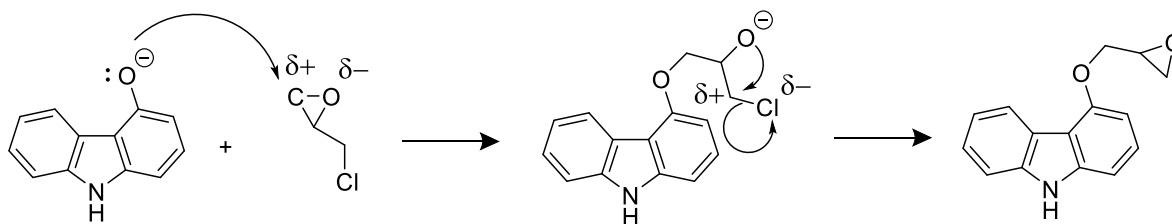
Cũng như tạp B, tạp C cũng được tổng hợp từ chính dược chất carvedilol, và cho đến nay vẫn chưa có công trình nghiên cứu nào trên thế giới công bố tổng hợp tạp C từ carvedilol. Trong nghiên cứu của Somiseti Narender Rao, tạp C được tổng hợp qua hai giai đoạn: tổng hợp *N*-benzyl-2-(2-methoxyphenoxy)ethanamin (**4**) và tổng hợp tạp C²⁶, dẫn đến hiệu suất toàn quy trình không cao. Hiệu suất của phản ứng tổng hợp tạp C trong nghiên cứu này tương đương với hiệu suất giai đoạn 2 trong nghiên cứu của Somiseti Narender Rao và cộng sự (78,5% so với 85%), và cao hơn nếu so với hiệu suất toàn quy trình trong nghiên cứu của Rao (42,5%). Tuy nhiên trong nghiên cứu này tạp C chỉ tổng hợp qua một giai đoạn duy nhất từ chính dược

chất carvedilol và hiệu suất phản ứng được tính trên tạp C tinh khiết thu được còn trong nghiên cứu của S. N. Rao hiệu suất được tính trên sản phẩm thô và chỉ tính trên phản ứng tổng hợp tạp C chứ không tính trên toàn bộ quy trình (nếu tính trên toàn bộ quy trình, hiệu suất tổng hợp C theo Rao chỉ 17,7%). Do đó quy trình tổng hợp tạp C trong nghiên cứu này đơn giản, hiệu suất cao, tạp C sau tinh chế đạt độ tinh khiết phù hợp để thiết lập tạp chuẩn đối chiếu.

Về xác định cấu trúc hóa học, tương tự các tạp trước, các phổ UV-Vis, IR, MS và NMR cho phép khẳng định sản phẩm tổng hợp là tạp C carvedilol. Trên phổ IR, Các đỉnh đặc trưng phù hợp với phổ IR của tạp C carvedilol theo công trình nghiên cứu của Rao và các cộng sự²⁶. Trên phổ khối HR-MS (-) của tạp C có $m/z = 495,2287$ $[MH]^-$ phù hợp với giá trị m/z dự kiến là 495,2284 $[MH]^-$ và phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến của tạp C ($C_{31}H_{31}N_2O_4$; $M = 496,60$). Các tín hiệu trên phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR và phổ 2 chiều HMBC, HSQC đều cho thấy số lượng, vị trí và các tương tác J^3 và J^1 giữa 1H và ^{13}C là phù hợp với công thức cấu tạo của tạp C của carvedilol. Tương tự các tạp khác, tạp C cũng được đo trong dung môi $CDCl_3$, giống với tài liệu tham khảo của Somiseti Narender Rao để tiện so sánh²⁶. Một số tín hiệu của C và H cũng được thể hiện rõ hơn trong nghiên cứu này do được đo trên máy NMR có độ phân giải tốt hơn. Ví dụ cặp C8a' (138,8 ppm) và C16 (138,7 ppm) hay cặp C19 (127,2 ppm) và C2' (126,6 ppm) cho các tín hiệu phân tách rõ. Kết hợp các phổ 2 chiều giúp gắn chính xác các nguyên tử H lên khung C trong cấu trúc của tạp C.

4.1.4. Tổng hợp, tinh chế và xác định cấu trúc tạp D

Dựa trên các tài liệu tham khảo, nghiên cứu đã tổng hợp tạp D từ phản ứng thế S_N2 giữa 4-hydroxycarbazol và epichlorohydrin.



Sơ đồ 4.5. Cơ chế phản ứng giai đoạn tổng hợp tạp D

Tiến hành tối ưu điều kiện phản ứng bằng cách thay đổi một đại lượng và cố định các đại lượng còn lại đồng thời đánh giá dựa trên hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế tạp D. Khảo sát dung môi phản ứng, tiến hành phản ứng trong các dung môi aprotic khác nhau, đây là các dung môi tạo điều kiện thuận lợi cho phản ứng S_N2 vì không tạo liên kết hydro với tác nhân ái nhân⁷⁹, kết quả cho thấy hiệu suất của phản ứng cao nhất khi tiến hành trong dung môi DMSO. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu tổng hợp tạp D khác của Somiseti Narender Rao và K. Suneel Kumar^{11,26}.

Khảo sát thời gian phản ứng, hiệu suất toàn quy trình tăng lên theo thời gian phản ứng trong khoảng thời gian từ 0,5 đến 2 h. Ở thời điểm 2,5 h, hiệu suất có tăng nhưng khác nhau không có ý nghĩa thống kê so với thời điểm 2 h ($p > 0,05$). Từ thời điểm 2,5 h trở đi, hiệu suất toàn quy trình giảm dần. Điều này có thể do sự chuyển đổi từ tạp D thành 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9H-carbazol (**6**) (là sản phẩm giai đoạn 1 của quá trình tổng hợp tạp A). Do đó nghiên cứu lựa chọn thời gian phản ứng là 2 h vì vừa đảm bảo hiệu suất của quá trình phản ứng, vừa tạo thuận lợi cho quá trình tiến hành, giúp tiết kiệm thời gian, chi phí trong quá trình tổng hợp.

Khảo sát nhiệt độ phản ứng trong khoảng từ nhiệt độ phòng đến 60 °C, hiệu suất toàn quy trình tổng hợp và tinh chế tạp D tăng lên khi nhiệt độ phản ứng thay đổi từ RT – 50 °C. Hiệu suất cao nhất (khoảng 70,6%) tương ứng với nhiệt độ phản ứng 48 °C. Hiệu suất toàn quy trình giảm dần khi nhiệt độ phản ứng thay đổi từ 48 – 60 °C. Nhiệt độ phản ứng là một yếu tố cần thiết trong cơ chế của phản ứng S_N2 , việc gia nhiệt giúp cung cấp năng lượng cho hỗn hợp phản ứng, có vai trò quan trọng trong việc hình thành trạng thái chuyển tiếp hay phức hoạt động. Tuy nhiên, trong phản ứng trên, khi nhiệt độ tăng cao trên 48 °C, hiệu suất của phản ứng giảm. Nguyên nhân giảm hiệu suất có thể do tạp D sau khi được tổng hợp cũng có thể bị mở vòng epoxy,

tạo ra sản phẩm mới hòa tan trong môi trường phản ứng, làm giảm hiệu suất phản ứng. Do đó nghiên cứu lựa chọn nhiệt độ phản ứng là 48 °C.

Khảo sát sự ảnh hưởng của tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol, kết quả nghiên cứu cho thấy, hiệu suất toàn quy trình tăng lên khi tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol thay đổi từ 1 : 1 đến 1,9 : 1 và cao nhất khi tỉ lệ số mol là 1,9 : 1. Hiệu suất toàn quy trình thay đổi không đáng kể khi tiếp tục tăng tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol lên 2,25 : 1. Trong phản ứng S_N2 , vì việc hình thành trạng thái chuyển tiếp là bước quyết định tốc độ phản ứng có sự tham gia của cả hai chất phản ứng nên tốc độ và hiệu suất phản ứng phụ thuộc vào tỉ lệ nồng độ của hai chất. Do đó nghiên cứu lựa chọn tỉ lệ số mol epichlorohydrin và 4-hydroxycarbazol là 1,9 : 1.

Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ số mol natri hydroxyd trên cơ chất 4-hydroxycarbazol, kết quả của nghiên cứu cho thấy, hiệu suất toàn quy trình tăng khi tỉ lệ số mol natri hydroxyd trên cơ chất 4-hydroxycarbazol thay đổi từ 0,875 : 1 đến 1,230 : 1. Hiệu suất cao nhất (khoảng 80,3%) tương ứng với tỉ lệ số mol là 1,230 : 1. Khi tiếp tục tăng tỉ lệ số mol natri hydroxyd trên cơ chất 4-hydroxycarbazol đến 1,650 : 1, hiệu suất toàn quy trình giảm tương đối mạnh. Natri hydroxyd trong phản ứng tổng hợp tạp D của carvedilol có vai trò là một chất xúc tác đồng thể, giúp làm mạnh tác nhân ái nhân trong phản ứng S_N2 , từ đó làm tăng hiệu suất của phản ứng. Bên cạnh đó, natri hydroxyd trong phản ứng tổng hợp tạp D còn có vai trò duy trì pH, trung hòa sản phẩm phụ HCl sinh ra trong quá trình phản ứng, từ đó ngăn ngừa các quá trình tạp chất trong quá trình tổng hợp tạp D gây ra bởi acid hydrocloric. Tuy nhiên, natri hydroxyd cũng là một nguyên nhân làm hình thành các tạp chất trong quá trình tổng hợp, do mở vòng epoxy trên epichlorohydrin, làm giảm hiệu suất phản ứng, đồng thời tạp D sau khi được tổng hợp cũng có thể bị mở vòng epoxy, tạo ra sản phẩm mới hòa tan trong môi trường phản ứng. Do đó, khi tỉ lệ số mol natri hydroxyd trên cơ chất 4-hydroxycarbazol quá cao, hiệu suất quá trình tổng hợp có xu hướng giảm.

