BÀI NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu tinh chế và thiết lập chuẩn làm việc của flutamid tổng hợp tại bộ môn hóa hữu cơ Trường Đại học Dược Hà Nội

Bùi Thị Lan Phương, Hoàng Mạnh Cường, Vũ Trần Anh,
Nguyễn Thị Kiều Anh, Đinh Thị Thanh Hải *
**Tác giả liên hệ: haidtt@hup.edu.vn*
Trường Đại học Dược Hà Nội
(Ngày gửi đăng: 05/5/2022 – Ngày duyệt đăng: 25/6/2022)

SUMMARY

The flutamide synthetized at Department of Organic Chemistry, Hanoi University of Pharmacy (HUP) was purified, and further, its working standard was established in a GLP standard laboratory in order to ensure the reliability and suitability for use in drug quality control. The structure of the purified compound was identified by UV, NMR, MS. Working standard (WS) of flutamide was The established by ISO Guide 35 and WHO Guideline. The purity of flutamide was determined by HPLC, reaching up to 99.12 ± 0.20 %. The results suggest that the synthesized and purified flutamide could be used as a WS for quality assessment of raw flutamide materials, finished products and control of related researches.

Từ khóa: *Flutamid, thiết lập chuẩn làm việc, tinh chế.*

Đặt vấn đề

Flutamid là một thuốc sử dụng trong điều trị ung thư tiền liệt tuyến [1]. Để có thể từng bước chủ động được nguyên liệu làm thuốc, chủ động được việc sản xuất thuốc, đặc biệt là các thuốc thiết yếu, nhóm nghiên cứu tại bộ môn Hóa Hữu cơ của Trường Đại học Dược Hà Nội đã thực hiện đề tài cấp thành phố Hà Nội *"Nghiên cứu quy trình tổng hợp và bào chế dạng thuốc viên flutamid điều trị ung thư tiền liệt tuyến".* Trong công bố trước đây, chúng tôi đã công bố các kết quả nghiên cứu về nghiên cứu tổng hợp flutamid qua con đường tạo phức với cyanuric clorid [2]. Nguyên liệu flutamid tổng hợp được ở qui mô 500 g/ mẻ đạt tiêu chuẩn USP 42 [3], do đó nghiên cứu này rất tiềm năng để tiếp tục nâng cấp qui mô tổng hợp và/ hoặc nghiên cứu bào chế. Bên cạnh tổng hợp nguyên liệu thì việc kiểm tra chất lượng sản phẩm cần tuân thủ theo yêu cầu tiêu chuẩn đăng ký. Khó khăn trong quá trình kiểm tra chất lượng flutamide là phải có chuẩn flutamide và các chuẩn tạp. Tuy nhiên, hiện nay ở Việt Nam hai đơn vị có chức năng và năng lực thiết lập chất chuẩn phục vụ kiểm nghiệm thuốc là Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương và Viện Kiểm nghiệm thuốc thành phố Hồ Chí Minh chưa thiết lập được các chất chuẩn này mà phải đặt mua từ nước ngoài với giá rất cao. Để thuận lợi cho quá trình phát triển nghiên cứu tiếp theo tạo nguyên liệu, chế phẩm thuốc đạt tiêu chuẩn dược dụng phục vụ điều trị, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu tinh chế và thiết lập chuẩn làm việc của flutamid tổng hợp tại Bộ môn Hóa hữu cơ Trường Đại học Dược Hà Nội.

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Dung môi, hóa chất và thiết bị

Chất chuẩn: Flutamide Lot. H1E297, hàm lượng 100,0 % của Hội đồng Dược điển Mỹ; *o*-Flutamide Lot number 1185473, hàm lượng 98,28 % của LGC - Đức; Flutamide Related Compound A Lot. 01K8E67JPU1, hàm lượng 99,50 % và Flutamide Related Compound B Lot. 11J4G52H, hàm lượng 97,42 % của AK Sci. - Mỹ.

Hóa chất, dung môi được nhập từ công ty Merck (đức) hoặc Sigma-aldrich (mỹ). sklm được thực hiện trên bản mỏng silica gel kieselgel 60 f254 (merck). nhiệt độ nóng chảy được đo trên máy electrothermal digital. phổ hồng ngoại ghi trên máy shimadzu ftir affinity-1s. phổ cộng hưởng từ hạt nhân ghi trên máy bruker av-500 nmr spectrometer 500 mhz, sử dụng dmso-d6 làm dung môi. phổ khối lượng ghi trên máy khối phổ agilent 6530 accurate mass qtof lc/ms bắn phá ion bằng phương pháp phun mù điện tử (esi). *Thiết bị, dụng cụ phân tích: Thiết bị phân tích:* Hệ thống HPLC - PDA Shimadzu 20AD (Nhật), FTIR IRAffinity-1 - Shimadzu (Nhật), Cân phân tích Mettler - Toledo MS 105, độ chính xác 0,00001 g, Lò nung Thermo Scientific, Mỹ, Tủ sấy chân không Memmert, Đức.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tinh chế flutamid: tinh chế flutamid tổng hợp được bằng phương pháp kết tinh lại để thu được flutamid đạt tiêu chuẩn USP 42 với độ tinh khiết cao.

