

TỐI ƯU HÓA QUY TRÌNH TỔNG HỢP TẠP B VÀ E CỦA ALLOPURINOL BẰNG MÔ HÌNH BOX-BEHNKEN

Lữ Thiện Phúc^{1*}, Cao Thị Kim Tuyền¹, Nguyễn Mỹ Hân¹, Nguyễn Mạnh Quân¹
Trương Ngọc Tuyền², Trần Việt Hùng³, Nguyễn Đức Tuấn²

1. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

2. Trường Đại học Y Dược TP.HCM

3. Viện Kiểm Nghiệm Thuốc TP.HCM

*Email: luthienphucpharma@yahoo.com.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Tổng hợp tạp B và E của allopurinol có ý nghĩa quan trọng trong ngành kiểm nghiệm thuốc. Tuy nhiên hiện tại chưa có công trình trong và ngoài nước nghiên cứu về tối ưu hóa tổng hợp tạp B và E của allopurinol. Các quy trình tổng hợp hiện tại hiệu suất chưa cao nên việc áp dụng vào trong thực tế còn hạn chế. Nghiên cứu khảo sát và tối ưu hóa các điều kiện phản ứng trong quá trình tổng hợp tạp B và E nhằm tăng hiệu suất tổng hợp bằng mô hình Box-Behnken, tiến hành kiểm tra độ tinh khiết sản phẩm bằng kỹ thuật HPLC–DAD hướng đến việc thiết lập chất chuẩn đối chiếu. **Mục tiêu nghiên cứu:** Khảo sát và tối ưu hóa quy trình tổng hợp tạp B và E của allopurinol. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** tạp B và E của allopurinol; phương pháp: tối ưu hóa quy trình tổng hợp tạp B và E của allopurinol bằng mô hình Box-Behnken. **Kết quả:** Các yếu tố ảnh hưởng chính đến hiệu suất tổng hợp là số mol chất tham gia phản ứng, nhiệt độ và thời gian, đồng thời có định yếu tố còn lại. Xác định điều kiện tối ưu hóa bằng mô hình Box-Behnken; tạp B: tỷ lệ mol tạp A/formamid (1/35); số mol formamid (0,1 mol), nhiệt độ (95°C), thời gian (60 phút) cho hiệu suất cao nhất; tạp E: tỉ lệ mol tạp D/acid formic (23/1891), thể tích acid formic (10 mL), nhiệt độ (90°C), thời gian (4 giờ) cho hiệu suất cao nhất. **Kết luận:** Thiết kế thí nghiệm theo mô hình Box-Behnken và tối ưu hóa bằng phần mềm JMP 13.0 giúp đánh giá được ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu suất tổng hợp và dự đoán được điều kiện cho phản ứng tối ưu.

Từ khóa: Allopurinol; Box-Behnken; tạp B, tạp E.

ABSTRACT

BOX-BEHNKEN DESIGN FOR THE OPTIMIZATION OF SYNTHESIS IMPURITIES B AND E OF ALLOPURINOL

Lu Thien Phuc¹, Cao Thi Kim Tuyen¹, Nguyen My Han¹, Nguyen Manh Quan¹
Truong Ngoc Tuyen², Tran Viet Hung³, Nguyen Duc Tuan²

1. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

2. University of Medicine and Pharmacy at HCMC

3. Institute of Drug Quality Control Ho Chi Minh city

Background: Synthetic impurities B and E of allopurinol are important in the field of drug quality control. However, at present, there are no domestic and foreign studies on the optimization of impurities B and E of allopurinol. The current synthesis processes are not high efficiency, so the application in practice is limited. Survey research and optimize reaction parameters in the impurities B and E synthesis process to increase synthesis efficiency, conduct product purity testing by HPLC-DAD technique towards establishing reference substances. Survey research and optimize reaction parameters in the synthesis of impurities B and E to increase synthesis efficiency by Box-Behnken model, conduct product purity testing by HPLC-DAD aims to establish a reference substance. **Objectives:** Survey and optimize the impurities B and E synthesis process of allopurinol. **Materials and methods:** impurities B and E of allopurinol; Method: Optimizing the impurities B and E synthesis process of allopurinol by Box-Behnken design. **Results:** The main factors affecting the synthesis efficiency are the number of moles of substances involved in the reaction, the temperature and the time, and the remaining factors are fixed. Determining optimal parameters by Box-Behnken design; impurity B: the mole ratio A/formamide (1/35), number of moles of formamide (0.1 mol), temperature (95°C), time (60 minutes) for highest efficiency; impurity E: the mole ratio D/ formic acid: 23/1891, volume of formic acid (10 mL), temperature (90°C), time (4 hours) for the highest efficiency. **Conclusions:** Experimental design based on Box-Behnken design and optimized by JMP 13.0 software help assess the impact of factors on the yield synthesis and predict the optimal reaction parameters.