Sự ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng và tỉ lệ số mol natri hydroxyd trên cơ chất 4-hydroxycarbazol đến quá trình tạp chất trong quá trình tổng hợp tạp D của carvedilol trong nghiên cứu cũng phù hợp với kết quả đã được đề cập trong nghiên cứu của K. Suneel Kumar ¹¹.

Sản phẩm thô sau khi tổng hợp sẽ được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexan - EtOAc (4:1) thu được sản phẩm tinh chế có độ tinh khiết cao (trên 98%).

Như vậy, với điều kiện tối ưu tìm được, hiệu suất của quá trình tổng hợp và tinh chế tạp D đã được cải thiện đáng kể so với nghiên cứu trước đó của Somisetti Narender Rao (2011) với hiệu suất tổng hợp và tinh chế 75%, tuy nhiên độ tinh khiết của sản phẩm không được đề cập đến ²⁶.

Về xác định cấu trúc hóa học, tương tự các tạp trước, các phổ UV-Vis, IR, MS và NMR cho phép khẳng định sản phẩm tổng hợp là tạp D carvedilol. Trên phổ IR, các đỉnh đặc trưng phù hợp với phổ IR của tạp D carvedilol theo công trình nghiên cứu của Rao và Suneel Kumar ^{11,26}. Các đỉnh đặc trưng gợi ý sự gắn kết nhóm epoxy thành công như đỉnh 1259 (ν_{C-O} epoxy) và 1095 (ν_{C-O} ether). Trên phổ khối HR-MS (-) của tạp D có $m/z = 238,0878$ $[MH]^-$ phù hợp với giá trị m/z dự kiến là 238,0874 $[MH]^-$ và phù hợp với khối lượng phân tử dự kiến của tạp D ($C_{15}H_{13}NO_2$, $M=239,27$). Các tín hiệu trên phổ 1H -NMR, ^{13}C -NMR và phổ 2 chiều HMBC, HSQC đều cho thấy số lượng, vị trí và các tương tác J^3 và J^1 giữa 1H và ^{13}C là phù hợp với công thức cấu tạo của tạp D của carvedilol. Tương tự các tạp khác, tạp D cũng được đo trong dung môi $CDCl_3$, giống với tài liệu tham khảo của Somisetti Narender Rao để dễ so sánh ²⁶. Các phổ 2 chiều giúp chỉ ra vị trí gắn chính xác của các nguyên tử carbon, hydro trong cấu trúc tạp D, đồng thời cũng là gợi ý để biện giải cấu trúc hóa học của sản phẩm trung gian 4-(oxiran-2-ylmethoxy)-9-(oxiran-2-ylmethyl)-9*H*-carbazol (**6**) trong quá trình tổng hợp tạp A carvedilol (nguyên tử H_α và H_β ở vị trí 1' và 3').

4.1.5. Điều chế, tinh chế và xác định cấu trúc tạp E

Nguyên liệu ban đầu của quá trình điều chế là 2-(2-methoxyphenoxy) ethylamin, đây là tạp E theo USP. Tuy nhiên amin này tồn tại ở dạng dầu lỏng, khó sử dụng để làm chất đối chiếu. Vì vậy chất đối chiếu tạp E carvedilol của USP ở dưới dạng muối hydroclorid monohydrat. Mục tiêu của quá trình điều chế tạp E trong nghiên cứu này là chuyển dạng từ dạng base sang dạng muối kết tinh, thuận tiện để thiết lập chất đối chiếu. Ban đầu, nghiên cứu đã chuyển dạng muối bằng cách cho base 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin phản ứng với acid HCl. Tuy nhiên sản phẩm thành tan một phần trở lại trong môi trường nước và một lượng dư của base làm cho sản phẩm có màu vàng. Vì vậy nghiên cứu đã điều chế tạp E từ 2-(2-methoxyphenoxy) ethylamin và khí hydroclorid (được điều chế từ muối natri clorid và acid sulfuric đậm đặc). Khí hydroclorid được dẫn vào bình chứa dung dịch 2-(2-methoxyphenoxy) ethylamin, tiến hành khảo sát các dung môi khác nhau. Có thể thấy rằng việc lựa chọn môi trường phản ứng có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất, tính chất cảm quan của sản phẩm. Khi sử dụng ethyl acetat thì chỉ sau khoảng 5 phút đã thu được sản phẩm là tủa dạng bột mịn, màu trắng hơi ngả vàng nhưng hiệu suất thấp hơn cloroform (70,78 %). Khi sử dụng aceton làm môi trường thì sau khoảng 3 giờ vẫn không thu được tủa và dung dịch trong bình phản ứng chuyển sang màu nâu đỏ. Điều này có thể là do trong môi trường có mặt aceton và nhóm amin sẽ tạo thành hợp chất imin, hợp chất này có thể đóng vòng với 2-(2-methoxyphenoxy) ethylamin để tạo thành sản phẩm có màu nâu đỏ. Với acetonitril, sau khoảng 30 phút thu được sản phẩm là tủa dạng bột mịn, màu trắng, nhưng khi để trong môi trường phòng thí nghiệm thì tủa lại tan. Trong khi đó, khi sử dụng cloroform làm môi trường, sau khoảng 20 phút thu được sản phẩm là tủa dạng hình kim, màu trắng, hiệu suất điều chế và tinh chế cao hơn khi sử dụng các dung môi khác (87,64 %).

Tạp E ở dạng muối hydroclorid là chất kém tan trong các dung môi hữu cơ nên nghiên cứu sử dụng aceton để rửa tủa điều chế được.

Sản phẩm sau khi tinh chế có độ tinh khiết cao ($\geq 98\%$) đủ điều kiện để đưa vào thiết lập chất đối chiếu. Như vậy, nghiên cứu đã xây dựng được quy trình điều chế đơn giản tạp E của carvedilol, để thực hiện tại các phòng thí nghiệm.

Về xác định cấu trúc, các thông tin trên phổ UV-Vis, hồng ngoại (IR), khối phổ (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) của sản phẩm tổng hợp đều phù hợp với công thức cấu tạo của tạp E. Trên phổ IR, kết quả cho thấy phổ IR của tạp E có các đỉnh đặc trưng phù hợp với công thức cấu tạo của tạp E và phù hợp với phổ IR của tạp E theo chứng nhận phân tích (CoA) của LGC⁷³. Trên phổ MS, phổ khối HR-MS(+) của tạp E có $m/z = 168,1153$ $[MH]^+$ phù hợp với $[MH]^+$ dự kiến là 168,1025. M phù hợp với khối lượng phân tử của tạp E ($C_9H_{13}NO_2.HCl.H_2O$, $M = 221,68$). Trên phổ NMR, kết quả cho thấy phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz), phổ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz), phổ HSQC và phổ HMBC cho các tín hiệu phù hợp công thức cấu tạo tạp E. Đặc biệt tín hiệu 8,36 (s, br, 3H) chứng tỏ có tạo muối ở nhóm chức NH_2 ($R-NH_3^+$).

Kết quả định tính ion clorid cho phản ứng tạo tủa trắng với $AgNO_3$ chứng tỏ muối tạo thành là muối hydroclorid. Kết quả nghiên cứu phân tích nhiệt trọng lượng (TGA) cho thấy ở nhiệt độ 30,90 – 76,41 °C (điểm giữa là 63,53 °C), mẫu giảm khối lượng với phần trăm được xác định là 3,7522 %. Điều này chứng tỏ trong phân tử có nước kết tinh, có thể mất đi một phần ở nhiệt độ thấp⁷⁴.

Từ các kết quả trên cho phép khẳng định cấu trúc chất điều chế được là tạp E của carvedilol.

4.2. QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT CÁC TẠP TỔNG HỢP BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Nghiên cứu tham khảo quy trình kiểm nghiệm tạp chất liên quan của carvedilol trong nguyên liệu theo dược điển Mỹ 2023 và theo phương pháp chuẩn hóa điện tích để xác định độ tinh khiết các tạp sau tinh chế. Tuy nhiên, để đảm bảo tất cả các thành phần có trong mẫu thử phải được rửa giải và đọc được tín hiệu trên sắc ký đồ, nghiên cứu có sự thay đổi về thành phần pha động, dung môi pha mẫu và bước sóng phát

hiện. Cụ thể, nghiên cứu sử dụng hỗn hợp dung môi nước - ACN (1:1, tt:tt) làm dung môi pha mẫu để dễ dàng hòa tan các tạp; sử dụng hệ dung môi rửa giải gradient thay đổi từ phân cực sang kém phân cực hơn và ngược lại; bước sóng phát hiện sử dụng chế độ Max plot trên toàn thang sóng 190 – 800 nm để phát hiện được tất cả các chất được rửa giải có hấp thụ UV-Vis.