Phương pháp xác định cấu trúc

Phổ hồng ngoại được đo viên KBr trên máy quang phổ Bruker Tensor 27. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được ghi lại trên thiết bị Bruker AVIII-500 NMR được trang bị CryoProbe (Bruker, Karlsruhe, Đức) ở 500 MHz (1H) và 125 MHz (13C). Phổ ion hóa tia điện cực có độ phân giải cao (HR-ESIMS) được đo trên thiết bị SCIEX X500 QTOF. Độ tinh khiết của darutoside được xác định trên hệ thống HPLC Shimadzu CBM-20A được trang bị máy bơm LC-20AD, máy dò SPD-20A.

Phương pháp đánh giá chất lượng

Đánh giá các chỉ tiêu chất lượng đối với chế phẩm nghiên cứu theo chuyên luận flutamid theo USP 42 [3]. Các chỉ tiêu:

Tính chất: Thử bằng cảm quan;

Định tính: Gồm 2 phép thử là 1) Đo phổ IR trong khoảng số sóng 4000 – 500 cm^{-1}, so sánh phổ của thử với chuẩn làm song song và 2) HPLC: dựa vào so sánh thời gian lưu của píc chính trên sắc ký đồ của dung dịch thử với thời gian lưu của píc chính trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn thu được trong phần định lượng.

Định lượng: HPLC- UV, Điều kiện sắc ký: Cột: C18 (4,6-mm × 25-cm; 5-µm), nhiệt độ cột: 25 ± 5 °C, Pha động: Acetonitril - nước (45:55), Tốc độ: 1 mL/min, Thể tích tiêm: 20 µL, bước sóng phát hiện: 240 nm.

Dung dịch kiểm tra sự phù hợp của hệ thống: Dung dịch chuẩn hỗn hợp o-Flutamid và Flutamid nồng độ mỗi chất 10 µg/mL trong dung môi pha mẫu là acetonitril – nước (20:80).

Dung dịch chuẩn và dung dịch thử nồng độ chính xác khoảng 0,2 mg/mL pha trong dung môi pha mẫu.

Yêu cầu: Độ phân giải giữa pic flutamid và pic o-flutamid: ≥ 6,0 (dung dịch kiểm tra sự phù hợp của hệ thống). Hệ số kéo đuôi: ≤ 2,0 và RSD của diện tích píc: ≤ 1,5 % (dung dịch chuẩn)

Tính phần trăm flutamid trong phần mẫu thử định lượng theo công thức:

(r_u/ r_s) x (C_s/ C_u) x 100

Trong đó:

r_u *và* r_s*: diện tích píc Flutamide thu được từ dung dịch thử và dung dịch chuẩn*

C_u và C_s: *Nồng độ* Flutamid trong dung dịch thử và dung dịch chuẩn *(mg/mL)*

Tiến hành lặp lại 6 lần đối với mẫu thử, tính hàm lượng trung bình, giá trị RSD của hàm lượng phải không lớn hơn 1,0 %.

Tro sulfat: USP <281>; 1,00 g. Tiến hành lặp lại 3 lần đối với mẫu thử, tính hàm lượng trung bình, giá trị RSD của hàm lượng phải không lớn hơn 1,0 %.

Mất khối lượng do làm khô: USP <731> 1,00

g; sấy chân không ở 60 °C trong 3 giờ. Tiến hành lặp lại 3 lần đối với mẫu thử, tính hàm lượng trung bình, giá trị RSD của hàm lượng phải không lớn hơn 1,0 %.

Tạp chất hữu cơ: HPLC với pha động, dung môi pha mẫu, dung dịch chuẩn, dung dịch thử và điều kiện sắc ký tương tự như phần Định lượng.

Chuẩn bị dung dịch gốc kiểm tra sự phù hợp của hệ thống là: Dung dịch chuẩn hỗn hợp *o*-Flutamid, Tạp chất liên quan A Flutamid (Flutamid Related Compound A), Tạp chất liên quan Flutamid B (Flutamid Related Compound B) và Flutamid nồng độ mỗi chất 10 µg/mL pha trong dung môi pha mẫu.

Dung dịch kiểm tra độ nhạy: Dung dịch Flutamid 0,1 µg/mL pha trong dung môi pha mẫu.

