

XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT TẠP C ALLOPURINOL BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG VỚI ĐẦU DÒ DÂY DIOD QUANG

Lữ Thiện Phúc*, Trần Lý Tường, Nguyễn Thanh Hà
Nguyễn Thị Phương Tuyền, Lâm Tuấn Nghĩa

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

*Email: luthienphucpharma@yahoo.com.vn

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết tạp chất C của allopurinol, với độ tin cậy cao, không bị ảnh hưởng bởi sản phẩm phân hủy bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò dây diod quang, lần đầu tiên công trình được công bố trong nước và thế giới là một nhu cầu cấp thiết. **Mục tiêu nghiên cứu:** Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết tạp C allopurinol bằng HPLC - đầu dò dây diod quang (HPLC-DAD). **Đối tượng và Phương pháp nghiên cứu:** Quy trình xác định độ tinh khiết tạp chất C của allopurinol; phương pháp nghiên cứu xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết của tạp C allopurinol bằng hệ thống sắc ký lỏng đầu dò dây diod quang theo hướng dẫn của ICH và Sổ tay đăng ký thuốc - Bộ Y tế. **Kết quả:** Phương pháp HPLC với đầu dò dây diod quang, cột Phenomenex Synergi 4u MAX-RP 80R C12 pha đảo, pha động gồm acetonitrile, acid phosphoric pH=2,0 (điều chỉnh bằng H₃PO₄ 10%) (2:98), nhiệt độ cột 25°C, tốc độ dòng 1mL/phút, bước sóng phát hiện 200 nm. Khoảng nồng độ tuyến tính 50-190µg/mL, phương trình hồi qui của tạp C allopurinol là $y=324681x$ với $R^2=0,9966$, $p<0,005$. Phương pháp cho thấy có sự tuyến tính trong khoảng nồng độ khảo sát, đạt độ chính xác, độ đúng, độ đặc hiệu, giới hạn phát hiện là 0,25µg/mL và giới hạn định lượng là 0,75µg/mL. **Kết luận:** Xây dựng được quy trình xác định độ tinh khiết tạp C allopurinol bằng phương pháp HPLC-DAD đạt yêu cầu theo ICH và sổ tay đăng ký thuốc. Quy trình có thể áp dụng xác định độ tinh khiết của tạp C của allopurinol tổng hợp được.

Từ khóa: tạp C allopurinol, HPLC

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A HPLC-DAD METHOD FOR DETERMINING THE PURITY OF ALLOPURINOL IMPURITY C

Lu Thien Phuc*, Tran Ly Tuong, Nguyen Thanh Ha
Nguyen Thi Phuong Tuyen, Lam Tuan Nghia
Can Tho University of Medicine and Pharmacy

Background: Development and validation of a high performance liquid chromatography with diode-array detector method (HPLC-DAD) for determining the purity of allopurinol impurity C to achieve reliability, not be affected by the decomposition product. To our the best knowledge, this study is the first publication. That is an urgent need. **Objectives:** Development and validation of a high performance liquid chromatography with diode array detector method for determining the purity of allopurinol impurity C. **Materials and method:** Allopurinol impurity C; development and validation of a high performance liquid chromatography with diode-array detector method for determining the purity of allopurinol impurity C was according to the instructions of International Conference on Harmonization and Drug Registration Manual of Ministry of Health, Vietnam. **Results:** High performance liquid chromatography with diode array detector, reversed phase Phenomenex Synergi 4u MAX-RP 80R C12 column, mobile phase consisting of acetonitrile: phosphoric acid pH=2.0 (adjusted with 10% H₃PO₄) (2:98), column temperature at 25°C, flow rate 1mL/min, wavelength detection 200nm. The linear concentration range 50-190 µg/mL, the regression equation for allopurinol impurity C was $y=324681x$ with R^2 0.9966, $p<0.005$. The

method showed that there was linearity in the range of investigated concentrations, achieving intermediate precision, accuracy, specificity, the limit of detection was $0.25\mu\text{g/mL}$, and the limit of quantitation was $0.75\mu\text{g/mL}$. **Conclusion:** A reliable HPLC method was successfully validated, which can be applied to determine the purity of the synthesized allopurinol C impurity.