Nghiên cứu đã tiến hành khảo sát trên các hệ pha động khác nhau: H₂O – MeOH; H₂O – ACN; dung dịch acid formic – MeOH; dung dịch acid formic – ACN sử dụng chế độ chạy gradient thay đổi độ phân cực của dung môi pha động từ phân cực sang kém phân cực và ngược lại để đảm bảo tất cả các chất nếu có đều sẽ được rửa giải trên sắc ký đồ. Kết quả cho thấy khi sử dụng hệ pha động dung dịch acid formic 0,05% – ACN (chạy từ 100% dung dịch acid formic 0,5% → 100% ACN) với tạp A và tạp B thì cho đường nền ổn định và hệ số kéo đuôi là tối ưu nhất. Trong khi đó, việc thay đổi gradient với nhiều hệ dung môi khi đánh giá tạp C, tạp D và tạp E cho kết quả không khả quan, do đó, nghiên cứu giữ thành phần dung môi rửa giải như quy trình định lượng tạp trong nguyên liệu carvedilol, chỉ điều chỉnh tỷ lệ các thành phần ACN và dung dịch đệm phosphat pH 2,0. Với tạp E, khi áp dụng theo quy trình USP, sắc ký đồ thu được cho thấy pic của tạp E có thời gian lưu ngắn (1,628 phút), hệ số kéo đuôi lớn ($T_f = 3,072$) và không phân tách hoàn toàn với pic của tạp khác ($R_s = 1,097$). Do đó, nghiên cứu đã khảo sát một số hệ dung môi gồm ACN - dung dịch đệm phosphat pH 2,0; ACN – dung dịch acid phosphoric 0,1%; ACN – dung dịch TFA pH 2,3. Dựa vào đặc điểm tạp E là chất rất phân cực nên vấn đề gặp phải khi áp dụng USP là tạp E bị rửa giải sớm, do đó nghiên cứu đã bổ sung thêm chất tạo cặp ion để kéo dài thời gian rửa giải của tạp E từ đó có thể tăng khả năng phân tách của pic tạp E. Kết quả cho thấy khi sử dụng hệ pha động ACN - H₂O (TFA pH 2,3 + 2,5 mM acid-1-heptansulfonic) thì pic sắc ký thu được sắc nhọn, cân đối, hệ số kéo đuôi thấp.

Theo quy định của Dược điển Việt Nam V, các thay đổi về dung môi pha động, dung môi pha mẫu, bước sóng phát hiện là các thay đổi lớn, cần thẩm định lại phương pháp phân tích¹⁹. Các quy trình xác định độ tinh khiết tạp đều được thẩm định theo hướng dẫn của ICH⁶⁸. Kết quả cho thấy các quy trình xác định độ tinh khiết bằng HPLC đạt tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, độ chính xác và có khoảng tuyến tính rộng. Quy trình sử dụng cột C8 (150 x 4,6 mm; 5 µm) rất phổ biến ở các phòng thí nghiệm ở Việt Nam.

Áp dụng quy trình đã thẩm định giúp xác định độ tinh khiết các tạp sau tinh chế đều hơn 99 % tính trên chế phẩm nguyên trạng. Các kết quả này cho thấy sản phẩm thu được đủ điều kiện để đưa vào thiết lập chất đối chiếu.

4.3. THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU

Việc kiểm soát các tạp chất liên quan trong nguyên liệu và đặc biệt là trong thành phẩm tương ứng chưa được quan tâm nhiều tại Việt Nam vì nhiều lý do như một số tạp chất chuẩn vẫn chưa có hoặc nếu có thường rất đắt tiền và phải mua từ nước ngoài. Tuy nhiên, phần lớn các chuyên luận trong dược điển nước ngoài (USP, EP, BP) cũng như dược điển Việt Nam V đều bắt buộc phải kiểm soát tạp chất liên quan. Gần đây, 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. Hiện nay hệ thống kiểm nghiệm thuốc quốc gia chưa cung cấp các tạp chuẩn của carvedilol nên gây khó khăn cho công tác kiểm nghiệm tạp chất này tại các xí nghiệp dược trong nước có sản xuất thành phẩm carvedilol. Việc đặt mua tạp chuẩn này từ nước ngoài phải mất 1 – 2 tháng với giá thành rất cao (15 mg tạp của carvedilol chuẩn USP có giá tiền khoảng hơn 30 triệu đồng). Trong khi đó, giá thành dự kiến nếu các tạp chất đối chiếu trong đề tài này khi thương mại hóa chỉ khoảng 500.000 đồng / lọ 10 mg. Sự chênh lệch này sẽ giúp các doanh nghiệp dược giảm thiểu chi phí sản xuất và tăng tính cạnh tranh trên thị trường. Điều này không chỉ cải thiện lợi nhuận cho doanh nghiệp mà còn giúp giảm giá thành thuốc cho người tiêu dùng, đặc

biệt là các loại thuốc chứa carvedilol, một dược chất được sử dụng rộng rãi trong điều trị bệnh tim mạch.

Kết quả đánh giá và thiết lập chất đối chiếu các tạp A, B, C, D, E carvedilol cho thấy hàm lượng được xác định lần lượt là 99,34; 99,68; 99,56; 99,95; 99,77% tính theo nguyên trạng. Như vậy, các chất này đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia. Hàm lượng cao trên 99% đối với tất cả các tạp chất là một yếu tố quan trọng, v đảm bảo độ tinh khiết và tính ổn định của các chất này trong quá trình sử dụng làm đối chiếu. Điều này cũng cho thấy quy trình tinh chế các tạp bằng sắc ký cột (các tạp A, B, C, D) và kết tinh lại (tạp E) khá hiệu quả.

Như vậy, với việc thiết lập các tạp chất đối chiếu đạt chuẩn quốc gia sẽ giúp tạo nên sự chủ động trong công tác kiểm nghiệm, giảm phụ thuộc vào các yếu tố bên ngoài. Thời gian chờ đợi lâu khi nhập khẩu tạp chuẩn có thể gây ra những khó khăn trong quá trình sản xuất và kiểm nghiệm, dẫn đến sự trì hoãn hoặc gián đoạn sản xuất. Khi có nguồn cung cấp nội địa, các doanh nghiệp dược trong nước có thể kiểm soát chặt chẽ hơn về thời gian và nguồn cung, từ đó tăng cường tính liên tục và ổn định trong quy trình sản xuất. Điều này góp phần phát triển năng lực tự chủ và cạnh tranh quốc tế của ngành dược trong nước.

4.4. XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CÁC TẠP TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM CARVEDILOL BẰNG SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Quy trình đã xây dựng cho phép định lượng đồng thời carvedilol và một số tạp trong chế phẩm thuốc chứa carvedilol đang lưu hành trên thị trường. Bằng việc sử dụng chung một quy trình phân tích để định lượng đồng thời carvedilol và các tạp như vậy đã giúp tiết kiệm được rất nhiều thời gian, công sức, dung môi hóa chất và chi phí.

4.4.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

Áp dụng điều kiện sắc ký các quy trình kiểm nghiệm tạp chất liên quan của carvedilol trong nguyên liệu và thành phẩm theo Dược điển Mỹ 2023, kết quả cho thấy quy trình chưa thực sự tối ưu với những nhược điểm: thời gian phân tích dài (hơn 30 phút); đường nền không ổn định; các pic không cân đối và pic tạp A, E chưa tách khỏi nhau; không định lượng đồng thời carvedilol và các tạp mà phải thay đổi thể tích tiêm. Trong khi đó, dược điển Anh 2023 chỉ đưa ra quy trình định lượng 3 tạp A, C và một tạp là đồng phân của tạp B trong chế phẩm carvedilol với nhược điểm là tổng thời gian phân tích dài (hơn 60 phút), do đó, nghiên cứu đã tiếp tục khảo sát các điều kiện sắc ký khác để cho kết quả phân tích tối ưu.

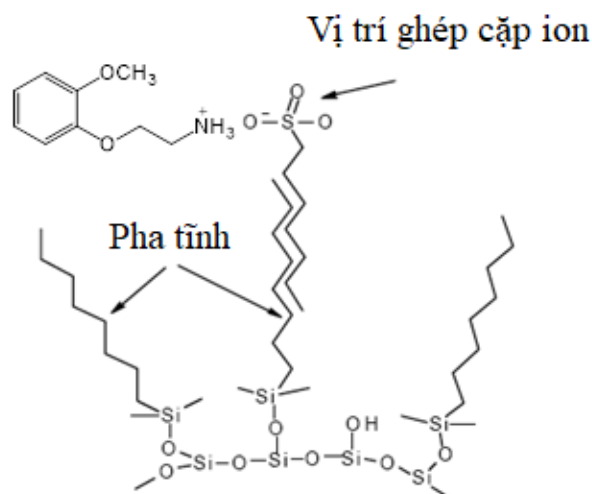
Nghiên cứu đã khảo sát các yếu tố về điều kiện pha động bao gồm tốc độ dòng, thành phần và tỷ lệ pha động để tối ưu hóa quy trình. Sự phân tách dựa trên nguyên tắc của sắc ký pha đảo, pha tĩnh không phân cực và dung môi pha động phân cực.

Thành phần pha động cố định là acetonitril. ACN mặc dù có giá thành cao hơn so với methanol nhưng có độ nhớt thấp hơn và phù hợp ACN cho việc phân tách carvedilol ra khỏi tạp tốt hơn¹⁴. Nghiên cứu tiếp tục khảo sát thành phần pha động còn lại gồm có đệm TFA và đệm phosphat. Xét độ tinh khiết pic giữa hai hệ đệm trên cho thấy đệm TFA mặc dù cho tỷ lệ tách carvedilol ra khỏi các tạp tốt, các thông số sắc ký đều đạt theo yêu cầu của ICH tuy nhiên độ tinh khiết của các pic đều rất thấp. Do đó, nghiên cứu lựa chọn đệm phosphat và tiếp tục khảo sát các tỷ lệ khác nhau của hệ dung môi ACN – đệm phosphat.