Yêu cầu: Độ phân giải giữa píc flutamid và píc o-flutamid: ≥ 6,0; giữa píc flutamid related compound A và píc flutamid related compound B: ≥ 2,0 (dung dịch kiểm tra sự phù hợp của hệ thống). RSD của diện tích píc: ≤ 10,0 % đối với flutamid (dung dịch kiểm tra độ nhạy).

Bảng 1. Các tạp chất của Flutamid và giới hạn cho phép (theo USP 42)

Tên chất	Thời gian lưu tương đối	Hệ số đáp ứng tương đối	Giới hạn cho phép (%)
Tạp chất liên quan flutamid B[a]	0,42	1,06	0,2
Tạp chất liên quan flutamid A[b]	0,45	1,10	0,15
3-(Trifluoromethyl)anilin	0,63	1,10	0,2
Propionyl analog[c]	0,66	1,02	0,3
Desnitroflutamid[d]	0,80	1,95	0,2
o-flutamid	1,40	1,78	0,2
Flutamid	1,0	-	-
Bất kỳ tạp không xác định	-	1,0	0,05
Tổng tạp	-	-	0,4

[a]N-[4-Nitro-3-(trifluoromethyl) phenyl] acetamide; [b] 4-Nitro-3-(trifluoromethyl)aniline.; [c]N-[4-Nitro-3-(trifluoromethyl) phenyl] propionamide; [d]N-[3-(Trifluoromethyl) phenyl] isobutyramide; [e]N-[2-Nitro-3-(trifluoromethyl) phenyl]isobutyramide.

Tính phần trăm mỗi tạp trong phần mẫu thử theo công thức:

$(r_u / r_T) \times (1/F) \times 100$

Trong đó: r_u là diện tích píc của mỗi píc tạp; r_T là tổng diện tích của tất cả các píc; F là hệ số đáp ứng tương đối (xem bảng 1).

Tiến hành lặp lại 3 lần đối với mẫu thử, tính hàm lượng trung bình, giá trị RSD của hàm lượng mỗi tạp phải không lớn hơn 2,0 %.

Phương pháp thiết lập chuẩn làm việc

Nguyên liệu đã được đo phổ để xác định cấu trúc và kiểm tra chất lượng đạt theo USP 42 sẽ được đóng gói, đánh giá sự thống nhất hàm lượng từ kết quả phân tích giữa các kiểm nghiệm viên với các thay đổi về thiết bị, nguồn gốc dung môi, cột tách từ đó xác định giá trị ấn định. Việc đóng gói, định lượng và xác định giá trị ấn định của chuẩn làm việc Flutamid WS được thực hiện theo ISO Guide 35 [4] và Hướng dẫn của WHO [5].

Quá trình đánh giá chất lượng của Flutamid và thiết lập chuẩn làm việc Flutamide WS được thực hiện tại phòng thí nghiệm đạt GLP.

Kết quả nghiên cứu

Kết quả nghiên cứu tinh chế nguyên liệu flutamid tổng hợp được

Đã tiến hành nghiên cứu tinh chế flutamid bằng phương pháp kết tinh lại với các dung môi kết tinh lại khác nhau toluen, ethylacetat, ethanol, methanol, với số lần kết tinh từ 1-3 lần.

Tiến hành: cho 10,0 g sản phẩm flutamid tổng hợp được vào trong bình cầu dung tích 250 ml. Thêm 30 ml dung môi nghiên cứu tương ứng, khuấy trộn đều hỗn hợp phản ứng, sau đó, vừa thêm dung môi vừa đun hồi lưu đến tan hoàn toàn. Dừng đun, tháo bộ dụng cụ, đổ hỗn hợp trong bình cầu ra cốc có mỏ dung tích 250 ml. Để nguội tự nhiên ở nhiệt độ phòng, tạo tinh thể có mầu trắng ngà. Làm lạnh với nước đá trong vòng 30 phút để sản phẩm kết tinh hoàn toàn. Lọc hút chân không để thu

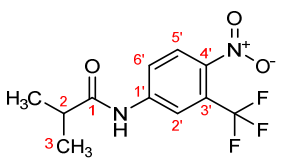
được sản phẩm sau tinh chế. Sấy trong tủ hút chân không ở 20 mmmHg và 50 °C. Thu được sản phẩm kết tinh màu trắng ngà.

