

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

**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**

**TP. HỒ CHÍ MINH, Năm 2021**

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO**

**BỘ Y TẾ**

**ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH**

**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**

**NGÀNH: KIỂM NGHIỆM THUỐC**

**MÃ SỐ: 62720410**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC**

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS.TS. NGUYỄN ĐỨC TUẤN**

**PGS.TS. ĐẶNG VĂN TỊNH**

**TP. HỒ CHÍ MINH, Năm 2021**

## LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các kết quả trong luận án này là trung thực và chưa từng công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả

TRẦN VĂN MƯỜI

## DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Ký hiệu, chữ viết tắt	Từ nguyên	Tiếng Việt
ACN	Acetonitrile	
ACRS	Asean chemical reference substance	Chất chuẩn đối chiếu hóa học Asean
7-ADCA	7-amino-3-desacetoxycephalosporanic acid	
As	Asymmetric factor	Hệ số bất đối
BMIM-BF <sub>4</sub>	1-Buthyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate	
BP	British Pharmacopoeia	Dược điển Anh
CDC		Chất đối chiếu
CCDC		Chất chuẩn đối chiếu
CP	Captopril	
CPDS	Captopril disulfide	
CTCL		Chỉ tiêu chất lượng
<i>d</i>	Doublet	Đỉnh đôi
DCM	Dichloromethane	
<i>dd</i>	Doublet of doublets	Đỉnh đôi - đôi
ĐĐVN		Dược điển Việt Nam
DSC	Differential scanning calorimetry	Phân tích nhiệt quét vi sai
<i>dt</i>	Doublet of triplets	Đỉnh đôi - ba
EtOAc	Ethyl acetate	
EP	European Pharmacopoeia	Dược điển Châu Âu
$[\alpha]_D^{25}$ ( $[\alpha]_D^{20}$ )		Năng lực triển quang ở 25 hoặc 20 °C
GTĐ		Giá trị ấn định

HDDĐ		Hội đồng Dược điển
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
Hz	Hertz	
ICRS	International chemical reference standard	Chất chuẩn đối chiếu hóa học quốc tế
IR	Infrared	Hồng ngoại
LOD	Limit of detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of quantitation	Giới hạn định lượng
M		Phân tử lượng
<i>m</i>	Multiplet	Đỉnh bội
MS	Mass spectrum	Phổ khối
N	Number of theoretical plates	Số đĩa lý thuyết
NMR	Nuclear magnetic resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
NLDC		Nguyên liệu đối chiếu
NSX		Nhà sản xuất
PCRS	Primary chemical reference standard	Chất chuẩn đối chiếu hóa học gốc
PDA	Photo diode array	Dãy diod quang
PGA	Penicillin G acylase	
Phổ <sup>1</sup> H-NMR		Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton <sup>1</sup> H
Phổ <sup>13</sup> C-NMR		Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon <sup>13</sup> C
ppm	Part per million	Phần triệu
PTN		Phòng thí nghiệm
<i>q</i>	Quadruplet	Đỉnh bốn
Rs	Resolution	Độ phân giải
RSD	Relative standard deviation	Độ lệch chuẩn tương đối

S	Peak area	Diện tích pic
<i>s</i>	Singlet	Đỉnh đơn
SCRS	Secondary chemical reference standard	Chất chuẩn đối chiếu hóa học thứ cấp
SD	Standard deviation	Độ lệch chuẩn
SKĐ		Sắc ký đồ
SKLM		Sắc ký lớp mỏng
S/N	Signal/Noise	Tỷ số tín hiệu/nhiều
<i>t</i>	Triplet	Đỉnh ba
TB		Trung bình
TCCL		Tiêu chuẩn chất lượng
TGA	Thermo gravimetric analysis	Phân tích nhiệt trọng lượng
tt/tt		Thể tích/thể tích
tt/tt/tt		Thể tích/thể tích/thể tích
$t_R$	Retention time	Thời gian lưu
$U_{bb}$	Uncertainty	Độ không đảm bảo đo
USP	United States Pharmacopoeia	Dược điển Mỹ
UV	Ultraviolet	Tử ngoại
UV-Vis	Ultraviolet - Visible	Tử ngoại – khả kiến
$\delta_C$ ( $\delta_H$ )	Chemical shift	Độ dịch chuyển hóa học của $^{13}C$ và $^1H$

## DANH MỤC CÁC BẢNG

	<b>Trang</b>
<b>Bảng 1.1.</b> Phương pháp và giới hạn các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm theo dược điển Việt Nam và dược điển tham chiếu .....	22
<b>Bảng 2.1.</b> Một số nguyên liệu, chất chuẩn dùng trong nghiên cứu .....	36
<b>Bảng 2.2.</b> Một số dung môi, hóa chất dùng trong nghiên cứu .....	37
<b>Bảng 2.3.</b> Trang thiết bị chính dùng trong nghiên cứu .....	38
<b>Bảng 3.1.</b> Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ sắt (III) clorid đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) .....	66
<b>Bảng 3.2.</b> Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thể tích acid hydrochloric đậm đặc với nồng độ sắt (III) clorid 8% đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid .....	66
<b>Bảng 3.3.</b> Kết quả khảo sát ảnh hưởng của khối lượng iod đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) .....	67
<b>Bảng 3.4.</b> Kết quả khảo sát ảnh hưởng của khối lượng kali iodid đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) .....	67
<b>Bảng 3.5.</b> Kết quả khảo sát ảnh hưởng của khối lượng kali permanganat đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) .....	67
<b>Bảng 3.6.</b> Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thể tích acid sulfuric đậm đặc với khối lượng kali permanganat đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid .....	68
<b>Bảng 3.7.</b> Kết quả khảo sát ảnh hưởng của khối lượng kali dicromat đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) .....	68
<b>Bảng 3.8.</b> Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thể tích acid sulfuric đậm đặc, khối lượng kali dicromat đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) ...	68
<b>Bảng 3.9.</b> Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thể tích hydrogen peroxyd 30% (100 thể tích) đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) .....	69
<b>Bảng 3.10.</b> Hiệu suất tổng hợp, tinh chế và toàn qui trình (n = 3) .....	69
<b>Bảng 3.11.</b> Mã hóa các yếu tố khảo sát qui trình tổng hợp captopril disulfid .....	70
<b>Bảng 3.12.</b> Bố trí thí nghiệm Box-Behnken mức cơ bản kiểu bề mặt đáp ứng và hiệu suất trung bình toàn qui trình tương ứng với từng thí nghiệm ....	70

<b>Bảng 3.13.</b> Kết quả tối ưu hóa qui trình tổng hợp captopril disulfid .....	72
<b>Bảng 3.14.</b> Hiệu suất phản ứng tổng hợp captopril disulfid theo điều kiện dự đoán .....	72
<b>Bảng 3.15.</b> Khối lượng sản phẩm thô thu được sau phản ứng thủy phân cephalixin với enzym PGA.....	76
<b>Bảng 3.16.</b> Hiệu suất điều chế hai tạp chất của cephalixin.....	80
<b>Bảng 3.17.</b> Kết quả khảo sát ảnh hưởng của khối lượng hỗn hợp $\text{SiO}_2 - \text{HNO}_3$ .....	80
<b>Bảng 3.18.</b> Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng .....	81
<b>Bảng 3.19.</b> Khối lượng sản phẩm D sau khi tinh chế .....	82
<b>Bảng 3.20.</b> Hiệu suất tổng hợp tạp A của nifedipin .....	84
<b>Bảng 3.21.</b> Hiệu suất tổng hợp tạp B của nifedipin .....	85
<b>Bảng 3.22.</b> Hiệu suất tinh chế sản phẩm A bằng sắc ký cột .....	85
<b>Bảng 3.23.</b> Hiệu suất điều chế các tạp .....	88
<b>Bảng 3.24.</b> Giá trị các thông số sắc ký với các tỷ lệ pha động khảo sát .....	91
<b>Bảng 3.25.</b> Giá trị các thông số sắc ký với các nhiệt độ cột khảo sát .....	92
<b>Bảng 3.26.</b> Bảng tóm tắt điều kiện sắc ký của các qui trình kiểm tra độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. ....	98
<b>Bảng 3.27.</b> Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống.....	99
<b>Bảng 3.28.</b> Kết quả xác định miền giá trị, độ đúng, độ chính xác của các qui trình phân tích các tạp chất.....	107
<b>Bảng 3.29.</b> Kết quả xác định độ tinh khiết (%) tính theo chế phẩm nguyên trạng của các tạp chất bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao .....	108
<b>Bảng 3.30.</b> Kết quả xác định độ tinh khiết (%) các tạp chất bằng phương pháp DSC và hàm ẩm bằng phương pháp TGA .....	108
<b>Bảng 3.31.</b> Kết quả đánh giá captopril disulfid .....	109
<b>Bảng 3.32.</b> Kết quả đánh giá tạp D của amlodipin.....	109
<b>Bảng 3.33.</b> Kết quả đánh giá <i>D</i> -phenylglycin và 7-ADCA.....	110
<b>Bảng 3.34.</b> Kết quả đánh giá tạp A và B của nifedipin .....	110
<b>Bảng 3.35.</b> Khối lượng chất khảo sát đóng trong 1 lọ và số lọ đóng được. ....	111



<b>Bảng 3.36.</b> Kết quả đánh giá đồng nhất lọ của các chất khảo sát sau khi đóng gói .....	112
<b>Bảng 3.37.</b> Kết quả phân tích robust A của captopril disulfid .....	113
<b>Bảng 3.38.</b> Kết quả phân tích robust A của 7-ADCA .....	114
<b>Bảng 3.39.</b> Kết quả phân tích robust A của <i>D</i> -phenylglycin .....	114
<b>Bảng 3.40.</b> Kết quả phân tích robust A của tạp D amlodipin .....	115
<b>Bảng 3.41.</b> Kết quả phân tích robust A của tạp A nifedipin .....	115
<b>Bảng 3.42.</b> Kết quả phân tích robust A của tạp B nifedipin .....	116
<b>Bảng 3.43.</b> Tóm tắt kết quả xác định giá trị ấn định và công bố các tạp đối chiếu	116
<b>Bảng 3.44.</b> Kết quả kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp captopril disulfid trên mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử giả lập .....	118
<b>Bảng 3.45.</b> Kết quả xác định miền giá trị, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác của qui trình kiểm tra tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm chứa captopril .....	121
<b>Bảng 3.46.</b> Kết quả định lượng tạp captopril disulfid trong một số nguyên liệu và chế phẩm captopril trên thị trường (n = 3) .....	123
<b>Bảng 3.47.</b> Kết quả kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng 7-ADCA và <i>D</i> -phenylglycin trong nguyên liệu và thành phẩm cephalixin ..	124
<b>Bảng 3.48.</b> Kết quả kiểm tra tạp 7-ADCA và <i>D</i> -phenylglycin trong một số nguyên liệu và chế phẩm cephalixin trên thị trường (n = 6) .....	125
<b>Bảng 3.49.</b> Kết quả kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp D của amlodipin trong nguyên liệu và thành phẩm amlodipin .....	126
<b>Bảng 3.50.</b> Kết quả kiểm tra tạp D của amlodipin trong một số nguyên liệu và chế phẩm chứa amlodipin besilat trên thị trường (n = 6) .....	127
<b>Bảng 3.51.</b> Kết quả kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong thành phẩm chứa nifedipin trên mẫu chuẩn (n = 6). .....	128
<b>Bảng 3.52.</b> Kết quả kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong nguyên liệu nifedipin trên mẫu chuẩn.....	128

<b>Bảng 3.53.</b> Kết quả kiểm tra tạp A và tạp B của B nifedipin trong một số nguyên liệu và chế phẩm nifedipin trên thị trường .....	129
--	-----

## DANH MỤC CÁC HÌNH

	<b>Trang</b>
<b>Hình 1.1.</b> Cấu trúc hóa học của captopril disulfid .....	3
<b>Hình 1.2.</b> Phản ứng phân hủy captopril với tác nhân oxy không khí .....	4
<b>Hình 1.3.</b> Tổng hợp captopril disulfid với tác nhân oxy không khí, môi trường [BMIM]-BF <sub>4</sub> và Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> .....	5
<b>Hình 1.4.</b> Các phương pháp cố định enzym phổ biến .....	8
<b>Hình 1.5.</b> Cấu trúc hóa học của acid 7-aminodesacetoxycephalosporanic .....	9
<b>Hình 1.6.</b> Sơ đồ điều chế cephalixin bằng phương pháp hóa học .....	10
<b>Hình 1.7.</b> Sơ đồ tổng hợp cephalixin với xúc tác enzym PGA .....	11
<b>Hình 1.8.</b> Sơ đồ tổng hợp 7-ADCA theo Yeh và cộng sự .....	12
<b>Hình 1.9.</b> Cấu trúc hóa học của <i>D</i> -phenylglycin .....	12
<b>Hình 1.10.</b> Sơ đồ tổng hợp <i>D</i> -phenylglycin từ benzaldehyd.....	13
<b>Hình 1.11.</b> Tổng hợp <i>D</i> -phenylglycin bằng phương pháp vi sinh vật.....	14
<b>Hình 1.12.</b> Cấu trúc hóa học của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl] -4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat (tạp D amlodipin) .....	14
<b>Hình 1.13.</b> Nguồn gốc hình thành tạp D của amlodipin .....	15
<b>Hình 1.14.</b> Tổng hợp N-(2-hydroxyethyl)phthalimid [II] .....	15
<b>Hình 1.15.</b> Tổng hợp ethyl-4-[2-phthalimido ethoxy] acetoacetat [III] .....	15
<b>Hình 1.16.</b> Tổng hợp ethyl-2-(clorobenzylidin)-4-[2- (phthalimido)ethoxy]acetoacetat [IV] .....	16
<b>Hình 1.17.</b> Tổng hợp phthaloyl amlodipin [V] .....	16
<b>Hình 1.18.</b> Oxy hóa phthaloyl amlodipin .....	17
<b>Hình 1.19.</b> Thủy phân sản phẩm [VI] tạo 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5- dicarboxylat [VII].....	17
<b>Hình 1.20.</b> Cấu trúc hóa học của tạp A nifedipin .....	18
<b>Hình 1.21.</b> Sự hình thành tạp A của nifedipin .....	18

<b>Hình 1.22.</b> Cấu trúc hóa học của tạp B nifedipin .....	19
<b>Hình 1.23.</b> Sự hình thành tạp B của nifedipin .....	19
<b>Hình 2.1.</b> Phản ứng oxy hóa captopril bằng hydrogen peroxyd .....	41
<b>Hình 2.2.</b> Phản ứng oxy hóa phthaloyl amlodipin bởi hỗn hợp $\text{SiO}_2 - \text{HNO}_3$ .....	47
<b>Hình 2.3.</b> Phản ứng thủy phân sản phẩm trung gian với xúc tác là methylamin hoặc xúc tác hydrazin .....	47
<b>Hình 2.4.</b> Phản ứng oxy hóa nifedipin với tác nhân acid nitric .....	49
<b>Hình 2.5.</b> Phản ứng quang oxy hóa nifedipin .....	50
<b>Hình 3.1.</b> Bề mặt đáp ứng hiệu suất toàn qui trình theo các yếu tố khảo sát .....	71
<b>Hình 3.2.</b> Hiệu suất dự đoán, ý nghĩa của phương trình và các hệ số .....	71
<b>Hình 3.3.</b> Công thức cấu tạo của captopril disulfid .....	74
<b>Hình 3.4.</b> Sắc ký đồ sản phẩm thủy phân của cephalixin .....	74
<b>Hình 3.5.</b> Sắc ký đồ các phân đoạn thu được từ sắc ký cột .....	75
<b>Hình 3.6.</b> Sắc ký đồ sản phẩm thủy phân của cephalixin với xúc tác enzym trong môi trường nước.....	77
<b>Hình 3.7.</b> Sắc ký đồ xác định độ tinh khiết sản phẩm A và B .....	78
<b>Hình 3.8.</b> Cấu trúc hóa học của <i>D</i> -phenylglycin .....	80
<b>Hình 3.9.</b> Cấu trúc hóa học của 7-ADCA .....	80
<b>Hình 3.10.</b> Cấu trúc hóa học của sản phẩm trung gian.....	82
<b>Hình 3.11.</b> Cấu trúc hóa học tạp D của amlodipin .....	84
<b>Hình 3.12.</b> Cấu trúc hóa học tạp A của nifedipin .....	87
<b>Hình 3.13.</b> Cấu trúc hóa học tạp B của nifedipin .....	88
<b>Hình 3.14.</b> Sắc ký đồ dung dịch captopril disulfid 1000 $\mu\text{g/ml}$ với các pha động khảo sát .....	90
<b>Hình 3.15.</b> Sắc ký đồ dung dịch captopril disulfid 1000 $\mu\text{g/ml}$ với các pH khảo sát.....	92
<b>Hình 3.16.</b> Sắc ký đồ <i>D</i> -phenylglycin với các điều kiện sắc ký khảo sát .....	93
<b>Hình 3.17.</b> Sắc ký đồ dung dịch cephalixin 1000 $\mu\text{g/ml}$ , <i>D</i> -phenylglycin 100 $\mu\text{g/ml}$ và 7-ADCA 100 $\mu\text{g/ml}$ với điều kiện (1).....	94

<b>Hình 3.18.</b> Sắc ký đồ 7-ADCA với các điều kiện sắc ký khảo sát .....	96
<b>Hình 3.19.</b> Phổ UV tại thời gian lưu của pic 7-ADCA khi khảo sát với điều kiện (2).....	96
<b>Hình 3.20.</b> Sắc ký đồ dung dịch 7-ADCA 100 µg/ml, <i>D</i> -phenylglycin 100 µg/ml và cephalixin 1000 µg/ml với điều kiện (2) .....	97
<b>Hình 3.21.</b> Sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu của phương pháp xác định độ tinh khiết captopril disulfid .....	100
<b>Hình 3.22.</b> Phổ UV – Vis tại thời gian lưu và sắc ký đồ 3 chiều của captopril disulfid .....	100
<b>Hình 3.23.</b> Sắc ký đồ pha động, dung môi pha mẫu và mẫu phân hủy của tạp <i>D</i> -phenylglycin .....	101
<b>Hình 3.24.</b> Kết quả sắc ký <i>D</i> -phenylglycin .....	102
<b>Hình 3.25.</b> Sắc ký đồ pha động, dung môi pha mẫu và mẫu phân hủy tạp 7-ADCA .....	103
<b>Hình 3.26.</b> Kết quả sắc ký tạp 7-ADCA .....	103
<b>Hình 3.27.</b> Phổ UV tại thời gian lưu và độ tinh khiết của chuẩn tạp <i>D</i> amlodipin	104
<b>Hình 3.28.</b> Phổ UV tại thời gian lưu và độ tinh khiết của pic tạp <i>D</i> amlodipin....	104
<b>Hình 3.29.</b> Sắc ký đồ mẫu trắng (a), pha động (b), mẫu thử tạp A (c) .....	105
<b>Hình 3.30.</b> Sắc ký đồ 3 chiều của mẫu thử tạp A .....	105
<b>Hình 3.31.</b> Phổ UV-Vis tại thời gian lưu và biểu đồ minh họa độ tinh khiết pic tạp A .....	105
<b>Hình 3.32.</b> Sắc ký đồ mẫu trắng (a), pha động (b), mẫu thử tạp B (c) .....	106
<b>Hình 3.33.</b> Sắc ký đồ 3 chiều mẫu thử tạp B .....	106
<b>Hình 3.34.</b> Phổ UV - Vis tại thời gian lưu và biểu đồ minh họa độ tinh khiết pic tạp B.....	106
<b>Hình 3.35.</b> Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn captopril và captopril disulfid trong nguyên liệu và chế phẩm chứa captopril .....	117
<b>Hình 3.36.</b> Sắc ký đồ mẫu thử giả lập nguyên liệu và thành phẩm .....	117
<b>Hình 3.37.</b> Sắc ký đồ các mẫu phân tích khi thẩm định tính đặc hiệu. ....	120

<b>Hình 3.38.</b> Sắc ký đồ dung dịch đối chiếu (3) và (4) trong kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng 7-ADCA và <i>D</i> -phenylglycin.....	124
<b>Hình 3.39.</b> Sắc ký đồ dung dịch đối chiếu (5) trong kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng 7-ADCA và <i>D</i> -phenylglycin .....	125
<b>Hình 3.40.</b> Sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch phân giải trong kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp D của amlodipin .....	126
<b>Hình 3.41.</b> Sắc ký đồ dung dịch chuẩn khi kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong thành phẩm chứa nifedipin .....	127
<b>Hình 3.42.</b> Sắc ký đồ dung dịch chuẩn khi kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong nguyên liệu nifedipin.....	128
<b>Hình 4.1.</b> Cơ chế phản ứng tổng hợp captopril disulfid bằng cách oxy hóa captopril với tác nhân hydrogen peroxyd.....	132
<b>Hình 4.2.</b> Cơ chế phản ứng tổng hợp sản phẩm trung gian .....	136
<b>Hình 4.3.</b> Cơ chế phản ứng tổng hợp tạp D của amlodipin .....	137
<b>Hình 4.4.</b> Cơ chế phản ứng tổng hợp tạp A của nifedipin .....	139
<b>Hình 4.5.</b> Cơ chế phản ứng tổng hợp tạp B của nifedipin .....	141

## DANH MỤC CÁC SƠ ĐỒ

	<b>Trang</b>
<b>Sơ đồ 2.1.</b> Qui trình tổng hợp và tinh chế captopril disulfid với tác nhân hydrogen peroxyd .....	42
<b>Sơ đồ 2.2.</b> Qui trình tổng hợp 7-ADCA và <i>D</i> -phenylglycin bằng cách thủy phân cephalixin trong môi trường acid và kiềm .....	44
<b>Sơ đồ 2.3.</b> Qui trình tổng hợp 7-ADCA và <i>D</i> -phenylglycin bằng cách thủy phân cephalixin với xúc tác enzym trong môi trường dung dịch đệm phosphat pH 8 .....	45
<b>Sơ đồ 2.4.</b> Qui trình tổng hợp 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat (sản phẩm trung gian) ..	46
<b>Sơ đồ 2.5.</b> Qui trình tổng hợp tạp D của amlodipin bằng cách thủy phân sản phẩm trung gian với xúc tác methylamin .....	48
<b>Sơ đồ 2.6.</b> Qui trình tổng hợp tạp D của amlodipin bằng cách thủy phân sản phẩm trung gian với xúc tác hydrazin .....	48
<b>Sơ đồ 2.7.</b> Qui trình tổng hợp tạp A của nifedipin .....	49
<b>Sơ đồ 2.8.</b> Qui trình tổng hợp tạp B của nifedipin .....	51

## MỞ ĐẦU

Ngày nay, cùng với sự phát triển mạnh mẽ của ngành công nghiệp dược trên thế giới, ngành dược Việt Nam cũng đã phát triển và khẳng định được vị trí của mình. Trên cả nước, với khoảng 200 nhà máy sản xuất dược phẩm đạt GMP-WHO, sản xuất các thành phẩm đa phần là thuốc generic, đặc biệt là các thuốc kháng sinh, thuốc điều trị bệnh tim mạch... Thêm vào đó, hiện đang có nhiều nhà máy sản xuất nguyên liệu dược ở nước ngoài mà nước ta phụ thuộc rất nhiều vào nguồn nguyên liệu nhập khẩu nên việc kiểm tra chất lượng cần phải được đặt lên hàng đầu áp dụng cho nguyên liệu đầu vào trước khi đưa vào sản xuất cũng như thành phẩm trước và trong quá trình lưu hành thuốc.

Tạp chất là những hợp chất được tạo thành trong quá trình sản xuất, bảo quản và lưu thông phân phối của nguyên liệu và thành phẩm. Tạp chất 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. Nhiều chuyên luận trong hầu hết dược điển tham chiếu và dược điển Việt Nam V [1], [24], [35], [74] bắt buộc phải kiểm tra tạp chất trong nguyên liệu và thành phẩm như cephalexin, amlodipin, captopril, nifedipin, ... Trong khi đó, các tạp chuẩn được bán với giá rất đắt và phải nhập mua từ nước ngoài và đôi lúc không có sẵn trên thị trường, vì vậy gây khó khăn cho công tác kiểm nghiệm như tốn nhiều chi phí khi phải mua tạp chuẩn từ nước ngoài, mất thời gian đặt hàng và không chủ động trong công tác kiểm nghiệm.

Hiện nay, các thuốc kháng sinh nhóm cephalexin và các thuốc tim mạch captopril, amlodipin, nifedipin được đa số các nhà máy trong nước sản xuất và đã được các bác sĩ sử dụng điều trị cho người bệnh từ trước đến nay. Chỉ tiêu tạp chất liên quan trong thuốc và nguyên liệu làm thuốc là bắt buộc và đã được Cục quản lý Dược - Bộ Y tế qui định. Tuy nhiên, nguồn tạp đối chiếu hiện nay đang là mục tiêu hàng đầu cần phải giải quyết của nhà quản lý. Các nhà khoa học Dược cũng tập trung, nỗ lực nghiên cứu các quy trình tổng hợp nhằm bổ sung nguồn tạp chuẩn cho hệ thống kiểm nghiệm quốc gia. Do đó, việc lựa chọn các tạp chất của các hoạt chất



này làm đối tượng nghiên cứu trong luận án để nghiên cứu điều chế và tiêu chuẩn hóa tạp chất lựa chọn nhằm hướng tới thiết lập tạp chuẩn góp phần thuận lợi trong công tác kiểm tra chất lượng thuốc, giúp giảm bớt chi phí mua tạp chuẩn từ nước ngoài và tăng danh mục tạp chuẩn thiết lập tại Việt Nam.

Xuất phát từ những lý do trên, đề tài “**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**” được thực hiện với mong muốn điều chế, đánh giá, xây dựng bộ dữ liệu chuẩn cho các tạp chất và thiết lập tạp chuẩn để phục vụ công tác kiểm nghiệm tạp chất liên quan của nguyên liệu và thành phẩm chứa hoạt chất tương ứng. Mục tiêu của đề tài là:

1. Xây dựng qui trình tổng hợp 6 tạp chất captopril disulfid, 7-ADCA, D-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin ở qui mô phòng thí nghiệm.
2. Xây dựng và thẩm định qui trình xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao.
3. Thiết lập được các tạp chuẩn captopril disulfid, 7-ADCA, D-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin đạt yêu cầu chất đối chiếu quốc gia.
4. Xây dựng và thẩm định qui trình định lượng tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm captopril bằng phương pháp sắc ký lỏng.
5. Ứng dụng các tạp chuẩn đã thiết lập trong kiểm nghiệm tạp captopril disulfid, 7-ADCA, D-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin trong một số nguyên liệu và thành phẩm tương ứng đang lưu hành trên thị trường.

## CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

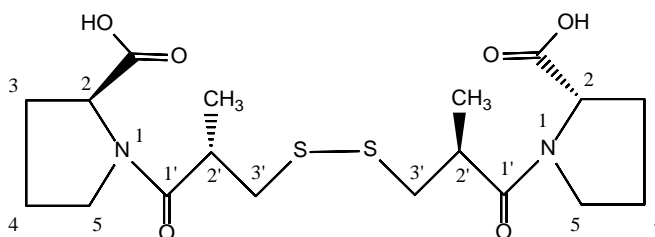
### 1.1. TỔNG QUAN TẠP CHẤT CAPTOPRIL DISULFID CỦA CAPTOPRIL

Tên quốc tế: captopril disulfid.

Tên khoa học: acid (2S,2'S)-1,1'-[disulphanediylbis[(2S)-2-methyl-1-oxopropan-3,1-diyl]-bis[pyrrolidin-2-carboxylic].

Công thức phân tử:  $C_{18}H_{28}N_2O_6S_2$ . Khối lượng phân tử 432,6 g/mol.

Công thức cấu tạo:



**Hình 1.1.** Cấu trúc hóa học của captopril disulfid

*Tính chất:* tinh thể trắng, vị đắng, mùi lưu huỳnh. Nhiệt độ nóng chảy 233 – 235 °C; ít tan trong nước, tan ít trong cloroform, ethyl acetat, dễ tan trong methanol [64].

*Nguồn gốc phát sinh:* captopril disulfid là sản phẩm phân hủy chủ yếu của captopril dưới tác động của các yếu tố môi trường như ánh sáng, oxy không khí [70].

*Độc tính:* lượng lớn captopril disulfid gây vị kim loại, khó chịu, làm giảm khả năng tuân thủ điều trị của bệnh nhân [46].

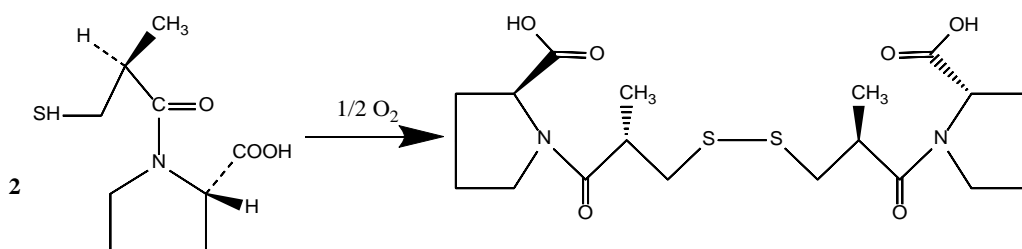
*Độc tính cấp:* LD<sub>50</sub> của captopril disulfid là 4,245 (g/kg). Captopril disulfid gây hạ huyết áp, tăng nhịp tim và suy thận hồi phục, ngứa, phát ban, rối loạn vị giác, dị ứng, mất bạch cầu, đau bụng, loét miệng, ho, thở khò khè và sung hạch bạch huyết. Sốc phản vệ cũng có thể xảy ra, hạ huyết áp và suy thận có thể nghiêm trọng do làm giảm lượng nước tiểu, tuy nhiên, hiếm trường hợp tử vong do suy thận. Tình trạng sung hạch xảy ra ở lưỡi, môi, mặt, tứ chi và cổ họng có thể đe dọa tính mạng [32].

*Độc tính mãn:* Các nghiên cứu trên động vật cho thấy captopril disulfid gây độc hại đến sự phát triển của thai nhi ở nhiều cấp độ mà không gây độc hại đáng kể cho người mẹ. Sảy thai hoặc thai chết lưu có thể xảy ra. Tiếp xúc lâu dài với nồng độ captopril disulfid cao có thể gây ra thay đổi chức năng phổi, gây tình trạng ho dị

ứng, có thể gây rối loạn chức năng thận. Captopril disulfid có thể gây rối loạn tiết niệu và rối loạn collagen mạch máu, tăng trưởng các tuyến, nhưng hiếm khi gây ra bệnh ung thư ác tính [32].

### **Một số công trình nghiên cứu về tạp captopril disulfid**

Theo Hellen Karine Stulzer [71] và Julia Aparecida L. Souza [70] về thử độ ổn định viên nén captopril ở  $40 \pm 2$  °C, độ ẩm tương đối  $75 \pm 5\%$ , captopril bị phân hủy tạo captopril disulfid.



**Hình 1.2.** Phản ứng phân hủy captopril với tác nhân oxy không khí

"Nguồn: Souza J. A. L. và cộng sự, 2012" [70]

Do đó captopril disulfid là tạp chất liên quan của captopril cần phải được kiểm soát.

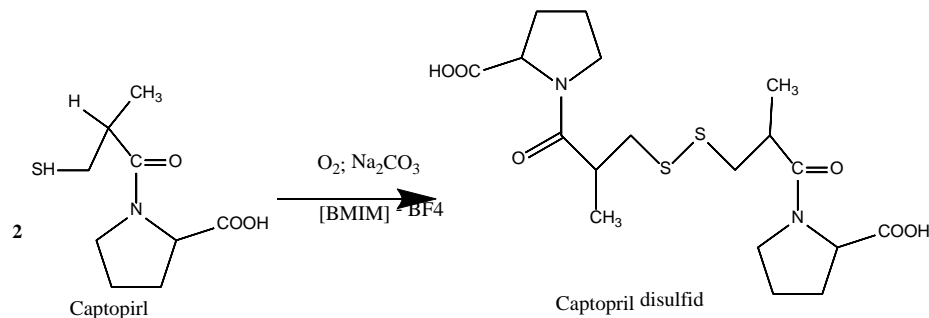
- Công trình nghiên cứu Waleed M.M. Mahmoud và Klaus Kümmerer khảo sát quá trình phân hủy captopril trong môi trường vi sinh, ánh sáng và nước cũng cho thấy sự oxy hóa captopril trong nước tạo sản phẩm captopril disulfid là chủ yếu [53].

- Nghiên cứu của Tak Yee Lee và Robert E. Notari về độ ổn định của dung dịch captopril ở pH 6,6–8,0, nhiệt độ 32 °C, dưới áp suất oxy riêng phần 90–760 mmHg, có và không có ion  $\text{Cu}^{2+}$  cũng cho kết quả tạo thành captopril disulfid [49].

- Nghiên cứu của Torreggiani A và cộng sự về phản ứng giữa captopril và ion  $\text{Cu}^{2+}$  cho thấy khi tỷ lệ  $\text{Cu}^{2+}$  và captopril là 1 : 1, thì captopril disulfid sẽ tạo thành. Ở tỷ lệ 0,5 : 1, hình thành phức tan captopril với  $\text{Cu}^{2+}$  ở pH 10 và một phức khác không tan ở pH 3 [73].

- Nghiên cứu của Seema S. Badi và Suresh M. Tuwar về động học của phản ứng oxy hóa captopril với tác nhân  $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$  ở 27 °C trong môi trường acid được điều chỉnh bởi  $\text{HClO}_4$  và  $\text{NaClO}_4$ , kết quả cho ra sản phẩm chủ yếu là captopril disulfid [22].

- Nghiên cứu của Singh D và cộng sự về qui trình tổng hợp các disulfid với tác nhân là oxy không khí, môi trường [BMIM]-BF<sub>4</sub> và Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, sản phẩm chính từ captopril là captopril disulfid [69].



**Hình 1.3.** Tổng hợp captopril disulfid với tác nhân oxy không khí, môi trường [BMIM]-BF<sub>4</sub> và Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

"Nguồn: Singh D. và cộng sự, 2010" [69]

- Nghiên cứu của Schaefer J. P. về sự tương tác *in vitro* giữa chế phẩm captopril 25 mg và FeSO<sub>4</sub> 300 mg cho thấy có sự tạo thành phức trong phản ứng giữa Fe<sup>3+</sup> với captopril và captopril disulfid là tinh thể màu trắng [64].

- Năm 1994, Alan F. Casy và Dewar đã dựa trên kết quả phổ NMR và MS của captopril, captopril disulfid và epicaptopril để đề xuất qui trình phát hiện tạp đồng phân và dựa vào phổ <sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) để phát hiện tạp oxy hóa của captopril [25].

- Nghiên cứu của Nafisur Rahman và Nishat Anwar về ứng dụng định lượng gián tiếp captopril dựa trên phản ứng oxy hóa của Fe<sup>3+</sup> và phản ứng tạo phức xanh của Fe<sup>2+</sup> với K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] cũng đề cập sản phẩm oxy hóa tạo thành là captopril disulfid [57].

- Năm 2004, Takashi Nishikawa đã công bố điều kiện sắc ký để phân tích 3 cặp đồng phân *cis-trans*, *cis-cis*, *trans-trans* captopril disulfid: pha động acetonitril – đệm phosphat pH 6,8 và nhiệt độ cột thấp hơn 12 °C [60].

- Năm 2011, Raquel Nogueira đã xây dựng qui trình định lượng tạp chất của captopril, pha động methanol – acid phosphoric, phát hiện 4 tạp chất, trong đó

captopril disulfid được tạo thành từ captopril trong acid hydrochloric 1 M, natri hydroxyd 1 M và nước oxy già 3% [61].

- Một nghiên cứu khác tổng hợp và thiết lập tạp chuẩn captopril disulfid cũng thu được captopril disulfid đạt độ tinh khiết 99,25% [11].

Từ các nghiên cứu trên, có thể nhận định captopril disulfid là sản phẩm phân hủy của captopril dưới tác động của môi trường như ánh sáng, oxy không khí. Ion  $\text{Cu}^{2+}$  tạo phức chất bền với captopril nên khó ứng dụng. Ion  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  tạo phức kém bền với captopril nên  $\text{Fe}^{3+}$  là tác nhân có khả năng tổng hợp captopril disulfid, tuy nhiên phức chất tạo thành khó tinh chế. [BMIM]- $\text{BF}_4$  là môi trường chọn lọc để tổng hợp captopril disulfid, nhưng đắt tiền và khó tinh chế.

## 1.2. TỔNG QUAN TẠP CHẤT 7-ADCA và D-PHENYLGLYCIN CỦA CEPHALEXIN

### 1.2.1. Tổng quan về enzym penicillin acylase và sự cố định hóa enzym

#### 1.2.1.1. Enzym penicillin acylase

- Penicillin G acylase (PGA) đã được thương mại hóa và sử dụng để thủy phân gốc acyl của penicillin G hoặc cephalosporin để tạo thành acid 6-aminopenicillanic (6-APA) hoặc acid 7-aminodesacetoxycephalosporanic (7-ADCA) là 2 chất trung gian chính trong sản xuất trên qui mô công nghiệp của các kháng sinh  $\beta$ -lactam bán tổng hợp. Mặt khác, PGA còn có thể được ứng dụng để tổng hợp nhiều kháng sinh đáng giá như các penicillin và cephalosporin bán tổng hợp, dựa trên sự kết hợp của các dẫn xuất acid phenylacetic thích hợp với một nhân  $\beta$ -lactam [44].

- Enzym PGA có thể được tạo ra từ vi khuẩn, nấm sợi, nấm men, actinomyces. Một điều thú vị là cho đến ngày nay, chức năng sinh học của enzym này vẫn chưa được sáng tỏ. Nó không có chức năng chống lại các kháng sinh penicillin tự nhiên như các  $\beta$ -lactamase. Ở vi khuẩn *Escherichia coli*, gen mã hóa cho PGA nằm trong nhóm gen liên quan đến chuyển hóa của acid 4-hydroxyphenylacetic, điều này cho phép dự đoán nó có chức năng trong sự phân hủy của các hợp chất vòng thơm [44].

- Penicillin acylase được chia thành 3 loại tùy theo loại cơ chất của nó. Penicillin V acylase (tuýp I) có ái lực với các dẫn xuất của acid phenoxyacetic trong khi

penicillin G acylase (tuýp II) có ái lực với các dẫn xuất của acic phenylacetic. Tuýp III là  $\alpha$ -aminoacyl hydrolase đặc biệt thủy giải các kháng sinh  $\alpha$ -aminoacyl  $\beta$ -lactam. Các enzym penicillin acylase được xếp vào nhóm enzym mới gọi là N-terminal nucleophile hydrolase hay NTN-hydrolase [44].

- Phương pháp sản xuất các kháng sinh  $\beta$ -lactam bán tổng hợp bằng enzym đã được nghiên cứu từ thập niên 1960. Cơ chế xúc tác chung được chấp nhận liên quan đến một phức hợp acyl-enzym trung gian, liên kết này sau đó bị nhân  $\beta$ -lactam chen vào. Quá trình tổng hợp các kháng sinh  $\beta$ -lactam bằng enzym có thể khởi đầu trực tiếp từ acid tự do, hoặc từ một dẫn xuất ester hoặc amid. Ở trường hợp đầu, phải đối mặt với vấn đề kiểm soát nhiệt động học, phải chuyển dịch cân bằng phản ứng về phía tạo ra sản phẩm. Mặc dù đã có nhiều cải tiến trong việc kiểm soát nhiệt động học của quá trình tổng hợp nhưng chiều phản ứng ngược lại (phản ứng phân hủy) vẫn là chiều ưu thế [44].

- Trở ngại chính trong việc kiểm soát động học của phản ứng tổng hợp chính là phản ứng thủy giải đi kèm: thủy phân gốc acyl hoạt hóa và phân hủy kháng sinh, giảm hiệu suất tổng hợp kháng sinh với tỉ lệ phản ứng tổng hợp/ thủy giải (synthesis/ hydrolysis – S/H) thấp. Do vậy, tỉ lệ S/H được sử dụng để chỉ ra hiệu suất của qui trình. Nhiều nỗ lực được thực hiện để thay đổi điều kiện phản ứng như tối ưu hóa pH, sử dụng dung dịch chất quá bão hòa hoặc dùng enzym cố định hóa, hệ thống tách loại sản phẩm tại chỗ, hệ hai pha lỏng - lỏng... Tuy nhiên, có thể thấy là đặc tính động học và bản chất của chất xúc tác sinh học có tác động chính lên hiệu suất của phản ứng tổng hợp [44].

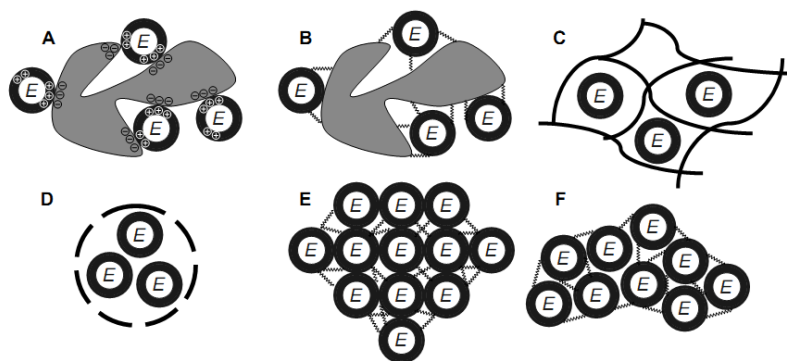
#### *1.2.1.2. Cố định hóa penicillin acylase*

- Việc cố định hóa enzym hiện nay là phổ biến, phần lớn để giảm thiểu chi phí giá thành enzym bằng cách làm cho enzym có thể tái sử dụng được nhiều lần. Điều này có nghĩa là enzym được cố định cấu trúc vật lý, thường là trên một chất nền polymer ở dạng các hạt hình cầu không tan vào trong dung dịch. Việc sử dụng một enzym được cố định hóa là một điều thuận tiện cho tiến trình tổng hợp bởi vì nó có thể được tách loại một cách dễ dàng bằng cách sàng lọc trong khi việc tách loại

enzym hòa tan ra khỏi dung dịch phản ứng thì tốn công sức và tiền bạc. Thêm vào đó, enzym được cố định hóa có khuynh hướng ổn định hơn là dạng hòa tan. Tuy nhiên, một số trở ngại là enzym mất đi một phần hoạt tính, thay đổi động học, và việc khuếch tán, chuyển khối bị giới hạn [44].

- Hiện có 5 phương pháp được áp dụng để cố định hóa enzym (Hình 1.4) [44]:

- Hấp phụ vật lý thông qua lực tĩnh điện hoặc tương tác kỵ nước trên bề mặt.
- Liên kết thông qua cầu nối hóa học trên bề mặt.
- Bất dính trong một nền gel có thể cho phép sự khuếch tán của các phân tử nhỏ cơ chất và sản phẩm nhưng giữ lại enzym.
- Lưu giữ vật lý trên một màng bán thấm.
- Cầu nối liên kết hóa học giữa các phân tử enzym hòa tan hoặc kết tụ enzym gây kết tủa hoặc enzym kết tinh, thường sử dụng glutaraldehyd như cầu nối liên kết.



**Hình 1.4.** Các phương pháp cố định enzym phổ biến: hấp phụ (A), liên kết (B), bất dính (C), lưu giữ trên màng (D), cầu nối tinh thể CLECs (E), và kết tập CLEAs (F)

"Nguồn: Janssen H. A., Michiel Sheldon R. A., 2006" [44]

- Do được sử dụng trên qui mô công nghiệp để thủy phân penicillin G, PGA cố định hóa trở thành một lĩnh vực được nghiên cứu rất nhiều. Kết quả là, mỗi phương pháp cố định hóa và gần như mỗi loại giá mang trên lý thuyết đều đã được sử dụng để cố định hóa penicillin acylase. Những giá mang này gồm: dẫn xuất agarose hoạt hóa, polyacrylamid và các copolymer acrylic như Eupergit C và Eupergit C 250 L thương mại, kieselguhr và celite, vật liệu silica (có các lỗ nano), các màng ép nylon, cầu nối kết tập enzym (CLEAs), đông tụ và kết tinh (CLECs), các dẫn xuất cầu nối

gel gelatin copolymer, polyvinyl alcol, và một polymer nhiệt hoạt “thông minh” có thể kết tủa ở nhiệt độ trên 32 °C. Phần lớn các dạng cố định hóa này chỉ được nghiên cứu với hoạt tính thủy giải của penicillin G để xác định sự ổn định của enzym cố định hóa [44].

### 1.2.2. Tổng quan về 7-ADCA

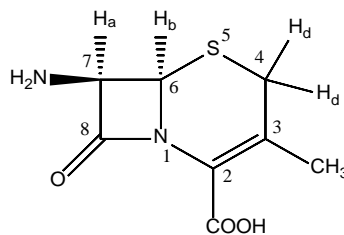
Tên quốc tế: 7-ADCA, acid 7-aminodesacetoxycephalosporanic

Tên khoa học: acid (6*R*,7*R*)-7-amino-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic.

Công thức phân tử: C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>S.

Khối lượng phân tử 214,24 g/mol.

Công thức cấu tạo:



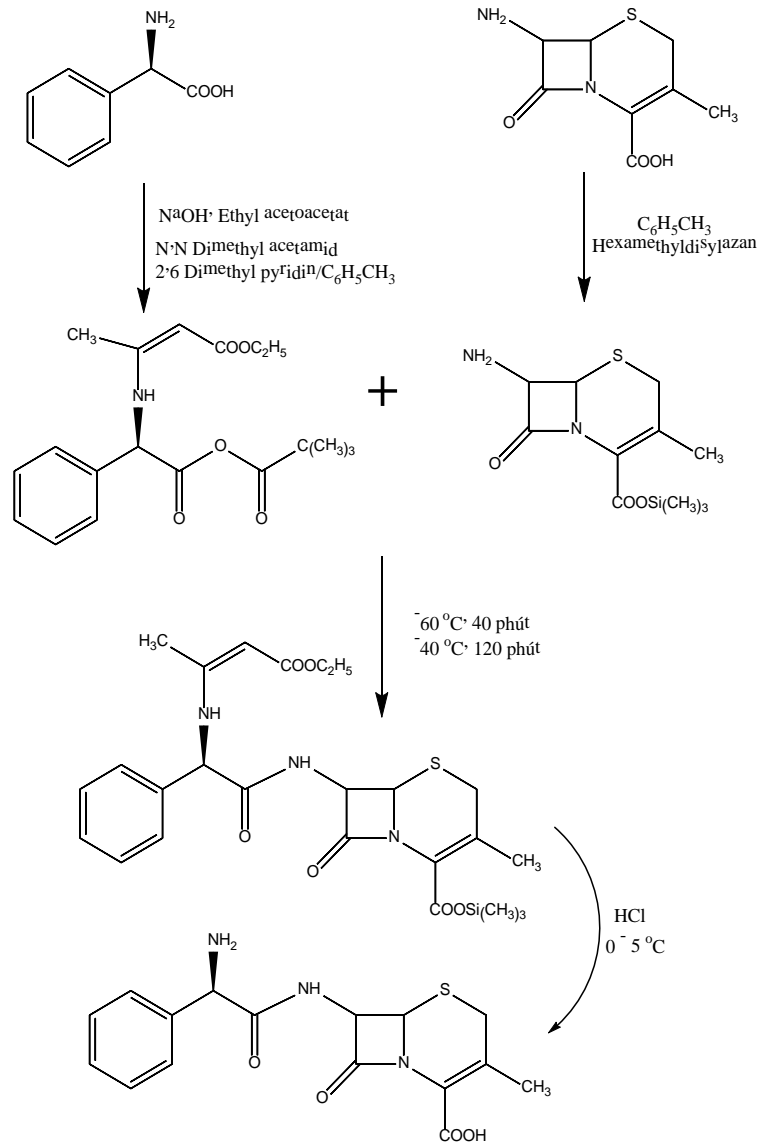
**Hình 1.5.** Cấu trúc hóa học của acid 7-aminodesacetoxycephalosporanic

*Nguồn gốc phát sinh:* Cephalexin có thể lần tạp 7-ADCA vì đây là nguyên liệu tổng hợp cephalexin và enzym penicillin G acylase xúc tác quá trình tổng hợp cephalexin đồng thời xúc tác quá trình thủy phân tạo 7-ADCA và *D*-phenylglycin [66].

*Độc tính của tạp 7-ADCA:* 7-ADCA có thể gây độc tính nếu hít phải hoặc nuốt phải, kích ứng đường hô hấp, mắt, gây độc nếu hấp thu qua da và gây kích ứng da [67].

- Cephalexin được điều chế bằng phản ứng N-acyl hóa 7-ADCA và *D*-phenylglycin. Qui trình điều chế này đòi hỏi nhiều bước, kể cả việc bảo vệ nhóm amino của *D*-phenylglycin và nhóm carboxyl của 7-ADCA cho sự N-acyl hóa và dùng nhiều dung môi có độc tính cao. Qui trình điều chế cephalexin của Fred G. Schreiber theo hình 1.6. [65].





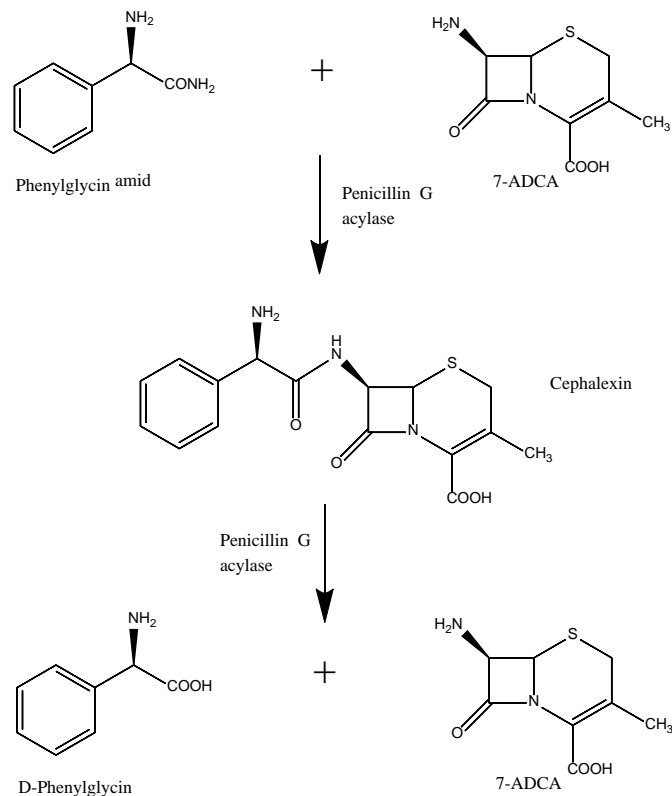
**Hình 1.6.** Sơ đồ điều chế cephalexin bằng phương pháp hóa học

"Nguồn: Schreiber Fred G., 1992" [65]

- Theo C.G.P.H. Schroën, tổng hợp cephalexin từ 7-ADCA và phenylglycine amid xúc tác bởi enzyme Penicillin G acylase (PGA) cố định hóa. Sơ đồ tổng hợp cephalexin như hình 1.7 [66].

### Một số công trình nghiên cứu về tổng hợp tạp chất 7-ADCA

- 7-ADCA đã được sử dụng làm nguyên liệu tổng hợp các kháng sinh nhóm cephalosporin như cephalexin, cefadroxil, cephadrin ... Có nhiều tài liệu nghiên cứu tổng hợp chất này nhưng chủ yếu với mục đích sản xuất làm nguyên liệu công nghiệp trong tổng hợp kháng sinh với độ tinh khiết chưa cao.

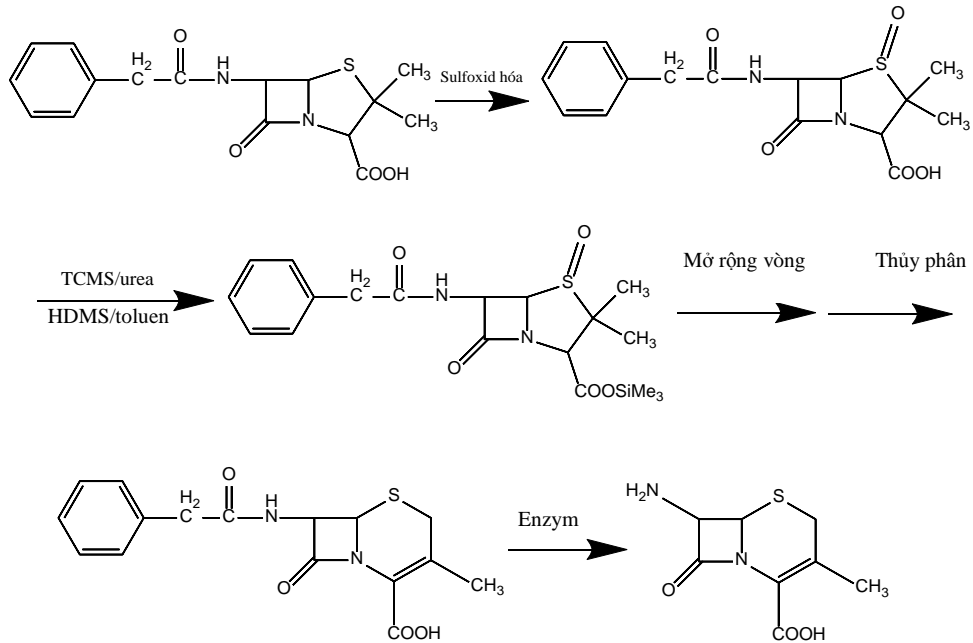


**Hình 1.7.** Sơ đồ tổng hợp cephalixin với xúc tác enzym PGA

"Nguồn: Schroën C. G. P. H., Mohy Eldin M. S., Janssen A. E. M., Mita G. D.,  
Tramper J., 2001" [66]

- Theo Jan Verweij, 7-ADCA và dẫn chất được tổng hợp từ 6-aminopenicillanic-sulfoxid bằng cách chuyển thành dạng anhydrid sau đó đun nóng ở nhiệt độ khoảng 160 °C trong dung môi hữu cơ khan với một acid khan có khả năng mở rộng vòng penam thành vòng cephem. Sau đó thủy phân thu được 7-ADCA hoặc dạng muối của nó [75].
- Sự thủy phân của cephalosporin G thành 7-ADCA bằng penicillin G acylase tự do [51] có độ tinh khiết 95,40 % thấp hơn so với penicillin G acylase cố định [31] có độ tinh khiết 98,5 %.
- Bovenberg và cộng sự đã tổng hợp 7-ADCA từ penicillin G nhờ hoạt tính mở rộng vòng của enzym từ *Penicillium chrysogenum* tái tổ hợp [23].
- Theo Yeh và cộng sự, 7-ADCA được tổng hợp từ penicillin sulfoxid bằng cách đun nóng với sự hiện diện của một muối amoni hữu cơ xúc tác và một copolymer

gồm dimethylsilan và urê cho đến khi mở vòng hình thành cephalosporanic (Hình 1.8.) [45].



**Hình 1.8.** Sơ đồ tổng hợp 7-ADCA theo Yeh và cộng sự  
"Nguồn: Jinun B. Yeh, Lain-Tze Lee, 1994" [45]

### 1.2.3. Tổng quan về tạp chất *D*-phenylglycin của cephalixin

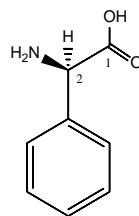
Tên quốc tế: *D*-phenylglycin.

Tên khoa học: acid (2*R*)-2-amino-2-phenylacetic.

Công thức phân tử:  $C_8H_9NO_2$ .

Khối lượng phân tử: 151,16 g/mol.

Công thức cấu tạo:



**Hình 1.9.** Cấu trúc hóa học của *D*-phenylglycin

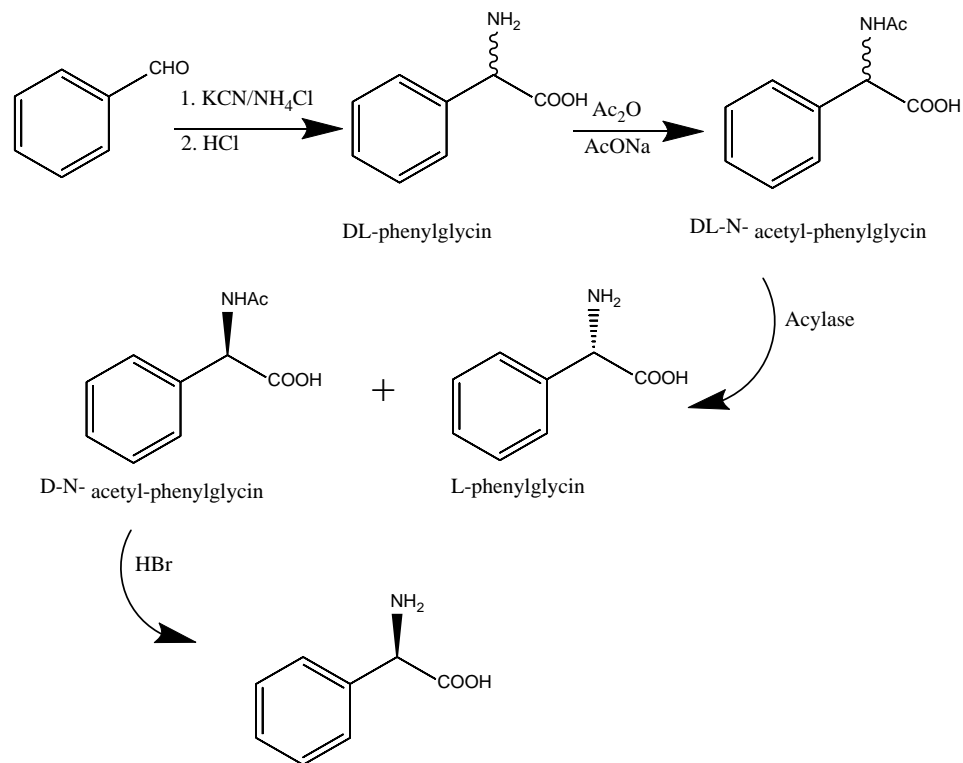
*Nguồn gốc phát sinh:* Cephalixin có thể lẫn tạp *D*-phenylglycin vì đây là nguyên liệu tổng hợp cephalixin và enzym penicillin G acylase xúc tác quá trình tổng hợp

cephalexin đồng thời xúc tác quá trình thủy phân tạo 7-ADCA và *D*-phenylglycin [66].

*Độc tính:* *D*-phenylglycin có thể có hại nếu hít phải, nuốt phải hoặc hấp thu qua da, có thể gây kích ứng đường hô hấp, mắt hoặc gây dị ứng trên da [68].

### Một số công trình nghiên cứu về tổng hợp tạp *D*-phenylglycin

- Theo Machado George D. C., *DL*-phenylglycin được tổng hợp từ benzaldehyd, được tạo dẫn xuất *DL*-*N*-acetyl. Sau đó sử dụng acylase I, enzym thủy giải nối amid, thủy phân chọn lọc *L*-*N*-acetyl-phenylglycin. Tiếp tục thủy phân bằng HBr với *D*-*N*-acetyl-phenylglycin không phản ứng ở trên thu được *D*-phenylglycin [52].

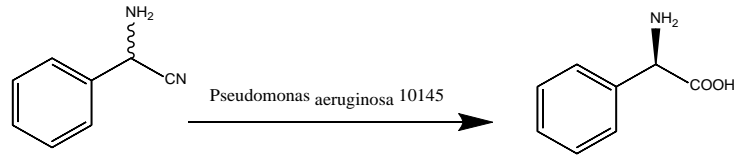


**Hình 1.10.** Sơ đồ tổng hợp *D*-phenylglycin từ benzaldehyd

"Nguồn: Machado George D. C., Marlito Gomes Jr., Antunes O. A. C., Enrique G. Oestreicher, 2005" [52]

- Alonso Fábio O.M. đã tìm thấy một chủng *Pseudomonas aeruginosa* có hoạt tính enzym chuyển hóa arylaminonitril thành acid *D*-amino. Hoạt tính enzym này được tăng cường khi sử dụng để tổng hợp *D*-phenylglycin tinh khiết quang học từ nguyên liệu 2-phenyl-2-aminoacetonitril. Để tăng cường tiềm năng sử dụng xúc tác, các vi

khuẩn *Pseudomonas aeruginosa* 10145 được cố định trong các hạt gel calci alginat [20].



**Hình 1.11.** Tổng hợp *D*-phenylglycine bằng phương pháp vi sinh vật

"Nguồn: Alonso F. O. M., Oestreicher E. G., Antunes O. A. C., 2008" [20]

- *D*-phenylglycine tham gia tạo mạch nhánh trong quá trình bán tổng hợp một số thuốc kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam (ampicilin, cephalixin, cefaclor). Điều chế *D*-phenylglycine trong nghiên cứu này sử dụng chất ban đầu là benzaldehyd trên cơ sở phản ứng Strecker với sự hiện diện của NaCN,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , hiệu suất phản ứng đạt 66,23% [2].

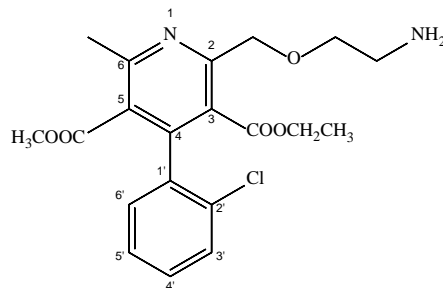
### 1.3. TỔNG QUAN TẠP CHẤT D CỦA AMLODIPIN

Tên khoa học: 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat.

Công thức phân tử:  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_5$ .

Khối lượng phân tử: 406,86 g/mol.

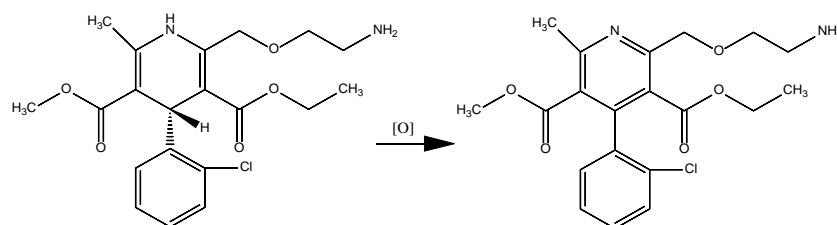
Công thức cấu tạo:



**Hình 1.12.** Cấu trúc hóa học của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat (tạp D amlodipin)

*Tính chất:* chất lỏng màu vàng nâu, tan nhiều trong methanol, ethyl acetat, diclorometan, cloroform, ít tan trong nước và dung môi không phân cực [50].

*Nguồn gốc phát sinh:* tạp D của amlodipin được hình thành khi vòng 1,4-dihydropyridin của amlodipin bị oxy hóa thành pyridin do tác động ánh sáng trong quá trình bảo quản [47].



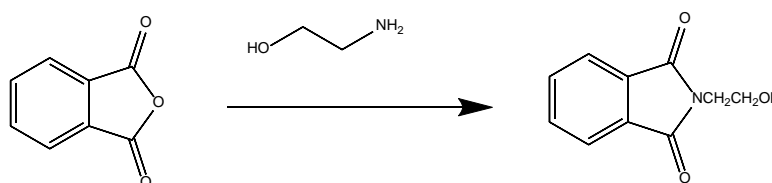
**Hình 1.13.** Nguồn gốc hình thành tạp D của amlodipin

### Một số công trình nghiên cứu về tổng hợp tạp D của amlodipin

- Quy trình tổng hợp D của amlodipin gồm 6 giai đoạn [28], [72]

▪ *Giai đoạn 1:* Tổng hợp N-(2-hydroxyetyl)phthalimid [II]

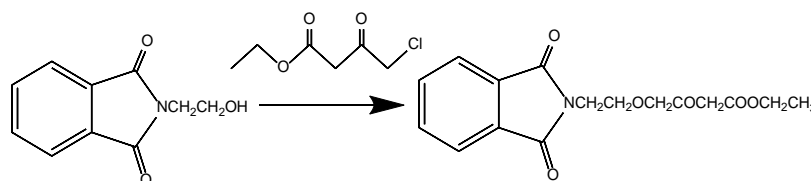
Cho 100 g anhydrid phthalic [I] ngưng tụ với 41,2 g monoethanolamin ở 160-178 °C trong 4 giờ. Sản phẩm được làm nguội nhanh trong nước 95 °C, sau đó làm mát. Lọc và rửa với nước 2 lần, làm khô ở 90 – 95 °C trong 12 giờ.



**Hình 1.14.** Tổng hợp N-(2-hydroxyetyl)phthalimid [II]

▪ *Giai đoạn 2:* Tổng hợp ethyl-4-(2-phthalimido ethoxy)acetoacetat [III]

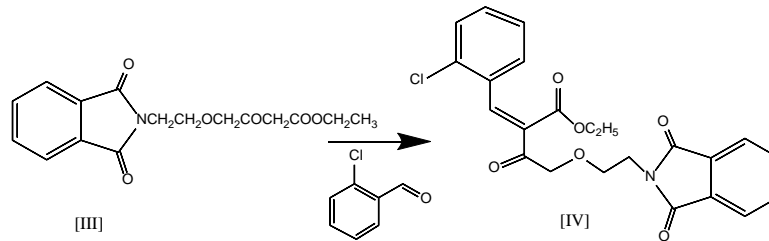
Cho 100 g N-(2-hydroxyetyl)phthalimid [II] phản ứng với 50 g 4-chloroethylacetoacetat với sự có mặt của natri hydrid trong toluen/nitrogen ở -11 đến -15 °C. Sau đó để phản ứng ở 25 – 30 °C trong 12 giờ và ở 45 °C trong 1 giờ. Sản phẩm được làm nguội nhanh với nước acid và chiết với toluen. Thu hồi dung môi đến cạn ở 60 °C.



**Hình 1.15.** Tổng hợp ethyl-4-(2-phthalimido ethoxy)acetoacetat [III]

- *Giai đoạn 3:* Tổng hợp ethyl-2-(clorobenzylidin)-4-[2-(phthalimido)ethoxy]acetoacetat [IV]

Cho 100 g ethyl-4-[2-phthalimidoethoxy]acetoacetat phản ứng với 67,5 g orthoclorobenzaldehyd và pyridin acetic/benzen ở 80-82 °C trong 12 giờ, làm mát đến nhiệt độ phòng; thu hồi dung môi hữu cơ, cần xuất hiện được rửa bằng hexan.

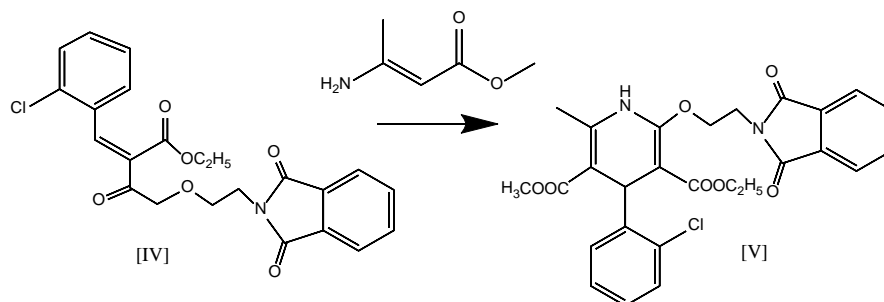


**Hình 1.16.** Tổng hợp ethyl-2-(clorobenzylidin)-4-[2-(phthalimido)ethoxy]acetoacetat [IV]

- *Giai đoạn 4:* Tổng hợp phthaloyl amlodipin [V]

Cần ethyl-2-(clorobenzylidin)-4-[2-(phthalimido)ethoxy]acetoacetat [IV] được ngưng tụ với 153 g methylaminocrotonat trong acid acetic trong 16 giờ, lọc rửa 2 lần với acid acetic và *n*-hexan, sau đó làm khô ở 60–70 °C trong 8 giờ, thu được 140 g sản phẩm phthaloyl amlodipin với độ tinh khiết 97,5%.

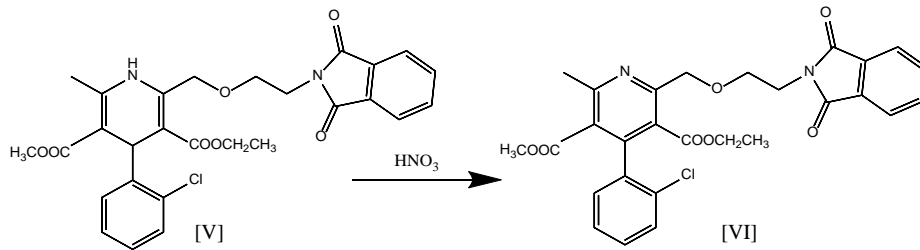
Tinh chế phthaloyl amlodipin: 100 g phthaloyl amlodipin được hòa tan trong 250 ml aceton ở 45 °C và thêm từ từ 90 ml nước. Sấy khô tủa thu được ở 50 °C trong 12 giờ, thu được 93 g phthaloyl amlodipin với độ tinh khiết 99,9%.



**Hình 1.17.** Tổng hợp phthaloyl amlodipin [V]

- *Giai đoạn 5:* Oxy hóa phthaloyl amlodipin để tạo thành 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat [VI].

Cho 100 g phthaloyl amlodipin tác dụng với 27,9 g hỗn hợp  $\text{SiO}_2 - \text{HNO}_3$  trong DCM trong 30 phút. Sản phẩm sau phản ứng được lọc với dung dịch  $\text{NaHCO}_3$  bão hòa và dung dịch  $\text{NaCl}$  bão hòa, sau đó làm khan bằng  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  khan trong 20 phút. Thu hồi dung môi thu được 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat [VI].

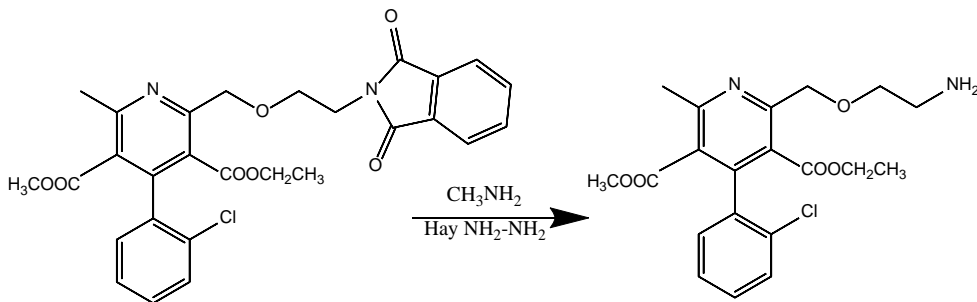


**Hình 1.18.** Oxy hóa phthaloyl amlodipin

▪ *Giai đoạn 6:* Thủy phân sản phẩm [VI] tạo 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat [VII]

*Quy trình 1:* Cho sản phẩm [VI] vào bình cầu, thêm DCM vào để hòa tan. Cho methylamin vào và khuấy trong 12 giờ ở nhiệt độ phòng. Sản phẩm sau phản ứng được lọc với nước để loại methylamin. Lọc dung môi được lọc với dung dịch  $\text{HCl}$  10% để chuyển amin tự do thành dạng muối, sau đó kiềm hóa bằng  $\text{NaOH}$  10%, chiết amin bằng DCM.

*Quy trình 2:* Cho sản phẩm [VI] vào bình cầu 1 cổ, thêm toluen. Cho vào bình cầu dung dịch hydrazin hòa tan trong methanol. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, lọc bỏ tủa rồi lọc dịch lọc với nước. Loại bỏ lớp nước, còn lớp dung môi được lọc với dung dịch  $\text{NaCl}$  bão hòa, làm khan bằng  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Cô quay loại dung môi thu được sản phẩm.



**Hình 1.19.** Thủy phân sản phẩm [VI] tạo 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat [VII]



- Từ nguyên liệu amlodipin besylat, qua 4 bước đã tổng hợp được 3-ethyl-5-methyl-2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat còn gọi là tạp D. Các sản phẩm trung gian và sản phẩm cuối được chứng minh cấu trúc và độ tinh khiết bằng nhiệt độ nóng chảy, sắc ký lớp mỏng, phổ IR, MS,  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ . Sản phẩm tổng hợp được gửi đến 3 phòng thí nghiệm độc lập đánh giá tiêu chuẩn chất lượng để có thể áp dụng vào việc kiểm tra chất lượng nguyên liệu và thành phẩm chứa amlodipin [15].

#### 1.4. TỔNG QUAN TẠP CHẤT A VÀ B CỦA NIFEDIPIN

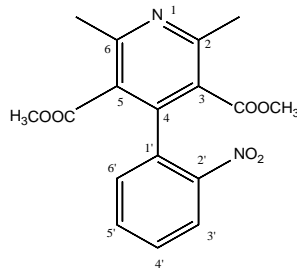
##### 1.4.1. Tổng quan về tạp A của nifedipin

Tên quốc tế: Dehydronifedipin.

Tên khoa học: dimethyl 2,6 – dimethyl – 4 - (2-nitrophenyl) - pyridin-3,5-dicarboxylat

Công thức phân tử:  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6$ . Khối lượng phân tử: 344,32 g/mol.

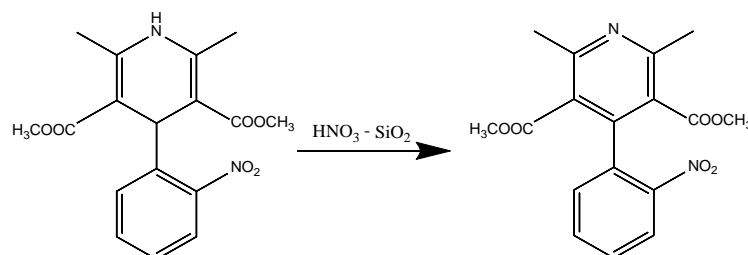
Công thức cấu tạo:



**Hình 1.20.** Cấu trúc hóa học của tạp A nifedipin

*Tính chất:* tinh thể vàng nhạt, nhiệt độ nóng chảy 100–104 °C; tan tốt trong cloroform, acetonitril, methanol, kém tan trong *n*-hexan, không tan trong nước [33].

*Nguồn gốc phát sinh:* nguyên nhân hình thành tạp A của nifedipin là do sự oxy hóa nifedipin dưới các tác nhân oxy hóa [33].



**Hình 1.21.** Sự hình thành tạp A của nifedipin

*Độc tính:* dehydronifedipin gây độc nếu nuốt phải. Khi ngộ độc cấp gây rối loạn tim mạch, hạ huyết áp, loạn nhịp tim và các triệu chứng thần kinh, khó thở, phù nề, mệt mỏi, đỏ mặt, nôn mửa, nhức đầu. LD<sub>50</sub> trên chuột là 1022 (mg/kg) [33].

Chất này được cho là tác nhân gây ra độc những người dùng nifedipin và tiếp xúc với ánh sáng, gây đỏ rát mặt và vùng da tiếp xúc [19].

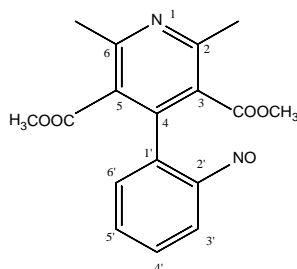
#### 1.4.2. Tổng quan về tạp B của nifedipin

Tên quốc tế: dehydronitroso nifedipin.

Tên khoa học: dimethyl 2,6-dimethyl-4-(2-nitrosophenyl)-pyridin-3,5-dicarboxylat

Công thức phân tử: C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Khối lượng phân tử: 328,32 g/mol.

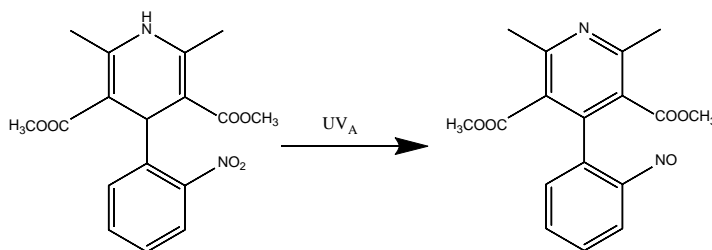
Công thức cấu tạo:



**Hình 1.22.** Cấu trúc hóa học của tạp B nifedipin

*Tính chất:* tinh thể màu xanh da trời, nhiệt độ nóng chảy 88–94 °C; tan tốt trong methanol, dicloromethan, acetonitril, kém tan trong *n*-hexan, không tan trong nước [34].

*Nguồn gốc phát sinh:* nguyên nhân hình thành tạp B của nifedipin là do sự oxy hóa nifedipin dưới các tác nhân oxy hóa [34]



**Hình 1.23.** Sự hình thành tạp B của nifedipin

*Độc tính:* Tạp B của nifedipin cũng tích lũy tại màng tế bào và gây độc cho một số tế bào *Candida albicans* [56].

Tuy nhiên gần đây cũng có một số nghiên cứu cho rằng tạp B của nifedipin tích lũy tại màng tế bào và bảo vệ tế bào khỏi sự oxy hóa hoặc bảo vệ tế bào hồng cầu khỏi sự ly giải bởi tia UV khi thử nghiệm trên chó [79].

#### **1.4.3. Một số công trình nghiên cứu về tổng hợp tạp A và tạp B của nifedipin**

- Nghiên cứu của Al-Turk và cộng sự năm 1988 cho thấy nifedipin là một hợp chất nhạy cảm với ánh sáng. Khi chiếu sáng dung dịch nifedipin trong ethanol 95% bằng đèn huỳnh quang đặt cách 30 cm trong 4 giờ sẽ chuyển hoàn toàn thành sản phẩm oxy hóa. Sự biến mất của hoạt chất và sự xuất hiện của sản phẩm oxy hóa được mô tả bằng động học bậc 0. Sản phẩm oxy hóa bởi ánh sáng phụ thuộc vào cường độ chiếu sáng và khoảng cách từ dung dịch tới nguồn sáng. Nghiên cứu cũng cho thấy dung dịch nifedipin bị biến đổi nhanh nhất ở pH 2 [21].

- Một nghiên cứu khác của Ali S. L. năm 1989 cho thấy nifedipin dạng rắn được bảo vệ trong chai thủy tinh nâu và được chiếu sáng thì sau 2 tháng hàm lượng nifedipin giảm không có ý nghĩa. Trong nghiên cứu này cũng cho thấy mức độ phân hủy của nifedipin trong cloroform, ethanol là tương đương [19].

- Năm 1995, Henk De Vries và cộng sự đã tổng hợp tạp B nifedipin bằng cách chiếu tia UV hoặc để nifedipin dưới ánh sáng ban ngày. Kết quả cho thấy trong dung dịch methanol và đệm phosphat pH 7,4 chỉ có duy nhất sản phẩm dehydronitroso nifedipin tạo thành và nếu có mặt glutathion thì sản phẩm nitroso này không bền, nhanh chóng phản ứng đóng vòng lactam [76].

- Năm 1990, Satoshi Ogawa và cộng sự đã nghiên cứu về tốc độ phân hủy nifedipin dưới ánh sáng. Kết quả cho thấy nifedipin dạng bột nghiền mịn hoặc thô từ viên nén đều có tốc độ phân hủy như nhau nếu được gói bằng giấy bóng kiếng trong suốt, phân hủy hoàn toàn sau 120 giờ. Ngược lại nếu được gói bằng giấy màu, sự phân hủy chỉ đạt 35% sau 120 giờ. Trong sản phẩm tạo thành đều có mặt cả hai dẫn xuất dehydronifedipin và dehydronitroso nifedipin [63].

- Năm 2006, Nagarajan và cộng sự đã tiến hành oxy hóa vòng 1,4-dihydropyridin bằng tác nhân bromosuccinimid trong dung môi methanol. Kết quả thu được khoảng 85% các dẫn xuất có nhóm thế nitrophenyl [58].

- Năm 2007, Satya Paul tiến hành oxy hóa vòng 1,4-dihydropyridin bằng tác nhân  $\text{SeO}_2$  với  $\text{SiO}_2 - \text{P}_2\text{O}_5$  trong dicloromethan, kết quả khoảng 82–85% sản phẩm thu được với các dẫn xuất có nhóm thế nitrophenyl [62].
- Năm 2009, Arash Ghorbani-Choghamarani oxy hóa vòng 1,4-dihydropyridin bằng tác nhân  $\text{HNO}_3$  với PVP hoặc  $\text{SiO}_2$ . Kết quả cho thấy tỷ lệ sản phẩm dehydronifedipin thu được rất cao từ 93–99%, thời gian phản ứng từ 3-47 phút [37].
- Năm 2011, Fatemeh Tamaddon và Zahra Razmi đã tiến hành oxy hóa vòng 1,4-dihydropyridin bằng các tác nhân  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ,  $\text{KMnO}_4$ ,  $\text{NaOCl}$  trong các môi trường khác nhau. Kết quả cho thấy sản phẩm oxy hóa cao nhất thu được khi oxy hóa bằng  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  trong dicloromethan (hiệu suất 95% sau 30 phút) [36].
- Năm 2007, Nguyễn Thị Kim Thanh và cộng sự đã nghiên cứu tạo tạp chất dehydronifedipin (tạp A) và dehydronitroso nifedipin (tạp B) để kiểm tra sự phù hợp của hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao. Dung dịch nifedipin trong methanol được chiếu sáng và đun nóng khoảng 4 giờ. Kết quả cho thấy có sự tạo thành cả hai tạp A và B trong dung dịch thu được. Tuy nhiên, hàm lượng nifedipin còn rất lớn [14].

### 1.5. PHƯƠNG PHÁP KIỂM NGHIỆM VÀ GIỚI HẠN CÁC TẠP TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM

**Bảng 1.1.** Phương pháp và giới hạn các tạp trong nguyên liệu và thành phẩm theo dược điển Việt Nam và dược điển tham chiếu

<b>Kiểm nghiệm tạp captopril disulfid trong nguyên liệu captopril</b>				
Dược điển	ĐDVN V [1]	BP 2019 [24]	USP 43 [74]	EP 9 [35]
	Cột C <sub>18</sub> (300 × 3,9 mm; 10 μm)	Cột C <sub>18</sub> (300 × 3,9 mm; 10 μm)	Cột C <sub>18</sub> (300 × 3,9 mm)	Cột C <sub>18</sub> (300 × 3,9 mm; 10 μm)
	Detector UV: 210 nm.	Detector UV: 210 nm.	Detector UV: 220 nm.	Detector UV: 210 nm.
	Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút.	Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút.	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.	Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút.
Phương pháp HPLC, các điều kiện SK	Thẻ tích tiêm: 25 μl.	Thẻ tích tiêm: 25 μl.	Thẻ tích tiêm: 20 μl.	Thẻ tích tiêm: 25 μl.
	Pha động A: acid phosphoric - nước (0,08 : 100).	Pha động A: acid phosphoric - nước (0,08 : 100).	Pha động: tetrahydrofuran trong methanol (9 : 100) và acid phosphoric (1 : 2000) (33 : 67).	Pha động A: acid phosphoric - nước (0,08 : 100).
	Pha động B: acid phosphoric - acetonitril - nước (0,08 : 50 : 50).	Pha động B: Acid phosphoric - acetonitril - nước (0,08 : 50 : 50).		Pha động B: acid phosphoric - acetonitril - nước (0,08 : 50 : 50).
	Rửa giải gradient.	Rửa giải gradient.		Rửa giải gradient.
	Giới hạn	≤ 1,0%	≤ 1,0%	≤ 1,0%
<b>Kiểm nghiệm tạp captopril disulfid trong viên nén captopril</b>				
Dược điển	ĐDVN V [1]	BP 2019 [24]	USP 43 [74]	EP 9 [35]
Phương pháp	Cột C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 10	Cột C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 μm)	Cột C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm)	

HPLC, các điều kiện SK	μm).	(Cột Ace C <sub>18</sub> là thích hợp)		
	Detector UV: 220 nm.	Detector UV: 220 nm.	Detector UV: 220 nm.	
	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút	
	Thể tích tiêm: 20 μl.	Thể tích tiêm: 20 μl.	Thể tích tiêm: 20 μl.	
	Pha động: methanol - nước - acid phosphoric (550 : 450 : 0,5).	Pha động: methanol - nước - acid phosphoric (550 : 450 : 0,5).	Pha động: Hỗn hợp methanol - nước - acid phosphoric (550 : 450 : 0,50).	
Giới hạn	≤ 3,0%	≤ 3,0%	≤ 3,0%	

**Kiểm nghiệm tạp 7-ADCA & D-phenylglycin trong nguyên liệu cephalixin**

Dược điển	DĐVN V [1]	BP 2019 [24]	USP 43 [74]	EP 9 [35]
Phương pháp HPLC, các điều kiện SK	Cột C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 5 μm)	Cột C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 5 μm)	Cột C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 μm)	Cột C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 5 μm)
	Detector UV: 220 nm.	Detector UV: 220 nm.	Detector UV: 254 nm.	Detector UV: 220 nm.
	Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút	Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút	Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút
	Thể tích tiêm: 20 μl.	Thể tích tiêm: 20 μl.	Thể tích tiêm: 20 μl.	Thể tích tiêm: 20 μl.
	Pha động A: đệm phosphat pH 5,0; B: methanol	Pha động A: đệm phosphat pH 5,0; B: methanol	Dung dịch A: 1 g natri 1-pentanesulfonat trong 1000 ml nước và 15 ml TEA, điều chỉnh pH 2,5 bằng acid phosphoric.	Pha động A: đệm phosphat pH 5,0; B: methanol
	Rửa giải gradient.	Rửa giải gradient.	Dung dịch B: 1 g natri 1-pentanesulfonat trong 300 ml nước và 15 ml TEA, điều chỉnh	Rửa giải gradient.

			pH 2,5 bằng acid phosphoric, và thêm 350 ml acetonitril và 350 ml methanol. Rửa giải gradient.	
Giới hạn	7-ADCA $\leq$ 1,0% <i>D</i> -phenylglycin $\leq$ 1,0%	7-ADCA $\leq$ 1,0% <i>D</i> -phenylglycin $\leq$ 1,0%	7-ADCA $\leq$ 1,0% <i>D</i> -phenylglycin $\leq$ 1,0%	7-ADCA $\leq$ 1,0% <i>D</i> -phenylglycin $\leq$ 1,0%
<b>Kiểm nghiệm tạp 7-ADCA &amp; <i>D</i>-phenylglycin trong viên nang cephalixin</b>				
Dược điển	ĐĐVN V [1]	BP 2019 [24]	USP 43 [74]	EP 9 [35]
Phương pháp sắc ký lớp mỏng	Không quy định kiểm tạp	Bản mỏng: Silica gel HF (Analtech là thích hợp). Hệ dung môi khai triển: aceton - dinatri hydrophosphat 7,2% - acid citric 2,1% (3 : 80 : 120) Phát hiện: thuốc thử ninhydrin 0,1%	Không quy định kiểm tạp	
Giới hạn		7-ADCA $\leq$ 1,0% DL-phenylglycin $\leq$ 1,0%		
<b>Kiểm nghiệm tạp 7-ADCA &amp; <i>D</i>-phenylglycin trong viên nén cephalixin</b>				
Dược điển	ĐĐVN V [1]	BP 2019 [24]	USP 43 [74]	EP 9 [35]
Phương pháp sắc ký lớp mỏng	Không quy định kiểm tạp	Bản mỏng: Silica gel HF Hệ dung môi khai triển: aceton - dinatri hydrophosphat 7,2%	Không quy định kiểm tạp	

	- acid citric 2,1% (3 : 80 : 120) Phát hiện: thuốc thử ninhydrin 0,1%
Giới hạn	7-ADCA $\leq$ 1,0% DL-phenylglycin $\leq$ 1,0%

**Kiểm nghiệm tạp D amlodipin trong nguyên liệu amlodipin besilat**

Dược điển	DĐVN V [1]	BP 2019 [24]	USP 43[74]	EP 9 [35]
	Cột C <sub>18</sub> (250 x 4,0 mm; 5 $\mu$ m).	Cột C <sub>18</sub> (250 x 4,0 mm; 5 $\mu$ m).	Cột C <sub>18</sub> (150 x 3,9 mm)	Cột C <sub>18</sub> (250 x 4,0 mm; 5 $\mu$ m).
	Detector UV: 237 nm.	Detector UV: 237 nm.	Detector UV: 237 nm.	Detector UV: 237 nm.
Phương pháp HPLC, các điều kiện SK	Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút.	Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút.	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.	Tốc độ dòng: 1,5 ml/phút.
	Thể tích tiêm: 20 $\mu$ l.	Thể tích tiêm: 20 $\mu$ l.	Thể tích tiêm: 10 $\mu$ l.	Thể tích tiêm: 20 $\mu$ l.
	Pha động: amoni acetat 0,23% - methanol (30 : 70)	Pha động: amoni acetat 0,23% - methanol (30 : 70)	Pha động: đệm pH 3,0 : methanol : acetonitril (50 : 35 : 15)	Pha động: amoni acetat 0,23% - methanol (30 : 70 )
Giới hạn	$\leq$ 0,3%	$\leq$ 0,3%	$\leq$ 0,3%	$\leq$ 0,3%

**Kiểm nghiệm tạp D amlodipin trong viên nén amlodipin**

Dược điển	DĐVN V [1]	BP 2019 [24]	USP 43 [74]	EP 9 [35]
Phương pháp HPLC, các điều kiện SK	Cột C <sub>18</sub> (150 x 3,9 mm; 5 $\mu$ m)	Cột C <sub>18</sub> (100 x 4,6 mm; 2,6 $\mu$ m) (Kinetex C <sub>18</sub> thích hợp)	Cột C <sub>18</sub> (150 x 3,9 mm; 5 $\mu$ m).	
	Detector UV: 237 nm.	Detector UV: 238 nm.	Detector UV: 237 nm.	



