

ĐIỀU CHẾ VÀ THIẾT LẬP TẠP CHẤT ĐỐI CHIẾU A VÀ C CỦA MELOXICAM

Võ Minh Thắng¹, Nguyễn Đức Tuấn²

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Tạp A và tạp C có nguồn gốc từ quá trình tổng hợp meloxicam. Trong chuyên luận nguyên liệu và thành phẩm meloxicam của dược điển Việt Nam V và dược điển tham chiếu có quy định kiểm tra tạp A và tạp C. Trong danh mục chất chuẩn quốc gia vẫn chưa có tạp A và tạp C chuẩn. Cho đến nay, chưa có nghiên cứu trong nước công bố quy trình điều chế tạp A và tạp C của meloxicam.

Mục tiêu: Điều chế và thiết lập tạp chất đối chiếu A và C của meloxicam.

Đối tượng và phương pháp: Tạp A được điều chế từ ethyl 4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazin-3-carboxylat 1,1-dioxid bằng phương pháp kết tinh với ethanol. Tạp C được tổng hợp bằng phản ứng thế S_N2 giữa meloxicam và methyl iodid trong môi trường dimethyl sulfoxid/kali hydroxyd và tinh chế bằng phương pháp kết tinh trong dimethylformamid. Các sản phẩm điều chế được xác định cấu trúc bằng các kỹ thuật phổ nghiệm, định lượng bằng HPLC-PDA và thiết lập chất đối chiếu.

Kết quả: Tạp A được tinh chế với hiệu suất 87%. Tạp C được tổng hợp và tinh chế với hiệu suất 67%. Sản phẩm điều chế có hàm lượng trên 99% tính trên nguyên trạng, đủ điều kiện thiết lập chất đối chiếu.

Kết luận: Tạp A và C meloxicam đã được điều chế và thiết lập chất đối chiếu sử dụng trong kiểm tra tạp chất của meloxicam.

Từ khoá: tạp chất của meloxicam, ethyl 4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazin-3-carboxylat 1,1-dioxid, (Z)-N-methyl meloxicam, N-[(2Z)-3,5-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene]-4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazin-3-carboxamid 1,1-dioxid

ABSTRACT

SYNTHESIS AND ESTABLISHMENT OF REFERENCE SUBSTANCE AS RELATED COMPOUNDS A AND C OF MELOXICAM

Vo Minh Thang, Nguyen Duc Tuan

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 26 - No. 2 - 2022: 37 - 51

Background: Meloxicam impurity A and impurity C, the related compounds of meloxicam, are process-related impurity. The Vietnamese V and reference Pharmacopoeias require testing impurity A and impurity C in meloxicam pharmaceutical substances and finished products. However, the reference standards of impurity A and impurity C are not in the national list of reference standards. There have been no published local studies on chemical synthesis and reference substance establishment of impurity A and impurity C so far.

Objectives: This study was conducted with the aim of synthesis and establishment of reference substance as related compounds A and C of meloxicam.

Methods: Impurity A was purified from ethyl 4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylate 1,1-dioxide by recrystallization with ethanol. Impurity C was synthesized from meloxicam by S_N2 reaction with iodomethane in dimethyl sulfoxide/potassium hydroxide, then purified by recrystallization with dimethylformamide. The products were structurally determined by spectroscopic techniques, assayed by HPLC-PDA, and finally established as reference substance.

Results: Impurity A was purified with yield of 87%. Impurity C was synthesized and purified with total yield

¹Trung tâm Kiểm nghiệm Thuốc, Mỹ phẩm, Thực phẩm Tiên Giang

²Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Tác giả liên lạc: GS.TS.DS. Nguyễn Đức Tuấn

ĐT: 0913799068

Email: ductuan@ump.edu.vn

of 67%. The products had HPLC purity over 99% on the basis and conformed to establish reference substance.

Conclusion: Impurity A and C were successfully synthesized and established as the reference substances for related compound test of meloxicam.

Keywords: meloxicam impurity, ethyl 4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylate 1,1-dioxide, (Z)-N-methyl meloxicam, N-[(2Z)-3,5-dimethylthiazol-2(3H)-ylidene]-4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxamide 1,1-dioxide

ĐẶT VẤN ĐỀ

Tạp A (ethyl 4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylat 1,1-dioxid) và tạp C (N-[(2Z)-3,5-dimethylthiazol-2(3H)-yliden]-4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazin-3-carboxamid 1,1-dioxid hay (Z)-N-methyl meloxicam) của meloxicam là tạp xuất hiện trong quá trình tổng hợp và gây ảnh hưởng không nhỏ đến hiệu quả điều trị và đặc tính an toàn của các chế phẩm chứa meloxicam^(1,2). Vì vậy, trong chuyên luận nguyên liệu và thành phẩm meloxicam của dược điển Việt Nam V và các dược điển tham chiếu (BP 2020, USP 43 và EP 10.0) có quy định kiểm nghiệm tạp A và C của meloxicam⁽³⁻⁶⁾. Tuy nhiên, trong danh mục chất chuẩn của hệ thống kiểm nghiệm quốc gia hiện tại vẫn chưa có 2 tạp chuẩn này^(7,8). Mặt khác, tạp A và tạp C chuẩn đã được thương mại hóa với giá thành khá cao (khoảng 355 SGD/lọ 15 mg với tạp A và 293 SGD/lọ 10 mg với tạp C) và thường phải liên hệ trước nhiều tháng với nhà cung cấp mới có thể mua được nên gây không ít khó khăn cho công tác kiểm tra tạp chất này trong nguyên liệu và thành phẩm meloxicam^(9,10). Vì tạp A là một trong các nguyên liệu để điều chế các thuốc thuộc dẫn xuất oxiam như meloxicam, piroxicam... nên đã có nhiều công trình nghiên cứu tổng hợp tạp chất này⁽¹¹⁻¹³⁾ và đã được thương mại hóa ở dạng hóa chất. Đối với tạp C, cho đến nay chỉ có 01 nghiên cứu có đề cập đến quy trình tổng hợp⁽²⁾. Trong khi đó, ở Việt Nam hiện vẫn chưa có tác giả nào công bố công trình điều chế tạp A và C của meloxicam. Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn trên, bài báo này công bố quy trình điều chế và thiết lập tạp chất đối chiếu A và C của meloxicam.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng nghiên cứu

Tạp A và tạp C của meloxicam.

Nguyên vật liệu

Chất chuẩn và nguyên liệu

Tạp A meloxicam EP-CRS, số lô: 2, hàm lượng 100,0% tính trên nguyên trạng, bảo quản ở $5 \pm 3^\circ\text{C}$, tránh ánh sáng và đựng trong lọ kín. Tạp C meloxicam EP-CRS, số lô: 4, hàm lượng 100,0% tính trên nguyên trạng, bảo quản ở $5 \pm 3^\circ\text{C}$, tránh ánh sáng và đựng trong lọ kín. Ethyl 4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylat 1,1-dioxid của nhà sản xuất Sigma-Aldrich, hàm lượng 97% tính trên nguyên trạng, số lô: MKCK0124, bảo quản tránh ánh sáng. Nguyên liệu meloxicam sản xuất tại Ấn Độ, hàm lượng 99,51% tính trên nguyên trạng, số lô: TD/ML/016/03/16-17, bảo quản tránh ánh sáng.

Dụng môi, hóa chất

Acetonitril đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng. Acid phosphoric, aceton, cloroform, ethyl acetat, hexan, methanol, acid acetic băng, dimethyl sulfoxid (DMSO), ethanol, kali hydroxyd, methyl iodid, dimethylformamid (DMF) đạt tiêu chuẩn phân tích.

Thiết bị và dụng cụ phân tích

Các thiết bị phân tích đều được hiệu chuẩn theo yêu cầu của GLP và ISO/IEC 17025, bao gồm: hệ thống LC/MS IT-TOF Shimadzu LCMS-8040, hệ thống HPLC-PDA Shimadzu CBM 20A, cân phân tích Mettler Toledo XP62, máy đo pH Mettler Toledo B50146045, máy IR Shimadzu iS50FT-IR, máy NMR Bruker Advance III. Các dụng cụ thủy tinh đạt yêu cầu chính xác dùng trong phân tích.

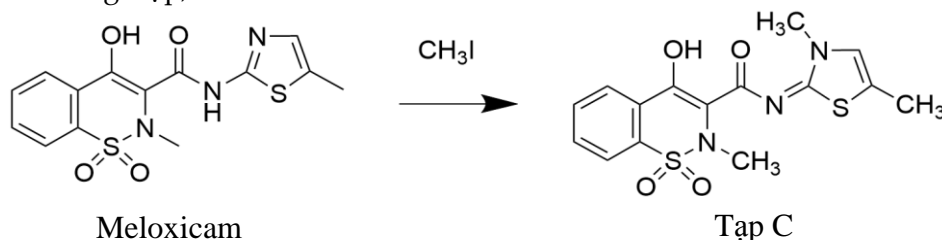
Phương pháp nghiên cứu

Điều chế tạp A

Tạp A được điều chế bằng phương pháp kết tinh ethyl 4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylat 1,1-dioxit trong ethanol.