Kết quả: xác định độ tinh khiết của sản phẩm Flutamid tổng hợp được cho thấy flutamid được kết tinh lại hai lần bằng dung môi toluen có nhiệt độ nóng chảy rõ gọn, sắc nét và cao nhất trong khoảng cho phép theo tài liệu tham khảo là từ 112,0 – 112,5 °C phù hợp với các tài liệu tham khảo đã công bố. Độ tinh khiết của sản phẩm Flutamid tinh chế được bằng phương pháp kết tinh lại hai lần, với dung môi toluen, cũng được sơ bộ kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng với dung môi hòa tan là aceton, lựa chọn hệ dung môi khai triển là cloroform: ethylacetat tỷ lệ thể tích/thể tích là 3:1, với Rf = 0,71. Độ tinh khiết của sản phẩm Flutamid tinh chế được đã được khẳng định thêm bằng các phương pháp phân tích phổ hồng ngoại, phổ khối lượng, phổ cộng hưởng từ hạt nhân ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR kết quả phân tích dữ liệu phổ và đối sánh với các tài liệu tham khảo được cho thấy, các sản phẩm Flutamid tinh chế được có cấu trúc đúng như dự kiến, phù hợp với các tài liệu tham khảo được và tinh khiết, không có các píc lạ.

Xây dựng bộ dữ liệu phổ để xác định cấu trúc flutamid

Để xác định cấu trúc của nguyên liệu flutamid thiết lập chuẩn làm việc, tiến hành đo phổ IR, MS và NMR của mẫu thử. Kết quả được trình bày ở bảng dưới đây:

Bảng 2. Kết quả phân tích phổ IR của nguyên liệu flutamid thiết lập chuẩn

CTCT	Đỉnh hấp thụ (cm^{-1})	Nhóm chức
 flutamid (1)	3360	N-H
	1716,65	C=O
	1612,499	C=C
	1543,05, 1319,31	NO_2
	1348,24 ; 1140	CF_3
	1244	C-N (amid)
	900,76 ; 860,25	Nhân benzen thế 3 vị trí 1,2,4
	754,17	C-N (C-NO_2)

Bảng 3. Dữ liệu phổ khối lượng (MS) của nguyên liệu flutamid thiết lập chuẩn

CTPT	m/z lý thuyết	m/z thực tế	Mảnh bị mất đi
MH^+	277	277,2	
$(MH – 16)^+$	261	261,1	O
$(M – 16)^+$	260	260,1	O
$(MH – 30)^+$	247	247,1	C_2H_6
$(M – 30)^+$	246	246,2	C_2H_6
$(MH – 46)^+$	231	231,1	NO_2
$(MH – 86)^+$	191	191,1	C_3H_7CONH
$(M – 86)^+$	190	190,1	C_3H_7CONH
$(MH – 89)^+$	188	188,1	C_3H_7, NO_2
$(M – 89)^+$	187	187,1	C_3H_7, NO_2
$(MH – 102)^+$	175	175,1	C_3H_7CONH, O

Phổ IR của mẫu nguyên liệu flutamid: Kết quả phân tích dữ liệu phổ hồng ngoại của flutamid trình bày trong bảng 2.

Nhận xét: Từ dữ liệu phổ IR có thể nhận dạng sơ bộ sự hiện diện của một số liên kết, nhóm chức như -C=C thơm, -NO_2... là các nhóm chức đặc trưng có trong cấu trúc của flutamid, thông qua các giá trị của dải hấp thụ, cường độ píc, hình dạng píc.

Phổ MS của mẫu nguyên liệu flutamid: Kết quả phân tích dữ liệu phổ khối lượng (MS) của flutamid được trình bày trong bảng 3.

Nhận xét: Từ dữ liệu phổ MS của flutamid tổng hợp được cho thấy các phổ khối đều có píc phù hợp với giá trị số khối dự kiến của chất cần phân tích với cường độ mạnh.

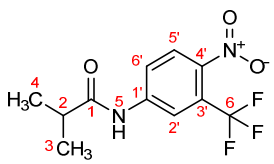
Phổ NMR của mẫu nguyên liệu flutamid: Kết quả phân tích dữ liệu phổ cộng hưởng từ: ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR của flutamid được trình bài trong bảng 4.

Nhận xét: Phổ ^{1}H-NMR và ^{13}C-NMR của hợp chất cho các tín hiệu số lượng proton, độ dịch chuyển hóa học và độ bội tín hiệu phù hợp với tài liệu tham khảo.

Đánh giá chất lượng của nguyên liệu Flutamid dùng thiết lập chuẩn

Tiến hành đánh giá các chỉ tiêu chất lượng

Bảng 4. Kết quả phân tích phổ cộng hưởng từ hạt nhân (^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR) của nguyên liệu flutamid thiết lập chuẩn

	Dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton: ^{13}C-NMR	Dữ liệu phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton: ^{1}H-NMR
	^{13}C-NMR, δ (ppm) DMSO-*d6*, *500MHz*	^{1}H-NMR, δ (ppm) DMSO-*d6*, *500MHz*
1	176,934	
2	35,758	2,630 (1H, h, J=6,75 Hz)
3	19,548	1,130 (6H, *d*)
4	19,548	
5		10,633 (1H, *s*)
6	121,439	
1′	141,521	
2′	117,567	8,283 (1H,*d*, *J* = 1,5Hz)
3′	123,488	
4′	144,554	
5′	128,068	8,148 (1H,*t*, *J*= 8,5Hz)
6′	123,809	8,047 (1H, *dd*, *J*=9Hz, 2Hz)