	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.	Tốc độ dòng: 0,6 ml/phút.	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.
	Thể tích tiêm: 10 µl.	Thể tích tiêm: 10 µl.	Thể tích tiêm: 50 µl.
	Pha động: đệm TEA pH 3,0 - methanol - acetonitril (50 : 35 : 15)	Pha động A: kali dihydrophosphat 0,03 M pH 3,0 - methanol (45 : 55).	Pha động: methanol - acetonitril - đệm (35 : 15 : 50)
	Dung dịch đệm TEA pH 3,0: Hòa tan 7,0 ml triethylamin trong 1000 ml nước, điều chỉnh đến pH 3,0 ± 0,1 bằng acid phosphoric.	Pha động B: kali dihydrophosphat 0,03 M, điều chỉnh đến pH 3,0 - methanol (30 : 70).	Dung dịch đệm: Thêm 7,0 ml TEA/1000 ml có chứa 900 ml nước, điều chỉnh đến pH 3,0 ± 0,1 bằng acid phosphoric.
Giới hạn	≤ 0,25%	≤ 0,5%	≤ 1,0%

**Kiểm nghiệm tạp A và B nifedipin trong nguyên liệu nifedipin**

Dược điển	DĐVN V [1]	BP 2019 [24]	USP 43 [74]	EP 9 [35]
	Cột C <sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 5 µm).	Cột C <sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 5 µm)	Cột C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 µm).	Cột C <sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 5 µm)
	Detector UV: 235 nm.	Detector UV: 235 nm.	Detector UV: 235 nm.	Detector UV: 235 nm.
Phương pháp HPLC, các điều kiện SK	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.	Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút
	Thể tích tiêm: 20 µl.	Thể tích tiêm: 20 µl.	Thể tích tiêm: 25 µl.	Thể tích tiêm: 20 µl.
	Pha động: acetonitril – methanol - nước (9: 36 : 55).	Pha động: acetonitril - methanol - nước (9: 36: 55).	Pha động: acetonitril- methanol -nước (25 : 25 : 50)	Pha động: acetonitril – methanol - nước (9: 36: 55)
Giới hạn	A ≤ 0,1%; B ≤ 0,1%	A ≤ 0,1%; B ≤ 0,1%	A ≤ 0,2%; B ≤ 0,2%	A ≤ 0,1%; B ≤ 0,1%

**Kiểm nghiệm tạp A và B nifedipin trong viên nén nifedipin**

Dược điển	ĐDVN V [1]	BP 2019 [24]	USP 43 [74]	EP 9 [35]
Phương pháp HPLC, các điều kiện SK	Cột C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 μm). Detector UV: 235 nm. Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút Thể tích tiêm: 20 μl. Pha động: acetonitril – methanol - nước (9: 36: 55)			
Giới hạn	A ≤ 0,5%; B ≤ 0,5%			

**Kiểm nghiệm tạp A và B nifedipin trong viên nang nifedipin**

Dược điển	ĐDVN V [1]	BP 2019 [24]	USP 43 [74]	EP 9 [35]
Phương pháp HPLC, các điều kiện SK	Cột Lichrosorb RP18 là thích hợp (250 x 4,6 mm; 5 μm)		Cột C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 μm)	
	Detector UV: 220 nm.		Detector UV: 265 nm.	
Giới hạn	Tốc độ dòng: 2,0 ml/phút		Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút	
	Pha động: acetonitril – methanol - đệm borat pH 8,0 (9: 36: 55)		Pha động: acetonitril – methanol - nước (25 : 25 : 50)	
Giới hạn	A ≤ 1,0%; B ≤ 0,5%		A ≤ 2,0%; B ≤ 0,5%	

## 1.6. CHẤT CHUẨN ĐỐI CHIẾU

### 1.6.1. Định nghĩa và phân loại

Nguyên liệu đối chiếu (NLĐC) là những nguyên liệu có sự đồng nhất và ổn định về một hoặc một số tính chất, được thiết lập để phù hợp với một quá trình sử dụng hoặc đo lường đã định sẵn. Một cách tổng quát, NLĐC được chia thành 3 nhóm: NLĐC về thành phần hóa học; NLĐC về tính chất vật lý; NLĐC về đặc điểm kỹ thuật. Trong ngành phân tích học, NLĐC được chia thành 5 nhóm cơ bản như sau: các dung dịch chuẩn và hỗn hợp khí chuẩn; các NLĐC trong chất nền; các NLĐC hóa – lý; các vật đối chiếu hoặc mẫu tự tạo để đối chiếu; các chất tinh khiết [41].

Các chất chuẩn đối chiếu (CCĐC), một số tài liệu còn gọi là chất đối chiếu hóa học hay CCĐC hóa học, là NLĐC thuộc nhóm các chất tinh khiết. Theo WHO, CCĐC được định nghĩa như sau: “CCĐC hóa học là nguyên liệu đồng nhất, xác thực, được sử dụng trong các phép thử vật lý và hóa học mà ở đó các tính chất của nó được so sánh với các tính chất của sản phẩm được kiểm tra, với độ tinh khiết phù hợp với mục đích sử dụng” [77].

Với định nghĩa này, CCĐC được phân loại theo các mức độ như sau:

- *Chất chuẩn đối chiếu hóa học gốc* (Primary chemical reference standard, PCRS): là một chất được thừa nhận rộng rãi, có các chỉ tiêu chất lượng (CTCL) phù hợp với tài liệu công bố, có hàm lượng được chấp nhận sử dụng làm chuẩn định lượng mà không cần phải so sánh với một chất hóa học khác. Các PCRS có thể tìm được từ các nguồn sau: trung tâm hợp tác về CCĐC của WHO; Hội đồng dược điển (HĐDD) Châu Âu; các phòng thí nghiệm (PTN) trực thuộc của HĐDD Anh, HĐDD Mỹ.

- *Chất chuẩn đối chiếu hóa học quốc tế* (International chemical reference standard, ICRS): là một PCRS được thiết lập bởi ủy ban chuyên gia của WHO về tiêu chuẩn chất lượng của các chế phẩm dược dụng. ICRS được sử dụng chủ yếu trong các phép thử vật lý, hóa học, định lượng của các chuyên luận dược phẩm được công bố trong dược điển quốc tế.

- *Chất chuẩn đối chiếu hóa học thứ cấp* (Secondary chemical reference standard, SCRS): là một chất đối chiếu hóa học mà các tính chất hay CTCL của nó được xác định bằng cách so sánh với một PCRS. SCRS lại được chia thành hai loại: i) SCRS “chính thức” là một SCRS khu vực hay quốc gia; ii) SCRS làm việc là một SCRS do một nhà sản xuất (NSX) hoặc một PTN cung cấp. SCRS do ASEAN, do các PTN của các HĐDD, viện kiểm nghiệm quốc gia thiết lập được xếp vào nhóm SCRS “chính thức”, nếu trong quá trình thiết lập chuẩn có sử dụng PCRS để so sánh. Quá trình thiết lập, phân phối chất đối chiếu hóa học được diễn ra do các HĐDD thực hiện và tuân theo các hướng dẫn của ISO [41].

Việc phân loại trên không mang ý nghĩa tuyệt đối, chẳng hạn, một SCRS như chuẩn quốc gia hoặc chuẩn ASEAN có thể được coi như một PCRS để thiết lập các chuẩn PTN hoặc chuẩn nhà sản xuất.

### ***1.6.2. Thiết lập, bảo quản và phân phối chất chuẩn đối chiếu gốc***

PCRS được thừa nhận rộng rãi vì vậy qui trình thiết lập PCRS phải được ban hành bởi các tổ chức có thẩm quyền và tuân thủ nghiêm ngặt. Qui trình thiết lập PCRS bao gồm các bước như sau:

- *Đánh giá nhu cầu PCRS*

Trước khi tiến hành thiết lập một PCRS phải đánh giá xem việc phát triển một CCĐC có thực sự là cần thiết không, việc đó đòi hỏi ngay từ khi xây dựng tiêu chuẩn và phương pháp kiểm nghiệm cho một chất mới cần phải xem liệu một qui trình nào đó có thể thay thế bởi một qui trình khác thỏa mãn yêu cầu tương đương mà không cần phải dùng đến CCĐC hay không.

- *Lựa chọn nguồn nguyên liệu dùng để thiết lập CCĐC từ nhà cung cấp*: nguyên liệu sử dụng để thiết lập CCĐC thường được lựa chọn từ các lô sản xuất nguyên liệu có chất lượng tốt nhất và được cung cấp bởi các NSX được phẩm. Một chất đối chiếu dự kiến sử dụng cho phép thử định tính bằng phương pháp IR hay phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) không yêu cầu có độ tinh khiết quá cao, trong khi đó các nguyên liệu được sử dụng thiết lập chuẩn để dùng trong định lượng nên có độ tinh khiết ít nhất 99,5% hoặc cao hơn nữa. Để đáp ứng cho yêu cầu của một chất

đối chiếu, cần xem xét ảnh hưởng của tạp chất đến phép đo trong khi định lượng. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng các tạp chất có tính chất lí hóa học tương tự như chất chính có thể không làm ảnh hưởng đến giá trị sử dụng của các CCĐC, nhưng một lượng vết tạp chất có tính chất hóa học khác hẳn hợp chất chính có thể làm cho việc sử dụng các CCĐC đó trở nên không còn phù hợp nữa.

- *Đánh giá mục đích sử dụng của PCRS:*

+ *CCĐC dùng cho phép thử định tính:* thông thường chỉ cần kết quả đánh giá từ một PTN đủ tiêu chuẩn.

+ *CCĐC dùng cho phép thử độ tinh khiết:* yêu cầu mô tả đặc tính rộng hơn so với phép thử định tính, đặc biệt khi sử dụng trong các phép thử giới hạn. Nếu sử dụng kĩ thuật SKLM, thường đề nghị độ tinh khiết tối thiểu ( $\geq 90\%$ ), nhưng yêu cầu độ tinh khiết cao hơn ( $\geq 95\%$ ) đối với kĩ thuật HPLC hoặc GC. Thông thường chỉ cần một PTN tham gia đánh giá CCĐC dùng cho phép thử độ tinh khiết. Nếu CCĐC được phân lập hoặc điều chế lần đầu tiên thì cần tiến hành một số phép thử hóa lí như phổ NMR, phổ MS và phân tích nguyên tố để mô tả đặc tính.

+ *CCĐC dùng cho phép định lượng:* phạm vi các phép thử rất rộng, sử dụng nhiều kĩ thuật đã được thiết lập và thẩm định, bao gồm các phương pháp đã được sử dụng để đánh giá tiêu chuẩn chất lượng (TCCL) trong dược điển. Khi định lượng các CCĐC bằng các phương pháp không đặc hiệu, như đo quang phổ UV hay so màu, cần phải xác định hàm lượng nước và lượng dung môi tồn dư. Khi định lượng bằng các phương pháp đặc hiệu, cần phải xác định hàm lượng tạp chất. Trong trường hợp này, khuyến khích sử dụng thêm các phương pháp tuyệt đối để định lượng chất chính.

+ *CCĐC dùng để hiệu chuẩn thiết bị:* yêu cầu phạm vi các thử nghiệm đánh giá tương tự CCĐC dùng cho phép định lượng.

- *Lựa chọn PPPT để đánh giá PCRS*

Các phương pháp lựa chọn để đánh giá các CCĐC chia thành 2 nhóm: nhóm các phương pháp định tính và nhóm các phương pháp định lượng.

+ *Nhóm các phương pháp định tính*: thường dùng phổ IR. Trường hợp không có CCĐC liên kết hoặc thiếu các dữ liệu về các đặc tính của CCĐC, cần phải xác minh nhận dạng của chất đó bằng một số kỹ thuật dùng để mô tả đặc tính một chất mới, như nghiên cứu tinh thể học, phổ NMR, MS, phân tích nhóm chức, và các phương pháp khác có thể, để đảm bảo một CCĐC được mô tả đặc tính đầy đủ.

+ *Nhóm các phương pháp định lượng*: các PPPT áp dụng phải có mối liên hệ với mục đích sử dụng dự kiến. Các PPPT có thể chia thành ba nhóm sau: các phương pháp cần chất CCĐC ngoài như sắc ký, quang phổ; các phương pháp chỉ phụ thuộc vào tính chất động học nội tại của chất như PPPT độ hòa tan của các thành phần rắn trong dung môi, quét nhiệt vi sai; các phương pháp khác.

- *Xác định giá trị ấn định (GTAD)*

GTAD được xác định dựa trên kết quả của chương trình hợp tác giữa các PTN sử dụng các PPPT khác nhau. Các kết quả phân tích của các PTN tham gia được tập hợp lại để đánh giá theo phương pháp thống kê được qui định cụ thể trong qui trình phân tích. Thông thường các giá trị này được tập hợp từ 5 PTN độc lập tham gia thiết lập chuẩn.

- *Xác định thông tin cần cung cấp kèm theo PCRS*

Nhãn của PCRS phải có đủ những thông tin sau đây: tên thích hợp của một chất, thông thường hay dùng tên không sở hữu quốc tế; tên cơ sở thiết lập PCRS; khối lượng xấp xỉ của nguyên liệu đựng trong bao bì; số lô hoặc số kiểm soát.

- *Đóng gói, bảo quản, nghiên cứu độ ổn định*

+ *Đóng gói*: lượng nguyên liệu đóng cho một lọ nên đủ cho các phép thử có liên quan và chỉ nên đủ cho một lần sử dụng, yêu cầu này chặt chẽ hơn đối với các CCĐC dễ hút ẩm. Khi cần đóng gói một lượng các chất CCĐC rất nhỏ đối với các chất đắt tiền hay khó kiếm, để đảm bảo độ đồng đều, nên pha mẫu thành dạng dung dịch sau đó làm khô làm phương pháp bay hơi hoặc đông khô.

+ *Bảo quản*: điều kiện bảo quản ở nhiệt độ khoảng 2 – 8 °C với đồ bao gói ngăn được sự hấp thụ ẩm, tránh ánh sáng là phù hợp cho đa số các chất đối chiếu hóa

học. Các lọ chất đối chiếu không được mở cho đến khi cân bằng về nhiệt độ PTN để ngăn quá trình hấp thụ ẩm.

+ *Nghiên cứu độ ổn định*: độ ổn định của chất CCĐC được kiểm soát bằng cách đánh giá lại theo định kỳ ở điều kiện bảo quản. Chất đối chiếu không chỉ định hạn dùng, phần lớn được thay thế bằng lô sản xuất mới khi có những biến đổi thuộc tính riêng quan trọng được ghi nhận sau khi được đánh giá lại theo chu kỳ quy định [77].

### **1.6.3. Thiết lập, bảo quản và phân phối chất chuẩn đối chiếu thứ cấp**

Trên cơ sở tham khảo qui trình thiết lập PCRS, các HĐDD quốc gia hay khu vực hoặc các PTN được ủy quyền của cơ quan quản lý dược quốc gia xây dựng qui trình thiết lập SCRS của cơ sở đó. Việc thiết lập SCRS dựa trên PCRS thường được tiến hành do nhu cầu thực tế, khi nguồn PCRS không đủ cung cấp cho nhu cầu sử dụng trong công tác nghiên cứu và đảm bảo chất lượng thuốc. Giá trị ổn định của SCRS thông thường được xử lý thống kê từ kết quả của 3 PTN độc lập tham gia thiết lập chuẩn.

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 dược phẩm. Trong trường hợp này, các chất chuẩn khu vực hay quốc gia được gọi là chuẩn liên kết [26], [27].

Theo qui định của ASEAN, chương trình đánh giá lại CCĐC 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 [26], [27].

Tần suất và cỡ mẫu dùng cho đánh giá lại phụ thuộc một số yếu tố như độ ổn định của CCĐC, 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 CCĐC. Đối với ACRS tần suất đánh giá lại được qui định như sau: 3 năm đối với CCĐC dùng cho phép thử hóa học, 2 năm đối với CCĐC dùng cho phép thử vi sinh, 1 năm đối với các chất đặc biệt nhạy cảm. Chương trình đánh giá lại thường bao gồm một số thử nghiệm sau [26] :

- Xác định hàm lượng nước, mất khối lượng khi sấy khô.

- Xác định tạp chất bằng HPLC hoặc SKLM.
- Xác định hàm lượng chất chính.
- Xác định độ tinh khiết bằng DSC, nếu thích hợp.

Chương trình đánh giá lại được tiến hành bởi các PTN tham gia thiết lập SCRS ban đầu. Khi kết quả xác định lại giá trị ấn định có sai khác từ 1% trở xuống so với giá trị ban đầu thì không phải điều chỉnh giá trị ấn định trên chứng chỉ phân tích, nếu việc xác định lại giá trị ấn định cho thấy sai khác trên 1% so với giá trị ấn định ban đầu thì phải công bố điều chỉnh lại giá trị ấn định trên chứng chỉ phân tích [27].

#### ***1.6.4. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng đánh giá chất chuẩn đối chiếu và yêu cầu của qui trình phân tích***

Tiêu chuẩn chất lượng của CCĐC bao gồm có các CTCL và PPPT. Tiêu chuẩn chất lượng của một CCĐC được xây dựng dựa trên các yếu tố như tiêu chuẩn chất lượng của các hợp chất được sử dụng làm CCĐC được công bố trong dược 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 CCĐC. PPPT sử dụng để đánh giá các CTCL của CCĐC phải là các phương pháp chính thống trong dược điển, và là phương pháp dự kiến sẽ sử dụng để đánh giá mẫu bằng CCĐC đó. Chẳng hạn một CCĐC dự kiến thiết lập cho mục đích định lượng bằng vi sinh vật thì giá trị ấn định hay hàm lượng của CCĐC 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 [77].

Các CTCL thông thường hay được công bố trên chứng chỉ phân tích của CCĐC: 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 PPPT chính thống trong dược điển hay dùng để xác định các CTCL của hoạt chất hoặc thành phẩm thuốc:

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



+ Độ tinh khiết: các kỹ 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 vi sinh

Các CCDC dự kiến được thiết lập là CCDC thứ cấp, tuân theo hướng dẫn của WHO, ASEAN trong quá trình thiết lập chuẩn [26], [27], [77].

#### **1.6.5. Tình hình nghiên cứu chất đối chiếu trong và ngoài nước**

Tại Việt Nam, Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh là hai đơn vị được Bộ Y tế giao nhiệm vụ thiết lập chất chuẩn dược điển Việt Nam và chuẩn phòng thí nghiệm cung cấp cho hệ thống kiểm nghiệm trên toàn quốc.

Tính đến thời điểm tháng 08/2020, quỹ chất chuẩn của hai Viện có khoảng 643 chất chuẩn hóa dược và khoảng 40 chất chuẩn có nguồn gốc từ dược liệu. Trong đó có khoảng 35 tạp chuẩn [80], [81].

Hiện nay, trên thế giới việc nghiên cứu và phân phối chất đối chiếu chủ yếu phát triển mạnh ở các nước có nền công nghiệp dược phẩm tiên tiến như Anh, Mỹ, Đức, Nhật Bản, Trung Quốc, ... Tuy nhiên, giá thành chất chuẩn phân lớn rất đắt và thời gian đặt hàng cho một sản phẩm tương đối dài từ vài tuần thậm chí vài tháng gây ảnh hưởng không nhỏ đến công tác kiểm nghiệm và nghiên cứu khoa học.

Một số nhà cung cấp chất đối chiếu:

- USP (Mỹ) cung cấp chất đối chiếu gốc phục vụ cho yêu cầu kiểm nghiệm theo các chuyên luận USP/NF.
- Sigma-Aldrich (Đức)
- Dalton, Atkin, ....

Riêng các tạp chuẩn trong phạm vi nghiên cứu của luận án được cung cấp bởi một số nhà cung cấp nước ngoài như sau:

<b>STT</b>	<b>Tạp chất</b>	<b>Nhà cung cấp</b>	<b>Số CAS</b>
1	Captopril disulfid	TRC	64806-05-9
		USP	
		Merck	
2	7-ADCA	USP	22252-43-3
		Sigma	
3	<i>D</i> -phenylglycin	USP	875-74-1
		Sigma	
4	D-amlodipin	LGC	113994-41-5
		USP	
		Sigma	
5	Nifedipin A	USP	67035-22-7
		Sigma	
6	Nifedipin B	USP	50428-14-3
		Sigma	

## CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU – ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU

#### 2.1.1. Đối tượng nghiên cứu

Gồm 6 chất hóa học là tạp chất liên quan của thuốc và nguyên liệu làm thuốc:

- Tạp chất captopril disulfid của captopril: acid (2S,2'S)-1,1'-disulphandiylbis[2-methyl-1-oxopropan-3,1-diyl]-bis[pyrrolidin-2-carboxylic].
- Tạp chất 7-ADCA của cephalexin: acid (6R,7R)-7-amino-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo [4.2.0] oct-2-en-2-carboxylic (acid 7-aminodesacetoxycephalosporanic).
- Tạp chất D-phenylglycin của cephalexin: acid (2R)-2-amino-2-phenylacetic.
- Tạp chất D của amlodipin: 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat.
- Tạp chất A của nifedipin: dimethyl-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-pyridin-3,5-dicarboxylat.
- Tạp chất B của nifedipin: dimethyl-2,6-dimethyl-4-(2-nitrosophenyl)-pyridin-3,5-dicarboxylat.

#### 2.1.2. Nguyên vật liệu thử nghiệm

**Bảng 2.1.** Một số nguyên liệu, chất chuẩn dùng trong nghiên cứu

Stt	Tên chất	Nguồn gốc	Mục đích	Độ tinh khiết
1	Captopril	Viện KN thuốc Tp.HCM	Chất chuẩn	99,09%
2	7-ADCA	EP	Chất chuẩn	99,5%
3	D-phenylglycin	Sigma	Chất chuẩn	99%
4	Captopril	Ch.Pharmaceutical	Nguyên liệu	100,65%
5	Dehydronifedipin	USP	Chất chuẩn	99,5%
6	Dehydronitrosonifedipin	USP	Chất chuẩn	99,5%
7	Amlodipin	Viện KN thuốc Tp.HCM	Chất chuẩn	100%
8	D-amlodipin	LGC	Chất chuẩn	91,5%
9	Nifedipin	Viện KN thuốc Tp.HCM	Chất chuẩn	99,5%
10	Cephalexin	Lupin	Nguyên liệu	99,5%

Stt	Tên chất	Nguồn gốc	Mục đích	Độ tinh khiết
11	Nifedipin	Moehs	Nguyên liệu	99%
12	Amlodipin	Ercros	Nguyên liệu	99,5%
13	Phthaloyl amlodipin	Changzhou Ruiming	Nguyên liệu	99,79%

**Bảng 2.2.** Một số dung môi, hóa chất dùng trong nghiên cứu

Stt	Hóa chất – dung môi	Xuất xứ	Tinh khiết
1	Acetonitril	Scharlau	99,9%
2	Acid phosphoric	Merck	85,0%
3	Hydrogen peroxyd 30%	Xilong	30,0%
4	Iod	Xilong	99,5%
5	Kali permanganat	Xilong	99,5%
6	Sắt (III) clorid hexahydrat	Xilong	99,0%
7	Kali dicromat	Jinhuada	99,8%
8	Kali iodid	QREC	99,5%
9	Methanol	Jinhuada	99,5%
10	Ethanol	Xilong	99,7%
11	Enzym penicillin G acylase cố định hóa trên chất nền polymer	HJ B	265 unit/g
12	Aceton	Chemsol	99,7%
13	<i>n</i> -hexan	Chemsol	100%
14	Dicloromethan	Chemsol	99,7%
15	Acid hydrocloric	Xilong	37,0%
16	Dinatri hydrophosphat	Merck	99,0%
17	Cloroform	Xilong	99,0%
18	Methylamin	Merck	99,0%
19	Hydrazin	Merck	99,0%

### 2.1.3. Trang thiết bị

**Bảng 2.3.** Trang thiết bị chính dùng trong nghiên cứu

Stt	Trang thiết bị	Dòng máy	Xuất xứ	Nước sản xuất
1	Cân phân tích 5 số AB-265S	1126461658	Mettler	Thụy Sĩ
2	Cân phân tích 4 số GH - 202	1120280620	Mettler Toledo	Thụy sĩ
3	Cột sắc ký Gemini NX C18 110 A (250 x 4,6 mm; 5 µm)	00G-4454-E0	Phenomenex	Mỹ
4	Hệ thống HPLC - PDA Shimadzu 2030C3D	L21455401307AE	Shimadzu	Nhật
5	Hệ thống HPLC – PDA CBM 20A - PDA và SPD-M20A	L2010512991	Shimadzu	Nhật
6	Hệ thống HPLC - UV-Vis	L202446-05893CR	Shimadzu	Nhật
7	Máy sắc ký lỏng điều chế Shimadzu Prep. LC-20A	L2054900462	Shimadzu	Nhật
8	Máy quét nhiệt vi sai DSC Q20	1732	TA	Mỹ
9	Máy quang phổ hồng ngoại (IR) Prestige-21	52600105	Shimadzu	Nhật
10	Máy quang phổ UV – Vis	A11675400763	Shimadzu	Nhật
11	Hệ thống Shimadzu LC-MS IF-TOF	L20695002360	Shimadzu	Nhật
12	Máy cộng hưởng từ hạt nhân	Z115310/MS10195	Bruker	Mỹ
13	Máy đo phổ hồng ngoại iS50 FT-IR	AUP1300292	Thermo	Mỹ
14	Máy đo năng suất quay cực Kruss Optronic	4181140028	Kruss	Đức

Stt	Trang thiết bị	Dòng máy	Xuất xứ	Nước sản xuất
	P8100-T			
15	Máy cô quay	RE801	Yamato	Nhật
16	Máy đo nhiệt độ nóng chảy MP90	B345975823	Mettler	Thụy Sĩ

#### 2.1.4. Bố trí thí nghiệm

Quy mô thực hiện: phòng thí nghiệm. Các thử nghiệm được thực hiện tại 2 cơ quan:

- Khoa Dược - Đại học Y dược Tp. Hồ Chí Minh:

- Bộ môn Phân tích - Kiểm nghiệm, Khoa Dược, Đại học Y Dược Tp.HCM.

- Bộ môn Hóa hữu cơ, Khoa Dược, Đại học Y Dược Tp.HCM.

- Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp. Hồ Chí Minh.

## 2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.2.1. Tổng hợp và tinh chế các tạp chất

#### 2.2.1.1. Tổng hợp và tinh chế tạp chất *captopril disulfid của captopril*

Dựa trên các tài liệu tham khảo về độ ổn định và sự phân hủy của hoạt chất captopril, một trong số các tạp chất của captopril là captopril disulfid. Các thử nghiệm để tổng hợp tạp này được thực hiện với tác nhân oxy hóa captopril như sau:

#### *Oxy hóa captopril bằng oxy không khí [69], [70]*

- Hòa tan khoảng 10,0 g (0,046 mol) captopril vào 200 ml nước, điều nhiệt ở  $30 \pm 5$  °C, cho tiếp xúc với ánh sáng mặt trời, 6 giờ mỗi ngày, sục oxy không khí (20%) vào dung dịch. Lặp lại thí nghiệm như trên nhưng thay nước cất bằng đệm phosphat pH 7, đệm phosphat pH 10 và dung dịch natri hydroxyd pH 10.

- Lặp lại thí nghiệm như trên với nhiệt độ  $60 \pm 5$  °C.

- Theo dõi thời gian tạo kết tủa từ lúc phản ứng đến 72 giờ.

#### *Oxy hóa captopril bằng sắt (III) clorid hexahydrat [22]*

- Chuẩn bị dung dịch sắt (III) clorid hexahydrat ở các nồng độ 4, 6, 7, 8, 10, 12, 16, 20, 24% với dung môi là nước.

- Hòa tan khoảng 3 g (0,0138 mol) captopril vào 80 ml nước cất, thêm 10 ml HCl đậm đặc, siêu âm 5 phút ở 30 °C, lọc qua giấy lọc. Cho dung dịch sắt (III) clorid hexahydrat vào dịch lọc, khuấy đều, để yên 12 giờ.

Chọn nồng độ dung dịch sắt (III) clorid hexahydrat cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

- Khảo sát thể tích HCl đậm đặc lần lượt là 0; 1; 2; 5; 20; 30 và 40 ml. Chọn thể tích acid hydrocloric cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

#### ***Oxy hóa captopril bằng iod***

- Hòa tan 10 g kali iodid vào 25 ml nước cất, thêm tiếp iod với khối lượng lần lượt là 1,6; 1,7; 1,8; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 và 6,0 g.

- Hòa tan khoảng 3 g (0,0138 mol) captopril vào 80 ml nước cất, siêu âm 5 phút ở 30 °C, lọc qua giấy lọc. Cho dung dịch iod vào dịch lọc, khuấy đều, để yên 12 giờ. Chọn khối lượng iod cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

- Khảo sát các khối lượng kali iodid lần lượt là 5; 15; 20 và 25 g. Chọn khối lượng kali iodid cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

#### ***Oxy hóa captopril bằng kali permanganat***

- Cho 15 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc vào 150 ml nước cất, thêm tiếp kali permanganat với khối lượng lần lượt 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 5,0 và 6,0 g, siêu âm 5 phút ở 30 °C. Hòa tan chính xác khoảng 5 g (0,023 mol) captopril vào 80 ml nước cất, siêu âm 5 phút ở 30 °C, lọc qua giấy lọc. Cho dung dịch kali permanganat vào dịch lọc, khuấy đều, để yên 12 giờ.

Chọn dung dịch kali permanganat cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

- Thay đổi thể tích H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> lần lượt là 1, 2, 5, 10, 20, 30 và 40 ml. Chọn thể tích H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

#### ***Oxy hóa captopril bằng kali dicromat***

- Cho 15 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc vào 150 ml nước cất, thêm tiếp kali dicromat với khối lượng lần lượt 0,6; 0,7; 0,75; 1,0; 1,5; 3,0; 5,0 và 7,0 g, siêu âm 5 phút ở 30 °C. Hòa tan 3 g (0,0148 mol) captopril vào 80 ml nước cất, siêu âm 5 phút ở 30 °C, lọc qua giấy lọc. Cho dung dịch kali dicromat vào dịch lọc, khuấy đều, để yên 12 giờ.

Chọn dung dịch kali dicromat cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

- Khảo sát các thể tích  $\text{H}_2\text{SO}_4$  lần lượt từ 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0; 35,0 và 40,0 ml. Chọn thể tích  $\text{H}_2\text{SO}_4$  cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

***Oxy hóa captopril bằng kali dicromat và ethylen diamin tetra acetic (EDTA)***

- Hòa tan chính xác khoảng 0,6; 0,7; 1,0; 1,5; 3,0 g kali dicromat vào 100 ml nước, siêu âm 5 phút ở 30 °C. Chuẩn bị dung dịch ethylen diamin tetra acetic bằng cách hòa tan khoảng 3 g EDTA vào 50 ml nước nóng.

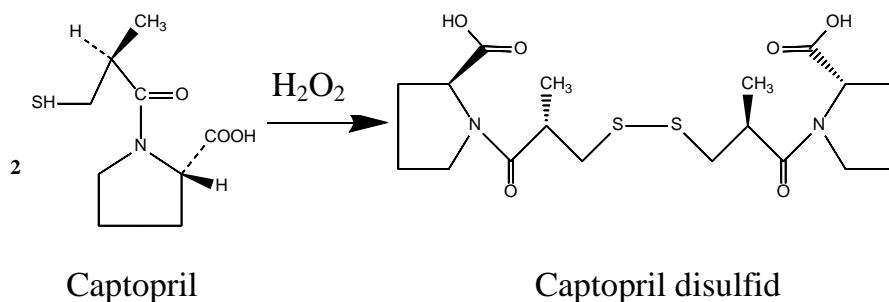
- Hòa tan chính xác khoảng 3 g captopril (0,0148 mol) vào 80 ml nước cất, siêu âm 5 phút ở 30 °C, lọc qua giấy lọc. Cho dung dịch EDTA vào dịch lọc. Acid hóa dung dịch phản ứng bằng 15 ml  $\text{H}_2\text{SO}_4$  đậm đặc và thêm tiếp dung dịch kali dicromat, khuấy đều, để yên 12 giờ.

Chọn dung dịch kali dicromat cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

***Oxy hóa captopril bằng hydrogen peroxyd [61]***

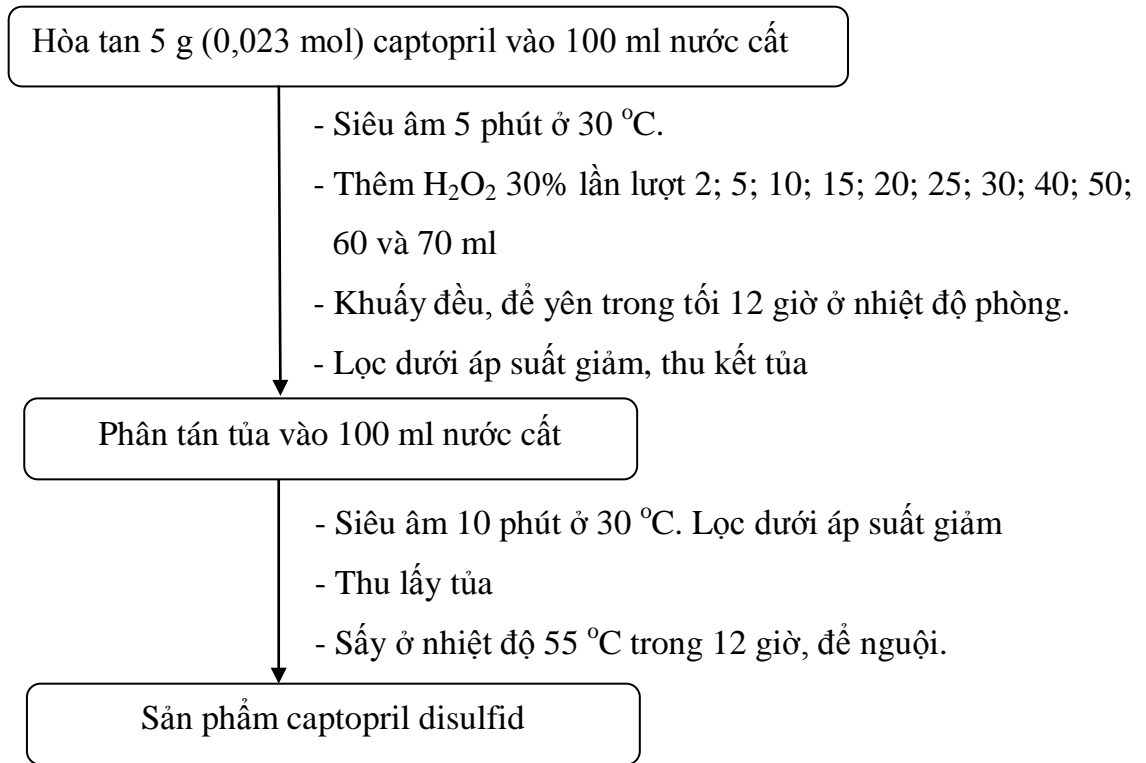
- Hòa tan khoảng 5 g (0,023 mol) captopril vào 100 ml nước cất, siêu âm 5 phút ở 30 °C, lọc qua giấy lọc. Cho dung dịch  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% (100 thể tích) với thể tích lần lượt 2; 5; 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 70 ml vào dung dịch captopril, khuấy đều, để yên trong tối 12 giờ. Chọn thể tích  $\text{H}_2\text{O}_2$  cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

- Thay đổi thời gian phản ứng từ 3-72 giờ và thay đổi môi trường phản ứng từ acid đến kiềm bằng cách cho thêm HCl đậm đặc với thể tích lần lượt 0,5; 1; 2; 5; 10; 20 ml và NaOH với khối lượng lần lượt 0,2; 0,4; 0,6 g. Khảo sát hiệu suất sản phẩm tạo thành. Chọn thời gian và môi trường phản ứng cho hiệu suất phản ứng cao nhất.



**Hình 2.1.** Phản ứng oxy hóa captopril bằng hydrogen peroxyd





**Sơ đồ 2.1.** Quy trình tổng hợp và tinh chế captopril disulfid với tác nhân hydrogen peroxyd

### Tinh chế sản phẩm tổng hợp

Sau khi để yên, lọc hỗn hợp phản ứng dưới áp suất giảm để thu lấy tủa. Phân tán tủa vào 100 ml nước cất, siêu âm 10 phút ở 30 °C. Tiếp tục lọc dưới áp suất giảm để thu lấy tủa. Cho tủa lên mặt kính đồng hồ đã được cân trước, sấy ở nhiệt độ 55 °C trong 12 giờ, để nguội. Sản phẩm tổng hợp được tinh chế bằng hai phương pháp:

- Kết tinh nguội: dung dịch sản phẩm tổng hợp ở nồng độ gần bão hòa ở nhiệt độ phòng.
- Kết tinh nóng: hoà tan sản phẩm tổng hợp trong một lượng tối thiểu dung môi sôi, lọc, sau đó để nguội và làm lạnh.

Do kết tủa ít tan trong nước và tan được trong methanol nên hỗn hợp nước – methanol được lựa chọn để thực hiện quá trình kết tinh nóng và methanol được lựa chọn để kết tinh nguội.

*Kết tinh nóng với hỗn hợp nước – methanol:*

Hòa tan chính xác khoảng 0,5 g tủa vào 25 ml methanol, siêu âm 5 phút ở 30 °C, lọc qua giấy lọc, hứng dịch lọc vào cốc có mỏ chứa 50 ml nước nóng đun cách thủy ở nhiệt độ 65 °C. Tiếp tục đun nóng cho bay hơi đến khi còn lại khoảng 25 ml. Để nguội 10 phút. Lọc dưới áp suất giảm để thu lấy tinh thể, rửa tinh thể trên giấy lọc bằng nước cất. Sau đó, sấy ở 55 °C trong 12 giờ.

*Kết tinh nguội với methanol:*

Cho khoảng 0,5 g tủa vào cốc có mỏ, cho từ từ methanol vào, lắc đều đến khi hòa tan hết, nhỏ nước từ từ đến khi thấy dung dịch bắt đầu xuất hiện tủa. Đậy kín cốc bằng giấy lọc, để yên 24 giờ. Thực hiện lại việc cho nước vào đến khi tủa không xuất hiện thêm nữa, thu lấy tinh thể, rửa tinh thể bằng 5 ml methanol, sấy ở 55 °C trong 1 giờ.

**Tối ưu hóa qui trình tổng hợp captopril disulfid bằng mô hình Box – Behnken**

Chọn quy trình tổng hợp có hiệu suất phản ứng và độ tinh khiết cao dựa vào khối lượng sản phẩm và kết quả thử tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng và nhiệt độ nóng chảy.

Tiến hành tối ưu hóa qui trình tổng hợp bằng phần mềm JMP 5.1 với mô hình Box – Behnken, thiết lập phương trình bề mặt đáp ứng:

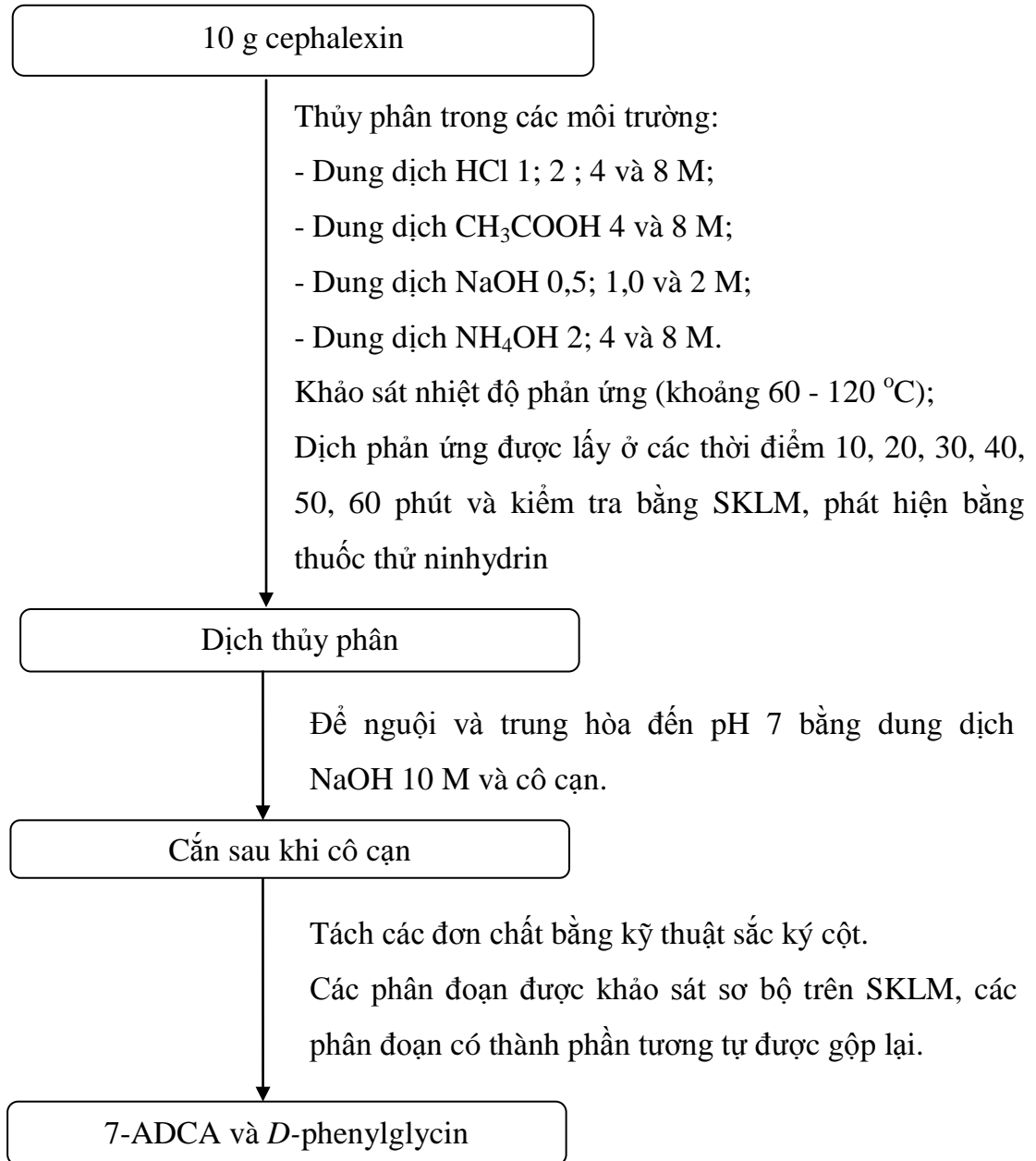
$$Y = b + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + a_4X_1X_2 + a_5X_1X_3 + a_6X_2X_3 + a_7X_1^2 + a_8X_2^2 + a_9X_3^2$$

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

### 2.2.1.2. Tổng hợp và tinh chế 7-ADCA và D-phenylglycin của cephalixin

#### Tổng hợp 7-ADCA và D-phenylglycin của cephalixin

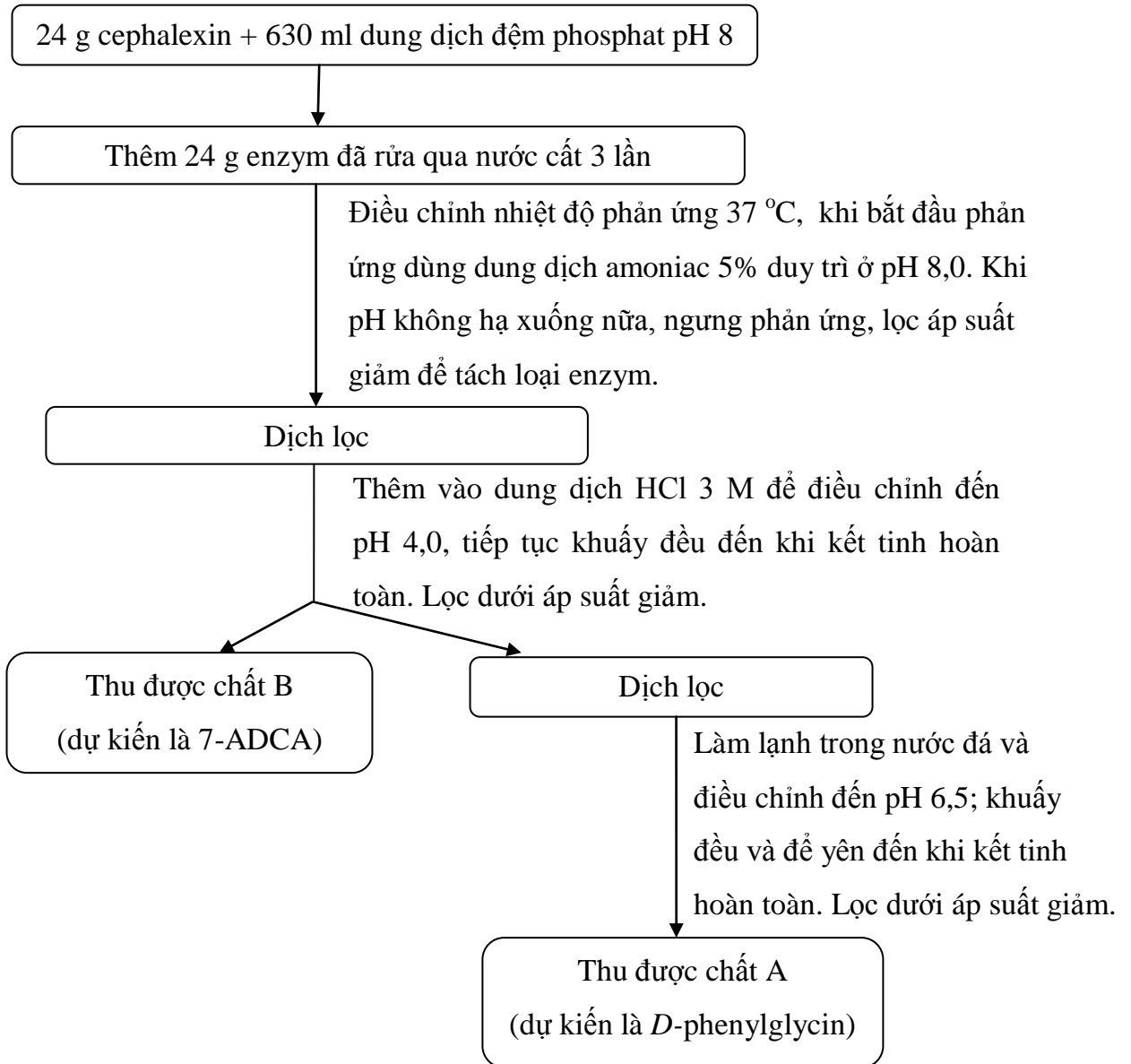
##### Thủy phân cephalixin trong môi trường acid và kiềm



**Sơ đồ 2.2.** Qui trình tổng hợp 7-ADCA và D-phenylglycin bằng cách thủy phân cephalixin trong môi trường acid và kiềm

### Thủy phân cephalixin bằng enzym PGA

**Thí nghiệm 1:** Thủy phân cephalixin bằng enzym trong đệm phosphat pH 8.



**Sơ đồ 2.3.** Qui trình tổng hợp 7-ADCA và *D*-phenylglycine bằng cách thủy phân cephalixin với xúc tác enzym trong môi trường dung dịch đệm phosphat pH 8

**Thí nghiệm 2:** tiến hành tương tự thí nghiệm 1 nhưng thay đệm pH 8 bằng nước cất.

### Tinh chế sản phẩm 7-ADCA và *D*-phenylglycine

- Sản phẩm B sau khi kết tinh lại trong dung môi được tiếp tục tinh chế bằng kỹ thuật HPLC điều chế.

Điều kiện sắc ký: Cột Gemini C18 (250 x 21,2 mm; 0,5  $\mu\text{m}$ ), pha động methanol – nước (10 : 90), thể tích tiêm 4 ml, tốc độ dòng 4 ml/phút.

Các phân đoạn tương ứng với pic rửa giải của sản phẩm B được thu lại, để yên thu được sản phẩm kết tinh. Lọc áp suất giảm thu được sản phẩm B tinh khiết.

- Sản phẩm A cũng được tinh chế bằng HPLC điều chế với qui trình và điều kiện tương tự như trên.

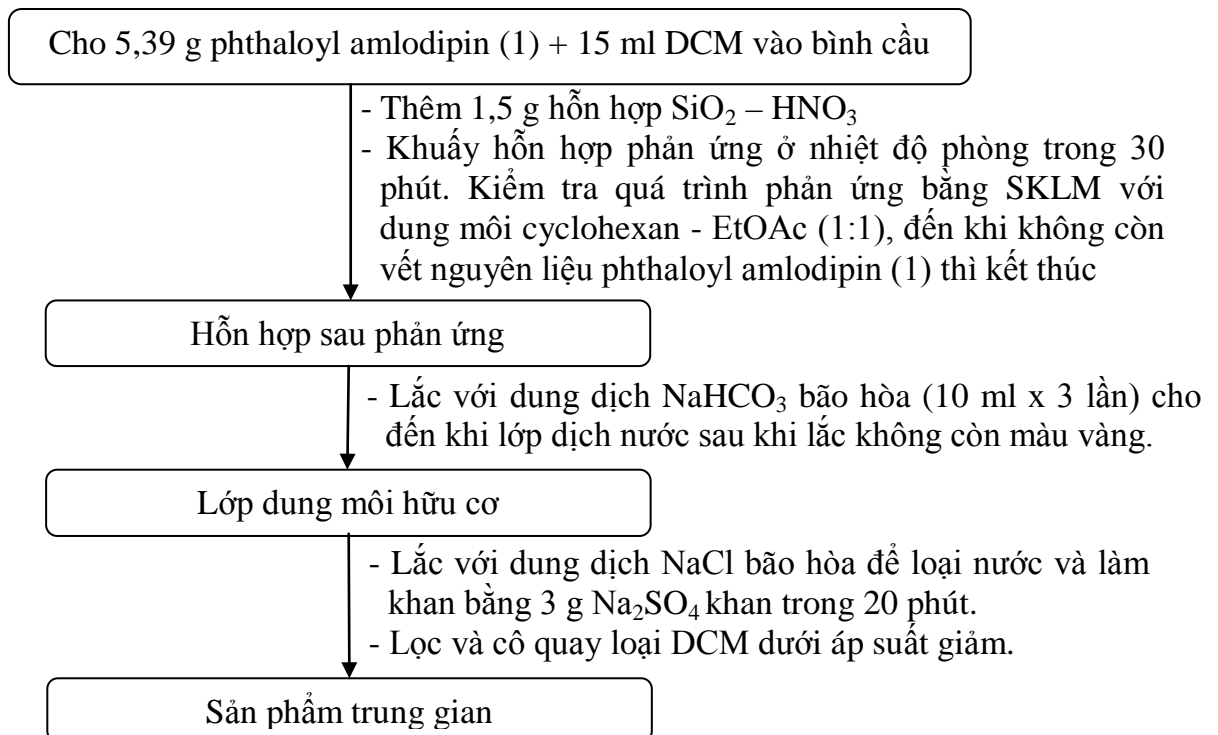
### 2.2.1.3. Tổng hợp và tinh chế tạp D của amlodipin

Dựa theo tài liệu tham khảo [28], tạp D được tổng hợp qua 2 giai đoạn sau:

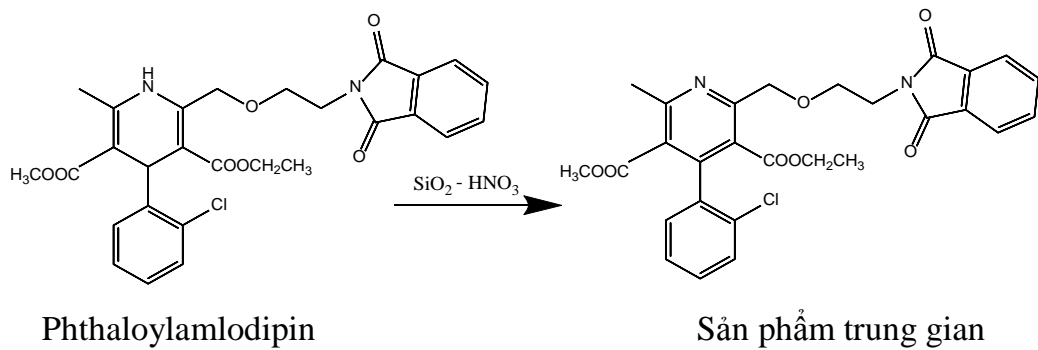
- **Giai đoạn 1:** tổng hợp sản phẩm trung gian 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat.

Sản phẩm trung gian này được tạo thành qua quá trình oxy hóa phthaloyl amlodipin. Vòng 1,4-dihydropyridin bị oxy hóa bởi  $\text{SiO}_2 - \text{HNO}_3$ , mất 2 hydrogen ở vị trí 1 và 4 tạo vòng pyridin (Hình 2.2).

- Hỗn hợp  $\text{SiO}_2 - \text{HNO}_3$ : cân 2 g silica gel cho vào cốc có mỏ, thêm 3,2 ml  $\text{HNO}_3$  đậm đặc, khuấy trong 10 phút ở nhiệt độ phòng đến khi tạo hỗn hợp rắn màu trắng.



**Sơ đồ 2.4.** Qui trình tổng hợp 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat (sản phẩm trung gian)

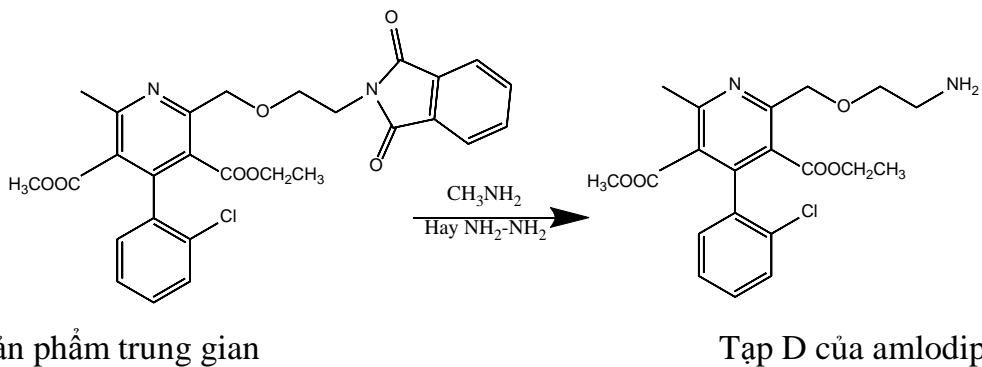


**Hình 2.2.** Phản ứng oxy hóa phthaloyl amlodipin bởi hỗn hợp  $\text{SiO}_2 - \text{HNO}_3$

**Tinh chế sản phẩm trung gian**

- Tinh chế sản phẩm trung gian 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat bằng hỗn hợp aceton – nước (2 : 1).

- **Giai đoạn 2:** tổng hợp tạp D của amlodipin từ sản phẩm trung gian: thủy phân 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat (2) với xúc tác là methylamin hoặc hydrazin.

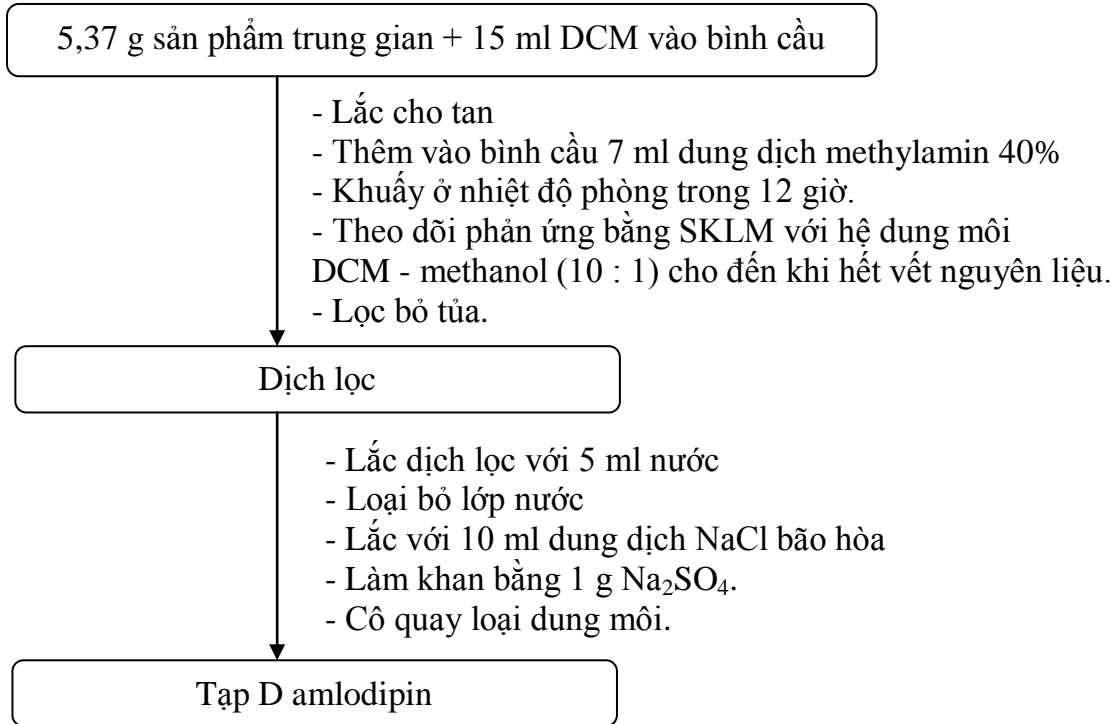


**Hình 2.3.** Phản ứng thủy phân sản phẩm trung gian với xúc tác là methylamin hoặc xúc tác hydrazin

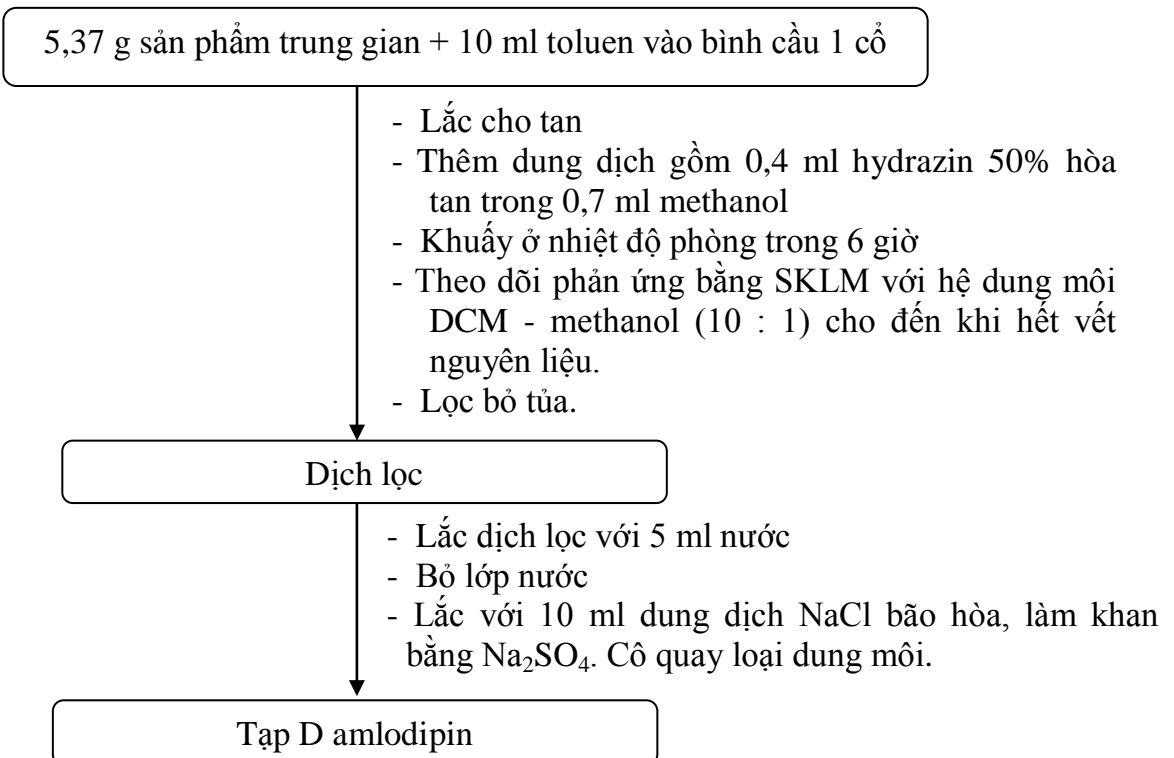
**Tinh chế sản phẩm tổng hợp tạp D của amlodipin**

- Sản phẩm sau phản ứng được chiết bằng HCl 10% (10 ml x 4 lần) để chuyển amin tự do sang dạng muối, gạn lấy lớp nước. Kiểm hóa phần dịch nước bằng 45 ml dung dịch NaOH 10% để chuyển muối trở lại dạng amin tự do. Lắc dung dịch thu được với dung môi DCM để thu dịch chiết sản phẩm.

Lặp lại quy trình chiết cho đến khi thu được sản phẩm tinh khiết (theo dõi bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng).

**Quy trình 1: sử dụng methylamin**

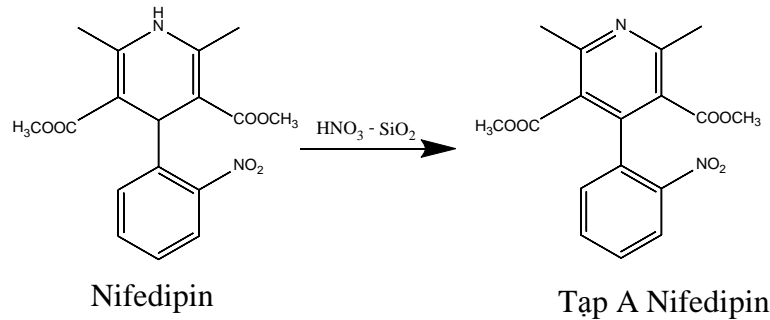
**Sơ đồ 2.5.** Quy trình tổng hợp tạp D của amlodipin bằng cách thủy phân sản phẩm trung gian với xúc tác methylamin

**Quy trình 2: sử dụng hydrazin**

**Sơ đồ 2.6.** Quy trình tổng hợp tạp D của amlodipin bằng cách thủy phân sản phẩm trung gian với xúc tác hydrazin

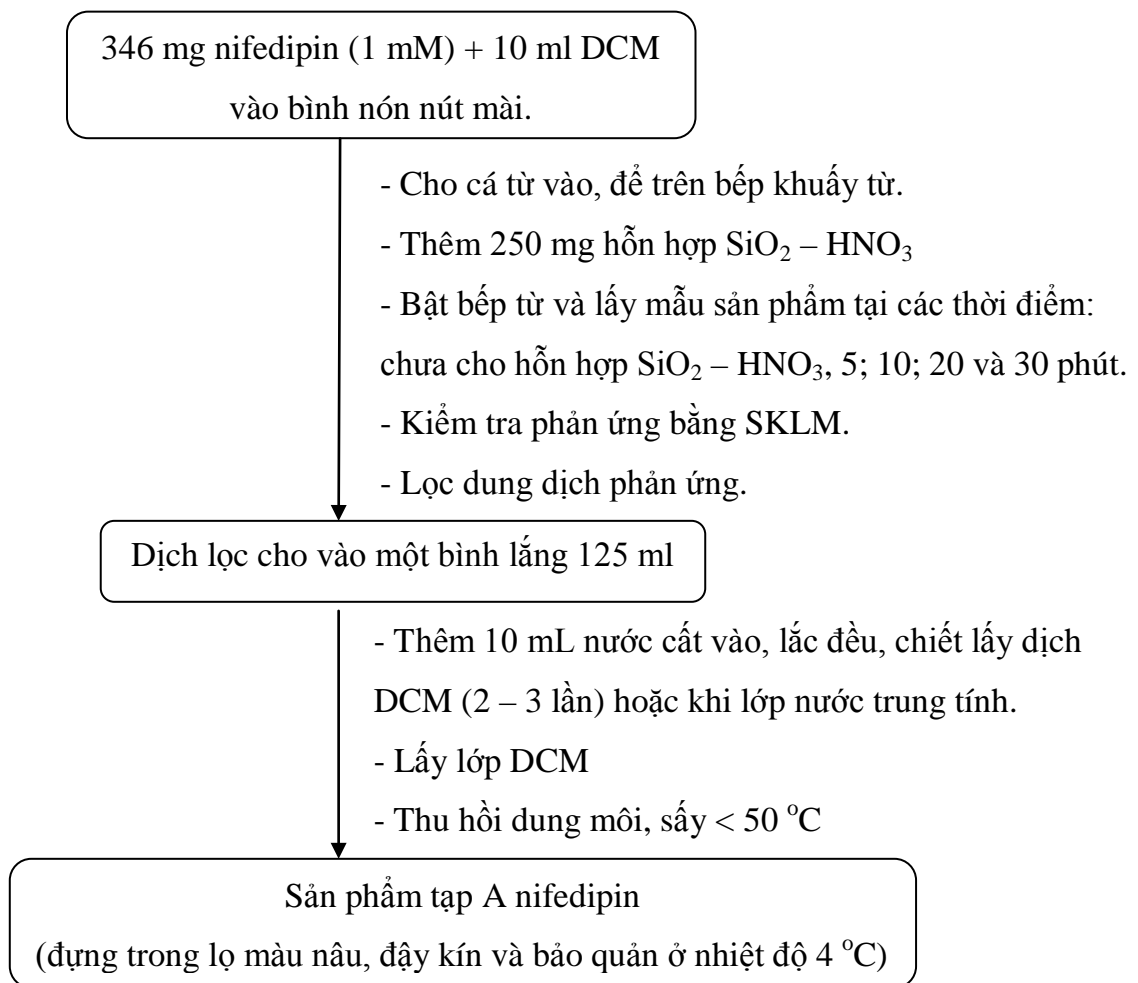
### 2.2.1.4. Tổng hợp và tinh chế tạp A của nifedipin

Quy trình tổng hợp tạp A nifedipin bằng phương pháp oxy hóa nifedipin với acid nitric:



**Hình 2.4.** Phản ứng oxy hóa nifedipin với tác nhân acid nitric

- Hỗn hợp  $\text{SiO}_2 - \text{HNO}_3$ : cân khoảng 2 g silica gel cho vào cốc có mỡ, thêm 3,2 ml  $\text{HNO}_3$  đậm đặc, khuấy trộn đều trong 10 phút.



**Sơ đồ 2.7.** Quy trình tổng hợp tạp A của nifedipin



### Tinh chế sản phẩm tạp A của nifedipin

Sản phẩm được tinh chế bằng kỹ thuật sắc ký cột, sản phẩm được kết tinh lại bằng hỗn hợp aceton – nước.

- Các điều kiện sắc ký cột:

Cột silica gel (60 x 4 cm, 80 g), pha động ethyl acetat – *n*-hexan (2 : 8).

Mẫu thử: 3 g sản phẩm được hòa tan với một lượng tối thiểu DCM.

Nạp mẫu thử lên cột và tiến hành sắc ký, kiểm tra các phân đoạn (5 ml/ phân đoạn) bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi ethyl acetat – *n*-hexan (2 : 8).

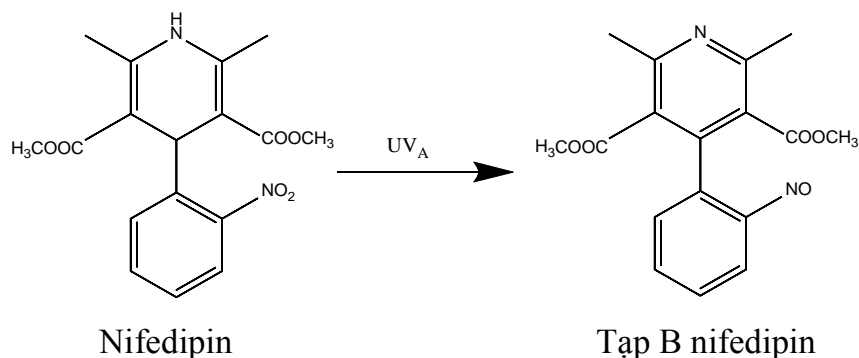
Quá trình sắc ký cột kết thúc khi trên bản mỏng không còn xuất hiện vết sản phẩm.

- Kết tinh lại:

Sản phẩm sau hai lần sắc ký được hòa tan trong một lượng tối thiểu aceton trong cốc có mỏ, thêm nước cất cho tới khi hỗn hợp trở nên đục, để hỗn hợp ở nhiệt độ 4 °C trong 2 giờ sẽ xuất hiện tinh thể. Lọc dưới áp suất giảm, thu sản phẩm kết tinh và sấy chân không ở nhiệt độ không quá 50 °C để thu sản phẩm.

### 2.2.1.5. Tổng hợp và tinh chế tạp B của nifedipin

- Tạp B được tổng hợp bằng phương pháp chiếu tia UV<sub>A</sub> nifedipin.



**Hình 2.5.** Phản ứng quang oxy hóa nifedipin

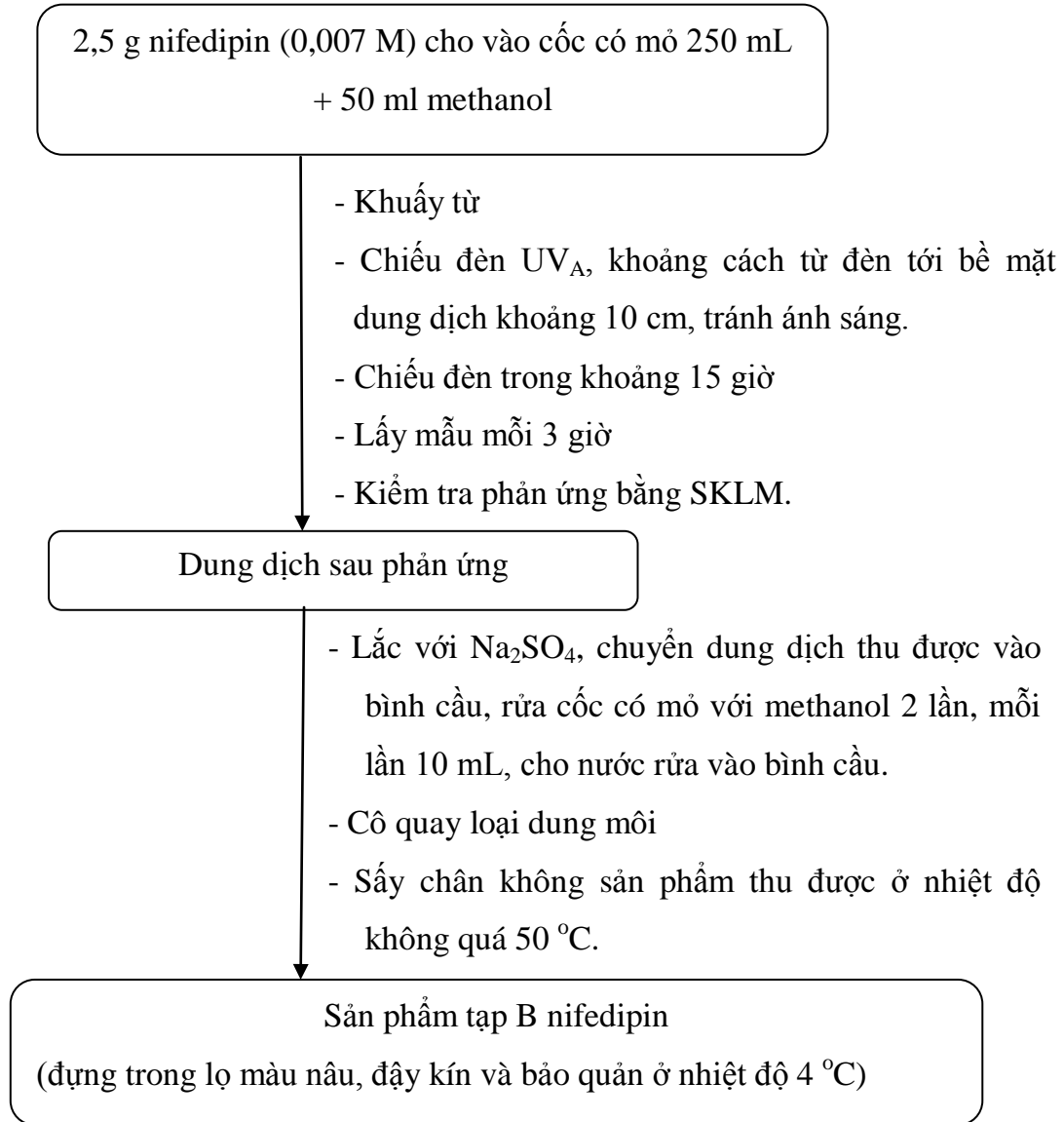
### Tinh chế tạp B của nifedipin

- Sản phẩm tổng hợp được tinh chế bằng sắc ký cột.

Cột silica gel (60 x 4 cm, 80 g), pha động ethyl acetat – *n*-hexan (2 : 8),

Mẫu thử: 2 g sản phẩm được hòa tan với một lượng tối thiểu DCM.

- Nạp mẫu thử và tiến hành sắc ký. Kiểm tra các phân đoạn (5 ml/ phân đoạn) bằng SKLM với hệ dung môi ethyl acetat – *n*-hexan (4 : 6).



**Sơ đồ 2.8.** Quy trình tổng hợp tạp B của nifedipin

### 2.2.1.6. Thử tinh khiết các sản phẩm tổng hợp

Các sản phẩm sau khi tinh chế sẽ được thử tinh khiết.

Thử nghiệm tinh khiết được thực hiện bằng ít nhất 3 phương pháp: đo điểm chảy; sắc ký lớp mỏng trên ít nhất 3 hệ dung môi; phương nhiệt vi sai.

- Xác định nhiệt độ nóng chảy trên máy Gallenkamp.

- Sắc ký lớp mỏng: khảo sát trên ít nhất 3 hệ dung môi có độ phân cực thay đổi. Sản phẩm tinh khiết khi trên sắc ký đồ có 1 vết chính với  $R_f$  thay đổi từ 0,2 đến 0,8.

- Phương pháp DSC: mẫu được cân bằng nhiệt ở 40 °C, gia nhiệt mẫu với tốc độ 10 °C/phút cho đến 150 °C và với tốc độ là 1 °C/phút khi đạt 350 °C. Lưu lượng dòng khí nitơ trong suốt quá trình thực hiện là 50,0 ml/phút. Cân khoảng 2 mg mẫu thử vào chén đựng mẫu. Tiến hành đo nhiệt độ nóng chảy và độ tinh khiết bằng máy DSC.

### **2.2.1.7. Xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp**

- Xác định cấu trúc của các sản phẩm tổng hợp bằng phương pháp phổ nghiệm trên các thiết bị phổ UV – Vis; IR; MS và NMR.

- So sánh với tài liệu khoa học và khẳng định cấu trúc của các sản phẩm tương ứng.

### **2.2.2. Xây dựng và thẩm định qui trình xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao**

#### **2.2.2.1. Chuẩn bị mẫu và điều kiện sắc ký**

##### **a) Captopril disulfid**

Mẫu thử: hòa tan captopril disulfid trong methanol nồng độ 1000 µg/ml.

Mẫu trắng: dung môi hòa tan mẫu.

*Điều kiện sắc ký cố định:*

- Cột Phenomenex Gemini NX (150 x 4,6 mm; 5 µm).

- Đầu dò PDA: bước sóng phát hiện 220 nm là bước sóng qui định để kiểm nghiệm giới hạn tạp captopril disulfid trong các dược điển.

*Điều kiện sắc ký khảo sát:*

- Thành phần pha động, tỷ lệ pha động, pH và nhiệt độ cột.

##### **b) 7-ADCA và D-phenylglycin**

Mẫu thử 7-ADCA: hòa tan 7-ADCA trong dung dịch đệm phosphat pH 5 để có dung dịch nồng độ 1 mg/ml. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Mẫu thử D-phenylglycin: hòa tan D-phenylglycin trong dung dịch đệm phosphat pH 5 để có dung dịch nồng độ 1 mg/ml. Lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Mẫu trắng: Chuẩn bị giống như mẫu thử nhưng không có 7-ADCA (hoặc *D*-phenylglycin).

*Điều kiện sắc ký*

<b>Điều kiện sắc ký đối với 7-ADCA</b>			<b>Điều kiện sắc ký đối với <i>D</i>-phenylglycin</b>		
- Pha động: A: dung dịch đệm phosphat pH 5; pha động B: methanol			- Pha động: A: dung dịch đệm phosphat pH 5; pha động B: methanol		
- Chương trình pha động			- Chương trình pha động		
Thời gian (phút)	Pha động A (% tt/tt)	Pha động B (% tt/tt)	Thời gian (phút)	Pha động A (% tt/tt)	Pha động B (% tt/tt)
0 – 1	98	2	0 – 1	98	2
1 – 20	98 → 70	2 → 30	1 – 20	98 → 70	2 → 30
20 – 23	70 → 98	30 → 2	20 – 23	70 → 98	30 → 2
23 – 30	98	2	23 – 30	98	2
<i>Điều kiện (1):</i> Cột Gemini C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 μm), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μl.			<i>Điều kiện (1):</i> Cột Gemini C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 μm), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μl.		
<i>Điều kiện (2):</i> Cột Gemini C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 μm), tốc độ dòng 2,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μl.			<i>Điều kiện (2):</i> Cột Inertsil®C <sub>8</sub> (250 x 4,6 mm; 5 μm), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μl.		
<i>Điều kiện (3):</i> Cột Inertsil®C <sub>8</sub> (250 x 4,6 mm; 5 μm), tốc độ dòng 2,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μl.			<i>Điều kiện (3):</i> Cột LuxCellulose-1 (250 x 4,6 mm; 5 μm), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10 μl.		
<i>Điều kiện (4):</i> Cột Inertsil®C <sub>8</sub> (250 x 4,6 mm; 5 μm), tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μl.			- Bước sóng phát hiện: 220 nm		
- Bước sóng phát hiện: 220 nm					

### c) Tạp D của amlodipin

Tham khảo điều kiện sắc ký theo chuyên luận amlodipin besylat USP 43 mục tạp chất liên quan.

*Mẫu thử*: hoà tan mẫu thử bằng methanol để có dung dịch nồng độ 1 mg/ml.

*Mẫu trắng*: dung môi hòa tan mẫu.

*Điều kiện sắc ký*:

Cột C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm, 5 µm); tốc độ dòng 1,0 mL/phút; thể tích tiêm 10 µL

Đầu dò UV - Vis: 237 nm.

*Điều kiện sắc ký khảo sát*: thành phần pha động, tỷ lệ pha động và pH; nhiệt độ cột.

### d) Tạp A và tạp B của nifedipin

*Mẫu thử*: cân chính xác khoảng 5 mg tạp A hoặc B, cho vào bình định mức 20 ml, thêm acetonitril tới vạch.

*Mẫu trắng*: dung môi hòa tan mẫu.

*Điều kiện sắc ký*

Cột: Phenomenex Gemini NX C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 3 µm);

Pha động nước – acetonitril (45 : 55); (50 : 50); (55 : 45);

Tốc độ dòng 0,8 ml/phút; thể tích tiêm mẫu 20 µL nhiệt độ cột 30 °C.

Chọn điều kiện sắc ký thích hợp sao cho các pic khảo sát có hệ số đối xứng A<sub>s</sub> trong khoảng 0,8-1,5, pic cần phân tích tách hoàn toàn các pic khác trên sắc ký đồ, độ tinh khiết pic ≥ 99%, thời gian phân tích không quá dài.

### e) Tính kết quả

- Trường hợp có tạp chuẩn: xác định độ tinh khiết bằng phương pháp sắc ký lỏng.
- Trường hợp không có tạp chuẩn: xác định độ tinh khiết bằng phương pháp DSC và sắc ký lỏng, áp dụng phương pháp tính phần trăm diện tích pic.
- Tính kết quả: bỏ qua tất cả các pic phụ trong mẫu thử có thời gian lưu tương ứng với các pic trong mẫu trắng. Độ tinh khiết tính theo chế 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 của tạp

$S_a$ : Diện tích của 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 với các pic trong mẫu trắng).

### **2.2.2.2. Thăm định qui trình**

Thăm định qui trình xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp được thực hiện theo hướng dẫn của ICH, bao gồm các chỉ tiêu khảo sát tính phù hợp hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng [40].

### **2.2.3. Đánh giá và thiết lập tạp chất đối chiếu**

#### **2.2.3.1. Xây dựng phương pháp và các chỉ tiêu đánh giá các tạp tổng hợp**

##### *a) Tính chất cảm quan*

Dựa vào cảm quan xác định hình dạng, màu, mùi và độ tan của mẫu thử.

##### *b) Điểm chảy*

Xác định điểm chảy bằng thiết bị 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 150 °C và với tốc độ là 1 °C/phút khi đạt 350 °C. Lưu lượng dòng khí nitơ trong suốt quá trình là 50,0 ml/phút.

Cân khoảng 2 mg mẫu thử vào chén đựng mẫu. Tiến hành đo nhiệt độ nóng chảy và độ tinh khiết bằng máy DSC. Xác định nhiệt độ nóng chảy và độ tinh khiết trên phần mềm Universal V4.7A TA Instruments.

##### *c) Định tính*

- Phổ hồng ngoại: 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  $^1\text{H-NMR}$  và phổ  $^{13}\text{C-NMR}$ .

##### *d) Giảm khối lượng do sấy khô*

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

Mẫu được cân bằng ở nhiệt độ 50 °C, gia nhiệt với tốc độ 10 °C/phút cho đến 200 °C. Lưu lượng dòng khí nitơ trong suốt quá trình thực hiện là 50,0 ml/phút. Cân một lượng mẫu khoảng 5–10 (mg) cho vào dụng cụ chứa mẫu, xác định hàm ẩm có trong mẫu dựa vào sự thay đổi phần trăm trọng lượng mẫu.

*e) Độ tinh khiết hoặc hàm lượng*

Độ tinh khiết của các chất khảo sát được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng qui về 100% diện tích pic.

**2.2.3.2. Thiết lập chất đối chiếu**

Qui trình thiết lập chất đối chiếu bao gồm:

- *Đóng gói:* các sản phẩm 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: khí nitơ 99,99%, độ ẩm tương đối trong buồng đóng  $\approx 40\%$ .

- *Đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ*

Lấy mẫu ngẫu nhiên theo công thức  $\sqrt{N} + 1$  bằng phần mềm excel trong đó N là tổng số lọ.

Tiến hành xác định độ tinh khiết từng lọ theo phương pháp đã xây dựng. Mỗi lọ được kiểm tra 2 lần.

Đánh giá đồng nhất giữa các lọ: đánh giá theo ISO Guide 35 [43].

Các lọ được coi là đồng nhất khi  $\frac{S_r}{\sqrt{n}} < u_{bb}$

$S_r$ : độ lệch chuẩn lặp lại

n: số lần lặp lại của kết quả đo

$u_{bb}$ : độ không đảm bảo đo từ độ đồng nhất giữa các lọ

Thực tế khó đạt được yêu cầu trên nên có thể áp dụng công thức chuyển đổi sau để tính  $u_{bb}$

$$u_{bb} = \sqrt{\frac{MS_{within}}{n}} \sqrt{\frac{2}{v_{MSwithin}}}$$

$MS_{within}$ : trung bình bình phương trong từng nhóm

$v_{MSwithin}$ : bậc tự do của trung bình bình phương trong từng nhóm

Khi đó các lọ được xem là đồng nhất khi thỏa mãn bất đẳng thức:

$$\frac{MS_{among} - MS_{within}}{n} \leq u_{bb}^2 \leq S_{bb}^2 + \frac{S_r^2}{n}$$

$S_{bb}$ : độ lệch chuẩn của độ đồng nhất giữa các lọ

$MS_{among}$ : trung bình bình phương giữa các nhóm

Đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ theo phương pháp thống kê phân tích ANOVA một yếu tố, so sánh 2 giá trị  $F_{tn}$  và  $F_{tc}$

- Nếu  $F_{tn} < F_{tc}$ : kết quả giữa các mẫu là đồng nhất
- Nếu  $F_{tn} > F_{tc}$ : kết quả giữa các mẫu là không đồng nhất

- Đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm:

Tiến hành dựa theo hướng dẫn của ISO 13528 [42].

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 2 phòng thí nghiệm độc lập đạt GLP hoặc ISO.

Hai phòng thí nghiệm được lựa chọn tại Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh:

- Khoa Vật lý đo lường
- Khoa Thiết lập chất chuẩn - chất đối chiếu.

Mỗi phòng thí nghiệm nhận 6 lọ chất đối chiếu và qui trình phân tích.

Độ đồng nhất liên PTN được đánh giá bằng phép thống kê ANOVA một yếu tố so sánh 2 giá trị  $F_{tn}$  và  $F_{tc}$  trên 12 kết quả định lượng của 2 PTN tham gia đánh giá.

Trường hợp 1:  $F_{tn} \leq F_{tc} \rightarrow$  kết quả trung bình của 2 phòng thí nghiệm khác nhau không có ý nghĩa, quy 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 2 phòng thí nghiệm khác nhau có ý nghĩa, quy 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.

- *Xác định giá trị ấn định – giá trị công bố:*

Các giá trị ấn định và giá trị công bố được xác định theo hướng dẫn của tài liệu ISO 13528 [42].

Giá trị ấn định được xác định từ 12 kết quả của hai phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

Quy ước: Giá trị trung bình thực (Robust average):  $X_{(n)}^*$

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 2 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

$S_{(0)} = 1,483 \cdot$  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  $\bar{X}_{(1)} - \delta_{(1)} X_{i(1)}^* = \bar{X}_{(0)} - \delta_{(1)}$

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

$X_{i(1)}^* = X_0 + \delta_{(1)}$  nếu  $X_{(i)} > X_{(0)} + \delta_{(1)}$

$X_{i(1)}^* = X_1$  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  $X_{(n)}^*$  không đổi thì giá trị này là giá trị ấn định.

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

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.

#### **2.2.4. Xây dựng và thẩm định qui trình định lượng tạp captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm chứa captopril**

##### **2.2.4.1. Chuẩn bị mẫu**

- *Dung dịch chuẩn gốc tạp captopril disulfid (0,1 mg/ml)*: hòa tan chính xác khoảng 5 mg chuẩn captopril disulfid trong methanol vào bình định mức 50 ml, thêm methanol vừa đủ đến vạch.

- *Mẫu chuẩn (1)*: captopril 1000 ppm – captopril disulfid 10 ppm (tương ứng với tỷ lệ cho phép tạp captopril disulfid trong nguyên liệu là 1% theo DDVN)

Cân chính xác khoảng 50 mg captopril chuẩn, cho vào bình định mức 50 ml. Thêm 5 ml dung dịch chuẩn gốc tạp captopril disulfid, bổ sung methanol vừa đủ vạch. Lắc đều, lọc qua màng lọc nylon 0,45  $\mu\text{m}$ .

- *Mẫu chuẩn (2)*: captopril 1000 ppm – captopril disulfid 20 ppm (tương ứng với tỷ lệ cho phép tạp captopril disulfid trong thành phẩm là 2% theo DDVN)

Cân chính xác khoảng 50 mg captopril chuẩn, cho vào bình định mức 50 ml. Thêm 10 ml dung dịch chuẩn gốc tạp captopril disulfid, bổ sung methanol vừa đủ vạch. Lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$ .

- *Mẫu thử*: cân một lượng nguyên liệu/ chế phẩm tương đương 50 mg captopril, cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml methanol, siêu âm khoảng 30 phút, để nguội và thêm methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$

- *Mẫu thử giả lập*: cân một lượng nguyên liệu/ chế phẩm tương đương 50 mg captopril, cho vào bình định mức 50 ml, thêm 5 ml dung dịch chuẩn gốc tạp

captopril disulfid đối với mẫu giả lập nguyên liệu và 10 ml chuẩn gốc tạp với mẫu giả lập chế phẩm. Thêm vào khoảng 30 ml methanol, siêu âm 30 phút, để nguội và thêm methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$ .

- *Mẫu giả dược*: cân một lượng giả dược tương đương 50 mg captopril, cho vào bình định mức 50 ml, thêm khoảng 30 ml methanol siêu âm khoảng 30 phút, để nguội và thêm methanol đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$ .

#### **2.2.4.2. Khảo sát điều kiện sắc ký**

Từ điều kiện sắc ký xác định độ tinh khiết captopril disulfid, tiếp tục khảo sát điều kiện sắc ký để tách hoàn toàn captopril, captopril disulfid và các tạp khác (nếu có).

#### **2.2.4.3. Thẩm định qui trình**

Tiến hành thẩm định qui trình theo hướng dẫn của ICH [40].

##### ***Tính phù hợp của hệ thống***

Chuẩn bị mẫu chuẩn (1), mẫu chuẩn (2), mẫu thử và mẫu thử giả lập, tiêm lặp lại 6 lần.

Tính phù hợp của hệ thống được xác định dựa trên các thông số sắc ký như diện tích pic (S), thời gian lưu ( $t_R$ ), độ phân giải ( $R_S$ ), hệ số đối xứng ( $A_S$ ).

##### ***Tính đặc hiệu***

Tiến hành sắc ký mẫu chuẩn, mẫu thử, mẫu thử giả lập, mẫu giả dược, mẫu pha động, dung môi pha mẫu.

Trên sắc ký đồ, điều kiện sắc ký lựa chọn phải nhận diện được pic tạp captopril disulfid với captopril và các tạp khác nếu có.

##### ***Yêu cầu:***

- Mẫu trắng (pha động và dung môi pha mẫu) và mẫu giả dược không được xuất hiện pic tại thời gian lưu của pic captopril disulfid.

- Sắc ký đồ mẫu thử và mẫu thử giả lập cho 2 pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của 2 pic captopril và captopril disulfid trong mẫu chuẩn, pic captopril disulfid tách hoàn toàn với pic captopril và các pic tạp khác (nếu có).

- Phổ UV-Vis tại thời gian lưu của pic captopril disulfid trong mẫu thử và mẫu giả lập giống phổ UV-Vis tại thời gian lưu của pic tương ứng trong mẫu chuẩn. Sử

dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết cho thấy pic captopril disulfid trong mẫu thử và mẫu thử giả lập đều lớn hơn 99%.

### ***Tính tuyến tính***

- Từ dung dịch chuẩn gốc tap captopril disulfid, pha 10 dung dịch chuẩn trong methanol theo các nồng độ 0,5; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 30,0; 35,0 và 40,0 ppm.
- Tiến hành sắc ký 2 lần cho mỗi dung dịch. Ghi lại sắc ký đồ và giá trị diện tích pic.
- Xác định sự tương quan giữa nồng độ và diện tích pic của các dung dịch. Thiết lập phương trình hồi quy và sự tương quan giữa nồng độ và diện tích pic. Sử dụng trắc nghiệm t kiểm tra ý nghĩa các hệ số phương trình và trắc nghiệm F kiểm tra tính thích hợp của phương trình hồi quy.

*Yêu cầu:*  $R^2 > 0,998$ .

### ***Độ chính xác***

- Độ lặp lại: chuẩn bị 6 dung dịch mẫu thử và mẫu thử giả lập, tiến hành sắc ký theo điều kiện đã chọn, xác định diện tích pic, tính hàm lượng captopril disulfid trong mẫu.
- Độ chính xác trung gian: tiến hành như độ lặp lại nhưng với 2 ngày khác nhau và thiết bị phân tích khác nhau.

*Yêu cầu:* phương pháp phân tích đạt độ chính xác khi hàm lượng hoạt chất thu được trên 6 mẫu thử và mẫu thử giả lập trong một ngày và hàm lượng hoạt chất thu được trên 12 mẫu thử và mẫu thử giả lập trong 2 ngày trên 2 thiết bị đều có  $RSD \leq 2\%$ .

### ***Độ đúng***

Độ đúng được thực hiện bằng cách chuẩn bị các mẫu sau đây

- Thêm chuẩn captopril disulfid vào mẫu thử nguyên liệu captopril đã được xác định hàm lượng captopril disulfid (nếu có) từ kết quả thẩm định độ chính xác, ở ba mức nồng độ 80; 100; và 120 % so với giới hạn 1% đối với nguyên liệu captopril. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu.
- Thêm chuẩn captopril disulfid vào mẫu giả dược đã được thêm nguyên liệu captopril tương ứng với một viên captopril 25 mg, ở ba mức nồng độ 80; 100; và

120 % so với giới hạn 2% đối với thành phẩm chứa captopril. Mỗi mức nồng độ chuẩn bị 3 mẫu.

*Yêu cầu:* tỷ lệ phục hồi của qui trình nằm trong khoảng 98-102 % và  $RSD \leq 2\%$ .

## **2.2.5. Kiểm tra tạp chất liên quan trong nguyên liệu và thành phẩm**

### ***2.2.5.1. Kiểm tra tạp captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm chứa captopril***

Qui trình định lượng tạp captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm chứa captopril sau khi được thẩm định sẽ được áp dụng để kiểm tra tạp chất này trong một số nguyên liệu và chế phẩm chứa captopril trên thị trường.

