

**XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI
TẠP A, B, C, D, E, F CỦA ALLOPURINOL
BẰNG PHƯƠNG PHÁP LC-MS/MS**

**Lữ Thiện Phúc^{1*}, Nguyễn Duy Gia Bảo¹, Vương Vinh Hưng¹,
Trương Lê Minh Thu¹, Trương Ngọc Tuyền², Trần Việt Hùng³, Nguyễn Đức Tuấn²**

1. Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

2. Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

3. Viện Kiểm Nghiệm Thuốc Thành phố Hồ Chí Minh

*Email: ltphuc@ctump.edu.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Hiện nay, việc kiểm tra chất lượng nguyên liệu cũng như thành phẩm thuốc thiết yếu allopurinol trước và trong quá trình sản xuất, lưu thông, bảo quản cần được giám sát chặt chẽ theo quy định của Dược điển Việt Nam V; BP 2021; USP 44, đặc biệt là tạp chất liên quan, ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả điều trị, an toàn của người bệnh. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 6 tạp A, B, C, D, E, Ethyl-(E/Z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethyl) amino pyrazol-4-carboxylat (tạp F theo USP standard 2022) của allopurinol trong thành phẩm bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép đầu dò khối phổ ba tứ cực. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Tạp chất liên quan A, B, C, D, E, F của allopurinol, xây dựng quy trình định lượng đồng thời bằng hệ thống sắc ký lỏng ghép khối phổ LC-MS/MS theo hướng dẫn thẩm định quy trình của ICH Q2(R2) và EC-657/2002. **Kết quả:** Các ion phân tử ban đầu và ion phân mảnh định lượng đặc trưng của tạp A tạp A (126,9 → 109,9); tạp B (155,1 → 138); tạp C (178,8 → 78,9); tạp D (155,86 → 127,9); tạp E (183,87 → 109,9); tạp F (279,1 → 187) và allopurinol (136,9 → 109,9). Điều kiện khối phổ tối ưu là: Nhiệt độ khí hoá hơi (°C): 400°C, tốc độ dòng khí hoá hơi (l/h): 900 l/h, thế Cone (V): 15-26V, thế mao quản (kV): 4kV, năng lượng buồng khí va chạm (V): 12-25V. Điều kiện sắc ký: pha tĩnh cột sắc ký pha đảo Gemini – NX C18 (15cm; 4,6mm; 5µm; Phenomenex), pha động acetonitril - nước acid formic 0,05% theo chương trình gradient, nhiệt độ cột 25°C, thể tích tiêm mẫu 10 µL, tốc độ dòng 0,8 mL/phút. Thẩm định quy trình theo hướng dẫn ICH: quy trình đạt độ đặc hiệu – chọn lọc; độ tuyến tính có hệ số tương quan từ 0,995 – 0,999; giới hạn phát hiện từ 3-10ppb; giới hạn định lượng 10ppb; độ đúng độ chính xác đạt yêu cầu RSD ≤ 2%. **Kết luận:** Xây dựng được quy trình định lượng đồng thời 6 tạp A, B, C, D, E, F của allopurinol phương pháp LC-MS/MS theo hướng dẫn của ICH.

Từ khóa: Tạp A, tạp B, tạp C, tạp D, tạp E, tạp Ethyl-(E/Z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethyl)amino pyrazol-4-carboxylat (theo USP standard 2022, LC-MS/MS, allopurinol).

ABSTRACT

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF LC-MS/MS FOR
ANALYZING IMPURITIES A, B, C, D, E, F IN ALLOPURINOL**

**Lu Thien Phuc^{1*}, Nguyen Duy Gia Bao¹, Vuong Vinh Hung¹,
Truong Le Minh Thu¹, Truong Ngoc Tuyen², Tran Viet Hung³, Nguyen Duc Tuan²**