Keywords: allopurinol C impurity, HPLC

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Allopurinol là thuốc phổ biến nằm trong danh mục thuốc thiết yếu hiện hành của Bộ Y tế, được chỉ định trong điều trị bệnh gút và tăng acid uric huyết [2],[4]. Tạp C của allopurinol vừa là sản phẩm trung gian trong quá trình tổng hợp vừa là sản phẩm phân hủy của allopurinol [10],[12]. Tạp C gây độc trên da, hội chứng Steven Johnson, hoại tử tế bào biểu bì, ảnh hưởng đến khả năng sinh sản và gây tổn hại cho thai nhi [6],[9]. Do đó, United States Pharmacopoeia 43 (USP 43) bắt buộc kiểm tra tạp C trong nguyên liệu allopurinol. Dược điển Việt Nam V (ĐDVN V) và British Pharmacopoeia 2018 (BP 2018) bắt buộc kiểm tra tạp C của allopurinol trong cả nguyên liệu và thành phẩm [3],[5]. Tuy nhiên, việc kiểm tra tạp C của allopurinol tại Việt Nam vẫn còn gặp nhiều khó khăn do tạp chuẩn C phải mua từ nước ngoài với giá cao khoảng 2500 USD/100mg chuẩn USP, thời gian nhập khẩu kéo dài và không chủ động được trong công tác kiểm tra chất lượng thuốc. Đến thời điểm hiện tại, trên thế giới chỉ có một vài công trình nghiên cứu tổng hợp tạp C được công bố, nhưng các công trình này đều chưa nêu cụ thể độ tinh khiết của tạp C tổng hợp được [11],[13]. Bên cạnh đó, chưa có công trình nghiên cứu về xây dựng quy trình đánh giá độ tinh khiết tạp C allopurinol. Xuất phát từ những lý do trên, nhóm nghiên cứu thực hiện đề tài “Xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết tạp C allopurinol bằng phương pháp sắc ký lỏng với đầu dò dây diod quang” với các mục tiêu là: xây dựng và thẩm định quy trình xác định độ tinh khiết tạp C của allopurinol bằng HPLC–đầu dò dây diod quang. Quy trình có thể áp dụng xác định độ tinh khiết sản phẩm tạp C tổng hợp được.

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Tạp C của allopurinol được tổng hợp tại LBM. Hóa phân tích–Kiểm nghiệm–Độc chất, Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Cần Thơ. Với độ tinh khiết $>99\%$ và được tổng hợp 3 lô, mỗi lô 2g.

Chất chuẩn: tạp chuẩn C allopurinol chuẩn Châu Âu lọ 10mg, code: A0350030, lô: 3.1, id:003Ddz, độ tinh khiết 100%. Tạp chuẩn A allopurinol chuẩn châu Âu lọ 10mg, code: A0350010, lô n^o3, độ tinh khiết 100%. Tạp chuẩn B allopurinol chuẩn châu Âu lọ 10mg, code: A0350020, lô id:0001nt;

Dung môi, hóa chất: acetonitril và acid phosphoric (Merck, Đức) đạt tiêu chuẩn dùng trong HPLC và methanol (Xilong, Trung Quốc) đạt tiêu chuẩn dược dụng.



Hình 1. Chuẩn tạp C allopurinol

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Điều kiện sắc ký

Máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Hitachi L–2000 với đầu dò DAD.

Cột sắc ký: phenomenex Synergi 4u MAX-RP 80R C12 (250×4,6 mm, 4μm).

Hệ pha động: ACN: acid phosphoric pH 2,0 (điều chỉnh bằng H₃PO₄ 10%) (2: 98).

Thể tích tiêm mẫu: 20 μL.

Nhiệt độ cột: 25°C.

Bước sóng phát hiện: 200 nm.

Tốc độ dòng: 1 mL/phút.

2.2.2. Chuẩn bị mẫu

Mẫu chuẩn: chuẩn tạp chất C được pha loãng trong pha động thành dung dịch chuẩn gốc 500 μg/mL. Pha loãng dung dịch chuẩn gốc thành dung dịch chuẩn làm việc 100 μg/mL. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

Mẫu thử: cân chính xác một lượng tạp C tổng hợp được pha trong pha động để được dung dịch có nồng độ 500 μg/mL. Tiếp tục pha loãng để thu được dung dịch thử làm việc có nồng độ khoảng 100 μg/mL. Lọc qua màng lọc 0,45 μm.