### ***2.2.5.2. Kiểm tra tạp 7-ADCA và D-phenylglycin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa cephalixin theo DĐVN***

*Dung dịch đệm A (đệm phosphat pH 5,0):* Hòa tan 2,72 g kali dihydrophosphat trong 800 ml nước, điều chỉnh pH đến 5,0 bằng kali hydroxyd 10%, thêm nước vừa đủ 1000 ml.

*Dung dịch thử:* hòa tan một lượng chế phẩm và điền đầy bằng dung dịch đệm A để được dung dịch 1 mg/ml.

*Dung dịch đối chiếu (1):* hòa tan D-phenylglycin chuẩn trong pha động A và điền đầy bằng dung dịch đệm A để được dung dịch 1 mg/ml.

*Dung dịch đối chiếu (2):* hòa tan 7-ADCA chuẩn và điền đầy bằng dung dịch đệm A để được dung dịch 1 mg/ml.

*Dung dịch đối chiếu (3):* lấy 1,0 ml dung dịch đối chiếu (1) và 1,0 ml dung dịch đối chiếu (2) cho vào bình định mức dung tích 100,0 ml, thêm dung dịch đệm A vừa đủ.

*Dung dịch đối chiếu (4):* pha loãng 1,0 ml dung dịch đối chiếu (3) thành 20,0 ml với dung dịch đệm A.

*Dung dịch đối chiếu (5):* hòa tan 10,0 mg natri cefotaxim chuẩn trong đệm A và pha loãng thành 10,0 ml với cùng dung môi. Lấy 1,0 ml dung dịch thu được, thêm 1,0 ml dung dịch thử và pha loãng thành 100,0 ml với cùng dung môi.

*Điều kiện sắc ký*

Cột sắc ký: C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 5 μm).

Pha động: dung dịch đệm A; dung môi B: methanol.

Tốc độ dòng: 1 ml/phút, thể tích tiêm: 20  $\mu$ l, đầu dò UV bước sóng 220 nm.

Chương trình dung môi tương tự qui trình xác định độ tinh khiết (Mục 2.2.2.1b).

*Kiểm tra tính phù hợp hệ thống:*

Tiến hành sắc ký dung dịch thử và các dung dịch đối chiếu (3), (4) và (5).

Phép thử chỉ có giá trị khi độ phân giải ( $R_s$ ) giữa pic tương ứng với *D*-phenylglycin và pic 7-ADCA trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu (3)  $\geq 2,0$ .  $R_s$  giữa pic tương ứng với cephalixin và pic tương ứng với cefotaxim trên sắc ký đồ dung dịch đối chiếu (5)  $\geq 1,5$ .

Bỏ qua những pic phụ có diện tích nhỏ hơn diện tích của pic thứ hai trên sắc ký đồ dung dịch đối chiếu (4).

### **2.2.5.3. Kiểm tra tạp D của amlodipin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa amlodipin theo ĐĐVN**

Dung dịch đệm: 7,0 ml TEA/1000 ml nước; điều chỉnh pH 3,0 bằng acid phosphoric.

*Dung dịch thử:* hòa tan 50,0 mg chế phẩm trong pha động, pha loãng thành 50,0 ml với cùng dung môi.

*Dung dịch chuẩn:* pha dung dịch chuẩn D của amlodipin nồng độ 3 ppm bằng pha động.

*Dung dịch phân giải:* hòa tan 5,0 mg chế phẩm trong 5,0 ml dung dịch hydrogen peroxyd 100 thể tích, đun nóng ở 70 °C trong 45 phút.

*Điều kiện sắc ký:* cột  $C_{18}$  (150 mm x 4,6 mm; 5  $\mu$ m); pha động: acetonitril – methanol – đệm (15 : 35 : 50); tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; thể tích tiêm: 10  $\mu$ l; phát hiện tại bước sóng 237 nm.

*Kiểm tra tính phù hợp hệ thống.* Phép thử chỉ có giá trị khi trên sắc ký đồ của dung dịch phân giải, độ phân giải giữa pic của tạp chất D và amlodipin ít nhất phải bằng 4,5.

#### **2.2.5.4. Kiểm tra tạp A và tạp B của nifedipin trong thành phẩm chứa nifedipin theo ĐĐVN**

*Dung dịch thử*: cân chính xác một lượng bột viên tương ứng với 25 mg nifedipin, thêm 25,0 ml methanol, siêu âm 15 phút, lọc qua màng lọc 0,45  $\mu\text{m}$ .

*Dung dịch đối chiếu (1)*: hòa tan 100,0 mg tạp chuẩn A và 50,0 mg tạp chuẩn B trong methanol vừa đủ 100,0 ml.

*Dung dịch đối chiếu (2)*: trộn 1,0 ml dung dịch thử và 1,0 ml dung dịch đối chiếu (1), pha loãng thành 100,0 ml với pha động.

*Điều kiện sắc ký*: cột  $\text{C}_{18}$  (250 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ); pha động: methanol - nước (3 : 2); tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; thể tích tiêm: 20 ml; phát hiện tại bước sóng 235 nm.

*Kiểm tra tính phù hợp hệ thống*: tiến hành sắc ký với dung dịch đối chiếu (2). Hệ số phân giải giữa pic tạp A và B > 1,5; hệ số phân giải giữa pic tạp B và nifedipin > 1,0.

#### **2.2.5.5. Kiểm tra tạp A và tạp B của nifedipin trong nguyên liệu nifedipin theo ĐĐVN**

*Dung dịch thử*: hòa tan 0,200 g chế phẩm trong 20 ml methanol và pha loãng thành 50,0 ml bằng pha động.

*Dung dịch đối chiếu (1)*: hòa tan 10 mg tạp chuẩn A trong methanol và pha loãng thành 25 ml với cùng dung môi.

*Dung dịch đối chiếu (2)*: hòa tan 10 mg tạp chuẩn B trong methanol và pha loãng thành 25,0 ml với cùng dung môi.

*Dung dịch đối chiếu (3)*: hỗn hợp gồm 1,0 ml dung dịch đối chiếu (1), 1,0 ml dung dịch đối chiếu (2), và 0,1 ml dung dịch thử rồi pha loãng với pha động thành 20,0 ml. Lấy 2,0 ml dung dịch thu được thêm pha động vừa đủ 10,0 ml.

*Điều kiện sắc ký*: cột  $\text{C}_{18}$  (150 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ); pha động là hỗn hợp dung môi acetonitril – methanol – nước (9 : 36 : 55); tốc độ dòng 1,0 ml/phút; thể tích tiêm 20 ml; phát hiện tại bước sóng 235 nm.

*Kiểm tra tính phù hợp hệ thống*

Tiến hành sắc ký dung dịch đối chiếu (3). Phép thử chỉ có giá trị khi sắc ký đồ thu được với dung dịch đối chiếu (3) cho độ phân giải giữa hai pic tương ứng với tạp A và tạp B > 1,5; Rs giữa hai pic tương ứng với tạp B và nifedipin > 1,5; pic tương ứng với tạp A có chiều cao không dưới 20 % chiều cao của thang đo.

- Qui trình định lượng tạp 7-ADCA và *D*-phenylglycin; tạp D của amlodipin; tạp A và tạp B của nifedipin sau khi kiểm tra đạt tính phù hợp hệ thống sẽ được áp dụng để kiểm tra các tạp này trong nguyên liệu và thành phẩm tương ứng.

- Hàm lượng phần trăm tạp trong nguyên liệu được tính theo công thức:

$$(\%)_{tạp} = \frac{S_t \times m_c \times D_t \times C \%}{S_c \times m_t \times D_c} \times 100$$

- $S_t, S_c$  : Diện tích pic của tạp trong dung dịch thử và dung dịch đối chiếu.
- $m_c$  : Lượng cân của tạp đối chiếu (mg).
- $m_t$  : Lượng cân của mẫu thử (mg)
- $C\%$  : Hàm lượng nguyên trạng của tạp đối chiếu.
- $D_c, D_t$  : Độ pha loãng của dung dịch đối chiếu và dung dịch thử.

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

$$(\%)_{tạp} = \frac{S_t \times m_c \times D_t \times m_{tbv} \times C \%}{S_c \times m_t \times D_c \times L} \times 100$$

- $S_t, S_c$  : Diện tích pic của tạp trong dung dịch thử và dung dịch đối chiếu.
- $m_c$  : Lượng cân của tạp đối chiếu (mg).
- $m_t$  : Lượng cân của mẫu thử (mg).
- $m_{tbv}$  : Khối lượng trung bình viên (mg).
- $C\%$  : Hàm lượng nguyên trạng của tạp đối chiếu.
- $D_c, D_t$  : Độ pha loãng của dung dịch đối chiếu và dung dịch thử.
- $L$  : Hàm lượng hoạt chất ghi trên nhãn (mg).



## CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 3.1. TỔNG HỢP VÀ TINH CHẾ TẠP CHẤT

#### 3.1.1. Tổng hợp và tinh chế captopril disulfid

##### 3.1.1.1. Oxy hóa captopril bằng oxy không khí

- Các kết quả thử nghiệm cho thấy việc oxy hóa captopril bằng oxy không khí ở các điều kiện khác nhau đều không xuất hiện kết tủa trong 72 giờ. Dung dịch sau phản ứng được khảo sát bằng phổ UV - Vis đều cho đỉnh hấp thụ giống captopril ban đầu.

##### 3.1.1.2. Oxy hóa captopril bằng sắt (III) clorid hexahydrat

- Oxy hoá captopril bằng sắt (III) clorid hexahydrat xuất hiện tủa vàng nhạt sau 1–5 phút, xuất hiện dung dịch màu xanh lá, sau 15 giây – 3 phút chuyển sang vàng sậm.

**Bảng 3.1.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nồng độ sắt (III) clorid đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) (PL 1.1)

FeCl <sub>3</sub> (%)	4	6	7	8	10	12	16	20	24
Hiệu suất (%)	63,6	65,6	71,6	76,6	78,6	79,6	77,87	80,1	81,1

*Nhận xét:* khi nồng độ sắt (III) clorid hexahydrat tăng thì hiệu suất phản ứng tăng nhẹ.

Ở nồng độ 8–24%, hiệu suất không chênh lệch nhiều, nhưng màu vàng của tủa đậm dần (do tủa hấp phụ dung dịch sắt (III) clorid dư). Vì thế, nồng độ sắt (III) clorid hexahydrat 8% (hiệu suất khoảng 75%) được lựa chọn cho các thử nghiệm thay đổi thể tích HCl đậm đặc tiếp theo.

**Bảng 3.2.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thể tích acid hydrochloric đậm đặc với nồng độ FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O 8% đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) (PL 1.1)

HCl (ml)	0	1	2	5	10	20	30	40
Hiệu suất (%)	76,3	79,4	81,1	83,4	77,8	78,5	78,1	76,1

*Nhận xét:* Hiệu suất phản ứng cao nhất với thể tích HCl thêm vào là 5 ml, tuy nhiên tủa vẫn còn màu vàng. Khi thể tích acid hydrochloric càng lớn, phản ứng xảy ra càng chậm.

### 3.1.1.3. Oxy hóa captopril bằng iod

- Quá trình oxy hoá captopril bằng iod xuất hiện tủa vàng nhạt đến vàng nâu sau 1 phút, dung dịch không màu.

**Bảng 3.3.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của khối lượng iod đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) (PL 1.2)

I <sub>2</sub> (g)	1,6	1,7	1,8	2	3	4	5	6
Hiệu suất (%)	77,3	78,4	80,3	79,3	78,7	81,1	80,6	79,8

*Nhận xét:* Hiệu suất phản ứng gần như không thay đổi theo khối lượng iod. Với khối lượng iod từ 1,6–1,7 g, tủa có màu vàng nhạt. Khi khối lượng iod tăng từ 1,8–6,0 g, màu vàng của tủa tăng rõ rệt. Khi khối lượng iod tăng từ 3–6 g, tủa có màu vàng đậm đến nâu đen. Vì vậy, khối lượng iod 1,6 g được lựa chọn cho thử nghiệm tiếp theo khi thay đổi khối lượng kali iodid.

**Bảng 3.4.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của khối lượng kali iodid đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) (PL 1.2)

Khối lượng KI (g)	5	10	15	20	25
Hiệu suất (%)	80,0	78,3	77,9	78,0	78,5

*Nhận xét:* Sự thay đổi khối lượng kali iodid không ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất phản ứng.

### 3.1.1.4. Oxy hóa captopril bằng kali permanganat

- Quá trình oxy hoá captopril bằng kali permanganat trong môi trường acid sulfuric xuất hiện tủa trắng sau 1–2 phút, dung dịch từ không màu sang vàng đến nâu đỏ.

**Bảng 3.5.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của khối lượng kali permanganat đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) (PL 1.3)

KMnO <sub>4</sub> (g)	2	2,5	3	3,5	4	5	6
Hiệu suất (%)	9,6	10,4	13,4	10,3	4,4	0,8	0,6

*Nhận xét:* Với khối lượng kali permanganat 3 g, hiệu suất phản ứng cao nhất (14%). Khi tăng lượng kali permanganat từ 3–6 g, hiệu suất phản ứng giảm. Với lượng kali permanganat từ 7–9 g, dung dịch phản ứng đậm dần, từ nâu nhạt đến nâu sẫm. Vì

vậy, khối lượng kali permanganat 3 g được lựa chọn cho các thử nghiệm tiếp theo khi thay đổi thể tích acid sulfuric đậm đặc.

**Bảng 3.6.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thể tích acid sulfuric đậm đặc với khối lượng kali permanganat đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) (PL 1.3)

Thể tích H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	15	20	30	40
Hiệu suất (%)	13,9	14,1	7,9	2,9

*Nhận xét:* Với thể tích 20 ml acid sulfuric, hiệu suất phản ứng cao nhất (14%).

### 3.1.1.5. Oxy hóa captopril bằng kali dicromat

Quá trình oxy hoá captopril bằng kali dicromat trong môi trường acid sulfuric xuất hiện tủa sau 1–2 phút, tủa và dung dịch có màu xanh ngọc.

**Bảng 3.7.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của khối lượng kali dicromat đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) (PL 1.4)

K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (g)	0,6	0,7	0,75	1	1,25	1,5	3	5	7
Hiệu suất (%)	30,3	52,9	64,5	66,4	53,5	31,2	27,8	10,5	3,1

*Nhận xét:* Hiệu suất phản ứng cao nhất (khoảng 66%) khi khối lượng kali dicromat 1 g. Hiệu suất phản ứng giảm dần khi lượng kali dicromat tăng 1–7 (g). Vì vậy, khối lượng kali dicromat 1 g được lựa chọn cho các thử nghiệm tiếp theo khi thay đổi thể tích acid sulfuric đậm đặc.

**Bảng 3.8.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thể tích acid sulfuric đậm đặc, khối lượng kali dicromat đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) (PL 1.4)

H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	1	2	5	10	15	20	25	30	35	40
Hiệu suất (%)	57,6	57,9	68,6	70,6	72,9	78,5	80,2	78,5	47,4	40,7

*Nhận xét:* Khi thể tích acid sulfuric từ 1–30 ml, hiệu suất phản ứng tăng. Hiệu suất giảm đột ngột khi thể tích acid sulfuric từ 35–40 ml.

### 3.1.1.6. Oxy hóa captopril bằng kali dicromat và EDTA

Quá trình oxy hoá captopril bằng kali dicromat trong môi trường acid sulfuric với sự hiện diện của EDTA xuất hiện tủa sau 1–3 phút, dung dịch màu tím xanh. Sự có mặt của EDTA không cải thiện hiệu suất phản ứng. (PL 1.5)

### 3.1.1.7. Oxy hóa captopril bằng hydrogen peroxyd

- Quá trình oxy hoá captopril bằng hydrogen peroxyd xuất hiện tủa trắng.

**Bảng 3.9.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thể tích hydrogen peroxyd 30% (100 thể tích) đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid (n = 3) (PL 1.6)

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (ml)	2	5	10	15	20	25	30	40	50	60	70
Hiệu suất (%)	15,3	30,9	40,8	32,7	26,5	19,9	9,0	5,7	3,5	3,5	1,4

Tiếp tục khảo sát pH và thời gian phản ứng với thể tích H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> là 10 ml, hiệu suất phản ứng cao nhất (khoảng 60%) ở pH 2,2 và thời gian phản ứng là 9 giờ (PL 1.6).

- Sản phẩm được tinh chế bằng phương pháp kết tinh nóng và kết tinh nguội.

Kết tinh nguội tốn nhiều thời gian hơn do methanol bay hơi chậm, do đó ưu tiên chọn phương pháp kết tinh nóng.

- Hiệu suất tổng hợp và tinh chế:

**Bảng 3.10.** Hiệu suất tổng hợp, tinh chế và toàn qui trình (n = 3)

Qui trình	Tác nhân oxy hoá khử				
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	FeCl <sub>3</sub>	I <sub>2</sub>	KMnO <sub>4</sub>	K <sub>2</sub> Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub>
Hiệu suất tổng hợp TB (%)	60,24	83,40	78,28	14,09	47,39
Hiệu suất tinh chế TB (%)	57,08	60,13	57,07	51,75	55,40
Hiệu suất toàn qui trình TB (%)	34,38	50,14	44,67	7,29	26,25

### 3.1.1.8. Tối ưu hóa qui trình tổng hợp captopril disulfid bằng mô hình Box-Behnken

Kết quả khảo sát qui trình tổng hợp captopril disulfid từ captopril với tác nhân H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cho thấy:

- Tỷ lệ thể tích H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (100 thể tích) và khối lượng captopril (ml/g) có ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng và tỷ lệ (2 : 1) cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

- pH có ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng và pH 2,2 cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

- Thời gian phản ứng (3, 6, 9, 12, 24, 36 và 48 giờ): với một số điều kiện phản ứng khác được cố định như tỷ lệ  $H_2O_2$ /captopril (2:1) (ml/g) và pH 2,2 thì thời gian phản ứng có ảnh hưởng đến hiệu suất và thời gian phản ứng 9 giờ cho hiệu suất phản ứng cao nhất.

Dựa vào kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng, qui trình tổng hợp captopril disulfid đã được tối ưu hoá bằng phần mềm JMP 5.1 với mô hình Box-Behnken.

Mã hóa các yếu tố khảo sát và bố trí các thí nghiệm như sau:

**Bảng 3.11.** Mã hóa các yếu tố khảo sát qui trình tổng hợp captopril disulfid

Yếu tố khảo sát	Mã hóa	Mức dưới	Mức giữa	Mức trên
		(-1)	(0)	(+1)
Tỷ lệ $H_2O_2$ /CP (ml/g)	$X_1$	1	2	3
Thời gian (giờ)	$X_2$	6	9	12
pH	$X_3$	1	2,2	3,4

Phần mềm JMP 5.1, mô hình Box–Behnken thiết kế ma trận gồm 15 thí nghiệm. Mỗi thí nghiệm 3 lần, tính hiệu suất trung bình toàn qui trình. Kết quả được thể hiện ở bảng sau:

**Bảng 3.12.** Bố trí thí nghiệm Box-Behnken mức cơ bản kiểu bề mặt đáp ứng và hiệu suất trung bình toàn qui trình tương ứng với từng thí nghiệm (n = 3)

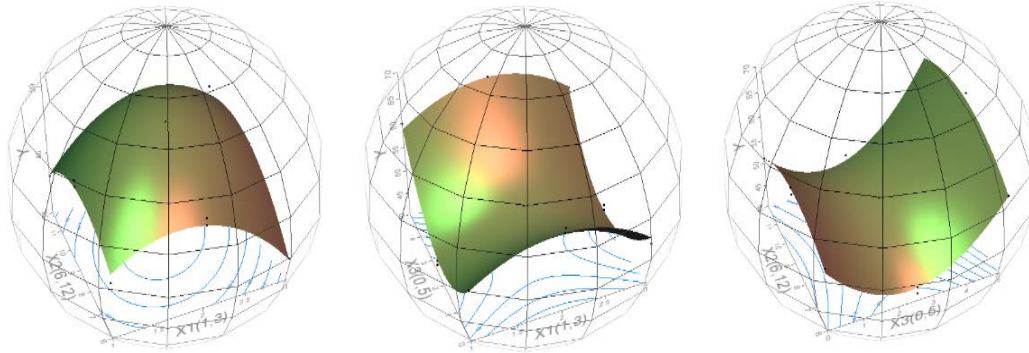
STT	Bố trí thí nghiệm	Yếu tố			Hiệu suất trung bình (%) (Y)
		$X_1$	$X_2$	$X_3$	
1	+0-	3	9	1	48,65
2	+0+	3	9	3,4	59,07
3	++0	3	12	2,2	44,01
4	000	2	9	2,2	49,13
5	0+-	2	12	1	51,03
6	-+0	1	12	2,2	36,23
7	000	2	9	2,2	49,16
8	0++	2	12	3,4	63,10
9	0-+	2	6	3,4	56,89
10	0--	2	6	1	53,56
11	-0+	1	9	3,4	59,98

12	--0	1	6	2,2	38,83
13	+0	3	6	2,2	33,58
14	000	2	9	2,2	49,15
15	-0-	1	9	1	51,05

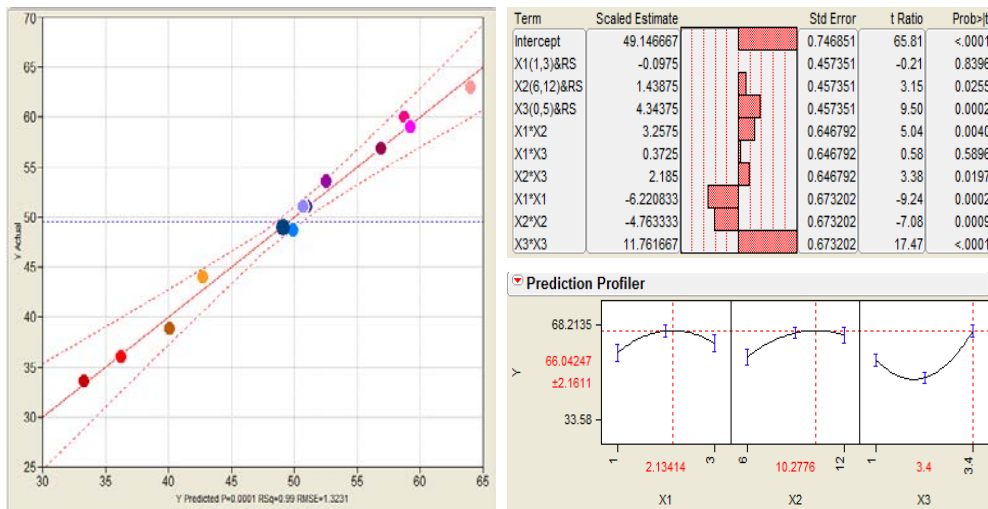
Từ kết quả thu được ở bảng 3.12, tiến hành nhập dữ liệu vào phần mềm JMP 5.1.

Hình 3.1 minh họa mối tương tác giữa các yếu tố khảo sát lên hiệu suất toàn qui trình.

Hình 3.2 thể hiện hiệu suất dự đoán, ý nghĩa của phương trình và các hệ số của phương trình bề mặt đáp ứng.



**Hình 3.1.** Bề mặt đáp ứng hiệu suất toàn qui trình theo các yếu tố khảo sát



**Hình 3.2.** Hiệu suất dự đoán, ý nghĩa của phương trình và các hệ số

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

$$Y = 49,15 + 1,44X_2 + 4,34X_3 + 3,26X_1X_2 + 2,19X_2X_3 - 6,22X_1^2 - 4,76X_2^2 + 11,76X_3^2$$

**Bảng 3.13.** Kết quả tối ưu hóa qui trình tổng hợp captopril disulfid

	b	a <sub>1</sub>	a <sub>2</sub>	a <sub>3</sub>	a <sub>4</sub>	R <sup>2</sup> = 0,992
p < 0,05	0,0001	0,84	0,03	0,0002	0,004	
	a <sub>5</sub>	a <sub>6</sub>	a <sub>7</sub>	a <sub>8</sub>	a <sub>9</sub>	p = 0,0001
	0,59	0,02	0,0002	0,0009	0,0001	
Điều kiện tối ưu	X <sub>1</sub>	2,13				Hiệu suất dự đoán: 66,04%.
	X <sub>2</sub>	10,28				
	X <sub>3</sub>	3,4				

Phương trình bề mặt có  $R^2 = 0,992 > 0,5$ ;  $p = 0,0001 < 0,05$  chứng minh sự tương quan và sự tác động đến hiệu suất của các yếu tố khảo sát là có ý nghĩa.

Phương trình có ý nghĩa khi  $p < 0,05$ . Vậy hai hệ số không có ý nghĩa là  $a_1$  và  $a_5$ .

Để kiểm chứng qui trình tổng hợp captopril disulfid tối ưu, tiến hành thực nghiệm 3 lần với điều kiện dự đoán.

Hiệu suất phản ứng tổng hợp captopril disulfid được trình bày ở bảng sau:

**Bảng 3.14.** Hiệu suất phản ứng tổng hợp captopril disulfid theo điều kiện dự đoán

n	Tỷ lệ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /captopril	Thời gian	pH	Hiệu suất	Khối lượng sản phẩm (g)
1	2,13 (ml/g)	10 giờ	3,4	60,5%	3,03
2	2,13 (ml/g)			65,1%	3,35
3	2,13 (ml/g)	30 phút		63,4%	3,17
<b>Trung bình</b>				<b>63,0%</b>	<b>3,15</b>

Hiệu suất dự đoán 66,0% và hiệu suất thực tế 63,0% khác nhau không có ý nghĩa thống kê, dựa trên phép kiểm T với  $t_m = 1,396 < 4,303 = t_{0,05}$

### 3.1.1.9. Thử tinh khiết sản phẩm tổng hợp

Sản phẩm sau khi tổng hợp được xác định độ tinh khiết bằng phương pháp: xác định khoảng chênh lệch nhiệt độ nóng chảy và phương pháp sắc ký lớp mỏng.

#### Phương pháp đo nhiệt độ nóng chảy

Sản phẩm tổng hợp được xác định nhiệt độ nóng chảy trên máy Gallenkamp.

Nhiệt độ nóng chảy: 234 °C (n = 3); khoảng chênh lệch giữa nhiệt độ bắt đầu chảy và chảy hoàn toàn là +1 °C (235 °C), cho nhận định mẫu thử tinh khiết.

**Phương pháp sắc ký lớp mỏng**

**Mẫu thử:** hòa tan sản phẩm tổng hợp (A) và (B) trong dung môi methanol, nồng độ khoảng 1 mg/ml.

(A): Sản phẩm kết tinh nóng trong hỗn hợp dung môi methanol – nước.

(B): Sản phẩm kết tinh nguội trong dung môi methanol.

**Các hệ dung môi:**

Hệ dung môi (1): benzen – ethyl acetat – acid formic (70 : 30 : 10).

Hệ dung môi (2): cloroform – methanol – acid formic (85 : 15 : 10).

Hệ dung môi (3): butanol – nước – acid formic (40 : 60 : 10).

Chấm hai mẫu thử (A) và (B) lên bản mỏng tráng sẵn silica gel F<sub>254</sub>, triển khai đến khi dung môi di chuyển được 10 cm, lấy bản mỏng và để khô trong tủ hút. Phát hiện vết sắc ký bằng đèn UV tại bước sóng 254 nm.

Kết quả cho thấy trên sắc ký đồ các vết thử (A) và (B) đều tinh khiết SKLM khi cho 1 vết với các R<sub>f</sub> tương ứng với 3 hệ dung môi lần lượt là 0,21; 0,46 và 0,72.

**3.1.1.10. Xác định cấu trúc**

Dữ liệu phổ nghiệm của sản phẩm tổng hợp:

- Phổ UV-Vis (methanol; nm): 200 (PL 1.7).

- Phổ IR (KBr; cm<sup>-1</sup>): 1746 (-COOH); 1601 (-N-C=O) và 490 (-S-S-) (PL 1.8).

- Phổ MS-ESI(-): m/z 431,1319 [M-H]<sup>-</sup>, phù hợp với công thức C<sub>18</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub> (M 432,5320) (PL 1.9).

- Phổ NMR

**Dữ liệu phổ NMR của sản phẩm tổng hợp (PL 1.10 và PL 1.11):**

Phổ <sup>1</sup>H-NMR, δ (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 4,22 (1H, *dd*, H-2); 3,58 (2H, *t*, H-3); 2,60 – 2,70 (2H, *brd*, H-4); 2,87 – 3,00 (2H, *brd*, H-5); 1,81 – 2,18 (1H, *m*, H-2'); 1,92 (2H, *m*, H-3'); 1,09 (3H, *d*, 2'-CH<sub>3</sub>).

Phổ <sup>13</sup>C-NMR, δ (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>, ppm): 173,3 (C-1'); 58,3 (C-2); 46,5 (C-5); 41,2 (C-3'); 36,9 (C-2'); 28,6 (C-3); 24,3 (C-4); 16,5 (2'-CH<sub>3</sub>).

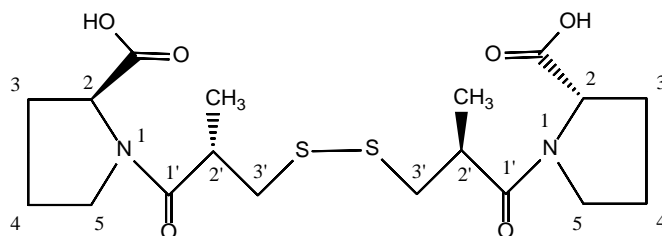


Dữ liệu phổ NMR của captopril disulfid [25]:

Phổ  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , ppm): 4,22 (1H, *dd*, H-2); 3,50 (2H, *t*, H-3); 2,55 – 2,70 (2H, *brd*, H-4); 2,85 – 3,00 (2H, *brd*, H-5); 1,80 – 3,00 (1H, *m*, H-2'); 1,85 – 1,95 (2H, *m*, H-3'); 1,10 (3H, *d*, 2'- $\text{CH}_3$ ).

Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$ ,  $\delta$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , ppm): 172,1 (C-1'); 58,3 (C-2); 46,4 (C-5); 41,2 (C-3'); 36,8 (C-2'); 28,6 (C-3); 24,3 (C-4); 16,4 (2'- $\text{CH}_3$ ).

Từ các kết quả khảo sát và so sánh với tài liệu tham khảo cho thấy sự tương đồng về dữ liệu phổ học của sản phẩm tổng hợp với cấu trúc của captopril disulfid (acid (2S,2'S)-1,1'-disulphanediylbis[2-methyl-1-oxopropan-3,1-diyl]-bis[pyrrolidine-2-carboxylic]).



**Hình 3.3.** Công thức cấu tạo của captopril disulfid

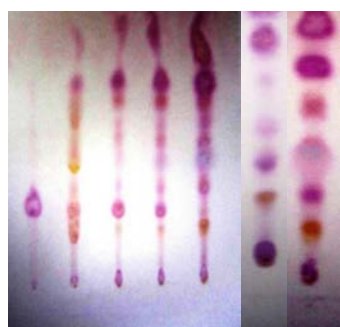
### 3.1.2. Tổng hợp và tinh chế 7-ADCA và D-phenylglycin

#### 3.1.2.1. Thủy phân cephalixin trong môi trường acid và kiềm

Phản ứng thủy phân cephalixin xảy ra tốt nhất trong môi trường HCl 2 M ở 100 °C và NaOH 0,5 M ở 60 °C.

Quá trình thủy phân bằng dung dịch HCl 2 M trong 60 phút cho các vết rõ, số vết ít do đó chọn dung dịch HCl 2 M làm môi trường thủy phân của phản ứng.

(a) (b)



Ce 1 2 3 4 5 6

**Hình 3.4.** Sắc ký đồ sản phẩm thủy phân của cephalixin

(a) Trong natri hydroxyd 0,5 M:

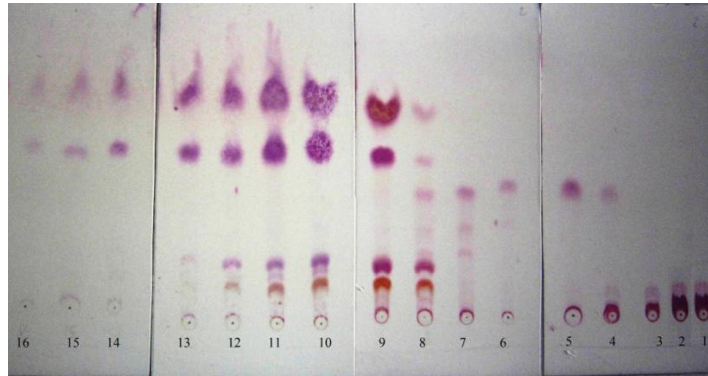
1: sau 10 phút, 2: sau 20 phút, 3: sau 30 phút, 4: sau 40 phút.

(b) Trong acid hydrocloric 2 M:

5: sau 40 phút, 6: sau 60 phút.

Ce: Cephalixin

Tiến hành phản ứng với 8 g cephalixin nguyên liệu trong 80 ml dung dịch HCl 2 M ở 100 °C trong 60 phút. Để nguội hỗn hợp và trung hòa đến pH 7 bằng NaOH 10 M, hỗn hợp sản phẩm được cô cạn. Kết quả khảo sát trên SKLM cho thấy hệ dung môi  $\text{CHCl}_3 - \text{MeOH} - \text{NH}_4\text{OH}$  (60 : 45 : 20) tách được hỗn hợp sản phẩm. Ứng dụng kết quả này trên kỹ thuật sắc ký cột để tách riêng hỗn hợp sản phẩm thủy phân.



**Hình 3.5.** Sắc ký đồ các phân đoạn thu được từ sắc ký cột

- Các phân đoạn thu được từ sắc ký cột được kiểm tra bằng kỹ thuật SKLM với hệ dung môi acid citric 0,1 M - dung dịch  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M - aceton (120 : 80 : 3).
  - Từ sắc ký đồ nhận thấy các phân đoạn 9; 10 và 11 tương đồng, tiến hành gộp 3 phân đoạn và cô thu hồi dung môi, thu được hỗn hợp chất rắn màu vàng nhạt. Tách riêng hỗn hợp này bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế với điều kiện sắc ký: cột Gemini  $\text{C}_{18}$  (250 x 21,2 mm; 0,5  $\mu\text{m}$ ), pha động methanol – nước (10 : 90). Kiểm tra các phân đoạn bằng SKLM, gộp các phân đoạn có thành phần giống nhau, cô thu hồi dung môi, thu được 2 phân đoạn có thể chất rắn A1 (khối lượng 0,20 g) và A2 (khối lượng 0,08 g).
  - Kiểm tra bằng SKLM, dung môi acid citric 0,1 M - dinatri hydrophosphat 0,1 M - aceton (120 : 80 : 3), A2 cho 1 vết chính màu tím có  $R_f = 0,8$  và 1 vết phụ màu vàng có  $R_f = 0,5$ .
  - Bằng kỹ thuật sắc ký lỏng, mẫu thử dung dịch A2 có thời gian lưu và phổ UV tương đồng với mẫu dung dịch *D*-phenylglycin (PL 2.1).
- Hiệu suất phản ứng tổng hợp sản phẩm A2 thấp: 3,5 %.

### 3.1.2.2. Thủy phân cephalexin bằng enzym PGA

Kết quả cho thấy lượng sản phẩm thô thu được từ hai thử nghiệm trong môi trường đệm và môi trường nước khác nhau không đáng kể, do đó chọn điều kiện là môi trường nước để sản phẩm ít bị ảnh hưởng của muối đệm.

**Bảng 3.15.** Khối lượng sản phẩm thô thu được sau phản ứng thủy phân cephalexin

	TN 1	TN 2
Chất A	1,56 g	1,44 g
Chất B	12,00 g	11,58 g

Sản phẩm sau khi thủy phân cephalexin bằng enzym PGA, kiểm tra sản phẩm bằng SKLM với hệ dung môi acid citric 0,1 M - dinatri hydrophosphat 0,1 M - aceton (120 : 80 : 3), các mẫu thử là dịch thủy phân, sản phẩm thủy phân A và B, chuẩn 7-ADCA và *D*-phenylglycin.

Từ kết quả trên SKĐ (hình 3.6.) có thể sơ bộ nhận định A và B tinh khiết và dự đoán A tương đồng với *D*-phenylglycin và B tương đồng với 7-ADCA.

### 3.1.2.3. Tinh chế sản phẩm thủy phân

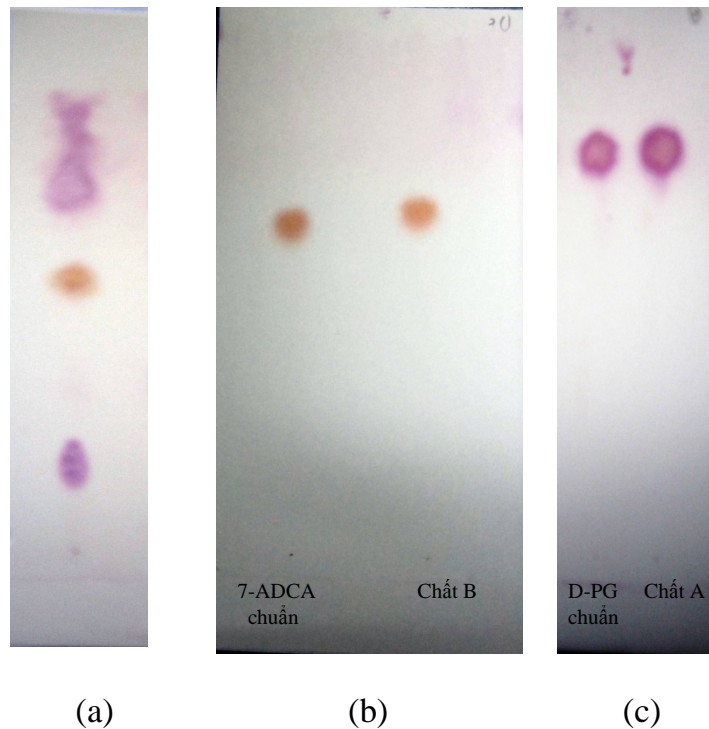
*Phương pháp kết tinh lại:* hòa tan toàn bộ sản phẩm B thu được trong 120 ml acid hydrochloric 0,2 M. Đun nóng, thêm 1,5 g than hoạt, khuấy đều và lọc nóng. Dịch lọc được để nguội và điều chỉnh về pH 4 bằng dung dịch amoniac 5%. Khuấy đều và để yên đến khi kết tủa hoàn toàn, lọc dưới áp suất giảm thu được 4,38 g sản phẩm B dạng tinh thể màu trắng ngà.

*Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế:*

- Chất B sau khi kết tinh được tiếp tục tinh khiết hóa bằng HPLC điều chế.

Chuẩn bị mẫu thử: 4,38 g sản phẩm kết tinh lại của sản phẩm B, hòa tan vào 450 ml dung dịch HCl 0,2 M. Sau khi tiến hành HPLC điều chế thu được 3,504 g sản phẩm B tinh khiết.

- Từ 1,44g chất A sau khi tiến hành HPLC điều chế thu được 1,14 g sản phẩm A tinh khiết.



**Hình 3.6.** Sắc ký đồ sản phẩm thủy phân của cephalixin với xúc tác enzym trong môi trường nước

(a): Sản phẩm thủy phân; (b): Chất B so sánh với chất đối chiếu 7-ADCA;  
 (c): Chất A so sánh với chất đối chiếu *D*-phenylglycin

#### 3.1.2.4. Thử tinh khiết sản phẩm tinh chế

Phương pháp sắc ký lớp mỏng.

Mẫu thử: sản phẩm A, B ở nồng độ 1 mg/ml trong HCl 0,2 M.

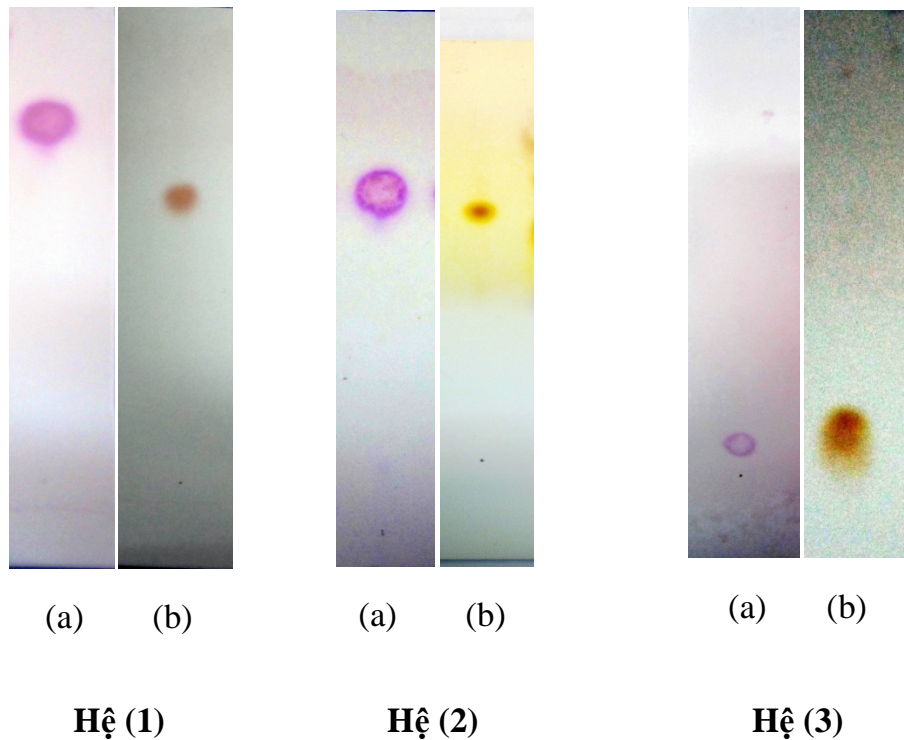
Các hệ dung môi:

- Hệ (1): acid citric 0,1 M – natri hydrophosphat 0,1 M – acetone (120 : 80 : 3).
- Hệ (2): methanol – nước (60 : 50).
- Hệ (3): cloroform – methanol – amoni hydroxid (80 : 45 : 20).

Chấm hai mẫu thử A và B lên bản mỏng silica gel GF<sub>254</sub>, triển khai đến khi dung môi di chuyển được 10 cm, lấy bản mỏng và để khô trong tủ hút. Phát hiện vết sắc ký bằng thuốc thử ninhydrin. Trên SKĐ các vết thử (a) và (b) đều tinh khiết SKLM khi cho 1 vết duy nhất với các  $R_f$  tương ứng với 3 hệ dung môi lần lượt là:

$$R_f = 0,80; 0,65 \text{ và } 0,29 \text{ đối với kết tinh A;}$$

và  $R_f = 0,65; 0,55$  và  $0,20$  đối với kết tinh B.



**Hình 3.7.** Sắc ký đồ xác định độ tinh khiết sản phẩm A và B  
 (a) Sản phẩm A;                      (b) Sản phẩm B

### 3.1.2.5. Xác định cấu trúc

#### **Đặc tính và cấu trúc của sản phẩm A:**

- Tinh thể màu trắng, năng suất quay cực  $[\alpha]_D^{25} = -156,0$  ( $c = 2$  g/L, HCl 3 N).

(kết quả so với *D*-phenylglycin  $[\alpha]_D^{20} = -155,0$  ( $c = 1$  g/L, HCl 1 N (Sigma))

- Dữ liệu phổ nghiệm:

Phổ IR (KBr;  $\text{cm}^{-1}$ ): 2933 (N-H); 2617 (C-H), 1612 (C-N) 1508 (C=C) (PL 2.2).

Phổ MS-ESI(+):  $m/z$  152,0707  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , phù hợp công thức  $\text{C}_8\text{H}_9\text{NO}_2 + \text{H}$  ( $M = 152,0711$  (PL 2.3).

*Dữ liệu phổ NMR của sản phẩm A* (PL 2.4 và PL 2.5):

Phổ  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm): 7,48 (1H, *m*, H-4); 7,47 (1H, *m*, H-5);  
 7,47 (1H, *m*, H-7); 7,44 (1H, *m*, H-6); 7,44 (1H, *m*, H-8); 5,02 (1H, *s*, H-2).

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $\delta$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm): 171,6 (1-COOH); 132,4 (C-6); 130,1 (C-3); 129,6 (C-4); 129,6 (C-8); 128,0 (C-5); 128,0 (C-7); 57,2 (C-2).

Dữ liệu phổ NMR của *D*-phenylglycin [52]:

Phổ  $^1\text{H}$ -NMR,  $\delta$  (500 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm): 7,35 (1H, *dd*, H-4); 7,35 (1H, *dd*, H-5); 7,35 (1H, *dd*, H-7); 7,35 (1H, *dd*, H-6); 7,35 (1H, *dd*, H-8); 5,10 (1H, *s*, H-2).

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $\delta$  (125 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ , ppm): 171,2 (1-COOH); 132,0 (C-6); 129,5 (C-3); 129,1 (C-4); 129,1 (C-8); 128,2 (C-5); 128,2 (C-7); 57,2 (C-2).

Như vậy, kết hợp các dữ liệu phổ và so với tài liệu, sản phẩm A có cấu trúc phù hợp với *D*-phenylglycin.

***Đặc tính và cấu trúc của sản phẩm B:***

- Tinh thể màu trắng ngà.

- Dữ liệu phổ nghiệm:

Phổ IR (KBr;  $\text{cm}^{-1}$ ): 3151 (N-H); 2933 (C-H); 1800 (C=O); 1618 (C-N) và 1539  $\text{cm}^{-1}$  (C=C) (PL 2.6).

Phổ MS-ESI(+):  $m/z$  237,03  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , phù hợp công thức  $\text{C}_8\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S} + \text{Na}$  (M = 237,24 (PL 2.7)

Dữ liệu phổ NMR của sản phẩm B (PL 2.8 và PL 2.9):

Phổ  $^1\text{H}$ -NMR,  $\delta$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , ppm): 4,91 (1H, *d*,  $J$  5,0; H-6); 4,70 (1H, *d*,  $J$  5,0; H-7); 3,55 (1H, *d*,  $J$  18,5; H-4a); 3,29 (1H, *d*,  $J$  18,5; H-4b); 1,98 (3H, *s*,  $-\text{CH}_3$ ).

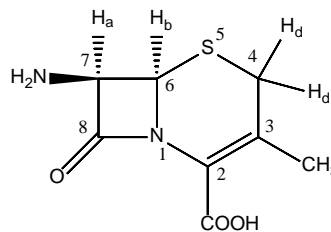
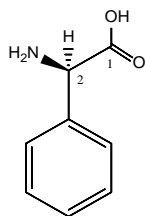
Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $\delta$  (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , ppm): 169,5 (2-COOH); 163,8 (C-8); 127,9 (C-2); 122,8 (C-3); 63,3 (C-6); 58,5 (C-7); 28,4 (C-4); 19,4 ( $-\text{CH}_3$ ).

Dữ liệu phổ NMR của 7-ADCA [66]:

Phổ  $^1\text{H}$ -NMR,  $\delta$  (500 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , ppm): 4,89 (1H, *d*,  $J$  6,0; H-6); 4,65 (1H, *d*,  $J$  6,0; H-7); 3,48 (1H, *d*,  $J$  17,6; H-4a); 3,23 (1H, *d*,  $J$  18,5; H-4b); 1,98 (3H, *s*,  $-\text{CH}_3$ ).

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $\delta$  (125 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ , ppm): 169,3 (2-COOH); 163,2 (C-8); 127,2 (C-2); 122,1 (C-3); 63,1 (C-6); 58,0 (C-7); 28,2 (C-4); 19,5 ( $-\text{CH}_3$ ).

Như vậy, kết hợp các dữ liệu phổ và so với tài liệu, sản phẩm B có cấu trúc phù hợp với 7-ADCA (acid 7-aminodesacetoxycephalosporanic).



**Hình 3.8.** Cấu trúc hóa học của *D*-phenylglycine **Hình 3.9.** Cấu trúc hóa học của 7-ADCA

### 3.1.2.6. Hiệu suất tổng hợp và tinh chế:

**Bảng 3.16.** Hiệu suất điều chế hai tạp chất của cephalixin

Hiệu suất	7-ADCA	<i>D</i> -phenylglycine
Hiệu suất phản ứng	82,3%	14,5%
Hiệu suất tinh chế qua kết tinh lại	37,8%	-
Hiệu suất tinh chế qua sắc ký điều chế	80,0%	79,2%
Hiệu suất toàn qui trình	24,9%	11,5%

### 3.1.3. Tổng hợp và tinh chế tạp D của amlodipin

#### 3.1.3.1. Tổng hợp sản phẩm trung gian

- Tổng hợp sản phẩm trung gian 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat.

Sau khi triển khai sắc ký với hệ dung môi cyclohexan – ethyl acetat (1: 1). Trên sắc ký đồ xuất hiện 2 vết đều có  $R_f$  thấp hơn  $R_f$  vết phthaloyl amlodipin.

Kết quả khảo sát điều kiện phản ứng ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp sản phẩm trung gian từ nguyên liệu phthaloyl amlodipin:

*Kết quả khảo sát ảnh hưởng của khối lượng  $SiO_2 - HNO_3$*

**Bảng 3.17.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của khối lượng hỗn hợp  $SiO_2 - HNO_3$

Lượng $SiO_2 - HNO_3$ (g)	0,1	0,15	0,2	0,25
Hiệu suất (%)	75	80	77	75

*Nhận xét:* khi tăng lượng  $SiO_2 - HNO_3$  hơn 0,15 g hiệu suất phản ứng giảm.

*Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng:*

**Bảng 3.18.** Kết quả khảo sát ảnh hưởng của thời gian phản ứng

Thời gian phản ứng (phút)	10	20	30	60
Hiệu suất (%)	80	84	85	85

*Nhận xét:* Khi tăng thời gian phản ứng trên 20 phút, hiệu suất phản ứng tăng không đáng kể. Thời gian phản ứng thích hợp là 20 đến 30 phút.

***Tinh chế, thử tinh khiết và xác định cấu trúc sản phẩm trung gian***

*- Tinh chế sản phẩm trung gian:*

Sản phẩm sau phản ứng được hòa tan trong 100 ml aceton, sau đó thêm vào 50 ml nước. Sau 48 giờ, lọc và thu được tinh thể màu vàng nhạt. Lặp lại quá trình tinh chế cho đến khi thu được sản phẩm tinh khiết. Hiệu suất phản ứng 85%.

*- Thử tinh khiết sản phẩm trung gian:*

Các hệ dung môi: cyclohexan – ethyl acetat (1 : 1)

*n*-hexan - aceton (2 : 5)

dicloromethan - methanol (40 : 1)

Trên sắc ký đồ, vết thử cho 1 vết duy nhất với các  $R_f$  tương ứng với 3 hệ dung môi lần lượt là 0,21; 0,36 và 0,61.

*- Xác định cấu trúc sản phẩm trung gian:*

- Phổ IR (KBr;  $\text{cm}^{-1}$ ): 1716 (C=O); 1251 (C–O) và 873 và 817 (PL 3.1).

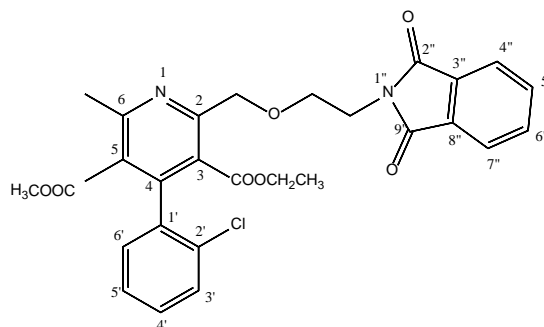
- Phổ MS-ESI(+):  $m/z$  559,89  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , phù hợp với  $\text{C}_{28}\text{H}_{25}\text{ClN}_2\text{O}_7 + \text{Na}$  ( $M = 559,93$  (PL 3.3)).

- Phổ NMR (PL 3.4 và PL 3.5):

Phổ  $^1\text{H}$ -NMR,  $\delta$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 7,82 (1H, *dd*,  $J$  5,5; 2,5; H-4''); 7,82 (1H, *dd*,  $J$  5,5; 2,5; H-7''); 7,70 (1H, *dd*,  $J$  7,0; 4,0; H-5''); 7,70 (1H, *dd*,  $J$  7,0; 4,0; H-6''); 7,39 (1H, *d*,  $J$  8,0; H-3'); 7,29 (1H, *dt*,  $J$  7,5; 1,5; H-6'); 7,24 (1H, *m*, H-5'); 7,14 (1H, *dd*,  $J$  7,5; 2,0; H-4'); 4,82 (2H, *q*,  $J$  13,0  $\text{CH}_2(-\text{COOC}_2\text{H}_5)$ ); 4,00 (2H, *s*, 2- $\text{CH}_2$ ); 3,87 (2H, *t*,  $J$  5,5;  $\text{CH}_2$ ); 3,71 (2H, *t*,  $J$  6,0;  $\text{CH}_2$  vòng phthalimido); 3,52 (3H, *s*,  $\text{CH}_3(-\text{COOCH}_3)$ ); 2,60 (3H, *s*, 6- $\text{CH}_3$ ); 0,91 (3H, *t*,  $J$  7,0  $\text{CH}_3(-\text{COOC}_2\text{H}_5)$ ).



Các kết quả khảo sát cho thấy sự tương đồng về dữ liệu phổ học của sản phẩm tổng hợp với cấu trúc 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat.



**Hình 3.10.** Cấu trúc hóa học của sản phẩm trung gian 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat

### 3.1.3.2. Tổng hợp và tinh chế tạp D của amlodipin từ sản phẩm trung gian

Sau khi tổng hợp và tinh chế, kết quả thu được như Bảng 3.19.

**Bảng 3.19.** Khối lượng sản phẩm D sau khi tinh chế

	Khối lượng (g)	Hiệu suất (%)
Qui trình 1 (dùng methylamin)	2,0	49,3
Qui trình 2 (dùng hydrazin)	1,9	46,8

### 3.1.3.3. Thử tinh khiết sản phẩm tổng hợp

Phương pháp sắc ký lớp mỏng. Mẫu thử được hòa tan trong methanol, nồng độ 20 ppm.

Các hệ dung môi:

Hệ dung môi (1): ethyl acetat – methanol (4 : 1)

Hệ dung môi (2): dicloromethan – methanol (10 : 1)

Hệ dung môi (3): cloroform – methanol (7 : 1)

Phát hiện vết sắc ký bằng đèn UV tại bước sóng 254 nm.

*Kết quả:* trên sắc ký đồ các vết thử từ 2 tác nhân phản ứng đều tinh khiết SKLM khi cho 1 vết duy nhất với các  $R_f$  tương ứng với 3 hệ dung môi lần lượt 0,32; 0,35 và 0,42.

### 3.1.3.4. Xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp

- Dữ liệu phổ nghiệm của sản phẩm tổng hợp:

Phổ IR (KBr;  $\text{cm}^{-1}$ ): 1238 (C-O); 1733 (C=O); 3523 (N-H) (PL 3.6).

Phổ MS-ESI(+):  $m/z$  407,1328  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , phù hợp  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{ClN}_2\text{O}_5 + \text{H}$  ( $M = 407,1378$ ) (PL 3.8, PL 3.9).

Phổ NMR (PL 3.10, PL 3.11, PL 3.12, PL 3.13):

Phổ  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 7,41 (1H, *dd*,  $J$  8,0; 1,5, H-3'); 7,31 (1H, *dt*,  $J$  7,5; 2,0; H-6'); 7,27 (1H, *dd*,  $J$  7,5; 1,5; H-5'); 7,17 (1H, *dd*  $J$  7,5; 1,5; H-4'); 4,80 (2H, *q*,  $J$  12,5,  $\text{CH}_2(-\text{COOC}_2\text{H}_5)$ ); 3,99 (2H, *q*,  $J$  7,0; 2- $\text{CH}_2$ ); 3,52 (2H, *m*,  $\text{CH}_2$ ); 3,48 (3H, *s*,  $\text{CH}_3(-\text{COOCH}_3)$ ); 2,84 (2H, *t*,  $J$  5,0,  $-\text{CH}_2-$ ); 2,64 (3H, *s*, 6- $\text{CH}_3$ ); 0,92 (3H, *t*  $J$  7,0,  $\text{CH}_3(-\text{COOC}_2\text{H}_5)$ ).

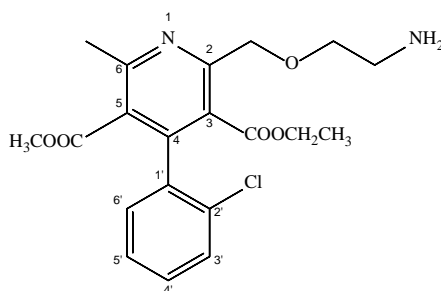
- Dữ liệu phổ  $^1\text{H-NMR}$  của tạp D amlodipin [15]

Phổ  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 7,39 – 7,21 (1H, *d*, C6); 7,29 – 7,25 (2H, *m*, H<sub>1</sub>, H<sub>5</sub>); 7,17 (1H, *t*, H<sub>2</sub>); 4,81 – 4,78 (2H, *q*, H<sub>12</sub>); 4,01 – 3,96 (2H, *q*, H<sub>13</sub>); 3,52 (3H, *m*, H<sub>15</sub>); 3,49 (2H, *m*, H<sub>19</sub>); 3,81 (2H, *t*, H<sub>20</sub>); 2,63 (3H, *s*, H<sub>14</sub>); 2,02 (2H, *s*,  $-\text{NH}_2$ ); 0,92 – 0,89 (3H, *s*, H<sub>14</sub>).

- Dữ liệu phổ  $^1\text{H-NMR}$  của tạp D amlodipin [50], (PL 3.14)

Phổ  $^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm): 7,4 – 7,3 (1H, *m*, H-3'); 7,3 – 7,2 (2H, *m*, H-6' và H-5'); 7,2 – 7,1 (1H, *m*, H-4'); 4,7 – 4,9 (2H, *m*,  $\text{CH}_2(-\text{COOC}_2\text{H}_5)$ ); 3,9 – 4,1 (2H, *m*, 2- $\text{CH}_2$ ); 3,5 – 3,6 (3H, *m*,  $\text{CH}_3(-\text{COOCH}_3)$ ); 3,4 – 3,5 (2H, *m*,  $\text{CH}_2$ ); 2,8 – 2,9 (2H, *m*,  $-\text{CH}_2-$ ); 2,6 – 2,7 (3H, *m*, 6- $\text{CH}_3$ ); 1,5 – 1,6 (2H, *s*,  $-\text{NH}_2$ ); 0,9 – 1,0 (3H, *m*,  $\text{CH}_3(-\text{COOC}_2\text{H}_5)$ ).

Dữ liệu phổ  $^1\text{H-NMR}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , ppm) của sản phẩm tổng hợp tương đồng với các tài liệu [15] và [50]. Kết hợp tất cả các dữ liệu có thể kết luận sản phẩm tổng hợp chính là tạp D của amlodipin.



**Hình 3.11.** Cấu trúc hóa học tạp D của amlodipin

### 3.1.4. Tổng hợp và tinh chế tạp A và tạp B của nifedipin

#### 3.1.4.1. Tổng hợp tạp A của nifedipin bằng phương pháp oxy hóa nifedipin với acid nitric

Trước phản ứng, dung dịch nifedipin có màu vàng. Sau phản ứng, hỗn hợp có màu vàng sậm hơn. Kết quả khảo sát bằng SKLM cho thấy trước 10 phút vẫn còn vết nguyên liệu nifedipin, sau 15 phút xuất hiện thêm một số vết tạp. Do đó thời gian phản ứng thích hợp là 10 phút.

**Bảng 3.20.** Hiệu suất tổng hợp tạp A của nifedipin

Lần	Nifedipin (g)	SiO <sub>2</sub> – HNO <sub>3</sub> (g)	Khối lượng sản phẩm lý thuyết (g)	Khối lượng sản phẩm A thô (g)	Hiệu suất (%)
1	0,3580	0,2536	0,3559	0,3218	90,42
2	0,3467	0,2512	0,3445	0,3074	89,23
3	0,3414	0,2498	0,3394	0,3052	89,92

Tiến hành phản ứng với lượng nifedipin tăng lên 10 lần (3,4531 g), kết quả thu được 2,9958 g sản phẩm thô.

#### 3.1.4.2. Tổng hợp tạp B của nifedipin bằng phương pháp chiếu tia UV<sub>A</sub>

Kết quả khảo sát bằng sắc ký lớp mỏng cho thấy với thời gian chiếu sáng trên 12 giờ nifedipin gần như không còn.

Dung dịch trước khi chiếu sáng màu vàng tươi, dung dịch sản phẩm sau khi chiếu sáng chuyển dần sang màu xanh da quang rồi xanh da trời nhạt.

Tiến hành phản ứng lần 2, lần 3 với thời gian 15 giờ chiếu sáng, khối lượng sản phẩm thô và hiệu suất được trình bày trong Bảng 3.21.

**Bảng 3.21.** Hiệu suất tổng hợp tạp B của nifedipin

Lần	Nifedipin (g)	Khối lượng sản phẩm lý thuyết (g)	Khối lượng sản phẩm B thô (g)	Hiệu suất phản ứng (%)
1	1,5730	1,4912	1,4461	96,97
2	1,6402	1,5549	1,4772	95,00
3	1,6289	1,5442	1,4607	94,59
		Trung bình		95,52

### 3.1.4.3. Tinh chế sản phẩm tổng hợp

*Sản phẩm A:*

Thực hiện sắc ký cột sản phẩm A 2 lần với hệ dung môi ethyl acetat – *n*-hexan (2 : 8), và sau đó kết tinh lại trong aceton – nước.

**Bảng 3.22.** Hiệu suất tinh chế sản phẩm A bằng sắc ký cột

Sản phẩm A (g)	Sắc ký cột lần 1 (g)	Sắc ký cột lần 2 (g)	Khối lượng sản phẩm sau khi kết tinh (g)	Hiệu suất tinh chế
2,9958	1,9309	1,5219	1,0434	34,83%

Hiệu suất toàn quy trình là:  $89,21\% \times 34,83\% = 31,07\%$ .

*Sản phẩm B:*

Lấy 2,2593 g sản phẩm B, thực hiện sắc ký cột với hệ dung môi ethyl acetat – *n*-hexan (4 : 6). Trong quá trình sắc ký, chú ý loại oxy bằng dòng khí argon. Sau đó bay hơi dung môi trong các phân đoạn dưới dòng khí argon. Khối lượng sản phẩm thu được là 1,7350 g, đồng nhất và có màu xanh nhạt.

Hiệu suất tinh chế: 76,79% và hiệu suất toàn quy trình:  $76,79\% \times 95,52\% = 73,35\%$ .

### 3.1.4.4. Thử tinh khiết sản phẩm tinh chế

Sản phẩm sau khi tinh chế được xác định độ tinh khiết bằng phương pháp: khoảng chênh lệch nhiệt độ nóng chảy và phương pháp sắc ký lớp mỏng.

*Phương pháp đo nhiệt độ nóng chảy*

Sản phẩm A và B được xác định nhiệt độ nóng chảy trên máy Gallenkamp.

Kết quả: nhiệt độ nóng chảy trung bình của A là 105 °C và B là 94 °C, phù hợp với điểm chảy của tạp A và tạp B từ tài liệu tham khảo. Khoảng chênh lệch giữa nhiệt độ bắt đầu chảy và chảy hoàn toàn là +1 °C, cho nhận định mẫu thử tinh khiết.

*Phương pháp sắc ký lớp mỏng*

*Mẫu thử:* Hòa tan sản phẩm A trong dung môi dicloromethan, sản phẩm B trong dung môi aceton với nồng độ khoảng 1 mg/ml.

*Các hệ dung môi*

Hệ dung môi (1): *n*-hexan – ethyl acetat (8 : 2).

Hệ dung môi (2): *n*-hexan – ethyl acetat (6 : 4).

Hệ dung môi (3): *n*-hexan – aceton (4 : 6).

Chấm hai mẫu thử A và B lên bản mỏng tráng sẵn silica gel F<sub>254</sub>, triển khai đến khi dung môi di chuyển được 10 cm, lấy bản mỏng và để khô trong tủ hút. Phát hiện vết sắc ký bằng đèn UV tại bước sóng 254 nm.

*Kết quả:* trên sắc ký đồ các vết thử sản phẩm A và sản phẩm B đều tinh khiết SKLM khi cho 1 vết duy nhất với các R<sub>f</sub> tương ứng với 3 hệ dung môi lần lượt là 0,25; 0,50; 0,66 đối với sản phẩm A và 0,25; 0,50; 0,79 đối với sản phẩm B.

**3.1.4.5. Xác định cấu trúc*****Dữ liệu phổ học của sản phẩm A***

- Phổ UV (acetonitril; nm): 268 (PL 4.1).

- Phổ IR (KBr; cm<sup>-1</sup>): 1728; 1524; 1378 và 1111 (PL 4.2).

- Phổ MS-ESI(+): *m/z* 367,0908 [M+Na]<sup>+</sup>, phù hợp với công thức C<sub>17</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub> + Na (M = 367,1008) (PL 4.3).

- Phổ NMR sản phẩm A (PL 4.4; PL 4.5):

Phổ <sup>1</sup>H-NMR, δ (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>, ppm): 8,26 (1H, *dd*, *J* 8,0; H-3'); 7,81 (1H, *dt*, *J* 7,5; H-4'); 7,73 (1H, *dt*, *J* 7,5; 1,5; H-5'); 7,29 (1H, *dd*, *J* 7,5; 1,5; H-6'); 3,44 (6H, *s*, -CH<sub>3</sub> ester); 2,55 (6H, *s*, CH<sub>3</sub> - pyridin).

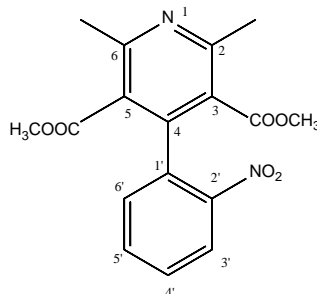
Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $\delta$  (125 MHz, DMSO  $-d_6$ , ppm): 166,54 (C=O ester); 156,05 (C-2); 156,05 (C-6); 146,81 (C-2'); 144,67 (C-4); 133,80 (C-1'); 130,81 (C-4'); 130,60 (C-5'); 130,35 (C-5'); 124,46 (C-3'); 124,35 (C-3); 124,35 (C-5); 52,23 (2C;  $\text{CH}_3$  ester); 23,09 ( $\text{CH}_3$  gắn vòng pyridin).

**Phổ NMR chuẩn tạp A của nifedipin (PL 4.6; PL 4.7):**

Phổ  $^1\text{H}$ -NMR,  $\delta$  (500 MHz, DMSO- $d_6$ , ppm): 8,26 (1H, *dd*,  $J$  8,0; H-3'); 7,80 (1H, *dt*,  $J$  7,5; H-4'); 7,72 (1H, *dt*,  $J$  7,5; 1,5; H-5'); 7,28 (1H, *dd*,  $J$  7,5; 1,5; H-6'); 3,44 (6H, *s*,  $-\text{CH}_3$  ester); 2,55 (6H, *s*,  $\text{CH}_3$  - pyridin).

Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR,  $\delta$  (125 MHz, DMSO  $-d_6$ , ppm): 166,54 (C=O ester); 156,05 (C-2); 156,05 (C-6); 146,81 (C-2'); 144,67 (C-4); 133,80 (C-1'); 130,81 (C-4'); 130,60 (C-6'); 130,35 (C-5'); 124,46 (C-3'); 124,35 (C-3); 124,35 (C-5); 52,23 (2C;  $\text{CH}_3$  ester); 23,09 ( $\text{CH}_3$  gắn vòng pyridin).

Như vậy, kết hợp các dữ liệu phổ và so với phổ chuẩn, sản phẩm A có cấu trúc phù hợp với dehydronifedipin (tạp A của nifedipin).



**Hình 3.12.** Cấu trúc hóa học tạp A của nifedipin

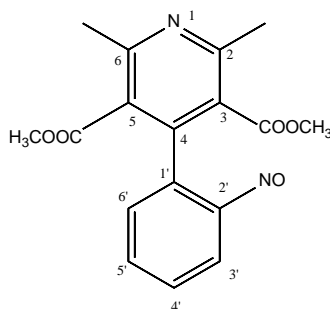
***Dữ liệu phổ học của sản phẩm B***

- Phổ UV (acetonitril; nm): 228; 280 và 312 (PL 4.8).
- Phổ IR (KBr;  $\text{cm}^{-1}$ ): 3084; 3001 – 2852; 1729; 1492; 1374 và 1110 (PL 4.9).
- Phổ MS-ESI(+):  $m/z$  351,0956  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ; phù hợp công thức  $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5 + \text{Na}$  ( $M = 351,1059$  (PL 4.10)).
- Phổ NMR (PL 4.11, PL 4.12):

$^1\text{H-NMR}$ ,  $\delta$  (500 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , ppm): 7,72 (1H, *t*, H-4'); 7,52 (1H, *d*, H-3'); 7,44 (1H, *t*, H-5'); 6,55 (1H, *d*, H-6'); 3,39 (6H, *s*,  $\text{CH}_3$  ester); 2,67 (6H, *s*,  $\text{CH}_3$  gắn vòng pyridin).

$^{13}\text{C-NMR}$ ,  $\delta$  (125 MHz,  $\text{DMSO-}d_6$ , ppm): 167,71 (C=O ester); 161,64 (C-2); 161,64 (C-6);. 156,46 (C-2'); 144,40 (C-4); 139,95 (C-1'); 135,01 (C-4'); 130,68 (C-6'); 128,86 (C-5'); 127,27 (C-3'); 107,86 (C-3); 107,86 (C-5); 52,03 ( $\text{CH}_3$  ester); 23,52 ( $\text{CH}_3$  gắn vòng pyridin).

Dữ liệu phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  và  $^1\text{H-NMR}$  cho thấy số lượng, vị trí của proton, và carbon của sản phẩm B phù hợp với công thức cấu tạo dehydronitroso nifedipin. Như vậy có thể kết luận sản phẩm B chính là dehydronitroso nifedipin (tạp B của nifedipin).



**Hình 3.13.** Cấu trúc hóa học tạp B của nifedipin

### Tóm tắt hiệu suất tổng hợp và tinh chế các tạp chất

**Bảng 3.23.** Hiệu suất điều chế các tạp

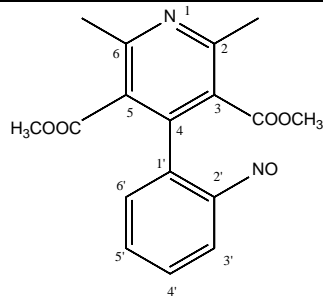
Tạp	Captopril disulfid	7-ADCA	D-phenylglycin	Tạp D amlodipin	Tạp A nifedipin	Tạp B nifedipin
HS tổng hợp (%)	63,0	82,3	14,5	42,0	89,2	95,5
HS tinh chế (%)	57,1	30,2	79,2	63,2	34,8	76,8
Hiệu suất toàn qui trình (%)	35,97	24,85	11,48	26,54	31,04	73,34

### Cấu trúc các tạp tổng hợp

TT	Cấu trúc sản phẩm tổng hợp	Tên
1		Acid (2 <i>S</i> ,2' <i>S</i> )-1,1'-disulphanediylbis[2-methyl-1-oxopropan-3,1-diyl]-bis[pyrrolidine-2-carboxylic]
2		Acid (2 <i>R</i> )-2-amino-2-phenylacetic
3		Acid (6 <i>R</i> ,7 <i>R</i> )-7-amino-3-methyl-8-oxo-5-thia-1-azabicyclo [4.2.0] oct-2-ene-2-carboxylic (acid 7-aminodesacetoxyccephalosporanic)
4		3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat
5		Dimethyl-2,6-dimethyl-4-(2-nitrophenyl)-pyridin-3,5-dicarboxylat



6



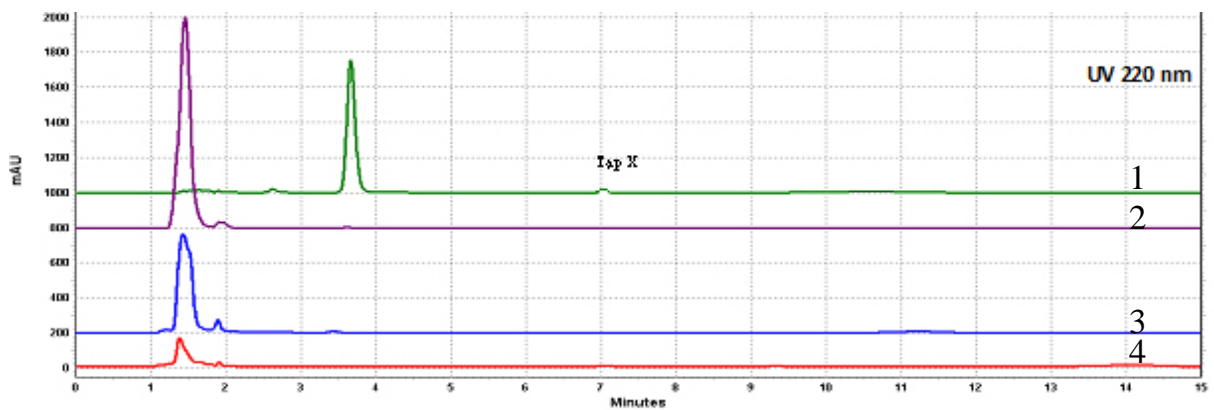
Dimethyl-2,6-dimethyl-4-(2-nitrosophenyl)-pyridin-3,5-dicarboxylat

### 3.2. XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUI TRÌNH XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT CÁC TẠP TỔNG HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

#### 3.2.1. Khảo sát điều kiện sắc ký

##### 3.2.1.1. Tạp captopril disulfid

- Khảo sát thành phần pha động:



**Hình 3.14.** Sắc ký đồ dung dịch captopril disulfid 1000 µg/ml với các pha động khảo sát

*Điều kiện sắc ký:* cột Phenomenex Gemini NX C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 5 µm); đầu dò PDA; bước sóng phát hiện 220 nm; tốc độ dòng 1 ml/phút; nhiệt độ cột 50 °C; thể tích tiêm mẫu 10 µl; tỷ lệ pha động (30 : 70):

- (1): acetonitril – nước acid phosphoric pH 2,5;
- (2): acetonitril – nước acid acetic pH 2,5;
- (3): acetonitril – nước;
- (4): methanol – nước acid phosphoric pH 2,5.

Sắc ký đồ cho thấy thành phần pha động có ảnh hưởng đến độ phân giải, hệ số đối xứng và thời gian lưu của chất phân tích. Chọn pha động acetonitril và acid phosphoric pH 2,5 (30 : 70) thoả mãn các yêu cầu về độ phân giải và hệ số đối xứng.

- Khảo sát tỷ lệ pha động:

Kết quả khảo sát tỷ lệ pha động được trình bày ở Bảng 3.24.

**Bảng 3.24.** Giá trị các thông số sắc ký với các tỷ lệ pha động khảo sát

Pha động ACN- H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 2,5	Captopril disulfid				Thời gian lưu của tạp X (phút)
	t <sub>R</sub> (phút)	A <sub>s</sub>	R <sub>s</sub>	k'	
25 : 75	6,19	1,1	17,8	3,1	13,77
30 : 70	3,63	1,2	13,3	1,4	6,95
35 : 65	2,62	1,2	9,4	0,8	4,33

*t<sub>R</sub>: thời gian lưu, A<sub>s</sub>: hệ số đối xứng, R<sub>s</sub>: độ phân giải, k': hệ số dung lượng.*

Với tỷ lệ (25 : 75), thời gian lưu của pic tạp X dài ( $k' > 3$ ), trên sắc ký đồ dung dịch captopril disulfid xuất hiện 1 pic tạp (tạp X).

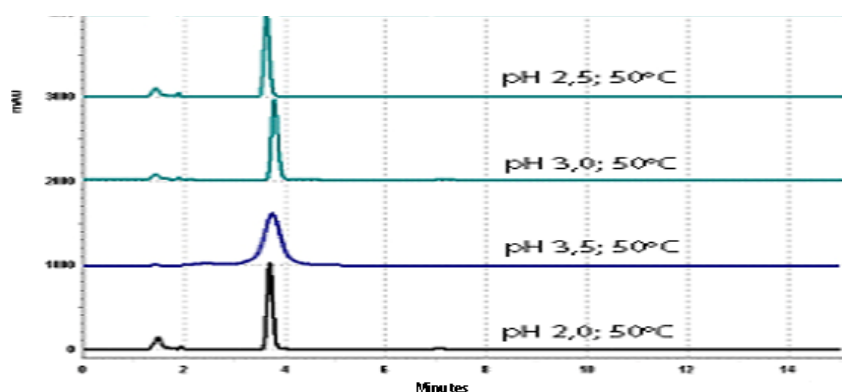
Với tỷ lệ (35 : 65) pic captopril disulfid xuất hiện gần pic dung môi ( $k' < 1$ ).

Với tỷ lệ (30 : 70) pic captopril disulfid đạt các yêu cầu về thông số sắc ký và thời gian lưu của pic tạp X không quá dài nên tỷ lệ pha động này được lựa chọn.

- Khảo sát pH và nhiệt độ cột:

Tiến hành khảo sát pha động acetonitril - nước acid phosphoric (30 : 70) với các giá trị pH là 2,0; 2,5; 3,0 và 3,5. Nhiệt độ cột được cố định ở 50 °C.

Kết quả cho thấy pH pha động không ảnh hưởng đến thời gian rửa giải của captopril disulfid. Khi pH pha động là 3,5 chiều rộng của pic tăng, chiều cao pic giảm. Trong khi đó với pH từ 2,0–3,0 pic captopril disulfid đạt yêu cầu về hệ số đối xứng, độ phân giải và đáp ứng đầu dò gần như không thay đổi.



**Hình 3.15.** Sắc ký đồ dung dịch captoril disulfid 1000  $\mu\text{g/ml}$  với các pH khảo sát

Tiếp tục khảo sát ảnh hưởng nhiệt độ cột với pH pha động là 2,0; kết quả khảo sát cho thấy nhiệt độ cột ảnh hưởng đến hệ số đối xứng. Khi nhiệt độ cột  $< 40\text{ }^\circ\text{C}$  thì hệ số đối xứng không đạt (pic kéo đuôi), tín hiệu tốt khi nhiệt độ từ  $50\text{--}60\text{ }^\circ\text{C}$ .

Kết quả khảo sát được trình bày ở Bảng 3.25.

**Bảng 3.25.** Giá trị các thông số sắc ký với các nhiệt độ cột khảo sát

Nhiệt độ cột	Captoril disulfid			
	$t_R$ (phút)	$A_s$	$R_s$	$k'$
$20\text{ }^\circ\text{C}$	4,44	1,8	9,3	2,0
$30\text{ }^\circ\text{C}$	4,51	1,6	11,2	2,0
$40\text{ }^\circ\text{C}$	4,54	1,3	12,8	2,0
$50\text{ }^\circ\text{C}$	4,52	1,1	14,0	2,0
$60\text{ }^\circ\text{C}$	4,47	1,1	14,4	2,0

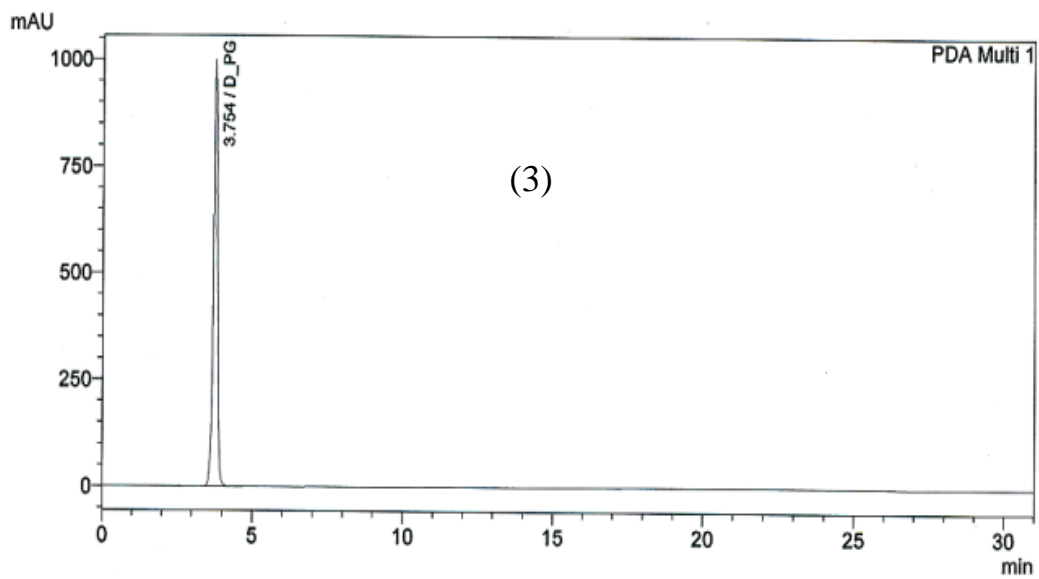
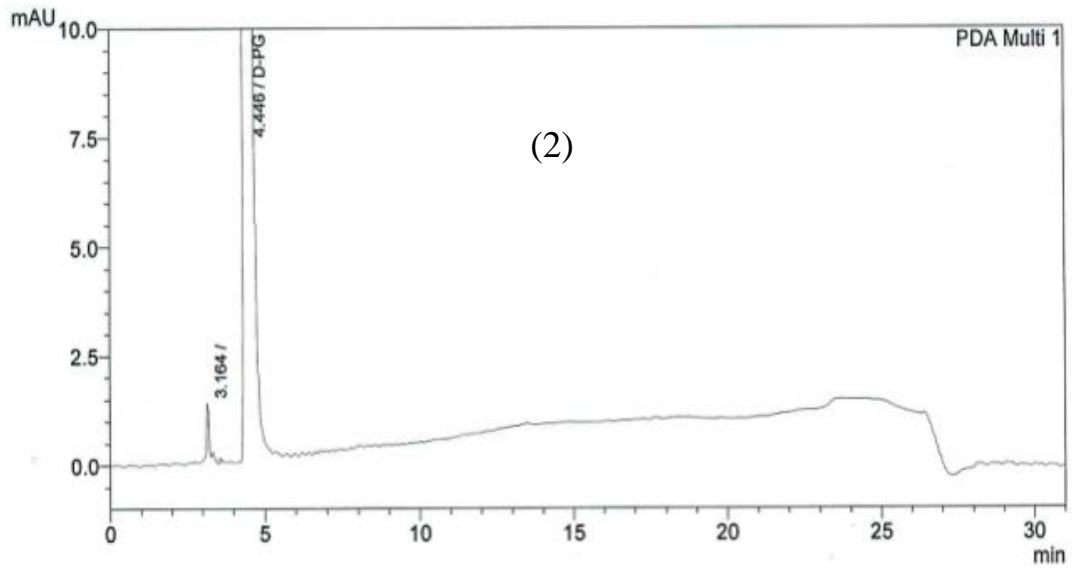
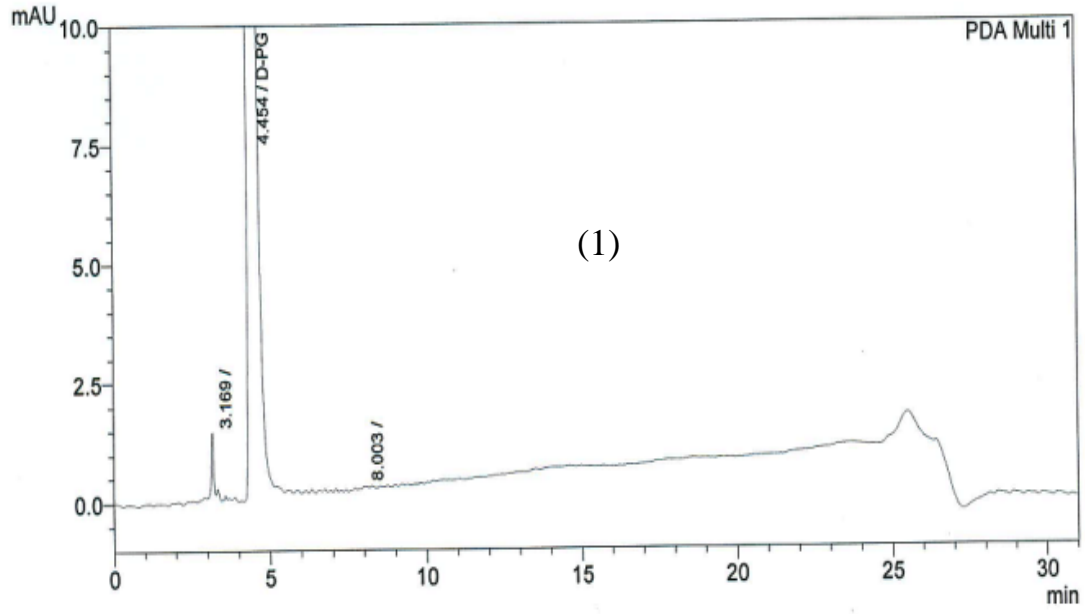
Như vậy, điều kiện sắc ký thích hợp để xác định độ tinh khiết captoril disulfid bao gồm cột Gemini–NX  $C_{18}$  (150 x 4,6 mm; 5  $\mu\text{m}$ ), nhiệt độ cột  $50\text{ }^\circ\text{C}$ ; pha động là hỗn hợp dung môi acetonitril – nước acid phosphoric pH 2 (30 : 70); tốc độ dòng: 1 ml/phút; phát hiện tại bước sóng 220 nm.

### 3.2.1.2. Tạp D-phenylglycin

Pha động A: dung dịch đệm phosphat pH 5; pha động B: methanol

Chương trình pha động như đã mô tả trong mục 2.2.4.1b.

Khảo sát trên 3 cột: Gemini  $C_{18}$  (1); Inertsil<sup>®</sup> $C_8$  (2) và LuxCellulose-1 (3).



**Hình 3.16.** Sắc ký đồ *D*-phenylglycin với các điều kiện sắc ký khảo sát

Kết quả khảo sát cho thấy:

+ Điều kiện (1) cho pic tạp chất A có thời gian lưu là 4,454 phút; hệ số đối xứng 1,02; độ tinh khiết của pic  $\geq 99\%$ ; đồng thời điều kiện này cũng cho pic *D*-phenylglycin tách hoàn toàn khỏi pic cephalixin và tạp 7-ADCA (Hình 3.16).

+ Điều kiện (2) cho kết quả độ tinh khiết pic không đạt ((sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết pic trên phần mềm LC Real Time Analysis cho kết quả 77%).

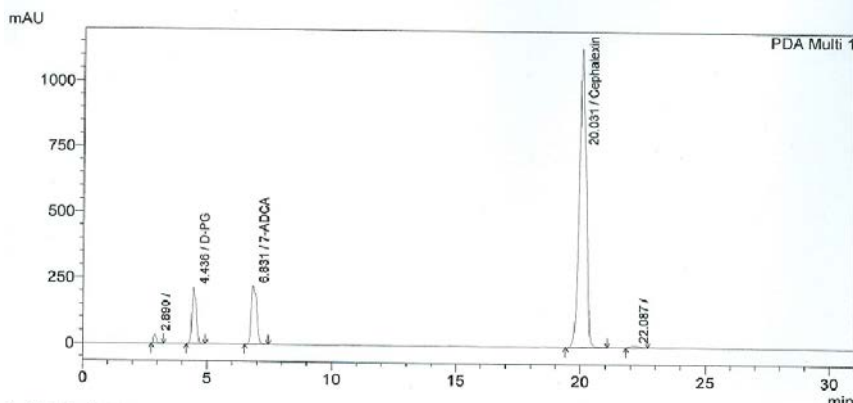
+ Điều kiện (3) cho pic *D*-phenylglycin có thời gian lưu là 3,754 phút; hệ số đối xứng 1,067; độ tinh khiết của pic  $\geq 99\%$ .

Nhận xét: Điều kiện (1) và (3) cho kết quả như nhau, đều thích hợp để xác định độ tinh khiết tạp chất *D*-phenylglycin nhưng cột Lux Cellulose-1 đắt tiền, không phổ biến nên để đơn giản chọn điều kiện (1) tương ứng với cột Gemini C<sub>18</sub>.

Như vậy, điều kiện sắc ký xác định độ tinh khiết tạp chất *D*-phenylglycin là: cột sắc ký Gemini C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5  $\mu$ m); tốc độ dòng: 1,0 ml/phút; thể tích tiêm mẫu: 10  $\mu$ l, phát hiện tại bước sóng 220 nm. Pha động: dung dịch đệm phosphat pH 5 (A) và methanol (B).