Tổng hợp và tinh chế tạp C

Theo tài liệu tham khảo thì tạp C được tổng hợp từ phản ứng methyl hóa meloxicam bằng methyl iodid trong môi trường dimethyl sulfoxid với sự hiện diện của kali hydroxyd⁽²⁾. Trong quá trình tổng hợp, tiến hành khảo sát



Hình 1. Sơ đồ tổng hợp tạp C của meloxicam

Thử tinh khiết sản phẩm tinh chế

Sản phẩm tinh chế được thử tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Xác định cấu trúc

Sản phẩm tinh chế được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ nghiệm UV, IR, MS và NMR.

Xác định độ tinh khiết tạp A và C bằng HPLC-PDA

Độ tinh khiết của tạp A và C được xác định bằng phương pháp HPLC với đầu dò PDA. Điều kiện sắc ký: Cột Phenomenex C18 (150 x 4,6 mm; 5 μ m), nhiệt độ cột 40°C, thể tích tiêm mẫu 10 μ l, tốc độ dòng 1 ml/phút, bước sóng phát hiện tạp A là 313 nm và tạp C là 359 nm. Pha động: acetonitril – dung dịch diamoni hydrophosphat 0,20% được điều chỉnh đến pH 7,0 bằng H₃PO₄ (40:60, tt/tt).

Đánh giá tạp A và C

Tạp A và C được đánh giá theo các chỉ tiêu tính chất, nhiệt độ nóng chảy, định tính, độ ẩm, định lượng và tạp chất liên quan.

các yếu tố ảnh hưởng đến phản ứng như thời gian phản ứng, tỷ lệ mol meloxicam và kali hydroxyd, tỷ lệ mol meloxicam và methyl iodid. Sản phẩm tổng hợp được kiểm tra bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Chọn điều kiện phản ứng sao cho hiệu suất phản ứng cao nhất và sản phẩm tổng hợp khi được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng chỉ cho một vết chính duy nhất. Sản phẩm tổng hợp được tinh chế bằng phương pháp kết tinh trong dung môi (Hình 1).

Thiết lập chất đối chiếu tạp A và C

Đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ

Các mẫu được lấy ngẫu nhiên theo công thức $\sqrt{N} + 1$ trong đó N là tổng số lọ. Việc xác định hàm lượng tạp A và C trong từng lọ được tiến hành theo phương pháp HPLC, mỗi lọ được xác định 2 lần. Loại giá trị bất thường bằng trắc nghiệm Dixon⁽¹⁴⁾. Việc đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ được dựa theo hướng dẫn của ISO Guide 35⁽¹⁵⁾.

Đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm

Tạp A và C sau khi được đóng gói và đánh giá đồng nhất lọ đạt yêu cầu được lấy mẫu ngẫu nhiên và tiến hành xác định hàm lượng tại ba phòng thí nghiệm độc lập. Các phòng thí nghiệm được lựa chọn để gửi mẫu phải đạt GLP hoặc ISO/IEC 17025. Mỗi phòng thí nghiệm sẽ nhận được sáu lọ mẫu ngẫu nhiên kèm theo quy trình phân tích và các tài liệu liên quan. Trước khi phân tích, mỗi phòng thí nghiệm sẽ kiểm tra tính phù hợp của hệ thống với yêu cầu hệ số bất đối của pic tạp nằm trong khoảng 0,8 – 1,5 và RSD giữa 6 lần đo lặp lại không được quá 2%. Nếu đạt yêu cầu, sẽ tiến hành xác định hàm

lượng tạp A và C trên 6 mẫu đã nhận, mỗi mẫu được xác định 2 lần. Các phòng thí nghiệm được lựa chọn để gửi mẫu là Khoa Thiết lập chất chuẩn & chất đối chiếu (PTN1), Khoa Kiểm nghiệm mỹ phẩm (PTN2) và Khoa Nghiên cứu phát triển (PTN3) thuộc Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh. Việc đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm được tiến hành theo hướng dẫn của ISO 13528⁽¹⁶⁾, sử dụng phép phân tích phương sai một yếu tố ANOVA.

Xác định giá trị ấn định và độ không đảm bảo đo:

Việc xác định giá trị ấn định trên phiếu kiểm nghiệm tạp A, tạp C và độ không đảm bảo đo được thực hiện theo hướng dẫn của ISO 13528⁽¹⁶⁾, dựa theo 18 kết quả xác định hàm lượng tạp A và C tại 3 phòng thí nghiệm.

KẾT QUẢ

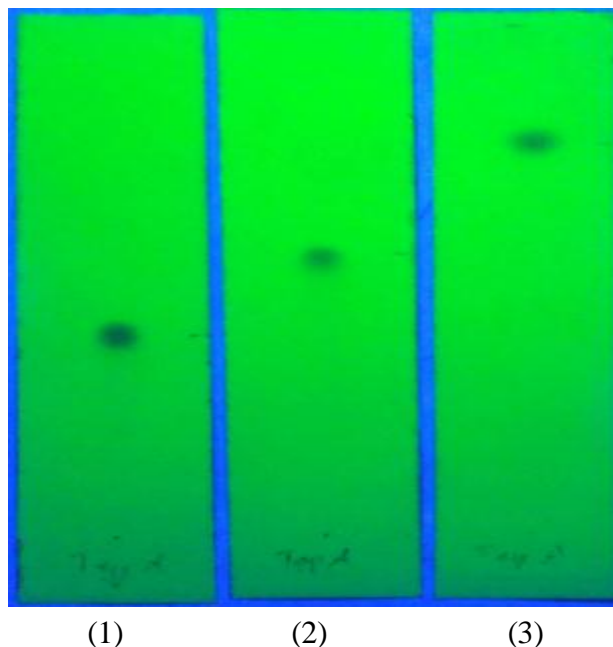
Điều chế tạp A

Việc tinh chế tạp A được thực hiện bằng phương pháp kết tinh lại với ethanol nóng như sau: Hòa tan hoàn toàn 2,18106 g ethyl 4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazin-3-

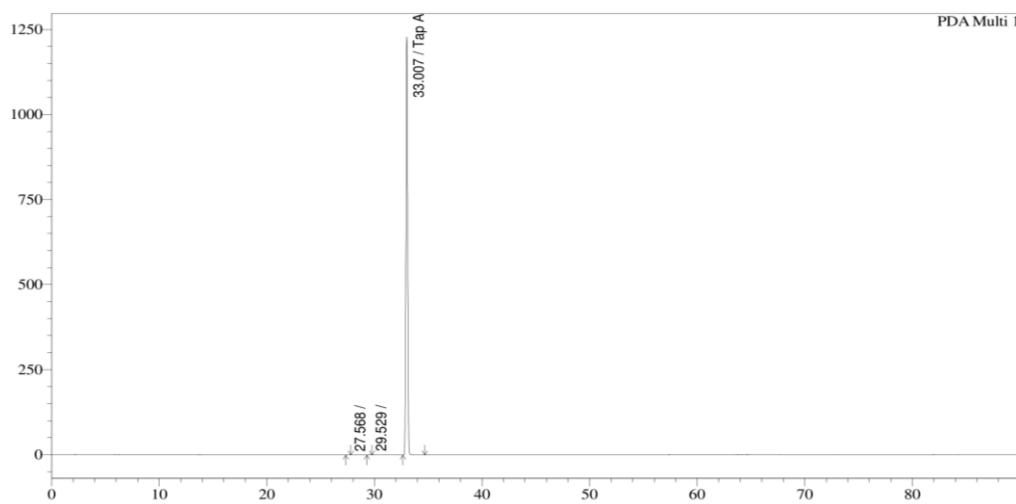
carboxylat 1,1-dioxid trong 50 ml ethanol ở nhiệt độ sôi (khoảng 78°C). Sau đó để nguội đến nhiệt độ phòng và làm lạnh, lọc thu tủa. Sấy tủa ở 80°C đến khi chênh lệch khối lượng giữa 2 lần cân liên tiếp không quá 0,5 mg (khoảng 6 giờ), thu được 1,89540 g sản phẩm tinh chế A.