Chú thích: *Độ dịch chuyển hoá học (δ) được lấy theo giá trị trung bình (ppm); s:singlet; d: doublet; m: multiplet; t: triplet; h: heptet; dd: doublet of doublet; tt: triple triplet.*

của mẫu nguyên liệu Flutamid đã xác định đúng cấu trúc theo điều kiện phân tích trình bày ở phần phương pháp nghiên cứu. Kết quả đánh giá độ phù hợp của hệ thống sắc ký đều đạt qui định. Cụ thể là:

- Đối với phép thử định lượng: Độ phân giải giữa píc flutamid và píc *o*-flutamid là 9,0 ≥ 6,0 (Hình 4a). Hệ số kéo đuôi (Tailing factor) là 1,05 ≤ 2,0 và RSD của diện tích píc flutamide là 0,07 % ≤ 1,5 %.

- Đối với phép thử xác định tạp chất hữu cơ: Độ phân giải giữa píc flutamid và píc *o*-flutamid là 9,1 ≥ 6,0; giữa píc flutamid related compound A và píc flutamid related compound B là 3,0 ≥ 2,0 (Hình 4c). Độ nhạy của hệ thống cho thấy RSD của diện tích flutamide là 9,3 % ≤ 10 %.

Bảng 5. Kết quả đánh giá chất lượng nguyên liệu flutamid thiết lập chuẩn

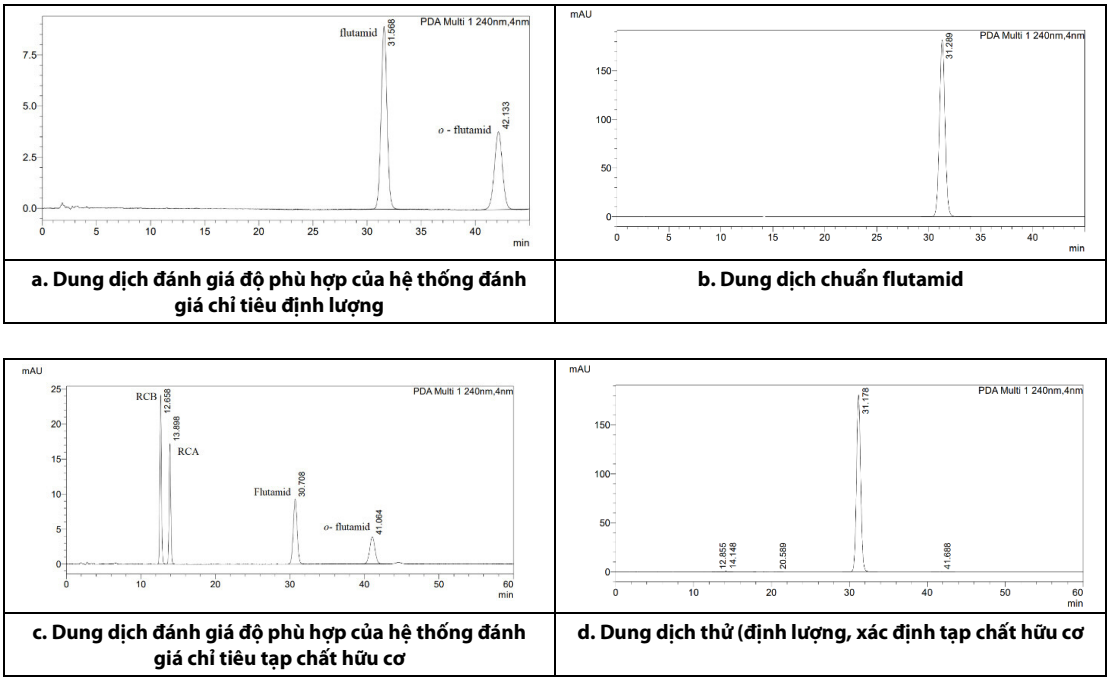
YÊU CẦU KỸ THUẬT	KẾT QUẢ
1/ Tính chất - Bột kết tinh, màu vàng. - Dễ tan trong aceton, ethyl acetat, methanol; tan trong cloroform và ether; thực tế không tan trong ether dầu hỏa và nước.	Đúng Đạt
2/ Định tính **- Định tính (Phép thử A)**: Phổ IR **- Định tính (Phép thử B):** HPLC	Đúng Đúng
3/ Định lượng: Hàm lượng chứa từ 98,0% đến 101,0% flutamid ($C_{11}H_{11}F_3N_2O_3$) tính theo chế phẩm khan	Đạt (99,50% với RSD = 0,71%; n = 6)
4/ Tro sulfat: ≤ 0,1%	Đạt (0,07%)
5/ Tạp chất hữu cơ	
- Tạp chất liên quan flutamid B: ≤ 0,2	Đạt (0,02%)
- Tạp chất liên quan flutamid A: ≤ 0,15	Đạt (0,13%)
- 3-(Trifluoromethyl)anilin: ≤ 0,2	KPH
- Propionyl analog: ≤ 0,3	Đạt (0,04%)
- Desnitroflutamid: ≤ 0,2	KPH
- *o*-flutamid: ≤ 0,2	Đạt (0,03%)
- Bất kỳ tạp không xác định: ≤ 0,05	KPH
- Tổng tạp: ≤ 0,4	Đạt (0,21%)
6/ Mất khối lượng do làm khô: ≤ 0,5%	Đạt (0,32%)