2.2.3. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng

Khảo sát và thẩm định quy trình phân tích theo hướng dẫn của ICH (The International Conference on Harmonisation) [7],[8] và Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc–Bộ Y tế [1]. Tiến hành thẩm định các yêu cầu về tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, tính tuyến tính, độ đúng, độ chính xác trung gian, giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Xác định tính tương thích hệ thống

Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống tạp C allopurinol đạt các thông số sắc ký.

Bảng 1. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống

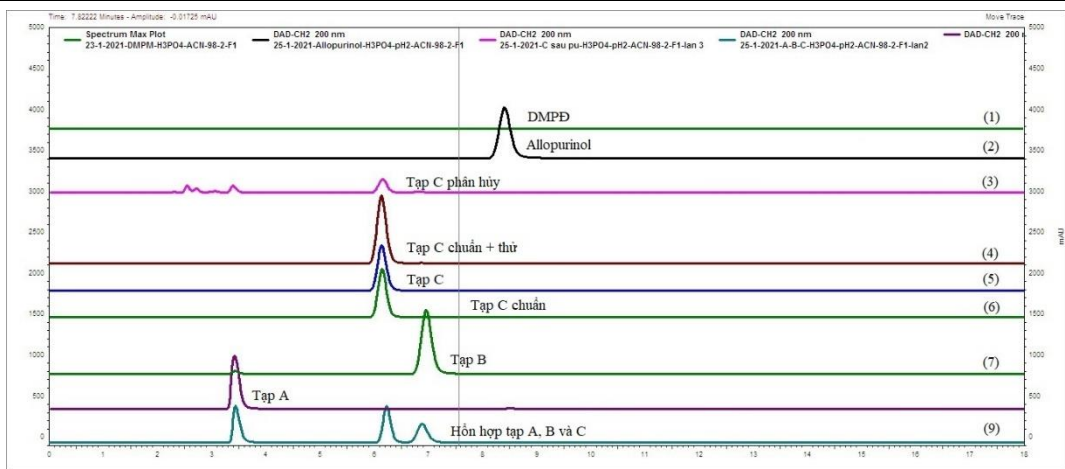
		tR (phút)	S (mAU.phút)	As	Rs	N	k'
XTB	UV 200nm	6,153	33.027.230	1,05	3,06	5075,21	3,02
	Max plot	6,153	34.512.902	1,07	3,06	5023,19	3,03
RSD%	UV 200nm	0,217	1,013	0,172	0,225	0,713	0,523
	Max plot	0,217	1,301	0,156	0,230	0,531	0,523

Nhận xét: RSD của các thông số sắc ký ứng với mẫu chuẩn khi tiêm lặp lại 6 lần liên tiếp đều nhỏ hơn 2%. Như vậy, quy trình đạt tính tương thích hệ thống.