Thử tinh khiết sản phẩm tinh chế A

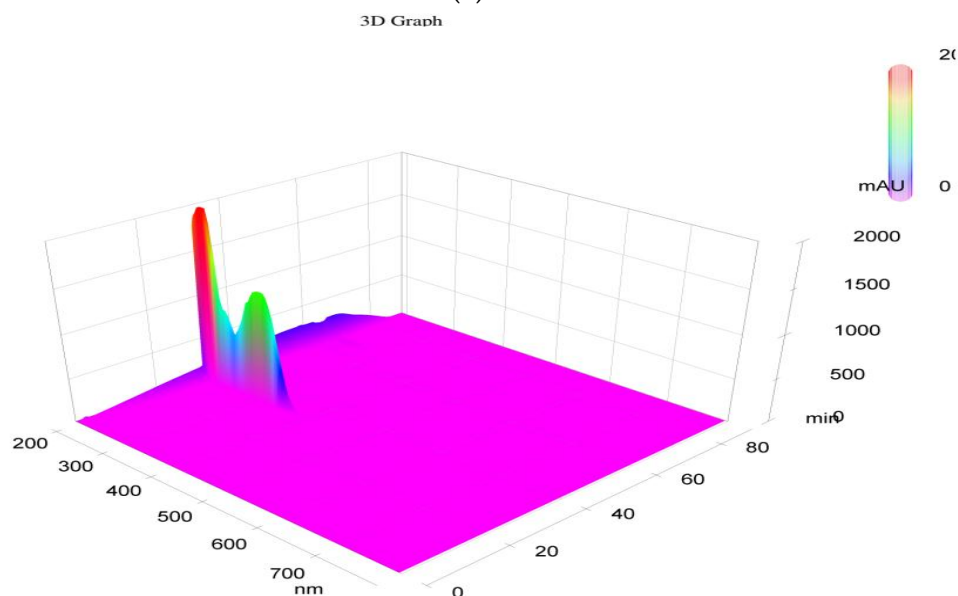
Kết quả thử tinh khiết SKLM cho thấy sản phẩm tinh chế A chỉ cho một vết duy nhất trên 3 hệ dung môi có sức rửa giải khác nhau. Kết quả thử tinh khiết sản phẩm tinh chế A bằng phương pháp HPLC, áp dụng phương pháp quy về 100% diện tích pic cho thấy sắc ký đồ 3 chiều và sắc ký đồ 2 chiều tại bước sóng hấp thụ cực đại 313 nm xuất hiện một pic chính duy nhất, pic chính đạt độ tinh khiết theo phổ UV-Vis, sản phẩm tinh chế A có độ tinh khiết sắc ký trên 99%. Hình 2 và hình 3 lần lượt minh họa sắc ký đồ SKLM và HPLC kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm tinh chế A (Hình 2).



Hình 2. Sắc ký đồ SKLM kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm tinh chế A. Điều kiện sắc ký: Bản mỏng silica gel 60 F254 (10 x 5 cm); Phát hiện: UV 254 nm; Hệ dung môi: (1) hexan – ethyl acetat (2:1), $R_f = 0,36$; (2) hexan – ethyl acetat (1:1), $R_f = 0,52$; (3) cloroform – methanol (9:1), $R_f = 0,76$. Dung dịch sản phẩm tinh chế A được pha trong cloroform có nồng độ 0,1 mg/ml



(a)



(b)

Hình 3. Sắc ký đồ dung dịch sản phẩm tinh chế A nồng độ 500 µg/ml pha trong acetonitril.

Điều kiện sắc ký: Cột Phenomenex C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm); Tốc độ dòng: 1 ml/ phút; Thể tích tiêm: 10 µl; Bước sóng phát hiện: 313 nm; Pha động: acetonitril và nước, rửa giải gradient: 0'(1:99), 2'(1:99), 62'(99:1), 65'(99:1), 74'(1:99), 90'(1:99). (a): sắc ký đồ tại bước sóng 313 nm, (b): sắc ký đồ 3 chiều

Áp dụng phương pháp quy về 100% diện tích pic để xác định độ tinh khiết sản phẩm tinh chế A:

$$\text{Độ tinh khiết sản phẩm tinh chế A} = \frac{S_{sp}}{\sum S} \times 100 = \frac{13826720}{13855171} \times 100 = 99,79\%$$

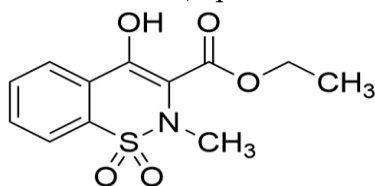
Trong đó: S_{sp} : diện tích pic sản phẩm tinh chế A.

$\sum S$: Tổng diện tích tất cả các pic (trừ pic dung môi).

Xác định cấu trúc sản phẩm tinh chế A

Kết quả phổ UV-Vis cho thấy sản phẩm tinh chế A (được pha trong acetonitril) có bước sóng hấp thụ cực đại tại 313 nm và tương đồng với phổ UV-Vis của tạp A chuẩn. Phổ IR của sản phẩm tinh chế A có độ tương đồng 99,52% so với phổ IR của tạp A chuẩn và có các đỉnh đặc trưng phù hợp với công thức cấu tạo của tạp A [ν_{max} (cm⁻¹): 1651 và

1605 (C=C), 1381 (O-H phenol), 1339 (O=S=O), 1170 (C-O). Phổ ESI-MS(-) của sản phẩm tinh chế A có tín hiệu ion tủa phân tử [M-H]⁻ với m/z = 282,0444, phù hợp với khối lượng phân tử của tạp A meloxicam (C₁₂H₁₃NO₅S, M = 283,3020). Như vậy, dựa vào phổ MS và các dữ liệu phổ UV-Vis và IR của sản phẩm tinh chế A đều tương đồng với tạp A chuẩn nên có thể kết luận sản phẩm tinh chế A chính là ethyl 4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazine-3-carboxylat 1,1-dioxid (tạp A meloxicam).



Hình 4. Công thức cấu tạo của tạp A meloxicam

Bảng 3. Kết quả khảo sát tỷ lệ mol meloxicam và methyl iodid (thời gian phản ứng 8 giờ, tỷ lệ mol meloxicam và kali hydroxyd là 1:1)

Tỷ lệ mol meloxicam và methyl iodid	1,1	2,3	3,4	4,5	5,6	6,8	7,9	9,0	10,2	11,3
Hiệu suất (%)	32,25	35,61	45,75	50,62	61,48	68,32	76,28	75,86	76,61	77,65

Với thời gian phản ứng từ 1 giờ đến 6 giờ, kết quả kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng cho thấy trên sắc ký đồ xuất hiện 2 vết chứng tỏ meloxicam chưa phản ứng hết. Với thời gian phản ứng từ 8 giờ đến 24 giờ, trên sắc ký đồ chỉ xuất hiện 1 vết có giá trị R_f khác với vết meloxicam và hiệu suất phản ứng gần tương đương nhau, cho thấy tủa sản phẩm gần như tinh khiết trên sắc ký lớp mỏng và hiệu suất phản ứng gần như đạt tối đa. Vậy thời gian phản ứng tổng hợp tạp C được lựa chọn là 8 giờ. Khi không thêm kali hydroxyd hay khi tỷ lệ meloxicam và kali hydroxyd là 1:0, sản phẩm phản ứng đã xuất hiện nhưng rất ít (thể hiện vết mờ trên sắc ký đồ và còn vết meloxicam). Với tỷ lệ mol từ 1:1 đến 1:4, trên sắc ký đồ chỉ xuất hiện 1 vết có giá trị R_f khác với vết meloxicam, hiệu suất phản ứng gần như không thay đổi. Vì vậy, tỷ lệ mol meloxicam và kali hydroxyd được lựa chọn là 1:1. Hiệu suất phản ứng tăng và phụ thuộc rất nhiều vào tỷ lệ mol meloxicam và methyl

Tổng hợp và tinh chế tạp C

Bảng 1, Bảng 2 và Bảng 3 trình bày kết quả khảo sát thời gian phản ứng, tỷ lệ mol meloxicam và kali hydroxyd, tỷ lệ mol meloxicam và methyl iodid đến hiệu suất phản ứng tổng hợp tạp C.

Bảng 1. Kết quả khảo sát thời gian phản ứng

Thời gian	1 giờ	6 giờ	7 giờ	8 giờ	9 giờ	12 giờ	24 giờ
Hiệu suất (%)	-	-	-	32,12	32,25	32,50	32,88

Bảng 2. Kết quả khảo sát tỷ lệ mol meloxicam và kali hydroxyd (thời gian phản ứng 8 giờ)

Tỷ lệ mol meloxicam và kali hydroxyd	1:0	1:0,5	1:1	1:2	1:3	1:4
Hiệu suất (%)	-	-	32,40	32,21	32,35	32,15

iodid với kết quả kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng chỉ xuất hiện 1 vết có giá trị R_f khác với vết meloxicam. Hiệu suất phản ứng đạt cao nhất và hầu như thay đổi không đáng kể khi tỷ lệ mol meloxicam và methyl iodid là 1:7,9. Vì vậy, tỷ lệ này được lựa chọn.