Keywords: Allopurinol, Box-Behnken design, impurity B, impurity E.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo các chuyên luận dược điển Việt Nam V (ĐĐVN V) [1] và các dược điển tiên tiến trên thế giới khác như dược điển Anh 2018 (BP 2018) [4] và dược điển Mỹ 41 (USP 41) [10] đều yêu cầu kiểm nghiệm tạp chất liên quan B và E, do có khả năng gây độc trên cơ thể người ở gen HLA-B cũng như gây ra hội chứng Steven Johnson, hội chứng tiêu thượng bì nhiễm độc và các phản ứng nghiêm trọng trên da [5], [8]. Tuy nhiên chưa có công trình trên thế giới nghiên cứu về tối ưu hóa tổng hợp tạp B và E của allopurinol. Các quy trình tổng hợp hiện tại hiệu suất và độ tinh khiết chưa cao nên việc áp dụng vào thực tế còn hạn chế, chưa đáp ứng được chất lượng và nhu cầu sử dụng tạp B và E trong công tác đảm bảo chất lượng thuốc. Nghiên cứu tối ưu hóa quy trình tổng hợp tạp B và E của allopurinol được thực hiện nhằm tăng hiệu suất tổng hợp bằng mô hình Box-Behnken, đồng thời đánh giá độ tinh khiết của sản phẩm tổng hợp bằng kỹ thuật HPLC-DAD nhằm hướng đến việc thiết lập chất đối chiếu. Vì vậy chúng tôi thực hiện nghiên cứu này với mục tiêu là “Khảo sát và tối ưu hóa quy trình tổng hợp tạp B và E của allopurinol”.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

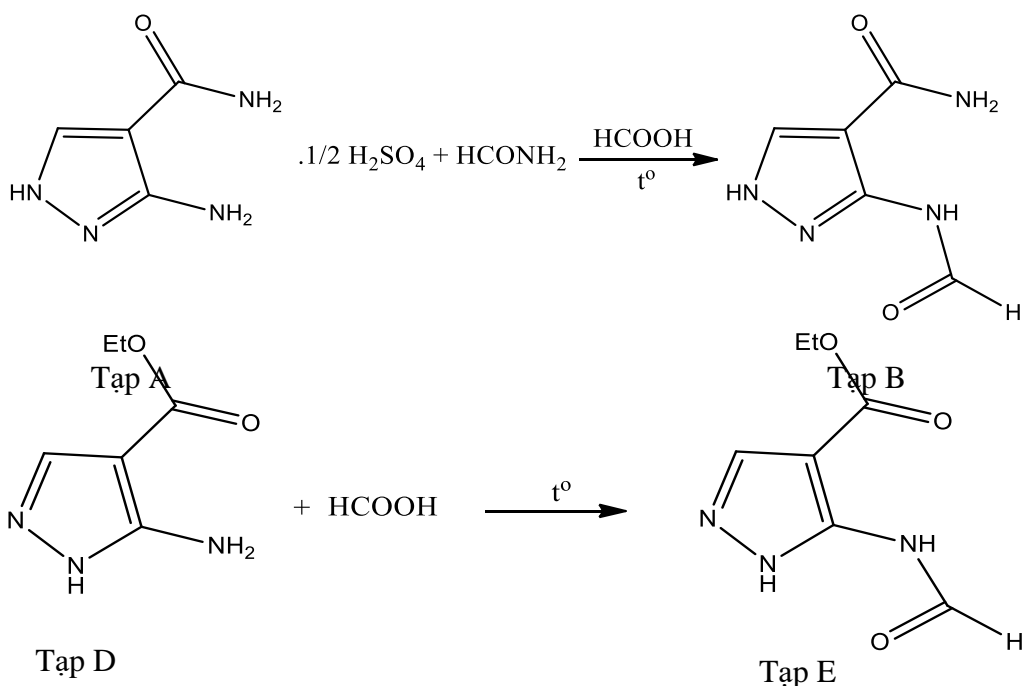
Tạp chất 5-(formylamino)-1H-pyrazol-4- carboxamid (tạp B)