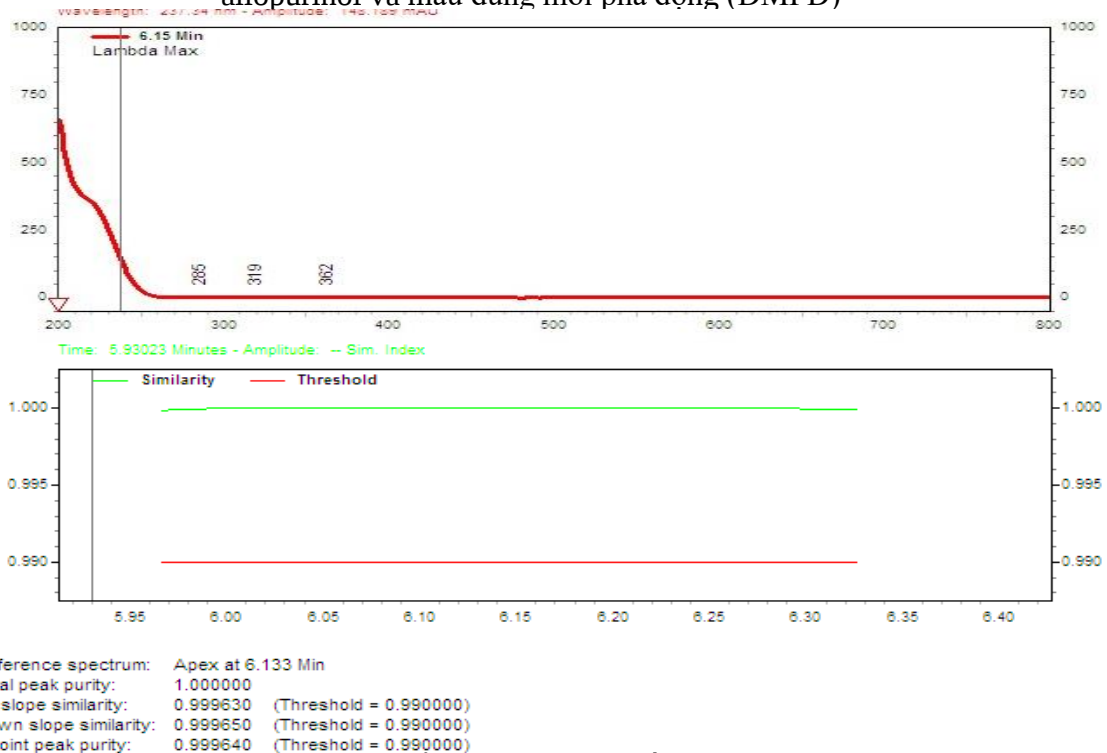
3.2. Thẩm định quy trình định lượng

3.2.1. Độ đặc hiệu

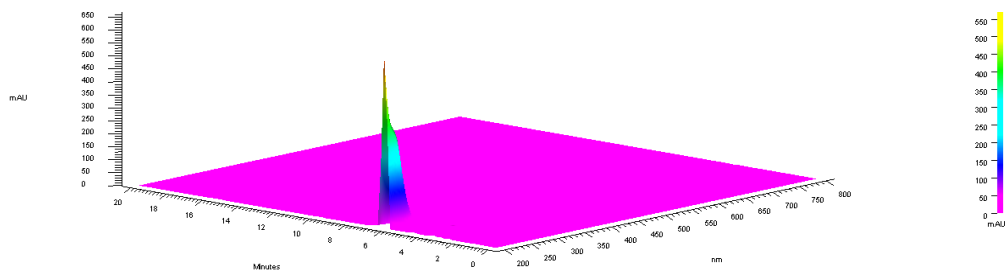
Phân tích đồng thời mẫu chuẩn tạp C, chuẩn tạp A, chuẩn tạp B, mẫu thử tạp C, mẫu chuẩn thêm thử tạp C, mẫu phân hủy tạp C trong HCl 1N trong 24 giờ, mẫu hỗn hợp tạp A, B và C, mẫu allopurinol và mẫu pha động ở hình 2.



Hình 2. Kết quả overlay mẫu chuẩn TẬP C, chuẩn TẬP A, chuẩn TẬP B, mẫu thử TẬP C, mẫu chuẩn thêm thử TẬP C, mẫu phân hủy TẬP C, mẫu hỗn hợp TẬP A, B và C, mẫu allopurinol và mẫu dung môi pha động (DMPĐ)