Như vậy, quy trình tổng hợp tạp C như sau: Hòa tan khoảng 0,5 g (1,42 mmol) meloxicam vào 5,0 ml DMSO, thêm 0,1 ml (1,43 mmol) dung dịch KOH (0,8 g/ml nước). Sau đó thêm 0,7 ml (11,25 mmol) dung dịch methyl iodid và khuấy đều trong 8 giờ. Trung hòa hỗn hợp sau phản ứng bằng 2,5 ml acid acetic băng và tiếp tục khuấy đều trong 1 giờ, lọc lấy tủa, rửa tủa với 5 ml ethanol, sấy tủa ở 80°C trong 6 giờ, thu được sản phẩm tổng hợp C. Tiến hành tổng hợp 5 lần theo quy trình thu được khoảng 1,95 g sản phẩm với hiệu suất 75%. Toàn bộ sản phẩm tổng hợp được tinh chế bằng cách hòa tan vào 20 ml DMF ở nhiệt độ sôi (khoảng 153 °C), để nguội cho tủa tinh thể hình thành, lọc lấy tủa và rửa tủa với 10 ml

ethanol. Cho tủa vào 300 ml nước và khuấy đều trong 1 giờ, lọc dưới áp suất giảm và rửa tủa với 20 ml ethanol. Sấy tủa ở 80 °C trong khoảng 6 giờ, thu được 1,75 g sản phẩm tinh chế C (hiệu suất toàn quy trình 67%).

Thử tinh khiết sản phẩm tinh chế C

Kết quả thử tinh khiết SKLM cho thấy sản phẩm tinh chế C chỉ cho 1 vết duy nhất trên 3 hệ dung môi có sức rửa giải khác nhau. Kết quả thử tinh khiết sản phẩm tinh chế C bằng phương pháp HPLC, áp dụng phương pháp quy về 100% diện tích pic cho thấy sắc ký đồ 3 chiều và sắc ký đồ 2 chiều tại bước sóng hấp thụ cực đại 359 nm xuất hiện 1 pic chính duy nhất, pic chính đạt độ tinh khiết theo phổ UV-Vis, sản phẩm tinh chế C có độ tinh khiết sắc ký trên 99%. Hình 5 và Hình 6 lần lượt minh họa sắc ký đồ SKLM và HPLC kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm tinh chế C.

Áp dụng phương pháp quy về 100% diện tích pic để xác định độ tinh khiết sản phẩm tinh chế C:

$$\text{Độ tinh khiết sản phẩm tinh chế C} = \frac{S_{sp}}{\sum S} \times 100 = \frac{10922727}{10926798} \times 100 = 99,96\%$$

Trong đó: S_{sp} : diện tích pic sản phẩm tinh chế C.

$\sum S$: Tổng diện tích tất cả các pic (trừ pic dung môi)

Xác định cấu trúc sản phẩm tinh chế C

Kết quả phổ UV-Vis cho thấy sản phẩm tinh chế C (được pha trong acetonitril) có bước sóng hấp thụ cực đại tại 359 nm và tương đồng với phổ UV-Vis của tạp C chuẩn. Phổ IR của sản phẩm tinh chế C có độ tương đồng 97,48% so với phổ IR của tạp C chuẩn và có các đỉnh đặc trưng phù hợp với công thức cấu tạo của tạp C [ν_{max} (cm⁻¹): 1586 (C=O), 1401 (O-H phenol), 1335 (O=S=O), 1170 C-N). Phổ ESI-MS(-) của sản phẩm tinh chế C có tín hiệu ion tủa phân tử [M-H]⁻ với m/z = 364,0434, phù hợp với khối lượng phân tử của tạp C meloxicam (C₁₅H₁₅N₃O₄S₂, M = 365,0504).

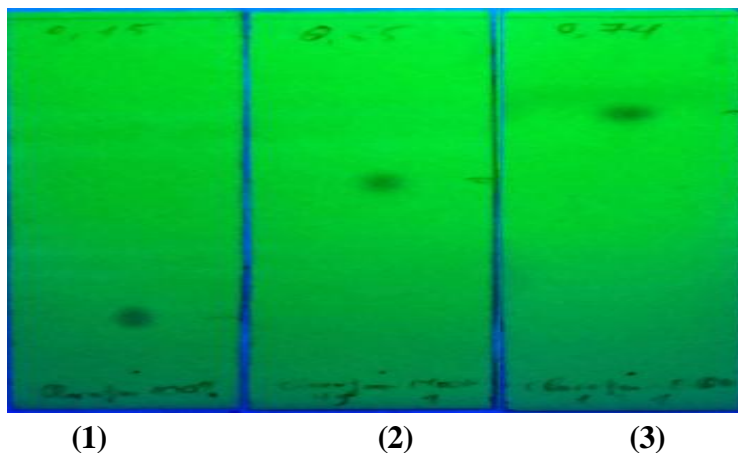
Phân tích dữ liệu phổ NMR (Bảng 4 và Bảng 5) cho thấy số lượng và vị trí của proton và carbon của sản phẩm tinh chế C phù hợp với tạp C chuẩn. Như vậy, sản phẩm tinh chế C có công thức cấu tạo N-[(2Z)-3,5-dimethylthiazol-2(3H)-yliden]-4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazin-3-carboxamid 1,1-dioxid (tạp C meloxicam). Các dữ liệu phổ UV, IR, MS đều phù hợp với tạp C meloxicam, có công thức phân tử C₁₅H₁₅N₃O₄S₂, khối lượng phân tử 365,43. Cấu trúc tạp C được trình bày ở Hình 7.

Bảng 4. Dữ liệu phổ ¹H-NMR của sản phẩm tinh chế C và tạp C chuẩn

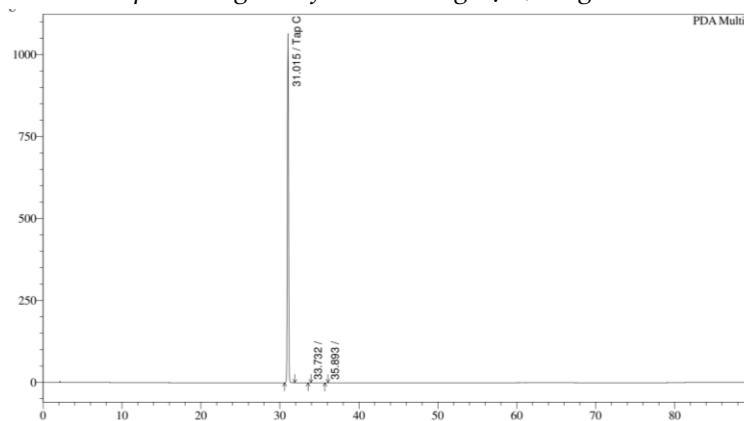
Vị trí	¹ H-NMR (DMSO-d ₆ , TMS, 400 MHz) δ _H (ppm)	
	Sản phẩm tinh chế C	Tạp C chuẩn
OH	14,956 (s; 1H)	14,956 (s; 1H)
H-5	8,048 – 8,024 (m; 1H)	8,049 – 8,025 (m; 1H)
H-6	7,892 – 7,794 (m; 3H)	7,892 – 7,794 (m; 3H)
H-7		
H-8		
H-4'	7,432 (d; J = 1,36 Hz; 1H)	7,431 (d; J = 1,36 Hz; 1H)
N3'-CH ₃	3,735 (s; 3H)	3,735 (s; 3H)
N2-CH ₃	2,909 (s; 3H)	2,909 (s; 3H)
C5'-CH ₃	2,322 (d; J = 1,32 Hz; 3H)	2,322 (d; J = 1,32 Hz; 3H)