Tạp chất ethyl 5-(formylamino)-1H-pyrazol-4-carboxylat (tạp E)

Hoá chất và dung môi: Methanol (Trung Quốc), Ethanol (Trung Quốc), Acid formic (Merck), Formamid (Fisher) đạt tiêu chuẩn tinh khiết hoá học. Acetonitril (Merck), Acid phosphoric (Merck), Methanol (Merck) đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng. Bùn mỏng silica gel GF₂₅₄ (Merck).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Khảo sát tác nhân ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp tạp B và E [2],[3], [9]



Sơ đồ 1: Quy trình tổng hợp tạp B và tạp E

Nguyên tắc: Khảo sát các yếu tố tham gia phản ứng tổng hợp, đánh giá những yếu tố chính ảnh hưởng đến hiệu suất, cố định các yếu tố còn lại.

Chọn yếu tố trong quy trình tổng hợp cho hiệu suất phản ứng cao nhất đưa vào mô hình Box-Behnken

2.2.2. Tối ưu hóa quy trình tổng hợp tạp B và E của allopurinol bằng mô hình Box-Behnken. [6]

Ứng dụng phương pháp bề mặt đáp ứng trong mô hình Box-Behnken để tiến hành lựa chọn các biến ảnh hưởng chính tới hiệu suất tổng hợp.

Thiết kế thí nghiệm và tiến hành thực hiện các thí nghiệm theo ma trận (15 phản ứng) của mô hình Box-Behnken (phần mềm JMP 13.0)

Từ số liệu thực nghiệm, phần mềm xử lý thống kê dữ liệu thu được thông qua sự tương thích của hàm đa thức:

$$Y = b + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_1X_2 + a_5X_1X_3 + a_6X_2X_3 + a_7X_1^2 + a_8X_2^2 + a_9X_3^2$$

Với Y là hiệu suất phản ứng X_1 , X_2 , X_3 là các tác nhân ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng.

Chỉ tiêu đánh giá: Giá trị Y cao nhất và có độ lặp lại.

Xác định hệ số tương quan và ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu suất của sản phẩm tổng hợp từ kết quả của phần mềm Box-Behnken. Từ kết quả phần mềm dự báo, tiến hành 3 phản ứng tổng hợp ở điều kiện tối ưu để kiểm tra độ lặp lại.

2.2.3. Xác định độ tinh khiết sản phẩm tổng hợp bằng kỹ thuật HPLC-DAD

Tap B và tap E

Độ tinh khiết của tap B được xác định bằng phương pháp HPLC quy về 100% diện tích pic [7]. Điều kiện sắc ký: cột Phenomenex Gemini NX C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), tap B: pha động ACN-nước acid phosphoric pH 2,5 (2:98 tt/tt); tap E: pha động ACN-nước acid phosphoric pH 3 (10:90 tt/tt), tốc độ dòng 1 ml/phút, đầu dò DAD với bước sóng phát hiện 220 nm, thể tích tiêm mẫu 10 μ L, nhiệt độ cột: 25°C. Mẫu thử có nồng độ 500 μ g/mL.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả khảo sát tác nhân ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp tap B và E

Tap B

Tỷ lệ mol formamid:acid formic là 100:1 và thể tích nước cất là 30 mL cho hiệu suất cao nhất. Hiệu suất không tăng thêm khi tỷ lệ mol formamid:acid formic và lượng nước tăng. Nguyên nhân do acid formic là chất xúc tác và nước chỉ đóng vai trò dung môi.