Sự thay đổi pH pha động cũng sẽ ảnh hưởng lớn đến các thông số của quá trình sắc ký. Carvedilol có pKa là 7,97, thấp hơn so với các thuốc chẹn beta khác (pKa thường khoảng 9,5), nguyên nhân chủ yếu là do hiệu ứng cảm ứng của nguyên tử oxy ở vị trí beta làm giảm hoạt tính của nhóm amino. Do đó, độ pH thấp là cần thiết để bảo toàn được nguyên tử hydro trong cấu trúc indol của carvedilol^{14,39}. Nghiên cứu khảo sát cho thấy pH từ 2 đến 2,5 cho kết quả phân tách tối ưu. Điều này

cũng đúng với nghiên cứu của Aimee N. Heyrman và Richard A. Henry về tầm quan trọng của việc kiểm soát pH pha động trong HPLC, nghiên cứu cho rằng khi sử dụng đệm phosphat thì việc duy trì pH pha động ở 2-3 là tối ưu. Nếu muốn tăng pH của hệ đệm lên 4-5 thì việc sử dụng một acid hữu cơ như acetat hoặc citrat thay cho phosphat là được khuyến cáo ⁸⁰. Thực tế sau khi khảo sát cho thấy, ở pH 2 píc carvedilol cho hệ số kéo đuôi tốt nhất. Ngoài ra, ở pH này, hiệu năng cột sắc ký cũng không bị ảnh hưởng do khả năng thích hợp của pH từ 1-13 của cột Zorbax Eclipse XDB-C8 (150 x 4,6 mm; 5 μ m). Do đó, ta lựa chọn sử dụng đệm phosphat pH 2.

Tiếp tục khảo sát các tỷ lệ thích hợp của hệ pha động ACN – đệm phosphat pH 2, kết quả thu cho thấy khả năng tách của tạp A và tạp E thấp, do đó, nghiên cứu đã bổ sung thêm chất tạo cặp ion, cụ thể là acid 1-heptansulfonic nhằm mục đích tăng khả năng phân giải píc của tạp E. Kết quả là khả năng tách của tạp A và tạp E tăng lên đáng kể. Tiến hành khảo sát các nồng độ acid 1-heptansulfonic thêm vào ở 1,5 mM, 2 mM và 2,5 mM nhận thấy khi nồng độ acid 1-heptansulfonic tăng lên thì khả năng tách của tạp A và E càng giảm. Điều này được giải thích là do tạp E có bản chất là một base phân cực, khi thêm acid 1-heptanesulfonic vào hệ dung môi thì acid này sẽ ghép cặp ion với tạp E làm giảm độ phân cực của tạp E, tăng lực tương tác với pha tĩnh, từ đó kéo dài thời gian lưu của tạp E, cuối cùng là làm giảm khả năng phân giải của tạp A và E.



Hình 4.1. Cơ chế sắc ký pha đảo ghép cặp ion của tạp E với acid 1-heptansulfonic

Như vậy, hệ pha động tối ưu cho quá trình sắc ký được lựa chọn là hệ ACN – đệm phosphat pH 2 + acid 1-heptansulfonic 1,5 mM (43:57).

Khảo sát tốc độ dòng từ 0,5 – 1,0 ml/phút nhận thấy ở 0,5 ml/phút, tổng thời gian phân tích bị kéo dài, tốc độ nhỏ làm doãng pic gây ra hiệu ứng kéo đuôi. Ở tốc độ dòng 0,7 ml/phút và 1 ml/phút, nhận thấy các pic tách nhau ổn, hệ số kéo đuôi tốt. Tuy nhiên, để tiết kiệm dung môi và đảm bảo không làm tăng áp suất quá cao của cột, nghiên cứu đã lựa chọn tốc độ dòng 0,7 ml/phút để tiến hành định lượng. Thời gian phân tích mẫu là 15 phút, tối ưu hơn so với nghiên cứu của T. V. Raghava Raju và cộng sự (2015) với tổng thời gian phân tích là 50 phút⁴⁰, điều này sẽ giúp tiết kiệm được thời gian phân tích, tránh hao tổn quá nhiều dung môi ACN.

Một khó khăn trong công tác kiểm nghiệm tạp chất liên quan là giới hạn cho phép của tạp thường rất nhỏ so với dược chất nên để phát hiện được tạp chất liên quan thường phải chuẩn bị mẫu chứa dược chất với nồng độ rất cao (thường từ 1000 µg/ml trở lên). Tuy nhiên, nếu nồng độ chất phân tích quá cao sẽ làm cột phân tích bị quá tải, dẫn đến hiệu năng cột giảm nhanh chóng chỉ sau vài lần sắc ký. Ưu điểm của quy

trình đã nghiên cứu là chỉ sử dụng mẫu kiểm nghiệm với nồng độ carvedilol là 500 µg/ml, ở nồng độ này vẫn đảm bảo đáp ứng các tiêu chí của quá trình thẩm định.

4.4.2. Thẩm định quy trình định lượng bằng HPLC

Phương pháp HPLC đã xây dựng có tính phù hợp hệ thống dựa trên 5 tiêu chí: thời gian lưu (t_R), diện tích pic (S), số đĩa lý thuyết (N), hệ số kéo đuôi (T_f) và độ phân giải (R_s). Kết quả thẩm định cho thấy ở carvedilol và 5 tạp, thông số thời gian lưu và diện tích pic đều có RSD% nhỏ hơn 2%; số đĩa lý thuyết $N > 1000$; hệ số kéo đuôi T_f nằm trong khoảng 0,8 – 1,5 và $R_s > 1,5$. Như vậy, hệ thống sắc ký thích hợp để định lượng carvedilol và các tạp, đảm bảo độ tin cậy của phương pháp.

Khoảng nồng độ tuyến tính được xây dựng khá rộng: 0,01–1500 µg/ml đối với carvedilol và 0,1 – 3 µg/ml đối với các tạp (riêng tạp A là 0,04–3 µg/ml). Phương trình hồi quy có tính tương thích với hệ số tương quan hồi quy giữa nồng độ và diện tích pic $R^2 > 0,995$ trong khoảng nồng độ đã xây dựng.

Tính đặc hiệu cao thể hiện qua sự tương quan về thời gian lưu của carvedilol và các tạp, đồng nhất về phổ UV giữa mẫu chuẩn và mẫu thử. Độ tinh khiết của các pic khi kiểm tra bằng công cụ Purity pic trên phần mềm đi kèm cho giá trị Purity Index đạt 0,99 – 1,00.

Độ đúng của phương pháp thể hiện qua tỷ lệ thu hồi. Phương pháp có tỷ lệ thu hồi cao 99,92 – 100,38 %. Độ chính xác của phương pháp được thể hiện qua RSD% nằm trong giới hạn cho phép theo hướng dẫn của ICH và Luwig Huber.

LOD và LOQ của các tạp A, B, C, D, E trong khoảng 0,003 – 0,033 µg/ml và 0,01 – 0,1 µg/ml, tối ưu hơn so với nghiên cứu của L. Samba Siva Rao và cộng sự (2015) với kết quả LOD và LOQ trung bình các tạp tương ứng là 1,5 và 4,6 µg/ml ¹².

Như vậy, phương pháp xây dựng đạt độ tin cậy cao nên có thể ứng dụng vào kiểm soát chất lượng các chế phẩm thuốc chứa carvedilol.

4.4.3. Ứng dụng quy trình HPLC để định lượng mẫu

Áp dụng quy trình đã nghiên cứu để tiến hành định lượng carvedilol và các tạp A, B, C, D, E trên 6 mẫu chế phẩm thuốc chứa carvedilol hiện đang lưu hành trên thị trường và 3 mẫu nguyên liệu. Kết quả cho thấy hàm lượng carvedilol nằm trong khoảng 99,46 – 100,99 % so với hàm lượng ghi trên nhãn, đạt yêu cầu về hàm lượng của carvedilol trong chế phẩm theo USP 2023 ¹³. Trong 6 mẫu thuốc có 5 mẫu phát hiện được tạp A, trong đó có 2 mẫu hàm lượng tạp A nằm dưới giới hạn định lượng, còn 3 mẫu còn lại thu được hàm lượng tạp A đạt yêu cầu theo giới hạn cho phép của tạp trong chế phẩm carvedilol theo USP 2023 là 0,2% ¹³. Các tạp B, C, D, E ở cả 6 mẫu thuốc đều nằm dưới giới hạn phát hiện. Trong 03 mẫu nguyên liệu đều phát hiện tạp A và trong giới hạn cho phép theo USP 2023 ¹³, trong đó có 01 mẫu có hàm lượng dưới giới hạn định lượng của phương pháp.

HPLC kết nối với detector PDA là phương pháp định lượng thường quy trong các dược điển và đa số các phòng thí nghiệm đều có máy HPLC, nên việc xây dựng quy trình định lượng carvedilol và các tạp trong chế phẩm thuốc sẽ có giá trị thực tiễn, có thể áp dụng rộng rãi trong các đơn vị kiểm soát chất lượng.

4.5. XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CÁC TẠP TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM CARVEDILOL BẰNG ĐIỆN DI MAO QUẢN

Theo tổng quan tài liệu, hiện chưa có nghiên cứu nào trên thế giới công bố quy trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp A, B, C, D, E bằng phương pháp điện di mao quản. Do đó nghiên cứu đã xây dựng quy trình định lượng bằng điện di mao quản, với mong muốn đóng góp một phương pháp mới trong kiểm soát chất lượng các nguyên liệu và thành phẩm carvedilol.