Bảng 5. Dữ liệu phổ ¹³C-NMR của sản phẩm tinh chế C và tạp C chuẩn

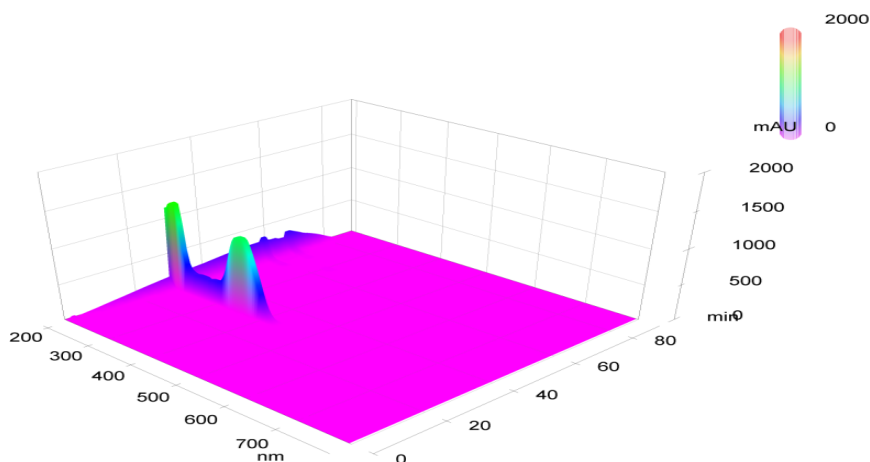
Vị trí	¹³ C-NMR (DMSO-d ₆ , TMS, 100 MHz) δ _C (ppm)	
	Sản phẩm tinh chế C	Tạp C chuẩn
C-4	168,82	168,78
C-9	163,85	163,85
C-2'	155,21	155,21
C-8a	134,26	134,26
C-6	132,83	132,83
C-7	132,04	132,04
C-4a	129,00	129,00
C-5	125,90	125,90
C-4'	125,66	125,66
C-8	123,07	123,06
C-5'	122,15	122,16
C-3	115,06	115,06
N2-CH ₃	37,56	37,56
N3'-CH ₃	35,85	35,85
C5'-CH ₃	11,80	11,80



Hình 5. Sắc ký đồ SKLM kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm tinh chế C. Điều kiện sắc ký: Bản mỏng silica gel 60 F₂₅₄ (12 x 5 cm); Phát hiện: UV 254 nm; Hệ dung môi: (1) cloroform 100%, R_f = 0,15; (2) cloroform – methanol (49:1), R_f = 0,55; (3) Cloroform – ethanol (1:1), R_f = 0,74. Dung dịch sản phẩm tinh chế C được pha trong cloroform có nồng độ 0,1 mg/ml



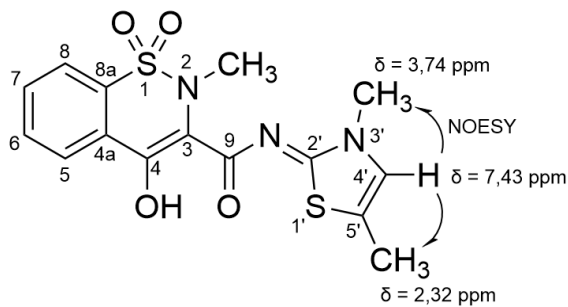
(a)



(b)

Hình 6. Sắc ký đồ dung dịch sản phẩm tinh chế C nồng độ 250 µg/ml pha trong acetonitril. Điều kiện sắc ký: Cột Phenomenex C18 (150 x 4,6 mm; 5 µm); Tốc độ dòng: 1 ml/phút; Thể tích tiêm: 10 µl; Bước sóng phát hiện: 359 nm; Pha động: acetonitril và nước, rửa giải gradient: 0'(1:99), 2'(1:99), 62'(99:1), 65'(99:1), 74'(1:99), 90'(1:99).

(a): sắc ký đồ tại bước sóng 359 nm, (b): sắc ký đồ 3 chiều



Hình 7. Công thức cấu tạo của tap C meloxicam

Xác định độ tinh khiết tap A và C bằng HPLC-PDA

Quy trình xác định độ tinh khiết tap A và tap C bằng HPLC-PDA được thẩm định theo ICH⁽¹⁷⁾, bao gồm khảo sát tính phù hợp của hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, độ chính xác, độ đúng. Kết quả thẩm định được thể hiện ở Bảng 6 và Bảng 7. Hình 8 minh họa sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu.

Bảng 6. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống của phương pháp (n = 6)

Mẫu	Giá trị thống kê	t _R (phút)	S (μV*giây)	N _{bk}	A _s
Chuẩn tap A	Trung bình	4,534	6026145	3245	1,10
	RSD	0,06%	0,08%	0,21%	0,05%
Thử tap A	Trung bình	4,536	6029464	3228	1,10
	RSD	0,04%	0,07%	0,40%	0,07%
Chuẩn tap C	Trung bình	8,259	6849242	4615	1,23
	RSD	0,14%	0,07%	0,80%	0,04%
Thử tap C	Trung bình	8,271	6849824	4641	1,24
	RSD	0,10%	0,08%	0,55%	0,12%

Giá trị RSD (Relative Standard Deviation) của thời gian lưu (t_R), diện tích pic (S) và số đĩa lý thuyết biểu kiến (N_{bk}) của tất cả các mẫu đều nhỏ hơn 2%, hệ số bất đồng (A_s) của pic tap A và pic tap C nằm trong khoảng 0,8 - 1,5. Như vậy quy trình định lượng tap A và tap C đạt tính phù hợp của hệ thống.

Bảng 7. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng

	Tap A	Tap C
Phương trình hồi quy	$\hat{y} = 15198,51x - 53179,80$	$\hat{y} = 15198,51x + 251940,60$
Khoảng tuyến tính (μg/ml)	300 - 500	150 - 250
Hệ số tương quan (R)	0,9999	0,9999
Độ chính xác (RSD, n=12)	0,08%	0,15%
Tỷ lệ phục hồi	99,56% - 100,38%	99,33% - 101,19%
Hàm lượng*	99,91%	99,88%

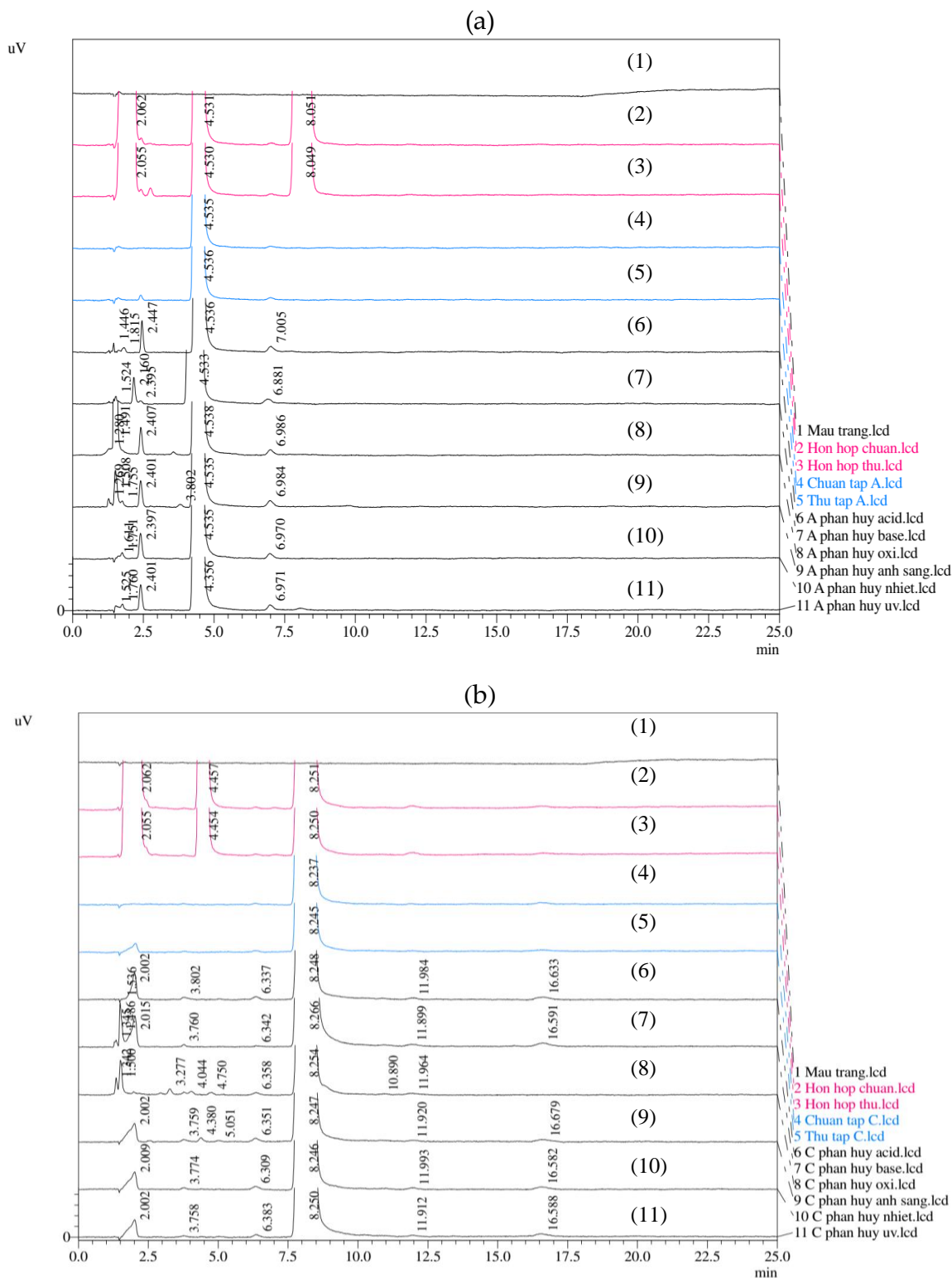
*Được xác định từ kết quả khảo sát độ chính xác

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy trong cùng điều kiện phân tích: sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic chính trong sắc ký đồ của mẫu chuẩn. Trên sắc ký đồ mẫu hỗn hợp chuẩn, pic tap A và pic tap C tách hoàn toàn pic meloxicam. Sắc ký đồ mẫu thử và mẫu phân hủy xuất hiện pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của tap A/tap C trong sắc ký đồ mẫu chuẩn. Sắc ký đồ các mẫu phân hủy có xuất hiện các pic phân hủy, các pic này đều tách hoàn toàn với pic tap A/tap C.