1. Can Tho University of Medicine and Pharmacy

2. University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

3. Institute of Drug Quality Control Ho Chi Minh city

Background: Currently, the quality control of raw materials as well as finished products of the essential drug allopurinol before and during the production, circulation and storage needs to be closely monitored according to the provisions of the Vietnam Pharmacopoeia V; BP 2021; USP 44, especially related impurities, directly affect the treatment effectiveness and safety of

patients. **Objectives:** To develop and validate a process for simultaneous quantification of 6 impurities A, B, C, D, E, Ethyl-(E/Z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethyl) amino pyrazol-4-carboxylate (F impurity according to USP standard 2022) of allopurinol in the finished product by high performance liquid chromatography twice mass spectrometry. **Materials and methods:** Related impurities A, B, C, D, E, F of allopurinol, quantitative procedure was developed by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS) system according to the verification instructions. ICH Q2(R2) and EC-657/2002 procedure specification. **Results:** The suitable mass spectrometry fractions for quantitative fragmentation were impurity A (126.9→109.9); B (155.1→138); C (178.8→78.9); D (155.86 →127.9); E (183.87→109.9); F (279.1→187) and allopurinol (136.9→109.9). Mass spectrometry conditions: Vaporization temperature (°C): 400°C, vaporization gas rate (l/h): 900 l/h, Cone potential (V): 15-26V, capillary potential (kV): 4kV, impact gas chamber energy (V): 12-25V. Chromatographic conditions: column Gemini – NX C18 (15cm; 4,6mm; 5µm ;Phenomenex), mobile phase acetonitrile - formic acid water 0.05% according to gradient program, column temperature 25°C, sample injection volume 10 µL, flow rate 0.8 mL/min. Process validation according to ICH guidelines: procedure achieves specificity – selectivity; linearity with correlation coefficient from 0.995 to 0.999; detection limit from 3-10ppb; quantitative limit 10ppb; Accuracy accuracy meets the requirements RSD ≤ 2%. **Conclusion:** A process to simultaneously quantify 6 impurities of allopurinol by LC-MS/MS method was developed according to the guidelines of ICH.

Keywords: Impurities A, impurities B, impurities C, impurities D, impurities E, Ethyl-(E/Z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethyl) amino pyrazol-4-carboxylate impurities (impurities according to USP standard 2022), LC-MS/MS, allopurinol.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, cùng với sự phát triển mạnh mẽ của ngành công nghiệp dược trên thế giới, ngành dược Việt Nam ngày càng phát triển với hơn 220 nhà máy sản xuất đạt GMP-WHO, GMP-EU, sản xuất các thành phẩm, đa phần là thuốc generic, trong đó phổ biến nhất là nhóm thuốc kháng viêm, thuốc điều trị bệnh gout, kháng sinh, đái tháo đường, tim mạch. Trong các nhóm thuốc điều trị bệnh gout mãn tính hay tăng acid uric huyết, allopurinol đã được Bộ Y tế đưa vào danh mục thuốc thiết yếu lần VII năm 2018 [2], và được chỉ định thường quy trong điều trị bệnh gout và tăng uric huyết thứ phát do hóa trị bệnh bạch cầu hay ung thư [1].

Hiện nay, ngành công nghiệp dược vẫn còn phụ thuộc nhiều vào nguồn nguyên liệu allopurinol được nhập khẩu từ các công ty nước ngoài. Do đó, việc kiểm tra chất lượng tạp trong nguyên liệu cũng như thành phẩm trước và trong quá trình lưu hành là một yêu cầu bắt buộc được quy định trong DĐVN V; BP 2021; USP 44. Trong đó tạp chất A, B, C, D, E được chứng minh tác dụng lên gen HLA-B*5801 gây hội chứng steven Jonhson[8], tạp Ethyl-(E/Z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethyl)amino pyrazol-4-carboxylat (tạp F theo USP standard 2022) thuộc nhóm 3 cấu trúc có khả năng gây ung thư, đột biến gen[9]. Tạp A và B là tạp phân hủy của allopurinol cần được kiểm cả trong nguyên liệu và thành phẩm. Trong khi đó các quy trình Dược Điển trên chỉ định lượng từng tạp hoặc một nhóm các tạp, hệ số phân giải giữa các tạp thấp, đặc biệt tạp B và C nhỏ hơn 1,5. Chưa có quy trình tối ưu để định lượng đồng thời 6 tạp trên trong thành phẩm. Từ những lí do trên, nhóm nghiên cứu thực hiện đề tài “Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 6 tạp A,B,C,D,E,F của allopurinol bằng phương pháp LC-MS/MS” với mục tiêu: Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng đồng thời 6 tạp A,B,C,D,E,F của allopurinol bằng phương pháp LC-MS/MS theo hướng dẫn của ICH.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tạp chất liên quan A, B, C, D, E, tạp Ethyl-(E/Z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethyl)amino pyrazol-4-carboxylat (tạp F theo USP standard 2022) của allopurinol được ghi rõ trong chuyên luận nguyên liệu và thành phẩm tương ứng trong Dược điển Việt Nam V, BP 2022 và USP 44.