4.5.1. Khảo sát điều kiện điện di

Về khảo sát các loại đệm, giá trị pH là yếu tố quan trọng trong phương pháp điện di vì nó ảnh hưởng đến tốc độ của dòng EOF và ảnh hưởng đến khả năng ion

hóa của các chất phân tích ⁸¹. Kết quả điện di ở các pH cho thấy: khi pH tăng, nhìn chung các chất phân tích được rửa giải nhanh hơn. Khi pH tăng làm tăng tỷ lệ các nhóm –OH trên thành cột mao quản silica chuyển thành –O⁻ gây tăng lớp điện âm bề mặt thành mao quản dẫn đến tăng thế Zeta, tăng tốc độ dòng EOF. Trong khi đó, tốc độ và hướng di chuyển của chất phân tích ($\overrightarrow{v_{tot}}$) ảnh hưởng bởi tốc độ dòng điện thẩm ($\overrightarrow{v_{eof}}$) và tốc độ điện di của chất phân tích ($\overrightarrow{v_{ep}}$) theo công thức $\overrightarrow{v_{tot}} = \overrightarrow{v_{eof}} + \overrightarrow{v_{ep}}$. Do đó khi tăng tốc độ dòng EOF, tốc độ của chất phân tích sẽ tăng lên.

Bên cạnh đó các chất phân tích đều là những phân tử có tính base yếu với các N còn mang đôi điện tử tự do. pH ảnh hưởng đến khả năng ion hóa qua phương trình Henderson-Hasselbach đối với các base yếu:

$$pH = pK_a + \log \frac{[B]}{[BH^+]} \quad 82$$

Thứ tự rửa giải từ nhanh đến chậm là: Tạp E, tạp A, carvedilol, tạp C, tạp B, tạp D. Điều này có thể giải thích qua điện tích và kích thước phân tử của chất phân tích. Trong các chất trên, tạp E chứa nhóm –NH₂ có pK_a = 8,55 ⁸³ nên mang điện dương ở pH ≤ 8, còn ở pH = 9 thì píc tạp E trùng píc EOF do ở dạng trung hòa. Với các chất còn lại, nguyên tử N trong vòng carbazol có pK_a = - 6 ⁸⁴, ở mọi pH mang thì N này đều không mang điện, do đó tạp D không mang điện, sẽ ra sau cùng trùng với píc của dòng điện thẩm EOF. Trong khi đó, nguyên tử N ở các mạch nhánh của các chất còn lại có tính base mạnh hay yếu tùy thuộc vào bậc amin và hiệu ứng không gian. Từ kết quả điện di ở các pH cho thấy ở pH ≥ 7, các chất này bị rửa giải cùng lúc và trùng píc EOF nên các chất sẽ không mang điện trong vùng pH này. Ở pH < 7 thì các píc tạp E, tạp A, carvedilol, tạp B, tạp C rửa giải trước píc EOF tức là mang điện dương, vì vậy có thể dự đoán pK_a của N trong mạch nhánh có pK_a > 7. Ở pH acid, các chất phân tích sẽ mang điện ở các N ở mạch nhánh: tạp E (+), tạp A(++), carvedilol (+), tạp C (+), tạp B (+), tạp D (trung hòa điện). Tạp A dù mang (++) nhưng

kích thước lớn hơn nhiều so với tạp E nên sẽ ra sau tạp E; các tạp B, tạp C và carvedilol đều mang (+) nhưng bán kính (r) $r_E < r_{\text{carvedilol}} < r_C < r_B$.

Trong các pH acid, ở pH 5 với thành phần đệm acetat có hiệu quả tốt hơn các đệm pH khác. Các ion của thành phần hệ đệm cũng tương tác đáng kể đến chất phân tích gây ảnh hưởng đáng kể đến khả năng tách.

Dung môi hữu cơ thêm vào ảnh hưởng đến độ nhớt và hằng số điện môi của BGE⁸⁵. Độ nhớt η_{MeOH} (0,54 mPa.s) $> \eta_{\text{ACN}}$ (0,37 mPa.s) và hằng số điện môi ϵ_{MeOH} (32,7) $< \epsilon_{\text{ACN}}$ (35,9)^{86,87}. Do đó, khi thêm MeOH sẽ làm giảm tốc độ dòng điện thẩm hơn, dẫn đến tăng thời gian lưu các chất phân tích hơn so với thêm ACN. Kết quả cho thấy khi thêm MeOH 50% thì thời gian lưu các chất lớn hơn so với thêm ACN 50%.

Các dung môi hữu cơ như MeOH hay ACN được cho thêm vào BGE ở một tỷ lệ phù hợp sẽ làm tăng độ tan của chất phân tích và độ tan các chất phụ gia thêm vào, làm giảm khả năng tạo bọt của SDS dẫn đến tăng độ ổn định của BGE, làm tăng độ ổn định điện thế và dòng điện⁸⁵. Kết quả khảo sát việc thêm dung môi hữu cơ cho thấy giảm nhiễu nền hơn so với khi không thêm, các pic sắc nhọn hơn tuy nhiên tạp D vẫn còn chưa tách khỏi pic của dòng EOF.

Việc thêm chất diện hoạt vào BGE nhằm mục đích tách pic D khỏi dòng EOF. Nghiên cứu đã khảo sát một số loại chất diện hoạt gồm chất diện hoạt tạo micell dương CTAB, chất diện hoạt tạo micell không mang điện Tween 20 và chất diện hoạt tạo micell âm SDS, HEPT. Kết quả cho thấy với CTAB, Tween 20 và HEPT ở các nồng độ khác nhau, tạp D vẫn không tách khỏi pic EOF. Với SDS 7 mM thì tạp D tách được khỏi pic EOF. Như vậy, các tạp được tách theo kỹ thuật sắc ký micell điện động: trong môi trường đệm phân cực, các chất diện hoạt tự ngưng kết và hình thành micell gồm nhóm có đầu thân nước tạo nên một lớp vỏ ngoài mang điện và nhóm có đuôi không thân nước tạo nhân không phân cực ở bên trong micell để cho các chất phân tích có thể phân bố vào. Sự phân bố khác nhau của các phân tử trung hòa vào pha động - pha “tĩnh giả” micell và lực tương tác tĩnh điện của các chất phân tích

mang điện với vỏ micell thì chất phân tích sẽ bị thay đổi tốc độ do ảnh hưởng tốc độ di chuyển của micell là cơ sở cho quá trình tách ^{81,88}.

Khi nồng độ đệm tăng lên, lớp điện kép trở nên mỏng hơn, làm giảm thế Zeta và tốc độ dòng EOF. Do đó, chất phân tích sẽ được rửa giải chậm hơn và thời gian lưu sẽ tăng lên. Tuy nhiên, độ phân giải giữa các pic có thể tăng lên ⁸¹. Với các nồng độ đệm acetat là 100 mM và 120 mM, pic tạp D sẽ được tách ra khỏi pic EOF với độ phân giải đạt khoảng 1,8. Nồng độ tối ưu chọn được là 100 mM vì cho thời gian lưu không quá dài và hình dạng pic vẫn tốt. Nồng độ dung dịch đệm cao có thể giúp giảm sự khuếch tán của chất phân tích và làm cho pic sắc hơn, nhưng quá nhiều sẽ dẫn đến quá tải cột, làm cho pic bị chệch và biến dạng, như trong trường hợp nồng độ đệm 140 mM.

Để nâng cao khả năng phân tích giữa các pic tạp D và EOF, nghiên cứu đã tiến hành giảm điện thế. Việc giảm điện thế có thể làm giảm tốc độ di chuyển của các chất phân tích, dẫn đến khả năng tăng độ phân giải của các pic ⁸¹. Tuy vậy, kết quả cho thấy rằng việc giảm điện thế kéo dài thời gian phân tích, nhưng lại không có hiệu quả rõ rệt trên độ phân giải giữa các pic D và EOF. Ngoài ra, các pic càng về sau càng có xu hướng bị doãng rộng. Do đó điện thế tối ưu được chọn là 20 kV

Việc tăng chiều dài của cột phân tích sẽ dẫn đến giảm tốc độ di chuyển và kéo dài thời gian lưu, giúp tăng độ phân giải của các pic ⁸¹. Tuy nhiên, kết quả thực nghiệm cho thấy việc tăng chiều dài cột làm tăng thời gian rửa giải các pic theo kiểu tịnh tiến và đồng thời các pic càng ra sau càng doãng rộng, không đem lại sự cải thiện đáng kể cho độ phân giải giữa pic D và pic EOF.

4.5.2. Thẩm định quy trình định lượng bằng CE

Phương pháp CE đã xây dựng có tính phù hợp hệ thống dựa trên 5 tiêu chí: thời gian điện di (t_R), diện tích pic (S), số đĩa lý thuyết (N), hệ số kéo đuôi (T_f) và độ phân giải (R_s).

Khoảng nồng độ tuyến tính được xây dựng khá rộng: 1000–6000 µg/ml đối với carvedilol và 2 – 8 µg/ml đối với các tạp. So với phương pháp HPLC, khoảng nồng độ này cao hơn, đồng thời các giá trị LOD và LOQ cũng cao gấp 3 – 15 lần so với HPLC. Điều này có thể giải thích là do lượng mẫu tiêm vào hệ thống trong phương pháp CE khá nhỏ so với HPLC, bên cạnh đó bề dày lớp chất lỏng hấp thụ quang trong phương pháp CE nhỏ hơn nhiều so với HPLC, dẫn đến cường độ tín hiệu bé, làm giảm độ nhạy của phương pháp.

Tính đặc hiệu cao thể hiện qua sự tương quan về thời gian điện di của carvedilol và các tạp, đồng nhất về phổ UV và độ tinh khiết pic. Độ đúng của phương pháp thể hiện qua tỷ lệ thu hồi. Phương pháp có tỷ lệ thu hồi cao 96,90 – 100,34 %. Độ chính xác của phương pháp được thể hiện qua RSD% nằm trong giới hạn cho phép theo hướng dẫn của ICH và Luwig Huber.

Như vậy, phương pháp xây dựng đạt độ tin cậy cao nên có thể ứng dụng vào kiểm soát chất lượng các chế phẩm thuốc chứa carvedilol.