Dựa vào bản chất phản ứng, các yếu tố sẽ cố định trong quy trình tổng hợp tap B là: tỉ lệ mol formamid/acid formic 100:1 và thể tích nước là 30 mL với lượng tap A khảo sát là 0,5 g (2,85 mmol)

Khảo sát số mol formamid (mol)

Số mol formamid khảo sát lần lượt là 0,05; 0,075; 0,1, 0,125 mol

Nhận xét: Điều kiện thời gian phản ứng $t = 2$ giờ, nhiệt độ 95 °C. Kết quả cho thấy số mol formamid là 0,075 mol cho hiệu suất phản ứng cao nhất. Khi tăng số mol phản ứng thì hiệu suất không tăng thêm.

Khảo sát nhiệt độ phản ứng (°C)

Nhiệt độ phản ứng khảo sát lần lượt là 75; 85; 95; 105 °C

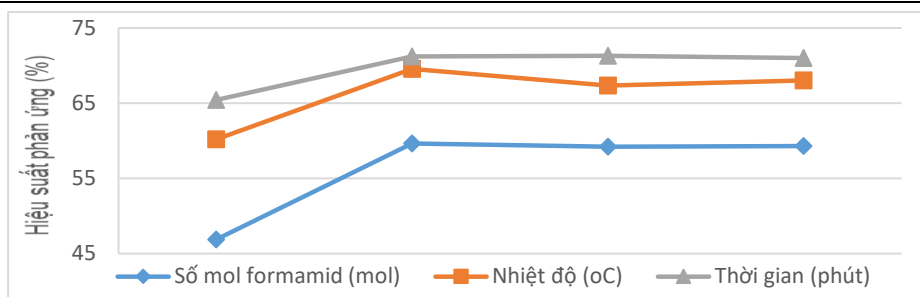
Nhận xét: Điều kiện thời gian phản ứng $t = 2$ giờ, số mol formamid = 0,075 mol. Kết quả cho thấy nhiệt độ phản ứng 85 °C cho hiệu suất phản ứng cao nhất. Khi tăng nhiệt độ phản ứng thì hiệu suất không tăng.

Khảo sát thời gian phản ứng (phút)

Thời gian phản ứng khảo sát lần lượt là 60; 90; 120; 150 phút

Nhận xét: Điều kiện nhiệt độ phản ứng 85 °C, số mol formamid = 0,075 mol. Kết quả cho thấy thời gian phản ứng 90 phút cho hiệu suất phản ứng cao nhất. Khi tăng thời gian phản ứng thì hiệu suất không tăng.

Kết luận: Các yếu tố cần đưa vào mô hình Box - Behnken: số mol formamid, nhiệt độ, thời gian.



Hình 1: Khảo sát số mol formamid (mol), nhiệt độ phản ứng (°C), thời gian phản ứng (phút) tổng hợp tạp B

Tạp E

Thể tích cloroform là 10 mL cho hiệu suất cao nhất. Hiệu suất không tăng thêm khi thể tích cloroform tăng.

Dựa vào bản chất phản ứng, các yếu tố sẽ cố định trong quy trình tổng hợp tạp E là thể tích cloroform lượng tạp D khảo sát là 0,5 g (3,23 mmol)

Khảo sát thể tích acid formic (mL)

Thể tích khảo sát lần lượt là 0,5; 0,75; 1; 1,25 mL.

Nhận xét: Điều kiện thời gian phản ứng $t = 4$ giờ, nhiệt độ 90 °C. Kết quả cho thấy thể tích là 0,75 mL cho hiệu suất phản ứng cao nhất. Khi thể tích phản ứng tăng thì hiệu suất không tăng.

Khảo sát nhiệt độ phản ứng (°C)

Nhiệt độ phản ứng khảo sát lần lượt là 70; 80; 90; 100 °C.

Nhận xét: Điều kiện thời gian phản ứng $t = 4$ giờ, thể tích acid formic = 0,75 mL.