Kết quả kiểm tra tất cả các chỉ tiêu chất lượng được trình bày ở bảng 5 và minh họa ở hình 1.

Kết quả đánh giá cho thấy nguyên liệu đạt yêu cầu chất lượng theo tiêu chuẩn USP 42, hàm lượng flutamide đạt 99,50 % để thiết lập chuẩn làm việc, tiến hành đóng lọ.

Đóng gói và xác định giá trị ấn định của chuẩn làm việc flutamide WS

Đóng gói: Nguyên liệu flutamide được đóng trong lọ thủy tinh màu hổ phách, dung tích 2 ml, nắp xoáy gồm nắp trong là silicon, nắp ngoài nhựa. Sau khi vặn chặt nắp, quấn cẩn thận quanh miệng và đỉnh lọ bằng màng parafin để tránh ẩm. Khối lượng 1 lọ khoảng 200 mg. Quá trình đóng lọ thực hiện trong buồng cân, kiểm soát nhiệt độ 24,5 °C – 25,2 °C



a. Dung dịch đánh giá độ phù hợp của hệ thống đánh giá chỉ tiêu định lượng

b. Dung dịch chuẩn flutamid

c. Dung dịch đánh giá độ phù hợp của hệ thống đánh giá chỉ tiêu tạp chất hữu cơ

d. Dung dịch thử (định lượng, xác định tạp chất hữu cơ

Hình 1. Sắc ký đồ minh họa trong kiểm nghiệm nguyên liệu flutamide bằng HPLC

và độ ẩm tương đối 18 - 20 % RH. Số lượng: 40 lọ. Các lọ được đánh số từ 1 - 40.

Đánh giá tính đồng nhất lô: Chuẩn Flutamid WS thiết lập với mục đích dùng làm chuẩn cho phép thử định lượng do đó kiểm tra độ đồng nhất về hàm lượng trong các lọ chuẩn. Số lượng lọ cần lấy để kiểm tra độ đồng nhất thực hiện theo hướng dẫn với $n = \sqrt{N} + 1 = 7$ (N = 40 lọ). Bảy lọ chuẩn flutamid WS được chọn ngẫu nhiên để kiểm tra tính đồng nhất. Từ mỗi lọ, cân chính xác khoảng 20 mg chế phẩm vào bình định mức 100 ml, hòa tan trong 20 ml acetonitril bằng siêu âm. Pha loãng với nước đến đủ thể tích. Lắc đều. Song song thực hiện phân tích mẫu chuẩn flutamide USPRS. Kết quả được trình bày tóm tắt trong bảng 6.

Bảng 6. Kết quả đánh giá độ đồng nhất lô

Lọ số	*Khối lượng (mg)*	*Diện tích pic (mAU, s)*	*Hàm lượng tính theo nguyên trạng (%)*
1	20,19	6667120	100,00
6	20,05	6534818	98,70
15	20,13	6559562	98,68
19	19,93	6574682	99,90
22	20,00	6518521	98,70
30	20,11	6582928	99,13
34	19,95	6538458	99,25
Chuẩn USPRS	20,51	6772790	
Trung bình			**99,19** (RSD = 0,57%, n=7)

Kết quả ở Bảng 6 cho thấy giá trị RSD là 0,57 (<1,0 %) do đó lô flutamid WS có tính đồng nhất đảm bảo yêu cầu.

Xác định giá trị ấn định của flutamid WS: Các lọ flutamid WS được chọn ngẫu nhiên và định lượng hàm lượng trong 2 điều kiện riêng biệt và tiến hành song song. Mỗi điều kiện thực hiện phân tích 6 lọ. Kết quả được tóm tắt trong Bảng 7.