- **Hóa chất, thuốc thử:** Chất chuẩn các tạp A, B, C (số lô No3 Code: A0350010), D (số lô No4), E (số lô No1.5) chuẩn CRS, độ tinh khiết 100%. Tạp F (số lô R028V0) chuẩn TRC với độ tinh khiết trên 99%; Acetonitril (ACN), Methanol (MeOH) đạt tiêu chuẩn HPLC gradient. Nước cất, acid formic (AF) đạt tiêu chuẩn phân tích khối phổ của Merck-Đức.

- **Trang thiết bị:** Hệ thống sắc ký lỏng WATERS ACQUITY UPLC H-CLASS SYSTEM. Đầu dò khối phổ ba lần tứ cực của Waters (Xevo TQD). cột Gemini – NX C18 (15cm; 4,6mm; 5 μ m; Phenomenex). Cân phân tích 5 chữ số (ABT 220-5DM). Bể siêu âm (Wisd WUC-D22H).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- **Thiết kế nghiên cứu:** Nghiên cứu thực nghiệm.

- **Chuẩn bị mẫu:** Thực hiện pha các mẫu giả lập, mẫu giả dược và pha các dung dịch chuẩn gốc của 6 tạp và allopurinol ở nồng độ 100 ppm trong pha động. Từ dung dịch chuẩn gốc thực hiện pha loãng trong pha động để thu được dung dịch hỗn hợp chuẩn làm việc có nồng độ từ 10-500 ppb.

- **Nội dung nghiên cứu:**

Xây dựng quy trình định lượng: Pha loãng hỗn hợp chuẩn 6 tạp đến nồng độ 200 ppb bằng pha động và phun trực tiếp trên hệ thống khối phổ Xevo TQD, sử dụng chế độ Auto tune trên phần mềm Masslynx để tối ưu hoá điều kiện khối phổ nhằm thu được ion mẹ và các phân mảnh con ở chế độ MRM (multi-reaction monitoring) có cường độ tín hiệu tối ưu của các tạp cần phân tích. Các thông số khối phổ cần khảo sát là: kiểu ion hoá ESI, thể mao quản, thể cone, thể va chạm, nhiệt độ khí bay hơi, tốc độ dòng khí bay hơi, thời gian chờ ghi nhận tín hiệu. Dựa vào cấu trúc các tạp, kỹ thuật sắc ký pha đảo được áp dụng với hệ dung môi phân cực bao gồm acetonitril, methanol, nước có hoặc không có thêm chất điều chỉnh pH như acid formic (< 0,1%) để khảo sát điều kiện sắc ký tối ưu trên mẫu thử.

Thẩm định quy trình theo ICH: với các tiêu chí: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác [6].

+ Tính tương thích hệ thống: đánh giá sai khác thời gian lưu và diện tích đỉnh của ít nhất 6 lần phân tích liên tiếp ở cùng một nồng độ tạp A (40ppb), tạp B (20ppb), tạp C (20ppb), tạp D (20ppb), tạp E (20ppb), tạp F (40ppb).

+ Độ đặc hiệu: phân tích mẫu, tổng hợp thời gian lưu và cường độ ion của các chất phân tích với RSD thời gian lưu $\leq 2\%$. Sắc kí đồ mẫu trắng, sắc ký đồ dung môi pha mẫu, sắc ký đồ mẫu trắng thêm chuẩn của mỗi tạp không xuất hiện tín hiệu của các tạp khác ở chế độ ghi phổ MRM.