Chương trình pha động:

Thời gian (phút)	Pha động A (% tt/tt)	Pha động B (% tt/tt)
0 – 1	98	2
1 – 20	98 → 70	2 → 30
20 – 23	70 → 98	30 → 2
23 – 30	98	2

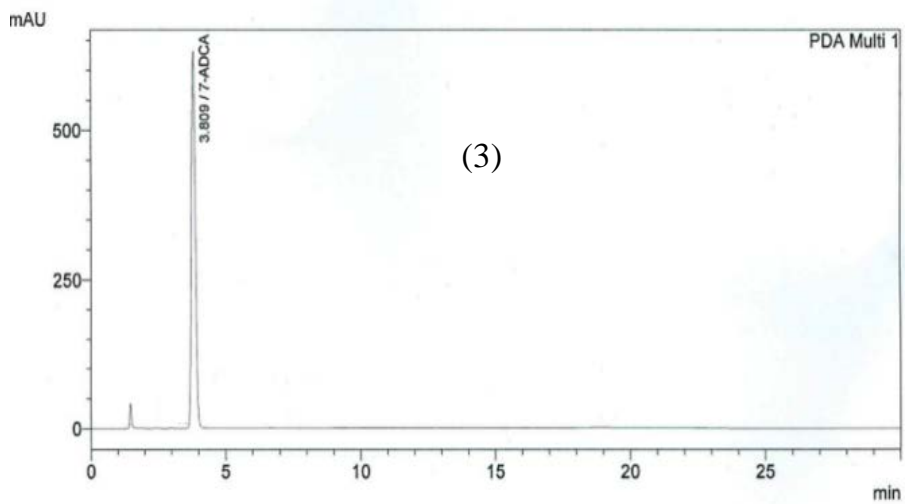
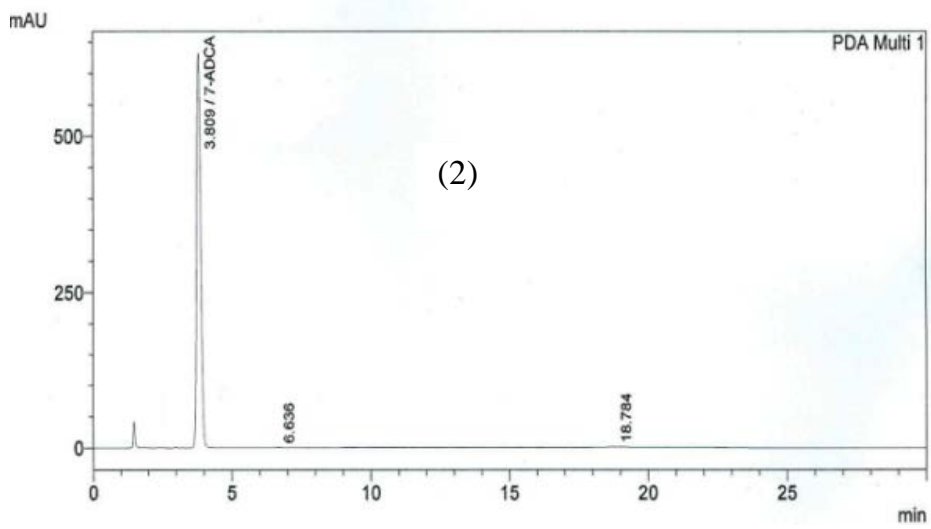
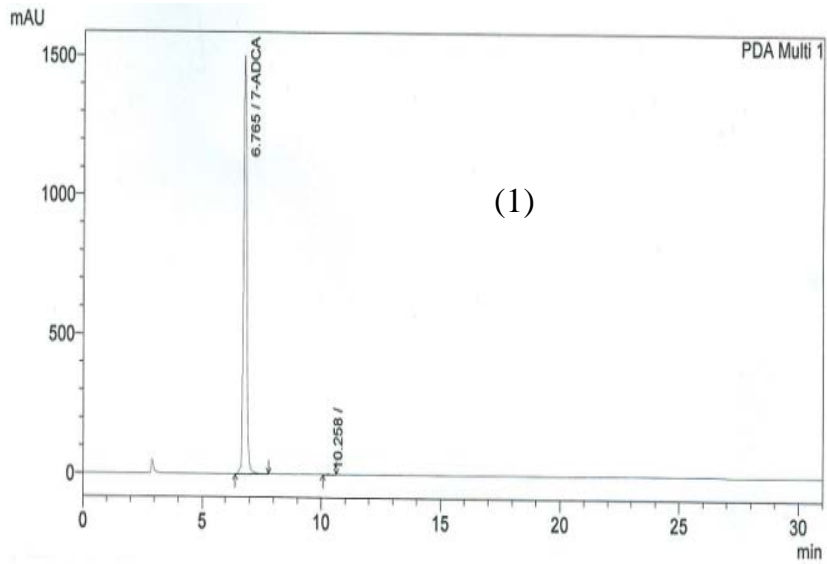


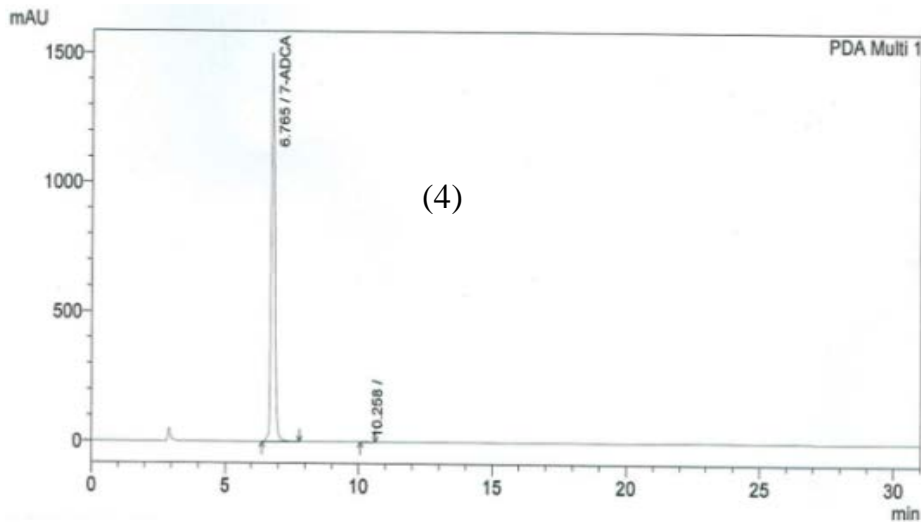
**Hình 3.17.** Sắc ký đồ dung dịch cephalixin 1000  $\mu$ g/ml, *D*-phenylglycin 100  $\mu$ g/ml và 7-ADCA 100  $\mu$ g/ml với điều kiện (1)

### 3.2.1.3. Tạp 7-ADCA

Pha động A: dung dịch đệm phosphat pH 5, pha động B: methanol

Chương trình pha động tương tự qui trình phân tích *D*-phenylglycin.





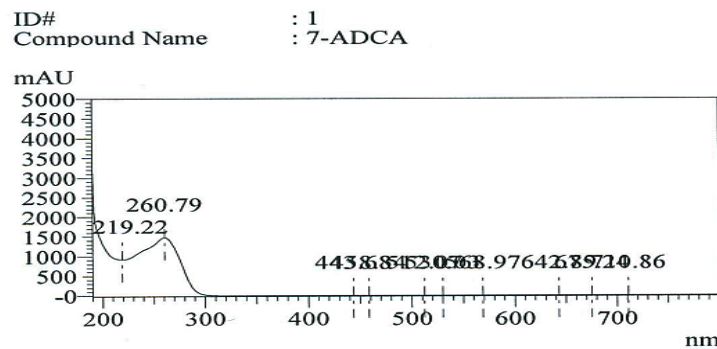
**Hình 3.18.** Sắc ký đồ 7-ADCA với các điều kiện sắc ký khảo sát

*Điều kiện (1):* Cột Gemini C<sub>18</sub>, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20  $\mu$ l.

*Điều kiện (2):* Cột Gemini C<sub>18</sub>, tốc độ dòng 2,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10  $\mu$ l.

*Điều kiện (3):* Cột Inertsil<sup>®</sup> C<sub>8</sub>, tốc độ dòng 2,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 10  $\mu$ l.

*Điều kiện (4):* Cột Inertsil<sup>®</sup> C<sub>8</sub>, tốc độ dòng 1,0 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20  $\mu$ l.



**Hình 3.19.** Phổ UV tại thời gian lưu của pic 7-ADCA khi khảo sát với điều kiện (2)

Kết quả khảo sát cho thấy:

+ Điều kiện (1) và (4) cho pic 7-ADCA có hệ số đối xứng 1,5; vết bị kéo đuôi.

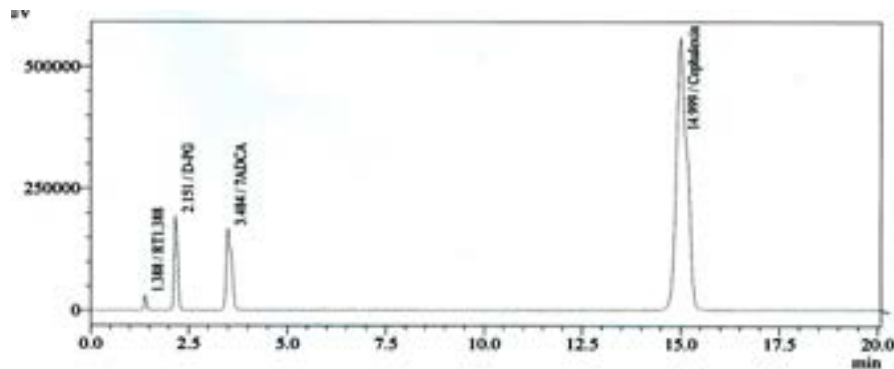
+ Điều kiện (2) cho pic 7-ADCA có thời gian lưu là 3,809 phút, độ tinh khiết pic  $\geq$  99%, hệ số đối xứng 1,10.

+ Điều kiện (3) cho pic 7-ADCA có thời gian lưu là 3,809 phút, độ tinh khiết pic  $\geq$  99%, hệ số đối xứng 1,12.

Điều kiện (2) hoặc (3) đều có thể xác định độ tinh khiết 7-ADCA. Tuy nhiên, điều kiện (2) được lựa chọn để qui trình tương đồng qui trình xác định độ tinh khiết của *D*-phenylglycin.

Nhận xét: có thể áp dụng điều kiện (2) (cột Gemini C18) hoặc điều kiện (3) (cột Inertsil®C8) để tiến hành xác định độ tinh khiết của tạp 7-ADCA. Điều kiện (2) được lựa chọn để giống với điều kiện xác định độ tinh khiết của tạp *D*-phenylglycin.

Như vậy, điều kiện sắc ký thích hợp để xác định độ tinh khiết của 7-ADCD là: Cột Gemini C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 μm); pha động là hỗn hợp dung dịch đệm pH 5 và methanol với chương trình pha động tương tự qui trình tạp *D*-phenylglycin; tốc độ dòng là 2,0 ml/phút; thể tích tiêm mẫu 10 μl; phát hiện tại bước sóng 220 nm.



**Hình 3.20.** Sắc ký đồ dung dịch 7-ADCA 100 μg/ml, *D*-phenylglycin 100 μg/ml và cephalosporin 1000 μg/ml với điều kiện (2)

#### 3.2.1.4. Tạp *D* của amlodipin

Kết quả khảo sát đã xác định được điều kiện sắc ký thích hợp để xác định độ tinh khiết tạp *D* của amlodipin: cột C<sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm; 5 μm), pha động: acetonitril - methanol - dung dịch TEA pH 3 (15 : 35 : 50) (dung dịch pH 3 gồm 7,0 ml TEA/1000 ml nước, điều chỉnh pH 3,0 bằng acid phosphoric), tốc độ dòng: 1,0 ml/phút, nhiệt độ cột: 35 °C, thể tích tiêm mẫu 10 μl và phát hiện tại bước sóng 237 nm.

#### 3.2.1.5. Tạp A và tạp B của nifedipin

Kết quả khảo sát các pha động: nước – acetonitril với các tỷ lệ (50 : 50); (45 : 55) và (55 : 45) cho thấy pha động với tỷ lệ (50 : 50) đáp ứng các thông số sắc ký.

Như vậy, điều kiện sắc ký thích hợp xác định độ tinh khiết tạp A và B của nifedipin là: cột Phenomenex Gemini NX (150 x 4,6 mm; 3 μm), pha động là hỗn hợp nước - acetonitril (50 : 50), tốc độ dòng 0,8 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 20 μl và phát hiện tại bước sóng 254 nm.



**Bảng 3.26.** Bảng tóm tắt điều kiện sắc ký của các qui trình kiểm tra độ tinh khiết các tạp tổng hợp bằng phương pháp HPLC.

Tên tạp	Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Pha tĩnh	Pha động	Nhiệt độ cột ( $^{\circ}\text{C}$ )	Bước sóng (nm)	Tốc độ dòng (ml/phút)	Thể tích tiêm mẫu ( $\mu\text{l}$ )
Captopril disulfid	1000	Cột Gemini NX C <sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 5 $\mu\text{m}$ )	Acetonitril - H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> pH 2 (30 : 70)	50	220	1,0	10
D-phenylglycin	1000	Cột Gemini C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 $\mu\text{m}$ )	Pha động A: đệm phosphat pH 5 Pha động B: methanol Rửa giải gradient	30	220	1,0	10
7-ADCA	1000	Cột Gemini C <sub>18</sub> (250 x 4,6 mm; 5 $\mu\text{m}$ )	Pha động A: đệm phosphat pH 5 Pha động B: methanol Rửa giải gradient	30	220	2,0	10
D của amlodipin	1000	Cột C <sub>18</sub> (250 mm x 4,6 mm; 5 $\mu\text{m}$ )	Acetonitril - methanol - dung dịch pH 3 (7,0 ml TEA/1000 ml nước và điều chỉnh pH đến $3,0 \pm 0,1$ bằng acid phosphoric) (15 : 35 : 50)	35	237	1,0	10
A và B nifedipin	250	Cột Phenomenex Gemini NX (150 x 4,6 mm; 3 $\mu\text{m}$ )	Nước – acetonitril (50 : 50)	30	254	0,8	20

### 3.2.2. Thẩm định qui trình xác định độ tinh khiết tạp chất

#### 3.2.2.1. Khảo sát tính phù hợp hệ thống

**Bảng 3.27.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống (n = 6) (PL 1.12, PL 2.10, PL 2.16, PL 3.15, PL 4.13, PL 4.14, PL 4.15)

Tên qui trình tạp khảo sát		$t_R$ (phút)	S ( $\mu V.s$ )	$A_s$	$R_s$	N
Captopril disulfid	TB	3,63	31518238	1,1	13,5	35357
	RSD %	0,16	0,64	1,56	0,89	0,64
D-phenylglycin	TB	4,50	8404831	1,0	5,7	27884
	RSD %	0,22	1,74			1,26
7-ADCA	TB	3,82	7876260	1,1	5,6	16128
	RSD %	1,02	0,77			2,35
D của amlodipin	TB	7,35	10779316	1,64		3032
	RSD %	0,54	0,27	0,97		0,86
A của nifedipin	TB	5,95	8588137	1,16		10839
	RSD %	0,02	0,73			1,09
B của nifedipin	TB	6,78	6399361	1,06		28073
	RSD %	0,18	0,12	1,31		1,79

$t_R$ : thời gian lưu, S: diện tích pic,  $A_s$ : hệ số bất đối, N: số đĩa lý thuyết,  $R_s$ : độ phân giải

#### 3.2.2.2. Tính đặc hiệu

##### Qui trình xác định độ tinh khiết của captopril disulfid

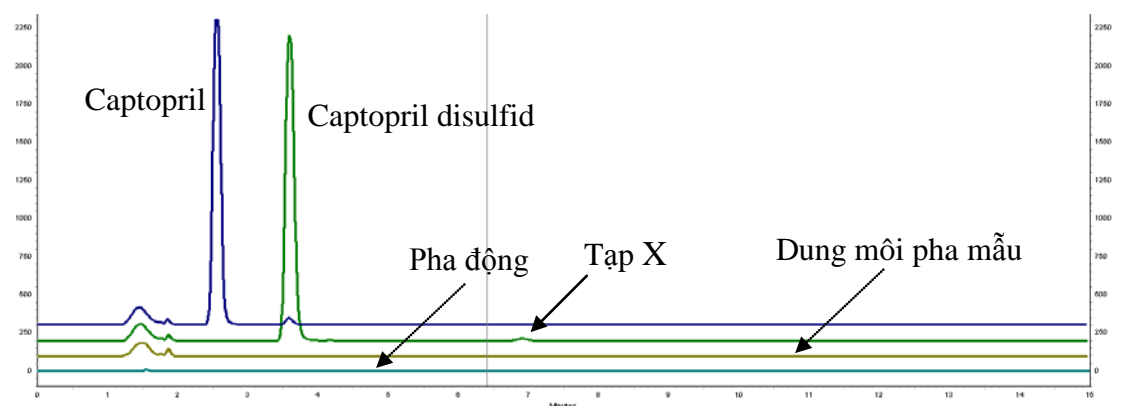
Tiến hành sắc ký pha động, dung môi pha mẫu, mẫu captopril disulfid 1000 ( $\mu g/ml$ ), mẫu hỗn hợp captopril 1000 ( $\mu g/ml$ ) và captopril disulfid 10 ( $\mu g/ml$ ).

Kết quả khảo sát:

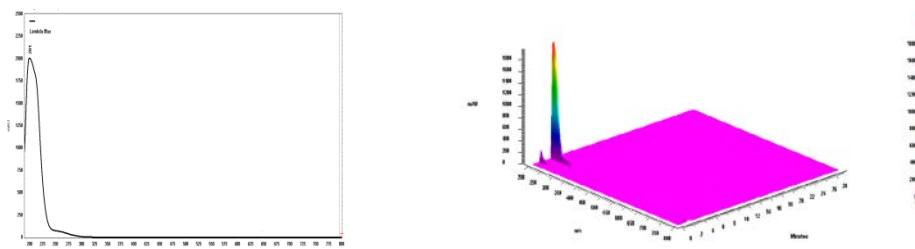
- Trên sắc ký đồ dung môi pha mẫu và pha động không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic captopril disulfid trên sắc ký đồ mẫu thử.
- Trên sắc ký đồ mẫu thử xuất hiện các pic từ 1,2 đến 2 phút có phổ UV-Vis giống phổ UV-Vis của các pic tương ứng trong sắc ký đồ dung môi pha mẫu.

- Trên sắc ký đồ mẫu captopril disulfid xuất hiện pic tạp (pic X) có thời gian lưu khoảng 7 phút. Pic tạp X, pic captopril và pic captopril disulfid tách hoàn toàn. Pic captopril disulfid tinh khiết (theo phổ UV-Vis).

Như vậy qui trình xác định độ tinh khiết tạp captopril disulfid có tính đặc hiệu.



**Hình 3.21.** Sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu của phương pháp xác định độ tinh khiết captopril disulfid



**Hình 3.22.** Phổ UV – Vis tại thời gian lưu và sắc ký đồ 3 chiều của captopril disulfid

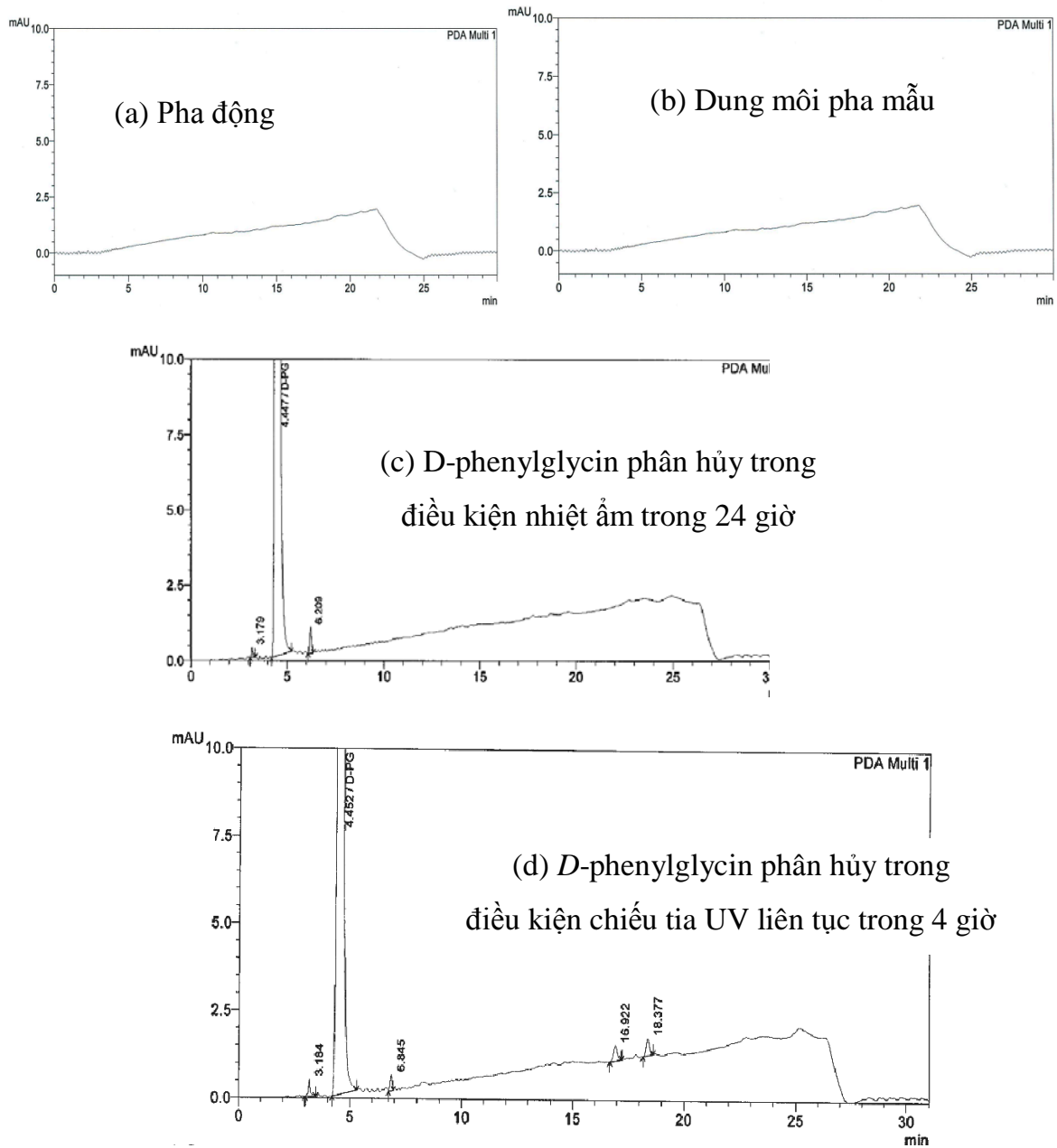
### ***Qui trình xác định độ tinh khiết của D-phenylglycin***

Kết quả khảo sát:

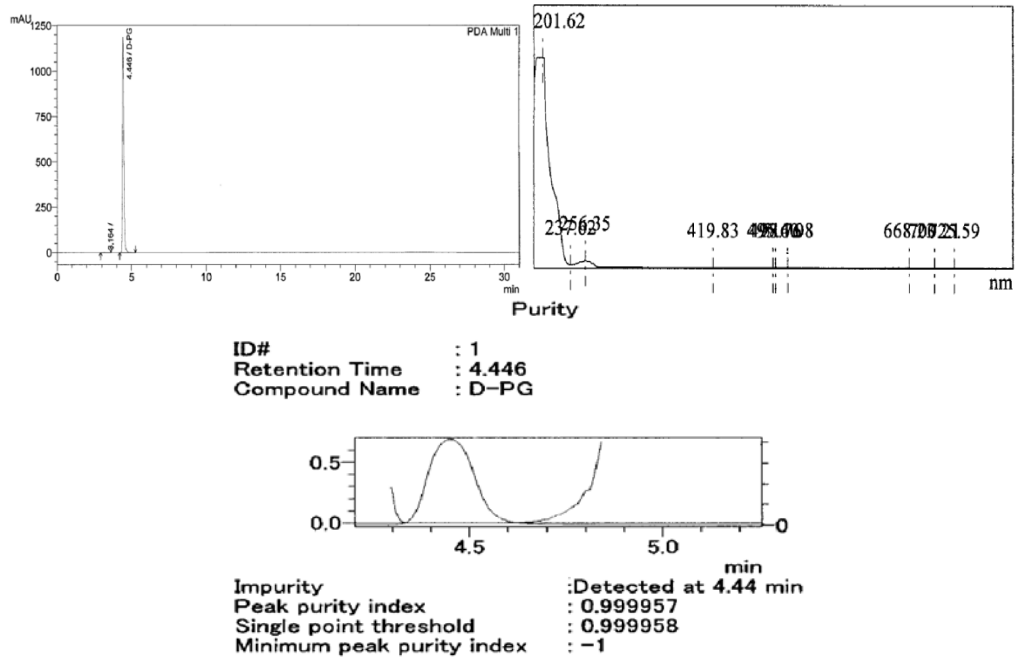
- Sắc ký đồ pha động và dung môi pha mẫu: không xuất hiện pic tại thời gian lưu tương ứng của pic *D*-phenylglycin trong sắc ký đồ mẫu thử.
- Sắc ký đồ mẫu thử: ngoài pic *D*-phenylglycin chỉ có 1 pic lạ có thời gian lưu ở 3,16 phút. Pic *D*-phenylglycin tinh khiết và tách hoàn toàn pic lạ.
- Sắc ký đồ dung dịch *D*-phenylglycin khi phân hủy ở nhiệt độ 100 °C, độ ẩm 90% trong 24 giờ có xuất hiện thêm 1 pic ở thời gian lưu 6,22 phút so với sắc ký đồ mẫu

thử. Pic *D*-phenylglycin đạt độ tinh khiết  $\geq 99\%$  và tách hoàn toàn khỏi các pic lân cận.

- Sắc ký đồ dung dịch *D*-phenylglycin khi được phân hủy trong điều kiện chiếu tia UV liên tục trong 4 giờ có xuất hiện một số pic khác ở thời gian lưu 6,8; 16,9 và 18,3 phút so với sắc ký đồ mẫu thử. Các pic này tách hoàn toàn khỏi pic *D*-phenylglycin.



**Hình 3.23.** Sắc ký đồ pha động, dung môi pha mẫu và mẫu phân hủy của tạp *D*-phenylglycin



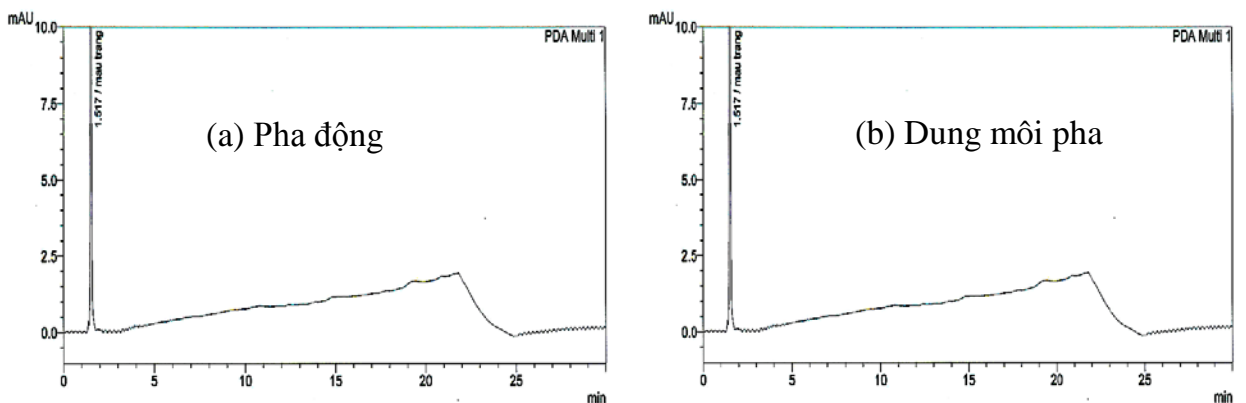
**Hình 3.24.** Kết quả sắc ký *D*-phenylglycine

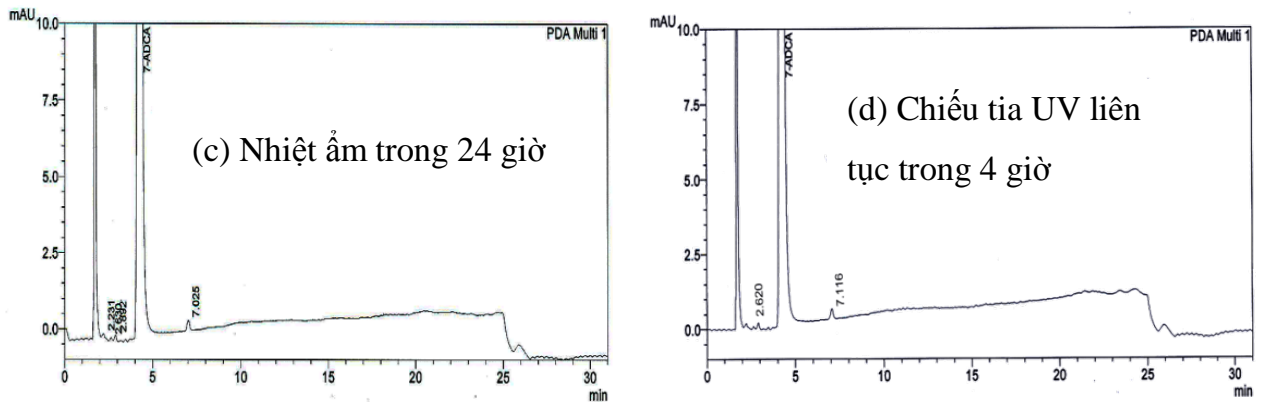
Như vậy qui trình xác định độ tinh khiết tạp *D*-phenylglycine có tính đặc hiệu.

#### ***Qui trình xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA***

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu:

- Sắc ký đồ pha động và dung môi pha mẫu (hình 3.25a và 3.25b): không xuất hiện pic tại thời gian lưu của pic tạp chất 7-ADCA trong sắc ký đồ mẫu thử (hình 3.26).
- Sắc ký đồ mẫu thử (hình 3.26): ngoài pic tạp chất 7-ADCA chỉ có 1 pic lạ có thời gian lưu giống pic xuất hiện trong sắc ký đồ dung môi pha mẫu, chứng tỏ pic lạ này là của dung môi pha mẫu. Pic tạp chất 7-ADCA tinh khiết và tách hoàn toàn các pic khác.

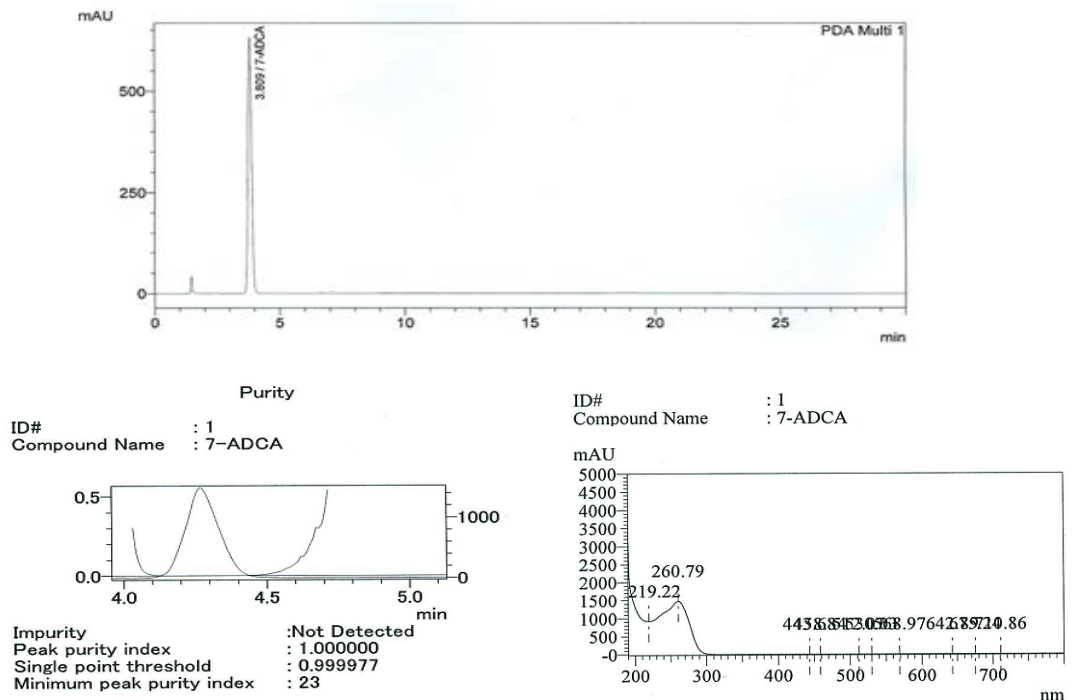




**Hình 3.25.** Sắc ký đồ pha động, dung môi pha mẫu và mẫu phân hủy tạp 7-ADCA

- Sắc ký đồ mẫu tạp chất 7-ADCA phân hủy trong điều kiện nhiệt độ 100 °C, độ ẩm 90% trong 24 giờ xuất hiện thêm các pic có thời gian lưu 2,23; 2,63; 2,89 và 7,03 phút so với sắc ký đồ mẫu thử. Pic 7-ADCA vẫn đạt độ tinh khiết  $\geq 99\%$  và tách hoàn toàn các pic khác (Hình 3.25c).

- Sắc ký đồ mẫu 7-ADCA phân hủy trong điều kiện chiếu tia UV liên tục trong 4 giờ xuất hiện một số pic có thời gian lưu 2,62 và 7,12 phút so với sắc ký đồ mẫu thử. Các pic này tách hoàn toàn pic 7-ADCA, pic 7-ADCA đạt độ tinh khiết  $\geq 99\%$  (Hình 3.25d).



**Hình 3.26.** Kết quả sắc ký tạp 7-ADCA

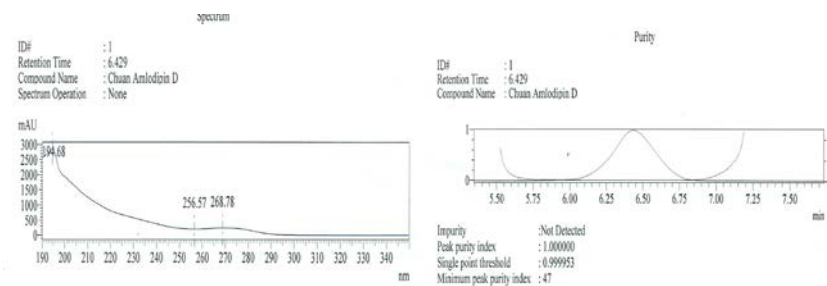
Như vậy qui trình xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA có tính đặc hiệu.

### ***Qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin***

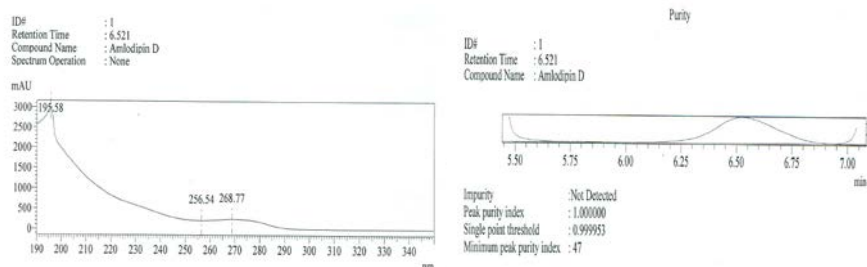
Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy (PL 3.16):

- Sắc ký đồ mẫu trắng không có pic trùng với pic tạp D của amlodipin trong mẫu thử.
- Phổ UV tại thời gian lưu của pic tạp D của amlodipin trong mẫu thử giống với phổ UV tại thời gian lưu của pic tạp D trong mẫu chuẩn, bước sóng cực đại tại 268 nm.
- Pic tạp D của amlodipin tinh khiết.

Như vậy qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin có tính đặc hiệu.



**Hình 3.27.** Phổ UV tại thời gian lưu và độ tinh khiết của chuẩn tạp D amlodipin



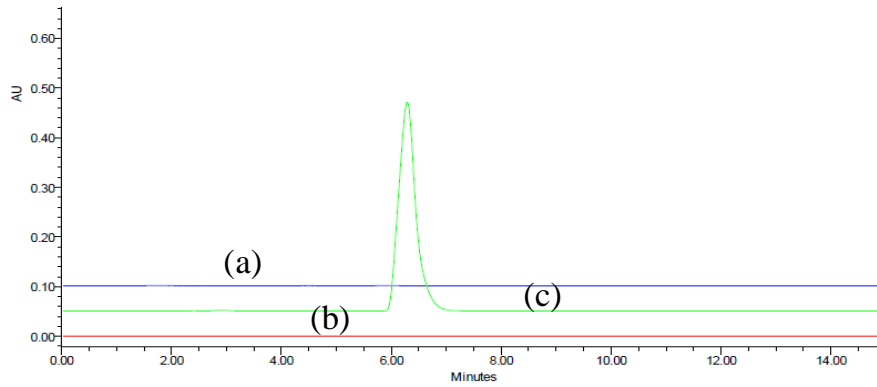
**Hình 3.28.** Phổ UV tại thời gian lưu và độ tinh khiết của pic tạp D amlodipin

### ***Qui trình xác định độ tinh khiết của tạp A và tạp B của nifedipin***

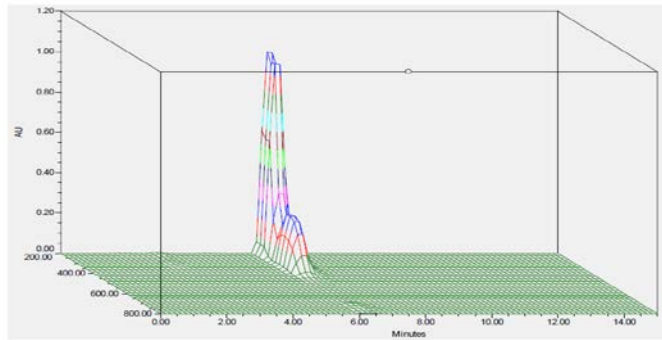
Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy:

- Sắc ký đồ pha động và mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic tạp A hoặc B trên sắc ký đồ mẫu thử (Hình 3.29 và 3.32).
- Sắc ký đồ mẫu thử không xuất hiện pic tạp trùng với pic tạp A hoặc B (hình 3.29, 3.30, 3.32 và 3.33). Pic tạp A và pic tạp B tinh khiết (Hình 3.31 và 3.34).

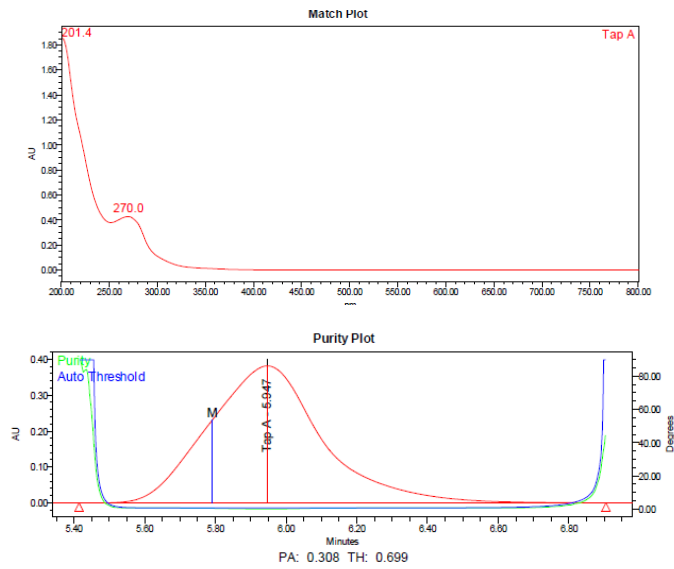
Như vậy qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin có tính đặc hiệu.



**Hình 3.29.** Sắc ký đồ mẫu trắng (a), pha động (b), mẫu thử tap A (c)

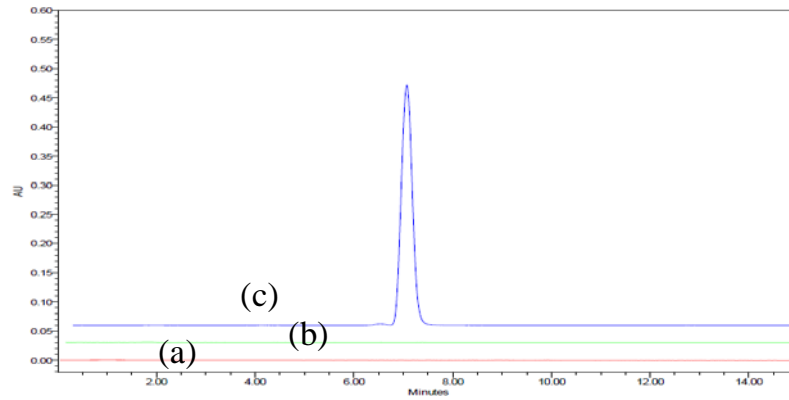


**Hình 3.30.** Sắc ký đồ 3 chiều của mẫu thử tap A

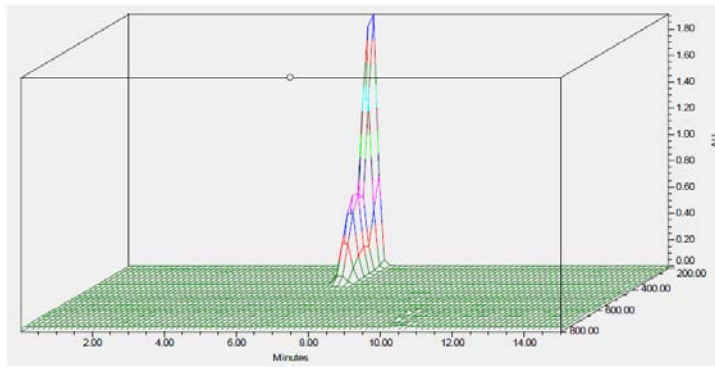


**Hình 3.31.** Phổ UV-Vis tại thời gian lưu và biểu đồ minh họa độ tinh khiết pic tap A

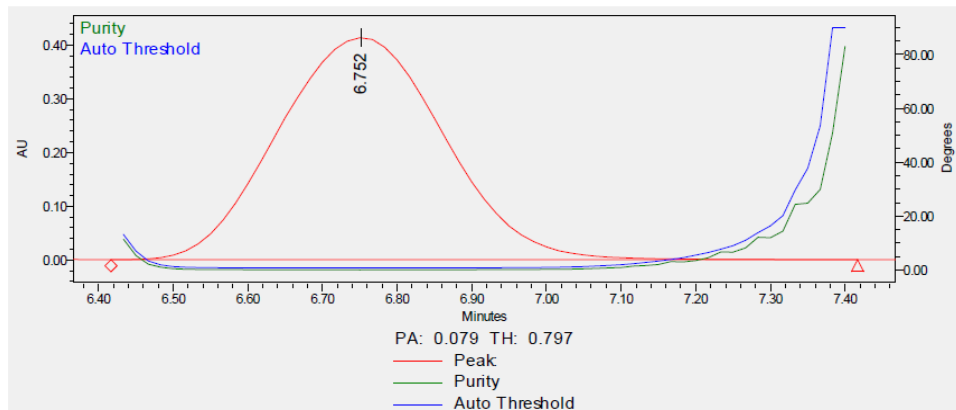
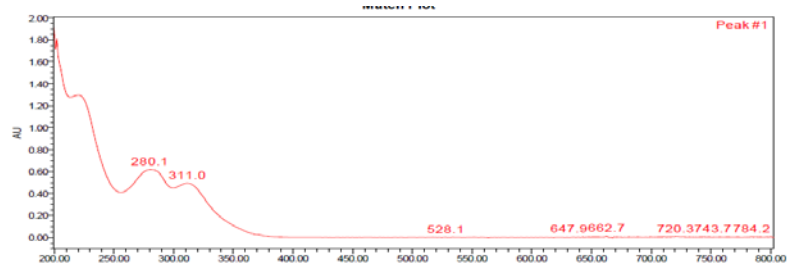




**Hình 3.32.** Sắc ký đồ mẫu trắng (a), pha động (b), mẫu thử tạp B (c)



**Hình 3.33.** Sắc ký đồ 3 chiều mẫu thử tạp B



**Hình 3.34.** Phổ UV-Vis tại thời gian lưu và biểu đồ minh họa độ tinh khiết pic tạp B

### 3.2.2.3. Miền giá trị, độ đúng, độ chính xác

Miền giá trị, độ đúng, độ chính xác của các qui trình phân tích các tạp chất được trình bày ở Bảng 3.28.

**Bảng 3.28.** Kết quả xác định miền giá trị, độ đúng, độ chính xác của các qui trình phân tích các tạp chất (PL 1.13, PL 1.14, PL 1.15, PL 2.11, PL 2.12, PL 2.13, PL 2.17, PL 2.18, PL 2.19, PL 3.17, PL 3.18, PL 3.19, PL 3.20, PL 4.16, PL 4.17, PL 4.18, PL 4.19, PL 4.20, PL 4.21, PL 4.22, PL 4.23).

	<b>Captopril disulfid</b>	<b>D-phenylglycin</b>	<b>7-ADCA</b>	<b>Tạp D của amlodipin</b>	<b>Tạp A của nifedipin</b>	<b>Tạp B của nifedipin</b>
Phương trình	$\hat{y} = 30366x + 1219486$	$\hat{y} = 7798x$	$\hat{y} = 8087x$	$\hat{y} = 11289089x$	$\hat{y} = 26507786x$	$\hat{y} = 25684885x$
Hệ số R <sup>2</sup>	0,9995	0,9997	0,9998	0,9994	0,9999	0,9999
Khoảng tuyến tính (µg/ml)	51 - 1505	600 - 1500	400 - 1500	612 - 1428	50 - 500	50 - 400
Độ lặp lại RSD (%) (n = 6)	0,17	0,09	0,04	0,01	0,01	0,08
Độ chính xác trung gian RSD (%) (n = 12)	0,16	0,04	0,05	0,01	0,01	1,68
Độ đúng (n = 9)	Không thực hiện	101,1-101,8	98,3-99,1	98,6-99,9	Không thực hiện	Không thực hiện

*Nhận xét:* Qui trình xác định độ tinh khiết của 06 tạp chất bằng phương pháp HPLC có tính đặc hiệu, miền giá trị rộng, độ chính xác và độ đúng 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.

### 3.2.3. Kết quả xác định độ tinh khiết các tạp tổng hợp

#### 3.2.3.1. Phương pháp HPLC - PDA

Độ tinh khiết sắc ký của các tạp tổng hợp được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng đã được thẩm định ở mục 3.2.2.

**Bảng 3.29.** Kết quả xác định độ tinh khiết sắc ký (%) tính theo chế phẩm nguyên trạng của các tạp chất bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao

Tên sản phẩm	Độ tinh khiết (%)	RSD (%)
Captopril disulfid	99,45	0,17
D-phenylglycin	99,89	0,09
7-ADCA	99,89	0,04
D của amlodipin	99,93	0,01
A của nifedipin	100,0	0,01
B của nifedipin	99,53	0,08

#### 3.2.3.2. Phương pháp DSC

**Bảng 3.30.** Kết quả xác định độ tinh khiết (%) các tạp chất bằng phương pháp DSC và hàm ẩm bằng phương pháp TGA

Tạp chất	Độ tinh khiết (%)	Hàm ẩm (%)
Captopril disulfid	99,99	0,3017
D-phenylglycin	99,67	0,11
7-ADCA	99,87	0,15
D của amlodipin *	-	-
A của nifedipin	99,60	0,079
B của nifedipin	99,78	0,061

\* Tạp D của amlodipin là chất thân dầu nên không xác định độ tinh khiết bằng phương pháp DSC.

## 3.3. ĐÁNH GIÁ VÀ THIẾT LẬP TẠP CHẤT ĐỐI CHIẾU

### 3.3.1. Đánh giá các tạp tổng hợp

Căn cứ vào tính chất lý hóa và mục đích sử dụng của các tạp chất đối chiếu được dùng cho phép thử định lượng các tạp chất trong nguyên liệu và chế phẩm.

Áp dụng kết quả xây dựng qui trình xác định độ tinh khiết và tham khảo chứng chỉ phân tích của các chất đối chiếu gốc, 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 sau:

**Bảng 3.31.** Kết quả đánh giá captopril disulfid

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu
Tính chất	Cảm quan	Tinh thể trắng, không mùi.
		Dễ tan trong pyridin, hơi tan trong ethanol, tan trong methanol.
		Không tan trong nước và một số dung môi hữu cơ như benzen, cloroform.
Điểm chảy	PL 6.7 – ĐĐVN V	235–236 °C
Hàm ẩm	Nhiệt trọng lượng	≤ 0,5%
Định tính	Phổ hồng ngoại	<i>IR (KBr/cm<sup>-1</sup>):</i> 1747 (HO-C=O), 1601(-N-C=O) và 490 (-S-S-)
	Phổ khối	ESI-MS(-): <i>m/z</i> 431,1319 [M-H] <sup>-</sup>
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân	Phổ <sup>1</sup> H-NMR và <sup>13</sup> C-NMR (PL 1.10 và PL 1.11)
Độ tinh khiết	Sắc ký lỏng	≥ 99,0% (nguyên trạng)

**Bảng 3.32.** Kết quả đánh giá tạp D của amlodipin

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu
Tính chất	Cảm quan	Dung dịch màu vàng nâu
Định tính	- Phổ hồng ngoại	<i>IR (KBr/cm<sup>-1</sup>):</i> 1238 (C-O); 1733 (C=O); 3523 (N-H)
	- Phổ khối	MS-ESI(+): <i>m/z</i> 407,1328 [M+H] <sup>+</sup>
	- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân	NMR: <sup>1</sup> H-NMR (PL 3.10, PL 3.11, PL 3.12, PL 3.13)
Độ tinh khiết	Sắc ký lỏng	≥ 99,0% (nguyên trạng)

**Bảng 3.33.** Kết quả đánh giá *D*-phenylglycin và 7-ADCA

Chỉ tiêu/ phương pháp	<i>D</i> -phenylglycin	7-ADCA
Tính chất (Cảm quan)	Bột kết tinh trắng	Bột kết tinh trắng ngà
Điểm chảy (DSC)	242 ± 1 °C	306 ± 1 °C
Định tính	<i>Phổ IR (KBr/cm<sup>-1</sup>):</i> 2933 (N-H); 2617 (C-H), 1612 (C-N) 1508 (C=C)	<i>Phổ IR (KBr/cm<sup>-1</sup>):</i> 3151 (N- H); 2933 (C-H); 1800 (C=O); 1618 (C-N) và 1539 cm <sup>-1</sup> (C=C)
	<i>Phổ MS: m/z</i> 152,0707 [M+H] <sup>+</sup> <i>Phổ NMR: <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C- NMR (PL 2.4 và PL 2.5)</i>	<i>Phổ MS: m/z</i> 237,03 [M+Na] <sup>+</sup> <i>Phổ NMR: <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C- NMR (PL 2.8 và PL 2.9)</i>
<i>Năng suất quay cực riêng:</i> [α] <sub>D</sub> <sup>25</sup> = -156 ° (C = 2, HCl 3 N)		
Độ tinh khiết (Sắc ký lỏng)	≥ 99,0% (nguyên trạng)	≥ 99,0% (nguyên trạng)

**Bảng 3.34.** Kết quả đánh giá tạp A và B của nifedipin

Chỉ tiêu/ phương pháp	Tạp A của nifedipin	Tạp B của nifedipin
Tính chất (Cảm quan)	Tinh thể trắng ngà, không mùi. Dễ tan trong methanol, ethanol, aceton, không tan trong nước và <i>n</i> -hexan.	Tinh thể xanh nhạt, không mùi. Dễ tan trong methanol, ethanol, aceton; không tan trong nước và <i>n</i> -hexan.
Điểm chảy (DSC)	105 °C	93,5 °C
Hàm ẩm (TGA)	≤ 0,1%	≤ 0,1%
	<i>Phổ IR (KBr/cm<sup>-1</sup>):</i> 1728; 1524; 1378 và 1111	<i>Phổ IR (KBr/cm<sup>-1</sup>):</i> 3084; 3001 – 2852; 1729; 1492;

Chỉ tiêu/ phương pháp	Tạp A của nifedipin	Tạp B của nifedipin
		1374 và 1110
Định tính	<i>Phổ MS</i> : ESI-MS(+) $m/z$ 367,0908 [M+Na] <sup>+</sup>	<i>Phổ MS</i> : ESI-MS(+) $m/z$ 351,0956 [M+Na] <sup>+</sup>
	<i>Phổ NMR</i> : <sup>1</sup> H-NMR và <sup>13</sup> C-NMR (PL 4.4 và PL 4.5)	<i>Phổ NMR</i> : <sup>1</sup> H-NMR và <sup>13</sup> C-NMR (PL 4.11 và PL 4.12)
Độ tinh khiết (Sắc ký lỏng)	≥ 99,0% (nguyên trạng)	≥ 99,0% (nguyên trạng)

### 3.3.2. Thiết lập chất đối chiếu

#### 3.3.2.1. Đóng gói

Chất khảo sát được đóng trong các lọ thủy tinh màu nâu, khối lượng đóng lọ và tổng số lọ đóng được theo bảng 3.35.

**Bảng 3.35.** Khối lượng chất khảo sát đóng trong 1 lọ và số lọ đóng được.

STT	Tên chất đối chiếu	KL lọ (mg)	Tổng số (lọ)
1	Captopril disulfid	20	50
2	7-ADCA	20	50
3	D-phenylglycin	10	30
4	Tạp D của amlodipin	20	50
5	Tạp A của nifedipin	20	30
6	Tạp B của nifedipin	20	30

Các lọ đối chiếu được bảo quản ở 2 – 8 °C và tiến hành đánh giá độ đồng nhất.

#### 3.3.2.2. Đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ

Lấy ngẫu nhiên 6 lọ mỗi chất thử nghiệm để đánh giá độ đồng nhất lọ. Mỗi lọ được phân tích 2 lần trên cùng phương pháp đã được thẩm định. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.36.

**Bảng 3.36.** Kết quả đánh giá đồng nhất lọ của các chất khảo sát sau khi đóng gói (PL 1.16, PL 2.14, PL 2.20, PL 3.21, PL 4.24, PL 4.27).

Số TT	Độ tinh khiết sắc ký TB giữa 2 lần phân tích (%)					
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	99,44	99,88	99,90	99,94	99,38	99,70
2	99,42	99,85	99,91	99,92	99,41	99,92
3	99,44	99,92	99,98	99,93	99,34	99,49
4	99,46	99,94	99,47	99,92	99,60	99,60
5	99,43	99,93	99,96	99,92	99,57	99,52
6	99,44	99,91	99,93	99,92	99,36	99,86
<b>TB</b>	<b>99,44</b>	<b>99,90</b>	<b>99,94</b>	<b>99,93</b>	<b>99,44</b>	<b>99,68</b>
<b>RSD</b>	<b>0,01%</b>	<b>0,01%</b>	<b>0,03%</b>	<b>0,01%</b>	<b>0,11%</b>	<b>0,18%</b>

(1): Captopril disulfid      (2): 7-ADCA      (3): D-phenylglycin  
 (4): Tạp D của amlodipin      (5): Tạp A của nifedipin      (6): Tạp B của nifedipin

Kết quả được đánh giá bằng phân tích thống kê ANOVA một yếu tố (PL 1.16, PL 2.14, PL 2.20, PL 3.21, PL 4.24, PL 4.27):

Captopril disulfid:  $F_{tn} 0,573 < F_{tc} 4,387$   
 7-ADCA:  $F_{tn} 1,290 < F_{tc} 3,110$   
 D-phenylglycin:  $F_{tn} 0,790 < F_{tc} 3,110$   
 Tạp D của amlodipin:  $F_{tn} 3,000 < F_{tc} 7,709$   
 Tạp A của nifedipin:  $F_{tn} 2,909 < F_{tc} 7,709$   
 Tạp B của nifedipin:  $F_{tn} 0,072 < F_{tc} 7,709$

*Nhận xét:* quá trình đóng gói không ảnh hưởng đến kết quả xác định độ tinh khiết của chất đối chiếu, các lọ chất đối chiếu đồng nhất.

### 3.3.2.3. Đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm

Các lọ CDC được đánh giá tại 2 phòng thí nghiệm đạt GLP và ISO 17025:

- PTN 1: Khoa Thiết lập Chất chuẩn và Chất đối chiếu – Viện Kiểm nghiệm thuốc TpHCM.

- PTN2: Khoa Vật lý đo lường - Viện Kiểm nghiệm thuốc TpHCM.

Mỗi PTN nhận ít nhất 6 lọ CDC và qui trình phân tích đã được thẩm định.

Độ đồng nhất lọ liên PTN được đánh giá bằng phép thống kê ANOVA một yếu tố trên 12 kết quả định lượng của 2 PTN tham gia đánh giá.

Các giá trị  $F_{tn}$  và  $F_{tc}$  được tính từ các kết quả độc lập của các phòng thí nghiệm (PL 1.17, PL 2.15, PL 2.21, PL 3.22, PL 4.25, PL 4.28):

Captopril disulfid:	$F_{tn} 4,253 < F_{tc} 4,965$
7-ADCA:	$F_{tn} 0,000 < F_{tc} 3,682$
D-phenylglycin:	$F_{tn} 0,249 < F_{tc} 4,964$
Tạp D của amlodipin:	$F_{tn} 0,172 < F_{tc} 4,965$
Tạp A của nifedipin:	$F_{tn} 4,496 < F_{tc} 6,607$
Tạp B của nifedipin:	$F_{tn} 0,300 < F_{tc} 4,965$

*Nhận xét:* các giá trị  $F_{tn} < F_{tc}$ , độ tinh khiết sắc ký của các CDC không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá. Các lọ CDC đồng nhất về chất lượng.

#### 3.3.2.4. Xác định giá trị ấn định và giá trị công bố

Giá trị ấn định và giá trị công bố được thực hiện theo hướng dẫn của ISO 13528.

##### *Giá trị ấn định và giá trị công bố của captopril disulfid*

Từ kết quả ở Bảng 3.37, giá trị  $s^*$  không thay đổi sau 3 lần tính, giá trị ấn định là 99,45% với độ lệch chuẩn thực của giá trị ấn định ( $s^*$ ) là 0,0144.

Xác định z-score: tất cả 12 giá trị đều có  $|z| < 2$ .

*Giá trị công bố:* độ tinh khiết sắc ký captopril disulfid: 99,45% ( $n = 12$ ),  $SD = 0,0166$

độ không đảm bảo đo  $\mu = 0,0052$ .

**Bảng 3.37.** Kết quả phân tích robust A của captopril disulfid (PL 1.18)

Chu kỳ	0	1	2	3
$x^* - \delta$		99,43	99,43	99,43
$x^* + \delta$		99,47	99,47	99,47
TB	99,473	99,449	99,449	99,449
SD	0,0669	0,0166	0,0166	0,0166
$x^*$	99,445	99,450	99,450	99,450
$s^*$	0,0144	0,0144	0,0144	0,0144



**Giá trị ấn định và giá trị công bố của 7-ADCA**

Từ kết quả ở Bảng 3.38, giá trị  $s^*$  không thay đổi sau 3 lần tính, giá trị ấn định là 99,90% với độ lệch chuẩn thực của giá trị ấn định ( $s^*$ ) là 0,048.

Xác định z-score: tất cả 12 giá trị đều có  $|z| < 2$ .

Giá trị công bố: độ tinh khiết sắc ký của 7-ADCA: 99,90% ( $n = 12$ ),  $SD = 0,052$

độ không đảm bảo đo  $\mu = 0,0187$

**Bảng 3.38.** Kết quả phân tích robust A của 7-ADCA

Chu kỳ	0	1	2	3
$x^* - \delta$	-	99,88	99,86	99,86
$x^* + \delta$	-	99,96	99,94	99,94
TB	99,90	99,92	99,90	99,90
SD	0,044	0,002	0,002	0,002
$x^*$	99,92	99,90	99,90	99,90
$s^*$	0,052	0,050	0,048	0,048

**Giá trị ấn định và giá trị công bố của D-phenylglycin**

Từ kết quả ở Bảng 3.39, giá trị  $s^*$  không thay đổi sau 3 lần tính, giá trị ấn định là 99,94% với độ lệch chuẩn thực của giá trị ấn định ( $s^*$ ) là 0,037.

Xác định z-score: tất cả 12 giá trị đều có  $|z| < 2$ .

Giá trị công bố:

độ tinh khiết sắc ký của D-phenylglycin: 99,94% ( $n = 12$ ),  $SD = 0,018$

độ không đảm bảo đo  $\mu = 0,0678$

**Bảng 3.39.** Kết quả phân tích robust A của D-phenylglycin

Chu kỳ	0	1	2	3
$x^* - \delta$	-	99,88	99,87	99,87
$x^* + \delta$	-	100,00	100,00	100,00
TB	99,91	99,94	99,94	99,94
SD	0,12	0,001	0,001	0,001
$x^*$	99,94	99,94	99,94	99,94
$s^*$	0,043	0,037	0,037	0,037

**Giá trị ấn định và giá trị công bố của tập D amlodipin**

Từ kết quả ở Bảng 3.40, giá trị  $s^*$  không thay đổi sau 3 lần tính, giá trị ấn định là 99,94% với độ lệch chuẩn thực của giá trị ấn định ( $s^*$ ) là 0,00.

Xác định z-score: có 1 giá trị đều có  $|z| > 2$ .

Giá trị công bố được tính trên 11 giá trị còn lại:

độ tinh khiết sắc ký của tập D: 99,92% ( $n = 11$ ),  $SD = 0,006$

độ không đảm bảo đo  $\mu = 0,0018$

**Bảng 3.40.** Kết quả phân tích robust A của tập D amlodipin

Chu kỳ	0	1	2	3
$x^* - \delta$		99,92	99,92	99,92
$x^* + \delta$		99,92	99,92	99,92
TB	99,92	99,92	99,92	99,92
SD	0,0067	0,00	0,00	0,00
$x^*$	99,92	99,92	99,92	99,92
$s^*$	0,00	0,00	0,00	0,00

**Giá trị ấn định và giá trị công bố của tập A nifedipin**

Từ kết quả ở Bảng 3.41, giá trị  $s^*$  không thay đổi sau 3 lần tính, giá trị ấn định là 99,59% với độ lệch chuẩn thực của giá trị ấn định ( $s^*$ ) là 0,258.

Xác định z-score: có 1 giá trị có  $|z| > 2$ .

Giá trị công bố được tính trên 11 giá trị còn lại:

độ tinh khiết sắc ký tập A: 99,56% ( $n = 11$ ),  $SD = 0,22$

độ không đảm bảo đo  $\mu = 0,097$

**Bảng 3.41.** Kết quả phân tích robust A của tập A nifedipin (PL 4.26)

Chu kỳ	0	1	2	3
$x^* - \delta$		99,175	99,218	99,201
$x^* + \delta$		99,975	99,932	99,976
TB	99,618	99,595	99,589	99,589
SD	0,286	0,238	0,228	0,228
$x^*$	99,575	99,595	99,589	99,589
$s^*$	0,267	0,270	0,258	0,258

**Giá trị ấn định và giá trị công bố của tạp B nifedipin**

Từ kết quả ở Bảng 3.42, giá trị  $s^*$  không thay đổi sau 3 lần tính, giá trị ấn định là 99,71% với độ lệch chuẩn thực của giá trị ấn định ( $s^*$ ) là 0,181.

Xác định z-score: tất cả 12 giá trị đều có  $|z| < 2$ .

Giá trị công bố: độ tinh khiết sắc ký tạp B: 99,71% ( $n = 12$ ),  $SD = 0,158$

độ không đảm bảo đo  $\mu = 0,065$

**Bảng 3.42.** Kết quả phân tích robust A của tạp B nifedipin (PL 4.29)

Chu kỳ	0	1	2	3
$x^* - \delta$		99,420	99,449	
$x^* + \delta$		100,020	99,991	
TB	99,708	99,708	99,708	
SD	0,158	0,158	0,158	
$x^*$	99,720	99,708	99,708	
$s^*$	0,200	0,181	0,181	

**Bảng 3.43.** Tóm tắt kết quả xác định giá trị ấn định và công bố các tạp đối chiếu

TT	Tạp đối chiếu	$x^*\%$	$s^*$	$\mu_x$	$X\%$
1	Captopril disulfid	99,45	0,014	0,0052	99,45
2	7-ADCA	99,90	0,048	0,0187	99,90
3	D-phenylglycin	99,94	0,037	0,0068	99,94
4	Tạp D của amlodipin	99,92	0,000	0,0018	99,92
5	Tạp A của nifedipin	99,59	0,258	0,097	99,56
6	Tạp B của nifedipin	99,71	0,181	0,065	99,71

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 chuẩn quốc gia.

Tiến hành lập hồ sơ chất chuẩn, dán nhãn lọ chuẩn và kèm theo phiếu kiểm nghiệm.

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 captopril, cephalexin, amlodipin, nifedipin và các thành phẩm tương ứng.

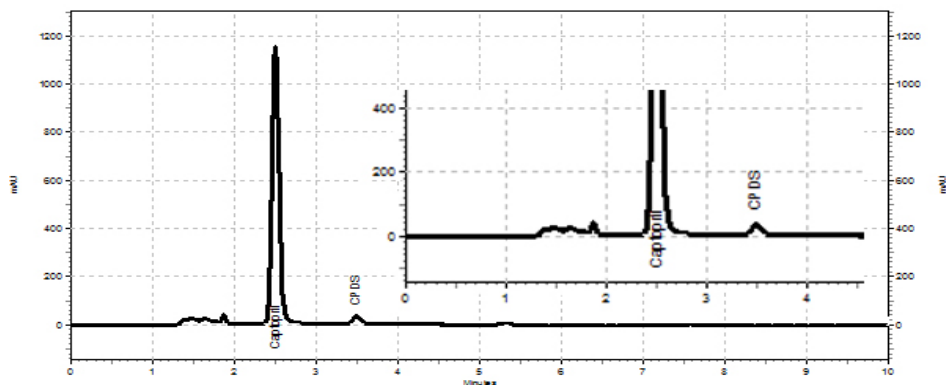
### 3.4. XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUI TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CAPTOPRIL DISULFID TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM CHỨA CAPTOPRIL BẰNG PHƯƠNG PHÁP SẮC KÝ LỎNG HIỆU NĂNG CAO

Qui trình định lượng captopril disulfid bằng phương pháp sắc ký lỏng với các điều kiện sắc ký tương tự qui trình xác định độ tinh khiết của captopril disulfid.

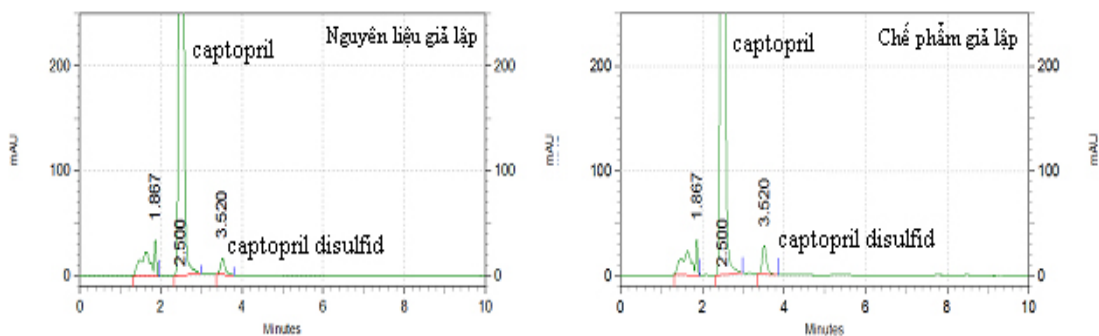
*Điều kiện sắc ký:*

- Cột Gemini – NX C<sub>18</sub> (150 x 4,6 mm; 5 μm),
- Pha động: acetonitril – dung dịch acid phosphoric pH 2 (30 : 70),
- Nhiệt độ cột: 50 °C, tốc độ dòng: 1 ml/phút, thể tích tiêm 10 μl,
- Đầu dò: PDA, bước sóng phát hiện 220 nm.

Tiến hành sắc ký 6 lần hỗn hợp chuẩn captopril 1000 μg/ml và captopril disulfid 10 μg/ml, mẫu thử giả lập nguyên liệu và thành phẩm. Kết quả các sắc ký đồ được minh họa ở hình 3.35 và 3.36.



**Hình 3.35.** Sắc ký đồ hỗn hợp chuẩn captopril và captopril disulfid trong nguyên liệu và chế phẩm chứa captopril



**Hình 3.36.** Sắc ký đồ mẫu thử giả lập nguyên liệu và thành phẩm

*Nhận xét:* Pic của tạp chất captopril disulfid có hệ số đối xứng ở trong khoảng 0,8–1,5; độ phân giải lớn hơn 1,5; số đĩa lý thuyết không giảm sau các lần tiêm mẫu liên tiếp, chứng tỏ cột không bị quá tải. Vì vậy tỷ lệ nồng độ captopril và captopril disulfid trong hỗn hợp chuẩn (1000 : 10 ppm), mẫu thử giả lập nguyên liệu (1000 : 10 ppm) và thành phẩm (1000 : 20 ppm) là phù hợp và điều kiện sắc ký xác định độ tinh khiết captopril disulfid cũng phù hợp để định lượng tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu captopril và thành phẩm.

### ***Kết quả thẩm định phương pháp***

*Tính phù hợp hệ thống:*

Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống trên mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử giả lập được thể hiện ở Bảng 3.44.

**Bảng 3.44.** Kết quả kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp captopril disulfid trên mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử giả lập (PL 1.19)

Mẫu phân tích	Captopril disulfid									
	$t_R$ (phút)		S ( $\mu V.s$ )		$R_s$		$A_s$		N	
	TB	RSD	TB	RSD	TB	RSD	TB	RSD	TB	RSD
Chuẩn (1)	3,50	0,20	324291	0,23	5,5	0,85	1,2	0,83	33040	0,10
Chuẩn (2)	3,51	0,39	656153	0,41	5,7	1,40	1,2	1,10	33661	1,65
Thử NL	3,51	0,88	43524	0,52	5,7	1,32	1,3	1,92	38487	1,10
Thử TP	3,49	0,36	195849	1,60	5,6	1,82	1,2	1,14	35395	1,20
Giả lập NL	3,53	1,10	363027	1,22	5,6	0,71	1,2	1,60	33570	0,69
Giả lập TP	3,53	1,50	664587	0,44	5,6	1,08	1,2	1,60	33545	0,96

$t_R$ : thời gian lưu,

S: diện tích pic,

$R_s$ : độ phân giải,

$A_s$ : hệ số đối xứng,

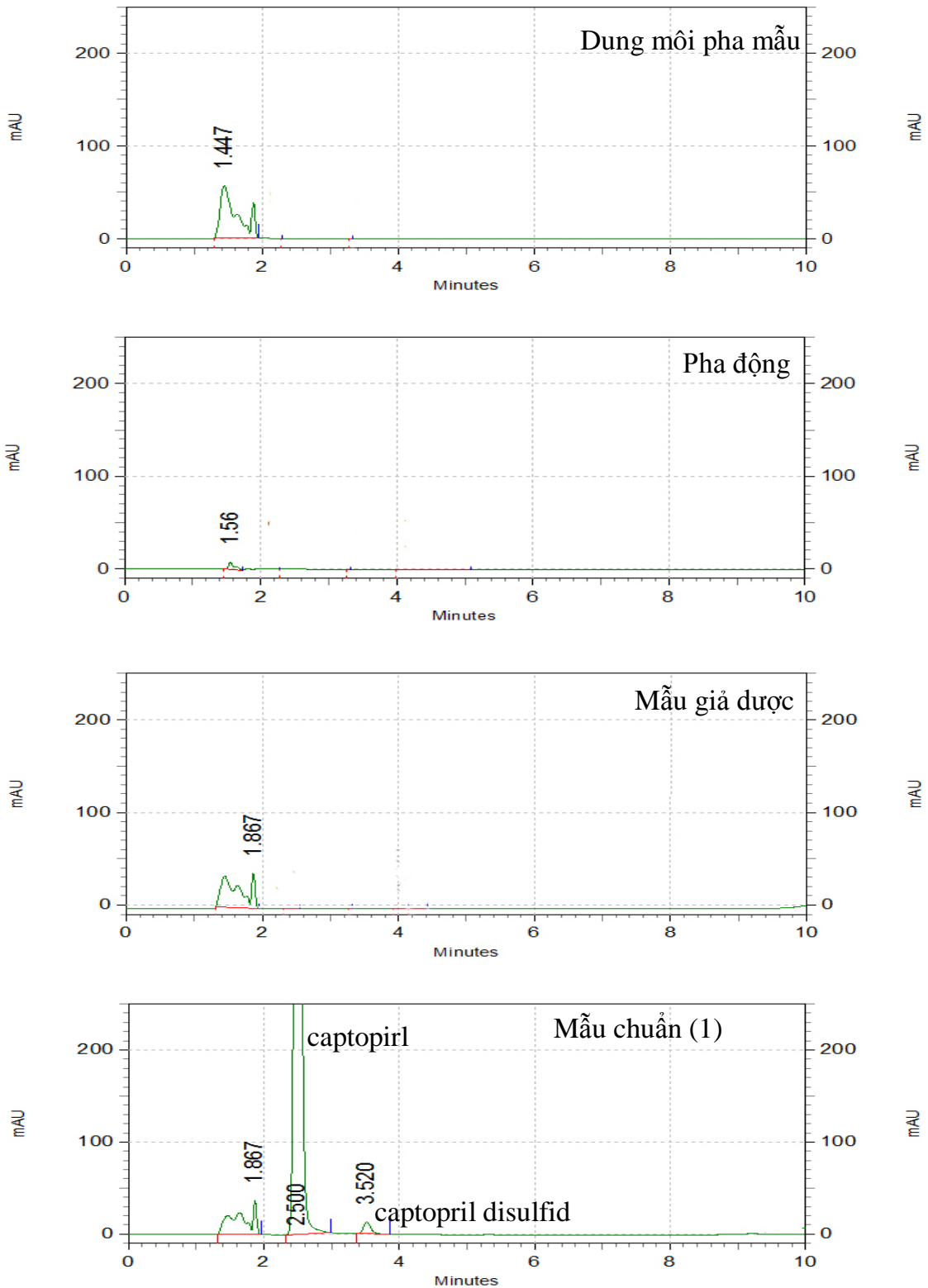
N: số đĩa lý thuyết,

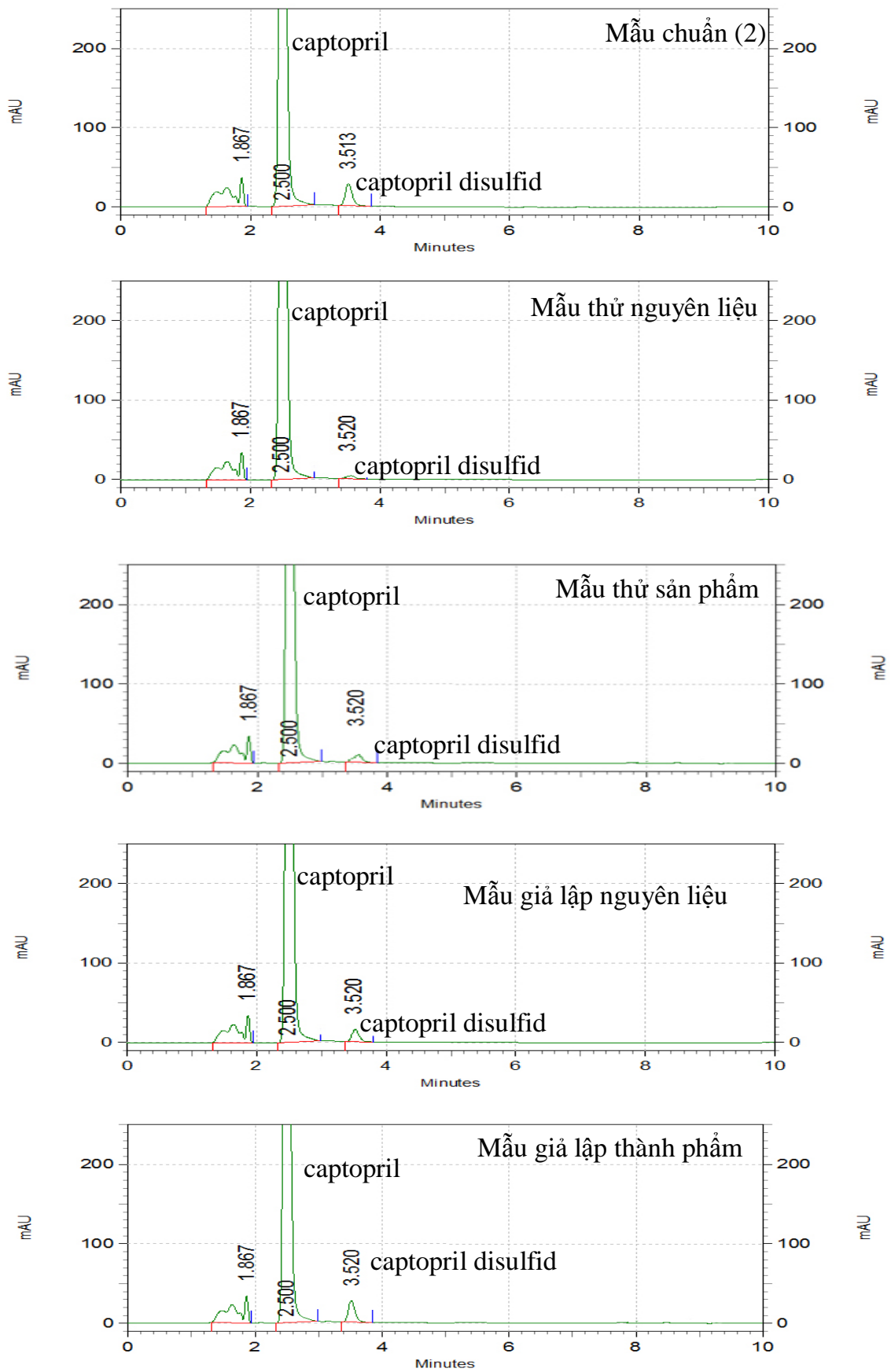
TB: trung bình.

Kết quả ở Bảng 3.44 cho thấy giá trị RSD của các thông số sắc ký đều không quá 2%, hệ số đối xứng trong khoảng 0,8–1,5; độ phân giải lớn hơn 1,5. Vì vậy, qui trình định lượng tạp chất captopril disulfid đạt tính phù hợp của hệ thống.

*Tính đặc hiệu:* (PL 1.20)

Tiến hành sắc ký dung môi pha mẫu, pha động, mẫu giả dược, mẫu chuẩn (1), mẫu chuẩn (2), mẫu thử nguyên liệu, mẫu thử thành phẩm, mẫu thử giả lập nguyên liệu và mẫu thử giả lập thành phẩm theo điều kiện sắc ký đã chọn, mỗi mẫu tiêm 2 lần.





**Hình 3.37.** Sắc ký đồ các mẫu phân tích khi thẩm định tính đặc hiệu.

Kết quả khảo sát cho thấy:

- Mẫu trắng (pha động và dung môi pha mẫu) và mẫu giả dược không xuất hiện pic tại thời gian lưu của pic captopril disulfid.
- Sắc ký đồ mẫu thử và mẫu giả lập cho 2 pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của 2 pic captopril và captopril disulfid trong mẫu chuẩn, pic captopril disulfid tách hoàn toàn với pic captopril và các pic tạp chưa định danh khác.
- Phổ UV-Vis tại thời gian lưu của pic captopril disulfid trong mẫu thử và mẫu giả lập giống phổ UV-Vis tại thời gian lưu của pic tương ứng trong mẫu chuẩn. Sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết cho thấy pic captopril disulfid trong mẫu thử và mẫu thử giả lập đều lớn hơn 99%.

Như vậy qui trình phân tích có tính đặc hiệu.

*Miền giá trị, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác của qui trình kiểm tra tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm chứa captopril*

**Bảng 3.45.** Kết quả xác định miền giá trị, giới hạn phát hiện, giới hạn định lượng, độ đúng, độ chính xác của qui trình kiểm tra tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm chứa captopril (PL 1.21, PL 1.22, PL 1.23, PL 1.24)

<b>Yêu cầu thẩm định</b>	<b>Qui trình kiểm tra tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm captopril</b>
<b>Phương trình hồi qui</b>	$\hat{y} = 33441x$
<b>Hệ số tương quan (<math>R^2</math>)</b>	0,9992
<b>Khoảng tuyến tính</b>	0,5 – 40 (ppm)
<b>Giới hạn phát hiện (LOD)</b>	0,17 $\mu\text{g/ml}$ .
<b>Giới hạn định lượng (LOQ)</b>	0,50 $\mu\text{g/ml}$ .
<b>Độ lặp lại RSD (%) (n = 6)</b>	
Mẫu thử nguyên liệu	0,79
Mẫu thử thành phẩm	1,47
Mẫu thử giả lập nguyên liệu	1,07



<b>Yêu cầu thẩm định</b>	<b>Qui trình kiểm tra tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm captopril</b>
Mẫu thử giả lập thành phẩm	0,80
<b>Độ chính xác trung gian (n = 12) RSD (%)</b>	
Mẫu thử nguyên liệu	0,81
Mẫu thử thành phẩm	1,97
Mẫu thử giả lập nguyên liệu	1,66
Mẫu thử giả lập thành phẩm	0,56
<b>Độ đúng (n = 9); tỷ lệ phục hồi (%) RSD</b>	
Mẫu nguyên liệu captopril được thêm chuẩn captopril disulfid	98,5 - 101,6 (RSD = 1,23%)
Mẫu giả dược được thêm nguyên liệu captopril và chuẩn captopril disulfid	99,4 - 101,9 (RSD = 0,74%)

*Nhận xét:* Qui trình định lượng tạp chất captopril disulfid bằng phương pháp HPLC có tính đặc hiệu, tuyến tính tại khoảng nồng độ đo, có giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng thấp, độ chính xác và độ đúng đáp ứng yêu cầu đề ra, do đó có thể được áp dụng để định lượng tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm captopril.

### **3.5. KIỂM TRA TẠP CHẤT LIÊN QUAN TRONG MỘT SỐ NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM**

#### **3.5.1. Định lượng captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm captopril**

Tiến hành xác định tạp captopril disulfid trên 2 lô nguyên liệu; 2 chế phẩm ngoại nhập và 4 lô chế phẩm trong nước. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.46.

*Nhận xét:* cả 2 lô nguyên liệu và 1 chế phẩm trong nước có kết quả kiểm tra tạp captopril disulfid đạt giới hạn cho phép theo qui định của dược điển Việt Nam V (nguyên liệu:  $\leq 1,0\%$ ; viên nén:  $\leq 3,0\%$ ), trong khi đó 2 chế phẩm ngoại nhập và 3

chế phẩm trong nước đều cao hơn mức cho phép, đặc biệt có 1 chế phẩm ngoại nhập và 1 chế phẩm trong nước có hàm lượng phần trăm captopril disulfid rất cao.

**Bảng 3.46.** Kết quả định lượng tạp captopril disulfid trong một số nguyên liệu và chế phẩm captopril trên thị trường (n = 3)

<b>Chế phẩm</b>	<b>Mã hóa</b>	<b>Hạn dùng</b>	<b>% captopril disulfid</b>
Nguyên liệu captopril, lô 1	NL01	03/2016	0,13%
Nguyên liệu captopril, lô 2	NL02	09/2016	0,13%
Viên nén captopril 25 mg (ngoại nhập, công ty A)	CPNNA	05/2016	20,41%
Viên nén captopril 25 mg (ngoại nhập, công ty B)	CPNNB	01/2017	8,49%
Viên nén captopril 25 mg (trong nước, công ty C)	CPTNC	02/2016	2,82%
Viên nén captopril 25 mg (trong nước, công ty D)	CPTND	02/2017	0,59%
Viên nén captopril 25 mg (trong nước, công ty E)	CPTNE	04/2016	30,60%
Viên nén captopril 25 mg (trong nước, công ty F)	CPTNF	12/2016	3,02%

### **3.5.2. Định lượng 7-ADCA và D-phenylglycin trong nguyên liệu và thành phẩm cephalixin**

*Tính phù hợp hệ thống* (PL 2.22, PL 2.23, PL 2.24)

Tiến hành sắc ký 6 lần các dung dịch đối chiếu (3), (4), (5). Hình 3.38, 3.39 minh họa các sắc ký đồ của các mẫu kiểm tra. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên các mẫu đối chiếu được thể hiện ở Bảng 3.47.

**Bảng 3.47.** Kết quả kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng 7-ADCA và D-phenylglycin trong nguyên liệu và thành phẩm cephalixin

Dung dịch đối chiếu (5) (n=6) (PL 2.22)							
	Cefotaxim			Cephalexin			$R_{\text{cefotaxim}} / \text{cephalexin}$
	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	
<b>TB</b>	489,071	17,436	0,9	350,503	14,835	1,0	4,7
<b>RSD (%)</b>	0,19	0,22	1,65	0,38	0,04	1,50	1,09

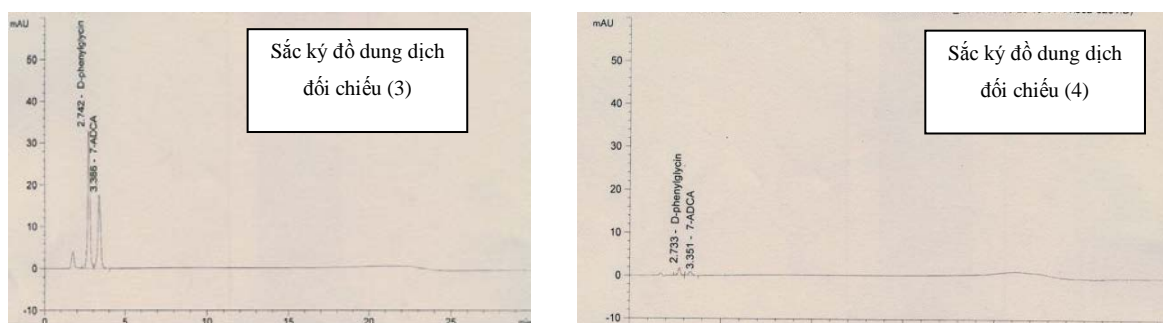
  

Dung dịch đối chiếu (3) (n=6) (PL 2.23)							
	D-phenylglycin			7-ADCA			$R_{7\text{-ADCA}/D\text{-phenylglycin}}$
	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	
<b>TB</b>	318,010	2,742	1,0	211,134	3,387	0,9	2,4
<b>RSD (%)</b>	0,39	0,20	1,45	0,73	0,24	0,67	1,70

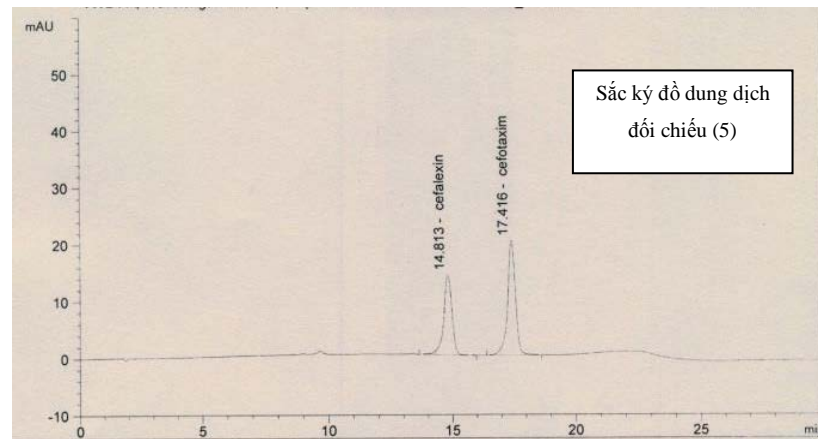
  

Dung dịch đối chiếu (4) (n=6) (PL 2.24)							
	D-phenylglycin			7-ADCA			$R_{7\text{-ADCA}/D\text{-phenylglycin}}$
	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	
<b>TB</b>	16,308	2,731	1,0	10,198	3,347	1,0	2,3
<b>RSD (%)</b>	0,69	0,08	0,82	0,63	0,11	1,50	1,76

$t_R$ : thời gian lưu, S: diện tích pic, R: độ phân giải,  $A_s$ : hệ số đối xứng, TB: trung bình



**Hình 3.38.** Sắc ký đồ dung dịch đối chiếu (3) và (4) trong kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng 7-ADCA và D-phenylglycin



**Hình 3.39.** Sắc ký đồ dung dịch đối chiếu (5) trong kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng 7-ADCA và *D*-phenylglycin.

*Nhận xét:* Kết quả khảo sát cho thấy giá trị RSD của các thông số sắc ký đều không quá 2,0%; hệ số đối xứng nằm trong khoảng 0,8–1,5; độ phân giải giữa 7-ADCA và *D*-phenylglycin lớn hơn 2,0; độ phân giải giữa cefotaxim và cephalexin lớn hơn 1,5. Như vậy qui trình định lượng tạp chất 7-ADCA và *D*-phenylglycin đạt tính phù hợp của hệ thống.

*Ứng dụng kiểm tra tạp chất trong một số nguyên liệu và chế phẩm chứa cephalexin*  
Tiến hành kiểm tra tạp 7-ADCA và *D*-phenylglycin trên 2 lô nguyên liệu cephalexin. Kết quả định lượng được trình bày ở Bảng 3.48.

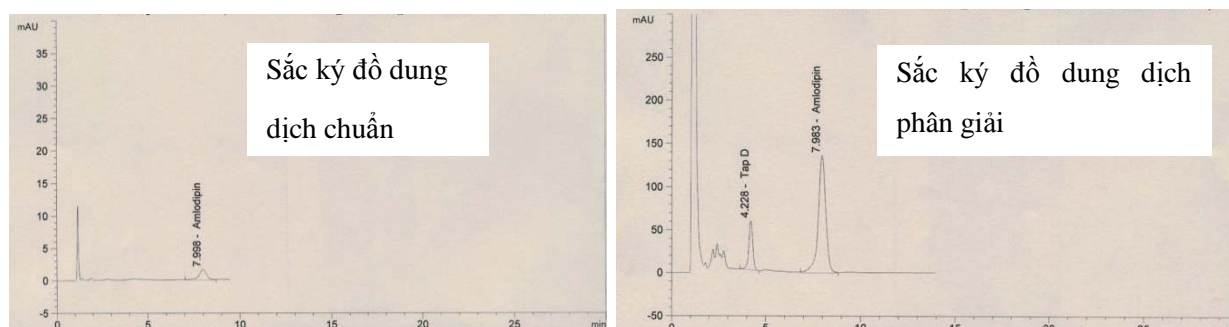
**Bảng 3.48.** Kết quả kiểm tra tạp 7-ADCA và *D*-phenylglycin trong một số nguyên liệu và chế phẩm cephalexin trên thị trường (n = 6)

Chế phẩm	Hạn dùng	<i>D</i> -phenylglycin	7-ADCA
Nguyên liệu cephalexin 0391, lô B5000405	03/2018	không phát hiện	không phát hiện
Nguyên liệu cephalexin 0392, lô B5000631	09/2018	không phát hiện	không phát hiện

*Nhận xét:* 2 lô nguyên liệu không phát hiện tạp chất 7-ADCA và *D*-phenylglycin.

### 3.5.3. Định lượng tạp D của amlodipin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa amlodipin

Tính phù hợp hệ thống: Tiến hành sắc ký 6 lần dung dịch chuẩn, dung dịch phân giải. Hình 3.40 minh họa các sắc ký đồ của các mẫu kiểm tra. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên các mẫu kiểm tra được thể ở Bảng 3.49.



**Hình 3.40.** Sắc ký đồ dung dịch chuẩn và dung dịch phân giải trong kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp D của amlodipin

**Bảng 3.49.** Kết quả kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp D của amlodipin trong nguyên liệu và thành phẩm amlodipin

Dung dịch phân giải amlodipin (n=6) (PL 3.23)							
	Tạp D			Amlodipin			$R_{\text{tạp D/amlodipin}}$
	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	
TB	1398,658	4,228	0,91	2674,101	7,990	0,908	7,2
RSD (%)	0,057	0,076	0,901	0,073	0,031	0,449	0,721
Dung dịch chuẩn D amlodipin (n=6) (PL 3.24)							
	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$				
TB	56,077	4,228	0,99				
RSD (%)	0,714	0,038	1,040				

$t_R$ : thời gian lưu, S: diện tích pic, R: độ phân giải,  $A_s$ : hệ số đối xứng, TB: trung bình.

Nhận xét: Kết quả khảo sát cho thấy giá trị RSD của các thông số sắc ký đều < 2,0%; hệ số đối xứng nằm khoảng 0,8–1,5; độ phân giải giữa tạp D và amlodipin

lớn hơn 4,5. Như vậy qui trình định lượng tạp chất D của amlodipin trong nguyên liệu và chế phẩm chứa amlodipin đạt tính phù hợp của hệ thống.

*Ứng dụng kiểm tra tạp D amlodipin trong một số nguyên liệu và chế phẩm chứa amlodipin*

Tiến hành kiểm tra tạp D của amlodipin trên 2 lô nguyên liệu và 2 chế phẩm amlodipin. Kết quả định lượng được trình bày Bảng 3.50.