Xử lý số liệu dựa vào phần mềm Excel đối với 12 số liệu của 2 điều kiện phân tích. Kết quả thu được như sau:

- Giá trị trung bình: 99,12 %
- Độ lệch chuẩn s: 0,70
- Độ lệch chuẩn tương đối RSD: 0,71 %

Bảng 7. Kết quả xác định hàm lượng flutamid WS ở 2 điều kiện phân tích

Điều kiện 1 Thiết bị HPLC: Agilent 1260, Mỹ Acetonitril loại HPLC: Fisher, Mỹ Cột sắc ký: Hypersil ODS (250 × 4,6 mm; 5 µm) Kiểm nghiệm viên: 1				**Điều kiện 2** Thiết bị HPLC: Shimadzu, Nhật Acetonitril loại HPLC: Merck, Đức Cột sắc ký: Inertsil ODS (250 × 4,6 mm; 5 µm) Kiểm nghiệm viên: 2			
Lọ số	Khối lượng (mg)	Diện tích píc (mAU.s)	Hàm lượng (%)	Lọ số	Khối lượng (mg)	Diện tích píc (mAU.s)	Hàm lượng (%)
2	20,28	3543894	98,29	4	20,31	6617733	99,08
8	21,21	3782204	100,3	5	20,28	6849602	99,36
11	20,13	3524839	98,49	14	21,03	6867555	98,31
20	20,15	3560225	99,38	23	20,52	6697894	100,31
27	20,25	3539371	98,31	35	20,35	6702803	99,47
32	19,98	3517756	99,03	38	19,86	6641745	99,16
Trung bình			98,97				99,28
RSD (%)			0,79				0,65
Chuẩn	20,58	3658885			20,54	6754820	

Sai số chuẩn:

$$s_x = \frac{s}{\sqrt{n}} = \frac{0,70}{\sqrt{12}} = 0,20$$

Giá trị ấn định của chuẩn flutamide WS:

$\overline{x} \pm \Delta X = \overline{x} \pm t_{\alpha;k} . S_x = 99,12 \pm t_{0,05;11} . 0,20 = 99,12 \pm 0,40$ %

Từ các kết quả thu được ghi nhãn với các thông tin: Trường Đại học Dược Hà Nội - Chuẩn Flutamid WS, Lot. 01WS2022, hàm lượng 99,12 % tính theo nguyên trạng. Bảo quản ở 2 – 8 °C, tránh ánh sáng.

Bàn luận

Về tinh chế và xác định cấu trúc nguyên liệu flutamid

Trong nghiên cứu phát triển hợp chất sử dụng làm thuốc từ tổng hợp, bào chế, đưa vào sử dụng trên người bệnh, tất cả các giai đoạn đều gắn liền với phân tích đánh giá chất lượng để xác nhận cấu trúc, kiểm tra độ tinh khiết, đánh giá hàm lượng và theo dõi nồng độ thuốc trong cơ thể. Các phương pháp phân tích hóa lý được sử dụng chủ yếu, như quang phổ, sắc ký cho kết quả đảm bảo yêu cầu kỹ thuật về độ chọn lọc, độ đúng, độ chính xác, độ nhạy. Đa số trong các chuyên luận kiểm nghiệm thuốc, để thực hiện được các phép thử chủ yếu trong kiểm tra chất lượng bên cạnh yêu cầu về trang thiết bị hiện đại, thì bắt buộc phải có chất chuẩn (chất đối chiếu). Chất đối chiếu là chất đồng nhất đã được xác định là đúng để dùng trong các phép thử được quy định về hóa học, vật lý và sinh học. Trong các phép thử đó các tính chất của chất đối chiếu được so sánh với các tính chất của chất cần thử. Chất đối chiếu phải có độ tinh khiết phù hợp với mục đích sử dụng. Tuy nhiên, khó khăn đối với các phòng kiểm nghiệm thuốc là số lượng chất chuẩn thiết lập trong nước với giá cả hợp lý (khoảng 500 nghìn đồng lọ) rất khiêm tốn, chưa đáp ứng yêu cầu, đặc biệt đối với thuốc chưa sản xuất bào chế ở Việt Nam như flutamid. Các chất chuẩn thường có nguồn gốc từ Hội đồng Dược điển các quốc gia phát triển như Mỹ, châu Âu, ... hoặc của các nhà sản xuất hóa chất lớn như Merck - Đức, Sigma- Mỹ,... Giá chất chuẩn thường rất cao, thời gian đặt hàng lâu, như chuẩn flutamid của Hội đồng Dược điển Mỹ giá khoảng gần 9 triệu/ lọ 200 mg, thời gian đặt hàng khoảng 2-3 tháng. Do đó, cần đẩy mạnh công tác thiết lập chất chuẩn để phục vụ kịp thời công tác kiểm tra chất lượng thuốc với giá cả hợp lý.