+ Tính tuyến tính: xây dựng đường tuyến tính với các mức nồng độ từ 10 ppb đến 200 ppb trên nền mẫu trắng được pha loãng từ dung dịch chuẩn.

+ Độ đúng: thực hiện trên mẫu trắng thêm chuẩn với 3 mức nồng độ 50%, 100%, 150% so với nồng độ tạp cần phân tích; mỗi nồng độ thực hiện tối thiểu 3 mẫu. Đánh giá dựa trên độ lệch chuẩn tương đối và độ thu hồi của chất phân tích.

+ Độ chính xác và độ chính xác trung gian: độ chính xác phân tích ít nhất 3 mẫu tại 3 mức nồng độ khác nhau. Độ chính xác trung gian: thực hiện tương tự độ chính xác ở các ngày khác nhau. RSD thời gian lưu và diện tích peak không quá 2% ở mỗi mức nồng độ.

+ Giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ): pha loãng tìm giá trị nồng độ các chất thoả mãn $S/N \geq 3,33$ và $S/N \geq 10$; tại các nồng độ này được xác nhận là LOQ khi tất cả các tiêu chí đánh giá độ đặc hiệu đều đạt.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

Xây dựng quy trình định lượng

- Điều kiện khối phổ tối ưu: chế độ MRM xác định hai ion sản phẩm ứng với mỗi chất. Ion có tín hiệu cao và ổn định hơn được chọn làm ion định lượng, ion còn lại được dùng để định tính. Các thông số khối phổ tối ưu được trình bày ở Bảng 1.

Bảng 1. Các thông số khối phổ tối ưu

Chất phân tích	[M+H] ⁺	Mảnh	Nhiệt độ khí hoá hơi (°C)	Tốc độ khí hoá hơi (l/h)	Thế Cone (V)	Thế mao quản (kV)	Thế va chạm (V)	Ghi chú
Tạp A	126,9	109,9	400	900	15	4	13	Định lượng
		53,9			15		18	Định tính
Tạp B	138	10			12		Định lượng	
	109,9	10			20		Định tính	
Tạp C	78,9	20			25		Định lượng	
	109,9	20			20		Định tính	
Tạp D	155,86	127,9			15		12	Định lượng
	109,9	15			15		Định tính	
Tạp E	183,87	109,9			8		14	Định lượng
	138	8			10		Định tính	
Tạp F	187	10			25		Định tính	
	233	10			15		Định lượng	
Allopurinol	109,9	26	18	Định lượng				
	54	26	24	Định tính				

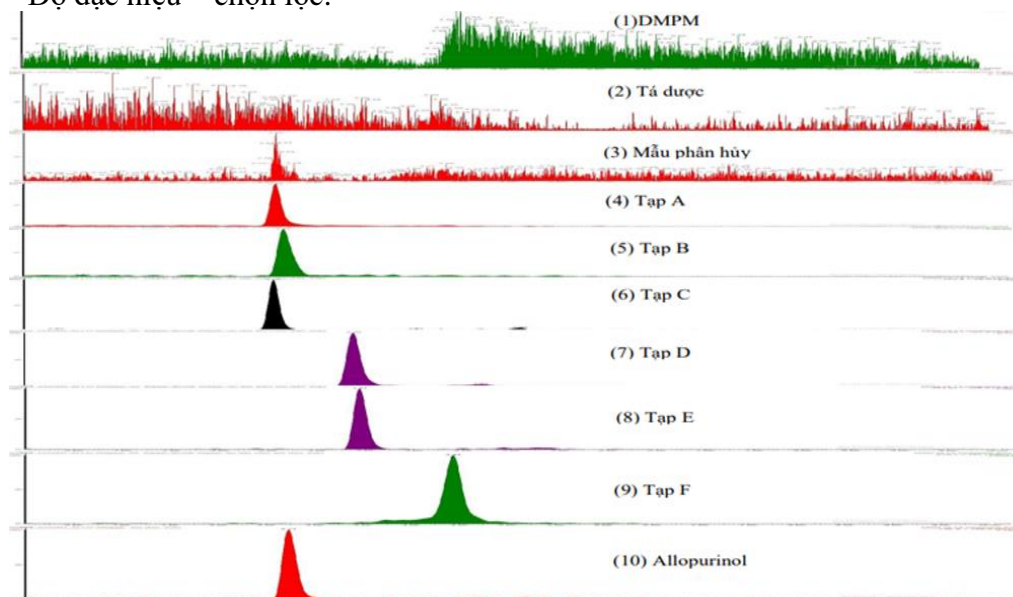
Nhận xét: Các chất phân tích đều đảm bảo có 2 mảnh con (1 mảnh định tính và 1 mảnh định lượng) đáp ứng đủ 4 điểm IP. Các chất được phân tích ở điều kiện tín hiệu tối ưu của các mảnh.