Pic tap A và pic tap C đều tinh khiết theo phổ UV-Vis. Như vậy quy trình định lượng tap A và tap C có tính đặc hiệu.

Giá trị R > 0,999 nên có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ tap A/tap C và diện tích pic. Sử dụng trắc nghiệm F cho thấy phương trình hồi quy có tính tương thích, sử dụng trắc nghiệm t cho thấy hệ số B và B₀ có ý nghĩa. Giá trị RSD của hàm lượng phần trăm tap A và tap C được xác định từ 12 mẫu trong 2 ngày đều nhỏ hơn 2,0% nên quy trình định lượng tap A và tap C đạt độ chính xác. Tỷ lệ phục hồi của tap A và tap C ở 3 mức nồng độ 75%, 100% và 125% của nồng độ định lượng đều nằm trong khoảng 98% đến 102% với giá trị RSD không quá 2% nên quy trình định lượng tap A và tap C đạt độ đúng.

Như vậy, quy trình định lượng tap A và tap C bằng phương pháp HPLC-PDA có tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính rộng, đạt độ chính xác và độ đúng. Hàm lượng phần trăm tap A và tap C lần lượt là 99,91% và 99,88% tính trên nguyên trạng.



Hình 8. Sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu tap A (a) và tap C (b). (1) Mẫu trắng; (2) Hồn hóp chuẩn; (3) Hồn hóp thử; (4) Mẫu chuẩn tap A hoặc C; (5) Mẫu thử tap A hoặc C; Các mẫu phân hủy tap A hoặc C: (6) trong HCl 0,1 N/24 giờ, (7) trong NaOH 0,1 N/24 giờ, (8) trong H₂O₂ 3%/24 giờ, (9) chiếu ánh sáng mặt trời/8 giờ, (10) sấy 120°C/24 giờ và (11) chiếu UV 254 nm/8 giờ

Đánh giá tạp A và C

Bảng 8 trình bày kết quả đánh giá tạp A và C. Với độ tinh khiết trên 99% nên tạp A và C đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu.

Thiết lập chất đối chiếu tạp A và C

Tạp A (1,16 g) và tạp C (1,15 g) mỗi tạp được đóng 76 lọ/15 mg và 10 lọ được lấy ngẫu nhiên kiểm tra độ đồng nhất. Kết quả xác định tính phù hợp của hệ thống tại ba phòng thí nghiệm đều đạt yêu cầu về hệ số bất đổi của pic tạp A, pic tạp C và RSD diện tích pic tạp A và C nên có thể tiếp tục tiến hành xác định độ tinh khiết. Bảng 9 và Bảng 8. Kết quả đánh giá tạp A và tạp C

Chỉ tiêu	Phương pháp	Mức chất lượng		Kết quả	
		Tạp A	Tạp C	Tạp A	Tạp C
Tính chất	Cảm quan	Bột màu trắng.		Đạt	Đạt
	Độ tan	Dễ tan trong methanol, acetonitril, cloroform; hơi tan trong ethanol.	Tan trong acetonitril; hơi tan trong DMF; khó tan trong DMSO.		
Định tính	Phổ hồng ngoại	$\nu_{max} (cm^{-1})$ 1651, 1605 (C=C), 1453 (C-H), 1339 (O=S=O), 1270 (C-N)	$\nu_{max} (cm^{-1})$ 1586 (C=O), 1335 (O=S=O), 1177 (C-N)	Đúng	Đúng
Điểm chảy	DSC	142 ± 1 °C	295 ± 1 °C	Đạt (142,2°C)	Đạt (294,9°C)
Độ ẩm	Karl-Fischer	≤ 0,5%		Đạt (0,10%)	Đạt (0,21%)
Tạp chất liên quan	HPLC	≤ 1,0%		Đạt (0,10%)	Đạt (0,09%)
Định lượng	HPLC	≥ 99,0% tính trên nguyên trạng		Đạt (99,91%)	Đạt (99,88%)

Bảng 9. Kết quả phân tích ANOVA đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ (n=2)

	Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F _{tn}	F _c	Nhận xét
Tạp A	Giữa các lọ	0,03680	9	0,00409	1,21693	3,02038	F _{tn} < F _c Các lọ trong quá trình đóng đồng nhất
	Trong từng lọ	0,03360	10	0,00336			
	Tổng cộng	0,07040	19				
Tạp C	Giữa các lọ	0,04641	9	0,00516	1,79969	3,02038	
	Trong từng lọ	0,02865	10	0,00287			
	Tổng cộng	0,07506	19				

Bảng 10. Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm

Mẫu	Hàm lượng tạp A			Hàm lượng tạp C		
	PTN1	PTN2	PTN3	PTN1	PTN2	PTN3
1	99,85%	99,90%	99,84%	99,97%	100,02%	99,96%
2	99,93%	99,96%	100,01%	99,95%	99,83%	99,96%
3	100,02%	99,82%	99,83%	99,81%	99,90%	99,86%
4	99,87%	100,01%	99,87%	99,76%	100,01%	99,78%
5	99,86%	100,00%	99,89%	99,93%	99,94%	99,82%
6	100,01%	99,95%	99,87%	99,91%	99,77%	100,01%
Trung bình	99,92%	99,94%	99,89%	99,89%	99,91%	99,90%

Bảng 10 minh họa kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ và độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm. Dựa vào kết quả phân tích ANOVA cho thấy các lọ đóng gói có hàm lượng đồng nhất, điều kiện đóng gói ổn định và phù hợp, kết quả định lượng giữa 3 phòng thí nghiệm khác biệt không có ý nghĩa thống kê, 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. Giá trị ấn định của tạp A và C được xác định từ 18 kết quả của ba phòng thí nghiệm tham gia đánh giá (Bảng 11).

Bảng 11. Kết quả xác định giá trị ấn định (n=18)

	Tạp A						Tạp C					
	HL (%)	CK1	CK2	CK3	Z	GTAD	HL (%)	CK1	CK2	CK3	Z	GTAD
		x_i^*1	x_i^*2	x_i^*3				x_i^*1	x_i^*2	x_i^*3		
$x^*-\delta$		99,77	99,80	99,80				99,75	99,75	99,75		
$x^*+\delta$		100,02	100,04	100,04				100,09	100,05	100,05		
1	99,82	99,82	99,82	99,82	1,20	99,82	99,76	99,76	99,76	99,76	1,42	99,76
2	99,83	99,83	99,83	99,83	1,08	99,83	99,77	99,77	99,77	99,77	1,32	99,77
3	99,84	99,84	99,84	99,84	0,95	99,84	99,78	99,78	99,78	99,78	1,22	99,78
4	99,85	99,85	99,85	99,85	0,83	99,85	99,81	99,81	99,81	99,81	0,91	99,81
5	99,86	99,86	99,86	99,86	0,70	99,86	99,82	99,82	99,82	99,82	0,81	99,82
6	99,87	99,87	99,87	99,87	0,58	99,87	99,83	99,83	99,83	99,83	0,71	99,83
7	99,87	99,87	99,87	99,87	0,58	99,87	99,86	99,86	99,86	99,86	0,40	99,86
8	99,87	99,87	99,87	99,87	0,58	99,87	99,90	99,90	99,90	99,90	0,01	99,90
9	99,89	99,89	99,89	99,89	0,33	99,89	99,91	99,91	99,91	99,91	0,11	99,91
10	99,90	99,90	99,90	99,90	0,20	99,90	99,93	99,93	99,93	99,93	0,31	99,93
11	99,93	99,93	99,93	99,93	0,18	99,93	99,94	99,94	99,94	99,94	0,41	99,94
12	99,95	99,95	99,95	99,95	0,43	99,95	99,95	99,95	99,95	99,95	0,51	99,95
13	99,96	99,96	99,96	99,96	0,55	99,96	99,96	99,96	99,96	99,96	0,62	99,96
14	100,00	100,00	100,00	100,00	1,05	100,00	99,96	99,96	99,96	99,96	0,62	99,96
15	100,01	100,01	100,01	100,01	1,18	100,01	99,97	99,97	99,97	99,97	0,72	99,97
16	100,01	100,01	100,01	100,01	1,18	100,01	100,01	100,01	100,01	100,01	1,12	100,01
17	100,01	100,01	100,01	100,01	1,18	100,01	100,01	100,01	100,01	100,01	1,12	100,01
18	100,02	100,02	100,02	100,02	1,30	100,02	100,02	100,02	100,02	100,02	1,23	100,02
x^*	99,90	99,92	99,92	99,92		99,92	99,92	99,90	99,90	99,90		99,90
s^*	0,082	0,080	0,080	0,080		0,080	0,111	0,098	0,098	0,098		0,098
δ	0,122	0,120	0,120	0,120			0,167	0,147	0,147	0,147		