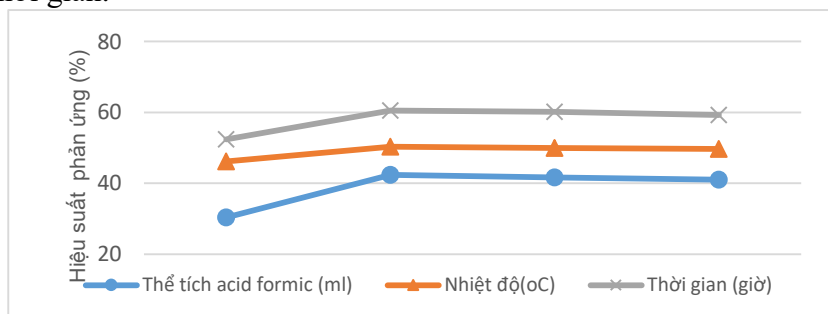
Kết quả cho thấy nhiệt độ phản ứng 80 °C cho hiệu suất phản ứng cao nhất. Khi tăng nhiệt độ phản ứng thì hiệu suất không tăng.

Khảo sát thời gian phản ứng (phút)

Thời gian phản ứng khảo sát lần lượt là 4; 5; 6; 7 giờ.

Nhận xét: Điều kiện nhiệt độ phản ứng 80 °C, thể tích acid formic = 0,75 mL. Kết quả cho thấy thời gian phản ứng 5 giờ cho hiệu suất phản ứng cao nhất. Khi tăng thời gian phản ứng thì hiệu suất không tăng.

Kết luận: Các yếu tố cần đưa vào mô hình Box - Behnken: thể tích acid formic, nhiệt độ, thời gian.



Hình 2: Thể tích acid formic (mL), nhiệt độ phản ứng (°C), thời gian phản ứng (giờ) tổng hợp tạp E

3.2. Tối ưu hóa quy trình tổng hợp tạp B và E của allopurinol bằng mô hình Box-Behnken

Dựa vào kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng ở trên, quy trình tổng hợp tạp B và E đã được tối ưu hoá bằng phần mềm JMP 13.0 với mô hình Box-Behnken. Tiến hành mã hoá các yếu tố khảo sát và bố trí các thí nghiệm theo Bảng 1 và Bảng 3.

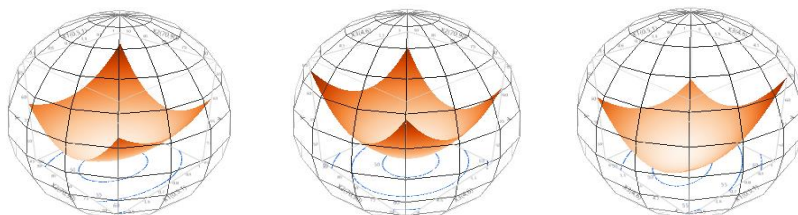
Tạp B

Các yếu tố biến thiên khảo sát: số mol formamid (X_1), nhiệt độ (X_2), thời gian (X_3).

Bảng 1. Mã hóa các yếu tố khảo sát quy trình tổng hợp tạp B

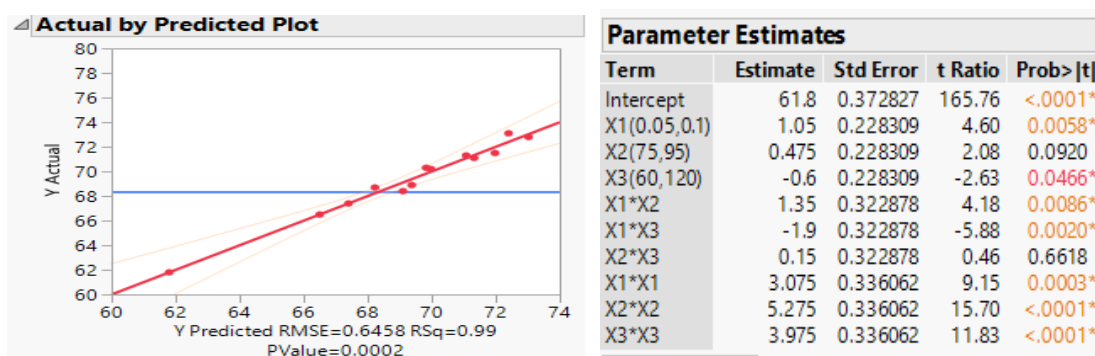
Yếu tố khảo sát	Mã hóa	Mức dưới (-1)	Mức giữa (0)	Mức trên (+1)
Formamid (mol)	X_1	0,05	0,075	0,1
Nhiệt độ (°C)	X_2	75	85	95
Thời gian (phút)	X_3	60	90	120