4.5.3. Ứng dụng quy trình CE để định lượng mẫu

Áp dụng quy trình đã nghiên cứu để tiến hành định lượng carvedilol và các tạp A, B, C, D, E trên 6 mẫu chế phẩm thuốc chứa carvedilol hiện đang lưu hành trên thị trường và 3 mẫu nguyên liệu. Kết quả cho thấy có 01 mẫu thành phẩm và 01 mẫu nguyên liệu phát hiện được tạp A với hàm lượng đều nằm trong giới hạn cho phép theo USP 2023 ¹³. Tạp A có thể gây kích ứng da, kích ứng mắt khi tiếp xúc, có thể gây tổn thương đường tiêu hóa nếu nuốt phải và nhóm GHS 09 rất độc với thủy sinh ²⁴. Các tạp B, C, D, E ở cả 9 mẫu đều nằm dưới giới hạn phát hiện.

Một trong những khó khăn khi phân tích mẫu thử là việc chuẩn bị mẫu để phân tích đồng thời hoạt chất chính và các tạp chất liên quan. Giới hạn cho phép thường rất nhỏ so với hoạt chất nên để phát hiện tạp chất cần chuẩn bị mẫu thử có nồng độ được chất rất cao, khiến pic hoạt chất thường rất lớn trên điện di đồ. Trong khi đó, tải lượng của cột điện di mao quan không lớn như cột sắc ký lỏng, nếu nồng độ chất phân

tích quá cao sẽ làm cột phân tích bị quá tải, dẫn đến làm giảm tuổi thọ của cột, đồng thời làm giảm độ chính xác và độ lặp lại của phân tích. Bên cạnh đó các pic quá lớn có thể làm giảm độ phân giải do nguy cơ chồng lấn pic.

* So sánh 2 quy trình định lượng đồng thời các tạp carvedilol bằng HPLC và CE:

So với quy trình HPLC đã xây dựng để định lượng đồng thời carvedilol và các tạp, quy trình CE này có một số ưu điểm riêng. Tốc độ phân tích mẫu bằng CE nhanh hơn, chỉ 10 phút so với 15 phút của trong quy trình HPLC đã xây dựng, và 30 phút trong quy trình của USP 2023. Bên cạnh đó, quy trình định lượng bằng CE giúp tiết kiệm mẫu phân tích, tiết kiệm dung môi, qua đó giảm thiểu nguy cơ gây ô nhiễm môi trường.

Tuy nhiên, phương pháp CE cũng có những nhược điểm so với HPLC, đặc biệt là độ nhạy trong phương pháp CE không tốt bằng phương pháp HPLC. Điều này được thể hiện qua giá trị LOQ của hai phương pháp được xây dựng ở trên chênh lệch nhau tới 3 - 50 lần. Do đó khi phân tích mẫu nguyên liệu và chế phẩm carvedilol theo các phương pháp đã xây dựng, trên cùng một đối tượng mẫu nhưng quy trình CE không phát hiện được, trong khi quy trình HPLC có thể phát hiện hoặc định lượng được hàm lượng tạp A. Nhược điểm này liên quan đến khả năng chứa mẫu của cột điện di. Trong CE, cột điện di có đường kính trong khoảng từ 25 μm đến 100 μm , trong nghiên cứu này là 75 μm . Do đó, lượng mẫu tiêm vào cột điện di cần phải nhỏ, thường trong khoảng từ vài nL đến vài μL . So với HPLC, cột của CE có thể chứa ít mẫu hơn. Do đó, nếu tiêm vào CE mẫu có nồng độ cao có thể dẫn đến hiện tượng quá tải hoặc tạo áp lực trong cột điện di, có thể xảy ra hiện tượng chồng chất, ảnh hưởng đến sự phân tách và độ chính xác của phân tích. Bên cạnh đó, HPLC sử dụng tế bào đo dòng chảy, có độ dày truyền quang lớn hơn nhiều so với CE chỉ sử dụng chính mao quản làm cuvet. Do đó cường độ hấp thụ trong CE không cao như HPLC theo định luật Lambert Beer. Vì vậy, như đã đề cập ở trước, khi sử dụng CE để phân tích tạp chất liên quan, cần phải cân nhắc về nồng độ mẫu và đảm bảo rằng lượng mẫu

tiêm vào cột điện di nằm trong khoảng chấp nhận được để tránh các vấn đề liên quan đến quá tải và sự cạnh tranh trong cột.

Như vậy, xây dựng quy trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm bằng điện di mao quản sẽ có giá trị thực tiễn, đóng góp thêm phương pháp định lượng tạp chất trong kiểm soát chất lượng thuốc.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Luận án đã đạt được các mục tiêu đề ra, cụ thể như sau:

Về quy trình tổng hợp tạp chất

Đã tổng hợp và xác định các điều kiện tổng hợp cho hiệu suất cao đối với các tạp A, B, C, D, E của carvedilol, đồng thời xác định cấu trúc của sản phẩm bằng phương pháp phổ nghiệm (IR, MS và NMR). Độ tinh khiết được xác định bằng phương pháp HPLC, các sản phẩm có độ tinh khiết cao có thể dùng làm chất đối chiếu trong kiểm nghiệm:

- Tạp A carvedilol với độ tinh khiết 99,14 %, hiệu suất toàn qui trình 62,02 %.
- Tạp B carvedilol với độ tinh khiết 99,26 %, hiệu suất toàn qui trình 70,80 %.
- Tạp C carvedilol với độ tinh khiết 99,92 %, hiệu suất toàn qui trình 78,50 %.
- Tạp D carvedilol với độ tinh khiết 99,86 %, hiệu suất toàn qui trình 80,30 %.
- Tạp E carvedilol với độ tinh khiết 99,96 %, hiệu suất toàn qui trình 87,64 %.

Trong đó, quy trình tổng hợp tạp B và tạp C từ carvedilol lần đầu tiên được công bố.

Đã xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu qui trình xác định độ tinh khiết của các tạp A, B, C, D và E của carvedilol bằng phương pháp HPLC.

Về đánh giá và thiết lập chất đối chiếu của các tạp tổng hợp được

Đã đánh giá chất lượng các tạp A, B, C, D và E của carvedilol tổng hợp được trên các tiêu chí tính chất cảm quan, điểm chảy, định tính, hàm ẩm và độ tinh khiết. Từ đó, đã thiết lập các chất đối chiếu từ các tạp trên:

- Tạp chất đối chiếu A của carvedilol có giá trị ấn định 99,36 %, độ không đảm bảo đo là 0,007 %.
- Tạp chất đối chiếu B của carvedilol có giá trị ấn định 99,70 %, độ không đảm bảo đo là 0,042 %.
- Tạp chất đối chiếu C của carvedilol có giá trị ấn định 99,60 %, độ không đảm bảo đo là 0,047 %.

- Tạp chất đối chiếu D của carvedilol có giá trị ấn định 99,96 %, độ không đảm bảo đo là $9,5 \times 10^{-15}$ %.

- Tạp chất đối chiếu E của carvedilol có giá trị ấn định 99,77 %, độ không đảm bảo đo là 0,006 %.

Xây dựng quy trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

Đã xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu qui trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp A, B, C, D, E trong nguyên liệu và thành phẩm bằng phương pháp HPLC. So với quy trình của Dược điển Mỹ 43, quy trình này có thời gian phân tích ngắn, cải thiện độ phân giải các pic tạp A và E, định lượng đồng thời carvedilol và các tạp mà phải thay đổi thể tích tiêm.

Xây dựng quy trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm bằng điện di mao quản

Đã xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu qui trình định lượng đồng thời carvedilol và các tạp A, B, C, D, E trong nguyên liệu và thành phẩm bằng phương pháp điện di mao quản. Quy trình định di gồm: Điều kiện điện di: Chiều dài cột hiệu dụng 40 cm; chiều dài cột tổng 48,5 cm; đường kính ngoài: 360 μm ; đường kính trong 75 μm ; dung dịch điện ly nền: đệm acetat 100 mM pH 5 chứa natri dodecyl sulfat 7 mM trong acetonitril : nước (50:50); điện thế 20 kV; dòng điện 150 μA ; nhiệt độ cột 20 °C; tiêm mẫu 35 mBar trong 4 giây; bước sóng phát hiện 220 nm cho tạp E và 242 nm cho các tạp còn lại, dầu dò nằm về phía cathod.

Đây là công bố đầu tiên về định lượng đồng thời các chất trên bằng phương pháp điện di mao quản trong nguyên liệu và thành phẩm chứa carvedilol.