Hình 3. Kiểm tra độ tinh khiết pic của TẬP C

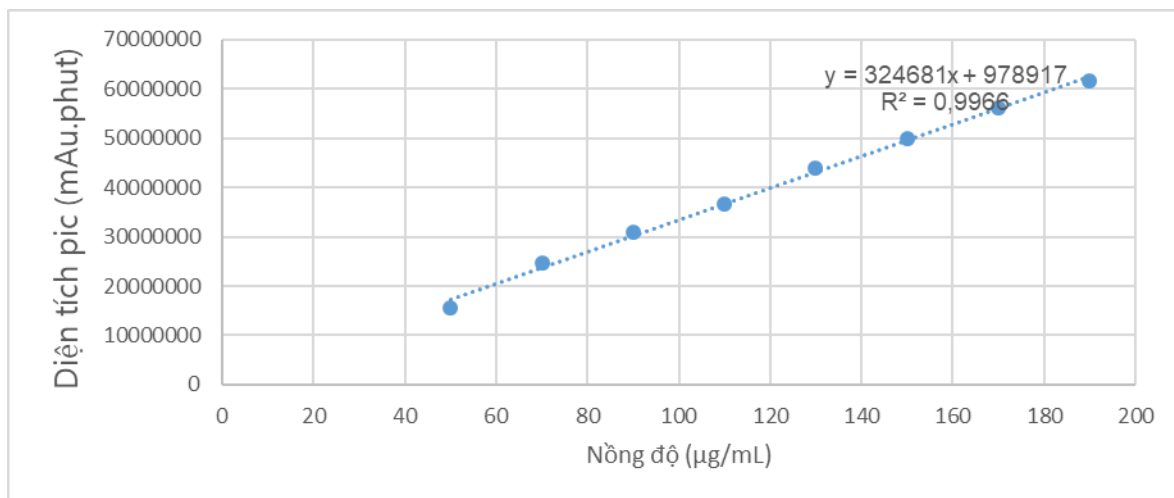


Hình 4. Phổ 3D của pic TẬP C

Nhận xét: Thời gian lưu của mẫu thử và mẫu chuẩn tạp C là như nhau. Trên sắc kí đồ mẫu hỗn hợp tạp A, B và C, pic tạp C tách hoàn toàn với pic tạp A và pic tạp B. Các pic của sản phẩm phân hủy không trùng thời gian lưu với pic tạp C. Hệ số chồng phổ UV của pic tạp C trong sắc ký đồ mẫu thử và mẫu chuẩn bằng 1,00. Như vậy, quy trình đạt độ đặc hiệu.

3.2.2. Tính tuyến tính

Phân tích sắc ký 8 mẫu chuẩn tạp C allopurinol có nồng độ từ 50–190 µg/mL. Trong khoảng nồng độ khảo sát, có mối liên hệ tuyến tính giữa diện tích pic tạp C và nồng độ chất phân tích.



Hình 5. Đồ thị tương quan giữa diện tích đỉnh và nồng độ tạp C allopurinol chuẩn

Nhận xét: Giá trị thống kê cho thấy hệ số b của phương trình hồi quy không có ý nghĩa thống kê, phương trình hồi quy của tạp C allopurinol là $y=324681x$ với $R^2=0,9966$, có ý nghĩa trong khoảng nồng độ [50-190] µg/mL.

3.2.3. Độ chính xác trung gian

Khảo sát độ lặp lại được thực hiện trong 3 ngày liên tiếp với cùng điều kiện làm việc và người thực hiện, kết quả được trình bày trong *bảng 2*.

Bảng 2. Kết quả thẩm định độ chính xác trung gian

Giá trị (%)	UV 200nm	Max plot
Độ tinh khiết trung bình XTB	99,55	98,46
Độ lệch chuẩn tương đối RSD%	0,19	0,07
Khoảng tin cậy µ	99,36–99,74	98,40–98,53

Nhận xét: sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê được trình ở *bảng 2*. Chứng minh quy trình ổn định có thể áp dụng cho các khoảng thời gian phân tích khác nhau.

3.2.4. Độ đúng

Tỷ lệ phục hồi ở mỗi nồng độ riêng biệt và tỷ lệ phục hồi trung bình đều nằm trong giới hạn yêu cầu 98,0%–102,0% theo hướng dẫn của Cục Quản lý Dược Việt Nam–Sở tay đăng ký thuốc. Như vậy, quy trình đạt độ đúng.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ đúng

Mức nồng độ chuẩn thêm vào (%)	Diện tích pic (mAu.phút)					Độ thu hồi (%)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình	RSD (%)	
50	25.387.992	25.374.881	25.480.409	25.414.427	0,19	101,04
100	33.607.167	33.989.307	33.628.950	33.741.808	0,52	101,81
150	41.762.441	41.227.450	41.922.865	41.637.585	0,71	100,30

3.2.5. Giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng

- Giới hạn phát hiện LOD: tiến hành sắc kí dung môi pha mẫu và tạp C allopurinol ở nồng độ có chiều cao pic gấp 3 lần chiều cao dung môi pha mẫu. Giá trị LOD đạt: (0,25 µg/mL).

- Giới hạn định lượng LOQ: tiến hành sắc kí tạp C allopurinol ở nồng độ gấp 3 lần LOD. Giá trị LOQ đạt: (0,75 µg/mL).

Bảng 4. Kết quả giới hạn định lượng LOQ (0,75 µg/mL)

Lần đo	N (mAu)	S (mAu)	S/N
1	0,9	9	10
2	0,8	8,4	10,5
3	0,85	9,0	10,6
4	0,9	9,5	10,6
5	0,8	8,2	10,25
6	0,8	8,0	10
Trung bình	0,84	8,7	10,325

3.3. Sử dụng quy trình xác định độ tinh khiết đánh giá lại độ tinh khiết sản phẩm tạp C allopurinol tổng hợp

Tiến hành xác định độ tinh khiết của 3 lô sản xuất tạp C allopurinol, với mỗi lô sản xuất có khối lượng là 2 g tạp C-allopurinol. Kết quả được trình bày trong bảng 5.