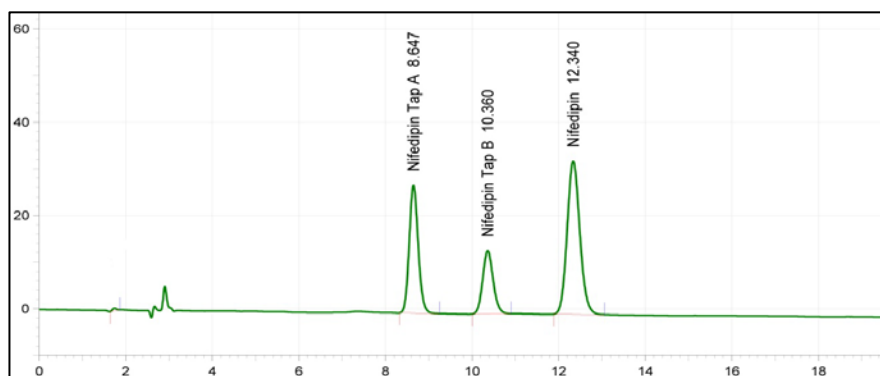
**Bảng 3.50.** Kết quả kiểm tra tạp D của amlodipin trong một số nguyên liệu và chế phẩm chứa amlodipin besilat trên thị trường (n = 6)

Chế phẩm	Hạn dùng	Tạp D của amlodipin
Nguyên liệu 464/15, lô ALK5AQA23B	03/2016	0,062%
Nguyên liệu 776/14, lô ALK5APA28B	02/2016	0,047%
Viên nén amlodipin 5 mg (công ty A)	05/2016	0,154%
Viên nang amlodipin 5 mg (công ty B)	01/2017	0,082%

*Nhận xét:* cả 2 lô nguyên liệu và 2 chế phẩm có kết quả kiểm tra tạp D của amlodipin đạt giới hạn cho phép theo qui định của dược điển Việt Nam V (nguyên liệu:  $\leq 0,3\%$ , viên nén:  $\leq 0,25\%$ ). Trong đó, 2 lô nguyên liệu có hàm lượng tạp D của amlodipin thấp hơn so với 2 chế phẩm.

#### 3.5.4. Định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa nifedipin

*Tính phù hợp hệ thống:* Tiến hành sắc ký 6 lần các dung dịch chuẩn. Kết quả kiểm tra tính phù hợp hệ thống trên dung dịch chuẩn được thể hiện ở Hình 3.41 và 3.42 và Bảng 3.51 và 3.52.

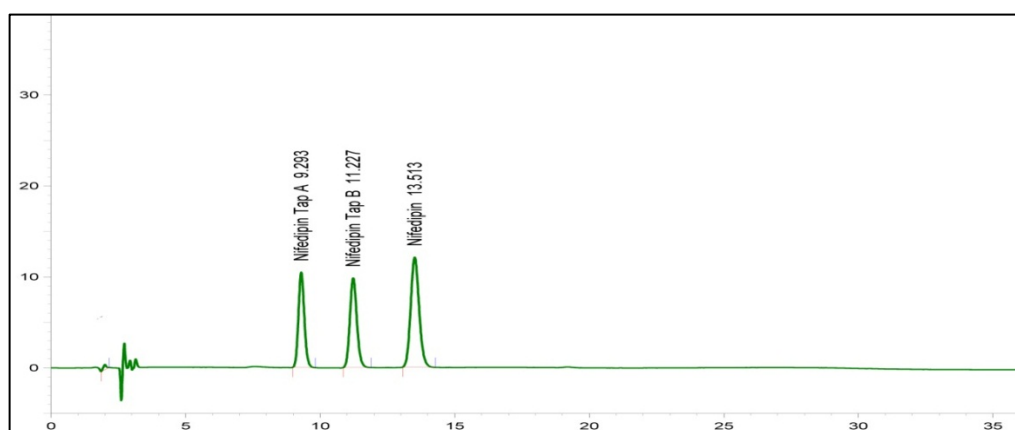


**Hình 3.41.** Sắc ký đồ dung dịch chuẩn khi kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong thành phẩm chứa nifedipin

**Bảng 3.51.** Kết quả kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong thành phẩm chứa nifedipin trên mẫu chuẩn (n=6) (PL 4.30)

	$t_R$ (phút)		S ( $\mu V \times$ giây)		$A_s$		Rs	
	TB	RSD	TB	RSD	TB	RSD	TB	RSD
Tạp A	8,632	0,20%	1586870	0,24%	1,11	1,09%	4,19	0,24%
Tạp B	10,337	0,22%	921749	0,61%	1,11	0,68%	4,08	0,20%

$t_R$ : thời gian lưu, S: diện tích pic,  $A_s$ : hệ số bất đối, TB: trung bình, RSD: độ lệch chuẩn tương đối.



**Hình 3.42.** Sắc ký đồ dung dịch chuẩn khi kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong nguyên liệu nifedipin

**Bảng 3.52.** Kết quả kiểm tra tính phù hợp hệ thống của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong nguyên liệu nifedipin trên mẫu chuẩn (n=6) (PL 4.31)

	$t_R$ (phút)		S ( $\mu V \times$ giây)		$A_s$		Rs	
	TB	RSD	TB	RSD	TB	RSD	TB	RSD
Tạp A	9,281	0,18%	633465	0,14%	1,12	0,73%	4,48	0,17%
Tạp B	11,209	0,21%	713963	0,52%	1,13	0,67%	4,42	0,12%

$t_R$ : thời gian lưu, S: diện tích pic,  $A_s$ : hệ số bất đối, TB: trung bình, RSD: độ lệch chuẩn tương đối.

*Nhận xét:* Kết quả khảo sát cho thấy giá trị RSD của các thông số sắc ký đều < 2,0%; hệ số đối xứng nằm trong khoảng 0,8–1,5; độ phân giải của hai pic tạp lớn

hơn 1,5. Như vậy qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa nifedipin đạt tính phù hợp của hệ thống.

*Ứng dụng kiểm tra tạp A và tạp B nifedipin trong nguyên liệu và chế phẩm nifedipin*  
Số mẫu khảo sát: 2 lô nguyên liệu và 2 lô chế phẩm chứa nifedipin.

**Bảng 3.53.** Kết quả kiểm tra tạp A và tạp B của nifedipin trong một số nguyên liệu và chế phẩm nifedipin trên thị trường (n = 6)

<b>Chế phẩm</b>	<b>Hạn dùng</b>	<b>% tạp A</b>	<b>% tạp B</b>
Viên nén Nifedipin 10 mg (lô 030815 công ty C)	010817	0,0043	0,102
Viên nén Nifedipin 10 mg (lô 030815 công ty D)	171017	0,0039	0,152
Nguyên liệu Nifedipin (lô 205)	052018	0,0041	0,077
Nguyên liệu Nifedipin (lô 249)	092018	0,0036	0,074

*Nhận xét:* Hàm lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong các nguyên liệu và chế phẩm chứa nifedipin đều nằm trong giới hạn cho phép theo qui định của DĐVN V (không quá 2,0% đối với tạp A và không quá 0,5% đối với tạp B trên mẫu chế phẩm; không quá 0,1% đối với tạp A và không quá 0,1% đối với tạp B trên mẫu nguyên liệu).



## CHƯƠNG 4. BÀN LUẬN

Cho đến nay, chưa có các công bố trong nước về quy trình tổng hợp và tiêu chuẩn hóa các tạp chất của kháng sinh cephalixin và thuốc tim mạch như captopril, amlodipin và nifedipin.

Vì vậy, việc lựa chọn các tạp chất của các hoạt chất này làm đối tượng nghiên cứu trong luận án là nghiên cứu không trùng lặp, cụ thể là với một số nghiên cứu của các tác giả theo các tài liệu [2], [3], [4], [5], [6], [7], [8], [9], [10], [11], [12], [13], [15], [16], [17], [18], [39].

Một số bàn luận rút ra từ quá trình thực hiện và kết quả thực nghiệm như sau:

### 4.1. PHƯƠNG PHÁP TỔNG HỢP CÁC TẠP CHẤT

#### 4.1.1. Tổng hợp và tinh chế tạp captopril disulfid

Captopril disulfid là sản phẩm phân hủy chủ yếu của captopril dưới tác động của các yếu tố môi trường như ánh sáng, oxy không khí. Ion  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$  tạo phức kém bền với captopril nên  $Fe^{3+}$  là tác nhân có khả năng tổng hợp captopril disulfid, tuy nhiên phức chất tạo thành khó tinh chế. [BMIM]- $BF_4$  là môi trường chọn lọc tạo captopril disulfid, nhưng là một hóa chất đắt tiền và khó tách khi tinh chế captopril disulfid. Do đó, captopril disulfid được tổng hợp bằng cách oxy hóa captopril với một số tác nhân oxy hóa. Các tác nhân oxy hóa ưu tiên được lựa chọn là các chất dễ tìm, rẻ tiền. Quy trình tổng hợp và tinh chế có thể thực hiện ở các phòng thí nghiệm và cho hiệu suất cao như oxy không khí, hydrogen peroxyd, sắt (III) clorid hexahydrat, iod, kali permanganat, kali dicromat và ethylendiamin tetraacetic.

Tổng hợp captopril disulfid từ captopril bằng cách oxy hoá bởi oxy không khí là không phù hợp, có thể do tốc độ phản ứng oxy hóa xảy ra khá chậm. Ngoài ra trong điều kiện sục oxy liên tục, thời gian dài cùng tác động của ánh sáng nên tạo thuận lợi cho vi khuẩn và tảo phát triển.

Tổng hợp captopril disulfid với tác nhân là sắt (III) clorid, thời gian phản ứng nhanh, nhưng tủa còn màu vàng.

Tổng hợp captopril disulfid với tác nhân là iod cho thời gian phản ứng nhanh, trong khoảng 30 phút xuất hiện tủa có màu vàng. Hiệu suất phản ứng hầu như

không thay đổi theo khối lượng iod. Sự thay đổi khối lượng kali iodid không ảnh hưởng đáng kể đến hiệu suất phản ứng. Tuy nhiên, lượng kali iodid lớn sẽ giúp cho quá trình hòa tan iod nhanh hơn. Để loại bỏ iod thừa, sử dụng natri thiosulfat, tủa trắng hơn nhưng đồng thời xuất hiện nhiều sản phẩm phụ tetrathionat gây khó khăn khi tinh chế.

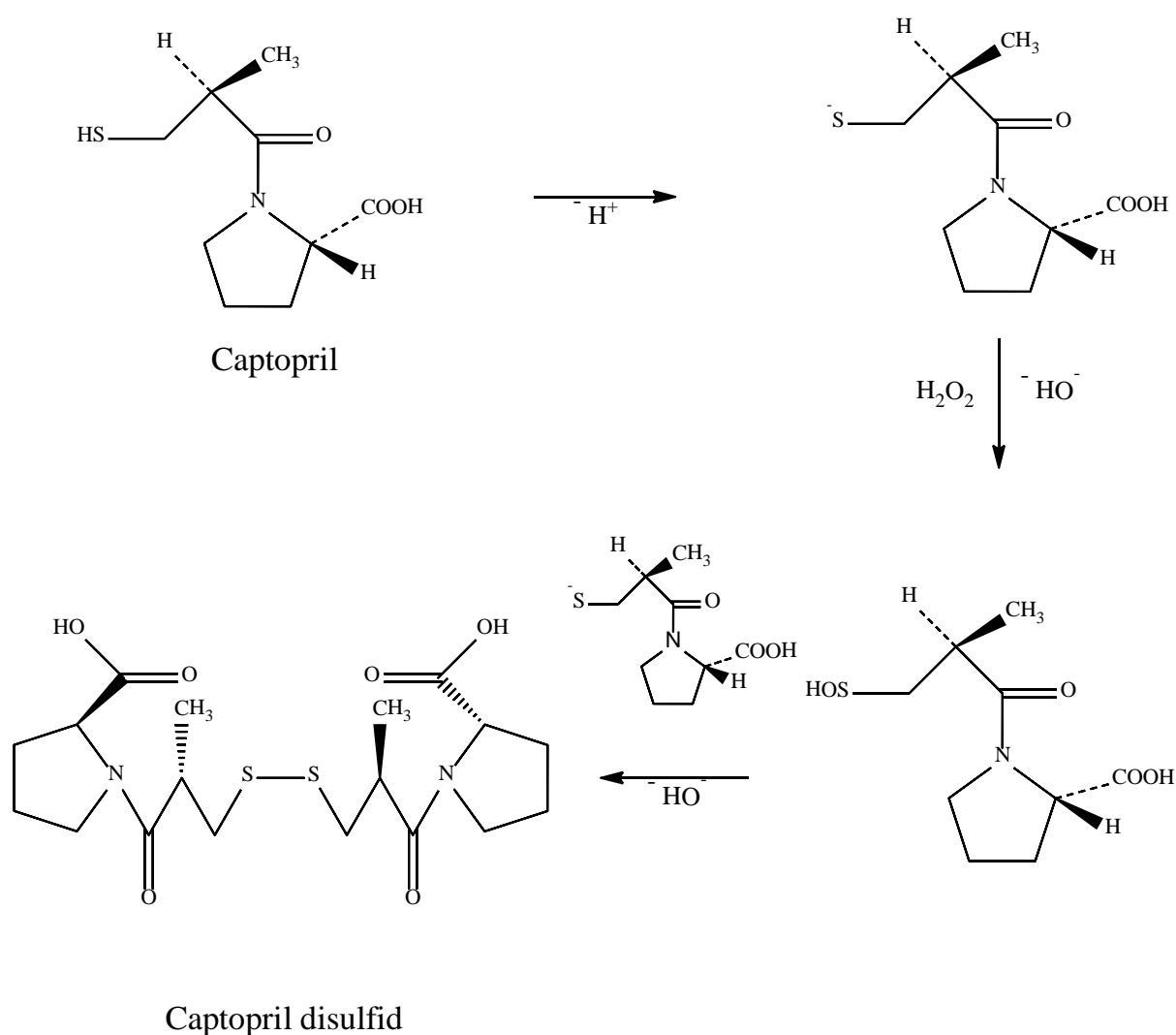
Tổng hợp captopril disulfid với tác nhân là kali permanganat trong môi trường acid cho thời gian phản ứng nhanh, xuất hiện tủa trắng sau 1–2 phút. Với thể tích 1, 2 và 5 ml acid sulfuric, tủa nâu xuất hiện, có thể là mangan dioxyd hay hợp chất không tan trong nước khác của mangan. Với thể tích 10 ml acid sulfuric tủa trắng có lấm tấm đen. Khi tăng thể tích acid sulfuric lên 15 ml, thu tủa trắng hoàn toàn. Với thể tích 20 ml acid sulfuric, hiệu suất phản ứng cao nhất (14%).

Tổng hợp captopril disulfid với tác nhân kali dicromat trong môi trường acid sulfuric xuất hiện tủa sau 1–2 phút, tủa và dung dịch có màu xanh ngọc. Khi thể tích acid sulfuric từ 1–30 ml, hiệu suất phản ứng tăng, tủa có màu xanh ngọc tăng dần. Hiệu suất giảm đột ngột khi thể tích acid sulfuric từ 35–40 ml, tủa có màu gần như trắng, có thể do thể tích acid sulfuric đậm đặc cao sẽ làm tăng tính oxy hóa của acid sulfuric, chất này phá hủy phức màu, tạo tủa trắng.

Tổng hợp captopril disulfid với tác nhân kali dicromat trong môi trường acid sulfuric với sự hiện diện của EDTA cho tủa sau 1–3 phút, dung dịch màu tím xanh. Trong phản ứng này EDTA là tác nhân tạo phức với  $\text{Cr}^{3+}$  nên hạn chế sự hấp phụ ion này lên bề mặt tủa tạo thành. Tuy nhiên tủa vẫn chưa trắng hoàn toàn và sự có mặt của EDTA không cải thiện hiệu suất phản ứng.

Tổng hợp captopril disulfid với tác nhân hydrogen peroxyd được thực hiện thành công do khả năng oxy hóa của oxy nguyên tử sinh ra từ hydrogen peroxyd mạnh hơn so với oxy không khí với cơ chế phản ứng được trình bày ở hình 4.1.

Phản ứng oxy hóa captopril bằng hydrogen peroxyd tạo captopril disulfid qua 2 giai đoạn, trong đó giai đoạn phản ứng giữa anion thiolat với hydrogen peroxyd tạo chất trung gian acid sulfenic là giai đoạn quyết định tốc độ phản ứng. Acid sulfenic sẽ tiếp tục phản ứng với anion thiolat tạo thành sản phẩm captopril disulfid.



**Hình 4.1.** Cơ chế phản ứng tổng hợp captopril disulfid bằng cách oxy hóa captopril với tác nhân hydrogen peroxyd [29]

Hiệu suất phản ứng tăng khi thể tích hydrogen peroxyd thay đổi từ 2 đến 10 ml. Hiệu suất cao nhất (khoảng 40%) tương ứng với 10 ml hydrogen peroxyd. Hiệu suất phản ứng giảm dần khi thể tích hydrogen peroxyd thay đổi từ 15 đến 70 ml. Với thể tích hydrogen peroxyd từ 80 đến 100 ml, tựa không xuất hiện. Nguyên nhân giảm hiệu suất có thể do khi thể tích hydrogen peroxyd tăng sẽ làm tăng tính oxy hóa hydrogen peroxyd, chất này sẽ oxy hóa tiếp sản phẩm kết tinh, tạo sản phẩm mới tan trong nước. Như vậy, tỷ lệ thể tích hydrogen peroxyd 30% (100 thể tích) và khối lượng captopril (ml/g) có ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng và tỷ lệ 2 : 1 cho hiệu suất phản ứng cao nhất. pH có ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng và pH

2,2 cho hiệu suất phản ứng cao nhất. Với một số điều kiện phản ứng khác được cố định như tỷ lệ hydrogen peroxyd/captopril (2:1) (ml/g) và pH 2,2 thì thời gian phản ứng có ảnh hưởng đến hiệu suất và thời gian phản ứng 9 giờ cho hiệu suất phản ứng cao nhất (khoảng 60%). Do sản phẩm trong phản ứng sinh ra là nước nên captopril disulfid tủa dễ dàng và sau khi tinh chế đạt độ tinh khiết cao, phù hợp với mục tiêu tạo sản phẩm làm chất đối chiếu và đồng thời hạn chế ô nhiễm môi trường.

Captopril disulfid là chất kém tan trong nước và trong các dung môi hữu cơ như cloroform, diethyl ether, dicloromethan nhưng tan được trong methanol và ethanol. Vì vậy methanol đã được lựa chọn để hòa tan sản phẩm và kết tinh lại trong môi trường nước. Ngoài ra methanol có nhiệt độ sôi thấp hơn ethanol nên quá trình kết tinh sẽ thuận lợi và nhanh chóng hơn. Quá trình tinh chế captopril disulfid bằng phương pháp kết tinh nóng và kết tinh nguội cho hiệu quả không khác biệt. Nhưng phương pháp kết tinh nguội thời gian kết tinh lâu hơn do methanol bay hơi chậm. Do đó ưu tiên chọn phương pháp kết tinh nóng. Sau 3 lần tinh chế, hiệu suất toàn qui trình trung bình với tác nhân oxy hoá khử hydrogen peroxyd, sắt (III) clorid và iod cao. Tuy nhiên với tác nhân sắt (III) clorid và iod, tủa vẫn còn ánh màu vàng. Nguyên nhân có thể là do thừa iod hoặc sản phẩm hấp phụ ion  $Fe^{3+}$ ,  $Fe^{2+}$  và phức của sắt với captopril. Do đó chọn tác nhân hydrogen peroxyd vì cho hiệu suất cao, tủa kết tinh trắng, để tiếp tục tối ưu hóa qui trình.

Dựa vào kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng ở trên, qui trình tổng hợp captopril disulfid đã được tối ưu hoá bằng phần mềm JMP 5.1 với mô hình Box-Behnken giúp đánh giá được ảnh hưởng của các yếu tố đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid từ captopril và hydrogen peroxyd và dự đoán được điều kiện cho phản ứng tối ưu. Kết quả tối ưu hóa cho thấy hiệu suất dự đoán 66,04% và hiệu suất thực tế 62,98% khác nhau không có ý nghĩa thống kê, dựa trên phép kiểm T với  $t_m = 1,396 < 4,303 = t_{0,05}$

#### **4.1.2. Tổng hợp và tinh chế 7-ADCA và D-phenylglycin**

Khi thủy phân cephalaxin trong môi trường acid và kiềm, có thể do nồng độ môi trường phản ứng được chọn quá cao nên làm cho hiệu suất qui trình thấp. Vì

vậy, cần khảo sát lại phản ứng thủy phân với nồng độ môi trường thấp hơn và thời gian dài hơn.

Việc điều chế tạp chất bằng phương pháp hóa học cho thấy quá trình thủy phân cephalixin trong môi trường acid và kiềm tuy dễ tiến hành nhưng sinh ra nhiều sản phẩm phân hủy nên không thu được sản phẩm có độ tinh khiết cao. Mặt khác, qui trình tổng hợp có hiệu suất thấp (khoảng 3,5%) vì vậy qui trình tổng hợp này không khả thi.

Enzym penicillin G acylase (PGA) xúc tác phản ứng tổng hợp cephalixin từ *D*-phenylglycin và 7-ADCA. Enzym này cũng tham gia quá trình thủy giải nhóm *N*-acyl để cho lại sản phẩm ban đầu. Tuy nhiên, PGA có giá thành cao (4,1 triệu đồng/100 mg), khó bảo quản, vận chuyển và không thể tái sử dụng. Một sản phẩm từ công nghệ mới của enzym là việc cố định hóa các enzym này trên phức hợp polymer giúp giải quyết các trở ngại trên. Do vậy, nhóm nghiên cứu đã sử dụng *enzym penicillin G acylase cố định hóa trên chất nền polymer*.

Tiến hành thủy phân trong môi trường đệm pH 8 và trong môi trường nước cho thấy lượng sản phẩm thô thu được từ hai thí nghiệm khác nhau không đáng kể. Do đó chọn điều kiện trong môi trường nước để sản phẩm ít bị ảnh hưởng của muối đệm.

Bước đầu tiên, Ser  $\beta$ 1: O  $\gamma$  hydroxyl sẽ cộng ái nhân vào nhóm chức carbonyl amid của cephalixin tạo trạng thái chuyển tiếp có cấu tạo oxyanion tứ diện bền do tạo được liên kết hydro với 2 acid amin Ala  $\beta$ 69: N và Asn  $\beta$ 241: N  $\delta$ 2. Kế tiếp, chất trung gian acyl-enzym và 7-ADCA được hình thành, theo sau là quá trình thủy phân ester của acyl-enzym tạo sản phẩm acid amin *D*-phenylglycin [54].

Khi tiến hành kết tinh phân đoạn để thu sản phẩm, do 7-ADCA có độ tan trong nước thấp hơn nhiều so với *D*-phenylglycin nên pH môi trường được điều chỉnh về pH đẳng điện của 7-ADCA trước (pH 4) để kết tủa 7-ADCA rồi sau đó mới điều chỉnh về pH đẳng điện của *D*-phenylglycin (pH 6,5) để thu sản phẩm *D*-phenylglycin. Kết quả cho thấy sản phẩm 7-ADCA có lẫn một ít *D*-phenylglycin nhưng phần tạp này được loại bỏ dễ dàng thông qua kết tinh lại và tiến hành HPLC

điều chế. Lượng sản phẩm *D*-phenylglycin thô thu được tuy thấp nhưng độ tinh khiết rất cao (98,3% tính theo phương pháp phần trăm diện tích pic).

Nếu điều chỉnh pH của dịch phản ứng từ 8 về 6,5 để thu *D*-phenylglycin trước thì sản phẩm bị lẫn rất nhiều tạp 7-ADCA và việc tinh chế gặp nhiều khó khăn, hiệu suất tinh chế thấp.

Cơ sở để chọn pH pha mẫu (7-ADCA được pha trong đệm pH 7 trước rồi bổ sung vừa đủ bằng đệm phosphat pH 5, *D*-phenylglycin được pha trong đệm pH 5) là dựa trên tài liệu tham khảo ĐĐVN. Điều kiện này phù hợp theo lý thuyết vì ở pH này nồng độ dạng ion hóa của mẫu cao. Thực tế cũng cho thấy mẫu tan tốt ở các điều kiện đã chọn.

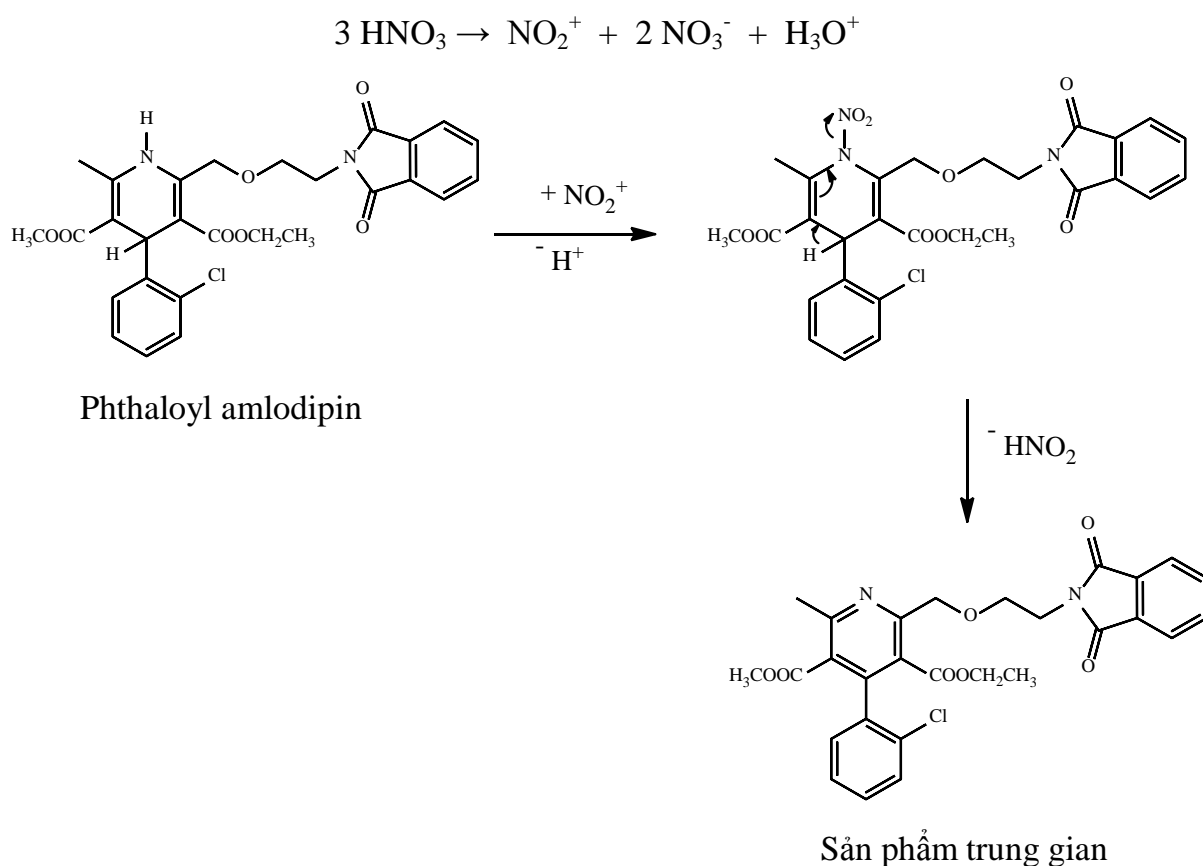
Như vậy, tổng hợp 7-ADCA và *D*-phenylglycin bằng cách thủy phân cephalixin bằng enzym PGA trong môi trường nước thu được sản phẩm dễ tinh chế, có độ tinh khiết cao đáp ứng yêu cầu làm chất chuẩn. Điểm quan trọng là sau khi xúc tác phản ứng, có thể tách loại enzym này dễ dàng bằng cách lọc thu hồi và tái sử dụng được nhiều lần, không làm ảnh hưởng đến môi trường và giá thành cũng rẻ hơn (1,5 triệu đồng/1kg). Cấu hình D-của hợp chất phenylglycin được chứng minh là không thay đổi từ cấu hình của nguyên liệu cephalixin. Đây là một điểm nổi trội so với việc tổng hợp bằng con đường hóa học, đồng thời cũng làm giảm giá thành của sản phẩm tổng hợp. Nghiên cứu này cũng hứa hẹn khả năng tổng hợp các tạp chất khác của các kháng sinh nhóm cephalosporin.

#### **4.1.3. Tổng hợp và tinh chế tạp D của amlodipin**

Theo Coppi Laura và cộng sự, qui trình tổng hợp tạp D của amlodipin gồm 6 giai đoạn [28], tiến hành phức tạp, tốn kém. Một số hóa chất, thuốc thử có độc tính, khó mua, phải nhập từ nước ngoài nên không thể thực hiện. Vì vậy, việc tổng hợp tạp D từ sản phẩm trung gian phthaloyl amlodipin được lựa chọn để rút ngắn qui trình tổng hợp còn 2 giai đoạn, giảm thiểu tạp chất trong sản phẩm tổng hợp.

Phương pháp tổng hợp 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat là phương pháp oxy hóa vòng 1,4-dihydropyridin của phthaloyl amlodipin tạo vòng pyridin với tác nhân oxy hóa là

hỗn hợp  $\text{SiO}_2\text{-HNO}_3$  là một phương pháp đơn giản, dễ thực hiện, thời gian phản ứng ngắn, hiệu suất cao và dễ tinh chế với cơ chế phản ứng giống với cơ chế phản ứng tổng hợp tạp A nifedipin được trình bày ở hình 4.2 [37], [55], [59].

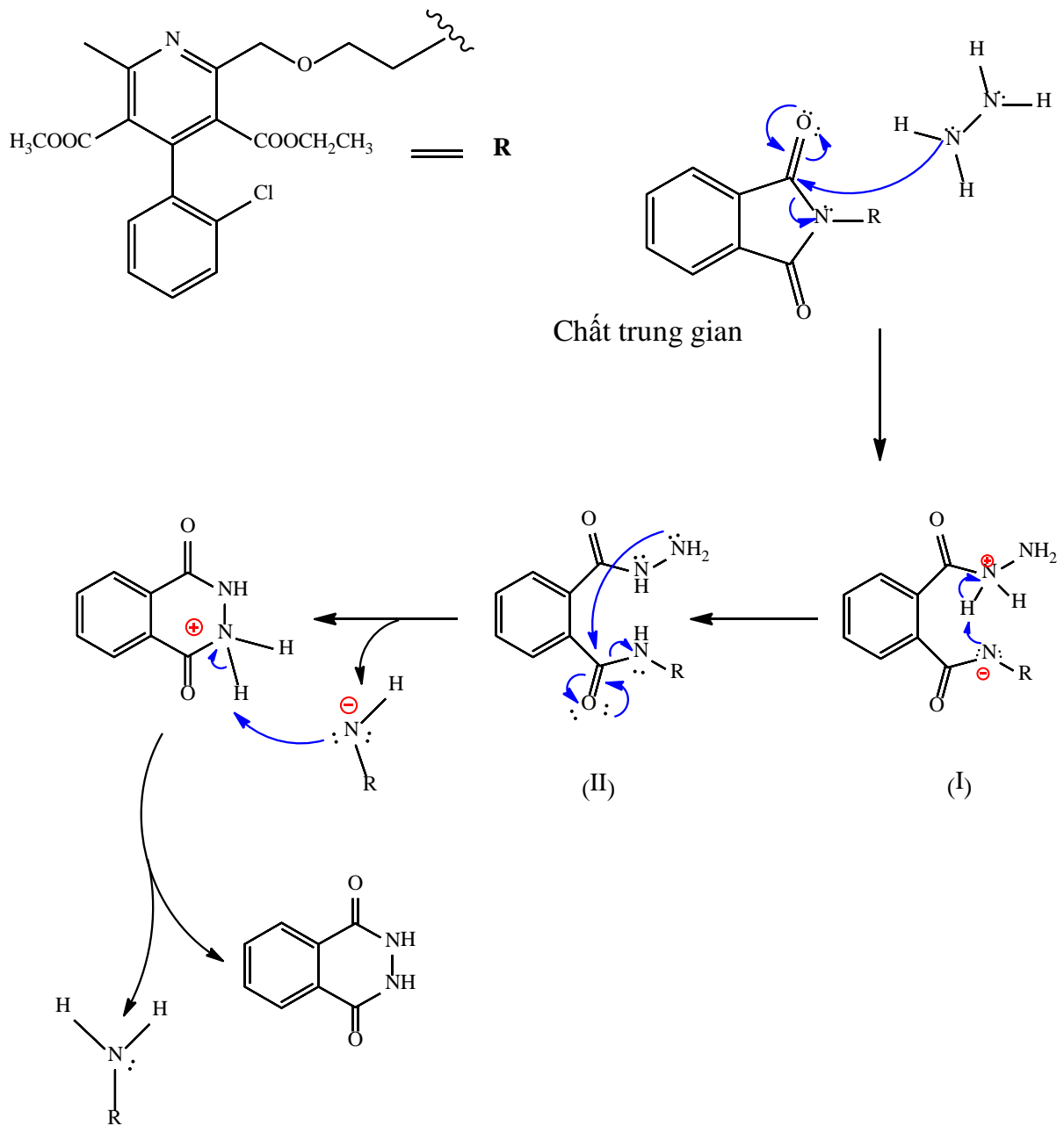


**Hình 4.2.** Cơ chế phản ứng tổng hợp sản phẩm trung gian 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-clorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylat [37], [55], [59].

Hiệu suất phản ứng thay đổi khi tăng hoặc giảm lượng tác nhân oxy hóa và thời gian phản ứng, tuy nhiên sự thay đổi này không nhiều. Khi tăng lượng  $\text{SiO}_2 - \text{HNO}_3$  hơn 0,15 g hiệu suất phản ứng giảm do khi  $\text{HNO}_3$  dư quá nhiều, sản phẩm sau phản ứng phải chiết lắ nhiều lần với dung dịch  $\text{NaHCO}_3$  bão hòa để trung hòa lượng  $\text{HNO}_3$  dư, đồng thời quá trình tinh chế phải lặp lại nhiều lần hơn để thu được sản phẩm tinh khiết. Điều này dẫn đến việc sản phẩm bị hao hụt, làm cho hiệu suất phản ứng giảm. Khi tăng thời gian phản ứng trên 20 phút, hiệu suất phản ứng không

tăng hoặc tăng không đáng kể. Qua khảo sát, tỷ lệ phthaloyl amlodipin và  $\text{SiO}_2\text{-HNO}_3$  thích hợp là (3,58 : 1, kl/kl), thời gian phản ứng thích hợp là 20 đến 30 phút. Tinh chế sản phẩm bằng hỗn hợp acetone - nước (2 : 1). Hiệu suất phản ứng 85%.

Tạp D của amlodipin đã được tổng hợp bằng cách thủy phân sản phẩm trung gian được tổng hợp với xúc tác là methylamin hoặc hydrazin với cơ chế được trình bày ở hình 4.3.



Tạp D amlodipin

**Hình 4.3.** Cơ chế phản ứng tổng hợp tạp D của amlodipin [38], [48].



Tạp D amlodipin được tổng hợp dựa trên phản ứng cộng ái nhân kèm tách loại của dẫn chất phthalimid với hydrazin. Phản ứng bắt đầu bằng quá trình cộng ái nhân của hydrazin với nhóm carbonyl phthalimid tạo chất trung gian (I), tiếp theo 1 proton  $H^+$  trên hydrazin sẽ tách ra và gắn trên N<sup>-</sup> tạo dẫn chất hydrazid (II). Dẫn chất hydrazid sẽ tiếp tục cộng ái nhân với nhóm carbonyl amid và tách loại anion amin, từ đó anion này sẽ nhận 1 proton để tạo sản phẩm amin.

Với xúc tác methylamin, hiệu suất phản ứng khá cao 49%, cách bố trí phản ứng đơn giản, dễ thực hiện. Với xúc tác hydrazin đạt hiệu suất 46,8%, tuy nhiên sau phản ứng, một phần tạp ở dạng rắn nên dễ dàng loại bỏ, vì vậy sản phẩm thu được sau phản ứng ít lẫn tạp, không cần lặp lại quy trình tinh chế nhiều lần. Vì vậy, ưu tiên chọn xúc tác hydrazin.

Tạp chất D của amlodipin là dạng dầu màu vàng nâu và rất dễ bị oxy hóa ngoài không khí do đó rất khó bảo quản sau khi tinh chế. Vì vậy phương pháp tinh chế sản phẩm bằng cách tạo muối với HCl đơn giản, ít tốn thời gian, và có thể áp dụng với lượng sản phẩm lớn.

#### 4.1.4. Tổng hợp và tinh chế tạp A và B của nifedipin

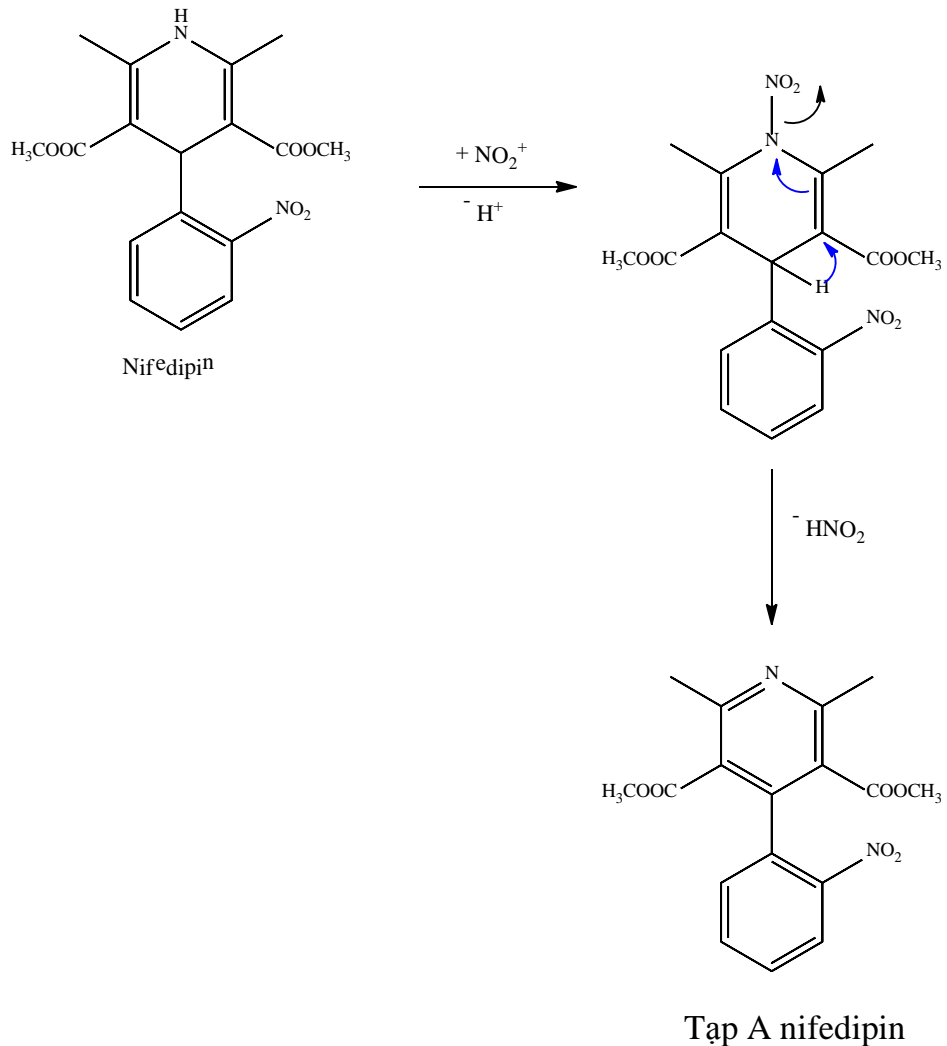
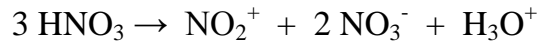
Phương pháp tổng hợp tạp A của nifedipin (dehydronifedipin) trong luận án hiện chưa có công trình công bố trong nước và trên thế giới, chỉ có các công trình nghiên cứu việc oxy hóa vòng 1,4-dihydropyridin của các chất có khung tương tự.

Từ một số nghiên cứu cho thấy tạp A có thể thu được khi oxy hóa nifedipin hoặc chiếu tia UV có bước sóng ngắn.

Để tạo tạp A, oxy hóa nifedipin với tác nhân oxy hóa  $HNO_3$  trên giá mang silica gel đã được sử dụng, phản ứng đơn giản, thực hiện dễ dàng, hiệu suất cao với cơ chế phản ứng được trình bày ở hình 4.4.

Acid nitric đậm đặc được sử dụng với vai trò là tác nhân oxy hóa dihydropyridin thành pyridin. Việc sử dụng acid nitric trên giá mang silica gel có nhiều ưu điểm như đơn giản trong xử lý, điều kiện phản ứng nhẹ, dễ tinh chế sản phẩm và an toàn với môi trường. Phản ứng bắt đầu bằng việc tự ion hóa *in situ* acid nitric tạo ra ion nitronium ( $NO_2^+$ ). Sau đó, tác nhân ái điện tử  $NO_2^+$  phản ứng với di

vòng dihydropyridin của nifedipin để tạo ra chất trung gian *N*-nitrodihydropyridin tương ứng. Quá trình này có sự tách proton  $H^+$  của N-H, theo sau là quá trình tách  $HNO_2$  tạo thành dị vòng thơm pyridin.



**Hình 4.4.** Cơ chế phản ứng tổng hợp tạp A của nifedipin [37], [55], [59].

Trong quá trình tổng hợp tạp A của nifedipin cần chú ý tới lượng  $HNO_3$  cho vào phản ứng và thời gian phản ứng, nên dừng phản ứng sớm để tránh việc tạo quá nhiều tạp gây khó khăn cho quá trình tinh chế. Sau khi tổng hợp tạp A của nifedipin, việc loại bỏ  $HNO_3$  chỉ nên rửa bằng nước cất, không nên rửa bằng nước có tính base vì sẽ gây biến đổi cấu trúc của tạp A, tạo chất có màu đỏ.

Phương pháp tổng hợp tạp B của nifedipin (dehydronitroso nifedipin) đã được công bố trong một số bài báo trên thế giới, tuy nhiên ở Việt Nam hiện vẫn chưa có ai thực hiện đề tài này.

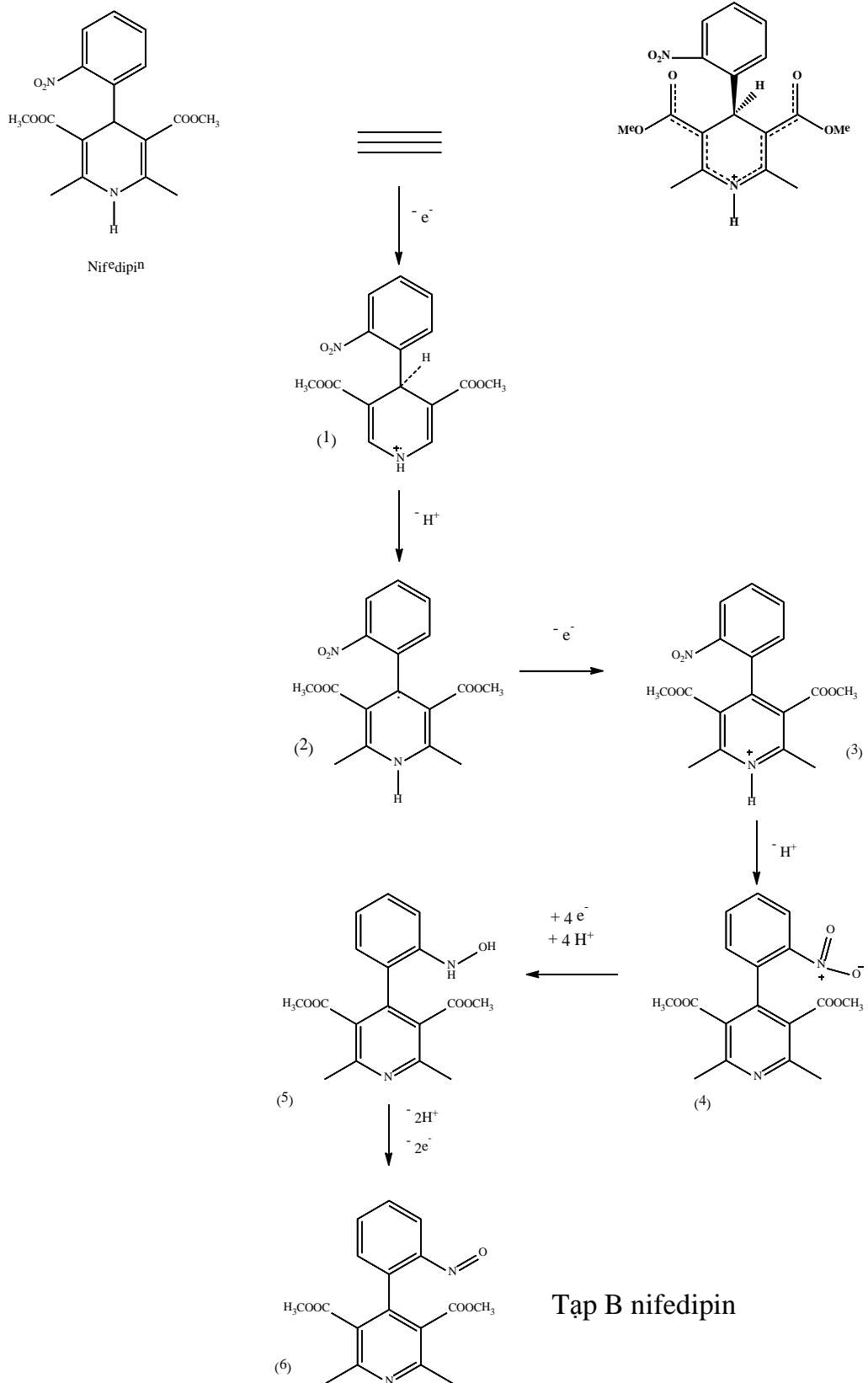
Tạp B thu được khi nifedipin trong dung môi hữu cơ như methanol được chiếu ánh sáng UV<sub>A</sub>, quá trình đơn giản và xảy ra hoàn toàn. Kết quả khảo sát bằng sắc ký lớp mỏng cho thấy với thời gian chiếu sáng trên 12 giờ nifedipin gần như chuyển hoàn toàn thành tạp B. Phản ứng xảy ra dễ dàng với hiệu suất rất cao. Cơ chế phản ứng được trình bày ở hình 4.5.

Tạp B của nifedipin được tổng hợp dựa trên phản ứng quang hóa nifedipin ở vùng tia sáng UV<sub>A</sub> do dị vòng dihydropyridin có khả năng hấp thụ mạnh trong vùng tia sáng này. Phản ứng bắt đầu bằng việc mất một electron của N tạo cấu trúc trung gian (1), theo sau là tách chuyển proton H<sup>+</sup> ở vị trí C-4 để tạo gốc tự do pyridinyl (2) và tiếp tục mất thêm 1 electron tạo thành cation pyridinium thơm (3). Phản ứng kết thúc bằng việc tách proton H<sup>+</sup> tạo dị vòng thơm pyridin. Ngoài ra, cũng có giả thuyết cho rằng từ cấu trúc trung gian (1) sẽ tách gốc tự do H<sup>•</sup> ở vị trí C-4 để tạo radical cation 1,4-dihydropyridin và sau đó tạo thành cation pyridinium thơm (3). Song song đó, nhóm nitro bị khử hóa nhận tạo thành nitroso qua trung gian hydroxylamin.

Các hóa chất sử dụng để tổng hợp tạp A và tạp B của nifedipin từ nguyên liệu nifedipin đều dễ tìm và rẻ tiền. Riêng để tổng hợp tạp B của nifedipin có thể sử dụng đèn UV<sub>A</sub> công suất lớn hơn để có thời gian phản ứng được rút ngắn.

Quá trình tinh chế tạp A bằng sắc ký cột sử dụng hệ dung môi ethylacetat : *n*-hexan (2:8). Tuy thời gian tiến hành sắc ký cột khá dài nhưng khả năng tách để loại tạp rất tốt. Sau đó sản phẩm kết tinh lại trong hỗn hợp acetone – nước được tinh khiết hơn. Tinh chế tạp B bằng sắc ký cột có hiệu suất khá cao. Tuy nhiên cần hết sức thận trọng vì trong công thức có nhóm nitroso gắn vào vòng thơm, nhóm này có đặc điểm rất dễ bị oxy hóa nên cần hạn chế tối đa việc tiếp xúc với oxy không khí cũng như các chất có tính oxy hóa khác. Do đó cần tiến hành loại oxy trong quá trình sắc ký và bay hơi dung môi dưới dòng khí argon. Chỉ tiến hành sắc ký cột mà không

cần tiến hành kết tinh lại, vì việc kết tinh lại và lọc trên phễu có nguy cơ cao phân hủy tạp B.



**Hình 4.5.** Cơ chế phản ứng tổng hợp tạp B của nifedipin [30], [78].

## 4.2. XÁC ĐỊNH ĐỘ TINH KHIẾT CÁC TẠP CHẤT BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC

### 4.2.1. Tạp captopril disulfid

Điều kiện nhiệt độ ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu năng cột khi xác định độ tinh khiết captopril disulfid. Hệ số đối xứng không đạt (pic kéo đuôi) khi nhiệt độ cột thấp hơn 40 °C. Khi tăng nhiệt độ lên 50-60 °C, hệ số đối xứng của pic captopril disulfid được cải thiện và đạt yêu cầu ( $0,8 \leq A_s \leq 1,5$ ). Khi nhiệt độ tăng, độ nhớt pha động giảm nên giảm thời gian rửa giải, dẫn đến chiều rộng pic hẹp. Ngoài ra nhiệt độ cao cũng làm giảm hiện tượng chuyển khối, dẫn đến hiệu năng cột tăng theo phương trình Van Deemter. Tuy nhiên nhiệt độ sắc ký cũng không nên quá cao (> 60 °C) vì có thể làm bay hơi dung môi pha động và có khả năng làm phân hủy mẫu. Trong nghiên cứu này, nhiệt độ cột 50 °C được lựa chọn là phù hợp. Thành phần pha động có ảnh hưởng đến độ phân giải, hệ số đối xứng và thời gian lưu của chất phân tích. Trong đó pha động acetonitril và dung dịch acid phosphoric với pH 2, không cần phải sử dụng dung dịch đệm nên thời gian rửa cột và hệ thống HPLC nhanh, không gây ăn mòn hệ thống do hiện tượng kết tinh muối. Ngoài ra ở pH này, hiệu năng cột sắc ký cũng không bị ảnh hưởng do khả năng thích hợp với pH từ 1–13 của cột Phenomenex Gemini NX C<sub>18</sub>.

Thời gian lưu của pic captopril và captopril disulfid đều dưới 5 phút, đồng thời xuất hiện một pic tạp trong quá trình tổng hợp khoảng 7 phút, có khả năng là một sản phẩm phụ xuất hiện trong quá trình tổng hợp captopril disulfid. Khi tiến hành sắc ký với thời gian đến 60 phút vẫn không thấy xuất hiện pic lạ khác và khi xem sắc ký đồ trong không gian 3 chiều với bước sóng từ 200 – 800 nm đều không phát hiện 1 pic tạp nào khác. Sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết của pic bằng cách so sánh phổ UV-Vis tại thời gian lưu của pic captopril disulfid với phổ UV-Vis tại một điểm bất kỳ trên pic này đều cho thấy có sự tương hợp về phổ đến 99%. Tất cả các đánh giá trên đã chứng tỏ tất cả các thành phần trong sản phẩm tổng hợp sau khi tinh chế đã được rửa giải khi tiến hành sắc ký nên độ tinh khiết của sản phẩm tính theo phương pháp phần trăm diện tích pic đạt trên 99% là tin cậy. Sau đó việc chọn

thời gian sắc ký để xác định độ tinh khiết của sản phẩm sau tinh chế là 10 phút sẽ giúp làm giảm thời gian phân tích, tiết kiệm được dung môi acetonitril.

#### **4.2.2. Tạp 7-ADCA và *D*-phenylglycin**

Kết quả định tính bằng năng suất quay cực riêng đã khẳng định hợp chất tổng hợp phenylglycin là *D*-phenylglycin, tiến hành xác định độ tinh khiết của sản phẩm.

Quy trình xác định độ tinh khiết của các tạp chất tổng hợp được tham khảo theo chuyên luận cefalexin monohydrat của BP 2019 phần tạp chất liên quan. Tuy nhiên có sự thay đổi điều kiện sắc ký cho phù hợp với phòng thí nghiệm như thay đổi chiều dài cột (250 x 4,6 mm) so với BP 2019 (100 x 4,6 mm). Kết quả cho thấy các quy trình này đạt yêu cầu tương thích hệ thống, có độ độ đặc hiệu cao, độ tuyến tính, độ tái lập và độ phục hồi tốt.

Việc xác định độ tinh khiết của *D*-phenylglycin với tốc độ dòng 1 ml/phút và chương trình gradient cùng với bước sóng cài đặt 220 nm, *D*-phenylglycin tách hoàn toàn 7-ADCA và ở bước sóng này 7-ADCA hấp thu rất ít nên diện tích pic không ảnh hưởng đến độ tinh khiết của tạp chất *D*-phenylglycin.

Việc xác định độ tinh khiết của 7-ADCA theo cùng điều kiện sắc ký với *D*-phenylglycin nhưng thay đổi tốc độ dòng 2 ml/phút nhằm mục đích chỉ xác định một hợp chất có độ tinh khiết theo phần trăm diện tích pic vì ở tốc độ dòng này *D*-phenylglycin sẽ bị rửa giải nhanh ra khỏi cột.

#### **4.2.3. Tạp D của amlodipin**

Quy trình xác định độ tinh khiết của tạp chất D của amlodipin được tham khảo điều kiện sắc ký theo chuyên luận amlodipin besylat USP 43 mục tạp chất liên quan với việc thay đổi chiều dài cột (250 x 4,6 mm) so với USP 43 (150 x 3,9 mm). Kết quả điều kiện sắc ký có tính tương thích hệ thống đạt yêu cầu quy định, thời gian lưu của D-amlodipin chỉ khoảng 7 phút. Quy trình thẩm định cho độ đặc hiệu, độ chính xác và độ phục hồi cao.

#### **4.2.4. Tạp A và tạp B của nifedipin**

Quy trình xác định độ tinh khiết hai tạp A và tạp B của nifedipin bằng HPLC - PDA đơn giản, thời gian lưu của pic tạp A từ 5,9 tới 6,2 phút và thời gian lưu của

pic tạp B từ 7,2 cho tới 8 phút, sử dụng hệ dung môi thông dụng acetonitril – nước, không cần thêm đệm hay phải điều chỉnh pH giúp rửa hệ thống sắc ký nhanh và an toàn cho hệ thống, cột sắc ký.

Đối với tạp B của nifedipin, trên sắc ký đồ thường xuất hiện một pic tạp đó là do tạp B bị oxy hóa tạo tạp A khi ở dạng dung dịch, do đó mẫu để định lượng tạp B phải được pha ngay trước khi định lượng.

Trong quá trình thử nghiệm, thời gian tiến hành sắc ký tạp A và tạp B là 60 phút, tuy nhiên trên sắc ký đồ các pic tạp A, tạp B và tạp khác chỉ có thời gian lưu khoảng dưới 10 phút, thời gian từ 10 phút tới 60 phút không phát hiện pic lạ trên sắc ký đồ 2 chiều cũng như 3 chiều, như vậy việc tiến hành sắc ký với thời gian 15 phút là phù hợp, tiết kiệm thời gian và dung môi.

#### **4.3. ĐÁNH GIÁ VÀ THIẾT LẬP TẠP CHẤT ĐỐI CHIẾU**

Trong dược điển Việt Nam V đều có quy định phải kiểm tra các tạp captopril disulfid của captopril, tạp 7-ADCA và *D*-phenylglycin của cephalixin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin trong nguyên liệu và thành phẩm vì đây là các tạp phân hủy được tạo thành khi bảo quản nguyên liệu hay thành phẩm không tốt, tiếp xúc với ánh sáng và tác nhân oxy hóa.

Hiện nay, Cục Quản lý Dược - Bộ Y tế 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, việc kiểm soát các tạp chất liên quan trong nguyên liệu và đặc biệt là trong thành phẩm tương ứng gặp nhiều khó khăn tại Việt Nam vì nhiều lý do như hệ thống kiểm nghiệm quốc gia chưa cung cấp được các tạp này, và việc đặt mua tạp từ nước ngoài thường đắt tiền và thiếu tính chủ động gây khó khăn rất nhiều cho công tác kiểm nghiệm.

Hơn nữa, các công ty trong nước sản xuất thành phẩm captopril, cephalixin, amlodipin và nifedipin khá nhiều, chính vì thế việc thiết lập chất đối chiếu của các tạp này là rất cần thiết và cấp bách.

Kết quả đánh giá và thiết lập chất đối chiếu các tạp này cho thấy đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia với độ tinh khiết sắc ký được xác định là tạp captopril

disulfid (99,32%), tạp 7-ADCA (99,42%), tạp *D*-phenylglycin (99,97%), tạp D của amlodipin (99,62%), tạp A của nifedipin (100%) và tạp B của nifedipin (99,75%) tính theo chế phẩm nguyên trạng.

Hiệu suất tổng hợp các tạp đạt khá cao. Thời gian tổng hợp và tinh chế tương đối ngắn, có thể cung cấp cho các xí nghiệp dược trong nước có nhu cầu, góp phần tăng nguồn tạp chuẩn trong công tác kiểm tra tạp chất liên quan.

#### **4.4. XÂY DỰNG VÀ THẨM ĐỊNH QUI TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG CAPTOPRIL DISULFID TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM CHỨA CAPTORIL BẰNG PHƯƠNG PHÁP HPLC**

Điều kiện sắc ký để xác định độ tinh khiết captopril disulfid cũng chính là điều kiện sắc ký để định lượng tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và chế phẩm captopril. Ngoài ra điều kiện này cũng hoàn toàn phù hợp khi định lượng đồng thời hoạt chất captopril và tạp chất captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm. Điều này rất thuận lợi trong công tác kiểm tra chất lượng chế phẩm này.

Một khó khăn trong công tác kiểm nghiệm tạp chất liên quan là giới hạn cho phép thường rất nhỏ so với dược chất nên để phát hiện được tạp chất liên quan phải chuẩn bị mẫu thử có nồng độ dược chất rất cao (thường từ 1000 ppm trở lên). Điều này đòi hỏi điều kiện sắc ký phải được lựa chọn sao cho độ phân giải giữa pic dược chất và pic tạp chất phải lớn hơn rất nhiều so với giá trị qui định là 1,5. Ngoài ra tải lượng cột sắc ký cũng là một thông số cần lưu ý. 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.

Trong nghiên cứu này với hỗn hợp chuẩn captopril 1000 ppm và captopril disulfid 10 ppm đã không ảnh hưởng đến tải lượng và hiệu năng cột sau 6 lần sắc ký liên tục.

Kết quả thẩm định cho thấy qui trình định lượng tạp chất captopril disulfid đáp ứng đầy đủ yêu cầu của một qui trình kiểm nghiệm tạp chất liên quan trong nguyên liệu và thành phẩm nên có thể được ứng dụng để kiểm tra tạp chất này trong một số nguyên liệu và chế phẩm chứa captopril trên thị trường.



#### 4.5. KIỂM TRA TẠP CHẤT TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM

Tiến hành xác định tạp captopril disulfid trên 2 lô nguyên liệu; 2 chế phẩm ngoại nhập và 4 lô chế phẩm trong nước cho thấy cả 2 lô nguyên liệu và 1 chế phẩm trong nước có kết quả kiểm tra tạp captopril disulfid đạt giới hạn cho phép theo qui định của dược điển Việt Nam V (nguyên liệu:  $\leq 1,0\%$ ; viên nén:  $\leq 3,0\%$ ), trong khi đó 2 chế phẩm ngoại nhập và 3 chế phẩm trong nước đều cao hơn mức cho phép, đặc biệt có 1 chế phẩm ngoại nhập và 1 chế phẩm trong nước có hàm lượng phần trăm captopril disulfid rất cao. Mặc dù mới chỉ là những kết quả ban đầu, nhưng đây là một thông tin cảnh báo cho các nhà bào chế, sản xuất và phân phối lưu ý trong quá trình nghiên cứu xây dựng công thức bào chế, lựa chọn bao bì và điều kiện bảo quản thuốc vì chất này rất dễ bị phân huỷ tạo tạp captopril disulfid.

Kết quả kiểm tra tạp 7-ADCA và *D*-phenylglycin trên 2 lô nguyên liệu cho thấy cả 2 lô nguyên liệu có kết quả kiểm tra tạp 7-ADCA và *D*-phenylglycin đạt yêu cầu theo qui định của dược điển Việt Nam V (7-ADCA  $\leq 1,0\%$  và *D*-phenylglycin  $\leq 1,0\%$ ).

Kết quả kiểm tra tạp D của amlodipin trên 2 lô nguyên liệu và 2 chế phẩm amlodipin cho thấy cả 2 lô nguyên liệu và 2 chế phẩm có kết quả kiểm tra tạp D của amlodipin đạt giới hạn cho phép theo qui định của dược điển Việt Nam V (nguyên liệu:  $\leq 0,3\%$ , viên nén:  $\leq 0,25\%$ ). Trong đó, 2 lô nguyên liệu có hàm lượng tạp D của amlodipin thấp hơn so với 2 chế phẩm.

Kết quả kiểm tra hai tạp A và tạp B của nifedipin trong một số nguyên liệu và chế phẩm chứa nifedipin trên thị trường (2 lô nguyên liệu và 2 lô chế phẩm chứa nifedipin) cho thấy các chế phẩm thường chỉ xuất hiện tạp B (tạp tạo bởi tác động của ánh sáng). Hàm lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong các nguyên liệu và chế phẩm chứa nifedipin đều nằm trong giới hạn cho phép theo qui định của ĐĐVN V (không quá 2,0% đối với tạp A và không quá 0,5% đối với tạp B trên mẫu chế phẩm; không quá 0,1% đối với tạp A và không quá 0,1% đối với tạp B trên mẫu nguyên liệu). Trong quá trình kiểm nghiệm thành phẩm chứa nifedipin, cần lưu ý là

chỉ pha dung dịch thử ngay trước khi kiểm nghiệm vì nếu để lâu kết quả sẽ không chính xác do khi nifedipin ở dạng dung dịch rất dễ tạo thành tạp A và tạp B.

## **4.6. ĐIỂM MỚI CỦA LUẬN ÁN**

### **4.6.1. Về phương pháp tổng hợp**

#### **Tạp captopril disulfid**

Tổng hợp captopril disulfid với tác nhân hydrogen peroxyd được thực hiện thành công, đồng thời các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp cũng được tối ưu hóa bằng mô hình Box-Behnken. Các nội dung này hiện chưa được công bố trong các nghiên cứu trong và ngoài nước.

#### **7-ADCA và D-phenylglycin**

Tổng hợp 7-ADCA và D-phenylglycin bằng cách thủy phân *cephalexin* bằng enzym penicillin G acylase (PGA) trong môi trường nước thu được sản phẩm dễ tinh chế, có độ tinh khiết cao đáp ứng yêu cầu làm chất chuẩn. Sau khi xúc tác phản ứng, có thể tách loại enzym này dễ dàng bằng cách lọc thu hồi và tái sử dụng được nhiều lần, hạn chế ảnh hưởng đến môi trường, là một điểm nổi trội so với việc tổng hợp bằng con đường hóa học, đồng thời cũng làm giảm giá thành của sản phẩm tổng hợp.

#### **Tạp D của amlodipin**

Tổng hợp tạp D của amlodipin từ sản phẩm trung gian phthaloyl amlodipin được lựa chọn để rút ngắn qui trình tổng hợp còn 2 giai đoạn, hạn chế sử dụng các dung môi, hóa chất độc hại, mặt khác các hóa chất này không mua được trong nước, giảm thiểu tạp chất trong sản phẩm tổng hợp, dễ tinh chế.

#### **Tạp A của nifedipin**

Các công trình nghiên cứu nước ngoài chỉ công bố việc oxy hóa vòng 1,4-dihydropyridin của các chất có khung tương tự. Phương pháp tổng hợp tạp A của nifedipin (dehydronifedipin) trong luận án hiện chưa có công trình công bố trong nước và trên thế giới.

#### **4.6.2. Về phương pháp phân tích**

Xây dựng và thẩm định qui trình định lượng captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm captopril bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đạt yêu cầu quy trình phân tích tạp chất, đã được ứng dụng để kiểm tra một số mẫu thử đang lưu hành trên thị trường.

#### **4.6.3. Về thiết lập chất đối chiếu**

Đã thiết lập thành công 6 sản phẩm tổng hợp. Tất cả đều đạt yêu cầu chất đối chiếu quốc gia, bao gồm: captopril disulfid (99,32%), 7-ADCA (99,42%), *D*-phenylglycin (99,97%), tạp D của amlodipin (99,92%), tạp A của nifedipin (99,62%) và tạp B của nifedipin (99,75%) tính theo chế phẩm nguyên trạng.

Các quy trình tổng hợp 6 tạp chất và 6 sản phẩm tổng hợp được từ kết quả nghiên cứu của luận án đã được Hội đồng đánh giá nghiệm thu - Sở Khoa học và Công nghệ Tp.HCM nghiệm thu kết quả vào ngày 23/03/2016. Trong số đó có 3 quy trình và 3 chất đối chiếu tương ứng được Viện Kiểm nghiệm thuốc Tp.HCM đã ứng dụng vào thực tế sản xuất, lưu thông như chất đối chiếu quốc gia là captopril disulfid; tạp A và tạp B của nifedipin.

## KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

### KẾT LUẬN

Đề tài đã hoàn thành các mục tiêu đề ra của luận án, cụ thể như sau:

#### 1. Về qui trình tổng hợp tạp chất

Đã tổng hợp và xác định các điều kiện tổng hợp cho hiệu suất cao đối với các tạp chất captopril disulfid, 7-ADCA, *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin, đồng thời xác định cấu trúc của sản phẩm bằng phương pháp phổ nghiệm (UV, 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:

- ✚ Captopril disulfid với độ tinh khiết 99,45 %, hiệu suất tổng hợp 63,0 %; hiệu suất tinh chế 57,1 %, và hiệu suất toàn qui trình 35,97 %.
- ✚ 7-ADCA với độ tinh khiết 99,90 %, hiệu suất tổng hợp 82,3 %; hiệu suất tinh chế 30,2 %, và hiệu suất toàn qui trình 24,85 %.
- ✚ *D*-phenylglycin với độ tinh khiết 99,94 %, hiệu suất tổng hợp 14,5 %; hiệu suất tinh chế 79,2 %, và hiệu suất toàn qui trình 11,48 %.
- ✚ Tạp D của amlodipin với độ tinh khiết 99,92 %, hiệu suất tổng hợp 42 %; hiệu suất tinh chế 63,2 %, và hiệu suất toàn qui trình 26,54 %.
- ✚ Tạp A của nifedipin với độ tinh khiết 99,56 %, hiệu suất tổng hợp 89,2 %; hiệu suất tinh chế 34,8 %, và hiệu suất toàn qui trình 31,04 %.
- ✚ Tạp B của nifedipin với độ tinh khiết 99,71 %, hiệu suất tổng hợp 95,5 %; hiệu suất tinh chế 76,8 %, và hiệu suất toàn qui trình 73,34 %.

#### 2. Về xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết các tạp chất tổng hợp

Đã xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu qui trình xác định độ tinh khiết của captopril disulfid, 7-ADCA, *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin bằng phương pháp HPLC.

#### 3. Về thiết lập chất đối chiếu các tạp tổng hợp

Đã đánh giá chất lượng các tạp 7-ADCA, *D*-phenylglycin, captopril disulfid, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin bao gồm chỉ tiêu tính chất, điểm

chảy, định tính, hàm ẩm, độ tinh khiết, mức chất lượng của từng chỉ tiêu và phương pháp thử. Tất cả các tạp đã được thiết lập chất đối chiếu, đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia phục vụ cho công tác kiểm nghiệm trong nước, phù hợp với yêu cầu, điều kiện và tình hình kinh tế của Việt Nam.

#### **4. Về xây dựng và thẩm định qui trình định lượng captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm captopril**

Đã xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu qui trình định lượng tạp captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm captopril bằng phương pháp HPLC. Qui trình này có giới hạn phát hiện thấp hơn mức chất lượng cho phép theo DĐVN.

#### **5. Về kiểm nghiệm tạp chất liên quan trong nguyên liệu và thành phẩm**

Các qui trình kiểm nghiệm tạp chất liên quan của cephalixin, amlodipin và nifedipin được khảo sát tính phù hợp hệ thống và đạt yêu cầu theo quy định của dược điển Việt Nam.

Đã ứng dụng các qui trình để kiểm tra tạp chất captopril disulfid, 7-ADCA và *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin trong một số nguyên liệu và thành phẩm tương ứng trên thị trường.

### **KIẾN NGHỊ**

Từ những kết quả thu được, đề tài cần được tiếp tục thực hiện các nội dung sau:

- 1) Sáu tạp chuẩn captopril disulfid, 7-ADCA và *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin được đăng ký chất chuẩn quốc gia.
- 2) Tiếp tục nghiên cứu độ ổn định của các tạp chất đối chiếu trên nhằm cải tiến qui trình tổng hợp, tinh chế đã xây dựng.
- 3) Ứng dụng qui trình kiểm tra tạp captopril disulfid, 7-ADCA, *D*-phenylglycin, tạp D của amlodipin, tạp A và tạp B của nifedipin trên các mẫu nguyên liệu và thành phẩm tương ứng khác đang lưu hành trên thị trường.
- 4) Tăng cường kiểm tra, kiểm soát chất lượng thuốc, nguyên liệu lưu hành trên thị trường đối với chỉ tiêu giới hạn các tạp chất để đảm bảo chất lượng thuốc theo đúng các tiêu chuẩn đã đăng ký.

- 5) Tiếp tục đầu tư trang thiết bị, cơ sở vật chất phục vụ cho công tác điều chế, chuẩn hóa các chất sử dụng làm chất chuẩn, đặc biệt là các tạp chuẩn để phục vụ nhu cầu sử dụng trong nước, hạn chế nhập khẩu từ nước ngoài.

## DANH MỤC CÔNG TRÌNH NGHIÊN CỨU LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Tran Van Muoi, Tran Linh Phuong, Ha Dieu Ly, Nguyen Duc Tuan, Dang Van Tinh (2013), "Synthesis of 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)methyl]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridine-3,5-dicarboxylat as amlodipin impurity D", *The Eighth Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences, Ho Chi Minh City, Vietnam*, 4-5, 531-534.
2. Trần Văn Mười, Mai Kim Cường, Nguyễn Đức Tuấn, Đặng Văn Tịnh (2015), "Tổng hợp và xác định độ tinh khiết quang hoạt của D- $\alpha$ -phenylglycin", *Tạp chí Y học TP.HCM*, tập 19, phụ bản số 3, 459-465.
3. Lữ Thiện Phúc, Trần Văn Mười, Nguyễn Tấn Đạt, Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ, Đặng Văn Tịnh, Nguyễn Đức Tuấn (2015), "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*, số 466, 18-23.
4. Trần Văn Mười, Nguyễn Xuân Thanh, Văn Kim Thành, Nguyễn Đức Tuấn (2016), "Tổng hợp và xác định độ tinh khiết của dehydronifedipin (tạp A) và dehydroso nifedipin (tạp B) của nifedipin", *Tạp chí Y học Tp.HCM*, phụ bản tập 20, số 2, 170-176.
5. Trần Văn Mười, Nguyễn Xuân Thanh, Văn Kim Thành, Nguyễn Đức Tuấn (2016), "Thiết lập chất đối chiếu dehydronifedipin (tạp A) và dehydroso nifedipin (tạp B) và ứng dụng quy trình HPLC kiểm tra tạp A và tạp B chế phẩm nifedipin", *Tạp chí Dược học*, số 4, 56-60.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### TIẾNG VIỆT

- [1] Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 74-76, 185-188, 250-254, 678-681.
- [2] Phan Đình Châu, Nguyễn Thị Ngân Hà, Đặng Thị Huyền Trang, Phan Thị Phương Dung (2008), “Nghiên cứu điều chế D-phenylglycin làm nguyên liệu cho việc bán tổng hợp một số thuốc kháng sinh nhóm  $\beta$ -lactam”, *Tạp chí Hóa học*, 46 (4), 416 – 420.
- [3] Đoàn Phụng Chính, Trương Văn Đạt, Trần Thành Đạo, Hà Diệu Ly, Lê Minh Trí (2016), "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*, 478, 34-39.
- [4] Nguyễn Tấn Đạt, Nguyễn Minh Đức, Nguyễn Thị Ngọc Vân (2019), “Tổng hợp và thiết lập chuẩn đối chiếu tạp chất A của diclofenac”, *Tạp chí Dược học*, 516, 76-79.
- [5] Nguyễn Tấn Đạt, Nguyễn Thị Ngọc Vân (2019), “Định lượng đồng thời diclofenac và tạp A trong chế phẩm bằng phương pháp HPLC-DAD”, *Tạp chí Dược học*, 519, 20-24.
- [6] Nguyễn Phước Định, Hà Diệu Ly, Nguyễn Đức Tuấn (2016), “Thiết lập chất đối chiếu [2-[2-flouro-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 Tp.HCM*, phụ bản tập 20, 164-169.
- [7] Mạch Khắc Duy, Nguyễn Đức Tuấn (2016), “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*, 478, 40-45.



- [8] Lê Thanh Long, Nguyễn Trần Vân Anh, Chương Ngọc Nãi, Hoàng Đình Hữu Hạnh, Nguyễn Đức Tuấn (2017), “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*, 495, 60-62, 80.
- [9] Hà Diệu Ly (2014), "Tổng hợp 2-methyl-4-nitroimidazol, tạp chất A của metronidazol làm chất đối chiếu", *Tạp chí Dược học*, 464, 34-37.
- [10] Võ Thị Hằng Nga, Huỳnh Phương Nguyên, Trương Ngọc Tuyền, Nguyễn Đức Tuấn (2019), “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*, 515, 47-53.
- [11] Nguyễn Bình Nguyên, Đào Thị Kim Oanh, Nguyễn Hải Nam (2017), “Bước đầu nghiên cứu tổng hợp và thiết lập tạp chuẩn captopril disulfid”, *Tạp chí Dược học*, 491, 41-47.
- [12] Trần Lê Hoàng Sơn, Lê Minh Trí, Trần Thành Đạo, Hà Diệu Ly (2012), “Điều chế và thiết lập chất chuẩn 2-amino-1-(4-nitrophenyl) propan-1,3-diol dùng trong kiểm nghiệm các chế phẩm cloramphenicol”, *Tạp chí Dược học*, 434, 44-49.
- [13] Nguyễn Việt Tân, Nguyễn Văn Tân Minh, Trương Ngọc Tuyền, Nguyễn Đức Tuấn (2017), “Tổng hợp và tiêu chuẩn hóa tạp chất L-cystin và N,N'-diacetyl-L-cystin của N-acetylcystein”, *Tạp chí Dược học*, 495, 35-40.
- [14] Nguyễn Thị Kim Thanh, Cao Ngọc Anh, Lê Quang Thảo, Mai Thanh Hà (2007), "Nghiên cứu tạo tạp chất nifedipin nitrophenylpyridin analog (tạp A) và nifedipin nitrosophenylpyridin analog (tạp B) để kiểm tra sự phù hợp của hệ thống sắc ký và xác định tạp chất trong nguyên liệu nifedipin bằng phương pháp HPLC", *Tạp chí Kiểm Nghiệm Thuốc*, 13-18.
- [15] Phan Xuân Thương, Trần Thành Đạo, Hà Diệu Ly, Lê Minh Trí (2014), “Tổng hợp tạp chuẩn D của amlodipin từ amlodipin besylat”, *Tạp chí Dược học*, 457, 53-56.

- [16] Đỗ Thị Thanh Thủy, Diêm Thị Mến Huyền, Nguyễn Hải Nam, Đoàn Cao Sơn (2019), “Tổng hợp tạp chất C của terazosin dùng trong kiểm nghiệm”, *Tạp chí Dược học*, 514, 51-54.
- [17] Nguyễn Thị Thanh Trà, Hà Diệu Ly, Nguyễn Hữu Lạc Thủy, Trần Thành Đạo (2018), “Tổng hợp 1-(2,6-diclorophenyl)-1,3-dihydro-2H-indol-2-on (tạp chất A) của diclophenac natri để làm chất đối chiếu”, *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh*, 22 (1), 521-527.
- [18] Trương Trần Trang, Trần Quốc Phú, Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ, Nguyễn Đức Tuấn (2018), “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*, 501, 45-49.

#### TIẾNG NƯỚC NGOÀI

- [19] Ali S. L., Florey K. (1989), "*Analytical profiles of drug substances nifedipine*", Academic Press, New York, (18) pp. 221 -268.
- [20] Alonso F. O. M., Oestreicher E. G., Antunes O. A. C. (2008), “Production of enantiomer pure *D*-phenylglycine using *Pseudomonas aeruginosa* 10145 as biocatalyst”, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, 25 (1), 1-8.
- [21] Al-Turk W. A., Ibraheem A. Majeed, Wallace J. Murray, David W. Newton, Sadeq Othman (1988), "Some factors affecting the photodecomposition of nifedipine", *International Journal of Pharmaceutics*, 41 (3), 227-230.
- [22] Badi S. S., Tuwar S. M. (2013), "Kinetics and mechanism of oxidation of captopril by hexacyanoferrate (III) in aqueous acidic medium", *Journal of Solution Chemistry*, 42 (7), 1518-1531.
- [23] Bovenberg Roelof Ary Lans, Koekman Bertus Pieter (1998), “Process for the production of 7-ADCA via expandase activity on Penicillin G”, *United States patent*, (5), 1-4.
- [24] Bristish Pharmacopoeia (2019), pp. I-156-I-157, I-417-I-418, I-454-I-455, II-397-II-398, III-146-III-147, III-275, III-293-III-294, III-1004.

- [25] Casy A. F., Dewar G. H. (1994), "Captopril and its probable contaminants: NMR and MS features of analytical value", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 12 (7), 855-861.
- [26] Committee on Asean reference Substances (2005), *Guidelines for the establishment, handling, storage and use of Asean reference substances*, Thailand, pp. 2-12.
- [27] Committee on Asean reference Substances (2009), *SOP for the production of Asean reference substances*, Thailand, pp. 1-6.
- [28] Coppi Laura., Campon Pardo J., Gasanz Guillen Y. (2003), "Intermediate for the synthesis of amlodipine, a process for the preparation thereof and corresponding use", *United States Patent*, US 6603006 B2.
- [29] Dayong Luo, Scott W. Smith, Bradley D. Anderson (2005), "Kinetics and mechanism of the reaction of cystein and hydrogen peroxide in aqueous solution", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94 (2), 304-316.
- [30] Elisa Fasani, Angelo Albini, Mariella Mella (2008), "Photochemistry of Hantzsch 1,4-dihydropyridines and pyridines", *Tetrahedron*, 64, 3190-3196.
- [31] Erarslan Altan (1993), "The hydrolysis of cephalosporin G by immobilized penicillin G acylsse from a mutant of *Escherichia coli* ATCC 11105", *Process Biochemistry*, 28 (5), 311-318.
- [32] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (2012), *Detailed view of Captopril disulfide ICRS*, pp. 198-216.
- [33] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (2009), *Safety Data Sheet N0750010*, No. 6, pp. 1-4.
- [34] European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare (2008), *Safety data sheet N0750015*, No. 5, pp. 1-3.
- [35] European pharmacopoeia 9.0 (2018), pp. 1710-1712, 1940-1942, 1972-1974, 3151-3152.
- [36] Fatemeh Tamaddon, Zahra Razmi (2011), "Oxidation of 1,4-Dihydropyridines and 3,4-Dihydropyrimidin-2(1H)-ones to substituted

- pyridines and pyrimidinones using  $\text{Ca}(\text{OCl})_2$  in aqueous media", *Synthetic Communications*, 41, 485-492
- [37] Ghorbani-Choghamarani A., Mohsen Nikoorazm, Hamid Goudarz Iafshar, Lotfi Shi Ri, Zahra Chenan (2009), "Oxidation of Hantzsch 1, 4-dihydropyridines using supported nitric acid on silica gel and poly vinyl pyrrolidone (PVP) under mild and heterogeneous conditions", *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 30 (4), 972-974.
- [38] Gibson M. S., Bradshaw R. W. (1968), "The Gabriel synthesis of primary amines", *Angew. Chem. internat.*, 7 (12), 919-930.
- [39] Hà Diệu Ly, Trần Thành Đạo, Lê Minh Trí (2017), "Synthesis and establishment of Amlodipine impurity G reference standard", *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(10), 105-110.
- [40] ICH Harmonised tripartite guideline (2005), Validation of analytical procedures: text and methodology, pp. 1-13.
- [41] International Organisation for Standardization (2015), ISO/Guide 30:2015 - Reference materials — Selected terms and definitions, pp. 1-8.
- [42] ISO 13528 (2005), Statistical method for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons, pp. 6-20.
- [43] ISO guide 35 (2006), Reference material – General and statistical principles for certification, pp. 38-44.
- [44] Janssen H. A., Michiel Sheldon R. A. (2006), "Properties of immobilised penicillin G acylase in lactam antibiotic synthesis", *Rotterdam Europrt*, Nertherlands, 18-19, 31-32
- [45] Jinun B. Yeh, Lain-Tze Lee (1994), "Method for the preparation of delta 3-7-substituted amino deacetoxy cephalosporanic acid", *United States patent* (5), 302-713.
- [46] Julia Aparecida L. Souza (2012), "Quantification of captopril disulfide as a degradation product in captopril tablets using near infrared spectroscopy and chemometrics", *Vibrational Spectroscopy*, 62, 35– 41.

- [47] Kim Seok-Chan, Choi Kwan-Min, Cheong Chan-Seong (2002), "Synthesis of amlodipine using aza Diels-Alder reaction", *Bull. Korean Chem. Soc.*, 23 (1), 143-144.
- [48] Laszlo Kurti, Barbara Czako (2005), "Gabriel synthesis", *Strategic applications of named reactions in organic synthesis*, pp. 182-183.
- [49] Lee T.-Y., Notari R. E. (1987), "Kinetics and mechanism of captopril oxidation in aqueous solution under controlled oxygen partial pressure", *Pharmaceutical Research*, 4 (2), 98-103.
- [50] LGC (2013), Certificate of reference substance "3-ethyl 5-methyl 2-[(2-aminoethoxy)-methyl]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridine-3,5-dicarboxylate".
- [51] Li Hui, Xuejun Cao (2011), "Bioconversion of cephalosporin-G to 7-ADCA in a pH-thermo sensitive recycling aqueous two-phase systems", *Process Biochemistry*, 46 (9), 1753-1758.
- [52] Machado George D. C., Marlito Gomes Jr., Antunes O. A. C., Enrique G. Oestreicher (2005), "Enzymic resolution of D1-phenylglycine", *Process Biochemistry*, (40), 3186-3189.
- [53] Mahmoud W. M., Kümmerer K. (2012), "Captopril and its dimer captopril disulfide: Photodegradation, aerobic biodegradation and identification of transformation products by HPLC-UV and LC-ion trap-MSn", *Chemosphere*, 88 (10), 1170-1177.
- [54] Mohamed E. Hassan (2016), "Production, immobilization and industrial uses of penicillin G acylase", *Int J Cur Res Rev.*, 8 (15), 11-22.
- [55] Mohammad Ali Zolfigol, Kamal Amani, Arash Ghorbani-Choghamarani, Maryam Hajjami, Roia Ayazi-Nasrabadi, Shila Jafari (2008), "Chemo and homoselective catalytic oxidation of sulfides to sulfoxides with supported nitric acid on silica gel and poly vinyl pyrrolidone (PVP) catalyzed by KBr and/ or NaBr", *Catalysis Communications*, 9, 1739-1744.

- [56]Mojtaba Shamsipur, Bahram Hemmateenejad, Morteza Akhond, Katayoun Javidnia, Ramin Miri (2013), "A study of the photo-degradation kinetics of nifedipine by multivariate curve resolution analysis", *J. Pharm. Biomed*, 31, 1013-1019.
- [57]Nafisur Rahman, Nishat Anwar (2006), "A sensitive kinetic spectrophotometric method for the determination of captopril in bulk and dosage forms", *Acta Pharmaceutica*, 56, 347 – 357.
- [58]Nagarajan R., Anthonyraj, Muralidharan, Saikumar (2006), "A convenient method for the oxidation of Hantzsch 1,4-dihydropyridines with N-bromo succinimide", *Indian Journal of Chemistry*, 45B, 826-828.
- [59]Nikoorazm M. (2013), "A new method for the oxidation of 1, 4-dihydropyridine derivatives by guanidinium nitrate in the presence of silica sulfuric acid under mild, heterogeneous and metal-free conditions", *Scientia Iranica C.*, 20 (3), 603-606.
- [60]Nishikawa T., Reiko Abe, Yumiko Sudo, Asako Yamada, Kayoko Tahara (2004), "HPLC profile of captopril disulfide that undergoes reversible cis-trans conversion among three isomers", *Analytical Sciences*, 20 (10), 1395-1398.
- [61]Nogueira R., Wagner Wollinger, Thaís Elias da Silva, *et al.* (2011), "Validation of a liquid chromatographic method for determination of related substances in a candidate certified reference material of captopril", *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 47 (2), 351-362.
- [62]Paul S., Shivani Sharma, Monika Gupta, Deepak Choudhary, Rajive Gupta (2007), "Oxidative aromatization of Hantzsch 1, 4-Dihydropyridines by SiO<sub>2</sub>/P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SeO<sub>2</sub> under mild and heterogeneous conditions", *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 28 (2), 336-338.
- [63]Satoshi Ogawa, Yuichi Itagaki, Nobumasa Hayase, *et al.* (1990), "Photostability nifedipine in powder, obtained by crushing tablet, granule or fine-granule", *Japanese Journal of Hospital Pharmacy*, 16 (3), 189-197.

- [64] Schaefer J., Tam Y. (1998), "Ferrous sulphate interacts with captopril", *British Journal of Clinical Pharmacology*, 46 (4), 377-381.
- [65] Schreiber Fred G. (1992), "Process for preparing cephalexin monohydrate" *United States Patent*, 5142043.
- [66] Schroën C. G. P. H., Mohy Eldin M. S., Janssen A. E. M., Mita G. D., Tramper J. (2001), "Cephalexin synthesis by immobilised penicillin G acylase under non-thermal conditions", *Journal of Molecular Catalysis B*, (15), 163-172.
- [67] Sigma Aldrich (2010), *7-ADCA safety data sheet*, pp. 1-5.
- [68] Sigma Aldrich (2010), *D-phenylglycin safety data sheet*, pp. 1-4.
- [69] Singh D., Antonio Luiz Braga, Oscar E. Dorneles Rodrigues (2010), "Metal-free air oxidation of thiols in recyclable ionic liquid: A simple and efficient method for the synthesis of disulfides", *European Journal of Organic Chemistry*, 2010 (14), 2661-2665.
- [70] Souza J. A. L., Miracy Muniz Albuquerque, Severino Grangeiro Jr, Maria Fernanda Pimentel, Davi Pereirade Santana, Simone S. Simões (2012), "Quantification of captopril disulphide as a degradation product in captopril tablets using near infrared spectroscopy and chemometrics", *Vibrational Spectroscopy*, 62, 35-41.
- [71] Stulzer H. K., Silva M. A. S. (2007), "Estudo de estabilidade de grânulos revestidos e comprimidos contendo Captopril", *Acta Farmacêutica Bonaerense*, 25 (4), 497-504.
- [72] Sudhakar P., M. Nirmala, J. Moses Babu, *et al.* (2006), "Identification and characterization of potential impurities of amlodipin maleate", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40 (3), 605-613.
- [73] Torreggiani A., Paola Taddeia, M. Raffaella Tosib (2001), "A spectroscopic investigation of captopril and the Cu (II)-captopril system", *Journal of Molecular Structure*, 565, 347-352.

- [74] United States Pharmacopoeia 43 (2020), pp. 285-287, 733-737, 896-899, 3160-3163.
- [75] Verweij Jan, Tan Hong Sheng, kooreman Hermanus Jacobus (1977), "Preparation of 7-substituted amino-desacetoxycephalosporanic acid compounds", *United States Patent*, 4 (3), 894.
- [76] Vries H. D., Henegouwen G. M. (1995), "Photodegradation of nifedipine under in vivo-related circumstances", *Photochemistry and Photobiology*, 62 (6), 959-963.
- [77] World Health Organization (2006), "General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substances", *WHO Technical Report Series*, 943(3), pp. 62-63, 70.
- [78] Yutao Sang, Baoyan Wang, Qinchao Wang, George Zhao, Peizhi Guo (2014), "Insights into the electrocatalysis of nitrobenzene using chemically-modified carbon nanotube electrodes", *Scientific Reports*, 4 : 6321, 1-6.
- [79] Yuya Horinouchi, Koichiro Tsuchiya, Chiaki Taoka, *et al.* (2011), "Antioxidant effects of photodegradation product of nifedipine", *Chem. Pharm. Bull.*, 59(2), 208-214.

## **TRANG WEB**

- [80] Danh mục chuẩn đối chiếu Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. HCM. Available at <<http://www.idqc-hcm.gov.vn/dich-vu/cac-danh-muc-chat-doi-chieu/chat-chuan-doi-chieu.html>>. Ngày truy cập 28/08/2020.
- [81] Danh mục chuẩn đối chiếu Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Available at <<https://nidqc.org.vn/danh-muc-chat-chuan-vien-kiem-nghiem-thuoc-trung-uong>>. Ngày truy cập 28/08/2020.