- Điều kiện sắc ký thích hợp: Bảng 2. Các điều kiện sắc ký tối ưu

Pha tĩnh	Cột Gemini – NX C18 (15cm; 4,6mm; 5µm; Phenomenex)		
Pha động	ACN - Acid formic 0,05% trong nước.		
Nhiệt độ cột	25°C.		
Tốc độ dòng	0,8 mL/phút.		
Thể tích tiêm mẫu	10µl.		
Điều kiện sắc kí tối ưu	Thời gian (phút)	ACN (%)	Acid formic 0,05% (%)
	0	50	50
	0,6	70	30
	1,2	100	0
	7	100	0
	7,1	50	50
12	50	50	

Thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn Q2(R2) của ICH

- Độ đặc hiệu – chọn lọc:



Hình 1. Sắc kí đồ dung môi pha mẫu, tá dược, mẫu phân hủy, tạp A, B, C, D, E, F và allopurinol

- Khoảng tuyến tính của đường chuẩn, LOD, LOQ:

Bảng 3. Khoảng tuyến tính, phương trình hồi quy, LOD, LOQ

Chất phân tích	Khoảng tuyến tính (ng/mL)	Phương trình hồi quy	Hệ số tương quan (r^2)	LOD (ppb)	LOQ (ppb)
Tạp A	10-200ppb	120,708x + 526,113	0,998	5	10
Tạp B	10-200ppb	171,203x - 635,259	0,995	5	10
Tạp C	10-200ppb	80,6819x - 176,712	0,997	5	10
Tạp D	10-200ppb	218,26x + 563,684	0,999	5	10
Tạp E	10-200ppb	109,144x - 182,179	0,996	5	10
Tạp F	10-200ppb	136,392x - 197,289	0,998	3	10

Nhận xét: Kết quả cho thấy cả 6 chất đều có phương trình tuyến tính với $R^2 > 0,995$. Giới hạn định lượng (LOQ) thấp hơn 15ppb, đạt độ nhạy cao

- Độ đúng

Bảng 4. Kết quả độ đúng của 6 tạp

Kết quả trung bình độ đúng	50%	100%	150%
	Độ thu hồi (%)	Độ thu hồi (%)	Độ thu hồi (%)
Tạp A	99,77	100,23	99,27
Tạp B	100,00	100,53	100,13
Tạp C	99,07	99,40	99,73
Tạp D	99,67	100,50	99,67
Tạp E	99,60	99,40	100,40
Tạp F	100,83	99,87	99,57

Nhận xét: các chất đều có độ thu hồi đạt 98%-102%. Do đó qui trình phân tích đáp ứng yêu cầu về độ thu hồi theo hướng dẫn của ICH.