Chuẩn đối chiếu có thể được chia thành hai loại, đó là chuẩn sơ cấp và chuẩn thứ cấp. Chuẩn sơ cấp (chuẩn gốc) là chất chuẩn được ấn định hoặc thừa nhận rộng rãi là có chất lượng đo lường cao nhất và giá trị của nó được chấp nhận mà không qui chiếu về các chất chuẩn khác cùng đại lượng, trong tình huống cụ thể. Một chất chuẩn được coi là chuẩn gốc như chuẩn Quốc tế (ICRS), chuẩn Dược điển Mỹ (USPRS), chuẩn Dược diển châu Âu (EPCRS), chất chuẩn do Viện tiêu chuẩn và công nghệ quốc gia Mỹ (NIST) thiết lập. Còn chuẩn thứ cấp chuẩn có giá trị được ấn định bằng cách so sánh với chuẩn gốc của cùng một đại lượng, như chuẩn Asean (ARS), chuẩn Dược điển Việt Nam, chuẩn làm việc,…

Quá trình thiết lập chuẩn flutamid WS được thực hiện tại phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn GLP, các trang thiết bị được hiệu chuẩn đạt yêu cầu kỹ thuật với các qui trình thực hiện được kiểm soát để đảm bảo kết quả thử nghiệm đạt độ tin cậy. Các bước thực hiện tuân thủ theo đúng hướng dẫn của ISO Guide 35 [3] và Hướng dẫn của WHO [4]. Nguyên liệu flutamid đạt tiêu chuẩn dược dụng có hàm lượng 99,20 % là sản phẩm của đề tài nghiên cứu được tiếp tục tinh chế đạt độ tinh khiết 99,50 % được sử dụng để thiết lập chuẩn làm việc. Nguyên liệu được xác định cấu trúc dựa trên dữ liệu phổ IR, MS, NMR đã xác nhận đúng là flutamid. Nguyên liệu này được kiểm nghiệm theo tiêu chuẩn USP 42 [2] với các chỉ tiêu tính chất, định tính, tro, độ ẩm, định lượng, tạp chất hữu cơ cho thấy nguyên liệu đạt tiêu chuẩn chất lượng kiểm tra. Sau đó, nguyên liệu được đóng gói, kiểm tra độ đồng nhất và xác định giá trị ấn định của chuẩn làm việc. Nghiên cứu đã thiết lập được 21 lọ chuẩn flutamid WS có độ tinh khiết 99,12 % tính theo nguyên trạng. Một khó khăn khi đóng gói là phòng thí nghiệm thực hiện nghiên cứu chưa có dụng cụ, thiết bị đóng gói tiêu chuẩn là hộp đóng chuẩn (Glove box) duy trì độ ẩm thấp (<10 %) và có khí trơ. Tuy vậy, số lượng lọ chuẩn phải đóng gói của nghiên cứu không nhiều (40 lọ), người làm đi găng tay, đeo khẩu trang, thao tác nhanh nên có thể ảnh hưởng không đáng kể tới chất chuẩn được đóng gói. Nhận định này được minh chứng hàm lượng flutamide tính theo nguyên trạng là 99,12 % khá tương đương với hàm lượng 99,50 % tính theo chế phẩm khan, độ ẩm 0,32 %.

Kết luận

Nghiên cứu đã tinh chế được nguyên liệu flutamide có độ tinh khiết cao và sử dụng thiết lập được 21 lọ chuẩn làm việc của flutamid với khối lượng 200 mg/lọ với giá trị ấn định là 99,12 ± 0,40 %. Chuẩn flutamide WS thiết lập được góp phần tiết kiệm được kinh phí kiểm nghiệm vì chi phí cho 1 lọ chất chuẩn flutamide WS 200 mg thiết lập được khoảng 0,8 triệu đồng (so với khoảng 9 triệu đồng/lọ 200 mg chuẩn flutamid của Hội đồng Dược điển Mỹ), đặc biệt giúp các nhà nghiên cứu chủ động trong các nghiên cứu tiếp theo như nâng cấp qui mô tổng hợp sản xuất, nghiên cứu bào chế chế phẩm thuốc, nghiên cứu độ ổn định để từng bước đưa flutamide vào phục vụ điều trị bệnh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2015), *Dược thư quốc gia Việt Nam,* Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội, tr. 690-691.
2. Đinh Thị Thanh Hải, Vũ Trần Anh, Đoàn Minh Sang, Giang Thị Minh Anh (2022) "Nghiên cứu tổng hợp flutamid", *Tạp chí Nghiên cứu dược và Thông tin thuốc,* tập 13, số 1, tr. 44-51
3. The United States Pharmacopeia 42 (2019). Bản online.
4. International Standard Oganization, ISO Guide 35: 2017 *Reference Materials - Guidance for Characterization and Assessment of Homogeneity and Stability.* 2017. pp. 9-45
5. World Health Organization, *General guidelines for the establishment, maintenance and distribution of chemical reference substance.* 2006. pp. 59-83.