KIẾN NGHỊ

Từ những kết quả thu được, đề tài cần được tiếp tục thực hiện các nội dung sau:

- 1) Tiếp tục nghiên cứu độ ổn định của các tạp chất đối chiếu trên để có thể tính toán chu kỳ đánh giá lại chất chuẩn.
- 2) Ứng dụng quy trình kiểm tra các tạp A, B, C, D, E của carvedilol trên các mẫu nguyên liệu và thành phẩm tương ứng khác đang lưu hành trên thị trường.
- 3) Tiếp tục nghiên cứu tổng hợp các tạp chất liên quan của các dược chất khác để bổ sung vào ngân hàng tạp chất đối chiếu trong nước.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN

- 1) **Nguyễn Hữu Tiến**, Trần Thị Ngọc Uyên, Chương Ngọc Nãi, Trần Việt Hùng, Trần Hữu Dũng, Nguyễn Đức Tuấn, Trương Ngọc Tuyền. Tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạp B của carvedilol. *Tạp chí Y học Thành phố Hồ Chí Minh*. 2019; Số 2-2019 (23): 70-76
- 2) Nguyễn Thị Quỳnh Như, **Nguyễn Hữu Tiến**. Xây dựng quy trình sắc ký pha đảo tạo cặp ion để xác định độ tinh khiết tạp E của carvedilol. *Tạp chí Y dược học*. 2019; Số đặc biệt 11/2019: 144-149.
- 3) **Nguyễn Hữu Tiến**, Huỳnh Thị Mai Trang, Nguyễn Đức Tuấn, Trương Ngọc Tuyền, Trần Hữu Dũng. Thiết lập chất đối chiếu 4 -(oxiran-2-ylmethoxy)-9h-carbazol (tạp D) và 2-(2-methoxyphenoxy)ethylamin (tạp E) của carvedilol. *Tạp chí Y dược học*. 2021; 34 tháng 11/2021: 35-39.
- 4) **Nguyễn Hữu Tiến**, Nguyễn Thảo Trang, Trịnh Hoàng Dương, Chương Ngọc Nãi, Trương Ngọc Tuyền, Trần Hữu Dũng, Nguyễn Đức Tuấn. Xây dựng các quy trình xác định độ tinh khiết sắc ký các tạp B và C của carvedilol. *Tạp chí Y dược học*. 2022; 50 tháng 06/2022: 65-72.
- 5) **Nguyen, T. H.**, Ho, A. N. L., Truong, T. N., Tran, D. H. Simultaneous Determination of Carvedilol and its Impurities in Tablets by High Performance Liquid Chromatography. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2022; 84(6):1498-1505.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cục quản lý Dược. Danh sách các CSSX trong nước đạt tiêu chuẩn nguyên tắc GMP, GMP bao bì dược phẩm (Cập nhật tới ngày 04/7/2023). Accessed 14/07/2023, <https://dav.gov.vn/danh-sach-cac-cssx-trong-nuoc-dat-tieu-chuan-nguyen-tac-gmp-gmp-bao-bi-duoc-pham-cap-nhat-toi-ngay-0472023-n4008.html>
2. Quyết định số 376/QĐ-TTg: Phê duyệt Chương trình phát triển công nghiệp dược, dược liệu sản xuất trong nước đến năm 2030, tầm nhìn đến năm 2045 (Văn phòng chính phủ) (2021).
3. Thông tư 11/2018/TT-BYT quy định về chất lượng thuốc, nguyên liệu làm thuốc ngày 4/5/2018 1-22 (2018).
4. Thông tư 08/2022/TT-BYT quy định về việc đăng ký thuốc, nguyên liệu làm thuốc, ban hành ngày 31/5/2022 1-54 (2022).
5. Prathap B, Dey A, Rao G, Sundarrajan T, Hussain S. A review on impurity profile in pharmaceutical substances. *J Pharmacy Pharmaceutical Sci.* 2013;2(3):2320-1215.
6. Singh A, Afreen S, Singh DP, Kumar R. A review on pharmaceutical impurities and their importance. *World J Pharm Pharm Sci.* 2017;6(10):1337-54.
7. Nath D, Sharma B. Impurity profiling-a significant approach in pharmaceuticals. *Curr Pharm Ana.* 2019;15(7):669-680.
8. Mc Namara K, Alzubaidi H, Jackson JK. Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved? *Integrated pharm res.* 2019;8:1.
9. Roth GA, Forouzanfar MH, Moran AE, et al. Demographic and epidemiologic drivers of global cardiovascular mortality. *New Eng. J. Med.* 2015;372(14):1333-1341.
10. Mendis S, Puska P, Norrving B. *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control.* World Health Organization; 2011.

11. K Suneel Kumar, K Tatendra Reddy, G Omprakash, P K Dubey. Synthesis and characterization of potential impurities in key intermediates of Carvedilol: a β -adrenergic receptor. *J Chem and Pharm Res.* 2011;3(6):33-45.
12. L. Samba Siva Rao, P. Madhavan, Prakash KV. Development and validation of stability indicating method for the quantitative determination of carvedilol and its related impurities in pharmaceutical dosage forms using RP HPLC. *J Chem and Pharm Res.* 2015;7(9):144-154.
13. US Pharmacopeial Convention. *The United States Pharmacopeia 2023: Carvedilol, Carvedilol tablets.* 2023.
14. Stojanović J, Marinković V, Vladimirov S, Veličković D, Sibinović P. Determination of Carvedilol and its Impurities in Pharmaceuticals. *Chromatographia.* 2005// 2005;62(9):539-542. doi:10.1365/s10337-005-0656-y
15. Müller L, Mauthe RJ, Riley CM, et al. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Reg Tox and Pharm.* 2006;44(3):198-211.
16. Srinivasa M Rao, Sumathi V Rao, UK Ray, G Sri Siva Kumar, Hemant Kumar Sharma, K Mukkanti. Quantification of 4-Oxiranyl Methoxy-9h-Carbazole a Genotoxic Impurity in Carvedilol Drug Substances by Lc-MS. *J Bioanal Biomed.* 2010;2:091-095.
17. Council of Europe, European Pharmacopoeia Commission. *European pharmacopoeia 11.0: Carvedilol.* 2023.
18. British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia: Carvedilol, Carvedilol Tablets.* 2023.
19. Bộ Y tế. *Dược điển Việt Nam V.* Nhà xuất bản Y học; 2017.
20. Murray L, Kelly GJME. Physicians' desk reference. 2002:3277.
21. Karaffa LS. *The Merck index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.* RSC Publishing; 2013.
22. Agency PaMD. *The Japanese Pharmacopoeia XVIII.* 18 th ed. 2021.

23. Fritz W, Wolfgang K, Max T, Gisbert S, Egon R, D K, inventors; New carbazolyl (4) oxy-propanolamine derivatives, methods for their manufacture and this drug compounds containing, DE2815926 A1. 1979.
24. LGC Limited. Data from: Safety Data Sheet: Carvedilol Related Compound A. 2013. 276 Abby Road Manchester, NH 03103, USA. Deposited 8.
25. G Madhusudhan, K Chinnam Naidu, B Anand Kumar, R Satyanarayana, Balraju V. Synthesis of impurity A in Carvedilol: a β -adrenergic receptor. *Ind J Chem.* 2009;48B:741-745.
26. Somiseti Narendra Rao, Devarasetty Sitaramaiah, Kema Srimannarayana, Challa Nageswar Rao, Peddi Srinivasa Rao, K. Sudhakar Babu. Synthesis and characterization of potential impurities of carvedilol, an antihypertensive drug. *Syn Com: Inter J Rapid Com of Syn Org Chem.* 2011;41(1):85-93. doi:10.1080/00397910903531839
27. Safety data sheet: Carvedilol Related Compound B. US Pharmacopeial Convention. 2016.
28. Safety data sheet: Carvedilol Biscarbazole. LGC Limited. 2020. Accessed 22/05/2023. https://assets.lgcstandards.com/sys-master%2Fpdfs%2Fh0e%2Fh5a%2F10134885433374%2FSDS_LGCFOR0291.02_ST-WB-MSDS-3049762-1-1-1.PDF
29. US pharmacopeial convention. Safety data sheet: Carvedilol Related Compound C. 2015. p. 1-5.
30. Laszlo Balazs, Jozsef Dr. Barkoczy, Judit Cselenyak, et al, inventors; Process and intermediates for preparing 1-(9H-carbazol-4-yloxy)-3-[[2-(2-methoxyphenoxy)ethyl]amino]-2-propanol(carvedilol). 1998.
31. LGC Limited. Data from: Safety Data Sheet: Carvedilol impurity C. 2018. *Queens Road Teddington, Middlesex TW11 0LY UNITED KINGDOM.* Deposited 8.
32. US pharmacopeial Convention. Safety data sheet: Carvedilol Related Compound D.1-6.

33. Santa Cruz Biotechnology. 4-(2,3-Epoxypropoxy)carbazole: Material safety data sheet.1-3.
34. Müller L., Mauthe R. J., Riley C. M. A rationale for determining, testing, and controlling specific impurities in pharmaceuticals that possess potential for genotoxicity. *Reg Tox and Pharm.* 2006;44 (3):198-211.
35. LGC standards. EU safety data sheet: Carvedilol Related Compound E. 2011. p. 1-7.
36. US pharmacopeial convention. Safety data sheet: Carvedilol Related Compound E. 2016. p. 1-5.
37. Thota Giridhar, Gudipati Srinivasulu, Srinivasa RK, inventors; Preparation of 2-(2-alkoxy phenoxy) ethylamine, an intermediate of carvedilol and tamsulosin. patent application WO/2009/128088. 2009.
38. Abolghasem Jouyban, Mohammad Hasanzadehb, Nasrin Shadjouc. Non-Aqueous Electromigration Analysis of Some Degradation Products of Carvedilol. *Iran J Pharm Res.* 2014;13(2):471-486.
39. Sajan P. G., Rohith T., Santosh Patil, Mantelingu K., Rangappa K. S., Kumara M.N. Rapid, highly efficient and stability indicating RP-UPLC method for the quantitative determination of potential impurities of carvedilol active pharmaceutical ingredient. *Inter J Pharmacy Pharmaceutical Sci.* 2014;6(10):214-220. doi:10.1111/j.1472-8206.1991.tb00698.x
40. Raju T. Development and Validation of Stability-Indicating Impurity Profiling Method for the Carvedilol in API and Pharmaceutical Formulation. *Inter J Pharmacology.* 2015;2(6):22-31.
41. Tie-chun K, Xiao G, Jia-jia H, Guo-gang Z, Jin-qi Z. Determination of impurities D and E of carvedilol tablets by RP-HPLC. *Chinese J Pharm Ana.* 2015;35(10):1838-1842.
42. Mahajan N, Deshmukh S, Farooqui M. Analytical method development and validation for known and unknown Impurities profiling for carvedilol