## DANH MỤC PHỤ LỤC

	<b>Trang</b>
<b>Phụ lục 1. Captopril disulfid .....</b>	<b>PL-1</b>
<b>Phụ lục 1.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng sắt (III) clorid hexahydrat .....</b>	<b>PL-1</b>
<b>Phụ lục 1.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng iod.....</b>	<b>PL-4</b>
<b>Phụ lục 1.3. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng kali permanganat .....</b>	<b>PL-6</b>
<b>Phụ lục 1.4. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng kali dicromat.....</b>	<b>PL-9</b>
<b>Phụ lục 1.5. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng kali dicromat và EDTA .....</b>	<b>PL-12</b>
<b>Phụ lục 1.6. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng hydrogen peroxyd.....</b>	<b>PL-13</b>
<b>Phụ lục 1.7. Phổ UV-Vis của captopril disulfid.....</b>	<b>PL-19</b>
<b>Phụ lục 1.8. Phổ IR của captopril disulfid tổng hợp .....</b>	<b>PL-19</b>
<b>Phụ lục 1.9. Phổ MS của captopril disulfid.....</b>	<b>PL-20</b>
<b>Phụ lục 1.10. Phổ <sup>13</sup>C-NMR của captopril disulfid.....</b>	<b>PL-20</b>
<b>Phụ lục 1.11. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của captopril disulfid.....</b>	<b>PL-21</b>
<b>Phụ lục 1.12. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết captopril disulfid .....</b>	<b>PL-22</b>
<b>Phụ lục 1.13. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của qui trình xác định độ tinh khiết captopril disulfid .....</b>	<b>PL-23</b>
<b>Phụ lục 1.14. Kết quả khảo sát độ lặp lại của qui trình xác định độ tinh khiết captopril disulfid.....</b>	<b>PL-24</b>
<b>Phụ lục 1.15. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của qui trình xác định độ tinh khiết captopril disulfid .....</b>	<b>PL-25</b>
<b>Phụ lục 1.16. Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ</b>	

captopril disulfid.....	PL-27
<b>Phụ lục 1.17.</b> Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ captopril disulfid liên phòng thí nghiệm.....	PL-28
<b>Phụ lục 1.18.</b> Kết quả xác định giá trị ấn định hàm lượng captopril disulfid ....	PL-29
<b>Phụ lục 1.19.</b> Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử giả lập của qui trình định lượng tạp chất captopril disulfid.....	PL-30
<b>Phụ lục 1.20.</b> Sắc ký đồ các mẫu phân tích khi thẩm định tính đặc hiệu phương pháp định lượng tạp captopril disulfid trong nguyên liệu và chế phẩm.....	PL-32
<b>Phụ lục 1.21.</b> Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của qui trình định lượng captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm.....	PL-34
<b>Phụ lục 1.22.</b> Kết quả khảo sát độ chính xác của qui trình định lượng tạp chất captopril disulfid trên mẫu thử và mẫu giả lập.....	PL-36
<b>Phụ lục 1.23.</b> Kết quả khảo sát độ đúng của qui trình định lượng tạp captopril disulfid trong mẫu nguyên liệu captopril được thêm vào chuẩn captopril disulfid.....	PL-38
<b>Phụ lục 1.24.</b> Kết quả khảo sát độ đúng của qui trình định lượng tạp captopril disulfid trong mẫu giả được thêm nguyên liệu captopril và chuẩn captopril disulfid .....	PL-39
<b>Phụ lục 2. 7-ADCA và D-phenylglycin.....</b>	PL-40
<b>Phụ lục 2.1.</b> Kết quả xác định độ tinh khiết của chất rắn A2 .....	PL-40
<b>Phụ lục 2.2.</b> Phổ IR chất A (D-phenylglycin) .....	PL-41
<b>Phụ lục 2.3.</b> Phổ MS chất A (D-phenylglycin) .....	PL-41
<b>Phụ lục 2.4.</b> Phổ <sup>1</sup> H-NMR chất A (D-phenylglycin) .....	PL-42
<b>Phụ lục 2.5.</b> Phổ <sup>13</sup> C NMR chất A (D-phenylglycin) .....	PL-43
<b>Phụ lục 2.6.</b> Phổ IR chất B (7-ADCA).....	PL-44
<b>Phụ lục 2.7.</b> Phổ MS chất B (7-ADCA).....	PL-44

<b>Phụ lục 2.8.</b> Phổ $^1\text{H}$ NMR chất B (7-ADCA) .....	PL-45
<b>Phụ lục 2.9.</b> Phổ $^{13}\text{C}$ NMR chất B (7-ADCA) .....	PL-46
<b>Phụ lục 2.10.</b> Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết tạp <i>D</i> -phenylglycin.....	PL-47
<b>Phụ lục 2.11.</b> Kết quả khảo sát miền giá trị của qui trình xác định độ tinh khiết tạp <i>D</i> -phenylglycin .....	PL-48
<b>Phụ lục 2.12.</b> Kết quả khảo sát độ chính xác của qui trình xác định độ tinh khiết tạp <i>D</i> -phenylglycin .....	PL-49
<b>Phụ lục 2.13.</b> Kết quả khảo sát độ đúng của qui trình xác định độ tinh khiết tạp <i>D</i> -phenylglycin .....	PL-50
<b>Phụ lục 2.14.</b> Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ tạp <i>D</i> -phenylglycin .....	PL-51
<b>Phụ lục 2.15.</b> Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ tạp <i>D</i> -phenylglycin liên phòng thí nghiệm.....	PL-52
<b>Phụ lục 2.16.</b> Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA .....	PL-53
<b>Phụ lục 2.17.</b> Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của qui trình xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA .....	PL-54
<b>Phụ lục 2.18.</b> Kết quả khảo sát độ chính xác của qui trình xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA.....	PL-55
<b>Phụ lục 2.19.</b> Kết quả khảo sát độ đúng của qui trình xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA.....	PL-56
<b>Phụ lục 2.20.</b> Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ tạp 7-ADCA .....	PL-56
<b>Phụ lục 2.21.</b> Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ tạp 7-ADCA liên phòng thí nghiệm.....	PL-57
<b>Phụ lục 2.22.</b> Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch đối chiếu (5) (n=6) của qui trình định lượng tạp chất 7-ADCA và <i>D</i> -phenylglycin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa cephalixin .....	PL-58

<b>Phụ lục 2.23.</b> Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch đối chiều (3) (n=6) của qui trình định lượng tạp chất 7-ADCA và <i>D</i> -phenylglycin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa cephalexin .....	PL-58
<b>Phụ lục 2.24.</b> Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch đối chiều (4) (n=6) của qui trình định lượng tạp chất 7-ADCA và <i>D</i> -phenylglycin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa cephalexin .....	PL-59
<b>Phụ lục 3. Tạp D của amlodipin</b> .....	PL-60
<b>Phụ lục 3.1.</b> Phổ IR của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)] -4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (2).....	PL-60
<b>Phụ lục 3.2.</b> Phổ IR của phthaloyl amlodipin (1) .....	PL-61
<b>Phụ lục 3.3.</b> Phổ MS của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)] -4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (2).....	PL-62
<b>Phụ lục 3.4.</b> Phổ <sup>1</sup> H-NMR của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)] -4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (2).....	PL-63
<b>Phụ lục 3.5.</b> Phổ <sup>1</sup> H-NMR mở rộng của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5- dicarboxylate (2).....	PL-64
<b>Phụ lục 3.6.</b> Phổ IR của kết tinh D của amlodipin .....	PL-65
<b>Phụ lục 3.7.</b> Phổ IR của tạp D amlodipin chuẩn từ LGC .....	PL-66
<b>Phụ lục 3.8.</b> Sắc ký đồ và phổ MS của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(amino)ethoxy)] -4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (3) .....	PL-67
<b>Phụ lục 3.9.</b> Phổ MS của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(amino)ethoxy)] -4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (3).....	PL-68
<b>Phụ lục 3.10.</b> Phổ <sup>1</sup> H-NMR của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(amino)ethoxy)] -4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (3).....	PL-69
<b>Phụ lục 3.11.</b> Phổ <sup>1</sup> H-NMR mở rộng của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(amino)ethoxy)] -4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (3) (7,10 – 7,45 ppm) .....	PL-70

<b>Phụ lục 3.12.</b> Phổ <sup>1</sup> H-NMR mở rộng của 3-ethyl 5-methyl 2- [(2-(aminoethoxy))-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5- dicarboxylate (3) (3,3, - 5,0 ppm) .....	PL-71
<b>Phụ lục 3.13.</b> Phổ <sup>1</sup> H-NMR mở rộng của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(amino) ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (3) (0,8 – 3,0 ppm) .....	PL-72
<b>Phụ lục 3.14.</b> Phổ <sup>1</sup> H-NMR của tạp D amlodipin chuẩn từ LGC .....	PL-73
<b>Phụ lục 3.15.</b> Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin (n=6) .....	PL-74
<b>Phụ lục 3.16.</b> Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin .....	PL-74
<b>Phụ lục 3.17.</b> Kết quả khảo sát tính tuyến tính của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin .....	PL-75
<b>Phụ lục 3.18.</b> Kết quả khảo sát độ lặp lại (n=6) của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin .....	PL-77
<b>Phụ lục 3.19.</b> Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian ở ngày thứ 2 (n=6) của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin .....	PL-77
<b>Phụ lục 3.20.</b> Kết quả khảo sát độ đúng của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin .....	PL-78
<b>Phụ lục 3.21.</b> Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ tạp D của amlodipin .....	PL-79
<b>Phụ lục 3.22.</b> Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ tạp D của amlodipin liên phòng thí nghiệm.....	PL-80
<b>Phụ lục 3.23.</b> Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch phân giải (n=6) của qui trình định lượng tạp D của amlodipin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa amlodipin.....	PL-81
<b>Phụ lục 3.24.</b> Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch chuẩn tạp D-amlodipin 3 ppm (n=6) của qui trình định lượng tạp D của amlodipin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa amlodipin.....	PL-81

<b>Phụ lục 4. Tạp A và tạp B của nifedipin .....</b>	<b>PL-82</b>
<b>Phụ lục 4.1. Phổ UV-Vis tạp A của nifedipin.....</b>	<b>PL-82</b>
<b>Phụ lục 4.2. Phổ IR tạp A của nifedipin.....</b>	<b>PL-83</b>
<b>Phụ lục 4.3. Phổ MS của sản phẩm tổng hợp tạp A của nifedipin.....</b>	<b>PL-85</b>
<b>Phụ lục 4.4. Phổ <sup>13</sup>C-NMR của sản phẩm tổng hợp tạp A của nifedipin.....</b>	<b>PL-86</b>
<b>Phụ lục 4.5. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của sản phẩm tổng hợp tạp A của nifedipin.....</b>	<b>PL-87</b>
<b>Phụ lục 4.6. Phổ <sup>13</sup>C-NMR của sản phẩm tổng hợp tạp A của nifedipin (a) so với chuẩn tạp A của nifedipin (b) .....</b>	<b>PL-87</b>
<b>Phụ lục 4.7. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của sản phẩm tổng hợp tạp A của nifedipin (a) so với chuẩn tạp A của nifedipin (b) .....</b>	<b>PL-88</b>
<b>Phụ lục 4.8. Phổ UV-Vis tạp B của nifedipin .....</b>	<b>PL-89</b>
<b>Phụ lục 4.9. Phổ IR tạp B của nifedipin.....</b>	<b>PL-90</b>
<b>Phụ lục 4.10. Phổ MS của sản phẩm tổng hợp tạp B của nifedipin.....</b>	<b>PL-92</b>
<b>Phụ lục 4.11. Phổ <sup>13</sup>C-NMR của sản phẩm tổng hợp tạp B của nifedipin.....</b>	<b>PL-93</b>
<b>Phụ lục 4.12. Phổ <sup>1</sup>H-NMR của sản phẩm tổng hợp tạp B của nifedipin.....</b>	<b>PL-94</b>
<b>Phụ lục 4.13. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống (n = 6) của qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin.....</b>	<b>PL-96</b>
<b>Phụ lục 4.14. Sắc ký đồ dung dịch tạp A của nifedipin khi khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin.....</b>	<b>PL-97</b>
<b>Phụ lục 4.15. Sắc ký đồ dung dịch tạp B của nifedipin khi khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin.....</b>	<b>PL-97</b>
<b>Phụ lục 4.16. Kết quả khảo sát miền giá trị của tạp A trong qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin .....</b>	<b>PL-98</b>
<b>Phụ lục 4.17. Kết quả khảo sát miền giá trị của tạp B trong qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin .....</b>	<b>PL-100</b>
<b>Phụ lục 4.18. Sắc ký đồ khảo sát miền giá trị của tạp A của nifedipin của qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin .....</b>	<b>PL-102</b>

- Phụ lục 4.19.** Sắc ký đồ khảo sát miền giá trị của tạp B của nifedipin của  
qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin .....PL-102
- Phụ lục 4.20.** Kết quả khảo sát độ lặp lại của qui trình xác định tinh khiết  
tạp A và tạp B của nifedipin với mẫu thử tạp A (n=6).....PL-103
- Phụ lục 4.21.** Kết quả khảo sát độ lặp lại của qui trình xác định độ tinh khiết  
tạp A và tạp B của nifedipin với mẫu thử tạp B (n=6).....PL-105
- Phụ lục 4.22.** Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của qui trình xác  
định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin với mẫu thử tạp A .....PL-107
- Phụ lục 4.23.** Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của qui trình xác  
định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin với mẫu thử tạp B .....PL-107
- Phụ lục 4.24.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ tạp A  
của nifedipin .....PL-108
- Phụ lục 4.25.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ tạp A của nifedipin liên  
phòng thí nghiệm.....PL-109
- Phụ lục 4.26.** Kết quả tính giá trị ấn định hàm lượng tạp A của nifedipin .....PL-110
- Phụ lục 4.27.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ tạp B  
của nifedipin.....PL-111
- Phụ lục 4.28.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ tạp B của nifedipin  
liên phòng thí nghiệm.....PL-112
- Phụ lục 4.29.** Kết quả tính giá trị ấn định hàm lượng tạp B của nifedipin .....PL-113
- Phụ lục 4.30.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch chuẩn  
(n = 6) của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong thành  
phần chứa nifedipin .....PL-114
- Phụ lục 4.31.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch  
chuẩn (n=6) của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong  
nguyên liệu nifedipin.....PL-115

## PHỤ LỤC

**Phụ lục 1. Captopril disulfid**

*Phụ lục 1.1. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng sắt (III) clorid hexahydrat*

Khảo sát nồng độ phần trăm  $\text{FeCl}_3$

Thử nghiệm	Nồng độ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (%)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 1	4	3,0068	2,9929	1,8841	62,95
	6	3,0113	2,9974	1,9156	63,91
	7	3,0089	2,995	2,0557	68,64
	8	3,0074	2,9935	2,1941	73,30
	10	3,0135	2,9996	2,2485	74,96
	12	3,0129	2,999	2,2913	76,40
	16	3,0097	2,9958	2,2853	76,28
	20	3,0083	2,9944	2,3670	79,05
	24	3,0016	2,9878	2,4121	80,73
Lần 2	4	3,0048	2,9910	1,9983	66,81
	6	3,0036	2,9898	2,0258	67,76
	7	3,0029	2,9891	2,1678	72,52
	8	3,0029	2,9891	2,2820	76,34
	10	3,0148	3,0009	2,4248	80,80
	12	3,013	2,9991	2,4643	82,17
	16	3,0182	3,0043	2,3249	77,39
	20	3,0029	2,9891	2,4254	81,14
	24	3,0092	2,9953	2,3901	79,80
Lần 3	4	3,0129	2,999	1,8294	61,00
	6	3,0048	2,991	1,9496	65,18
	7	3,0058	2,9919	2,2029	73,63
	8	3,0148	3,0009	2,4039	80,11
	10	3,0038	2,9900	2,3930	80,03



Thứ nghịem	Nồng độ FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (%)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
	12	3,0137	2,9998	2,4029	80,10
	16	3,0058	2,9919	2,3920	79,95
	20	3,0073	2,9934	2,3903	79,85
	24	3,0048	2,991	2,4739	82,71

Nồng độ FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O (%)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất trung bình (%)
		Lý thuyết	Thực tế	
4	3,0082	2,9943	1,9039	63,58
6	3,0066	2,9927	1,9637	65,62
7	3,0059	2,9920	2,1421	71,59
8	3,0084	2,9945	2,2933	76,58
10	3,0107	2,9968	2,3554	78,60
12	3,0132	2,9993	2,3862	79,56
16	3,0112	2,9973	2,3341	77,87
20	3,0062	2,9923	2,3942	80,01
24	3,0052	2,9914	2,4254	81,08

Kết quả khảo sát thể tích acid hydrocloric

Thứ nghịem	Thể tích HCl (ml)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 1	0	3,0026	2,9888	2,2938	76,75
	1	3,0083	2,9944	2,4135	80,60
	2	3,0015	2,9877	2,3398	78,31
	5	3,0117	2,9978	2,5259	84,26
	10	3,0036	2,9898	2,3339	78,06
	20	3,0010	2,9872	2,3839	79,80
	30	3,0069	2,9930	2,3328	77,94
	40	3,0126	2,9987	2,2849	76,20

Thứ nghiệm	Thể tích HCl (ml)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 2	0	3,0026	2,9888	2,1735	72,72
	1	3,0117	2,9978	2,3921	79,80
	2	3,0093	2,9954	2,4209	80,82
	5	3,0028	2,9890	2,469	82,60
	10	3,0079	2,9940	2,353	78,59
	20	3,0052	2,9914	2,256	75,42
	30	3,0046	2,9908	2,3892	79,88
	40	3,0070	2,9931	2,2468	75,07
Lần 3	0	3,0025	2,9887	2,3739	79,43
	1	3,0040	2,9902	2,3302	77,93
	2	3,0019	2,9881	2,5112	84,04
	5	3,0083	2,9944	2,4953	83,33
	10	3,0027	2,9889	2,2927	76,71
	20	3,0126	2,9987	2,4045	80,18
	30	3,0057	2,9918	2,2834	76,32
	40	3,0084	2,9945	2,321	77,51
Thể tích HCl (ml)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất trung bình (%)	
		Lý thuyết	Thực tế		
0	3,0026	2,9887	2,2804	76,30	
1	3,0080	2,9941	2,3786	79,44	
2	3,0042	2,9904	2,4240	81,06	
5	3,0076	2,9937	2,4967	83,40	
10	3,0047	2,9909	2,3265	77,79	
20	3,0063	2,9924	2,3481	78,47	
30	3,0057	2,9919	2,3351	78,05	
40	3,0093	2,9955	2,2842	76,25	

**Phụ lục 1.2. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng iod**

Khảo sát khối lượng iod

Thử nghiệm	Khối lượng I <sub>2</sub> (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 1	1,6	3,0072	2,9933	2,3354	78,02
	1,7	3,0055	2,9916	2,3488	78,51
	1,8	3,0093	2,9954	2,4131	80,56
	2	3,0083	2,9944	2,3340	77,95
	3	3,0057	2,9918	2,3498	78,54
	4	3,0031	2,9893	2,4633	82,40
	5	3,0025	2,9887	2,4309	81,34
	6	3,0073	2,9934	2,3829	79,61
Lần 2	1,6	3,0080	2,9941	2,3298	77,81
	1,7	3,0072	2,9933	2,3782	79,45
	1,8	3,0035	2,9897	2,3918	80,00
	2	3,0061	2,9922	2,3728	79,30
	3	3,0036	2,9898	2,3209	77,63
	4	3,0099	2,9960	2,4309	81,14
	5	3,0048	2,9910	2,3789	79,54
	6	3,0034	2,9896	2,3762	79,48
Lần 3	1,6	3,0088	2,9949	2,2738	75,92
	1,7	3,0067	2,9928	2,3109	77,22
	1,8	3,0021	2,9883	2,4034	80,43
	2	3,0093	2,9954	2,4109	80,49
	3	3,0047	2,9909	2,3928	80,00
	4	3,0003	2,9865	2,382	79,76
	5	3,0060	2,9921	2,4223	80,96
	6	3,0053	2,9915	2,4029	80,32

Khối lượng I <sub>2</sub> (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất trung bình (%)
		Lý thuyết	Thực tế	
1,6	3,0080	2,9941	2,3130	77,25
1,7	3,0065	2,9926	2,3460	78,39
1,8	3,0050	2,9912	2,4028	80,33
2	3,0079	2,9940	2,3726	79,25
3	3,0047	2,9909	2,3545	78,72
4	3,0044	2,9906	2,4254	81,10
5	3,0044	2,9906	2,4107	80,61
6	3,0053	2,9915	2,3873	79,80

Kết quả khảo sát khối lượng kali iodid

Thử nghiệm	Khối lượng KI (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 1	5	3,0074	2,9935	2,3483	78,45
	10	3,0032	2,9894	2,3639	79,08
	15	3,0068	2,9929	2,3178	77,44
	20	3,0051	2,9913	2,3271	77,80
	25	3,0073	2,9934	2,3339	77,97
Lần 2	5	3,0070	2,9931	2,3226	77,60
	10	3,0091	2,9952	2,3425	78,21
	15	3,0028	2,9890	2,3512	78,66
	20	3,0057	2,9918	2,3335	78,00
	25	3,0044	2,9906	2,3809	79,61
Lần 3	5	3,0083	2,9944	2,3323	77,89
	10	3,0083	2,9944	2,3221	77,55
	15	3,0060	2,9921	2,3209	77,57
	20	3,0051	2,9913	2,3424	78,31

Thử nghiệm	Khối lượng KI (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
	25	3,0125	2,9986	2,3398	78,03

Khối lượng KI (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất trung bình (%)
		Lý thuyết	Thực tế	
5	3,0076	2,9937	2,3344	77,98
10	3,0069	2,9930	2,3428	78,28
15	3,0052	2,9914	2,3300	77,89
20	3,0053	2,9915	2,3343	78,03
25	3,0081	2,9942	2,3515	78,54

**Phụ lục 1.3.** Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng kali permanganat

Kết quả khảo sát khối lượng kali permanganat

Thử nghiệm	Khối lượng KMnO <sub>4</sub> (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 1	2	5,0028	4,9797	0,4569	9,18
	2,5	5,0034	4,9803	0,5502	11,05
	3	5,0132	4,9901	0,6839	13,71
	3,5	5,0029	4,9798	0,5309	10,66
	4	5,0093	4,9862	0,2478	4,97
	5	5,0141	4,9910	0,0539	1,08
	6	5,0096	4,9865	0,0298	0,60
Lần 2	2	5,0039	4,9808	0,4765	9,57
	2,5	5,0045	4,9814	0,5389	10,82
	3	5,0163	4,9932	0,6924	13,87

Thử nghiệm	Khối lượng KMnO <sub>4</sub> (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 3	3,5	5,0068	4,9837	0,4928	9,89
	4	5,0093	4,9862	0,2167	4,35
	5	5,0046	4,9815	0,0358	0,72
	6	5,0083	4,9852	0,0136	0,27
	2	5,0056	4,9825	0,5012	10,06
	2,5	5,0029	4,9798	0,4679	9,40
	3	5,0138	4,9907	0,6322	12,67
	3,5	5,0039	4,9808	0,512	10,28
	4	5,0053	4,9822	0,1898	3,81
	5	5,0084	4,9853	0,022	0,44
	6	5,0129	4,9898	0,0389	0,78

Khối lượng KMnO <sub>4</sub> (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất trung bình (%)
		Lý thuyết	Thực tế	
2	5,0041	4,9810	0,4782	9,60
2,5	5,0036	4,9805	0,5190	10,42
3	5,0144	4,9913	0,6695	13,41
3,5	5,0045	4,9814	0,5119	10,28
4	5,0080	4,9849	0,2181	4,38
5	5,0090	4,9859	0,0372	0,75
6	5,0103	4,9872	0,0274	0,55

## Kết quả khảo sát thể tích acid sulfuric

Thử nghiệm	Thể tích H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 1	15	5,0110	4,9995	0,6914	13,83
	20	5,0042	4,9927	0,7050	14,12
	30	5,0032	4,9917	0,4827	9,67
	40	5,0079	4,9964	0,1254	2,51
Lần 2	15	5,0167	5,0051	0,6767	13,52
	20	5,0052	4,9937	0,7126	14,27
	30	5,0069	4,9954	0,3087	6,18
	40	5,0021	4,9906	0,1357	2,72
Lần 3	15	5,0005	4,9890	0,7079	14,19
	20	5,0031	4,9916	0,6933	13,89
	30	5,0050	4,9935	0,3985	7,98
	40	5,0037	4,9922	0,1757	3,52
Thể tích H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất trung bình (%)	
15	5,0094	4,9979	0,6920	13,85	
20	5,0042	4,9926	0,7036	14,09	
30	5,0050	4,9935	0,3966	7,94	
40	5,0046	4,9930	0,1456	2,92	

**Phụ lục 1.4. Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng kali dicromat**

Kết quả khảo sát khối lượng kali dicromat

Thứ nghiệm	Khối lượng kali dicromat (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 1	0,6	3,0042	2,9904	0,9245	30,92
	0,7	3,0058	2,9919	1,5790	52,78
	0,75	3,0041	2,9903	1,9945	66,70
	1	3,0023	2,9885	2,0356	68,11
	1,25	3,0046	2,9908	1,5893	53,14
	1,5	3,0073	2,9934	0,9294	31,05
	3	3,0116	2,9977	0,8237	27,48
	5	3,0037	2,9899	0,2456	8,21
	7	3,0026	2,9888	0,0689	2,31
Lần 2	0,6	3,0090	2,9951	0,8309	27,74
	0,7	3,0084	2,9945	1,5790	52,73
	0,75	3,0063	2,9924	1,8403	61,50
	1	3,0047	2,9909	1,943	64,96
	1,25	3,0025	2,9887	1,6839	56,34
	1,5	3,0076	2,9937	0,8834	29,51
	3	3,0045	2,9907	0,7834	26,19
	5	3,0111	2,9972	0,3209	10,71
	7	3,0083	2,9944	0,1278	4,27
Lần 3	0,6	3,0115	2,9976	0,942	31,43
	0,7	3,0026	2,9888	1,5839	52,99
	0,75	3,0047	2,9909	1,952	65,26
	1	3,0083	2,9944	1,982	66,19
	1,25	3,0026	2,9888	1,521	50,89
	1,5	3,0048	2,9910	0,9834	32,88
	3	3,0093	2,9954	0,8893	29,69



Thử nghiệm	Khối lượng kali dicromat (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
	5	3,0058	2,9919	0,3794	12,68
	7	3,0033	2,9895	0,0834	2,79
Khối lượng kali dicromat (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất trung bình (%)	
		Lý thuyết	Thực tế		
0,6	3,0082	2,9943	0,8991	30,03	
0,7	3,0056	2,9917	1,5806	52,83	
0,75	3,0050	2,9912	1,9289	64,49	
1	3,0051	2,9913	1,9869	66,42	
1,25	3,0032	2,9894	1,5981	53,46	
1,5	3,0066	2,9927	0,9321	31,15	
3	3,0085	2,9946	0,8321	27,79	
5	3,0069	2,9930	0,3153	10,53	
7	3,0047	2,9909	0,0934	3,12	

#### Kết quả khảo sát thể tích acid sulfuric

Thử nghiệm	Thể tích H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 1	1	3,0011	2,9873	1,7439	58,38
	2	3,0025	2,9887	1,7893	59,87
	5	3,0047	2,9909	2,0356	68,06
	10	3,0079	2,9940	2,0679	69,07
	15	3,0062	2,9923	2,1789	72,82
	20	3,0084	2,9945	2,3567	78,70
	25	3,0037	2,9899	2,4289	81,24
	30	3,0026	2,9888	2,392	80,03

Thứ nghiệm	Thể tích H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
	35	3,0104	2,9965	1,3589	45,35
	40	3,0052	2,9914	1,0493	35,08
Lần 2	1	3,0073	2,9934	1,7527	58,55
	2	3,0124	2,9985	1,692	56,43
	5	3,0036	2,9898	2,1027	70,33
	10	3,0072	2,9933	2,1928	73,26
	15	3,0081	2,9942	2,2019	73,54
	20	3,0047	2,9909	2,2738	76,02
	25	3,0026	2,9888	2,4109	80,66
	30	3,0054	2,9916	2,3589	78,85
	35	3,0002	2,9864	1,4209	47,58
	40	3,0090	2,9951	1,2291	41,04
	Lần 3	1	3,0073	2,9934	1,6732
2		3,0113	2,9974	1,7209	57,41
5		3,0084	2,9945	2,0194	67,44
10		3,0063	2,9924	2,0799	69,51
15		3,0025	2,9887	2,162	72,34
20		3,0073	2,9934	2,4152	80,68
25		3,0084	2,9945	2,3602	78,82
30		3,0125	2,9986	2,2947	76,53
35		3,0036	2,9898	1,4723	49,24
40		3,0057	2,9918	1,3729	45,89

Thể tích H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất trung bình (%)
		Lý thuyết	Thực tế	
1	3,0052	2,9914	1,7233	57,61
2	3,0087	2,9948	1,7341	57,90
5	3,0056	2,9917	2,0526	68,61
10	3,0071	2,9932	2,1135	70,61
15	3,0056	2,9917	2,1809	72,90
20	3,0068	2,9929	2,3486	78,47
25	3,0049	2,9911	2,4000	80,24
30	3,0068	2,9929	2,3485	78,47
35	3,0047	2,9909	1,4174	47,39
40	3,0066	2,9927	1,2171	40,67

**Phụ lục 1.5.** *Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng kali dicromat và EDTA*

Kết quả khảo sát khối lượng kali dicromat

Khối lượng kali dicromat (g)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
		Lý thuyết	Thực tế	
0,6	3,0060	2,9991	0,6507	21,70
0,7	3,0152	3,0083	1,0419	34,63
1	3,0094	3,0025	1,8524	61,70
1,5	3,0041	2,9972	1,1347	37,86
3	3,0051	2,9982	0,9554	31,87

**Phụ lục 1.6.** Khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp captopril disulfid bằng hydrogen peroxyd

Kết quả khảo sát thể tích hydrogen peroxyd 30 % (100 thể tích)

Thử nghiệm	Thể tích H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 1	2	5,0024	4,9793	0,6357	12,77
	5	5,0018	4,9788	1,4980	30,09
	10	5,0063	4,9832	2,0395	40,93
	15	5,0014	4,9784	1,6398	32,94
	20	5,0047	4,9816	1,2509	25,11
	25	5,0029	4,9798	0,8309	16,69
	30	5,0062	4,9831	0,3409	6,84
	40	5,0013	4,9782	0,2449	4,92
	50	5,0035	4,9804	0,1509	3,03
	60	5,0024	4,9793	0,1320	2,65
	70	5,0015	4,9784	0,0729	1,46
Lần 2	2	5,0020	4,9789	0,7209	14,48
	5	5,0069	4,9838	1,5029	30,16
	10	5,0029	4,9798	1,9782	39,72
	15	5,0037	4,9806	1,5309	30,74
	20	5,0032	4,9801	1,3029	26,16
	25	5,0137	4,9906	1,0398	20,84
	30	5,0013	4,9783	0,6043	12,14
	40	5,0047	4,9816	0,3058	6,14
	50	5,0035	4,9804	0,2032	4,08
	60	5,0019	4,9788	0,2028	4,07
	70	5,0060	4,9829	0,0502	1,01
Lần 3	2	5,0029	4,9798	0,9309	18,69
	5	5,0018	4,9788	1,6209	32,56

Thứ nghiệm	Thể tích H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
	10	5,0049	4,9818	2,0892	41,94
	15	5,0047	4,9816	1,7209	34,55
	20	5,0040	4,9809	1,4029	28,17
	25	5,0063	4,9832	1,1029	22,13
	30	5,0040	4,9809	0,4039	8,11
	40	5,0014	4,9784	0,2947	5,92
	50	5,0024	4,9793	0,1703	3,42
	60	5,0013	4,9783	0,1893	3,80
	70	5,0124	4,9893	0,0930	1,86
Trung bình	Thể tích H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất trung bình (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
	2	5,0024	4,9793	0,7625	15,31
	5	5,0035	4,9804	1,5406	30,93
	10	5,0142	4,9911	2,0356	40,78
	15	5,0033	4,9802	1,6305	32,74
	20	5,0040	4,9809	1,3189	26,48
	25	5,0135	4,9904	0,9912	19,86
	30	5,0038	4,9807	0,4497	9,03
	40	5,0025	4,9794	0,2818	5,66
	50	5,0141	4,9910	0,1748	3,50
	60	5,0019	4,9788	0,1747	3,51
	70	5,0113	4,9882	0,0720	1,44

## Kết quả khảo sát thời gian tổng hợp

Thứ nghiệm	Thời gian tổng hợp (giờ)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
Lần 1	3	5,0046	4,9931	1,9835	39,73
	6	5,0045	4,9930	1,7840	35,73
	9	5,0023	4,9908	2,1120	42,32
	12	5,0063	4,9948	1,7302	34,64
	24	5,0029	4,9914	1,7378	34,82
	48	5,0109	4,9994	1,6824	33,65
	72	5,0087	4,9972	1,7031	34,08
Lần 2	3	5,0059	4,9944	2,0350	40,75
	6	5,0089	4,9974	2,1030	42,08
	9	5,0024	4,9909	2,1690	43,46
	12	5,0073	4,9958	1,8590	37,21
	24	5,0102	4,9987	1,7582	35,17
	48	5,0114	4,9999	1,6924	33,85
	72	5,0201	5,0085	1,7131	34,20
Lần 3	3	5,0059	4,9944	2,0453	40,95
	6	5,0089	4,9974	1,9539	39,10
	9	5,0024	4,9909	2,0371	40,82
	12	5,0073	4,9958	1,9597	39,23
	24	5,0102	4,9987	1,8673	37,36
	48	5,0114	4,9999	1,8402	36,81
	72	5,0201	5,0085	1,8556	37,05
Trung bình	3	5,0053	4,9937	2,0144	40,34
	6	5,0024	4,9908	2,0746	41,57
	9	5,0067	4,9952	1,8690	37,41
	12	5,0068	4,9953	1,8450	36,93
	24	5,0066	4,9950	1,8026	36,09

Thử nghiệm	Thời gian tổng hợp (giờ)	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)
			Lý thuyết	Thực tế	
	48	5,0112	4,9996	1,7613	35,23
	72	5,0144	5,0028	1,7794	35,57

### Kết quả khảo sát môi trường phản ứng

#### Lần 1

Môi trường phản ứng	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)	
		Lý thuyết	Thực tế		
Nước cất	5,0037	4,9922	2,1420	42,91	
	0,5 ml	5,0137	5,0021	43,51	
	1 ml	5,0072	4,9957	39,29	
HCl đậm đặc	2 ml	5,0059	4,9944	39,72	
	5 ml	5,0092	4,9977	37,08	
	10 ml	5,0059	4,9944	1,3525	27,08
	20 ml	5,0173	5,0057	0,7348	14,68
	40 ml	5,0024	Không xuất hiện tủa		
	0,2 g	5,0085	4,9970	2,6530	53,09
	0,4 g	5,0169	5,0053	3,0151	60,24
NaOH	0,6 g	5,0062	4,9947	1,8625	37,29
	0,8 g	5,0023			
	1,6 g	5,0054	Không xuất hiện tủa		
	3,2 g	5,0016			

#### Lần 2

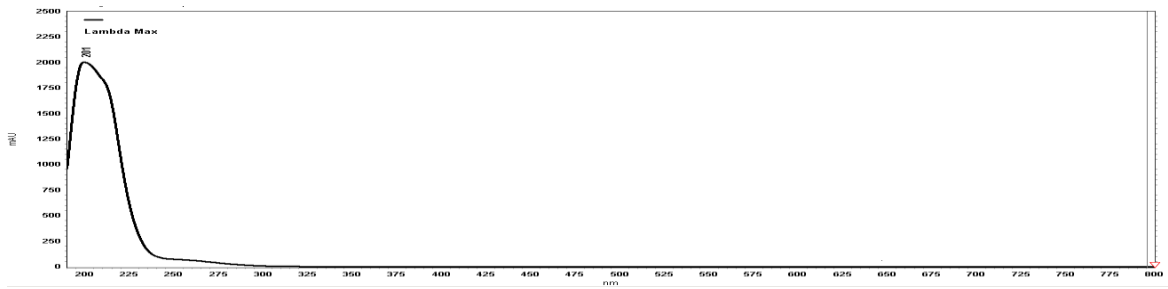
Môi trường phản ứng	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)	
		Lý thuyết	Thực tế		
Nước cất	5,0079	4,9964	2,0875	41,78	
HCl	0,5 ml	5,0039	4,9924	2,2162	44,39

Môi trường phản ứng	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)	
		Lý thuyết	Thực tế		
đậm đặc	1 ml	5,0153	5,0037	2,0453	40,88
	2 ml	5,0073	4,9958	2,0734	41,50
	5 ml	5,0085	4,9970	1,8649	37,32
	10 ml	5,0051	4,9936	1,5623	31,29
	20 ml	5,0160	5,0044	0,5348	10,69
	40 ml	5,0342	Không xuất hiện tủa		
NaOH	0,2 g	5,0073	4,9958	2,4256	48,55
	0,4 g	5,0094	4,9979	2,7872	55,77
	0,6 g	5,0048	4,9933	1,7930	35,91
	0,8 g	5,0030			
	1,6 g	5,0019	Không xuất hiện tủa		
	3,2 g	5,0046			
Lần 3					
Môi trường phản ứng	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)	
		Lý thuyết	Thực tế		
Nước cất	5,0046	4,9931	2,1571	43,20	
HCl đậm đặc	0,5 ml	5,0210	5,0094	2,1979	43,88
	1 ml	5,0052	4,9937	2,2184	44,42
	2 ml	5,0039	4,9924	1,8940	37,94
	5 ml	5,0072	4,9957	1,9623	39,28
	10 ml	5,0064	4,9949	1,6305	32,64
	20 ml	5,0110	4,9995	1,0634	21,27
40 ml	5,0342	Không xuất hiện tủa			
NaOH	0,2 g	5,0142	5,0026	2,3324	46,62
	0,4 g	5,0214	5,0098	2,9171	58,23
	0,6 g	5,0149	5,0033	1,9458	38,89

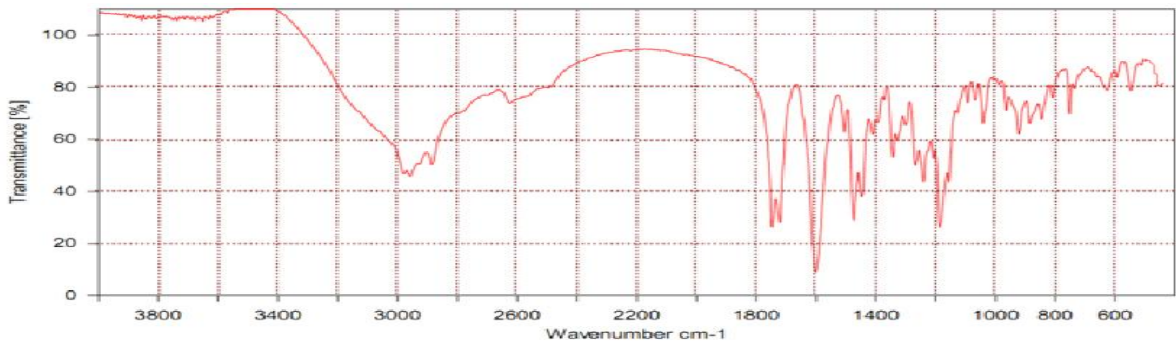


Môi trường phản ứng	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)	
		Lý thuyết	Thực tế		
	0,8 g				
	1,6 g	Không xuất hiện tủa			
	3,2 g				
Trung bình					
Môi trường phản ứng	Khối lượng captopril (g)	Khối lượng captopril disulfid (g)		Hiệu suất tổng hợp (%)	
		Lý thuyết	Thực tế		
Nước cất	5,0054	4,9939	2,1289	42,63	
	0,5 ml	5,0129	5,0013	43,92	
	1 ml	5,0092	4,9977	41,53	
HCl đậm đặc	2 ml	5,0057	4,9942	39,72	
	5 ml	5,0083	4,9968	37,89	
	10 ml	5,0058	4,9943	30,34	
	20 ml	5,0148	5,0032	0,7777	15,55
	40 ml	5,0234	Không xuất hiện tủa		
	0,2 g	5,0100	4,9985	2,4703	49,42
	0,4 g	5,0159	5,0043	2,9065	58,08
NaOH	0,6 g	5,0086	4,9971	1,8671	37,36
	0,8 g				
	1,6 g		Không xuất hiện tủa		
	3,2 g				

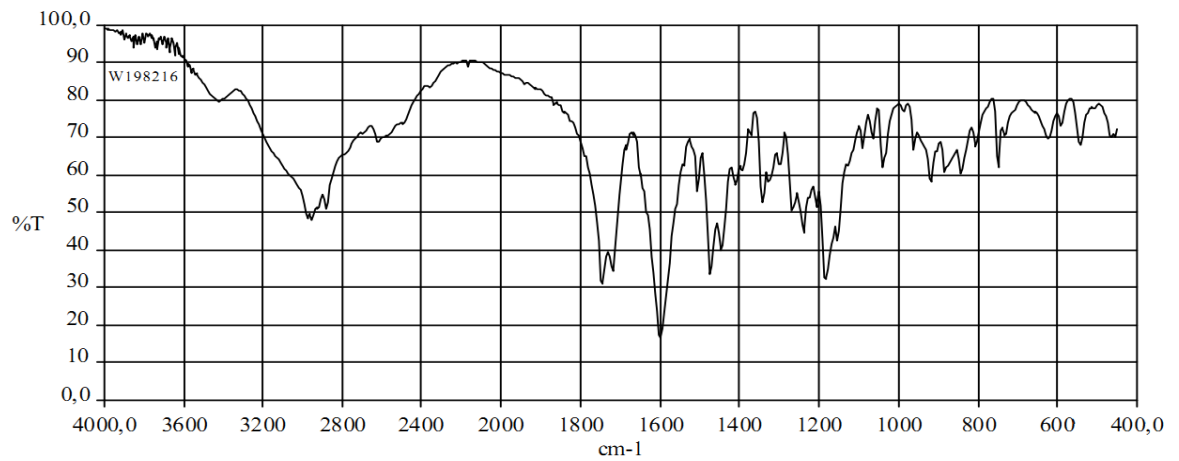
*Phụ lục 1.7. Phổ UV-Vis của captopril disulfid*



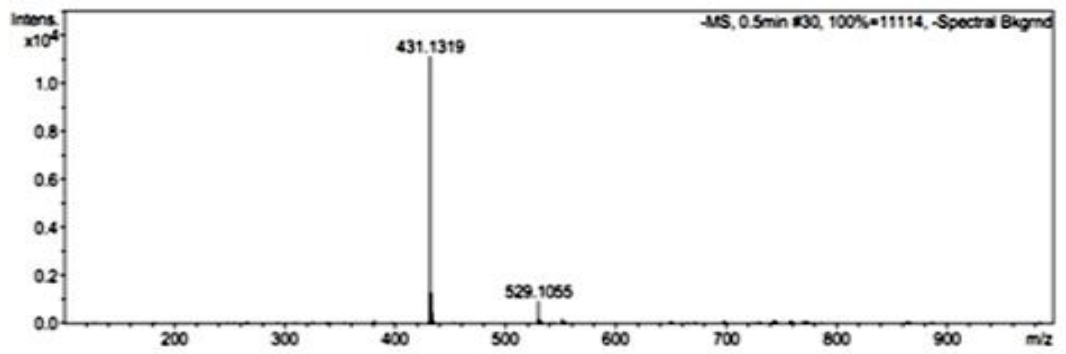
*Phụ lục 1.8. Phổ IR của captopril disulfid tổng hợp*



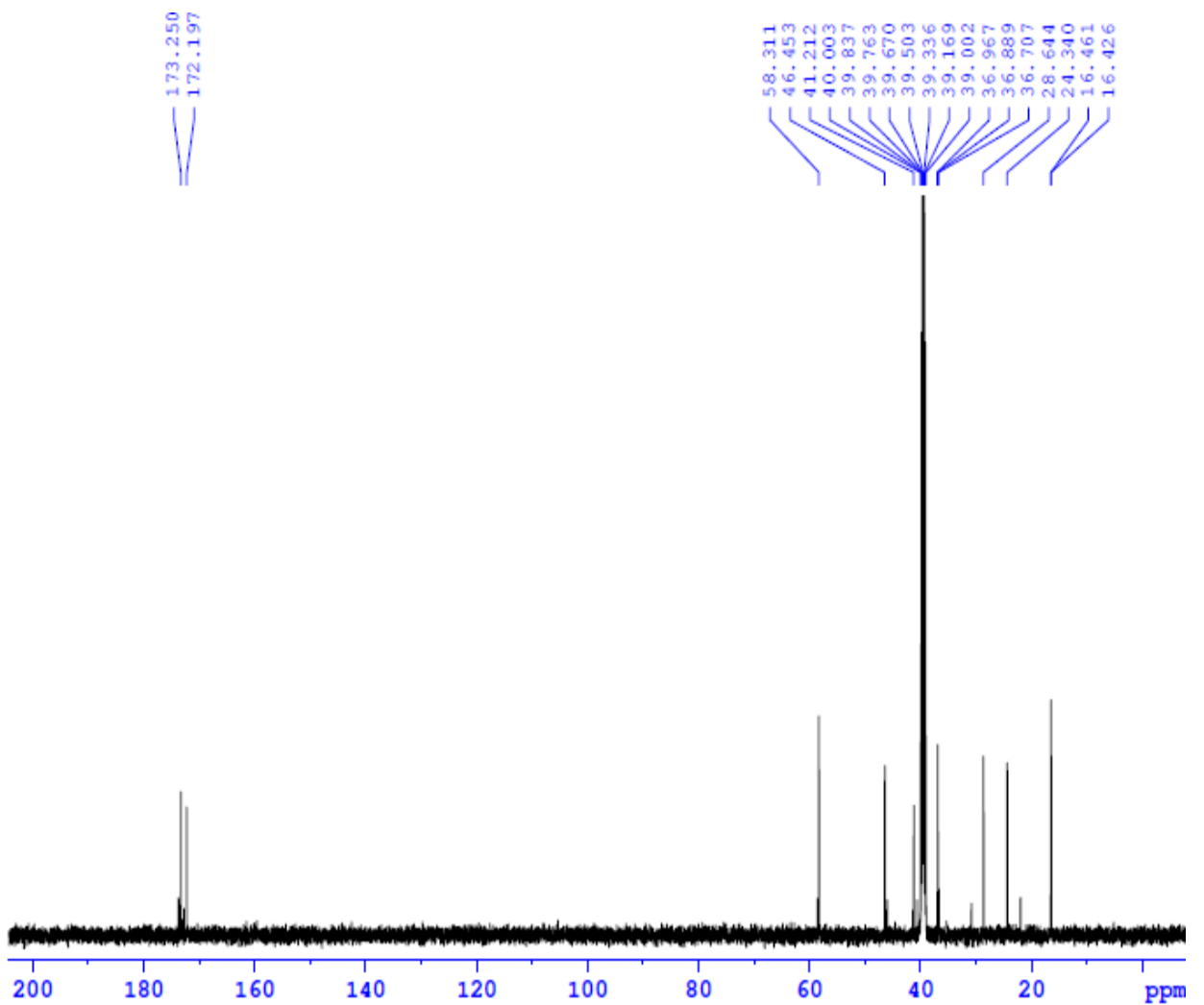
*Phổ IR của captopril disulfid chuẩn*



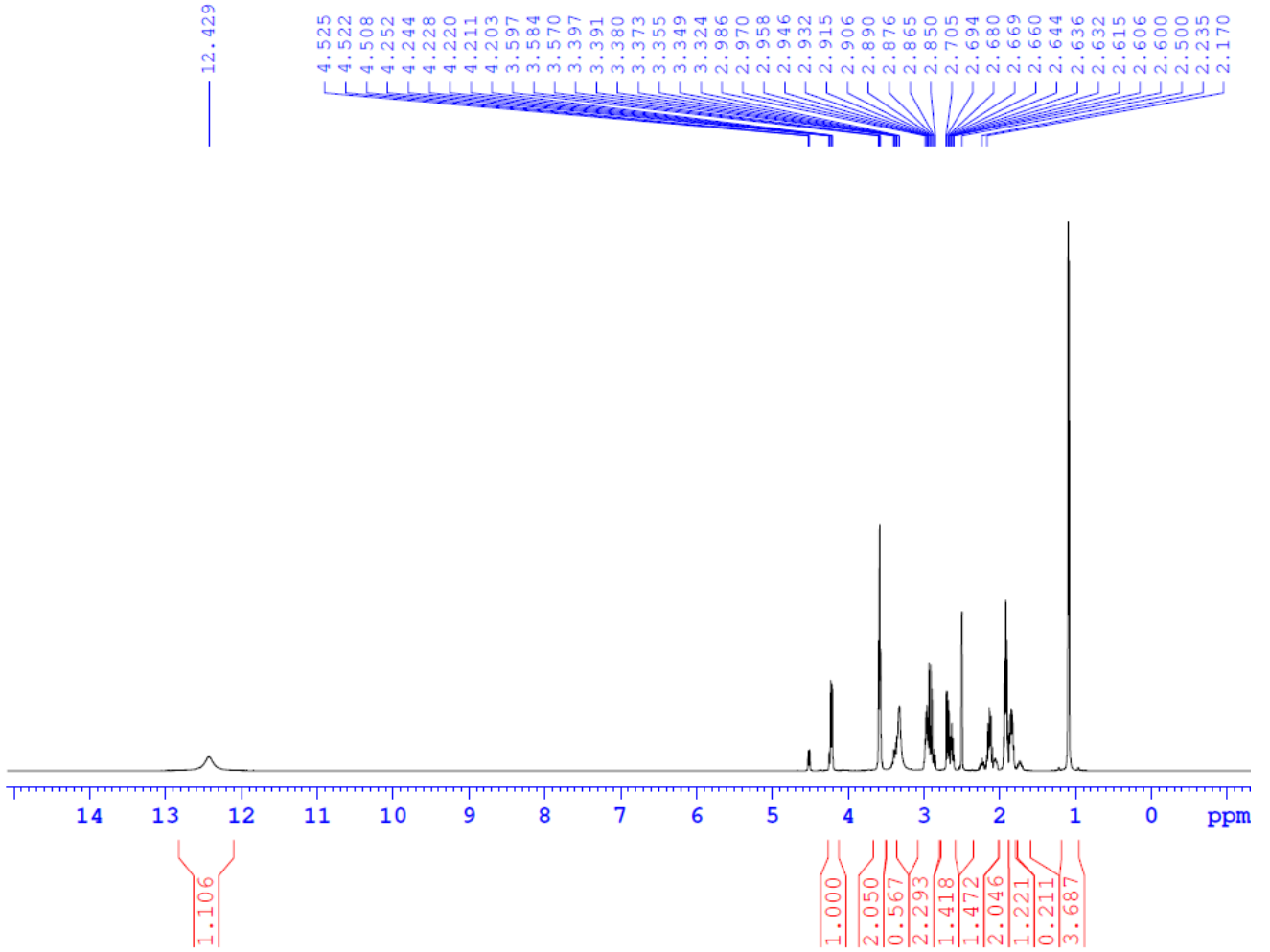
*Phụ lục 1.9. Phổ MS của captopril disulfid*



*Phụ lục 1.10. Phổ <sup>13</sup>C-NMR của captopril disulfid*



*Phụ lục 1.11. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của captopril disulfid*



**Phụ lục 1.12.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết captopril disulfid

Lần tiêm	$t_R$ (phút)	S ( $\mu V \times$ giây)	$A_s$	$R_s$	N	$k'$
1	3,633	31459441	1,149	13,458	35447	1,422
2	3,627	31434465	1,131	13,644	35564	1,418
3	3,633	31851596	1,165	13,562	35348	1,422
4	3,627	31603265	1,116	13,467	35603	1,418
5	3,620	31247427	1,156	13,552	35099	1,413
6	3,620	31513235	1,146	13,296	35083	1,413
Trung bình	3,627	31518238	1,144	13,496	35357	1,418
RSD%	0,161	0,638	1,564	0,886	0,637	0,227

$R_s$ : độ phân giải giữa pic captopril disulfid và pic tạp chất X.

N: số đĩa lý thuyết quy về cột phân tích dài 1 m.

$A_s$  : hệ số đối xứng

$k'$  : hệ số dung lượng

Thời gian chết là 1,5 phút.

**Phụ lục 1.13. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của qui trình xác định độ tinh khiết captopril disulfid**

SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.999729
R Square	0.999459
Adjusted R Square	0.999351
Standard Error	409649.2
Observations	7

ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	1.55E+15	1.55E+15	9233.789	2.31E-09
Residual	5	8.39E+11	1.68E+11		
Total	6	1.55E+15			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	1219486	285939	4.264846	0.007978	484456.3	1954515	484456.3	1954515
X Variable	30365.94	316.0071	96.0926	2.31E-09	29553.62	31178.27	29553.62	31178.27

RESIDUAL OUTPUT

<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>	<i>Standard Residuals</i>
1	2768149	-642523	-1.71817
2	8902070	243754.1	0.651824
3	16554288	318473	0.85163
4	24085042	317038.7	0.847795
5	31889090	213491.9	0.5709
6	39116185	-130414	-0.34874
7	46920233	-319821	-0.85523

PROBABILITY OUTPUT

<i>Percentile</i>	<i>Y</i>
7.142857	2125626
21.42857	9145824
35.71429	16872761
50	24402081
64.28571	32102582
78.57143	38985771
92.85714	46600412

Bình phương hệ số tương quan  $R^2 = 0,9995$ . Tính thích hợp của phương trình hồi quy:  $F_{tn} = 9233,789 > F_{0,05}(1, 5) = 6,608$ . Ý nghĩa của các hệ số trong phương trình hồi quy:

Hệ số A = 30366 có  $t_A = 96,093 > t_{0,05}(5) = 2,571$ . Hệ số B = 1219486 có  $t_B = 4,265 > t_{0,05}(5) = 2,571$ . Từ những kết quả trên, phương trình biểu diễn sự tương quan diện tích pic theo nồng độ phân tích của captopril disulfid ở bước sóng 220 nm là  $y = 30366x + 1219486$ , với khoảng tuyến tính từ 51 – 1505  $\mu\text{g/mL}$ .

**Phụ lục 1.14.** *Kết quả khảo sát độ lặp lại của qui trình xác định độ tinh khiết captopril disulfid*

Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diện tích pic ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )			Hàm lượng captopril disulfid (%)
	Captopril disulfid	Tạp X	Tổng	
1004	31180394	211600	31391994	99,33
1000	30403959	195665	30599624	99,36
998	30557440	195940	30753380	99,36
990	30054464	92696	30147160	99,69
1010	32102582	111367	32213949	99,65
1006	31191804	215094	31406898	99,32
Số lần thực nghiệm n				6
Giá trị hàm lượng trung bình $x_{tb}$				99,45%
SD				0,17%
RSD				0,17%
Giới hạn tin cậy e ( $p = 0,95; t = 2,571$ )				0,18%
Khoảng tin cậy $\mu$				99,27% – 99,63%

**Phụ lục 1.15. Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của qui trình xác định độ tinh khiết captopril disulfid**

Ngày 2

Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diện tích pic ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )			Hàm lượng captopril disulfid (%)
	Captopril disulfid	Tạp X	Tổng	
1003	30267166	212601	30479767	99,30
1007	32842277	133589	32975866	99,59
1004	31477705	200488	31678193	99,37
1012	33255123	135645	33390768	99,59
1013	33819276	236372	34055648	99,31
1009	32502324	210624	32712948	99,36
Số lần thực nghiệm n				6
Giá trị hàm lượng trung bình $x_{tb}$				99,42%
SD				0,14%
RSD				0,14%
Giới hạn tin cậy e ( $p = 0,95; t = 2,571$ )				0,14%
Khoảng tin cậy $\mu$				99,28% – 99,56%

Ngày 3

Nồng độ ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diện tích đỉnh ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )			Hàm lượng captopril disulfid (%)
	Captopril disulfid	Tạp X	Tổng	
1007	32343696	153610	32497306	99,53
1014	34941431	291106	35232537	99,17
991	27540367	127422	27667789	99,54
1005	31714551	134295	31848846	99,58
995	28950639	153946	29104585	99,47
1005	31247682	130099	31377781	99,59
Số lần thực nghiệm n				6



Giá trị hàm lượng trung bình $X_{TB}$	99,48%
SD	0,16%
RSD	0,16%
Giới hạn tin cậy e ( $p = 0,95$ ; $t = 2,571$ )	0,17%
Khoảng tin cậy $\mu$	99,31% – 99,65%

Tóm tắt kết quả khảo sát độ chính xác trung gian

Hàm lượng captopril disulfid (%)		
Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3
99,33	99,30	99,53
99,36	99,59	99,17
99,36	99,37	99,54
99,69	99,59	99,58
99,65	99,31	99,47
99,32	99,36	99,48
Số lần thực nghiệm n		18
Giá trị hàm lượng trung bình $x_{tb}$		99,44%
SD		0,16%
RSD		0,16%
Giới hạn tin cậy e (với $p = 0,95$ ; $t = 2,110$ )		0,08%
Khoảng tin cậy $\mu$		99,36% – 99,52%

**Phụ lục 1.16.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ captopril disulfid

Kết quả xác định độ tinh khiết captopril disulfid trong quá trình đóng lọ

Số thứ tự lọ	Diện tích pic ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )	% diện tích pic	Xử lý thống kê
8	6437953	99,44	n = 6; $x_{TB} = 99,44\%$ ; SD = 0,01%; RSD = 0,01% (với t = 2,57; p = 0,95)
13	6379470	99,42	
17	9066459	99,44	
20	9068224	99,46	
32	8329464	99,43	
48	8301351	99,44	

Đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ theo phương pháp thống kê phân tích ANOVA một yếu tố, so sánh 2 giá trị  $F_m$  và  $F_{tc}$

Phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA trong đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	$F_m$	$F_{tc}$
Giữa các nhóm	0,016481	5	0,00043	0,573	4,387
Trong cùng nhóm	0,034520	6	0,00038		
Tổng cộng	0,051001	11			

Nhận xét:  $F_m = 0,573 < F_{tc} = 4,387$ . Vậy các lọ trong quá trình đóng đồng nhất.

**Phụ lục 1.17. Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ captopril disulfid liên phòng thí nghiệm**

Kết quả định lượng captopril disulfid tại hai phòng thí nghiệm

Mẫu	PTN1	PTN2
1	99,50%	99,44%
2	99,61%	99,42%
3	99,45%	99,44%
4	99,45%	99,46%
5	99,61%	99,43%
6	99,43%	99,44%
Trung bình	99,51%	99,44%

Việc đánh giá độ đồng nhất lọ giữa 2 phòng thí nghiệm được thực hiện bằng cách áp dụng phương pháp thống kê phân tích phương sai một yếu tố, so sánh 2 giá trị  $F_{tn}$  và  $F_{tc}$ .

Kết quả phân tích ANOVA đánh giá độ đồng nhất lọ giữa 2 phòng thí nghiệm

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	$F_{tn}$	$F_{tc}$
Giữa các nhóm	0,0147	1	0,0147	4,253	4,965
Trong cùng nhóm	0,034567	10	0,003457		
Tổng cộng	0,049267	11			

$F_{tn} = 4,253 < F_{tc} = 4,965$ . Vậy kết quả định lượng giữa 2 phòng thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê. 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.

*Phụ lục 1.18. Kết quả xác định giá trị ấn định hàm lượng captopril disulfid*

	x*0	x*1	x*2	x*3	lzl
$\delta = 1,5s^*$		0,0216	0,0216	0,0216	
$x^* - \delta$		99,43	99,43	99,43	
$x^* + \delta$		99,47	99,47	99,47	
	99,42	99,43	99,43	99,43	1,21
	99,43	99,43	99,43	99,43	1,12
	99,44	99,44	99,44	99,44	0,52
	99,44	99,44	99,44	99,44	0,52
	99,44	99,44	99,44	99,44	0,52
	99,46	99,46	99,46	99,46	0,69
	99,43	99,43	99,43	99,43	1,12
	99,45	99,45	99,45	99,45	0,08
	99,45	99,45	99,45	99,45	0,08
	99,50	99,47	99,47	99,47	1,38
	99,61	99,47	99,47	99,47	1,38
	99,61	99,47	99,47	99,47	1,38
Trung bình	99,473	99,449	99,449	99,449	
Độ lệch s	0,0669	0,0166	0,0166	0,0166	
$x^*$ mới	99,45	99,45	99,45	99,45	
$s^*$ mới	0,0144	0,0144	0,0144	0,0144	

**Phụ lục 1.19.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử giả lập của qui trình định lượng tạp chất captopril disulfid

**Mẫu chuẩn**

Lần đo	Mẫu chuẩn (1)					Mẫu chuẩn (2)				
	$t_R$ (phút)	$S$ ( $\mu V \times giây$ )	$R_S$	$A_S$	$N$	$t_R$ (phút)	$S$ ( $\mu V \times giây$ )	$R_S$	$A_S$	$N$
1	3,51	324450	5,6	1,2	33036	3,52	656730	5,6	1,2	33678
2	3,50	324462	5,5	1,2	33042	3,51	656478	5,5	1,2	33543
3	3,49	324992	5,6	1,2	33101	3,50	654789	5,5	1,2	32456
4	3,50	323900	5,5	1,2	32990	3,48	657864	5,5	1,2	33567
5	3,51	325049	5,5	1,2	33050	3,52	659814	5,5	1,2	34657
6	3,50	322890	5,5	1,2	33020	3,50	651243	5,7	1,2	34067
TB	3,50	324291	5,5	1,2	33040	3,51	656153	5,6	1,2	33661
SD	0,01	734	0,1	0,1	34	0,01	2.668,88	0,1	0,1	662
RSD%	0,20	0,23	0,85	0,83	0,10	0,39	0,41	1,40	1,49	1,97

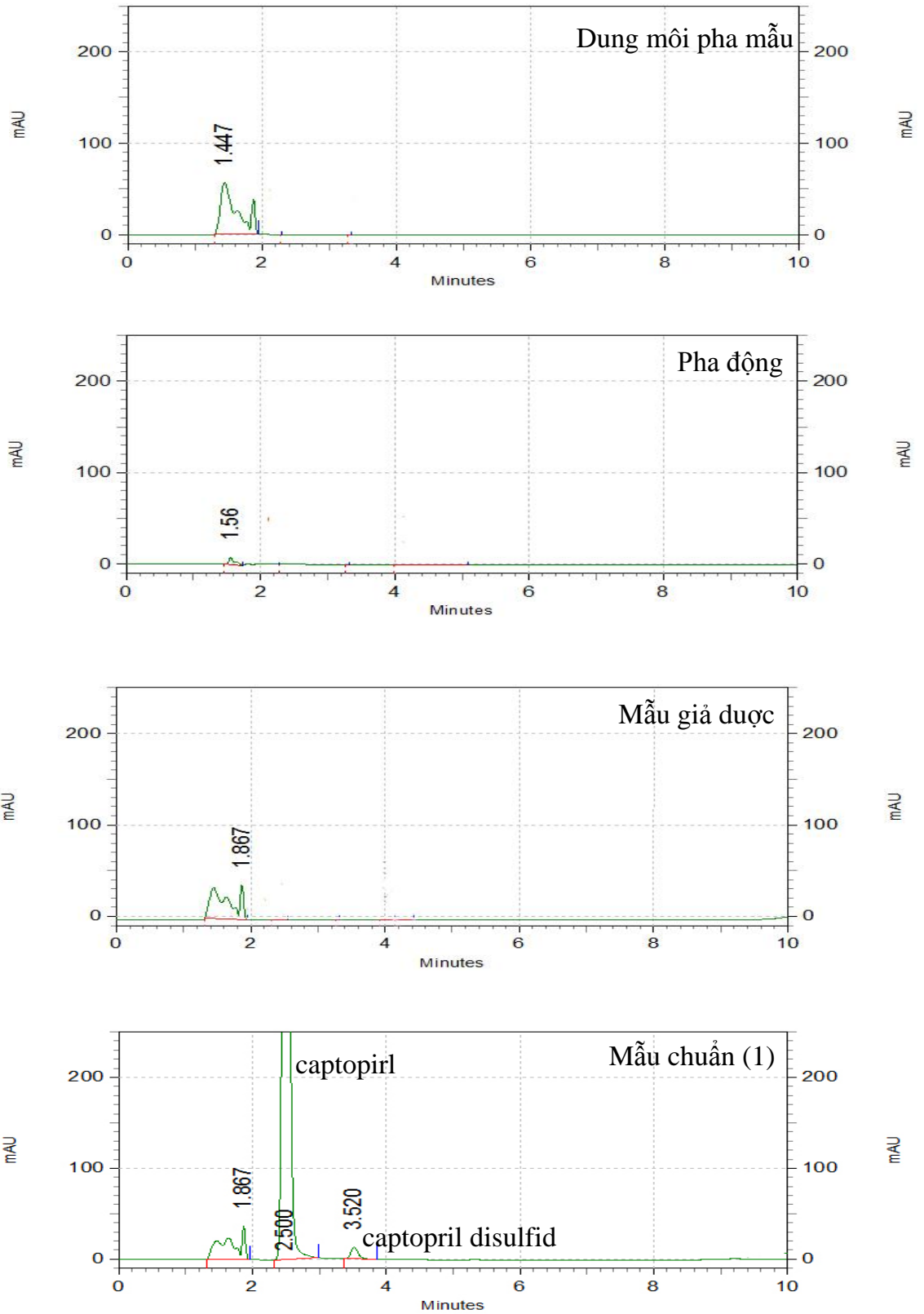
**Mẫu thử**

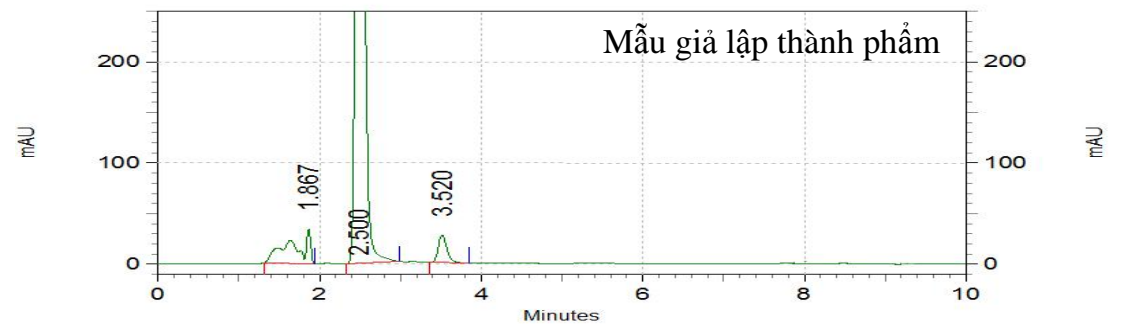
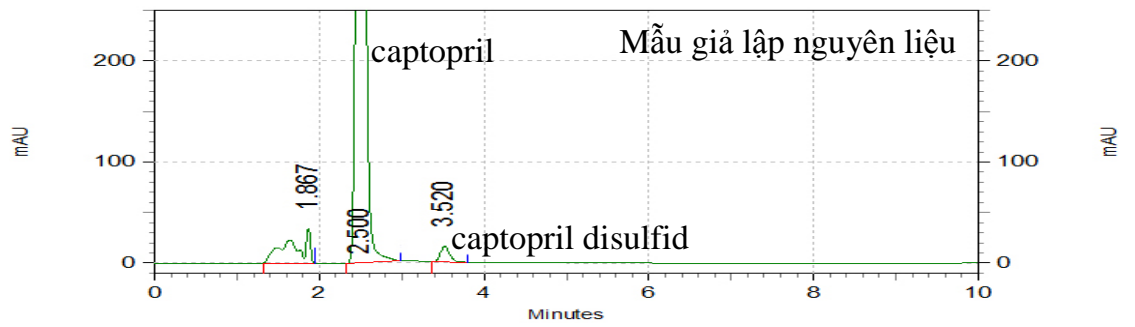
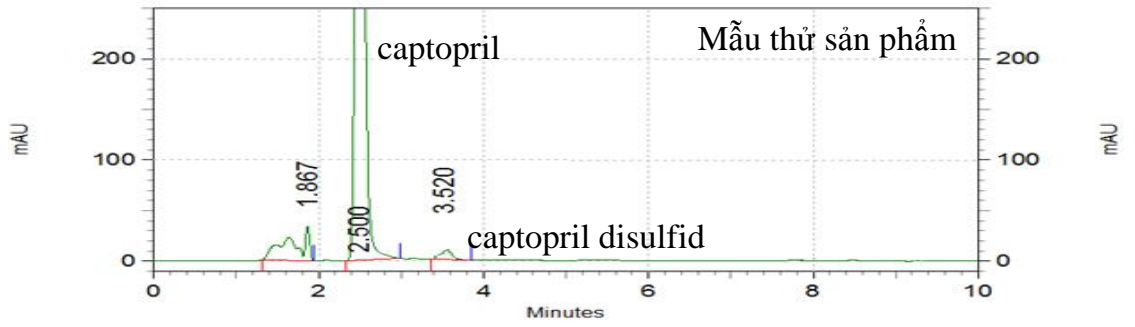
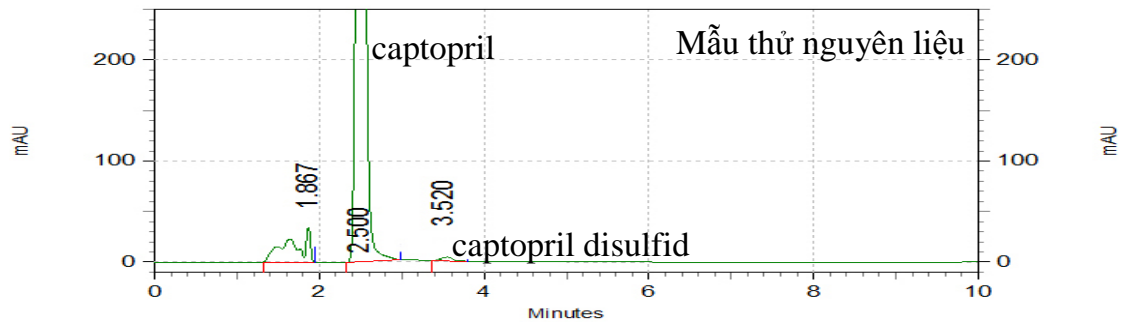
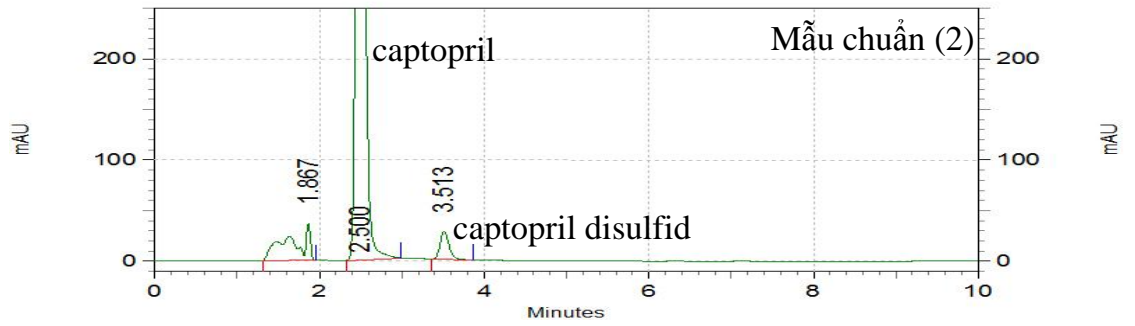
Lần đo	Mẫu thử nguyên liệu					Mẫu thử chế phẩm				
	$t_R$ (phút)	$S$ ( $\mu V \times giây$ )	$R_S$	$A_S$	$N$	$t_R$ (phút)	$S$ ( $\mu V \times giây$ )	$R_S$	$A_S$	$N$
1	3,55	43467	5,8	1,3	38433	3,47	197425	5,6	1,2	35548
2	3,54	43500	5,7	1,3	38569	3,48	197845	5,5	1,2	35987
3	3,48	43698	5,7	1,3	38759	3,48	198742	5,7	1,2	35698
4	3,52	43758	5,8	1,3	38997	3,50	196587	5,8	1,2	35259
5	3,49	43598	5,6	1,3	38416	3,50	194238	5,6	1,2	34965
6	3,48	43125	5,7	1,3	37749	3,50	190254	5,6	1,2	34910
TB	3,51	43524	5,7	1,3	38487	3,49	195849	5,6	1,2	35395
SD	0,03	225	0,1	0,1	423	0,01	3139	0,1	0,1	425
RSD%	0,88	0,52	1,32	1,92	1,10	0,36	1,60	1,82	1,14	1,20

## Mẫu giả lập

Lần đo	Mẫu giả lập nguyên liệu					Mẫu giả lập thành phẩm				
	$t_R$ (phút)	$S$ ( $\mu V \times$ giây)	$R_S$	$A_S$	$N$	$t_R$ (phút)	$S$ ( $\mu V \times$ giây)	$R_S$	$A_S$	$N$
1	3,49	365874	5,6	1,2	33896	3,52	665986	5,6	1,2	33680
2	3,51	369875	5,6	1,2	33727	3,51	664879	5,7	1,2	33987
3	3,50	359876	5,6	1,2	33568	3,48	663254	5,6	1,2	33568
4	3,55	351498	5,6	1,3	33458	3,52	668794	5,6	1,2	33124
5	3,60	361254	5,6	1,2	33215	3,50	661254	5,6	1,3	33215
6	3,50	369784	5,5	1,2	33554	3,46	661236	5,5	1,2	33698
TB	3,53	363027	5,6	1,2	33570	3,50	664587	5,6	1,2	33545
SD	0,039	4432	0,04	0,020	232	0,05	2936	0,1	0,1	324
RSD%	1,10%	1,22%	0,70%	1,60%	0,69%	1,50%	0,40%	1,08%	1,60%	0,96%

**Phụ lục 1.20.** Sắc ký đồ các mẫu phân tích khi thẩm định tính đặc hiệu phương pháp định lượng tạp captopril disulfid trong nguyên liệu và chế phẩm

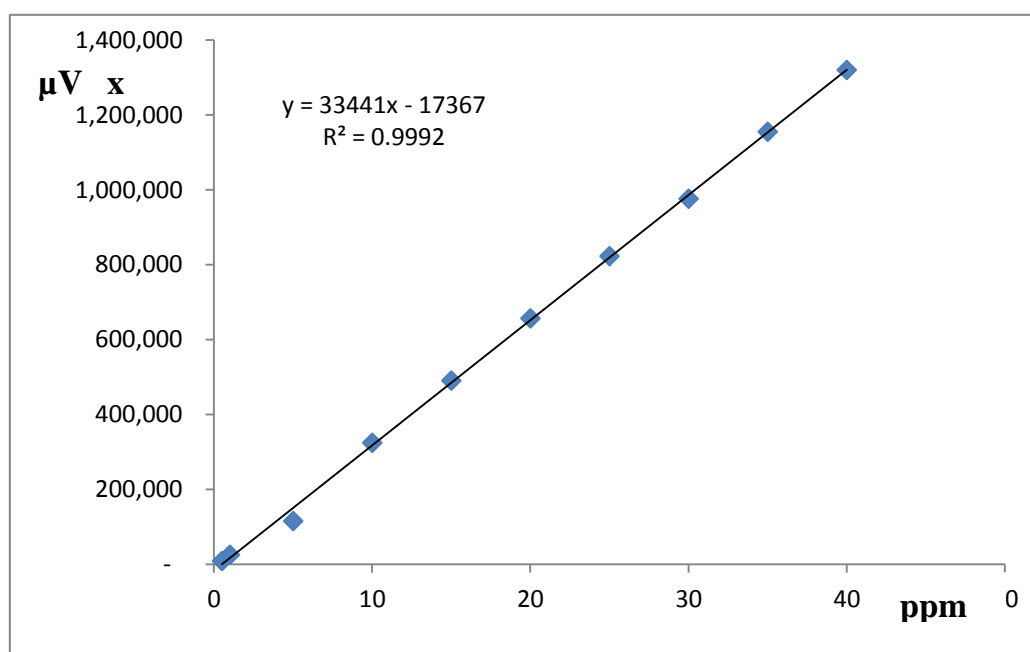






**Phụ lục 1.21.** Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của qui trình định lượng captopril disulfid trong nguyên liệu và thành phẩm

Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ , ppm)	Diện tích pic trung bình ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )	Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ , ppm)	Diện tích pic trung bình ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )
0,5	8789	20	656761
1	25403	25	822851
5	115557	30	976200
10	324446	35	1155121
15	490581	40	1320150



Đồ thị biểu diễn diện tích pic theo nồng độ captopril disulfid.

Khảo sát đường biểu diễn diện tích pic theo nồng độ captopril disulfid.

Xét hàm ANOVA bằng phần mềm MS excel:

- Kiểm tra tính thích hợp của phương trình hồi quy:  $F_S = 0,00016 < \alpha = 0,05 \Rightarrow$  phương trình hồi quy tương thích.
- Kiểm tra ý nghĩa của hệ số B và  $B_0$  bằng trắc nghiệm t (phân phối Student).

Giá trị P đối với hệ số B có  $t = 2,337 < 2,365 \Rightarrow$  hệ số B không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Giá trị P đối với hệ số  $B_0$  có  $t = 101,856 > 2,365 \Rightarrow$  hệ số  $B_0$  có ý nghĩa về mặt thống kê.

Như vậy phương trình hồi quy tuyến tính biểu diễn sự tương quan diện tích pic theo nồng độ phân tích của captopril disulfid là  $\hat{y} = 33441x$

Do giá trị  $R^2 = 0,9992$  nằm trong khoảng  $0,998 - 1,0029$  nên quy trình định lượng tạp captopril disulfid có khoảng tuyến tính từ  $0,5 - 40$  ppm.

- Giới hạn phát hiện và giới hạn định lượng

Kết quả thu được sau khi tiến hành sắc ký mẫu giả dược và mẫu chuẩn ở các nồng độ giảm dần như sau:

- Giới hạn phát hiện (LOD) của tạp captopril disulfid là  $0,17 \mu\text{g/ml}$ .
- Giới hạn định lượng (LOQ) của tạp captopril disulfid là  $0,50 \mu\text{g/ml}$ .

Tiêm lặp lại 6 lần mẫu chuẩn ở nồng độ tương ứng với LOQ để kiểm tra kết quả khảo sát. Số liệu cụ thể được trình bày trong bảng 3.38.

Giá trị S/N tại LOQ của tạp captopril disulfid (n=6)

Lần đo	N ( $\mu\text{V}$ )	S ( $\mu\text{V}$ )	S/N
1	10,8	98,9	9,2
2	10,6	97,6	9,2
3	10,9	95,9	8,8
4	9,8	98,4	10,0
5	8,5	97,6	11,5
6	9,2	99,2	10,8
Trung bình	9,7	97,90	10,11

*N*: chiều cao nhiễu đường nền của mẫu giả dược ngay tại thời gian lưu của captopril disulfid.

*S*: chiều cao pic captopril disulfid của mẫu chuẩn có nồng độ tương ứng với LOQ.

**Phụ lục 1.22. Kết quả khảo sát độ chính xác của qui trình định lượng tạp chất captopril disulfid trên mẫu thử và mẫu giả lập**

Ngày 1 (Độ lặp lại)						
Lần đo	Mẫu thử nguyên liệu			Mẫu thử giả lập nguyên liệu		
	S ( $\mu\text{Au} \times \text{giây}$ )	Captopril disulfid ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	HL % captopril disulfid	S ( $\mu\text{Au} \times \text{giây}$ )	Captopril disulfid ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	HL % captopril disulfid
1	43467	1,30	0,13	371035	11,10	1,11
2	43578	1,30	0,13	378950	11,33	1,13
3	43654	1,31	0,13	376452	11,26	1,13
4	43980	1,32	0,13	379250	11,34	1,13
5	43112	1,29	0,13	369872	11,06	1,11
6	43567	1,30	0,13	380071	11,37	1,14
TB	43559	1,30	0,13	375938	11,24	1,12
SD	281,06	0,01	0,001	4432	0,12	1,12
RSD	0,79%	0,79%	0,79%	1,07%	1,07%	1,07%
Ngày 2 và ngày 3 (Độ chính xác trung gian)						
Lần đo	Mẫu thử nguyên liệu			Mẫu thử giả lập nguyên liệu		
	S ( $\mu\text{Au} \times \text{giây}$ )	Captopril disulfid ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	HL % captopril disulfid	S ( $\mu\text{Au} \times \text{giây}$ )	Captopril disulfid ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	HL % captopril disulfid
1	44354	1,33	0,13	385697	11,53	1,15
2	44567	1,33	0,13	387450	11,59	1,16
3	44121	1,32	0,13	382160	11,43	1,14
4	44987	1,35	0,14	389785	11,66	1,17
5	44235	1,32	0,13	386560	11,56	1,16
6	44782	1,34	0,13	380079	11,37	1,14
7	44424	1,33	0,13	378697	11,32	1,13
8	44647	1,34	0,13	379450	11,35	1,14
9	44211	1,32	0,13	373164	11,16	1,12
10	45087	1,35	0,14	379785	11,36	1,14
11	44345	1,33	0,13	375563	11,23	1,12
12	44902	1,34	0,13	368079	11,01	1,10
TB	44555	1,33	0,13	380539	11,38	1,14
SD	325	0,01	0,11	6313	0,19	0,19
RSD	0,81%	0,81%	0,81%	1,66%	1,66%	1,66%

PL-37

Lần đo

Ngày 1 (Độ lặp lại)

	Mẫu thử chế phẩm			Mẫu thử giả lập chế phẩm		
	S ( $\mu\text{Au} \times \text{giây}$ )	Captopril disulfid ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	HL % captopril disulfid	S ( $\mu\text{Au} \times \text{giây}$ )	Captopril disulfid ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	HL % captopril disulfid
1	197425	5,90	0,59	675986	20,21	2,02
2	195623	5,85	0,59	676978	20,24	2,02
3	197425	5,90	0,59	678512	20,29	2,03
4	190236	5,69	0,57	685965	20,51	2,05
5	197458	5,90	0,59	679853	20,33	2,03
6	193260	5,78	0,58	689478	20,62	2,01
TB	195238	5,84	0,58	681129	20,37	2,03
SD	2952	0,09	0,01	5390	0,16	0,02
RSD	1,47%	1,47%	1,47%	0,80%	0,80%	0,80%

Ngày 2 và ngày 3 (Độ chính xác trung gian)

Lần đo	Mẫu thử chế phẩm			Mẫu thử giả lập chế phẩm		
	S ( $\mu\text{Au} \times \text{giây}$ )	Captopril disulfid ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	HL % captopril disulfid	S ( $\mu\text{Au} \times \text{giây}$ )	Captopril disulfid ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	HL % captopril disulfid
1	197525	5,91	0,59	674986	20,18	2,02
2	195823	5,86	0,59	674978	20,18	2,02
3	197725	5,91	0,59	675512	20,20	2,02
4	190636	5,70	0,57	681965	20,39	2,04
5	197958	5,92	0,59	674853	20,18	2,02
6	193860	5,80	0,58	683478	20,44	2,04
7	195486	5,85	0,59	674244	20,16	2,02
8	192541	5,76	0,58	674130	20,16	2,02
9	197854	5,92	0,59	674558	20,17	2,02
10	195487	5,85	0,59	680905	20,36	2,04
11	185246	5,54	0,55	673687	20,15	2,01
12	197845	5,92	0,59	682206	20,40	2,04
TB	194832	5,83	0,58	677125	20,25	2,02
SD	3827	0,12	0,01	3772	0,11	0,01
RSD	1,97%	1,97%	1,97%	0,56%	0,56%	0,56%

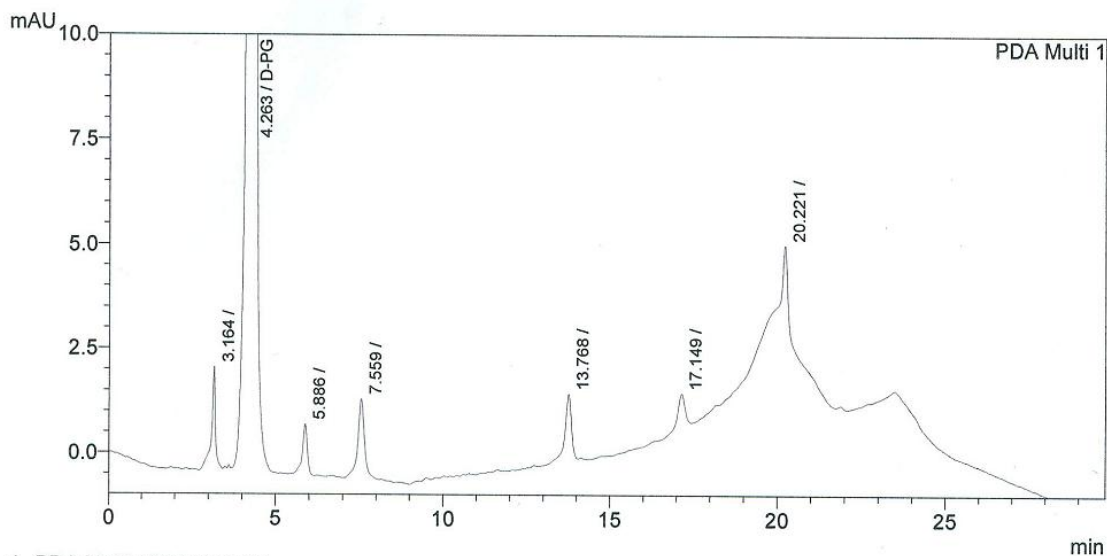


**Phụ lục 1.24.** Kết quả khảo sát độ đúng của qui trình định lượng tạp captopril disulfid trong mẫu giả dược được thêm nguyên liệu captopril và chuẩn captopril disulfid

Mẫu	Tỷ lệ thêm chuẩn (%)	Khối lượng giả dược cân (mg)	Khối lượng nguyên liệu cân (mg)	Tổng khối lượng giả dược và nguyên liệu	Hàm lượng CPDS trong 1 viên captopril 25 mg giả lập (mg)	Thể tích dung dịch CPDS chuẩn 100 µg/mL thêm vào (mL)	Hàm lượng CPDS chuẩn thêm vào (mg)	Diện tích pic sau khi thêm chuẩn (µV x s)	Nồng độ CPDS tìm lại (µg/mL)	Tổng hàm lượng CPDS tìm lại (mg)	Hàm lượng CPDS tìm lại (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)
1	80	250,2	50,2	300,4	0,033	7,9	0,79	585124	17,4	0,87	0,80	101,20
2		250,5	50,6	301,1	0,033	8,0	0,80	581566	17,4	0,87	0,80	100,47
3		250,6	50,9	301,5	0,033	8,1	0,81	589210	17,8	0,89	0,82	101,85
4	100	250,4	50,1	300,5	0,033	10,2	1,02	722680	22,2	1,11	1,04	101,54
5		250,2	50,4	300,6	0,033	9,9	0,99	723476	21,6	1,08	1,01	101,62
6		250,7	50,7	301,4	0,033	10,0	1,00	708688	21,2	1,06	0,99	99,37
7	120	250,9	50,5	301,4	0,033	12,1	1,21	856123	25,8	1,29	1,22	101,20
8		250,1	50,3	300,4	0,033	12,0	1,20	857233	25,8	1,29	1,22	101,36
9		250,0	50,8	300,8	0,033	11,8	1,18	857026	25,4	1,27	1,20	101,28
TB												101,10
SD												0,753
RSD												<b>0,74%</b>

**Phụ lục 2. 7-ADCA và D-phenylglycin**

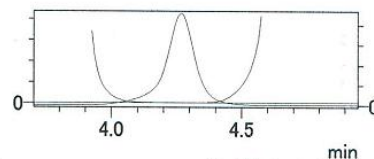
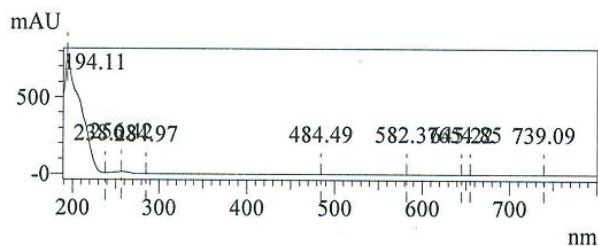
**Phụ lục 2.1. Kết quả xác định độ tinh khiết của chất rắn A2**



1 PDA Multi 1/220nm 4nm

Spectrum  
 ID# : 1  
 Retention Time : 4.263  
 Compound Name : D-PG  
 Spectrum Operation : None

Purity  
 ID# : 1  
 Retention Time : 4.263  
 Compound Name : D-PG



Impurity : Not Detected  
 Peak purity index : 1.000000  
 Single point threshold : 0.999880  
 Minimum peak purity index : 120

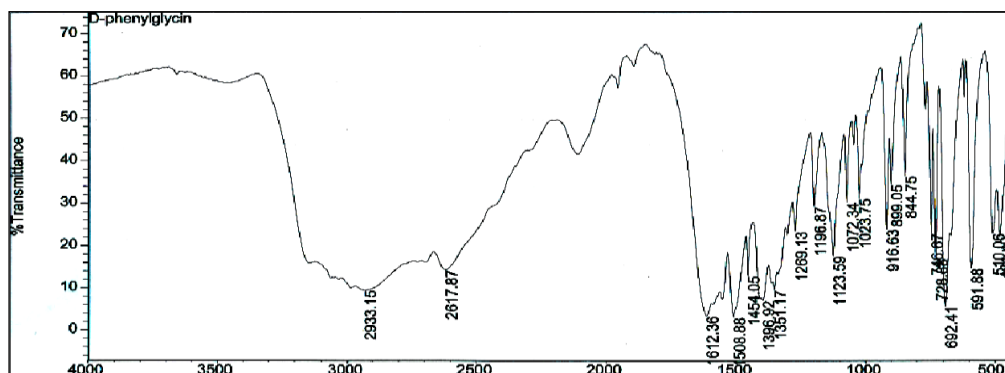
Summary(Compound)

<< PDA >>

ID#1 Compound Name: D-PG

Sample Name	Resolution	Ret. Time	Area	Area %	Tailing Factor (10%)
thu	5.618	4.263	1584574	93.508	0.910

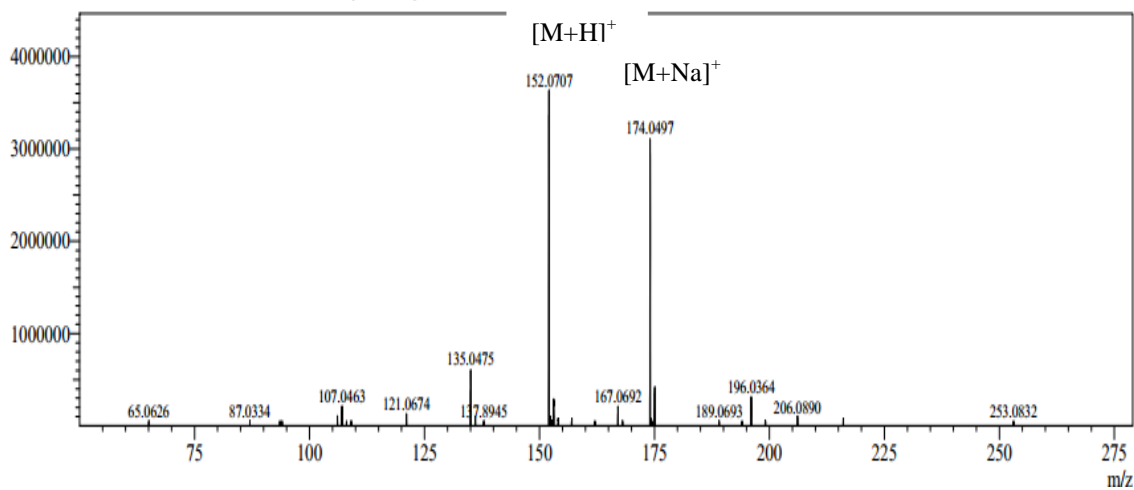
**Phụ lục 2.2. Phổ IR chất A (D-phenylglycin)**