*HL: Hàm lượng; CK: Chu kỳ; GTAD: Giá trị ấn định

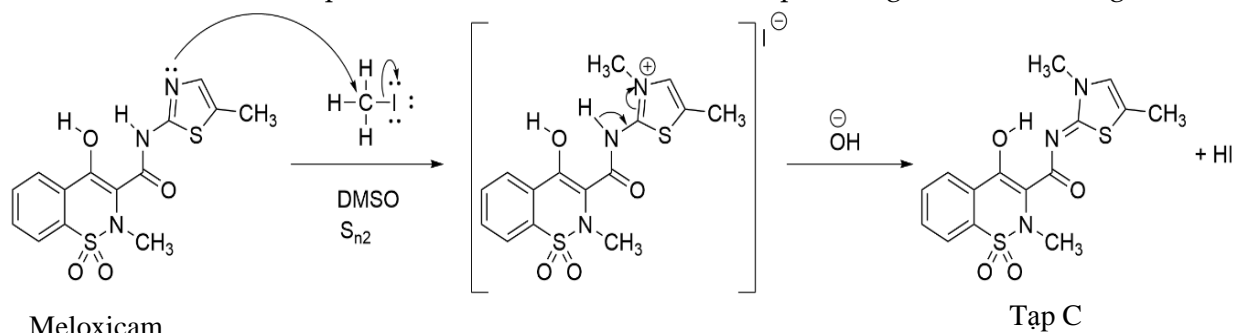
Sau 3 lần thay đổi, $s^*(\text{tạp A}) = 0,080$ và $s^*(\text{tạp C}) = 0,098$ không thay đổi, khi đó giá trị $x^*(\text{tạp A})$ được chọn là 99,92% và $x^*(\text{tạp C})$ được chọn là 99,90%. Từ kết quả trên tính Z-score, kết quả 18/18 giá trị đối với mỗi tạp có $|Z| < 2,0$. Từ đó, giá trị ấn định của tạp A là 99,92% với độ không đảm bảo đo: $U(A) = \frac{1,25s^*}{\sqrt{P}} = \frac{1,25 \times 0,08}{\sqrt{18}} = 0,02$ và giá trị ấn định của tạp C là 99,90% với độ không đảm bảo đo: $U(C) = \frac{1,25s^*}{\sqrt{P}} = \frac{1,25 \times 0,098}{\sqrt{18}} = 0,03$. Như vậy, tạp A và tạp C đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia với hàm lượng được xác định lần lượt là 99,92% và 99,90% tính trên nguyên trạng. Tiến hành lập hồ sơ chất chuẩn, dán nhãn lọ chuẩn và kèm theo phiếu kiểm nghiệm. Bảo quản các lọ chuẩn ở nhiệt độ 2-8°C, tránh ánh sáng.

BÀN LUẬN

Ethanol là dung môi được lựa chọn để tinh chế tạp A vì tạp A chỉ hơi tan trong ethanol ở nhiệt độ thường nhưng lại tan tốt trong ethanol

ở nhiệt độ cao. Ngoài ra, ethanol dễ bay hơi, nhiệt độ sôi khoảng 80°C thấp hơn nhiều so với nhiệt độ nóng chảy của tạp A (khoảng 142 °C). Điều đó tạo thuận lợi cho việc hạn chế tạp A bị biến đổi cấu trúc trong quá trình tinh chế cũng như quá trình sấy. Sử dụng ethanol tinh chế tạp A có các ưu điểm sau: ethanol ít độc đối với người thí nghiệm và môi trường; thời gian chờ kết tinh ngắn (khoảng dưới 1 giờ); hiệu suất kết tinh cao (khoảng 87%); tinh thể tạo ra lớn và đồng nhất (tinh thể hình kim dài nhất khoảng 5 cm ở điều kiện thử nghiệm); tính chất, cấu trúc tạp A không bị thay đổi sau quá trình tinh chế; độ tinh khiết của sản phẩm kết tinh cao (trên 99%). Do việc điều chế chỉ trải qua giai đoạn kết tinh ở nhiệt độ không quá cao từ hóa chất ethyl 4-hydroxy-2-methyl-2H-1,2-benzothiazin-3-carboxylat 1,1-dioxid có độ tinh khiết 97%, ít gây ảnh hưởng đến việc thay đổi cấu trúc, nên sản phẩm tinh chế A được định danh dựa trên việc so sánh dữ liệu phổ UV-Vis, IR và MS của sản phẩm tinh chế và của tạp A chuẩn được đo trong

cùng điều kiện. Kết quả cho thấy phổ UV-Vis và phổ IR của sản phẩm tương đồng với phổ UV-Vis và phổ IR của tạp A chuẩn, phổ ESI-MS(-) của sản phẩm có ion tựa phân tử $[M-H]^-$ với $m/z = 282,0444$, chỉ sai lệch 0,71 ppm với m/z lý thuyết của ion $[M-H]^-$ của tạp A. Như vậy, sản phẩm tinh chế A chính là tạp A của meloxicam.



Hình 9. Cơ chế phản ứng tổng hợp tạp C meloxicam

Trong quá trình tổng hợp tạp C, một số đặc điểm về phản ứng tổng hợp đã được ghi nhận như sau:

Khi thêm nước vào dung dịch DMSO sau phản ứng (lặp lại thí nghiệm theo tài liệu tham khảo⁽²⁾) có thể thu được nhiều tủa và làm tăng hiệu suất, nhưng tủa này ngoài tạp C còn có các sản phẩm khác (thể hiện nhiều vết sắc ký trên bản mỏng) dẫn đến giảm hiệu suất kết tinh. Nếu thay nước bằng acid acetic băng thì tủa thu được hầu như chỉ là tạp C (thể hiện 1 vết sắc ký trên bản mỏng), có thể do tạp C khó tan trong acetic băng còn những thành phần khác tan được trong hỗn hợp DMSO - acetic băng. Vì vậy, quy trình tổng hợp theo tài liệu tham khảo có hiệu suất thấp do phản ứng tổng hợp chưa được tối ưu, dẫn đến hiệu suất toàn quy trình (hiệu suất tổng hợp và tinh chế) thấp. Trong nghiên cứu này, tạp C đã được tổng hợp tạp theo tài liệu tham khảo⁽²⁾ nhưng thay nước bằng acetic băng.

Vì phản ứng tổng hợp tạp C diễn ra theo cơ chế S_{N2} với tác nhân nucleophilin là phân tử meloxicam với cấu trúc lớn và công kênh nên trung tâm phản ứng là nguyên tử nitrogen của vòng thiazol khó có thể tiếp cận phân tử methyl iodid dẫn đến hiệu suất phản ứng thấp. Do đó,

Phản ứng tổng hợp tạp C diễn ra theo cơ chế thế ái nhân S_{N2} trong môi trường dung môi hữu cơ aprotic DMSO. Tác nhân ái nhân là nguyên tử nitrogen có đôi điện tử tự do của phân tử meloxicam. Trong môi trường kiềm, sản phẩm trung gian sẽ chuyển vị nối đôi để tạo thành tạp C. Cơ chế phản ứng được mô tả trong Hình 9.

khi tăng số lượng phân tử methyl iodid (tăng tỷ lệ mol của methyl iodid so với meloxicam), khả năng tiếp xúc với trung tâm phản ứng sẽ tăng và cải thiện hiệu suất phản ứng.

Khi hòa tan meloxicam vào DMSO và cho thêm KOH, meloxicam hòa tan nhanh hơn so với không thêm KOH, dung dịch từ màu vàng nhạt chuyển sang vàng cam. Điều này có thể được giải thích là trong môi trường kiềm, một phần meloxicam chuyển sang dạng anion dễ tan hơn trong DMSO. Ngoài ra, KOH còn có vai trò trung hòa HI sinh ra sau phản ứng, làm tăng tốc độ phản ứng.