- pharmaceutical dosage form (tablets). *Inter J Cur Pharm Res*. 2021;13(6):71-80.
43. David C. Browne. Reference-Standard Material Qualification. *Pharm Tech*. 2009;33(4), 66-73.
 44. USP Council of Experts, Committee URM. Primary and Secondary Reference Materials for Procedures to Test the Quality of Medicines and Foods. *Pharmaceutical Research*. 29(4); 2012:922-931.
 45. WHO. General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substance. *WHO technical report series*. 2007:61-82.
 46. WHO. *The International Pharmacopoeia*. Seventh Edition ed. 2017.
 47. Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương. Thủ tục thiết lập và hiệu chuẩn chất chuẩn. *các thủ tục trong hệ thống quản lý*. 2014.
 48. Committee on Asean reference substances. *Guidelines for the establishment, handling, storage and use of Asean reference substances*. Thailand; 2005.
 49. Annex 3 General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances (WHO expert committee on specifications for pharmaceutical preparations) 59-82 (2007).
 50. Committee on Asean reference substances. *SOP for the production of Asean reference substances*. Thailand; 2009.
 51. Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh. Chất chuẩn - chất đối chiếu. Accessed 15/5/2022, <https://vienkiemnghiem.gov.vn/chat-chuan-doi-chieu/>
 52. Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung ương. Chất chuẩn - chất đối chiếu. Accessed 15/5/2022, <https://nidqc.gov.vn/tim-kiem-chat-chuan>
 53. Đoàn Phụng Chính, Trương Văn Đạt, Trần Thành Đạo, Hà Diệu Ly, Lê Minh Trí. Tổng hợp 8-cloro-1,3,7-trimethyl-3,7-dihydro-1H-purin-2,6-dion (8-clorocafein) tạp E của dimenhydrinat dùng làm chất đối chiếu. *Tạp chí Dược học*. 2016;(478):34-39.

54. Nguyễn Tấn Đạt, Nguyễn Minh Đức, Nguyễn Thị Ngọc Vân. Tổng hợp và thiết lập chuẩn đối chiếu tạp chất A của diclofenac. *Tạp chí Dược học*. 2019;(516):76-79.
55. Nguyễn Phước Định, Hà Diệu Ly, Nguyễn Đức Tuấn. Thiết lập chất đối chiếu [2-[2-fluoro-4-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)phenyl]-1,3-bis(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-propan-2-ol] (tạp A) và 1,1'-(1,3-phenylen)di(1H-1,2,4-triazol) (tạp C) và kiểm tra tạp A và tạp C trong nguyên liệu và chế phẩm fluconazol. *Tạp chí Y học TpHCM*. 2016;phụ bản tập 20:164-169.
56. Hà Diệu Ly. Tổng hợp 2-methyl-4-nitroimidazol, tạp chất A của metronidazol làm chất đối chiếu. *Tạp chí Dược học*. 2014;(464):34-37.
57. Lê Thanh Long, Nguyễn Trần Văn Anh, Chương Ngọc Nãi, Hoàng Đình Hữu Hạnh, Nguyễn Đức Tuấn. Tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạp chất liên quan 2-azaspiro[4.5]decan-3-on của gabapentin. *Tạp chí Dược học*. 2017;495:60-62.
58. Nguyễn Bình Nguyên, Đào Thị Kim Oanh, Nguyễn Hải Nam. Bước đầu nghiên cứu tổng hợp và thiết lập tạp chuẩn captopril disulfid. *Tạp chí Dược học*. 2017;(491):41-47.
59. Lữ Thiện Phúc, Trần Văn Mười, Nguyễn Tấn Đạt, Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ, Đặng Văn Tịnh, Nguyễn Đức Tuấn. Thiết lập chất đối chiếu captopril disulfid và xây dựng quy trình HPLC định lượng tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và chế phẩm captopril. *Tạp chí Dược học*. 2015;(466):18-23.
60. Mạch Khắc Duy, Nguyễn Đức Tuấn. Thiết lập chất đối chiếu 4-methylbenzensulfonamid (tạp A), 2-nitroso-octahydrocyclopenta[c]pyrrol (tạp B) và xây dựng qui trình HPLC định lượng đồng thời tạp A, tạp B trong chế phẩm gliclazid. *Tạp chí Dược học*. 2016;(478):40-45.
61. Võ Thị Hằng Nga, Huỳnh Phương Nguyên, Trương Ngọc Tuyền, Tuấn NĐ. Tổng hợp và xác định độ tinh khiết tạp chất liên quan glimepirid sulfonamid (tạp B) và glimepirid urethan (tạp C) của glimepirid. *Tạp chí Dược học*. 2019;(515):47-53.

62. Nguyễn Việt Tân, Nguyễn Văn Tân Minh, Trương Ngọc Tuyền, Nguyễn Đức Tuấn. Tổng hợp và tiêu chuẩn hóa tạp chất L-cystin và N,N'-diacetyl-L-cystin của N-acetylcystein. *Tạp chí Dược học*. 2017;(495):35-40.
63. Phan Xuân Thương, Trần Thành Đạo, Hà Diệu Ly, Lê Minh Trí. Tổng hợp tạp chất D của amlodipin từ amlodipin besylat. *Tạp chí Dược học*. 2014;(457):53-56.
64. Trương Trần Trang, Trần Quốc Phú, Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ, Nguyễn Đức Tuấn. Thiết lập tạp chất đối chiếu N-butyryl-N- {[2'-(1H-tetrazol-5-yl)biphenyl-4-yl]methyl}-L-valin (tạp B của valsartan); xây dựng quy trình định lượng tạp B trong nguyên liệu và thành phẩm valsartan. *Tạp chí Dược học*. 2018;(501):45-49.
65. Đỗ Thị Thanh Thủy, Phạm Văn Quang, Nguyễn Hải Nam, Đoàn Cao Sơn. Nghiên cứu tổng hợp tạp chất B của terazosin và bước đầu đánh giá giới hạn tạp chất của sản phẩm. *Tạp chí dược học*. 2017;57(500):40-43.
66. Đỗ Thị Thanh Thủy. *Nghiên cứu tổng hợp, thiết lập chất chuẩn và tạp chuẩn dùng trong kiểm nghiệm terazosin*. Luận án Tiến sĩ Dược học. Trường Đại học Dược Hà Nội; 2019.
67. Trần Văn Mười. *Tổng hợp và thiết lập tạp chuẩn captopril disulfid, 7-ADCA, D-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và B của nifedipin dùng trong kiểm nghiệm thuốc*. Luận án Tiến sĩ dược học. Đại học Y Dược thành phố Hồ Chí Minh; 2021.
68. ICH. Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2 (R1). 2005:
69. ISO 13528:2015. *Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparisons*. 2015.
70. International Organisation for Standardization. ISO Guide 31:2015 - Reference materials - Contents of certificates, labels and accompanying documentation. 2015:1-10.

71. Ludwig Huber. *Validation and qualification in analytical laboratories*. 2nd ed. CRC Press; 2007.
72. LGC Standards. *Certificate of Analysis: Reference Standard of 2-(2-Methoxyphenoxy)ethylamine hydrochloride*. 2016.
73. LGC Standards. *Certificate of Analysis: Reference Standard of 2-(2-Methoxyphenoxy)ethylamine hydrochloride*. 2016.
74. Van Essen V, Zondag H, Gores JC, et al. Characterization of MgSO₄ hydrate for thermochemical seasonal heat storage. *Journal of solar energy engineering*. 2009;131(4):041014.
75. Wade L. Alkyl Halides: Nucleophilic Substitution and Elimination. *J Organic Chemistry*. 2011;8
76. Moschona F, Savvopoulou I, Tsitopoulou M, Tataraki D, Rassias G. Epoxide syntheses and ring-opening reactions in drug development. *J Catalysts*. 2020;10(10):1117.
77. Chakraborti AK, Rudrawar S, Kondaskar A. An efficient synthesis of 2-amino alcohols by silica gel catalysed opening of epoxide rings by amines. *J Organic biomolecular chemistry*. 2004;2(9):1277-1280.
78. Hosseini-Sarvari M. Synthesis of β -amino alcohols using MgO as a new catalyst under solvent-free conditions. *Can Jour Chem*. 2008;86(1):65-71.
79. L.G. Wade JR. *Organic chemistry*. Eighth edition ed. Alkyl Halides: Nucleophilic Substitution and Elimination. 2013.
80. Heyrman AN, Henry RA. Importance of controlling mobile phase pH in reversed phase HPLC. *Keystone tech bul*. 1999;99(1)
81. Harvey D. *Modern analytical chemistry*. vol 1. McGraw-Hill New York; 2000.
82. Po HN, Senozan N. The Henderson-Hasselbalch equation: its history and limitations. *J chem edu*. 2001;78(11):1499.
83. ChemicalBook. 2-(2-Methoxyphenoxy)ethylamine. Accessed 22th Feb 2020, https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB3169531_EN.htm

84. Liang C, Pankow JF, technology. Gas/particle partitioning of organic compounds to environmental tobacco smoke: partition coefficient measurements by desorption and comparison to urban particulate material. *J Environ sci*. 1996;30(9):2800-2805.
85. Amézqueta S, Subirats X, Fuguet E, Ràfols C, Rosés M. Capillary electrophoresis for drug analysis and physicochemical characterization. *Handbook of Analytical Separations*. 2020:633-666.
86. Marcus Y. *The properties of solvents*. 1998.
87. Haynes WM. *CRC handbook of chemistry and physics*. CRC press; 2014.
88. Harris DC. *Quantitative chemical analysis*. Macmillan; 2010.