Ma trận thực nghiệm: chọn mô hình Box – Behnken để thực hiện tối ưu hóa. Tiến hành các thí nghiệm như Bảng 1, mỗi phản ứng thực hiện 3 lần, lấy kết quả trung bình, sau đó nhập dữ liệu thu được vào phần mềm JMP 13.0. Hình 3 minh họa mối tương tác giữa các yếu tố khảo sát lên hiệu suất phản ứng.



Hình 3: Bề mặt đáp ứng hiệu suất toàn quy trình theo các yếu tố khảo sát
Phương trình bề mặt đáp ứng với hiệu suất được thiết lập như sau

$$Y = 61,8 + 1,05X_1 - 0,6X_3 + 1,35X_1X_2 - 1,9X_1X_3 + 3,075X_1^2 + 5,275X_2^2 + 3,975X_3^2$$



Hình 4: Hiệu suất dự đoán, ý nghĩa của phương trình và các hệ số
Để kiểm chứng quy trình tổng hợp tạp B tối ưu, tiến hành thực nghiệm 3 lần với điều kiện dự đoán. Bảng 2 trình bày hiệu suất phản ứng tổng hợp tạp B.

Bảng 2. Hiệu suất phản ứng tổng hợp tạp B theo điều kiện dự đoán

n	Số mol formamid	Nhiệt độ	Thời gian	Hiệu suất	Khối lượng sản phẩm (g)
1	0,1 (mmol)	95°C	60 phút	79,92%	0,354
2	0,1 (mmol)			78,34%	0,347
3	0,1 (mmol)			76,54%	0,339
Trung bình				78,20%	0,347

Hiệu suất dự đoán 79,35% và hiệu suất thực tế 78,2% khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p=0,832>0,05$)

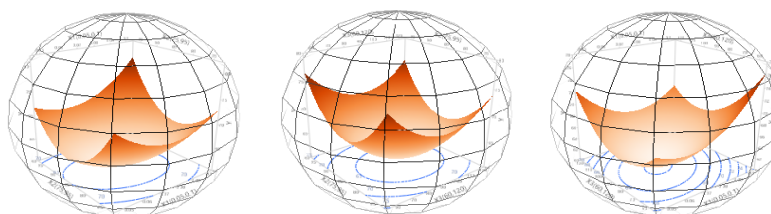
Tạp E

Các yếu tố biến thiên khảo sát: số mL acid formic (X_1), nhiệt độ (X_2), thời gian (X_3).

Bảng 3. Mã hóa các yếu tố khảo sát quy trình tổng hợp tạp E

Yếu tố khảo sát	Mã hóa	Mức dưới (-1)	Mức giữa (0)	Mức trên (+1)
Thể tích acid formic (mL)	X_1	0,5	0,75	1
Nhiệt độ (°C)	X_2	70	80	90
Thời gian (giờ)	X_3	4	5	6

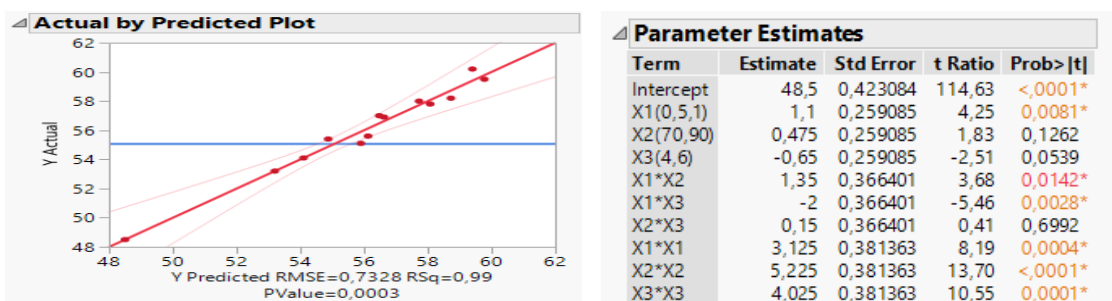
Ma trận thực nghiệm: chọn mô hình Box – Behnken để thực hiện tối ưu hóa. Tiến hành các thí nghiệm như Bảng 3, mỗi phản ứng thực hiện 3 lần, lấy kết quả trung bình, sau đó nhập dữ liệu thu được vào phần mềm JMP 13.0. Hình 5 minh họa mối tương tác giữa các yếu tố khảo sát lên hiệu suất phản ứng.