Bảng 5. Độ tinh khiết tạp C allopurinol tổng hợp

Lô	Độ tinh khiết (%) UV 200nm				Trung bình	RSD(%)
	Lần 1	Lần 2	Lần 3	Trung bình		
1	99,56	99,85	99,37	99,59	99,60	0,05
2	99,79	99,58	99,32	96,56		
3	99,95	99,76	99,31	96,67		

Nhận xét: tạp C tổng hợp được từ quy trình tổng hợp với các điều kiện tốt nhất trong mỗi yếu tố đạt độ tinh khiết cao (với độ tinh khiết trung bình 99,60% theo phương pháp so với chuẩn, tại bước sóng 200nm, RSD <2%).

IV. BÀN LUẬN

Quy trình xác định độ tinh khiết của tạp chất C allopurinol bằng HPLC-DAD, cho thấy tính đặc hiệu của pic tạp C tách hoàn toàn khỏi các sản phẩm phân hủy và hai tạp A, B của allopurinol. Trong đó tạp A là nguyên liệu chính trong quá trình tổng hợp tạp C allopurinol. Thời gian lưu trong quy trình cho thấy pic tạp C là 6,2 phút và pic tạp B là 7,0 phút tách hoàn toàn, so sánh với quy trình ĐĐVN V xác định giới hạn tạp chất allopurinol trong nguyên liệu có thời gian lưu tạp B và C cùng 6,1 phút. Giới hạn tạp chất C của

allopurinol trong nguyên liệu theo ĐĐVN V là 0,2%, BP 2018 là 0,2% và trong USP 43 là 0,1%. Giới hạn tạp C trong viên nén allopurinol theo BP 2018 là không quá 0,2%.

V. KẾT LUẬN

Kết quả thẩm định phương pháp HPLC-DAD để xác định độ tinh khiết của tạp C allopurinol theo ICH và thẩm định theo sổ tay đăng ký thuốc của Cục Quản lý Dược cho thấy quy trình này phù hợp với hệ thống sắc ký và đảm bảo độ đặc hiệu, với độ đúng nằm trong khoảng 98–102%, độ chính xác cao (RSD <2%), Khoảng tuyến tính [50–190 µg/mL]; LOD=0,25 µg/mL; LOQ=0,75 µg/mL.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2013), *Sổ tay hướng dẫn đăng ký thuốc – phụ lục 8: Thẩm định phương pháp phân tích*. Hà Nội, trang 49-52.
2. Bộ Y tế (2015), *Dược thư Quốc gia Việt Nam*. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội, trang 162-165.
3. Bộ Y tế (2018), *Dược điển Việt Nam V*. NXB Y học, Hà Nội, trang 55-58.
4. Bộ Y tế (2018), *Thông tư 19/2018/TT-BYT ngày 30/08/2018, Ban hành Danh mục thuốc thiết yếu – Phụ lục 1: Danh mục thuốc hóa dược, vắc xin, sinh phẩm thiết yếu*, Hà Nội.
5. British Pharmacopoeia (2018), *Software*.
6. Debabrata Sanyal, Jitendra Verdia, Narendra Joshi (2015), Gentoxic impurities in active pharmaceutical ingredients, *European Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 2(5), pp. 973-989.
7. ICH (2005), Q1A (R2) Stability testing of new drug substances and products. *European Medicines Agency*, pp. 5-16.
8. ICH (2005), Q2 (R1) *Validation of analysis procedures: Text and methodology*. ICH Harmonised Tripartite Guideline, pp. 1-13.
9. Makoto Osabe, Masahiro Tohkin, 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.
10. Philip D. Gresse, Josep F. Gallelli (1968), Quantitative Analysis and Alkaline Stability Studies of Allopurinol, *Journal of Pharmaceutical*, 57(2), pp. 335-338.
11. Richard H. Wilep and Albert J. Hart (1953), Reaction of diformylhydrazine with aminoheterocycles, *The Journal of Organic Chemistry*, 18 (10), pp. 1368-1371.
12. Steven A. Benezra, T. Reney Bennett (1978), *Analytical Profiles of Drug Substances*, 7, The Squibb Institute for Medical Research New Brunswick, New Jersey, pp.1-17.
13. Yuan Huashing, Li Guotao, Liu Jian et al (2014), *Synthesis method of allopurinol impurity C*. United State patent and trademark office.

(Ngày nhận bài: 07/04/2021 - Ngày duyệt đăng: 25/05/2021)