- Độ chính xác và độ chính xác trung gian

Bảng 5. Kết quả độ chính xác và độ chính xác trung gian của 6 tạp

Mẫu phân tích	Nồng độ (ppb)	S	RSD%	S	RSD%	S	RSD%
Tạp A	20	2995	1,21	2957	1,38	2950	1,57
	40	5486	1,61	5411	1,59	5372	1,41
	60	7713	1,18	7845	1,35	7780	1,58
Tạp B	10	1163	1,88	1143	1,82	1081	1,67
	20	2756	1,26	2860	1,84	2770	1,81
	30	4336	1,57	4657	1,52	4590	1,43
Tạp C	10	623	1,72	628	2,00	639	1,98
	20	1508	0,98	1442	1,82	1454	1,82
	30	2157	1,76	2244	1,99	2241	1,43
Tạp D	10	2956	1,08	2856	1,58	2754	1,36
	20	4951	1,06	5140	1,35	4940	1,62
	30	7089	0,93	7350	1,36	7111	1,37
Tạp E	10	959	1,25	922	1,95	921	1,96
	20	1977	1,19	2013	1,67	2015	1,60
	30	3181	1,19	3110	1,27	3150	1,26
Tạp F	20	2595	1,98	2532	1,80	2534	1,83
	40	5252	1,50	5261	1,64	5248	1,30
	60	8088	0,84	8152	1,17	7976	1,73

Nhận xét: qui trình định lượng đạt về độ chính xác và độ chính xác trung gian chứng tỏ qui trình ổn định có thể ứng dụng vào thực tế.

IV. BÀN LUẬN

Điều kiện khối phổ và sắc ký thích hợp Cấu trúc đặc trưng của các chất phân tích phù hợp với kiểu ion hóa dương (ES+). Các thông số khối phổ được tối ưu hóa để tín hiệu các mảnh ghi nhận được cao nhất. Tín hiệu các chất tăng theo nhiệt độ dòng khí bay hơi và tốc độ dòng khí bay hơi, tối ưu ở giá trị 400°C và 900 L/giờ. Do cấu trúc tương tự nhau, nên thế cone phù hợp để bắt các ion nằm ở khoảng 15V đến 26V. Hệ pha động trong rửa giải sắc ký cũng được khảo sát. Kết quả cho thấy rằng khi sử dụng chất điều chỉnh pH là acid formic < 0,1% cho tín hiệu tốt hơn, các pic cân đối và gọn hơn so với hệ pha động chỉ sử dụng dung môi hữu cơ và nước. Khi sử dụng acid formic 0,05%/H₂O cả 7 peak thu được

đều gọn, không bị chẻ và hình dạng đối xứng. Chính vì vậy pha động là ACN - Acid fomic 0,05% trong nước được lựa chọn. Tốc độ dòng được lựa chọn phân tích là 0,8 mL/phút để rút ngắn thời gian chạy mẫu, đồng thời làm peak xuất hiện gọn đẹp.

V. KẾT LUẬN

Phương pháp định lượng LC-MS/MS định lượng đồng thời 6 tạp A,B,C,D,E,F của allopurinol với thời gian phân tích ngắn, đơn giản cho kết quả độ đúng, độ chính xác cao, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp theo hướng dẫn của ICH. Phương pháp xây dựng đáp ứng đầy đủ yêu cầu của một phương pháp phân tích và ứng dụng định lượng các tạp của allopurinol trong các sản phẩm đang lưu hành trên thị trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam*, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, tr. 162-165.
2. Bộ Y tế (2018), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 55-58.
3. Bộ Y tế (2013), *Ban hành danh mục thuốc thiết yếu tân dược lần VI*, Thông tư 19/2018/TT-BYT ngày 30/08/2018.
4. British Pharmacopoeia (2020), Software.
5. United States Pharmacopoeia 43, Software.
6. ICH Harmonised Guideline, Q2(R2) (2022), *Validation of Analytical procedures*.
7. ICH Harmonised Guideline, Q2(R1) (2022), *Validation of Analytical procedures text and methodology*.
8. Makoto Osabe, Masahiro Tohkin and Noriaki Hirayama (2016), “In silico Analysis of Interactions between HLA-B*58:01 and Allopurinol-related Compounds”, *Chem-Bio Informatics Journal*, 16(0), pp. 1-4.
9. Kumara, M. N., Sajan, P. G., & Rohith (2014), “A validated stability indicating RP-UPLC method for the quantitative determination of potential impurities of allopurinol”, *Am J Pharm Health Res*, 2(10), 116-127.

(Ngày nhận bài: 27/7/2022 - Ngày duyệt đăng: 11/02/2023)