Hình 5: Bề mặt đáp ứng hiệu suất toàn quy trình theo các yếu tố khảo sát

Phương trình bề mặt đáp ứng với hiệu suất được thiết lập như sau:

$$Y = 48,5 + 1,1X_1 + 1,35X_1X_2 - 2X_1X_3 + 3,125X_1^2 + 5,225X_2^2 + 4,025X_3^2$$



Hình 6: Hiệu suất dự đoán, ý nghĩa của phương trình và các hệ số

Để kiểm chứng quy trình tổng hợp tạp E tối ưu, tiến hành thực nghiệm 3 lần với điều kiện dự đoán. Bảng 4 trình bày hiệu suất phản ứng tổng hợp tạp E.

Bảng 4. Hiệu suất phản ứng tổng hợp tạp E theo điều kiện dự đoán

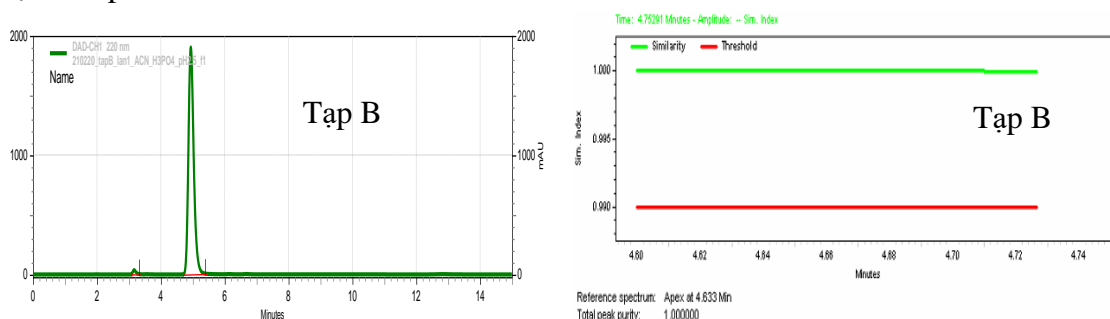
n	Thể tích acid formic	Nhiệt độ	Thời gian	Hiệu suất	Khối lượng sản phẩm (g)
1	1 (mL)	90°C	4 giờ	66,12%	0,3901
2	1 (mL)			64,81%	0,3824
3	1 (mL)			63,03%	0,3717
Trung bình				64,66%	0,3814

Hiệu suất dự đoán 66,3% và hiệu suất thực tế 64,66% khác nhau không có ý nghĩa thống kê ($p = 0,207 > 0,05$)

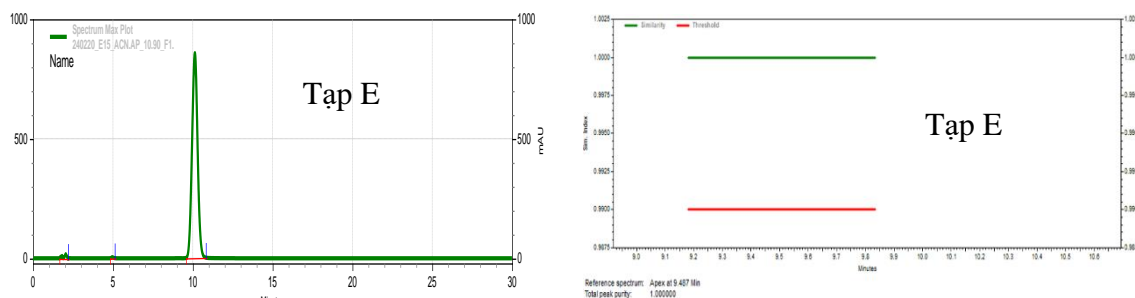
3.3. Kết quả xác định độ tinh khiết sản phẩm tổng hợp bằng HPLC-DAD

Ứng dụng quy trình xác định độ tinh khiết bằng HPLC-DAD đã được thẩm định.