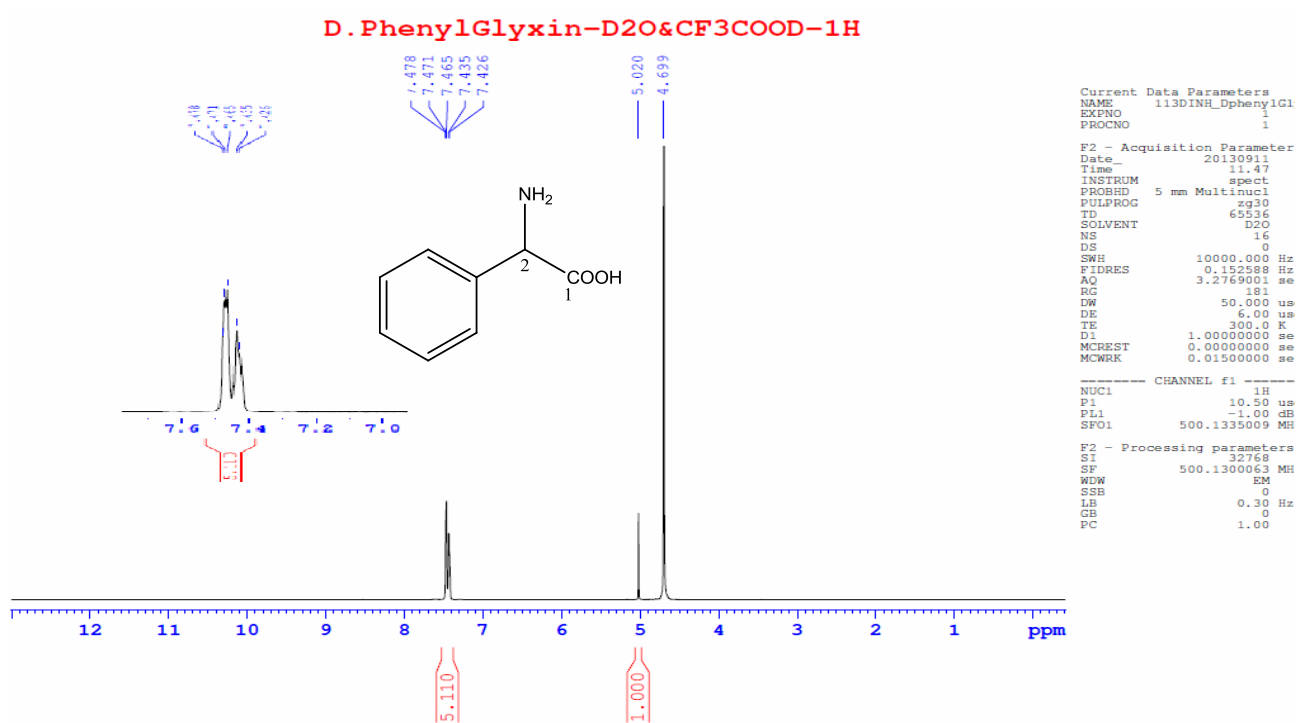
**Phụ lục 2.3. Phổ MS chất A (D-phenylglycin)**

<Spectrum>

MSMS: Precursor m/z ----- /+ Base Peak 152.07(3364303)

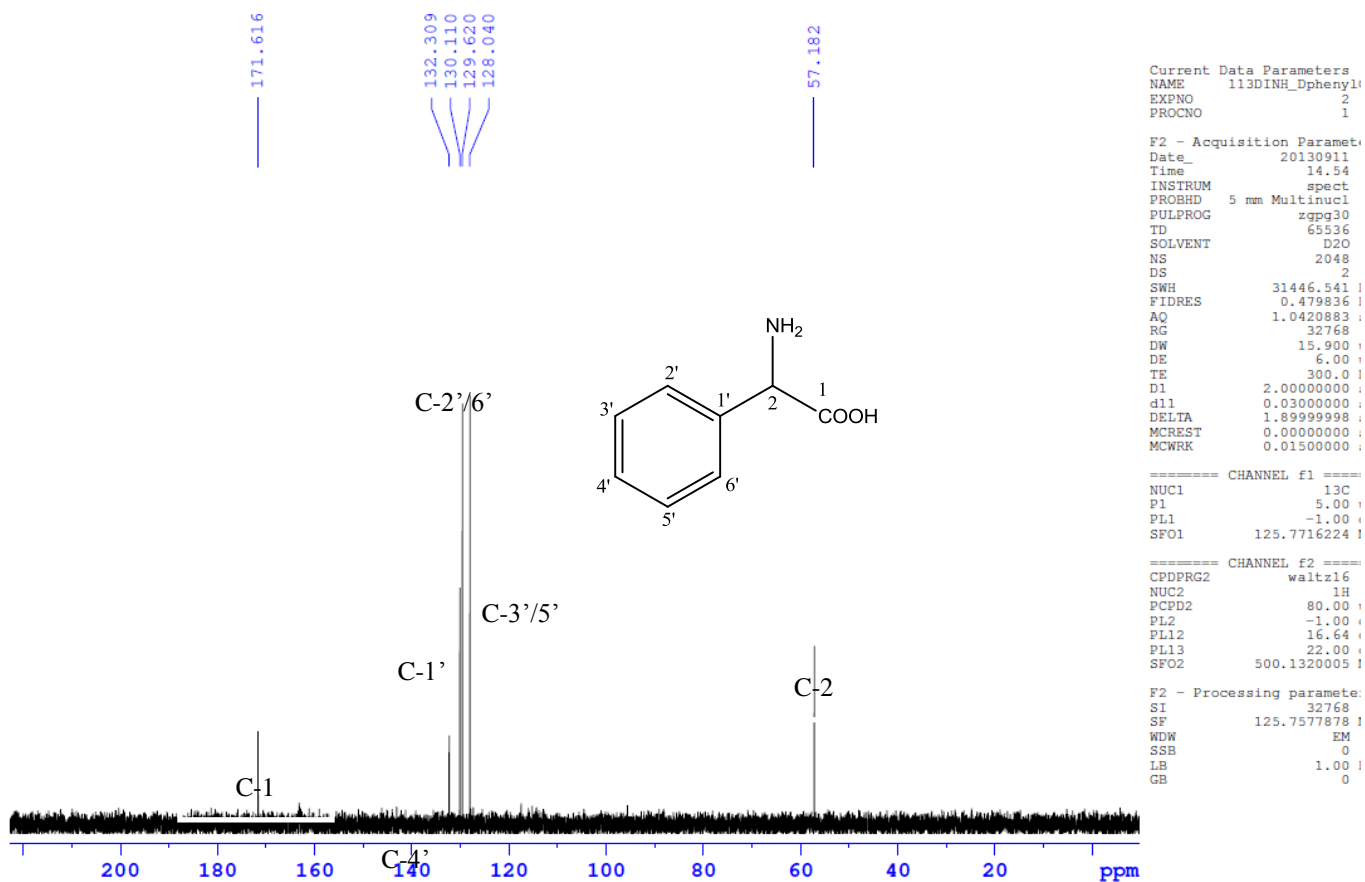




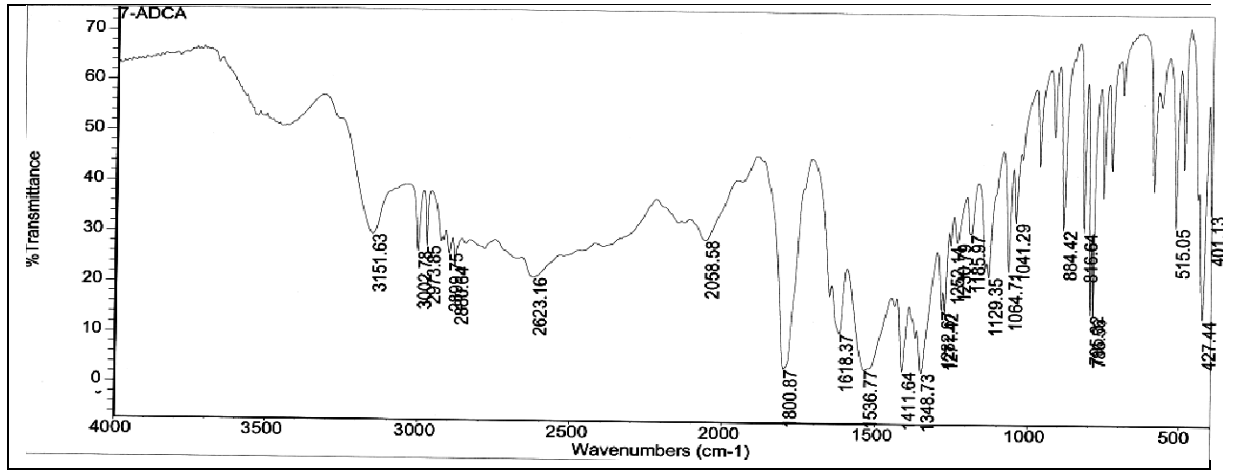
**Phụ lục 2.4. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  chất A (D-phenylglycin)**

Phụ lục 2.5. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR chất A (*D*-phenylglycin)

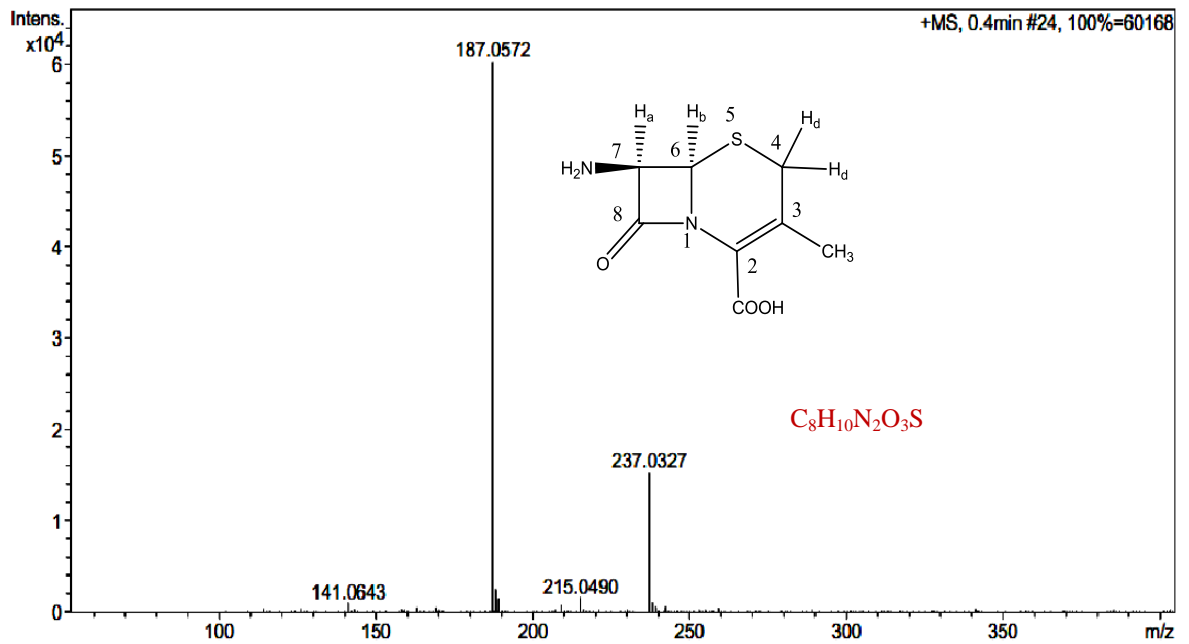
D. PhenylGlyxin-D2O&CF3COOD-C13CPD



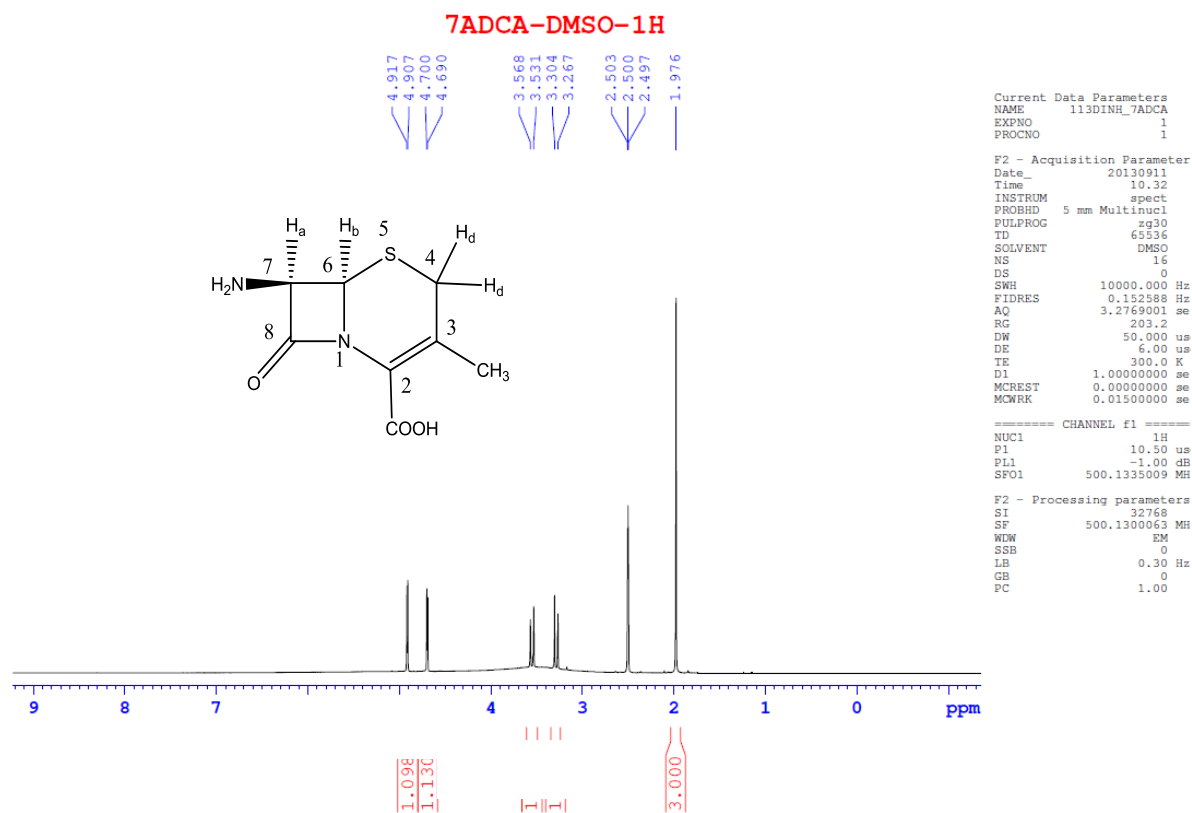
**Phụ lục 2.6. Phổ IR chất B (7-ADCA)**



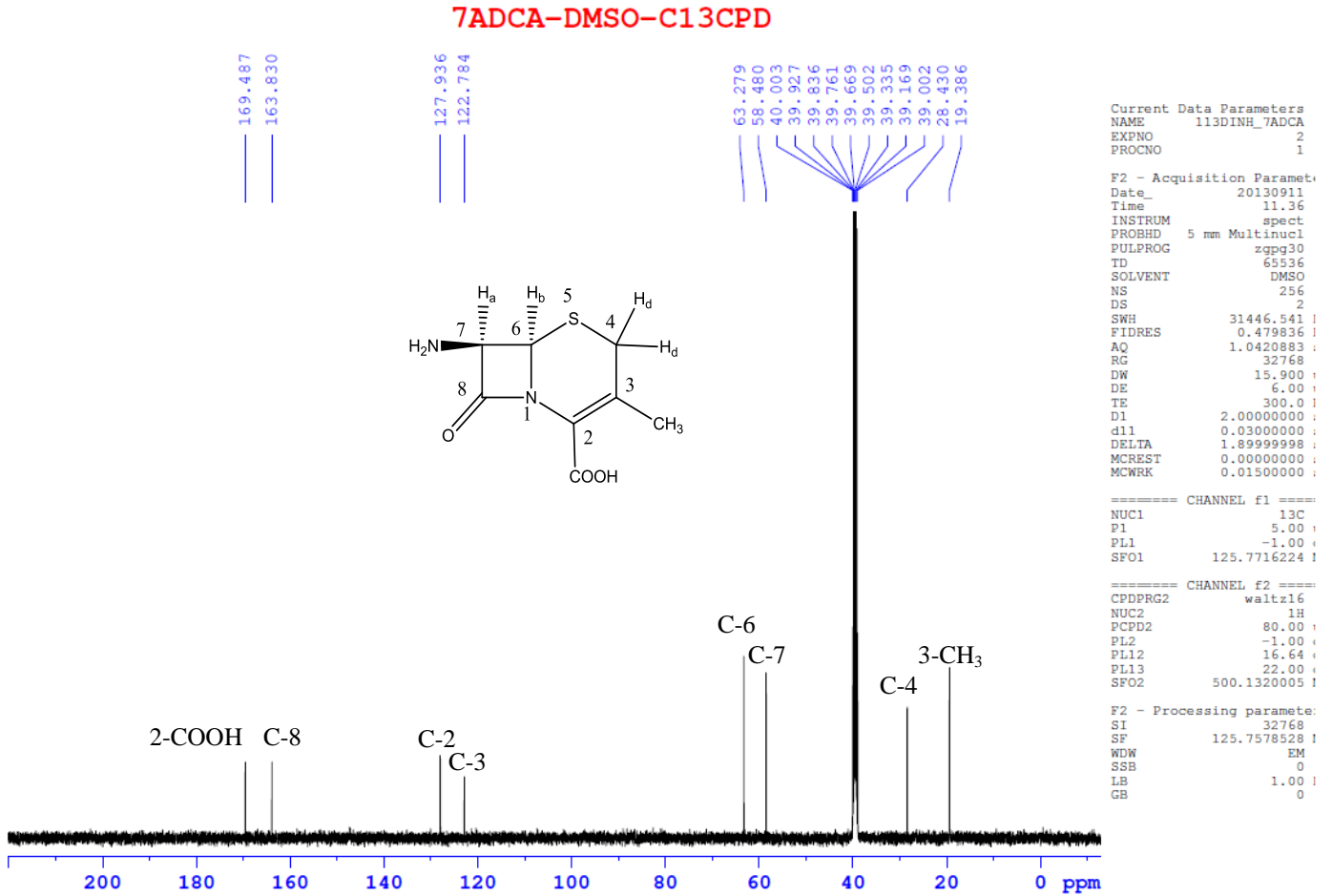
**Phụ lục 2.7. Phổ MS chất B (7-ADCA)**



Phụ lục 2.8. Phổ  $^1\text{H}$  NMR chất B (7-ADCA)



Phụ lục 2.9. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR chất B (7-ADCA)

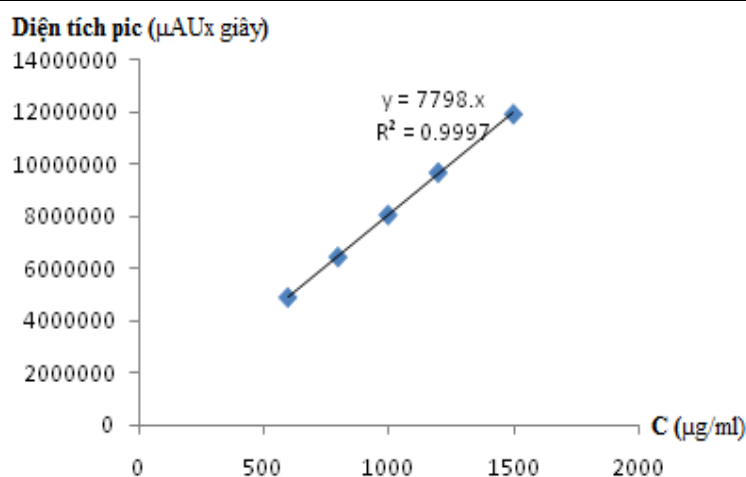


**Phụ lục 2.10.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D-phenylglycin

Số lần tiêm mẫu	t <sub>R</sub> (phút)	S (μAU x giây)	A <sub>S</sub>	R <sub>S</sub>	N
1	4,486	8504332	1,0	5,9	27580
2	4,507	8508282	1,0	6,0	27792
3	4,505	8506245	1,0	5,8	27540
4	4,504	8425473	1,0	5,6	28064
5	4,508	8428147	1,0	5,6	28296
6	4,505	8456511	1,1	5,5	28032
Trung bình	4,503	8404831	1,0	5,7	27884
<b>RSD</b>	<b>0,22%</b>	<b>1,74%</b>			<b>1,26 %</b>

**Phụ lục 2.11.** Kết quả khảo sát miền giá trị của qui trình xác định độ tinh khiết tạp *D*-phenylglycin

Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Diện tích pic ( $\mu\text{AU} \times \text{giây}$ )
600	4919075
800	6458525
1000	8463002
1200	9675610
1500	11905386



Đường biểu diễn diện tích pic theo nồng độ phân tích của *D*-phenylglycin

**Khảo sát đường biểu diễn diện tích pic theo nồng độ phân tích của tạp chất A**

Độ dốc:  $B_0 = 7798$ , tung độ gốc:  $B = 249132$ , bình phương của hệ số tương quan:

$R^2 = 0,9997$ , do đó chấp nhận sự tuyến tính.

- Kiểm tra ý nghĩa của các hệ số trong phương trình hồi quy:

Giá trị  $P$  đối với hệ số  $B_0$  là  $1,89 \cdot 10^{-6} < \alpha = 0,05 \Rightarrow$  hệ số  $B_0$  có ý nghĩa về mặt thống kê. Giá trị  $P$  đối với hệ số  $B$  là  $0,062 > \alpha = 0,05 \Rightarrow$  hệ số  $B$  không có ý nghĩa về mặt thống kê.

Như vậy, khoảng tuyến tính của qui trình xác định độ tinh khiết tạp chất A là 600 – 1500  $\mu\text{g/ml}$ . Phương trình hồi quy tuyến tính biểu diễn sự tương quan diện tích pic theo nồng độ phân tích của tạp chất A là  $\hat{y} = 7798x$ .

**Phụ lục 2.12.** Kết quả khảo sát độ chính xác của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D-phenylglycin

Số lần đo	Độ lặp lại		Độ chính xác trung gian	
	Diện tích pic ( $\mu$ AU x giây)	Độ tinh khiết tạp A (% diện tích pic)	Diện tích pic ( $\mu$ AU x giây)	Độ tinh khiết tạp A (% diện tích pic)
1	8552055	99,97	8559763	99,90
2	8523126	99,97	8502035	99,91
3	8485780	99,94	8552055	99,98
4	8533870	99,67	8536621	99,97
5	8545550	99,96	8556981	99,96
6	8547177	99,94	8506678	99,94
7	8483109	99,91	8457974	99,93
8	8469744	99,91	8471473	99,97
9	8318939	99,79	8533870	99,96
10	8303171	99,80	8554236	99,95
11	8559136	100,00	8559136	99,93
12	8483109	99,91	8534055	99,84
Trung bình	8483730	99,89	8493739	99,94
<b>RSD</b>	<b>1,02%</b>	<b>0,09%</b>	<b>0,60%</b>	<b>0,04%</b>



**Phụ lục 2.13.** Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình xác định độ tinh khiết tạp D-phenylglycin

Mức nồng độ đo (%)	D-phenylglycin			
	Diện tích pic ( $\mu$ AU x giây)	Nồng độ đo ở các mức ( $\mu$ g/ml)	Nồng độ ( $\mu$ g/ml) tính từ phương trình hồi quy	Tỷ lệ hồi phục %
80%	6448230	808,34	826,91	101,83
	6398124	808,34	820,48	
	6410333	808,34	822,05	
100%	8536201	1028,72	1056,19	101,05
	8536593	1028,72	1030,60	
	8546791	1028,72	1031,90	
120%	9567986	1212,86	1226,98	101,17
	9552006	1212,86	1224,93	
	9586888	1212,86	1229,40	
<b>TB (%)</b>				<b>101,35</b>

**Phụ lục 2.14.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ tạp *D*-phenylglycin

Kết quả xác định độ tinh khiết tạp *D*-phenylglycin trong quá trình đóng lọ

Mẫu	Diện tích pic ( $\mu$ AU x giây)	% diện tích pic	Xử lý thống kê
3	8659763	99,90	n = 6; $x_{TB} = 99,94\%$ ; SD = 0,03; RSD = 0,03% (với t = 2,57; p = 0,95)
8	8602035	99,91	
14	8552055	99,98	
19	8536621	99,47	
22	8556981	99,96	
26	8606678	99,93	

Phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA để đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ (tạp *D*-phenylglycin)

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	$F_{tn}$	$F_{tc}$
Giữa các nhóm	0,056311	5	0,0113	0,79	3,11
Trong từng nhóm	0,171067	12	0,0143		
Tổng cộng	0,586	17			

Nhận xét:  $F_{tn} = 0,79 < F_{tc} = 3,11$ . Vậy các lọ trong quá trình đóng đồng nhất.

**Phụ lục 2.15. Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ tạp D-phenylglycin liên phòng thí nghiệm**

Kết quả định lượng tạp D-phenylglycin tại hai phòng thí nghiệm

<b>STT</b>	<b>PTN 1 Độ tinh khiết %</b>	<b>PTN 2 Độ tinh khiết %</b>
1	99,84	99,90
2	99,95	99,91
3	99,96	99,98
4	99,97	99,97
5	99,93	99,96
6	99,94	99,94

Việc đánh giá độ đồng nhất lọ giữa 2 phòng thí nghiệm được thực hiện bằng cách áp dụng phương pháp thống kê phân tích phương sai một yếu tố, so sánh 2 giá trị  $F_{tn}$  và  $F_{tc}$ .

Kết quả phân tích ANOVA đánh giá độ đồng nhất lọ giữa 2 phòng thí nghiệm

<b>Nguồn sai số</b>	<b>Tổng bình phương</b>	<b>Bậc tự do</b>	<b>Bình phương trung bình</b>	<b><math>F_{tn}</math></b>	<b><math>F_{tc}</math></b>
Giữa các nhóm	0,000408	1	0,000408	0,249	4,964
Trong từng nhóm	0,016417	10	0,001642		
Tổng cộng	0,016825	11			

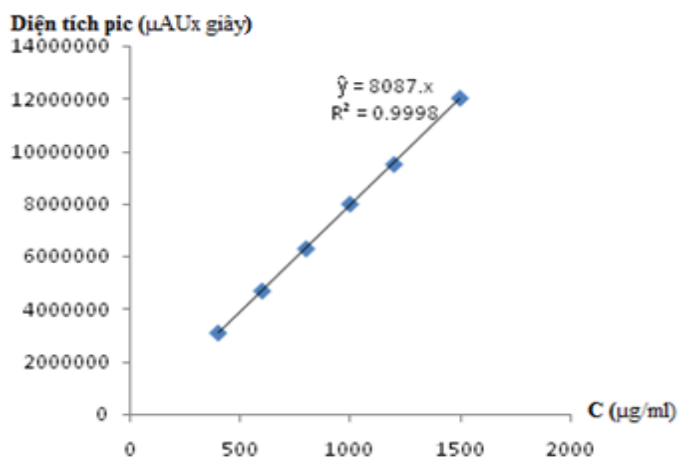
$F_{tn} = 0,249 < F_{tc} = 4,964$ . Vậy kết quả định lượng giữa 2 phòng thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê. Qui trình phân tích có độ lặp lại cao, độ tinh khiết chất phân tích không phụ thuộc vào phòng thí nghiệm tham gia đánh giá.

**Phụ lục 2.16.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA

Số lần tiêm mẫu	t <sub>R</sub> (phút)	S (μAU x giây)	A <sub>S</sub>	R <sub>S</sub> (pic tạp chất B và pic DM pha mẫu)	N
1	3,809	7852965	1,1	5,8	16404
2	3,818	7852153	1,1	5,6	16396
3	3,800	7960950	1,1	5,2	16572
4	3,799	7944144	1,1	5,9	15632
5	3,813	7827864	1,1	5,4	15980
6	3,902	7819486	1,1	5,4	15800
Trung bình	3,824	7876260	1,1	5,6	16128
<b>RSD</b>	<b>1,02%</b>	<b>0,77%</b>			<b>2,35%</b>

**Phụ lục 2.17. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của qui trình xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA**

Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ )	Diện tích pic ( $\mu\text{AU} \times \text{giây}$ )
400	3106241
600	4701733
800	6302479
1000	7996543
1200	9501621
1500	12013861



Đường biểu diễn diện tích pic theo nồng độ 7-ADCA

Bình phương của hệ số tương quan:  $R^2 = 0,9998$ .

$0,995 \leq R^2 \leq 1$ , do đó chấp nhận sự tuyến tính.

- Kiểm tra ý nghĩa của hệ số B và  $B_0$  bằng trắc nghiệm t (phân phối Student).

Phương trình hồi quy có:

Hệ số B có  $P = 0,063 > 0,05$  nên hệ số B không có ý nghĩa.

Hệ số  $B_0$  có  $P = 8,32 \cdot 10^{-9} < 0,05$  nên hệ số  $B_0$  có ý nghĩa.

Như vậy, miền giá trị của qui trình xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA là 400 – 1500  $\mu\text{g/ml}$ . Phương trình hồi quy tuyến tính biểu diễn sự tương quan diện tích pic theo nồng độ phân tích của tạp 7-ADCA là  $\hat{y} = 8087x$ .

**Phụ lục 2.18.** Kết quả khảo sát độ chính xác của qui trình xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA

Số lần đo	Độ chính xác		Độ chính xác trung gian	
	Diện tích pic ( $\mu$ AU x giây)	Độ tinh khiết tạp A (% diện tích pic)	Diện tích pic ( $\mu$ AU x giây)	Độ tinh khiết tạp A (% diện tích pic)
1	7947169	99,92	7963838	99,92
2	7852331	99,82	7857210	99,88
3	7866751	99,84	7855665	99,80
4	7990635	99,91	7935518	99,92
5	7997479	99,91	7933031	99,94
6	8001516	99,92	7823813	99,91
7	7819485	99,91	7951741	99,92
8	7827864	99,93	7869944	99,84
9	7944144	99,94	7974046	99,91
10	7960950	99,92	7977062	99,91
11	7852153	99,85	7830456	99,93
12	7852965	99,88	7865291	99,82
Trung bình	7909453	99,89	7930134	99,89
<b>RSD</b>	<b>0,89%</b>	<b>0,04%</b>	<b>0,73%</b>	<b>0,05%</b>

**Phụ lục 2.19.** Kết quả khảo sát độ đúng của qui trình xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA

Mức nồng độ đo (%)	7-ADCA			Tỷ lệ hồi phục %
	Diện tích pic ( $\mu\text{AU} \times \text{giây}$ )	Nồng độ đo ở các mức ( $\mu\text{g/ml}$ )	Nồng độ ( $\mu\text{g/ml}$ ) tính từ phương trình hồi quy	
80%	6263103	790,14	778,41	99,06
	6308747	790,14	784,08	
	6320677	790,14	785,57	
100%	7996777	1002,46	988,84	98,58
	7987080	1002,46	987,64	
	7990734	1002,46	988,10	
120%	9530015	1198,78	1178,43	98,29
	9523903	1198,78	1177,68	
	9533222	1198,78	1178,83	
<b>TB (%)</b>				<b>98,64</b>

**Phụ lục 2.20.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ tạp 7-ADCA

Kết quả xác định độ tinh khiết tạp 7-ADCA trong quá trình đóng lọ

Số thứ tự lọ	Diện tích pic ( $\mu\text{AU} \times \text{giây}$ )	% diện tích pic	Xử lý thống kê
8	7852965	99,88	$n = 6$ ; $x_{\text{TB}} = 99,90\%$ ; $SD = 0,01$ ; $RSD = 0,01\%$ (với $t = 2,57$ ; $p = 0,95$ )
13	7852153	99,85	
17	7960950	99,92	
20	7944144	99,94	
32	7827864	99,93	
48	7819485	99,91	

Phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA để đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ (tạp 7-ADCA)

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	$F_{tn}$	$F_{tc}$
Giữa các nhóm	0,011520	5	0,0023	1,29	3,11
Trong từng nhóm	0,021325	12	0,001777		
Tổng cộng	0,032845	17			

Nhận xét:  $F_{tn} = 1,29 < F_{tc} = 3,11$ . Vậy các lọ trong quá trình đóng đồng nhất.

**Phụ lục 2.21.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ tạp 7-ADCA liên phòng thí nghiệm  
Kết quả định lượng tạp 7-ADCA tại ba phòng thí nghiệm

Mẫu	PTN1 Độ tinh khiết %	PTN2 Độ tinh khiết %	PTN3 Độ tinh khiết %
1	99,88	99,91	99,91
2	99,80	99,93	99,93
3	99,92	99,94	99,94
4	99,94	99,92	99,92
5	99,93	99,80	99,80
6	99,92	99,89	99,89
Trung bình	99,90	99,90	99,90

Việc đánh giá độ đồng nhất lọ giữa các phòng thí nghiệm được thực hiện bằng cách áp dụng phương pháp thống kê phân tích phương sai một yếu tố, so sánh 2 giá trị  $F_{tn}$  và  $F_{tc}$ .

Kết quả phân tích ANOVA đánh giá độ đồng nhất lọ giữa các phòng thí nghiệm

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	$F_{tn}$	$F_{tc}$
Giữa các nhóm	0	2	0	0	3,682
Trong từng nhóm	0,03985	15	0,002657		
Tổng cộng	0,03985	17			

$F_{tn} = 0 < F_{tc} = 3,682$ . Vậy kết quả định lượng giữa các phòng thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê. 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.



**Phụ lục 2.22.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch đối chiếu (5) ( $n=6$ ) của qui trình định lượng tạp chất 7-ADCA và D-phenylglycin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa cephalixin

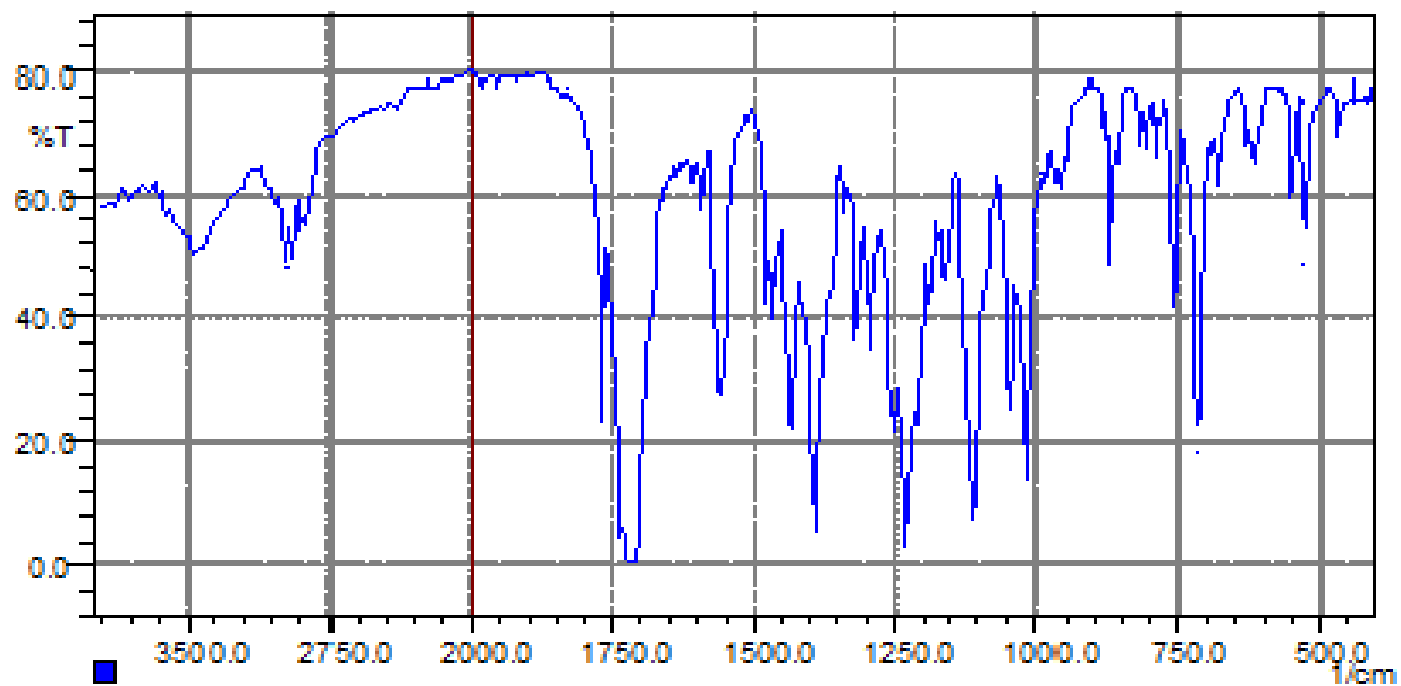
n	Dung dịch đối chiếu (5)						$R_{\text{cefotaxim/cefalexin}}$
	Cefotaxim			cefalexin			
	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	
1	488,210	17,455	0,9	350,665	14,828	1,0	4,7
2	490,102	17,478	0,9	351,257	14,828	1,0	4,8
3	489,351	17,391	0,9	348,861	14,841	1,1	4,7
4	488,775	17,440	0,9	350,710	14,839	1,0	4,7
5	490,116	17,389	0,9	352,409	14,839	1,0	4,7
6	487,869	17,462	0,9	349,116	14,832	1,0	4,8
<b>TB</b>	489,071	17,436	0,9	350,503	14,835	1,0	4,7
<b>RSD (%)</b>	0,19	0,22	1,65	0,38	0,04	1,50	1,09

**Phụ lục 2.23.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch đối chiếu (3) ( $n=6$ ) của qui trình định lượng tạp chất 7-ADCA và D-phenylglycin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa cephalixin

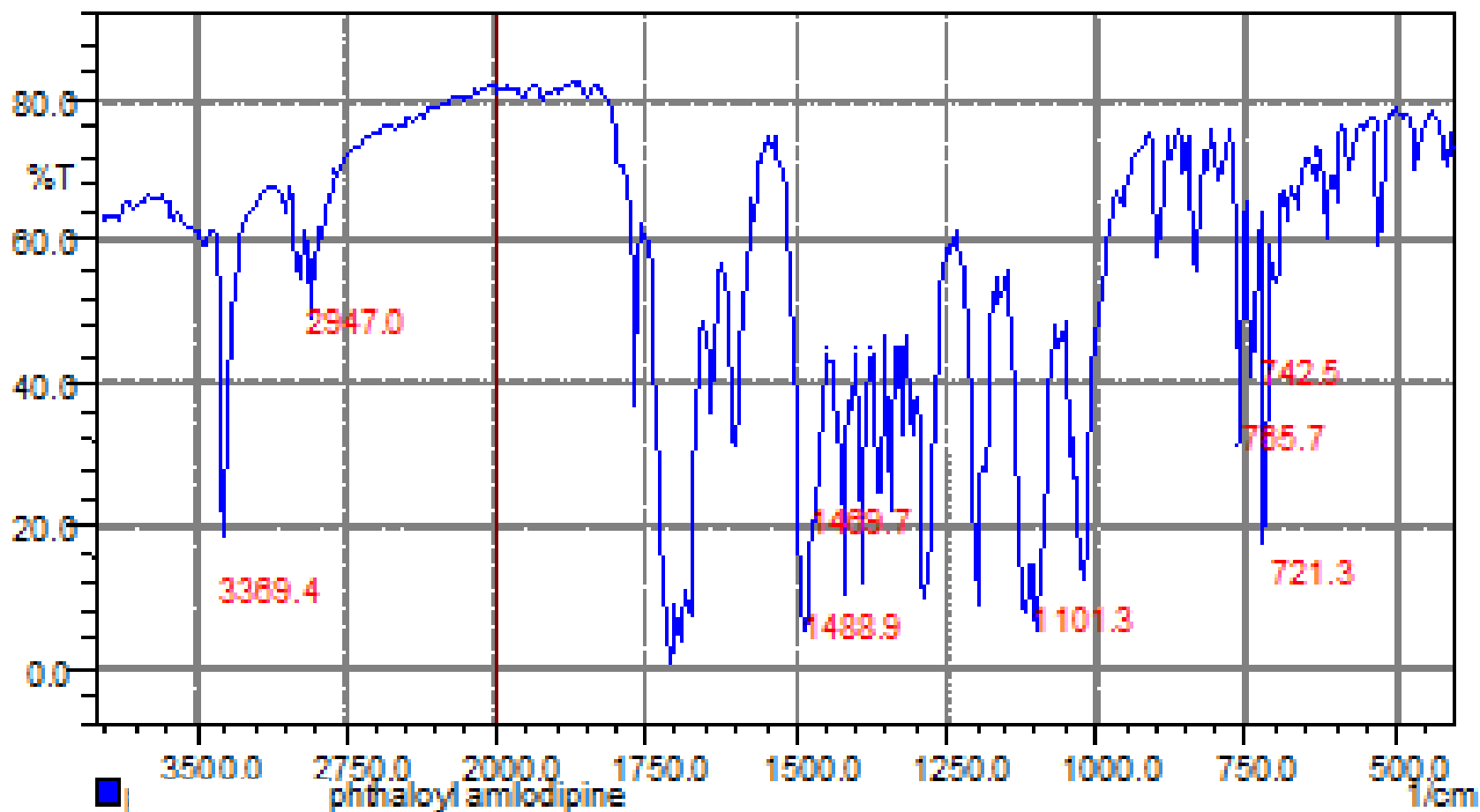
n	Dung dịch đối chiếu (3)						$R_{7\text{-ADCA/D-phenylglycin}}$
	D-phenylglycin			7-ADCA			
	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	
1	318,076	2,747	1,0	210,663	3,386	0,9	2,4
2	319,152	2,738	1,0	213,381	3,372	0,9	2,4
3	315,787	2,749	1,0	209,359	3,396	0,9	2,5
4	317,621	2,74	1,0	212,364	3,391	0,9	2,4
5	318,445	2,745	1,0	209,765	3,389	0,9	2,4
6	318,98	2,735	1,0	211,272	3,385	0,9	2,4
<b>TB</b>	318,010	2,742	1,0	211,134	3,387	0,9	2,4
<b>RSD (%)</b>	0,39	0,20	1,45	0,73	0,24	0,67	1,70

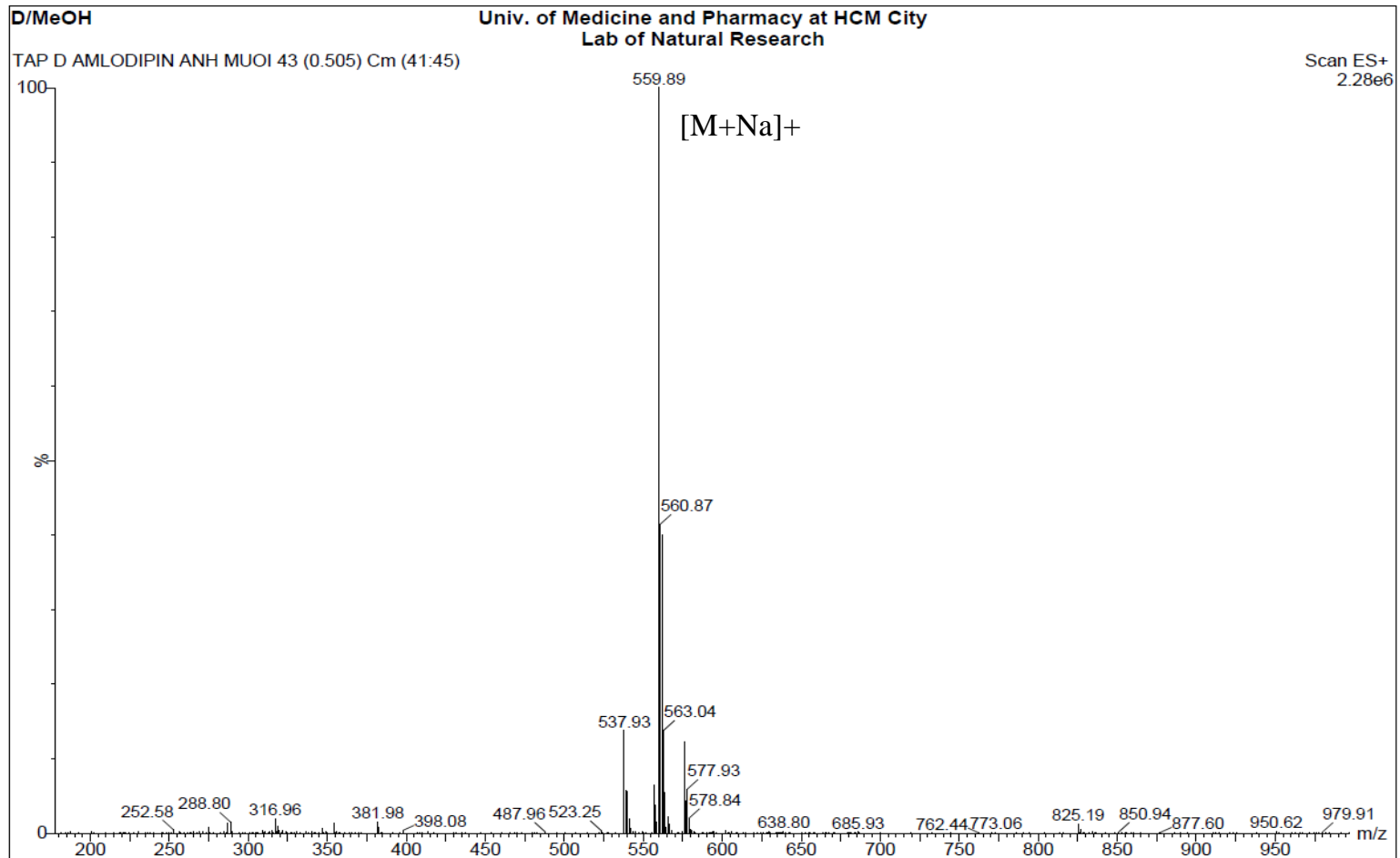
**Phụ lục 2.24.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch đối chiếu (4) ( $n=6$ ) của qui trình định lượng tạp chất 7-ADCA và D-phenylglycin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa cephalixin

n	Dung dịch đối chiếu (4)						$R_{7\text{-ADCA/D-phenylglycin}}$
	D-phenylglycin			7-ADCA			
	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	
1	16,132	2,733	1,0	10,310	3,351	1,0	2,3
2	16,405	2,733	1,0	10,134	3,347	1,0	2,3
3	16,414	2,730	1,0	10,149	3,346	1,1	2,3
4	16,335	2,728	1,0	10,165	3,35	1,0	2,3
5	16,347	2,733	1,0	10,209	3,341	1,0	2,4
6	16,215	2,73	1,0	10,221	3,345	1,0	2,3
<b>TB</b>	16,308	2,731	1,0	10,198	3,347	1,0	2,3
<b>RSD (%)</b>	0,69	0,08	0,82	0,63	0,11	1,50	1,76

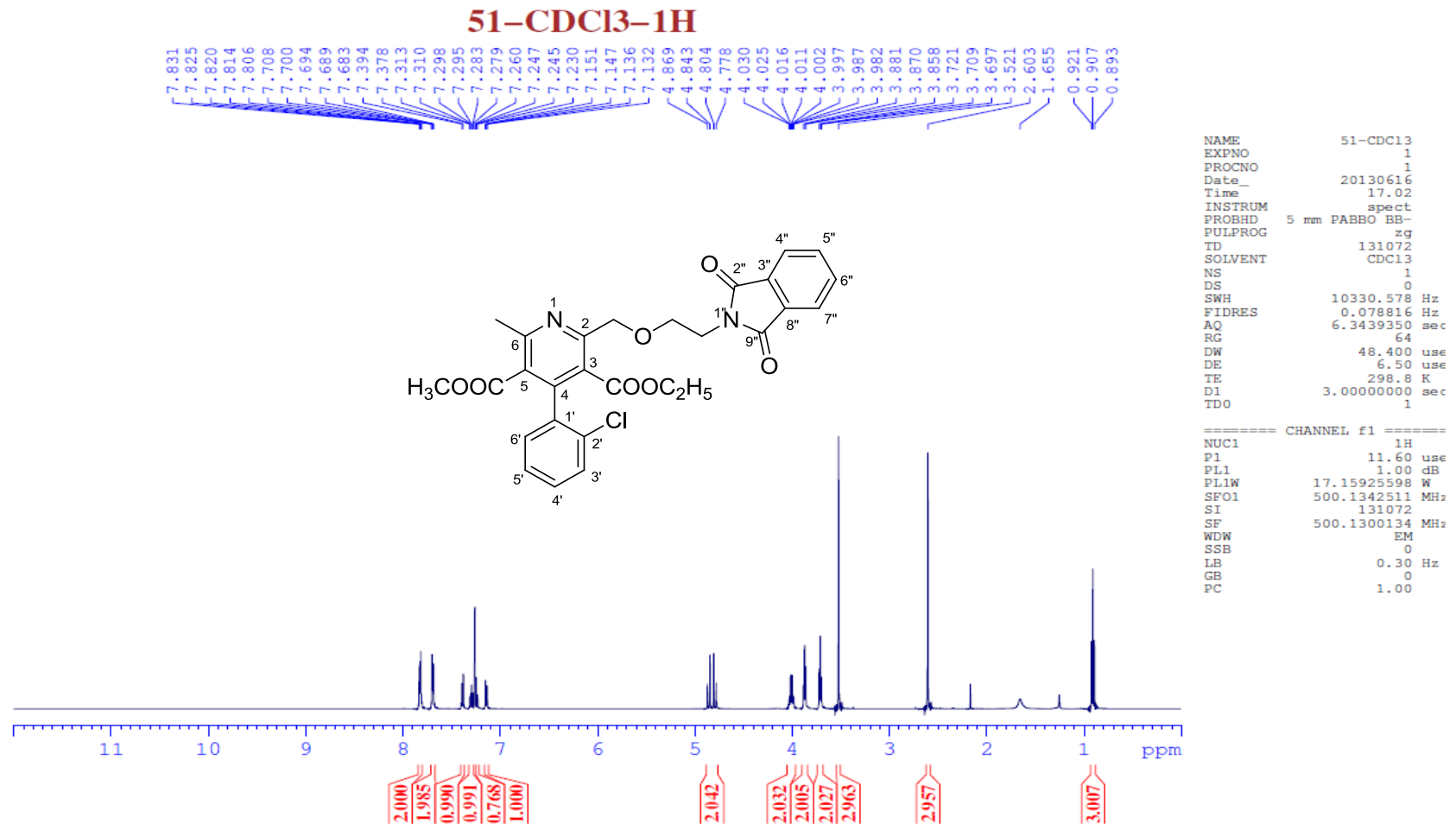
**Phụ lục 3. Tạng D của amlodipin****Phụ lục 3.1. Phổ IR của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (2)**

Phụ lục 3.2. Phổ IR của phthaloyl amlodipin (1)

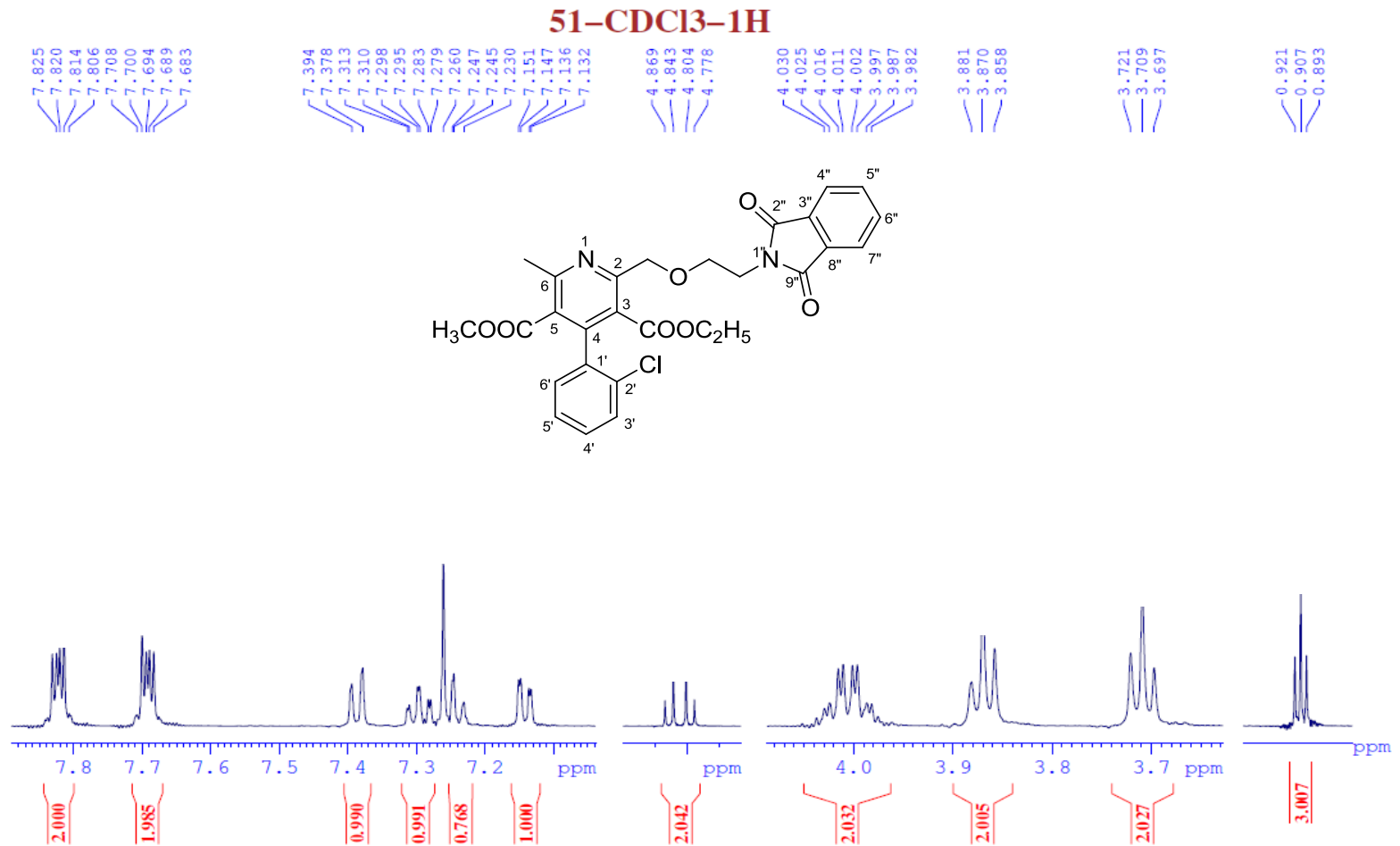


**Phụ lục 3.3.** Phổ MS của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (2)

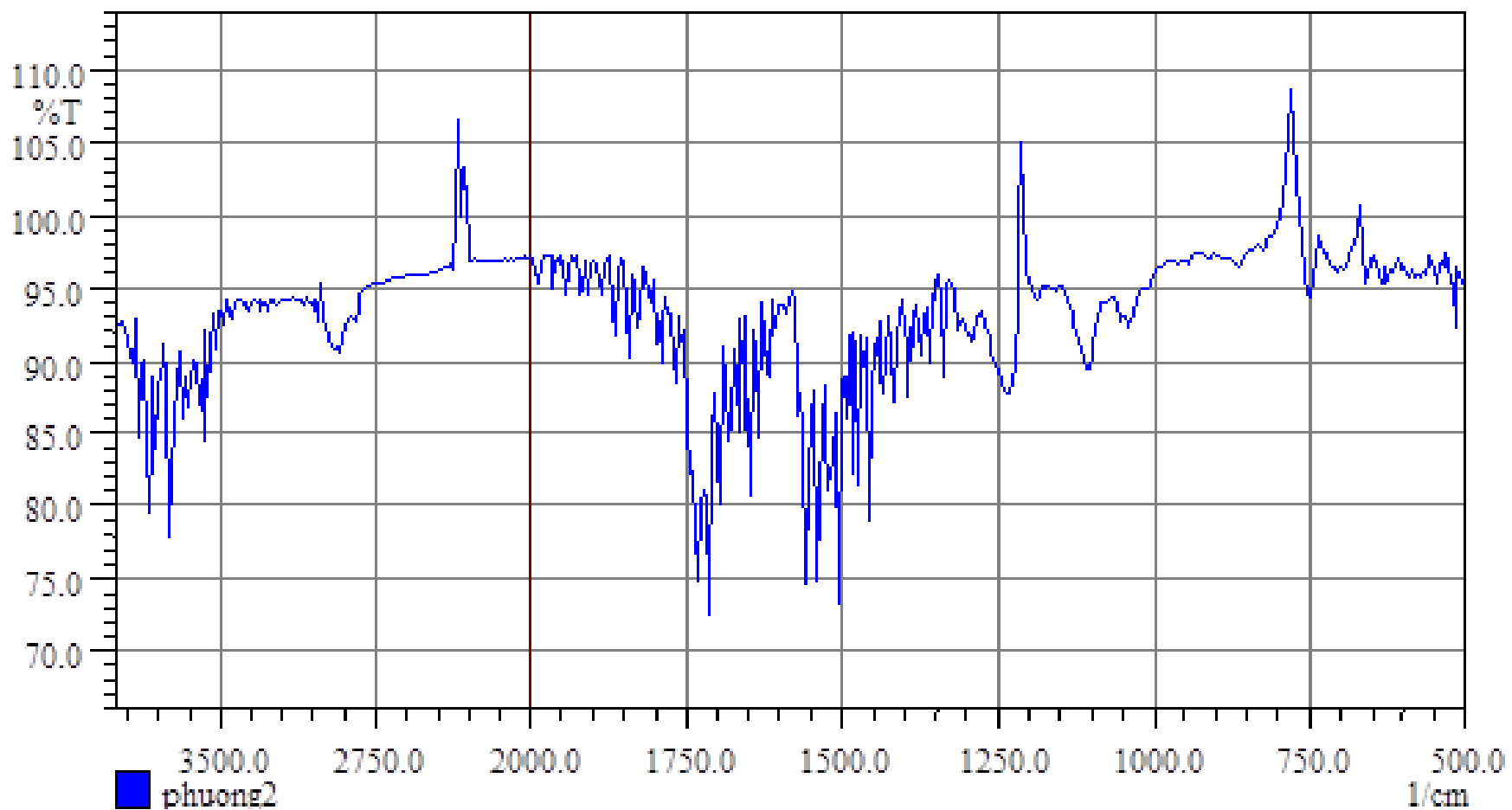
**Phụ lục 3.4. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate**  
(2)



**Phụ lục 3.5.** Phổ  $^1\text{H-NMR}$  mở rộng của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(phthalimido)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (2)



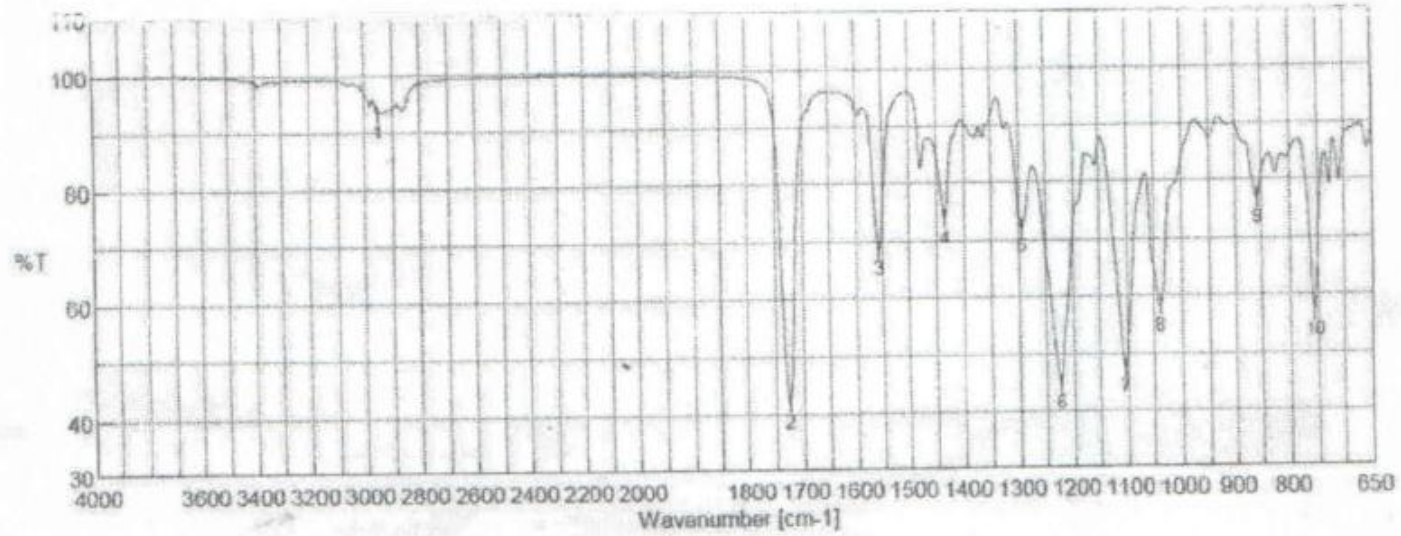
*Phụ lục 3.6. Phổ IR của kết tinh D của amlodipin*





*Phụ lục 3.7. Phổ IR của tạp D amlodipin chuẩn từ LGC*

Method: Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared (ATR-FTIR) Spectroscopy

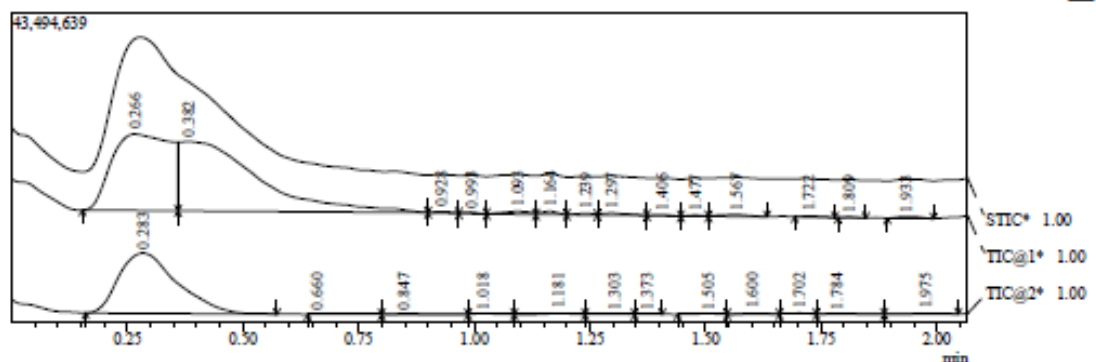
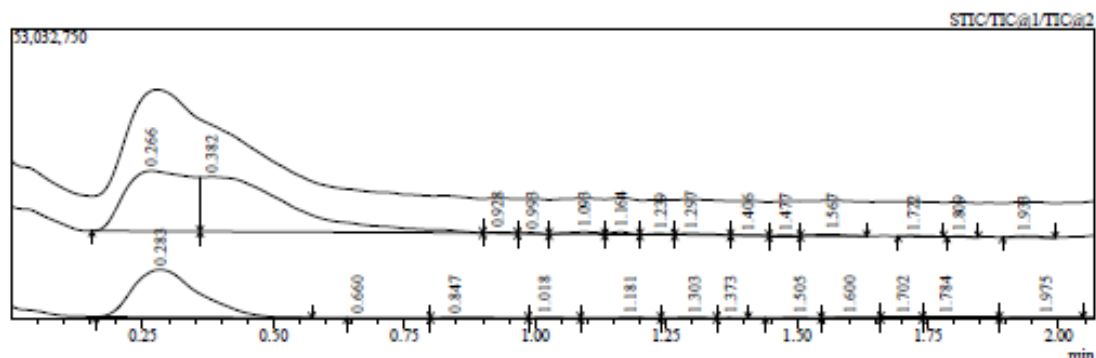


Result of Peak Picking		
No.	Position	Intensity
1	2948.59	93.1098
2	1725.01	41.9453
3	1557.24	68.5211
4	1434.78	73.808
5	1294	72.1978
6	1224.58	44.7585
7	1105.01	47.3882
8	1039.44	58.1158
9	859.132	78.7576
10	755.959	57.1589

**Phụ lục 3.8. Sắc ký đồ và phổ MS của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(amino)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (3)**

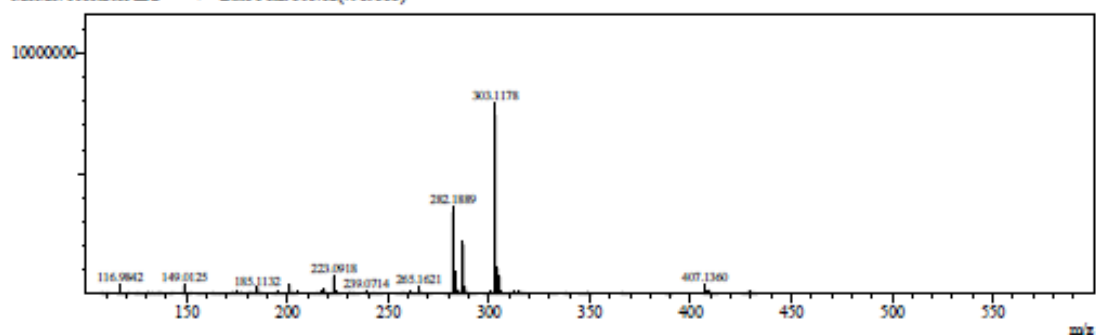
**==== Shimadzu LCMSsolution Data Report ====**

<Chromatogram>

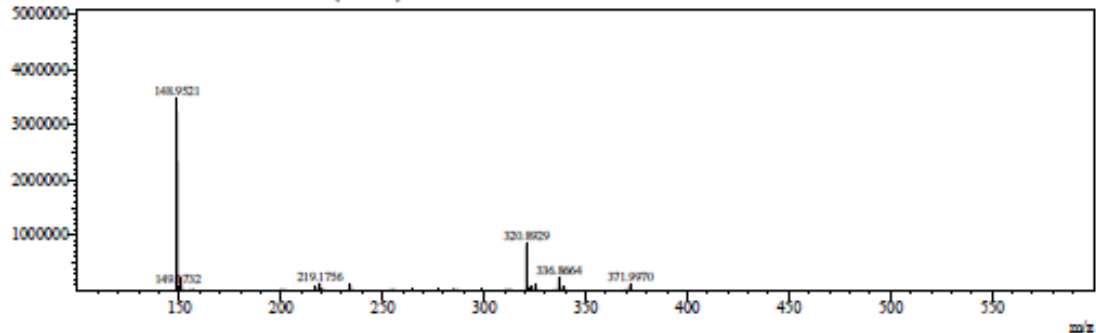


<Spectrum>

MSMS: Precursor m/z — /+ Base Peak 303.12(7989333)



MSMS: Precursor m/z — /- Base Peak 148.95(3479447)



**Phụ lục 3.9. Phổ MS của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(amino)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (3)**

Formula Predictor Report - A1-3.lod

Page 1 of 1

Data File: D:\Research\Do mau\21072013\A1-3.lod

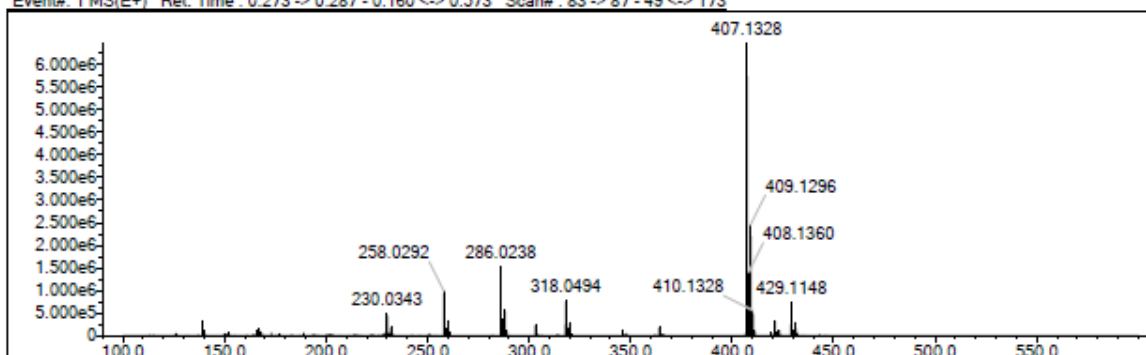
Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Elmt	Val.	Min	Max	Use Adduct
H	1	0	23	O	2	0	5	S	2	0	0	H
C	4	0	20	F	1	0	0	Cl	1	0	1	
N	3	0	2	P	3	0	0	Br	1	0	0	

Error Margin (ppm): 50  
 HC Ratio: unlimited  
 Max Isotopes: all  
 MSn Iso RI (%): 75.00

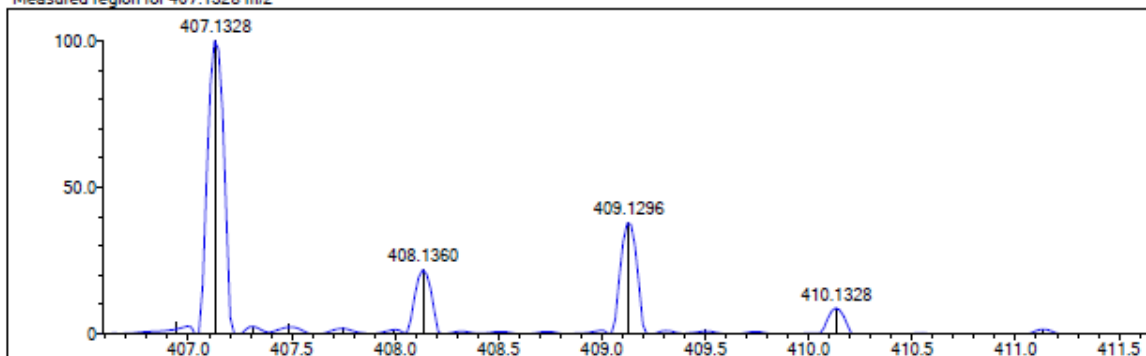
DBE Range: -2.0 - 1000.0  
 Apply N Rule: yes  
 Isotope RI (%): 1.00  
 MSn Logic Mode: AND

Electron Ions: both  
 Use MSn Info: no  
 Isotope Res: 10000  
 Max Results: 500

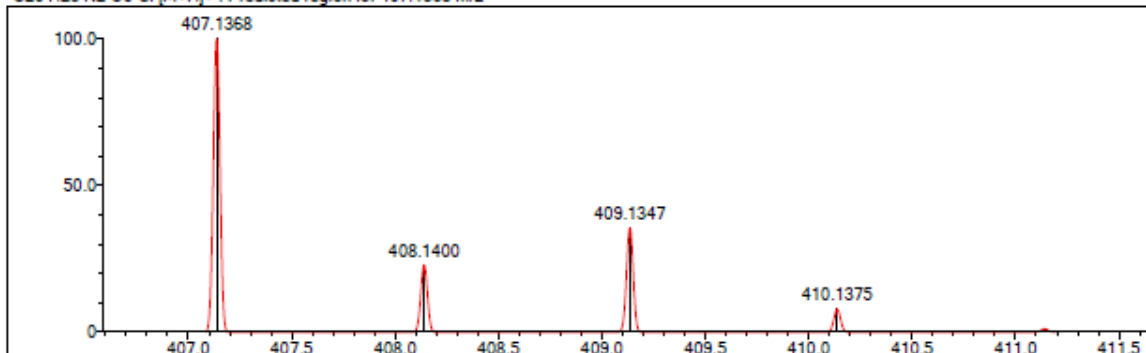
Event#: 1 MS(E+) Ret. Time : 0.273 -> 0.287 - 0.160 <-> 0.573 Scan#: 83 -> 87 - 49 <-> 173



Measured region for 407.1328 m/z

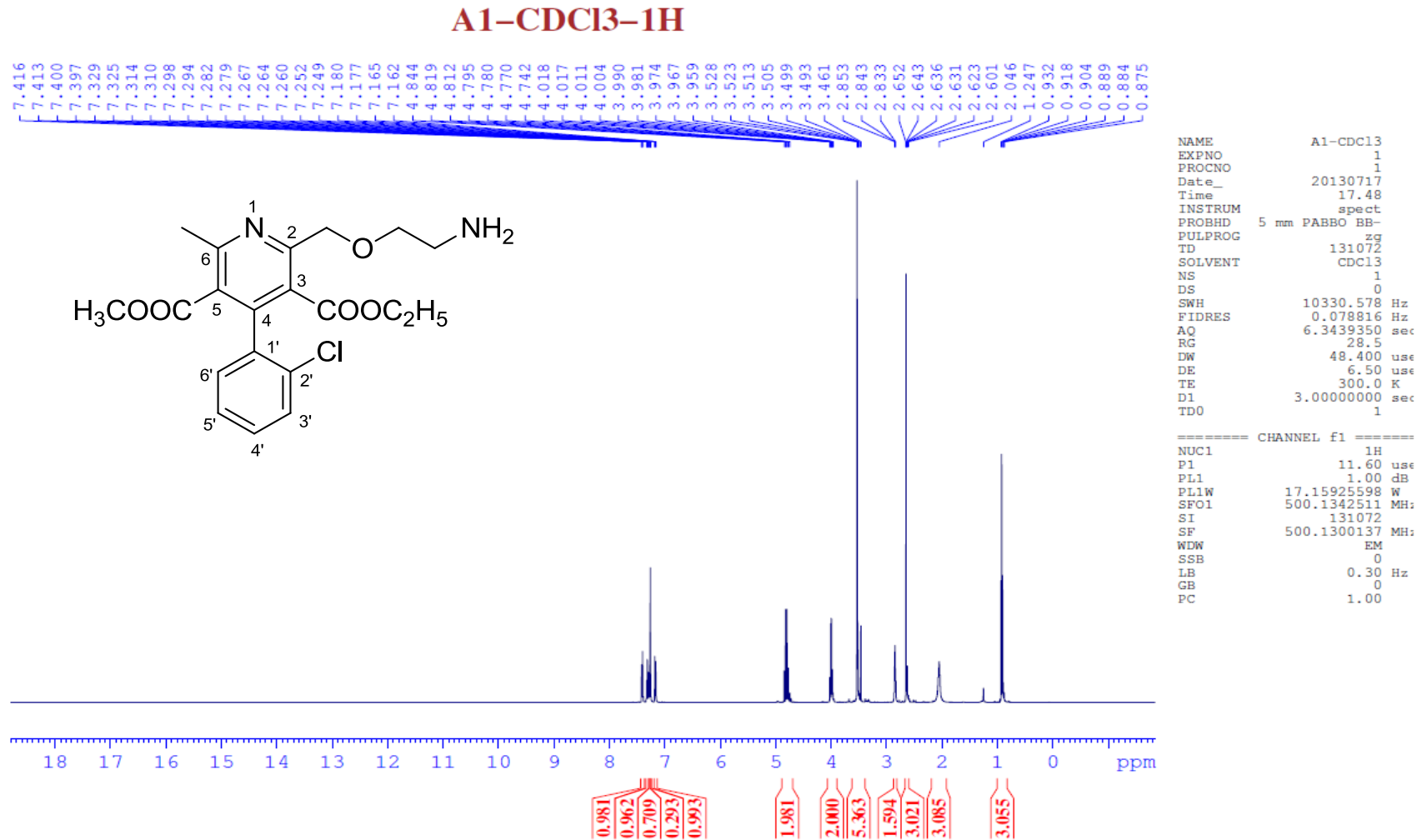


C20 H23 N2 O5 Cl [M+H]<sup>+</sup> : Predicted region for 407.1368 m/z

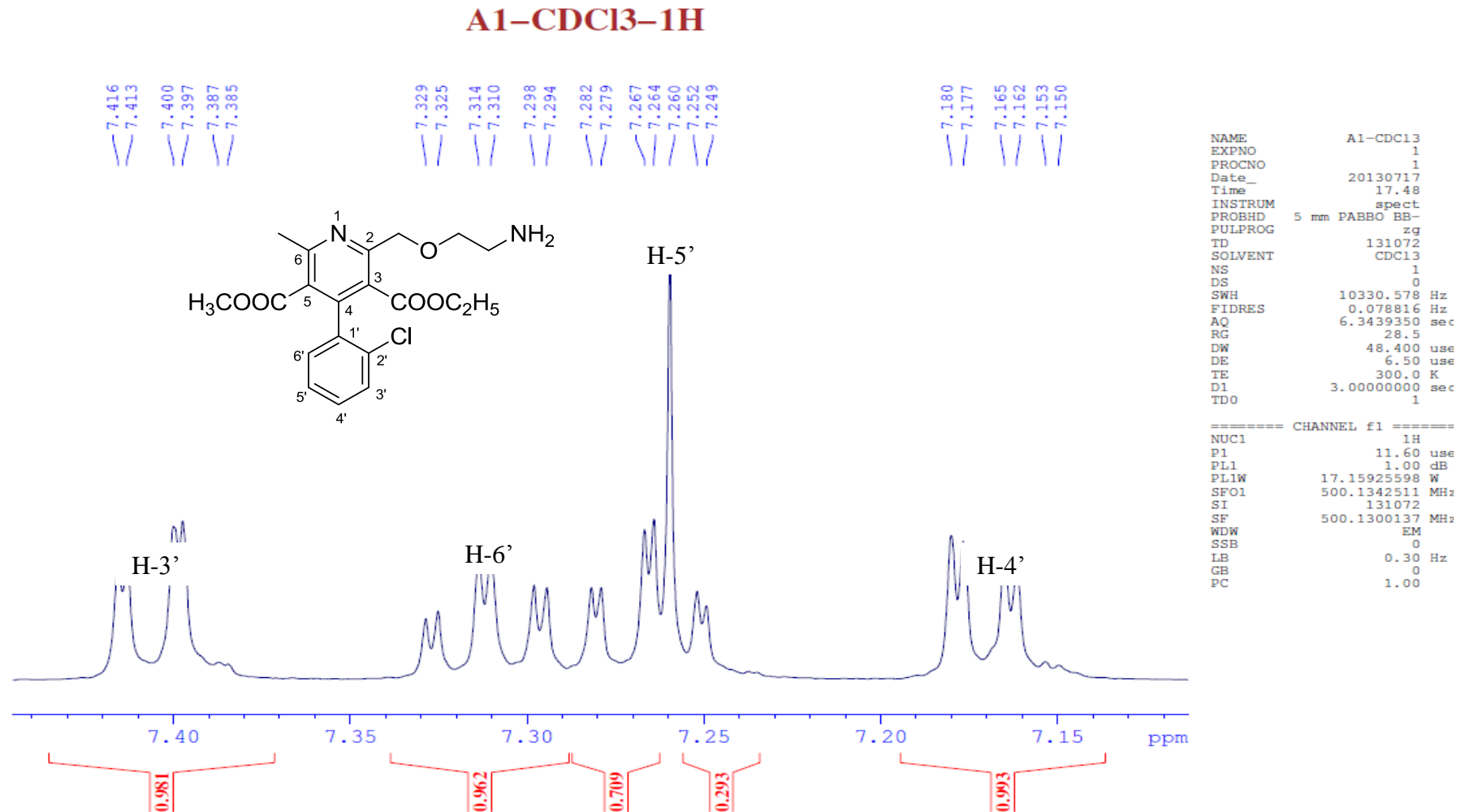


Rank	Score	Formula (M)	Ion	Meas. m/z	Pred. m/z	Df. (mDa)	Df. (ppm)	Iso	DBE
1	35.19	C20 H23 N2 O5 Cl	[M+H] <sup>+</sup>	407.1328	407.1368	-4.0	-9.82	84.20	10.0

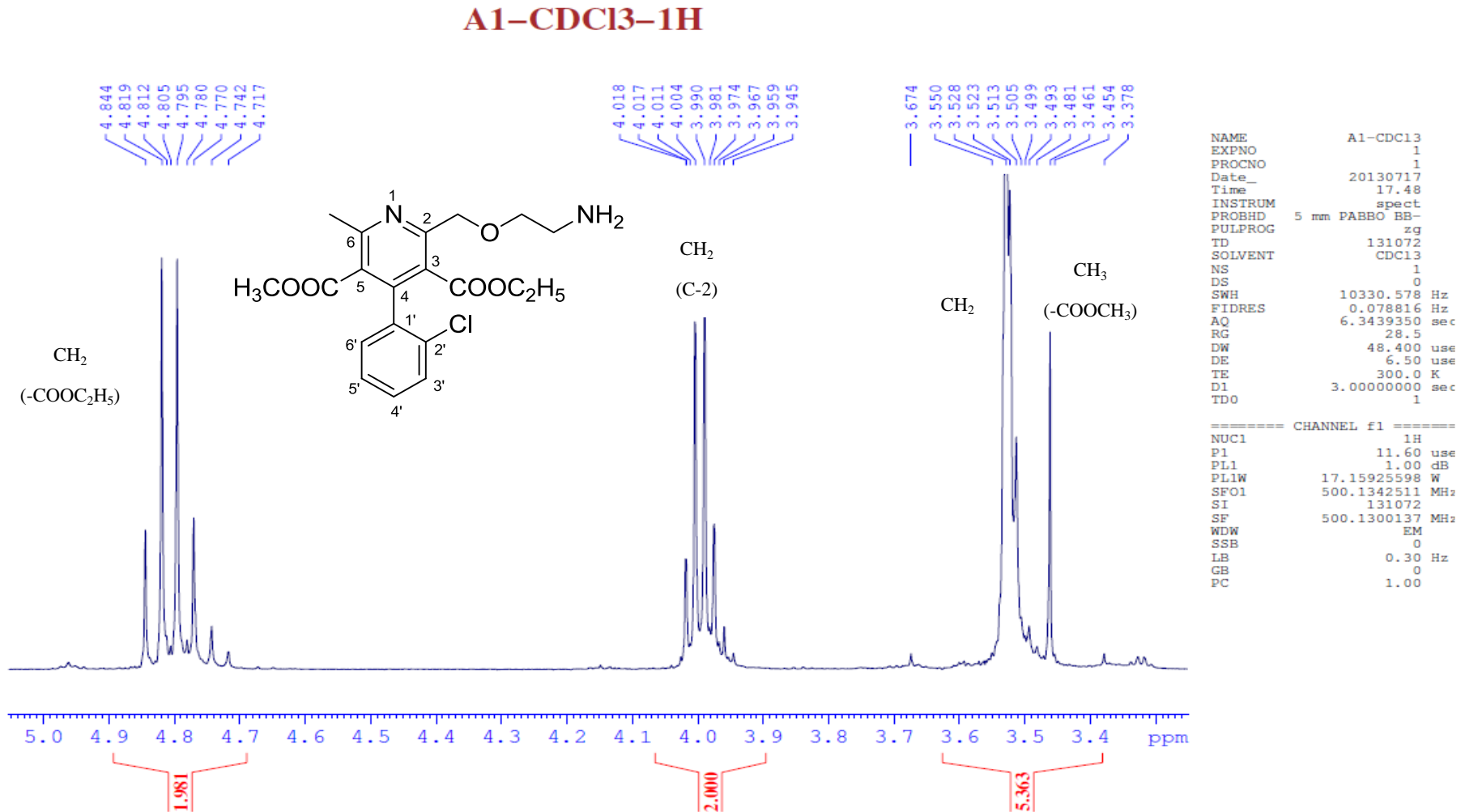
**Phụ lục 3.10.** Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(amino)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (3)



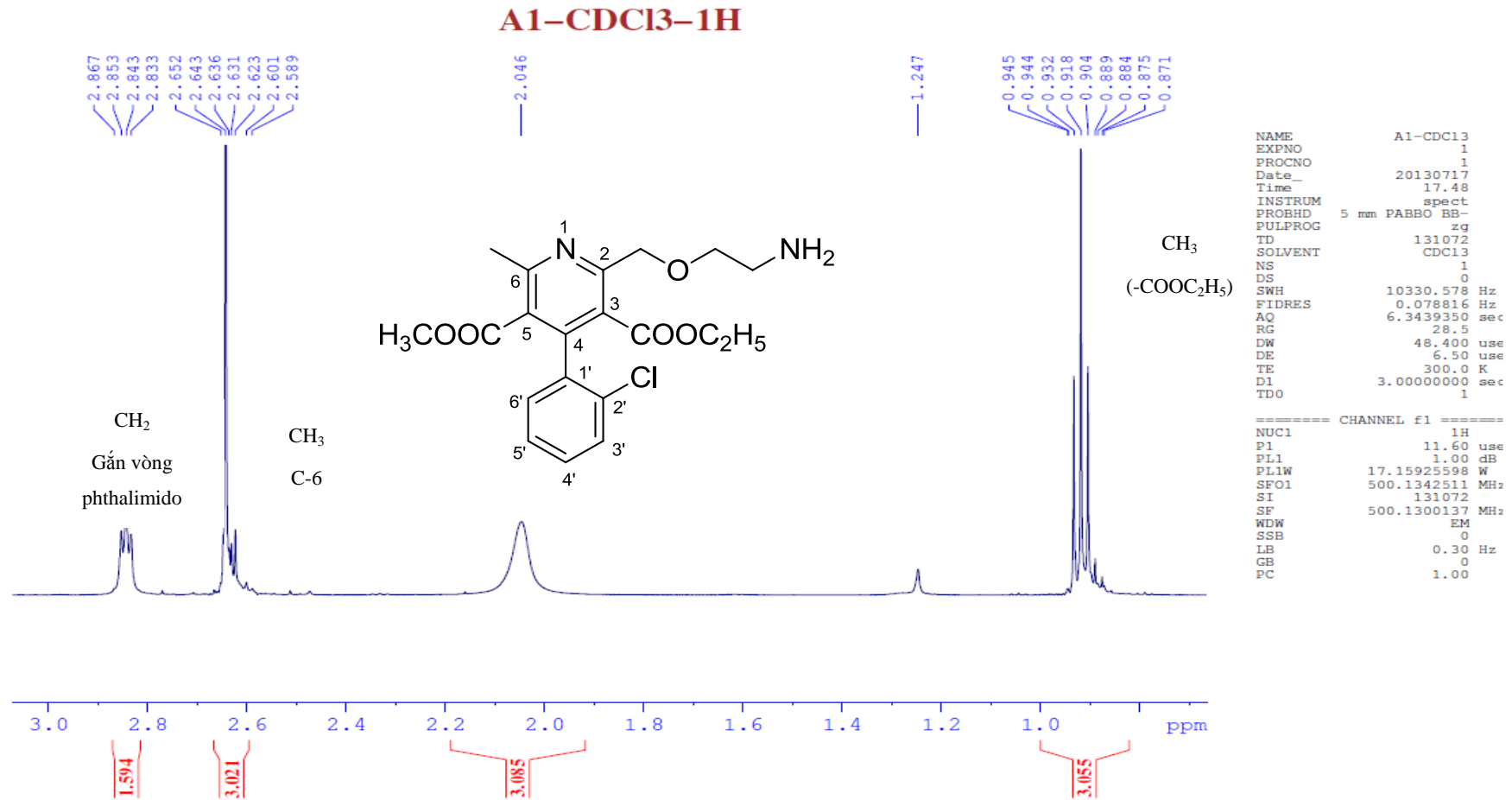
**Phụ lục 3.11.** Phổ  $^1\text{H-NMR}$  mở rộng của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(amino)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (3) (7,10 – 7,45 ppm)



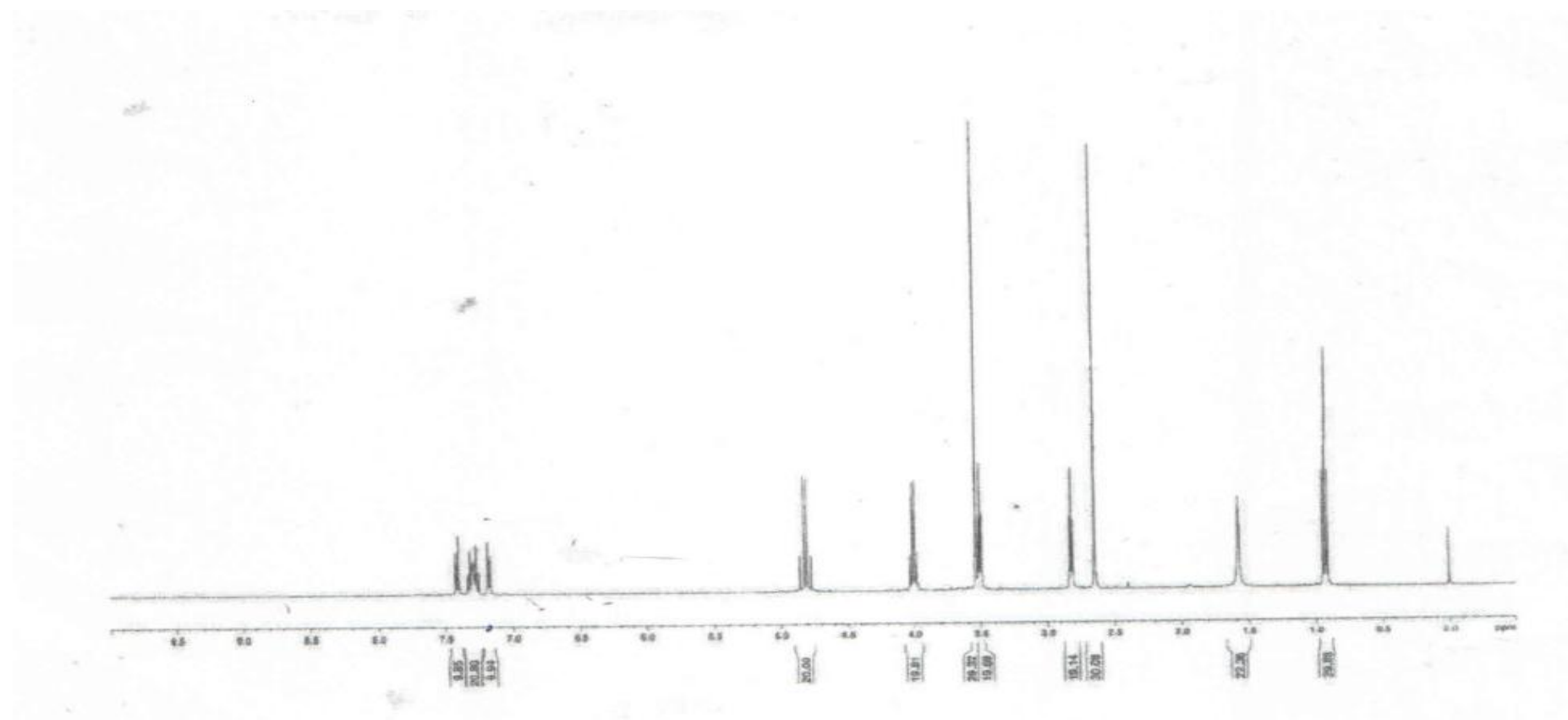
**Phụ lục 3.12.** Phổ <sup>1</sup>H-NMR mở rộng của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(aminoethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (3) (3,3, - 5,0 ppm)



**Phụ lục 3.13.** Phổ  $^1\text{H-NMR}$  mở rộng của 3-ethyl 5-methyl 2-[(2-(amino)ethoxy)]-4-(2-chlorophenyl)-6-methylpyridin-3,5-dicarboxylate (3) (0,8 – 3,0 ppm)



*Phụ lục 3.14. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của tạp D amlodipin chuẩn từ LGC*





*Phụ lục 3.15. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin (n=6)*

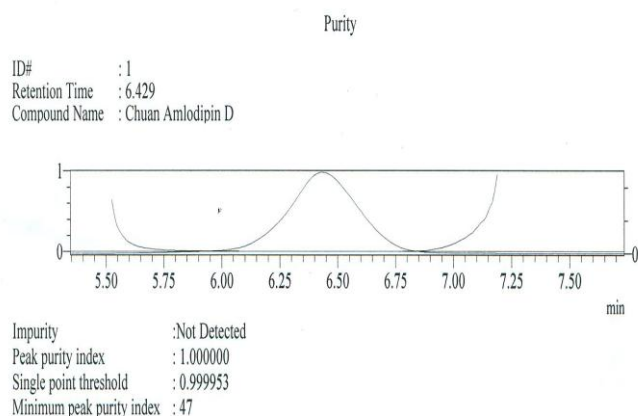
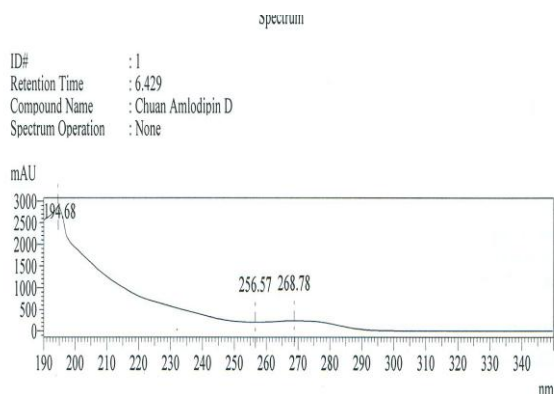
STT	t <sub>R</sub> (phút)	Diện tích đỉnh	Số đĩa lý thuyết	Hệ số đối xứng
1	7,368	10797441	3046	1,653
2	7,370	10739465	3001	1,618
3	7,370	10743029	3000	1,618
4	7,368	10797441	3046	1,653
5	7,319	10799234	3033	1,633
6	7,275	10799283	3063	1,645
<b>TB</b>	<b>7,345</b>	<b>10779316</b>	<b>3032</b>	<b>1,636</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,54</b>	<b>0,27</b>	<b>0,86</b>	<b>0,97</b>

*Phụ lục 3.16. Kết quả khảo sát tính đặc hiệu của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin*

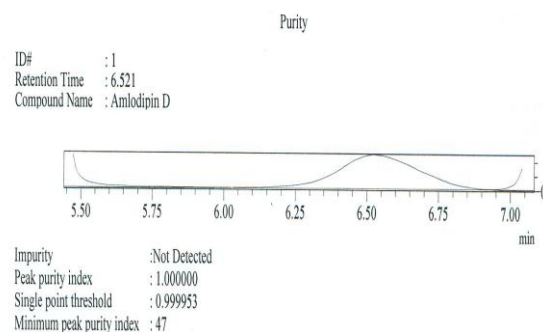
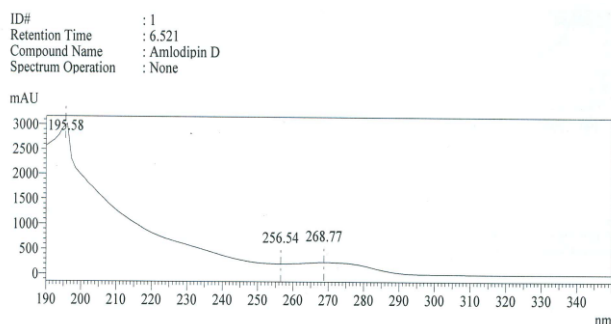
*Kết quả thời gian lưu trung bình của pic amlodipin D trong dung dịch đối chiếu và dung dịch thử*

STT	Thời gian lưu thử (phút)	Thời gian lưu chuẩn (phút)	Thời gian lưu của placebo
1	6,606	6,623	-
2	6,575	6,627	-
3	6,581	6,631	-
4	6,574	6,632	-
5	6,599	6,595	-
6	6,614	6,615	-
<b>TB</b>	<b>6,5915</b>	<b>6,6205</b>	
<b>RSD (%)</b>	<b>0,08 %</b>		

*Phổ UV và độ tinh khiết pic của chuẩn và thử amlodipin D*



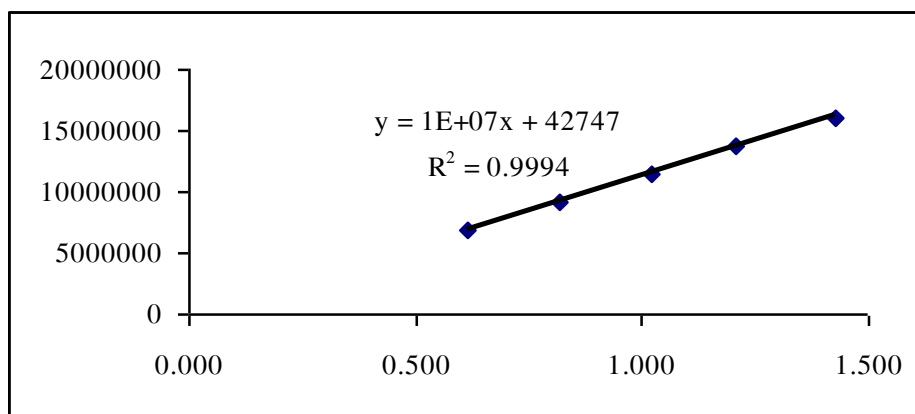
*Phổ đồ UV và độ tinh khiết chuẩn mlodipin D*



*Phổ đồ UV và độ tinh khiết thử amlodipin D*

**Phụ lục 3.17. Kết quả khảo sát tính tuyến tính của qui trình xác định độ tinh khiết tại D của amlodipin**

<b>Nồng độ (mg/ ml)</b>	0,612	0,816	1,020	1,204	1,428
<b>Diện tích pic (μV x giây)</b>	6951064	9228930	11512439	13789555	16080317
Phương trình hồi quy: $\hat{y} = 11289089 x + 42747$					
Hệ số tương quan $r = 0,9994$					



## SUMMARY OUTPUT

<i>Regression Statistics</i>	
Multiple R	0.999678
R Square	0.999355
Adjusted R Square	0.99914
Standard Error	105797.1
Observations	5

## ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>
Regression	1	5.20377E+13	5.2E+13	4649.125	6.95E-06
Residual	3	33579057276	1.12E+10		
Total	4	5.20713E+13			

	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95.0%</i>	<i>Upper 95.0%</i>
Intercept	42746.52	174743.2049	0.244625	0.822524	-513364	598857.4	-513364	598857.4
X Variable 1	11289089	165566.8156	68.18449	6.95E-06	10762182	11815997	10762182	11815997

$P = 0,82 > 0,05$  hệ số b không có ý nghĩa thống kê

Hệ số tương quan  $r = 0,9994$ ; Phương trình hồi quy tuyến tính có dạng:  $\hat{y} = 11289089 x$

**Phụ lục 3.18.** Kết quả khảo sát độ lặp lại ( $n=6$ ) của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin

<b>Độ lặp lại</b>				
<b>n</b>	<b>Lượng cân (mg)</b>	<b>Diện tích pic chính (<math>\mu\text{V} \times \text{giây}</math>)</b>	<b>Tổng diện tích pic tạp (<math>\mu\text{V} \times \text{giây}</math>)</b>	<b>% tinh khiết</b>
1	10,15	10797441	7024	99,94
2	10,16	10739465	8773	99,92
3	10,15	10798338	7810	99,93
4	10,25	11377872	8764	99,92
5	10,20	11524056	8752	99,92
6	10,30	11449596	8724	99,92
<b>Trung bình</b>				<b>99,93</b>
<b>RSD</b>				<b>0,01%</b>

**Phụ lục 3.19.** Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian ở ngày thứ 2 ( $n=6$ ) của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin

<b>Mẫu thử</b>				
<b>n</b>	<b>Lượng cân (mg)</b>	<b>Diện tích pic chính (<math>\mu\text{V} \times \text{giây}</math>)</b>	<b>Tổng diện tích pic tạp (<math>\mu\text{V} \times \text{giây}</math>)</b>	<b>% tinh khiết</b>
1	10,28	11439263	8541	99,93
2	10,35	11520134	9182	99,92
3	10,05	11387929	9241	99,92
4	10,25	11515795	8674	99,93
5	10,21	11448040	8830	99,92
6	10,27	11473913	9210	99,92
<b>TB</b>				<b>99,92</b>
<b>RSD</b>				<b>0,01%</b>

*Phụ lục 3.20. Kết quả khảo sát độ đúng của qui trình xác định độ tinh khiết tạp D của amlodipin*

Mức nồng độ đo	Tạp D của amlodipin				
	Diện tích pic ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )	Nồng độ (mg/ml) tính từ phương trình hồi quy	Nồng độ thực tế (%)	% Tỷ lệ hồi phục	RSD (%)
60%	6907275	0,6119	61,25	99,89	<b>TB = 99,44%</b> <b>RSD = 0,52%</b>
	6912095	0,6123	61,51	99,54	
	6912619	0,6123	61,93	98,87	
100%	11408475	1,0106	102,11	98,97	<b>TB = 99,01%</b> <b>RSD = 0,39%</b>
	11404525	1,0102	102,42	98,64	
	11404216	1,0102	101,61	99,42	
140%	15921511	1,4103	142,70	98,83	<b>TB = 99,28%</b> <b>RSD = 0,47%</b>
	15918562	1,4101	141,35	99,76	
	15921626	1,4104	142,10	99,25	
				<b>TB (%)</b>	<b>99,24</b>
				<b>RSD (%)</b>	<b>0,44</b>

**Phụ lục 3.21.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ tap D của amlodipin

Kết quả xác định độ tinh khiết tap D amlodipin trong quá trình đóng lọ

Số thứ tự lọ	% diện tích pic	Xử lý thống kê
5	99,94%	
13	99,92%	n=6; $X_{TB} = 99,93\%$ SD = 0,01 RSD = 0,01% (với $t = 2,57$ ; $p = 0,95$ )
24	99,93%	
30	99,92%	
38	99,92%	
47	99,92%	

Đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ theo phương pháp thống kê phân tích ANOVA một yếu tố, so sánh 2 giá trị  $F_m$  và  $F_{tc}$

Phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA để đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ (tap D của amlodipin)

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	$F_m$	$F_{tc}$
Giữa các nhóm	0,00015	1	0,00015	3	7,709
Trong cùng nhóm	0,0002	4	0,00005		
Tổng cộng	0,00035	5			

*Nhận xét:*  $F_m = 3 < F_{tc} = 7,709$ . Vậy các lọ trong quá trình đóng đồng nhất.