Khi thực hiện phản ứng tổng hợp tạp C trong các dung môi khác nhau, có sự khác biệt trong sản phẩm tạo thành giữa dung môi aprotic và protic. Với dung môi aprotic như DMSO, DMF, acetonitril, aceton, diethyl ether và ethyl acetat, tủa thu được có nhiều vết sắc ký trên bản mỏng, trong đó có vết có giá trị R_f tương đương với tạp C chuẩn. Với dung môi protic như methanol, ethanol và propanol, tủa thu được không có vết sắc ký nào có giá trị R_f tương đương với tạp C chuẩn. Điều này chứng minh dung môi có vai trò quan trọng trong việc định hướng vị trí gắn nhóm methyl vào phân tử

meloxicam. Dung môi DMSO được lựa chọn do có khả năng hòa tan meloxicam cao hơn so với các dung môi aprotic khác (trong cùng điều kiện thí nghiệm, độ tan meloxicam trong DMSO khoảng 0,12 g/ml, trong khi các dung môi khác, độ tan meloxicam chỉ khoảng 0,002 – 0,050 g/ml).

Tạp C khó tan trong DMSO, hơi tan trong DMF ở nhiệt độ thường và tan tốt ở nhiệt độ cao trong DMSO (khoảng 189°C), DMF (khoảng 153°C). Việc sử dụng DMSO và DMF cho hiệu suất kết tinh và chất lượng sản phẩm gần như tương đương. Tuy nhiên, do nhiệt độ hòa tan của DMF thấp hơn DMSO và khả năng hòa tan của DMF cao hơn DMSO nên kết tinh trong DMF đã được lựa chọn nhằm hạn chế việc biến đổi cấu trúc sản phẩm do nhiệt độ và tiết kiệm dung môi. Qua quá trình thử nghiệm, tạp C được tinh chế bằng phương pháp kết tinh trong dung môi DMF đã đem lại hiệu suất tinh chế cao (khoảng 86%) đồng thời cho sản phẩm tinh chế có độ tinh khiết sắc ký phù hợp với yêu cầu dùng làm chất đối chiếu (trên 99%).

Kết quả xác định cấu trúc cho thấy phổ UV-Vis và phổ IR của sản phẩm tinh chế C tương đồng với phổ UV-Vis và phổ IR của tạp C chuẩn, phổ MS của sản phẩm có ion tựa phân tử [M-H]⁺ với m/z = 364,0434, chỉ sai lệch 0,82 ppm với m/z lý thuyết của ion [M-H]⁺ của tạp C. Đồng thời, phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR của sản phẩm cũng có các đỉnh có độ dịch chuyển hóa học tương đương với tạp C chuẩn. Phổ NOESY cho thấy hydro của C(4') vòng thiazol tại đỉnh 7,43 ppm không chỉ tương tác với hydro nhóm CH₃ gắn với C(5') vòng thiazol tại đỉnh 2,32 ppm mà còn tương tác với đỉnh 3,74 ppm tương ứng với hydro nhóm CH₃ gắn với N(3'). Điều này chứng minh phản ứng tổng hợp đã gắn nhóm -CH₃ vào phân tử N(3'), khẳng định sản phẩm tinh chế C có cấu trúc đúng với tạp C của meloxicam.

Quy trình xác định độ tinh khiết tạp A và C bằng phương pháp HPLC sử dụng cột C18 (150 x 4,6 mm; 5 μm) rất phổ biến nên có thể áp dụng rộng rãi tại các phòng thí nghiệm. Các kết quả thử nghiệm đã chứng minh quy trình định

lượng tạp A và tạp C được lựa chọn hoàn toàn phù hợp với mục tiêu xác định hàm lượng của mỗi tạp thể hiện qua việc đáp ứng các chỉ tiêu thẩm định như tính phù hợp của hệ thống, tính đặc hiệu, tính tuyến tính, miền giá trị, độ chính xác và độ đúng.

Cho đến nay, trong danh mục phân phối chất chuẩn đối chiếu ở cả Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh vẫn chưa có tạp A chuẩn và tạp C chuẩn. Vì vậy các cơ sở sản xuất thuốc và các cơ quan kiểm nghiệm thuốc muốn kiểm tra chỉ tiêu tạp chất liên quan của meloxicam phải đặt mua tạp chuẩn ở nước ngoài với giá thành cao và mất nhiều thời gian. Kết quả đánh giá và thiết lập chất đối chiếu tạp A và tạp C của meloxicam được thực hiện theo hướng dẫn của WHO và xử lý thống kê theo ISO 13528 cho hàm lượng trên 99% tính trên nguyên trạng, phù hợp với yêu cầu đăng ký chuẩn gốc. Sản phẩm của đề tài là 38 lọ 15 mg cho mỗi tạp và đã được đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ, độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm, được xác định giá trị ấn định cũng như giá trị công bố dựa trên kết quả của 3 phòng thí nghiệm đạt GLP-WHO.

KẾT LUẬN

Tạp A và tạp C của meloxicam đã được điều chế và tiêu chuẩn hóa để làm chất đối chiếu sử dụng trong kiểm tra tạp chất liên quan của meloxicam. Quy trình tinh chế tạp A có hiệu suất 86,90%, khối lượng sản phẩm 1,90 g và hàm lượng trên 99% tính trên nguyên trạng. Quy trình tổng hợp và tinh chế tạp C có hiệu suất trung bình toàn quy trình 67,28%, khối lượng sản phẩm 1,75 g và hàm lượng trên 99% tính trên nguyên trạng. Cả 2 tạp đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Viganò E, Landonio E (2010). Process for the purification of meloxicam. Patent US7671197B2.
2. Tibor M, Norbert M, Tibor B, et al (2009). Manufacture of high-purity meloxicam via its novel potassium salt monohydrate. *Organic Process Research & Development*, 13:1-6.

3. Bộ Y Tế (2017). Dược điển Việt Nam V. pp.419-421, 615-617. *Nhà Xuất Bản Y Học*, Hà Nội.
4. British Pharmacopoeia Online (2020). Monograph meloxicam, meloxicam tablets. URL: [https://www.pharmacopoeia.com/\(07/02/2022\)](https://www.pharmacopoeia.com/(07/02/2022))
5. The United States Pharmacopeia (2020). United States Pharmacopeia 43-NF 38. Monographs meloxicam meloxicam tablets, pp. 2767-2773. *The United States Pharmacopeial Convention*, USA.
6. European Pharmacopoeia 10.0 (2019). Monograph meloxicam, pp. 3193-3194. *Council of Europe*, Europe.
7. Danh mục chất chuẩn đối chiếu Viện Kiểm nghiệm thuốc Thành phố Hồ Chí Minh. URL: <https://www.idqc-hcm.gov.vn/dich-vu/cac-danh-muc-chat-doi-chieu/chat-chuan-doi-chieu.html> (access on 10/02/2022).
8. Danh mục chất chuẩn đối chiếu Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. URL: <https://nidqc.gov.vn/tim-kiem-chat-chuan?key=&dm=19> (access on 10/02/2022).
9. Sigma-Aldrich. Meloxicam impurity A. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/y0001035?lang=en®ion=VN> (access on 10/02/2022).
10. Sigma-Aldrich. Meloxicam impurity C. URL: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/y0001037?lang=en®ion=VN> (access on 10/02/2022).
11. Moustafa G (2017). An overview of the synthetic routes of 2-alkyl-4-hydroxy-2h-1, 2-benzothiazine-3-carboxamides -1, 1-dioxides (oxicams) and their analogues. *Synthetic Communications*, 47:1527-1558.
12. Michel P, Marie L, Didier J, Yves R (2015). Derivatives of benzothiazines, preparation thereof and application thereof as drugs. Patent US9187438B2.
13. Slobodan S, Nebojsa S, Snezana M, Dejan N (2001). Process for synthesis of 4-hydroxy-2h-1,2-benzothiazine-3-carboxamides. Patent WO2001040208A2.
14. TCVN 4548:2009 (2009). Thống kê ứng dụng – loại bỏ các giá trị bất thường, pp.8-12.
15. ISO Guide 35:2006 (2006). Reference materials – General and statistical principles for certification, pp. 48.
16. ISO 13528:2005 (2005). Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparisons, pp. 66.
17. ICH (2005). Harmonized tripartite guideline, validation of analytical procedures: test and methodology, pp. 1-13.

Ngày nhận bài báo: 10/02/2022

Ngày phản biện nhận xét bài báo: 27/02/2022

Ngày bài báo được đăng: 07/04/2022