Kết quả độ tinh khiết tạp B đạt 99,32%, tạp E đạt 99,87% theo phương pháp quy về 100% diện tích pic.



Hình 7: Sắc kí đồ và phổ DAD kiểm tra độ tinh khiết tạp B



Hình 8: Sắc kí đồ và phổ DAD kiểm tra độ tinh khiết tạp E

IV. BÀN LUẬN

Hiệu suất quy trình tổng hợp tạp B và E, ảnh hưởng lớn bởi các yếu tố: Tỷ lệ các chất tham gia phản ứng, nhiệt độ và thời gian phản ứng. Sử dụng mô hình Box-Behnken để tìm điều kiện tối ưu, từ đó thực nghiệm lại nhằm xác định điều kiện cho hiệu suất phản ứng cao nhất. Với các kết quả nghiên cứu đã trình bày cho thấy nhóm nghiên cứu đã tăng hiệu suất tạp B thành công so với nghiên cứu trước [2], [3]: tạp B từ ban đầu là 71,12% [3] tăng lên 78,20%, tạp E từ ban đầu là 52,9% [2] tăng lên 64,66%. Kết quả thực nghiệm lại từ mô hình Box-Behnken cho thấy phù hợp với dự đoán, khác biệt không có ý nghĩa thống kê với $p > 0,05$.

V. KẾT LUẬN

Tạp B và E được tổng hợp từ tạp A và D của allopurinol. Tổng hợp ở điều kiện tối ưu số mol phản ứng, nhiệt độ, thời gian cho hiệu suất phản ứng cao nhất tạp B đạt 78,20%, tạp E đạt 64,66% với tổng khối lượng 900 mg mỗi tạp và độ tinh khiết cao (trên 99%) HPLC-DAD. Sản phẩm tổng hợp đủ điều kiện để thiết lập chất chuẩn đối chiếu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2018), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 55-58.
2. Đào Anh Dũng (2019), *Tổng hợp tạp chất liên quan E (ethyl 5-formylamino-1h-pyrazol-4-carboxylat) của Allopurinol*, Khóa luận tốt nghiệp Dược sĩ đại học, Đại học Y Dược Cần Thơ.
3. Nguyễn Thị Thanh Tuyền (2019), *Nghiên cứu tổng hợp tạp chất liên quan B (5-(formylamino)-1h-pyrazol-4-carboxamid) của Allopurinol*, Khóa luận tốt nghiệp Dược sĩ đại học, Trường Đại Học Y Dược Cần Thơ.
4. British Pharmacopoeia (2018), Software.
5. Debabrata Sanyal, Jitendra Verdia, Narendra Mangal Joshi (2015), "Gentoxic impurities in active pharmaceutical ingredients"; *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, vol 2, p. 973-989.
6. Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., Ferreira, H. S., Matos, G. D., David, J. Met al(2007), "Box-Behnken design: An alternative for the optimization of analytical methods"; *Analytica chimica acta*, vol 597, p. 179-86.
7. Guideline I.H.T. (2005), *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*, International conference on harmonization, Geneva, Switzerland.
8. Osabe, M., Tohkin, M., & Hirayama, N (2016), "In silico Analysis of Interactions between HLA-B* 58: 01 and Allopurinol-related Compounds"; *Chem-Bio Informatics Journal*, vol 16, p. 1-4.
9. Tao Changyuan, Zheng Xixia, Liu Zuohua, Sun Dagui (2011), "Microwave assisted synthesis of new substituted pyrazole derivatives"; *Huaxue Shiji*, vol 33(2); p. 164-166.
10. United States Pharmacopoeia 41 (2018), USP Monographs: Allopurinol, CD-ROMs.

(Ngày nhận bài: 18/03/2020 - Ngày duyệt đăng bài: 11/4/2020)