**Phụ lục 3.22.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ tap D của amlodipin liên phòng thí nghiệm

Kết quả định lượng tap D của amlodipin tại hai phòng thí nghiệm

Mẫu	PTN1 Độ tinh khiết %	PTN2 Độ tinh khiết %
1	99.94%	99.93%
2	99.92%	99.92%
3	99.93%	99.92%
4	99.92%	99.93%
5	99.92%	99.92%
6	99.92%	99.92%
Trung bình	99.93%	99.92%

Việc đánh giá độ đồng nhất lọ giữa 2 phòng thí nghiệm được thực hiện qua việc đánh giá kết quả định lượng trung bình giữa 2 phòng thí nghiệm, sử dụng phương pháp thống kê phân tích ANOVA, so sánh 2 giá trị  $F_{tn}$  và  $F_{tc}$ .

Phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA để đánh giá độ đồng nhất lọ giữa 2 phòng thí nghiệm

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	$F_{tn}$	$F_{tc}$
Giữa các nhóm	0,0000083	1	0,0000083	0,172	4,965
Trong cùng nhóm	0,0000483	10	0,0000048		
Tổng cộng	0,0004917	11			

*Nhận xét:*  $F_{tn} = 0,172 < F_{tc} = 4,965$ . Vậy kết quả định lượng giữa 2 phòng thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê. 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.

**Phụ lục 3.23.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch phân giải ( $n=6$ ) của qui trình định lượng tạp D của amlodipin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa amlodipin

n	Dung dịch phân giải amlodipin						$R_{\text{tạp D/amlodipin}}$
	Tạp D			Amlodipin			
	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$	
1	1399.561	4.226	0.91	2675.439	7.992	0.91	7.1
2	1398.637	4.228	0.91	2670.779	7.989	0.91	7.2
3	1398.449	4.230	0.90	2675.983	7.992	0.91	7.2
4	1399.621	4.228	0.90	2674.138	7.992	0.90	7.2
5	1397.793	4.231	0.90	2672.945	7.987	0.91	7.2
6	1397.886	4.222	0.92	2675.320	7.987	0.91	7.1
<b>TB</b>	1398.658	4.228	0.91	2674.101	7.990	0.908	7.2
<b>RSD (%)</b>	0.057	0.076	0.901	0.073	0.031	0.449	0.721

*t*: thời gian lưu, *S*: diện tích pic, *R*: độ phân giải, *A*: hệ số đối xứng, *TB*: trung bình.

**Phụ lục 3.24.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch chuẩn D-amlodipin 3 ppm ( $n=6$ ) của qui trình định lượng tạp D của amlodipin trong nguyên liệu và thành phẩm chứa amlodipin

n	Dung dịch chuẩn D-amlodipin		
	S (mV x giây)	$t_R$ (phút)	$A_s$
1	56.554	4.228	0.99
2	55.846	4.228	1.00
3	55.412	4.230	0.99
4	56.109	4.228	0.99
5	56.312	4.225	0.98
6	56.228	4.228	1.01
<b>TB</b>	56.077	4.228	0.99
<b>RSD (%)</b>	0.714	0.038	1.040



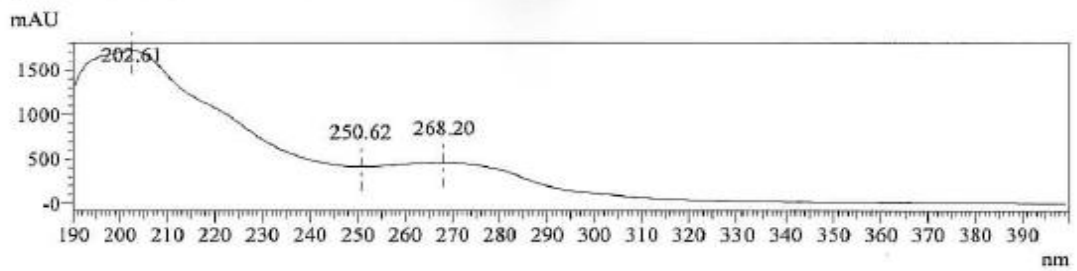
**Phụ lục 4. Tạp A và tạp B của nifedipin**

*Phụ lục 4.1. Phổ UV-Vis tạp A của nifedipin*

**Chuan tap A Nifedipin USP**

Spectrum

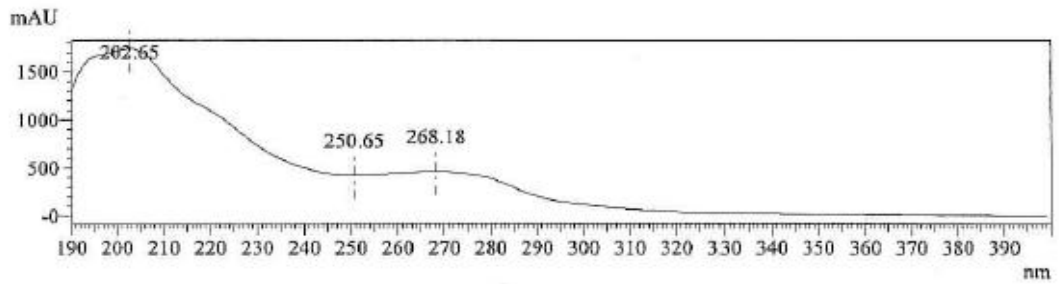
ID# : 1  
 Retention Time : 4.461  
 Compound Name : RT4.461  
 Spectrum Operation : None



**Tap A Nifedipin tong hop**

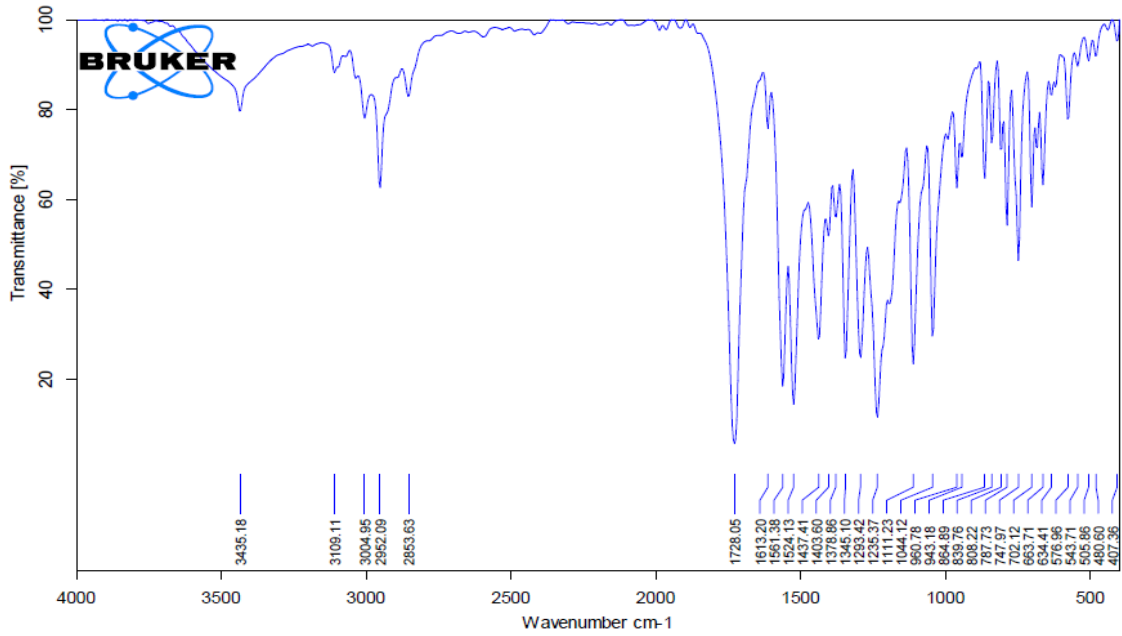
Spectrum

ID# : 1  
 Retention Time : 4.555  
 Compound Name : RT4.555  
 Spectrum Operation : None



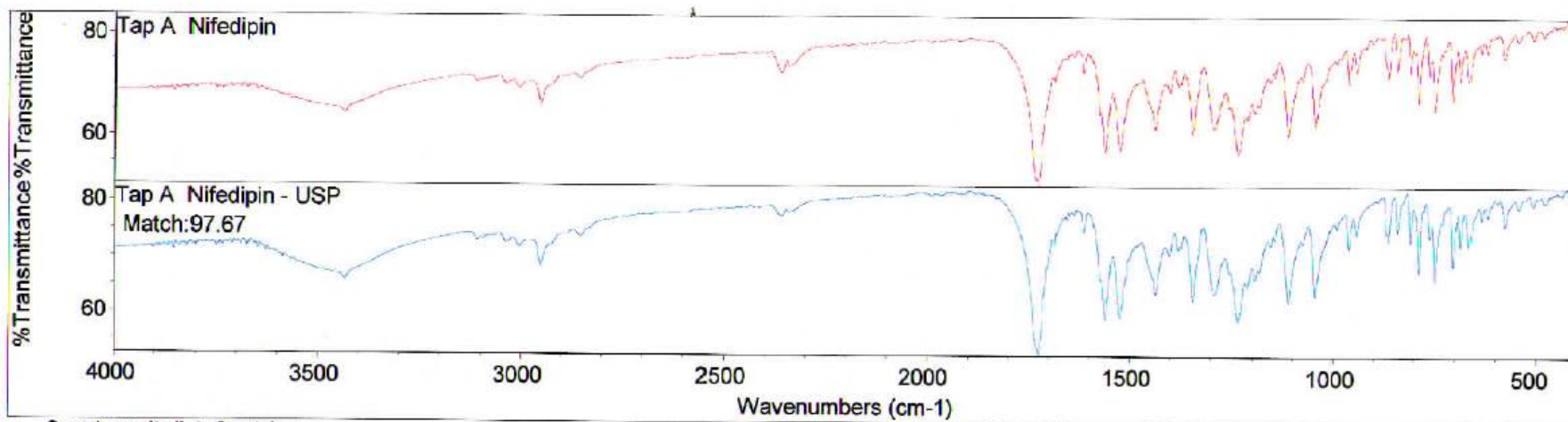
*Phụ lục 4.2. Phổ IR tap A của nifedipin*

**Phổ IR của sản phẩm tổng hợp**



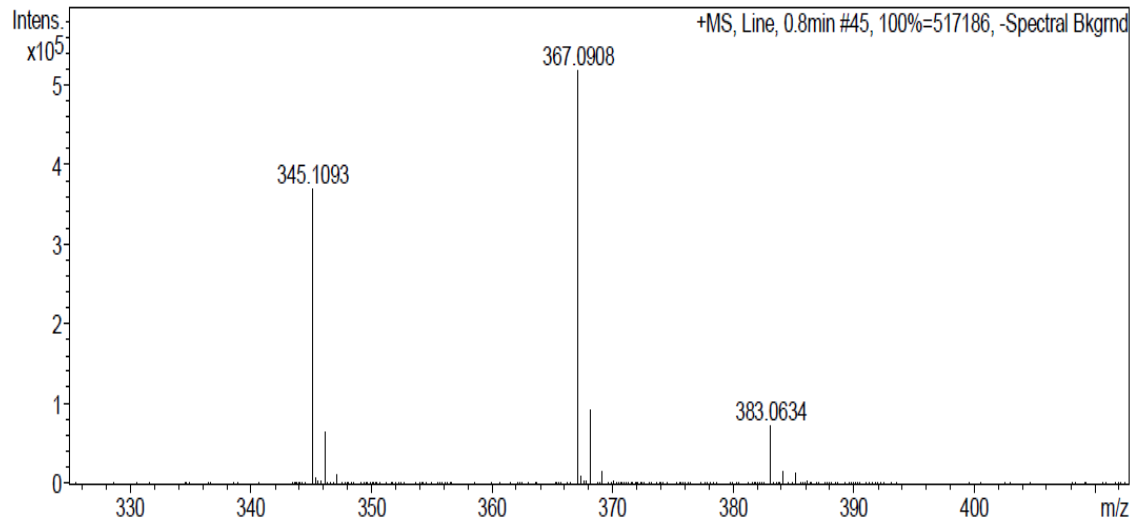
*Phổ IR của sản phẩm tổng hợp và chuẩn tap A của nifedipin trong thư viện dữ liệu phổ.*

Search results for: Tap A Nifedipin  
 Date: Tue Aug 25 16:39:43 2015 (GMT+07:00)  
 Search algorithm: Correlation  
 Regions searched: 4000.00-400.16

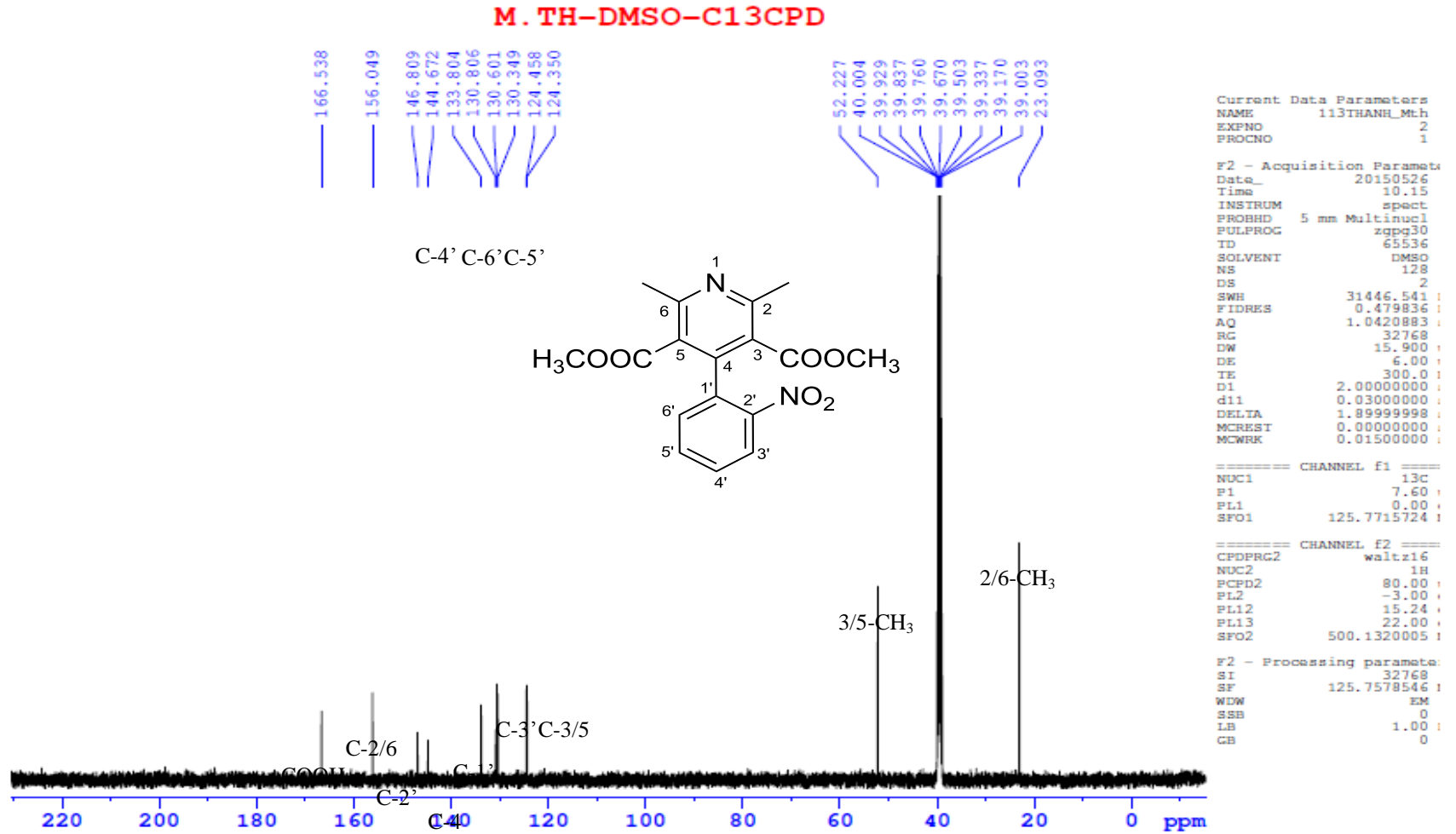


Search results list of matches

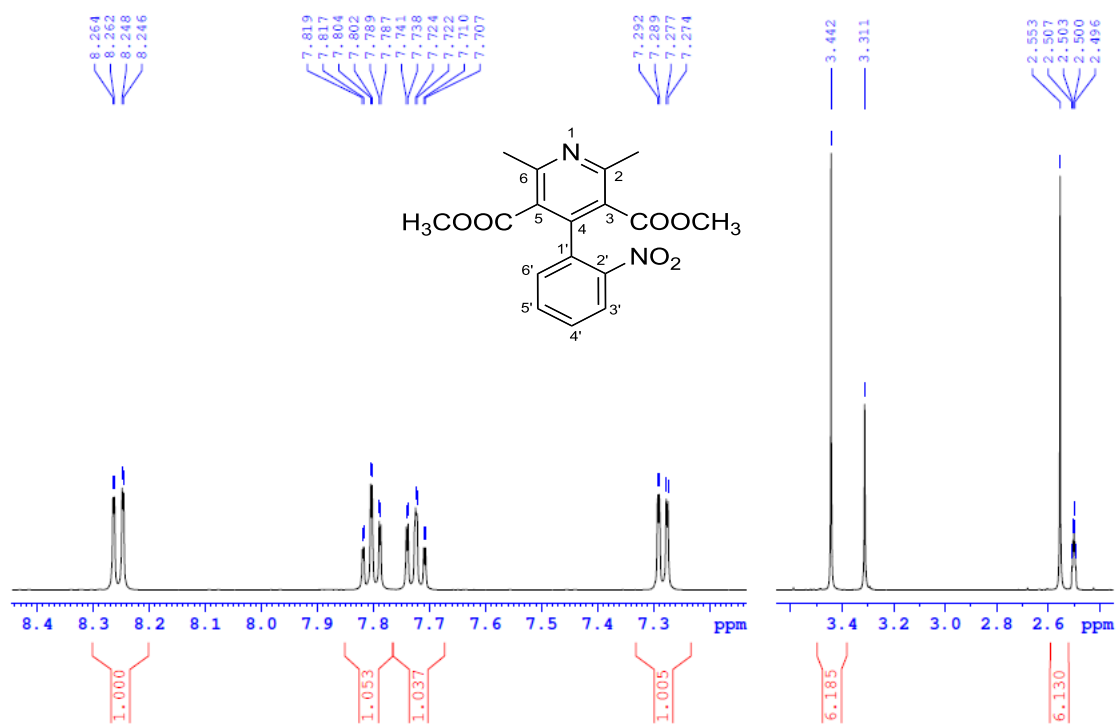
	Index	Match	Compound Name	Library Name
1	295	97.67	Tap A Nifedipin - USP	ThuocChuan
2	293	37.12	Tap B Nifedipin - USP	ThuocChuan
3	18	25.06	Alverin citrat	ThuocChuan

**Phụ lục 4.3. Phổ MS của sản phẩm tổng hợp tạp A của nifedipin**

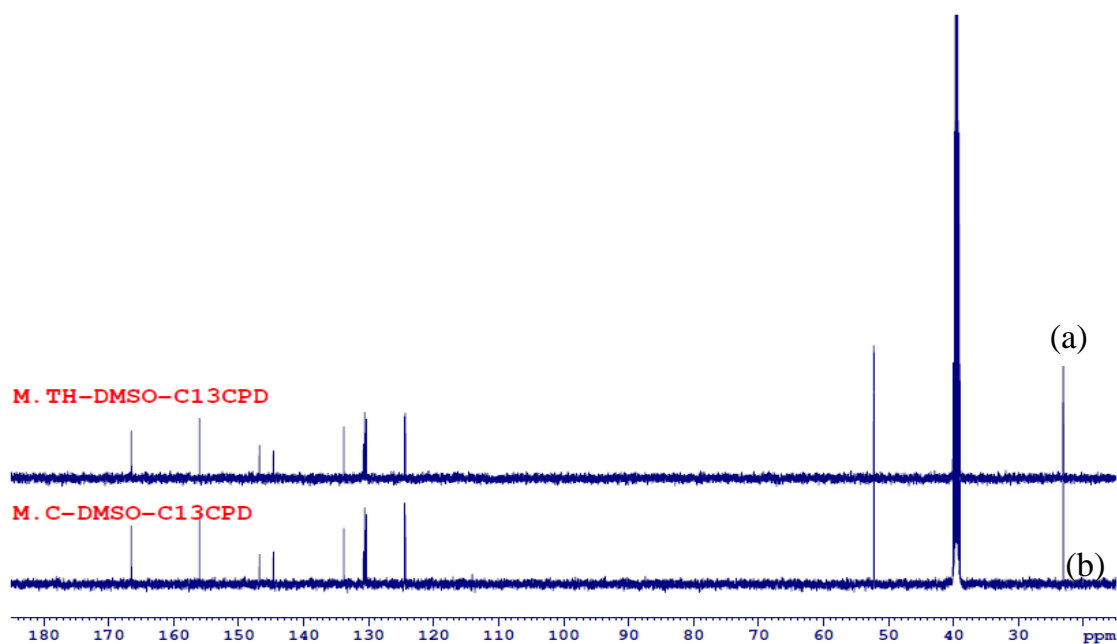
Phụ lục 4.4. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của sản phẩm tổng hợp tạp A của nifedipin



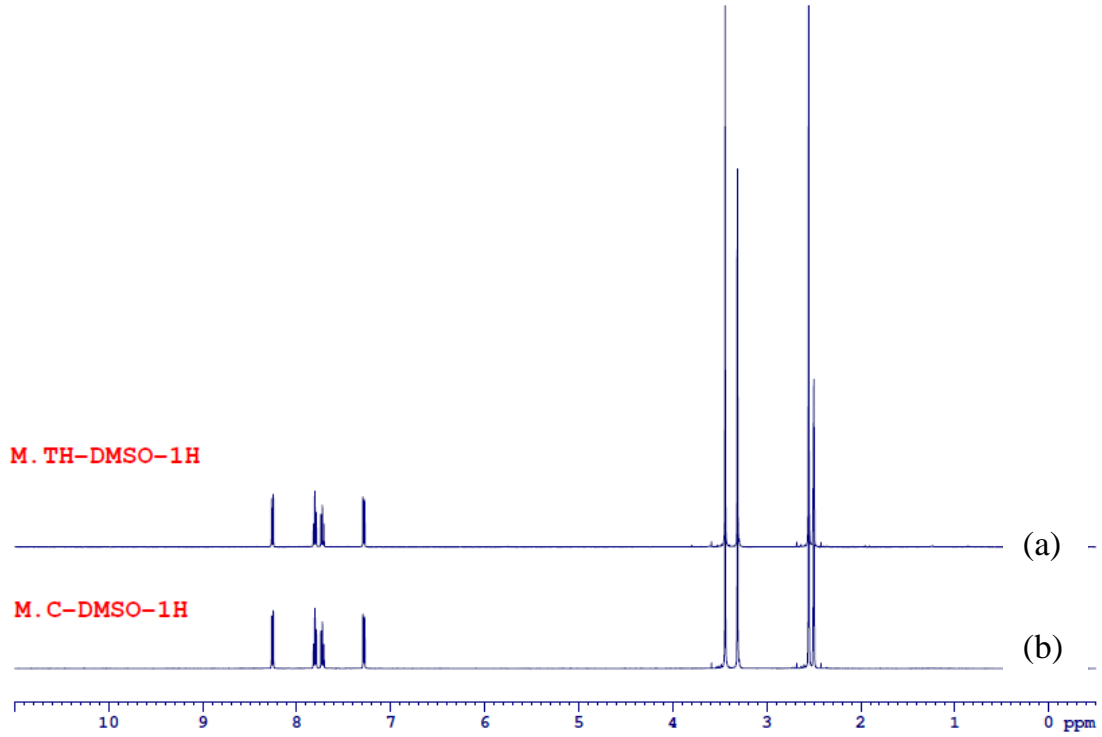
**Phụ lục 4.5.** Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của sản phẩm tổng hợp tạp A của nifedipin



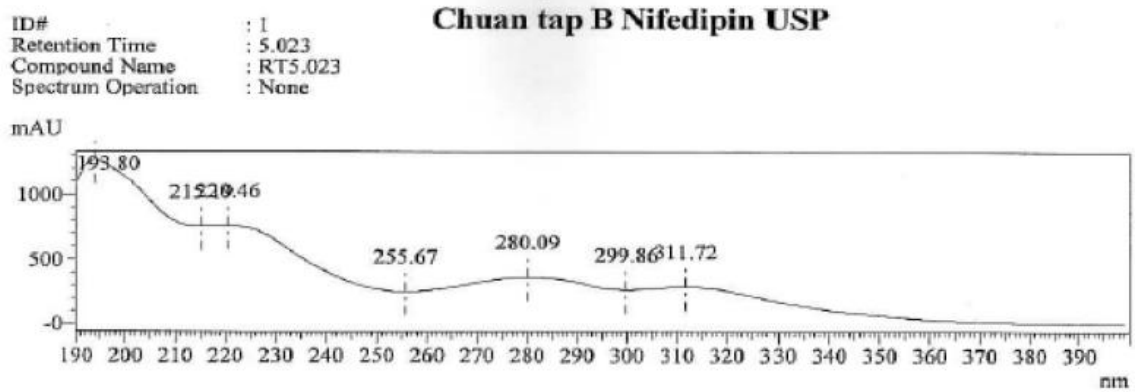
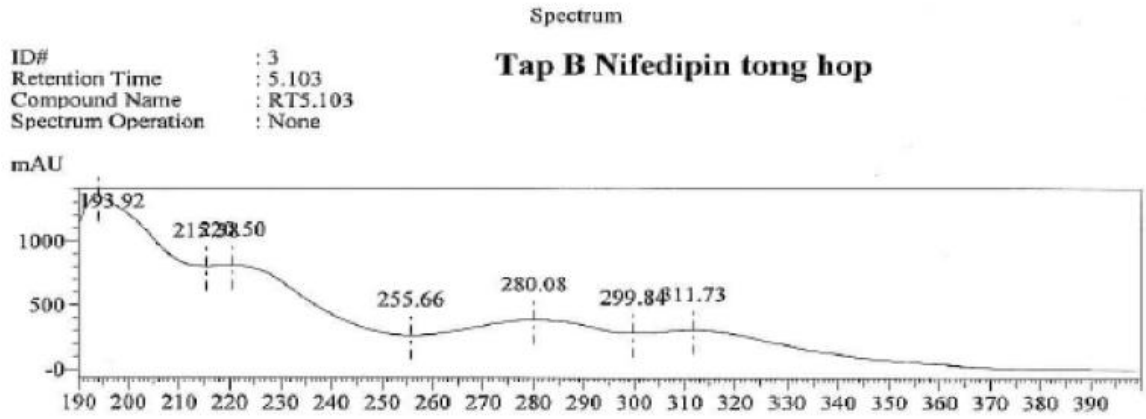
**Phụ lục 4.6.** Phổ  $^{13}\text{C-NMR}$  của sản phẩm tổng hợp tạp A của nifedipin (a) so với chuẩn tạp A của nifedipin (b)



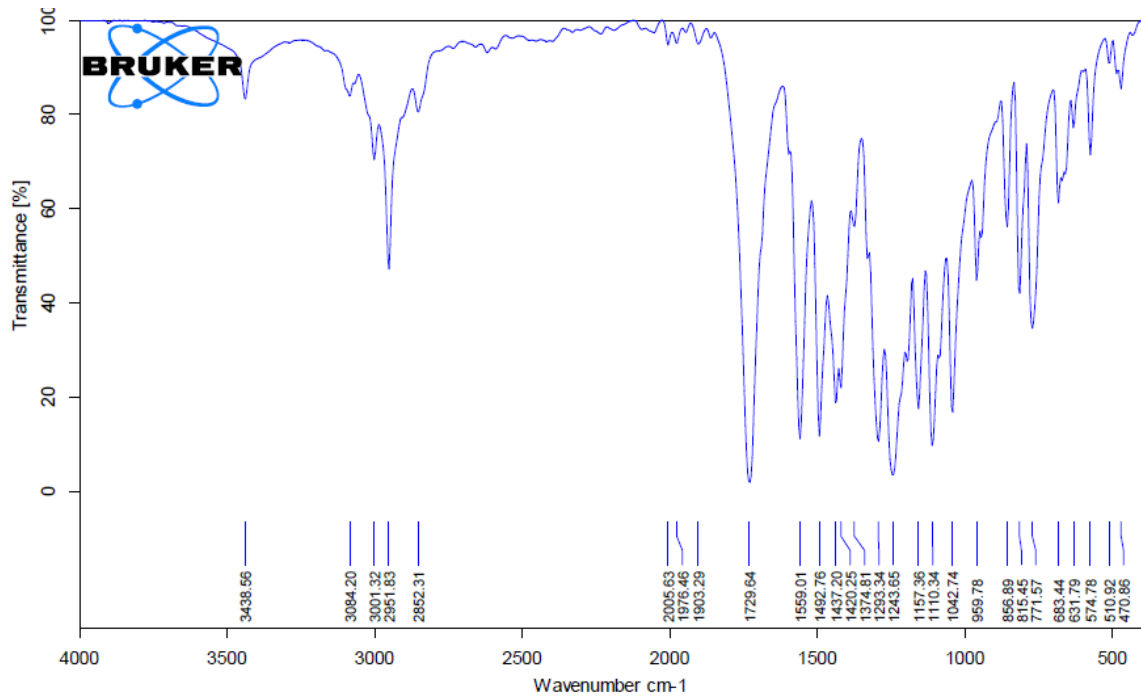
**Phụ lục 4.7.** Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của sản phẩm tổng hợp tạp A của nifedipin (a) so với chuẩn tạp A của nifedipin (b)



*Phụ lục 4.8. Phổ UV-Vis tap B của nifedipin*

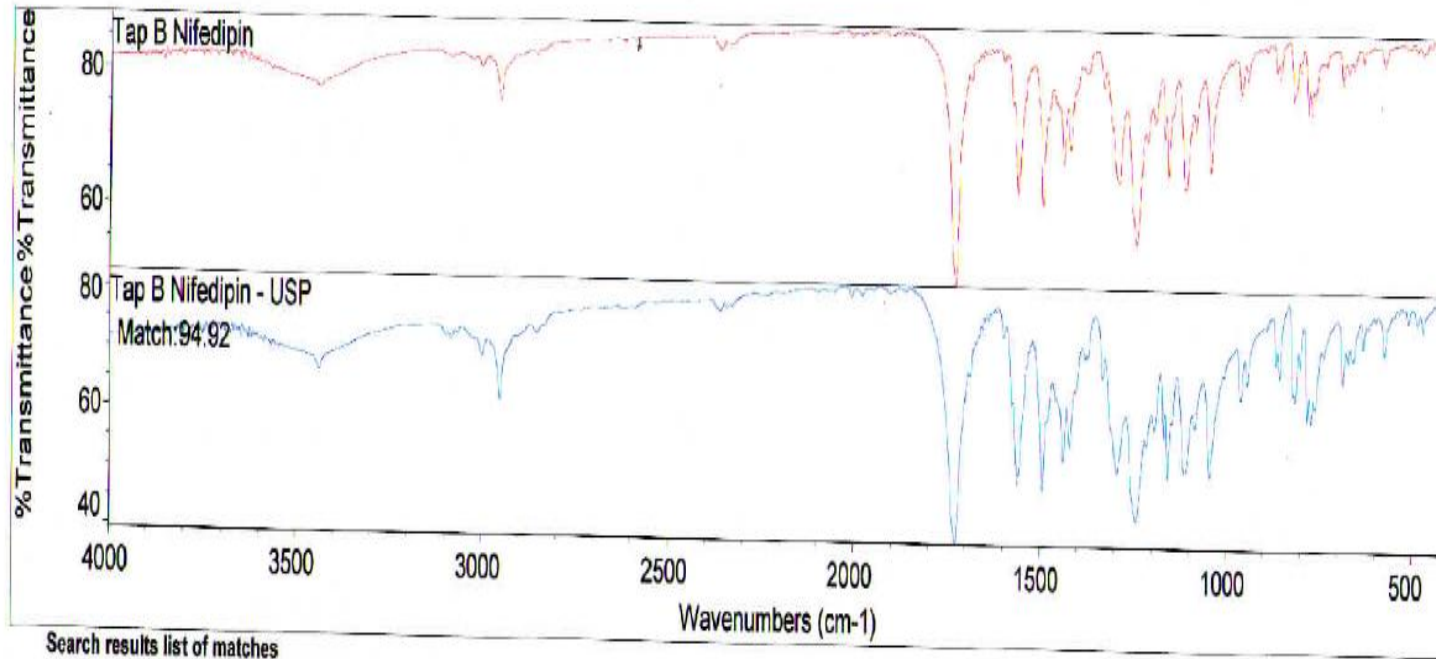




*Phụ lục 4.9. Phổ IR tạp B của nifedipin**Phổ IR của sản phẩm tổng hợp*

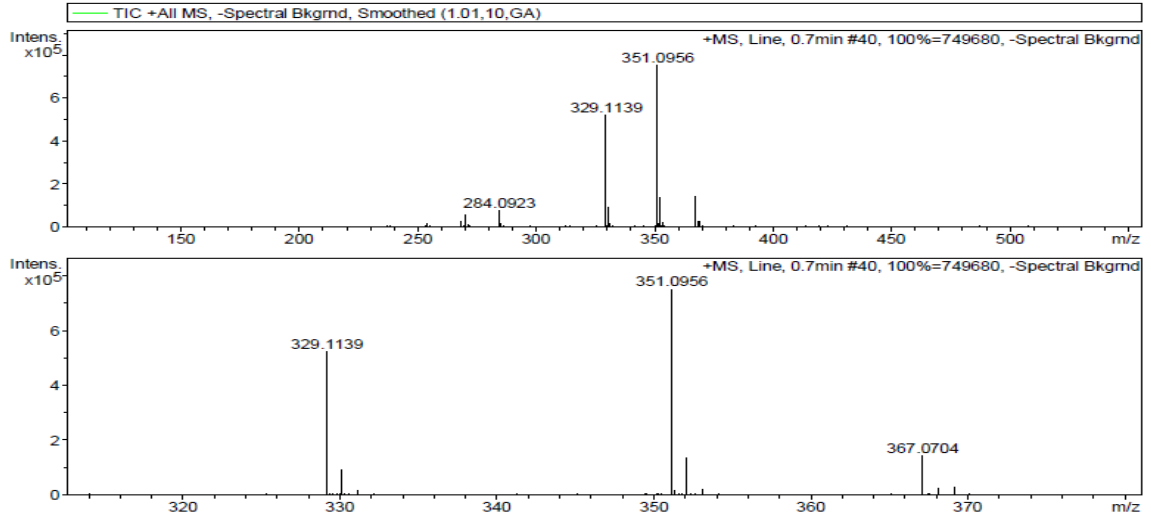
*Phổ IR của sản phẩm tổng hợp và phổ IR của chuẩn tap B của nifedipin trong thư viện dữ liệu phổ*

Search results for: Tap B Nifedipin  
 Date: Tue Aug 25 16:15:01 2015 (GMT+07:00)  
 Search algorithm: Correlation  
 Regions searched: 4000.00-400.16

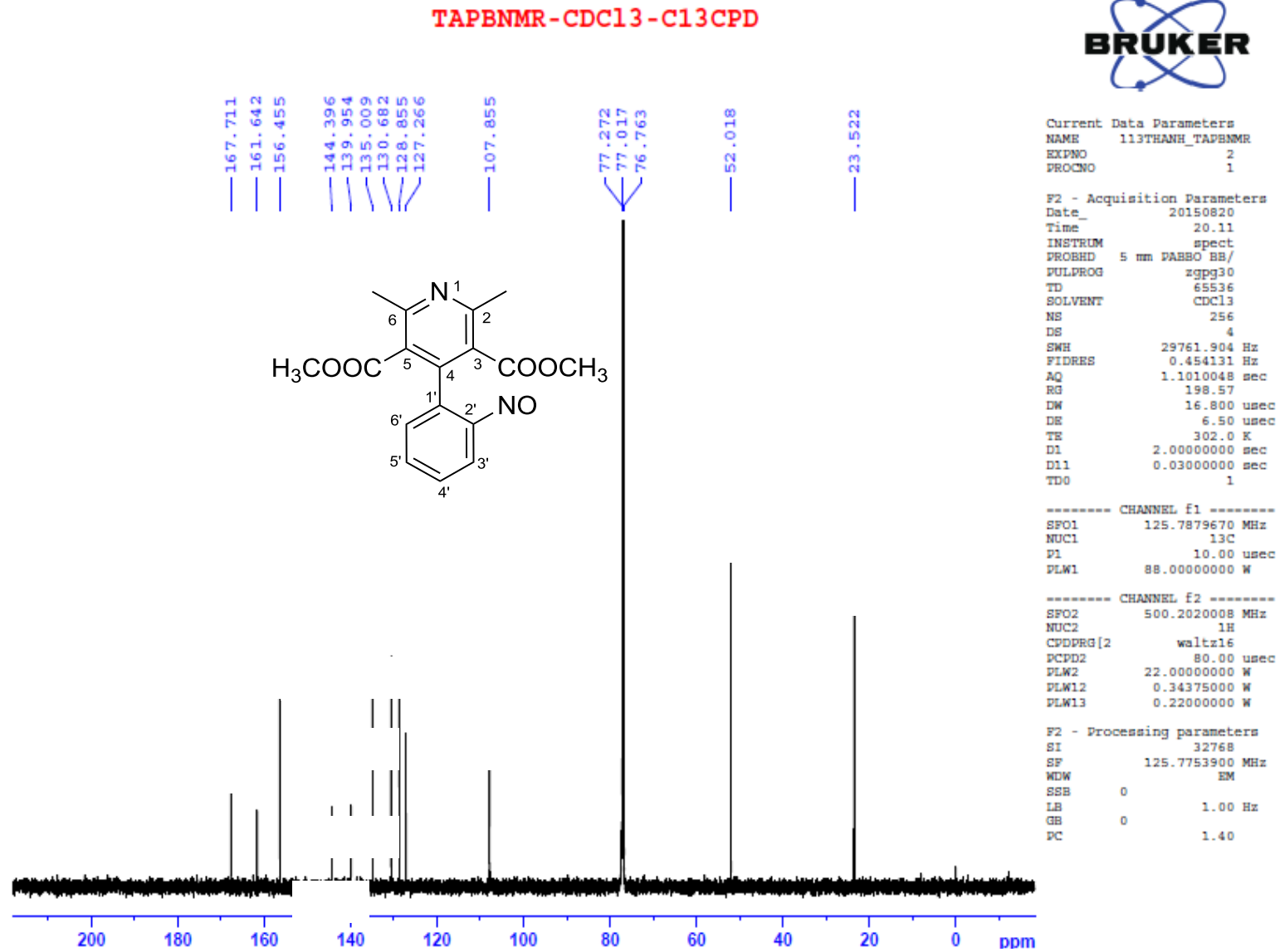


Index	Match	Compound Name	Library Name
1	293	94.92 Tap B Nifedipin - USP	ThuocChuan
2	216	19.36 Chuan Diclofenac tap A	ThuocChuan
3	116	19.27 Rifampicin - ATR	ThuocChuan

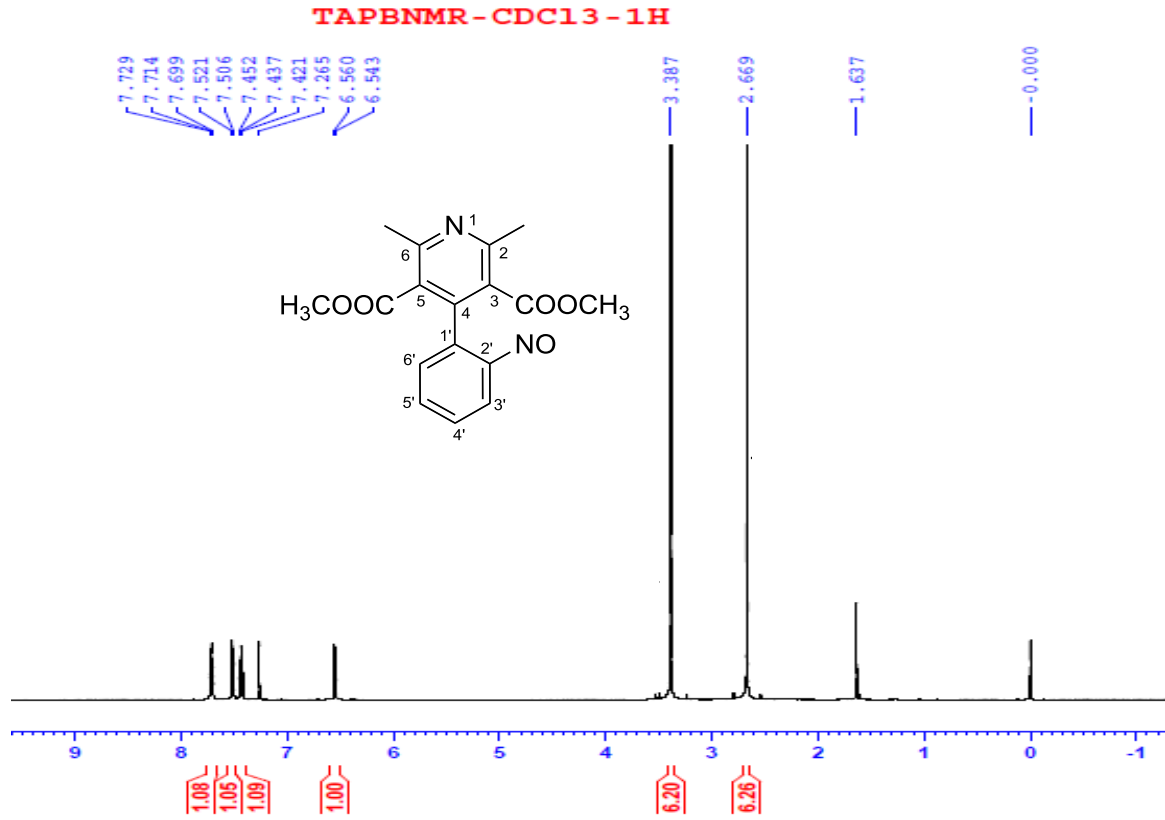
**Phụ lục 4.10. Phổ MS của sản phẩm tổng hợp tạp B của nifedipin**



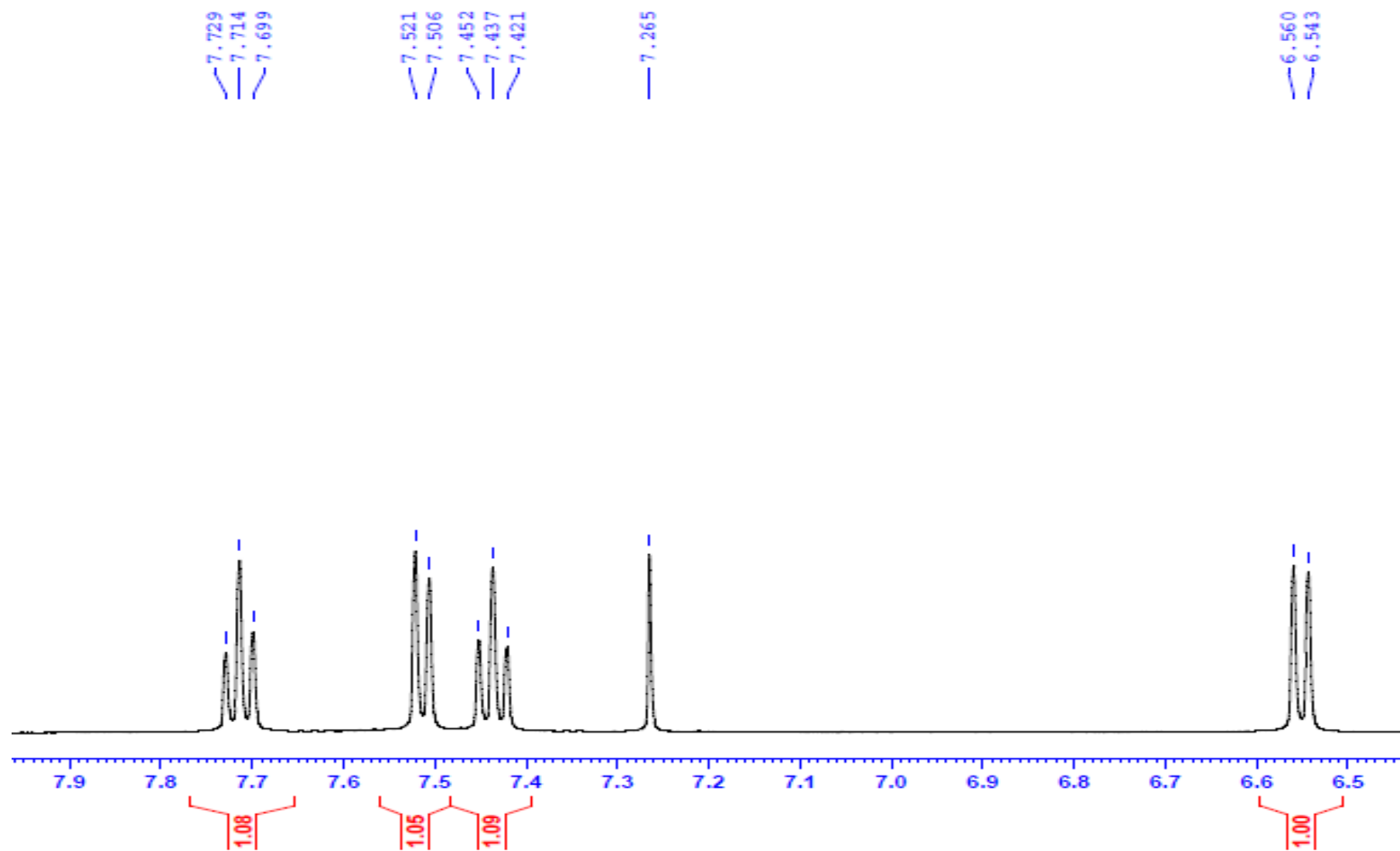
Phụ lục 4.11. Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR của sản phẩm tổng hợp tạp B của nifedipin



Phụ lục 4.12. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của sản phẩm tổng hợp tạp B của nifedipin



## TAPBNMR - CDC13 - 1H

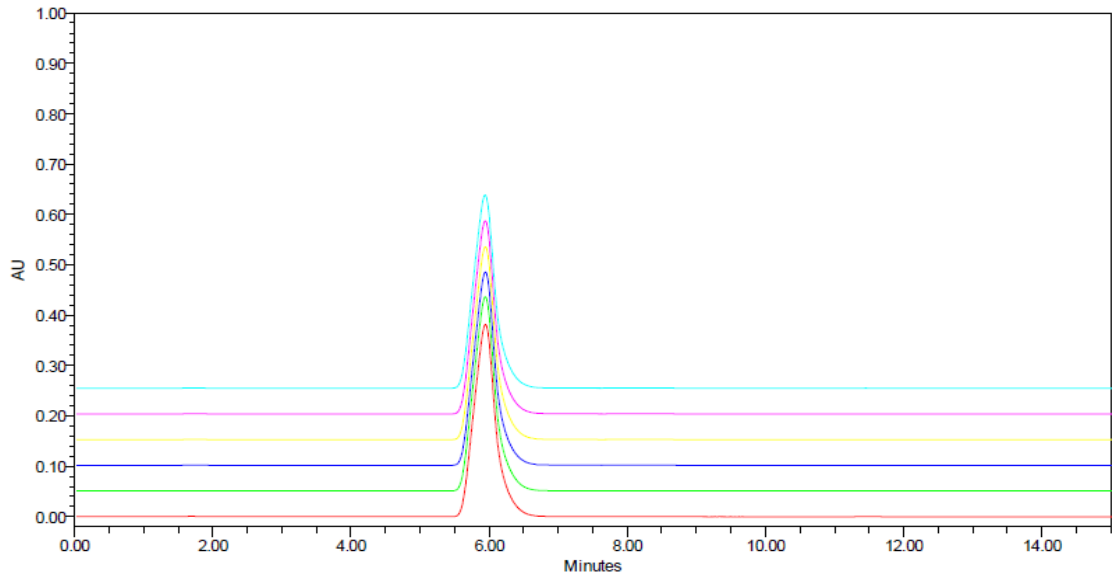


**Phụ lục 4.13.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống ( $n = 6$ ) của qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin

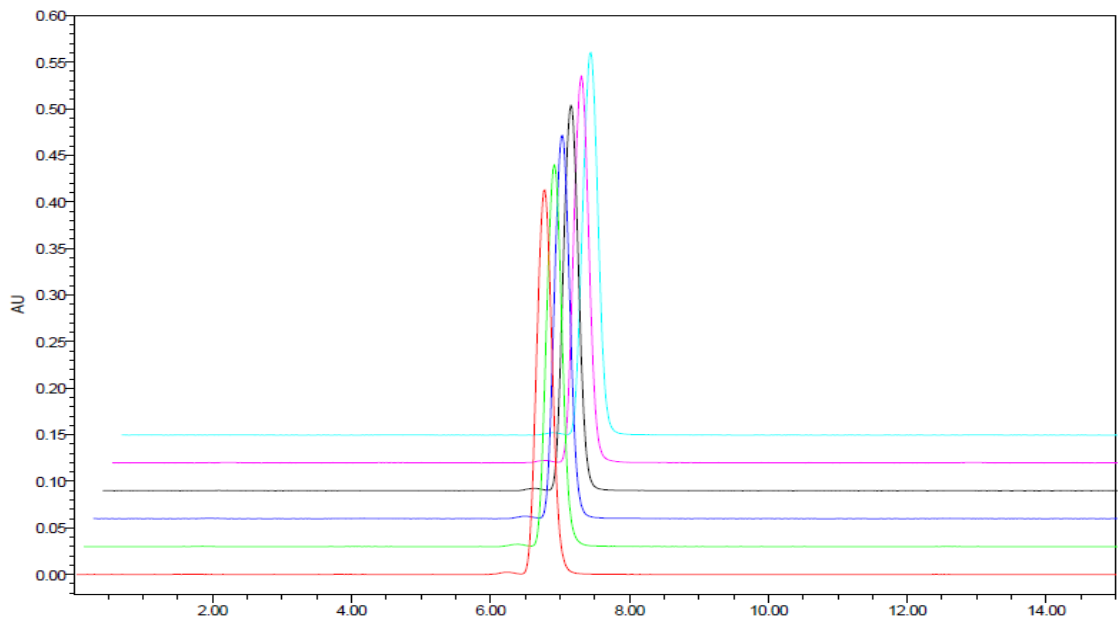
Tạp	Lần tiêm	$t_R$ (phút)	S ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )	$A_s$	N
A	1	5,947	8487439	1,16	11027
	2	5,946	8683634	1,16	10660
	3	5,947	8599920	1,16	10800
	4	5,946	8582414	1,16	10820
	5	5,945	8589362	1,16	10846
	6	5,943	8586055	1,16	10880
	<b>Trung bình</b>		5,946	8588137	1,16
	<b>RSD (%)</b>	<b>0,02</b>	<b>0,73</b>	<b>0</b>	<b>1,09</b>
B	1	6,778	6405198	1,07	28420
	2	6,784	6393399	1,06	28160
	3	6,760	6402086	1,06	28260
	4	6,752	6389510	1,06	28353
	5	6,765	6396219	1,05	28180
	6	6,762	6409752	1,03	27067
	<b>Trung bình</b>		6,767	6399361	1,06
	<b>RSD (%)</b>	<b>0,18</b>	<b>0,12</b>	<b>1,31</b>	<b>1,79</b>

$t_R$ : thời gian lưu, S: diện tích pic,  $A_s$ : hệ số bất đối, N: số đĩa lý thuyết.

**Phụ lục 4.14.** *Sắc ký đồ dung dịch tap A của nifedipin khi khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết tap A và tap B của nifedipin*



**Phụ lục 4.15.** *Sắc ký đồ dung dịch tap B của nifedipin khi khảo sát tính phù hợp hệ thống của qui trình xác định độ tinh khiết tap A và tap B của nifedipin*





**Phụ lục 4.16.** Kết quả khảo sát miền giá trị của tạp A trong qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin

Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic trung bình ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )	Các giá trị thống kê	
0,050	1342912	$R^2$	0,9999
0,100	2729176	$F_{in}$	18315,57
0,125	3453454	$F_{0,05}$	4,474
0,200	5537091	$t_a$	135,335
0,250	6765928	$t_b$	1,976
0,400	10648544	$t_{0,05}$	2,571
0,500	13351006		
	Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 26507786x$	
	Khoảng tuyến tính	0,05 – 0,50 mg/ml	

SUMMARY OUTPUT								
<b>Regression Statistics</b>								
Multiple R	0,999864							
R Square	0,999727							
Adjusted R Square	0,999672							
Standard Error	79173,49							
Observations	7							
<b>ANOVA</b>								
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>			
Regression	1	1,15E+14	1,15E+14	18315,57	4,18E-10			
Residual	5	3,13E+10	6,27E+09					
Total	6	1,15E+14						
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	107565,6	54433	1,97611	0,1051	-32358,9	247490,1	-32358,9	247490,1
X Variable	26507786	195867,9	135,335	4,18E-10	26004291	27011280	26004291	27011280
<b>RESIDUAL OUTPUT</b>								
	<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>					
	1	1432955	-90042,9					
	2	2758344	-29168,2					
	3	3421039	32415,18					
	4	5409123	127968,3					
	5	6734512	31415,97					
	6	10710680	-62135,9					
	7	13361458	-10452,5					

Bình phương hệ số tương quan  $R^2 = 0,9999$

Tính thích hợp phương trình hồi quy:  $F_m = 18315,6 > F_{0,05} = 4,747$

Ý nghĩa của phương trình hồi quy

Hệ số A = 26507786 có  $t_A = 135,335 > t_{0,05(7)} = 2,571$

Hệ số B = 107565,6 có  $t_B = 1,97611 < t_{0,05(7)} = 2,571 \Rightarrow$  loại bỏ hệ số B

Từ những kết quả trên, phương trình biểu diễn sự tương quan diện tích pic theo nồng độ phân tích của tạp A ở bước sóng 254 nm là  $\hat{y} = 26507786x$  với khoảng tuyến tính từ 0,05 – 0,5 mg/mL.

**Phụ lục 4.17.** Kết quả khảo sát miền giá trị của tạp B trong qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin

<b>Nồng độ B (mg/ml)</b>	<b>Diện tích pic trung bình (<math>\mu\text{V} \times \text{giây}</math>)</b>	<b>Các giá trị thống kê</b>	
0,050	1330533	$R^2$	0,9999
0,100	2658763	$F_{\text{tn}}$	t
0,125	3298020	$F_{0,05}$	4,474
0,200	5248002	$t_a$	165,304
0,250	6590237	$t_b$	2,455
0,300	7779972	$t_{0,05}$	2,571
0,400	10318200		
	Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 25684885x$	
	Khoảng tuyến tính	0,05 – 0,40 mg/ml	

SUMMARY OUTPUT								
<i>Regression Statistics</i>								
Multiple R	0,999908522							
R Square	0,999817053							
Adjusted R Square	0,999780463							
Standard Error	46752,54093							
Observations	7							
<i>ANOVA</i>								
	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Significance F</i>			
Regression	1	5,97276E+13	5,97276E+13	27325,28802	1,53717E-10			
Residual	5	10929000415	2185800083					
Total	6	5,97385E+13						
	<i>Coefficients</i>	<i>Standard Error</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-value</i>	<i>Lower 95%</i>	<i>Upper 95%</i>	<i>Lower 95,0%</i>	<i>Upper 95,0%</i>
Intercept	88966,5355	36232,21526	2,455453934	0,05754921	-4171,33891	182104,4099	-4171,33891	182104,4099
X Variable 1	25684885,09	155380,0486	165,3036237	1,53717E-10	25285467,96	26084302,22	25285467,96	26084302,22
<i>RESIDUAL OUTPUT</i>								
	<i>Observation</i>	<i>Predicted Y</i>	<i>Residuals</i>					
	1	1373210,79	-42677,78994					
	2	2657455,044	1307,955621					
	3	3299577,172	-1557,171598					
	4	5225943,553	22058,44675					
	5	6510187,808	80049,19231					
	6	7794432,062	-14460,06213					
	7	10362920,57	-44720,57101					

Bình phương hệ số tương quan  $R^2 = 0,9999$

Tính thích hợp phương trình hồi quy:  $F_{\text{tn}} = 27325,28 > F_{0,05} = 4,747$

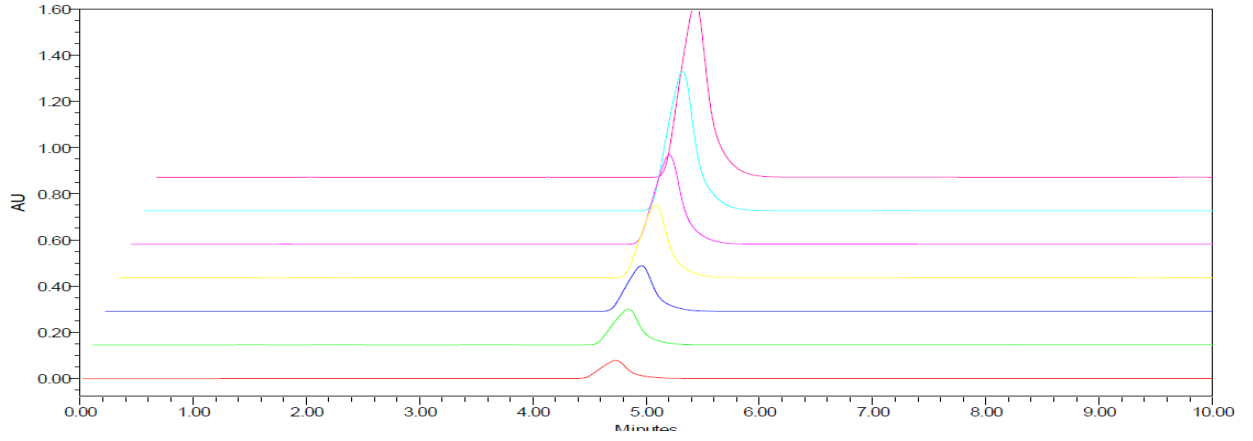
Ý nghĩa của phương trình hồi quy

Hệ số A = 25684885,09 có  $t_A = 165,304 > t_{0,05} = 2,571$

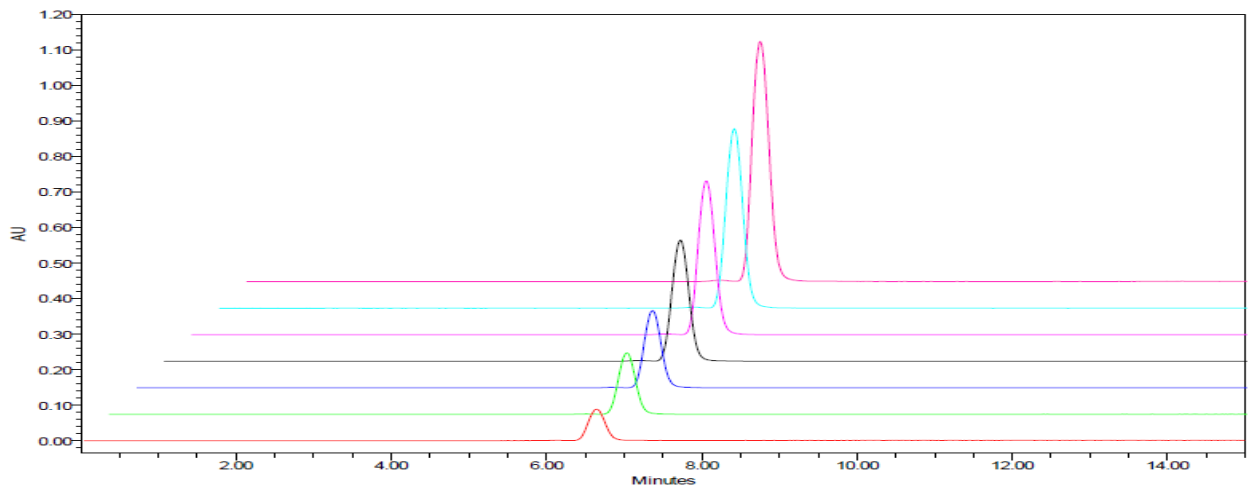
Hệ số B = 107565,6 có  $t_B = 2,4554 < t_{0,05} = 2,571 \Rightarrow$  loại bỏ hệ số B

Từ những kết quả trên, phương trình biểu diễn sự tương quan diện tích pic theo nồng độ phân tích của tạp B ở bước sóng 254nm là  $\hat{y} = 25684885,09 x$  với khoảng tuyến tính từ 0,05 – 0,4 mg/mL.

**Phụ lục 4.18.** Sắc ký đồ khảo sát miền giá trị của tạp A của nifedipin của qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin



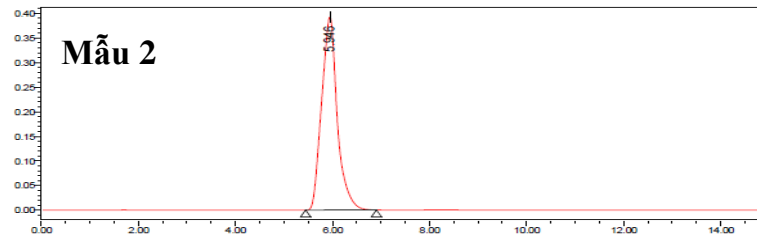
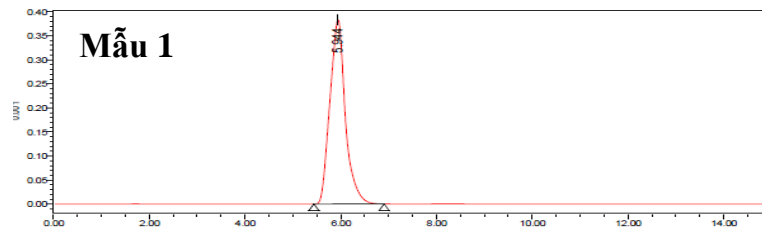
**Phụ lục 4.19.** Sắc ký đồ khảo sát miền giá trị của tạp B của nifedipin của qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin

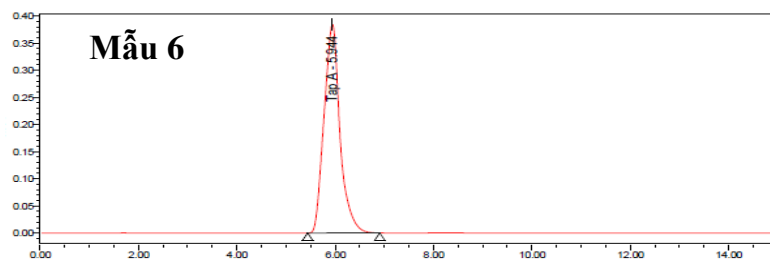
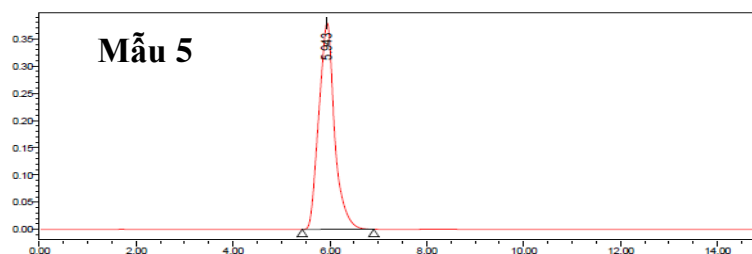
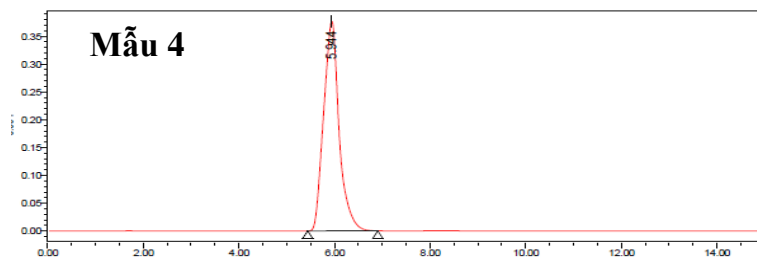
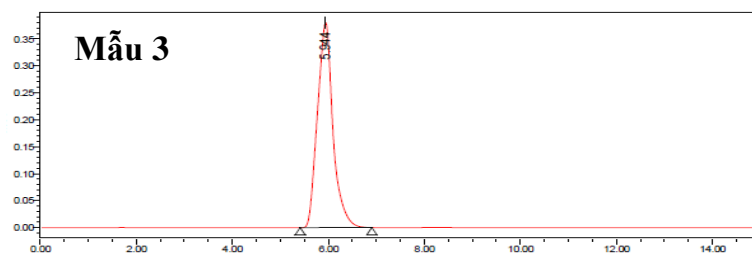


**Phụ lục 4.20.** Kết quả khảo sát độ lặp lại của qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin với mẫu thử tạp A ( $n=6$ )

Nồng độ tạp A (mg/ml)	Diện tích pic ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )		Độ tinh khiết sắc ký tạp A (%)
	Tạp A	Tạp khác	
0,250	6632856	0	100
0,255	6738248	0	100
0,255	6729341	0	100
0,250	6717838	0	100
0,250	6717318	0	100
0,255	6720863	0	100
<b>Độ tinh khiết sắc ký trung bình <math>x_{tb}</math> (%)</b>			100
<b>RSD (%)</b>			0

Sắc ký đồ mẫu thử tạp A của nifedipin khi khảo sát độ lặp lại của phương pháp xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin

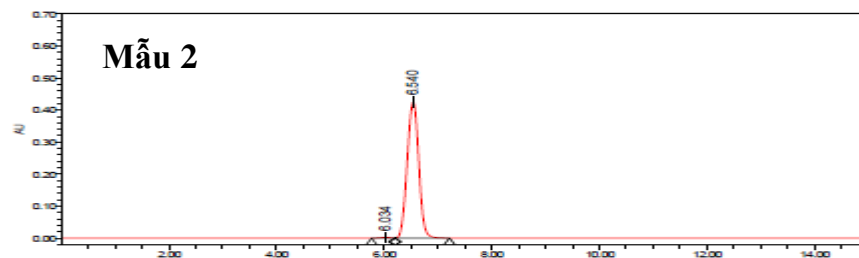
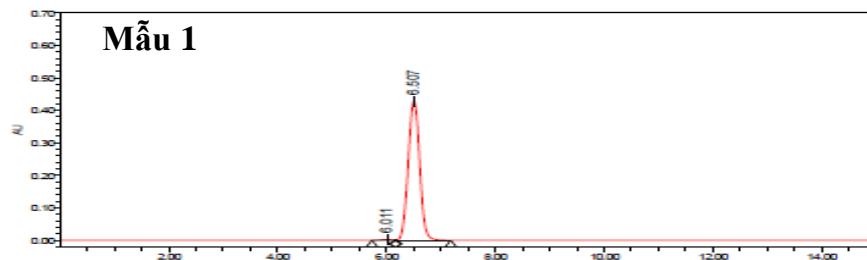




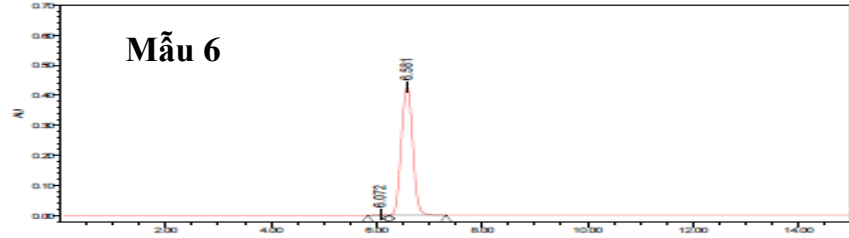
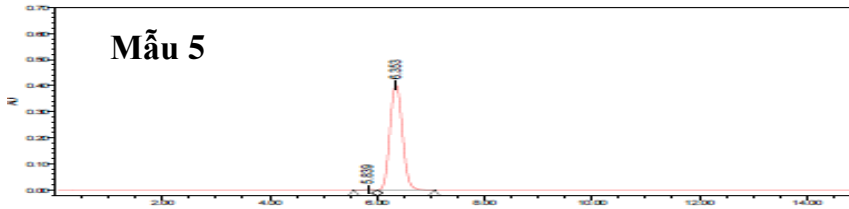
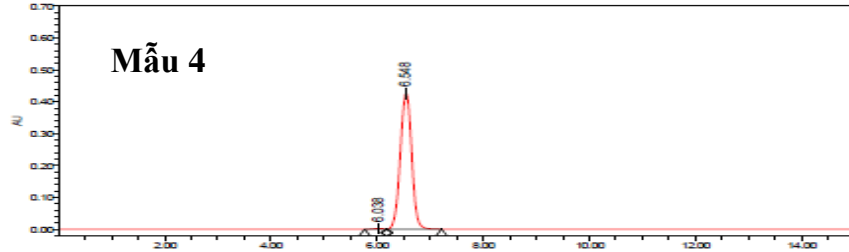
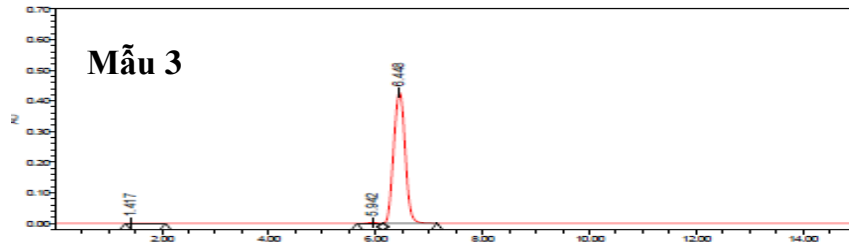
**Phụ lục 4.21.** Kết quả khảo sát độ lặp lại của qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin với mẫu thử tạp B (n=6)

Nồng độ tạp B (mg/ml)	Diện tích pic ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )			Độ tinh khiết sắc ký tạp B (%)
	Tạp B	Tạp X	Tổng	
0,245	6283066	27839	6310905	99,56
0,245	6359904	30018	6389922	99,53
0,245	6381616	40382	6421998	99,37
0,245	6375359	28531	6403890	99,55
0,250	6516575	26868	6543443	99,59
0,250	6422535	25624	6448159	99,60
<b>Độ tinh khiết sắc ký trung bình <math>x_{tb}</math> (%)</b>				99,53%
<b>RSD</b>				0,08%

Sắc ký đồ mẫu thử tạp B khi khảo sát độ lặp lại của phương pháp xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin







**Phụ lục 4.22.** Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin với mẫu thử tạp A

Nồng độ tạp A ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diện tích pic ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )		Độ tinh khiết tạp A (%)
	Tạp A	Tạp khác	
0,300	8596551	0	100
0,310	8778654	0	100
0,305	8520975	0	100
0,300	8484721	0	100
0,300	8529452	0	100
0,310	8638193	0	100
<b>RSD (%)</b>			<b>0</b>

**Phụ lục 4.23.** Kết quả khảo sát độ chính xác trung gian của qui trình xác định độ tinh khiết tạp A và tạp B của nifedipin với mẫu thử tạp B

Nồng độ tạp B ( $\mu\text{g/mL}$ )	Diện tích pic ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )			Hàm lượng tạp B (%)
	Tạp B	Tạp X	Tổng	
245	6342279	28698	6370977	99,55
245	6364493	28601	6393094	99,55
245	6396736	31029	6427765	99,52
245	6494037	28861	6522898	99,56
250	6390497	28081	6418578	99,56
250	6437894	28387	6466281	99,56
Giá trị hàm lượng trung bình $x_{tb}$ (%)				99,55%
RSD				1,68%
Giới hạn tin cậy e ( $p=0,95$ ; $t = 2,571$ )				0,02
Khoảng tin cậy				99,53% - 99,57%

**Phụ lục 4.24.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ tap A của nifedipin

Kết quả xác định độ tinh khiết tap A của nifedipin trong quá trình đóng lọ

Số thứ tự lọ	Lượng cân (mg)	Diện tích pic ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )	Độ tinh khiết (%)	Xử lý thống kê
1	4,84	3183839	99,38	n = 6; $x_{\text{TB}} = 99,44\%$ ; RSD = 0,11% (với t = 2,571; p = 0,95)
2	4,12	2710886	99,41	
3	4,83	3175928	99,34	
4	4,93	3250249	99,60	
5	4,30	2834052	99,57	
6	4,98	3275149	99,36	
Chuẩn tap A	4,94	3269785		

Đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ theo phương pháp thống kê phân tích ANOVA một yếu tố, so sánh 2 giá trị  $F_{\text{tn}}$  và  $F_{\text{tc}}$ .

Phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA (tap A của nifedipin) trong đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	$F_{\text{tn}}$	$F_{\text{tc}}$
Giữa các nhóm	0,026667	1	0,026667	2,909	7,709
Trong cùng nhóm	0,036667	4	0,009167		
Tổng cộng	0,063333	5			

Nhận xét:  $F_{\text{tn}} = 2,909 < F_{\text{tc}} = 7,709$ . Vậy các lọ trong quá trình đóng đồng nhất.

**Phụ lục 4.25.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ tap A của nifedipin liên phòng thí nghiệm

Kết quả định lượng tap A của nifedipin tại hai phòng thí nghiệm

Mẫu	PTN 1	PTN 2
1	99,38%	100,25%
2	99,41%	99,61%
3	99,34%	99,93%
4	99,60%	99,42%
5	99,57%	99,58%
6	99,36%	99,96%
<b>Trung bình</b>	<b>99,44%</b>	<b>99,79%</b>

Việc đánh giá độ đồng nhất lọ giữa 2 phòng thí nghiệm được thực hiện qua việc đánh giá kết quả định lượng trung bình giữa 2 phòng thí nghiệm, sử dụng phương pháp thống kê phân tích ANOVA, so sánh 2 giá trị  $F_{tn}$  và  $F_{tc}$ .

Kết quả phân tích ANOVA (tap A của nifedipin) trong đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	$F_{tn}$	$F_{tc}$
Giữa các nhóm	0,132075	5	0,026415	4,496798	6,607891
Trong cùng nhóm	0,364008	1	0,364008		
Độ lệch	0,404742	5	0,080948		
Tổng cộng	0,900825	11			

$F_{tn} = 4,496 < F_{tc} = 6,607$ . Vậy kết quả định lượng giữa 2 phòng thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê. 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.

**Phụ lục 4.26.** Kết quả tính giá trị ổn định hàm lượng tại A của nifedipin ( $n = 11$ )

	x*0	x*1	x*2	x*3	lzl
$\delta = 1,5s^*$		0,40041	0,356857	0,3875859	
$x^* - \delta$		99,1746	99,2181	99,2011	
$x^* + \delta$		99,9754	99,9319	99,9762	
	99,34	99,34	99,34	99,34	0,96
	99,36	99,36	99,36	99,36	0,88
	99,38	99,38	99,38	99,38	0,81
	99,41	99,41	99,41	99,41	0,69
	99,42	99,42	99,42	99,42	0,65
	99,57	99,57	99,57	99,57	0,07
	99,58	99,58	99,58	99,58	0,03
	99,6	99,6	99,6	99,6	0,04
	99,61	99,61	99,61	99,61	0,08
	99,93	99,93	99,93	99,93	1,32
	99,96	99,96	99,93	99,93	1,44
	100,25	99,98	99,93	99,93	2,56
Trung bình	99,618	99,595	99,589	99,589	
Độ lệch s	0,286	0,238	0,228	0,228	
Trung vị	99,575	99,575	99,575	99,575	
$x^*$ mới	99,575	99,595	99,589	99,589	
$s^*$ mới	0,267	0,270	0,258	0,258	

**Phụ lục 4.27.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ tap B của nifedipin

Kết quả xác định độ tinh khiết tap B của nifedipin trong quá trình đóng lọ

Số thứ tự lọ	Lượng cân (mg)	Diện tích pic ( $\mu\text{V} \times \text{giây}$ )	Độ tinh khiết (%)	Xử lý thống kê
1	4,82	2596558	99,70	n = 6; $x_{\text{TB}} = 99,68\%$ ; RSD = 0,18% (với t = 2,571; p = 0,95)
2	4,48	2418813	99,92	
3	4,48	2408315	99,49	
4	4,72	2540179	99,60	
5	4,40	2366190	99,52	
6	4,71	2541607	99,86	
Chuẩn tap B	4,17	2253244		

Đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ theo phương pháp thống kê phân tích ANOVA một yếu tố, so sánh 2 giá trị  $F_{\text{tn}}$  và  $F_{\text{tc}}$

Phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA (tap B của nifedipin) trong đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	$F_{\text{tn}}$	$F_{\text{tc}}$
Giữa các nhóm	0,002817	1	0,002817	0,072	7,709
Trong cùng nhóm	0,155667	4	0,038917		
Tổng cộng	0,158483	5			

Nhận xét:  $F_{\text{tn}} = 0,072 < F_{\text{tc}} = 7,709$ . Vậy các lọ trong quá trình đóng đồng nhất.

**Phụ lục 4.28.** Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ tap B của nifedipin liên phòng thí nghiệm

Kết quả định lượng tap B của nifedipin tại hai phòng thí nghiệm

Mẫu	PTN 1	PTN 2
1	99,70%	99,74%
2	99,92%	99,86%
3	99,49%	99,47%
4	99,60%	99,67%
5	99,52%	99,81%
6	99,86%	99,85%
<b>Trung bình</b>	<b>98,681%</b>	<b>98,733%</b>

Việc đánh giá độ đồng nhất lọ giữa 2 phòng thí nghiệm được thực hiện qua việc đánh giá kết quả định lượng trung bình giữa 2 phòng thí nghiệm, sử dụng phương pháp thống kê phân tích ANOVA, so sánh 2 giá trị  $F_{tn}$  và  $F_{tc}$ .

Kết quả phân tích ANOVA (tap B của nifedipin) trong đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	$F_{tn}$	$F_{tc}$
Giữa các nhóm	0,008008	1	0,008008	0,300	4,965
Trong cùng nhóm	0,267417	10	0,026742		
Tổng cộng	0,275425	11			

$F_{tn} = 0,300 < F_{tc} = 4,965$ . Vậy kết quả định lượng giữa 2 phòng thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê. 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.

**Phụ lục 4.29.** Kết quả tính giá trị ổn định hàm lượng tại B của nifedipin ( $n = 12$ )

	x*0	x*1	x*2	lzl
$\delta = 1,5s^*$		0,3003075	0,2712956	
$x^* - \delta$		99,4197	99,4487	
$x^* + \delta$		100,0203	99,9913	
	99,47	99,47	99,47	1,50
	99,49	99,49	99,49	1,37
	99,52	99,52	99,52	1,18
	99,6	99,6	99,6	0,68
	99,67	99,67	99,67	0,24
	99,7	99,7	99,7	0,05
	99,74	99,74	99,74	0,21
	99,81	99,81	99,81	0,65
	99,85	99,85	99,85	0,90
	99,86	99,86	99,86	0,96
	99,86	99,86	99,86	0,96
	99,92	99,92	99,92	1,34
Trung bình	99,708	99,708	99,708	
Độ lệch s	0,158	0,158	0,158	
Trung vị	99,720	99,720	99,720	
$x^*$ mới	99,720	99,708	99,708	
$s^*$ mới	0,200	0,181	0,181	



**Phụ lục 4.30.** Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống trên dung dịch chuẩn (n=6) của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong thành phẩm chứa nifedipin

<b>Dung dịch chuẩn (n = 6)</b>				
	<b>t<sub>R</sub> (phút)</b>	<b>S (μV x giây)</b>	<b>A<sub>s</sub></b>	<b>Rs</b>
<b>Tạp A</b>				
1	8,647	1588541	1,12	4,20
2	8,653	1582744	1,10	4,20
3	8,640	1584680	1,12	4,20
4	8,627	1584049	1,11	4,18
5	8,620	1587933	1,10	4,18
6	8,607	1593275	1,13	4,19
<b>TB</b>	<b>8,632</b>	<b>1586870</b>	<b>1,11</b>	<b>4,19</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,202</b>	<b>0,244</b>	<b>1,088</b>	<b>0,235</b>
<b>Tạp B</b>				
1	10,360	913254	1,12	4,08
2	10,367	916235	1,10	4,07
3	10,353	923730	1,11	4,08
4	10,333	924336	1,11	4,18
5	10,320	926679	1,12	4,09
6	10,313	926260	1,11	4,09
<b>TB</b>	<b>10,337</b>	<b>921749</b>	<b>1,11</b>	<b>4,08</b>
<b>RSD (%)</b>	<b>0,218</b>	<b>0,610</b>	<b>0,677</b>	<b>0,200</b>

*t<sub>R</sub>*: thời gian lưu, *S*: diện tích pic, *A<sub>s</sub>*: hệ số bất đối, *TB*: trung bình, *RSD*: độ lệch chuẩn tương đối.

**Phụ lục 4.31.** Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống trên dung dịch chuẩn ( $n=6$ ) của qui trình định lượng tạp A và tạp B của nifedipin trong nguyên liệu nifedipin

<b>Dung dịch chuẩn (n = 6)</b>				
	<b><math>t_R</math> (phút)</b>	<b>S (<math>\mu\text{V} \times \text{giây}</math>)</b>	<b><math>A_s</math></b>	<b><math>R_s</math></b>
<b>Tạp A</b>				
1	9,293	632911	1,13	4,49
2	9,307	632858	1,12	4,48
3	9,287	633377	1,12	4,48
4	9,267	632898	1,11	4,47
5	9,267	635097	1,13	4,47
6	9,267	633651	1,13	4,48
<b>TB</b>	9,281	633465	1,12	4,48
<b>RSD (%)</b>	0,183	0,136	0,727	0,168
<b>Tạp B</b>				
1	11,227	707648	1,13	4,42
2	11,240	711705	1,14	4,42
3	11,220	714402	1,12	4,41
4	11,187	715722	1,12	4,41
5	11,193	716767	1,13	4,42
6	11,187	717534	1,13	4,42
<b>TB</b>	11,209	713963	1,123	4,42
<b>RSD (%)</b>	0,205	0,520	0,667	0,117

$t_R$ : thời gian lưu, S: diện tích pic,  $A_s$ : hệ số bất đối, TB: trung bình, RSD: độ lệch chuẩn tương đối.