

Bệnh nhân sau rút nội khí quản vẫn duy trì được tình trạng ổn định về khí máu động mạch và giảm được thời gian thở máy, thời gian lưu ống nội khí quản. Thời gian thở máy trong nghiên cứu chúng tôi thấp hơn so với nghiên cứu của Harry (2021) do nghiên cứu của Harry thực hiện cả trên nhóm bệnh nhân sau mổ tim<sup>2</sup>.

Hạn chế của nghiên cứu là cỡ mẫu tương đối nhỏ. Tuy nhiên đây là nghiên cứu lâm sàng đầu tiên đánh giá kết quả của biện pháp rút ống nội khí quản ở bệnh nhân chạy VA-ECMO ở Việt Nam, định hướng cho thực hành lâm sàng.

## V. KẾT LUẬN

Kết quả của nghiên cứu chúng tôi nhận thấy biện pháp rút ống nội khí quản cho các bệnh nhân trong quá trình điều trị VA-ECMO đạt tỷ lệ thành công cao, duy trì ổn định trao đổi khí, giúp giảm tỷ lệ VPBV, cải thiện kết cục bệnh nhân. Những kết quả này là cơ sở để áp dụng quy trình này trong cải thiện chất lượng điều trị bệnh nhân VA-ECMO.

Cần tiến hành thêm nghiên cứu với số lượng bệnh nhân nhiều hơn và trong thời gian dài hơn,

có thể kết hợp nghiên cứu đối chứng.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Jose I Nunez, et al.** Abstract 13058: Outcomes with Venous Arterial Extracorporeal Membrane Oxygenation for Acute Myocarditis: A 20-year Experience from the ELSO Registry. 8 Nov 2021. Circulation. 2021.
2. **Magunia H, et al.** Extubation and Noninvasive Ventilation of Patients Supported by Extracorporeal Life Support for Cardiogenic Shock: A Single-Center Retrospective Observational Cohort Study. J Intensive Care Med. 2021 Jul;36(7):783-792.
3. **Trần Đức Trung** (2020). Đánh giá tình trạng nhiễm khuẩn bệnh viện ở bệnh nhân được điều trị ECMO tại bệnh viện Bạch Mai. Luận văn cao học. Đại học Y Hà Nội.
4. **Deng L, Xia Q, Chi C, Hu G.** Awake venoarterial extracorporeal membrane oxygenation in patients with perioperative period acute heart failure in cardiac surgery. J Thorac Dis. 2020 May;12(5):2179-2187.
5. **Bùi Văn Cường** (2021). Nghiên cứu kết quả hỗ trợ tuần hoàn của phương pháp trao đổi oxy qua màng ngoài cơ thể (ECMO) trong điều trị bệnh nhân viêm cơ tim cấp. Luận văn tiến sĩ. Viện Nghiên cứu Khoa học Y Dược lâm sàng 108.

# TỔNG HỢP VÀ THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU TẠP F CỦA ALLOPURINOL (ETHYL-(E/Z)-3-(2-CARBETHOXY-2-CYANOETHENYL)AMINO-1H-PYRAZOL-4-CARBOXYLAT)

Lữ Thiện Phúc<sup>1</sup>, Trần Việt Hùng<sup>2</sup>, Trương Ngọc Tuyền<sup>3</sup>

## TÓM TẮT

**Đặt vấn đề:** Allopurinol là thuốc được ưu tiên chỉ định trong điều trị bệnh gút và nằm trong danh mục thuốc thiết yếu hiện hành của Bộ Y tế Việt Nam [1]. Tạp chất F allopurinol (Ethyl-(E/Z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethenyl)amino-1H-pyrazol-4-carboxylat) là tạp sinh ra trong quá trình tổng hợp allopurinol có khả năng gây ung thư, đột biến gen và được quy định kiểm tra bắt buộc trong USP-NF-2023 [2],[6]. Tuy nhiên chuẩn tạp F allopurinol hiện có giá rất đắt (trên 800 USD/25mg) và không sẵn có, gây ảnh hưởng đến công tác kiểm nghiệm và đảm bảo chất lượng thuốc [7]. **Mục tiêu:** Tổng hợp tạp F allopurinol ở quy mô phòng thí nghiệm, đủ điều kiện để thiết lập chất chuẩn đối chiếu tại Việt Nam. **Đối tượng và phương**

**pháp nghiên cứu:** Tạp F allopurinol được tổng hợp từ ethyl(ethoxymethylen)cianoacetat và hydrazin hydrat 50% với tỷ lệ mol, nhiệt độ và thời gian phản ứng được khảo sát đảm bảo quy trình dễ tinh chế, đạt hiệu suất và độ tinh khiết cao. Xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết bằng HPLC-PDA, đánh giá độ đồng nhất lọ và xác định giá trị công bố thông qua đánh giá kết quả tại 3 phòng thí nghiệm đạt tiêu chuẩn GLP tại Viện kiểm nghiệm thuốc TP.HCM. **Kết quả:** Tổng hợp thành công tạp F allopurinol từ ethyl (ethoxymethylen) cyanoacetat và hydrazin hydrat 50% với tỷ lệ mol 4:1; nhiệt độ phản ứng 60 °C, thời gian phản ứng ngắn 30 phút. Sản phẩm được xác định cấu trúc bằng phổ nghiệm UV-Vis; IR có đối chiếu với chuẩn, phổ khối phân giải cao, phổ <sup>13</sup>C-NMR, <sup>1</sup>H-NMR cho kết quả phù hợp với cấu trúc tạp F allopurinol. Quy trình xác định độ tinh khiết bằng HPLC-PDA được thẩm định với pha tĩnh: cột Gemini – NX C18 (15 cm; 4,6 mm; 5 μm), nhiệt độ cột: 25 °C, pha động: acetonitril – acid formic pH = 2,5 (35:65), tốc độ dòng: 1 ml/phút, nồng độ 50 μg/ml trong pha động, thể tích tiêm mẫu: 10 μl, đầu dò: bước sóng 254 nm. Kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm với độ tinh khiết đạt giá trị công bố 99,5%. **Kết luận:** Đã tổng hợp được 2,5 g tạp F allopurinol ở quy mô phòng thí nghiệm có độ tinh khiết trên 99%, xây dựng được quy trình xác định độ tinh khiết tạp F

<sup>1</sup>Trường Đại học Y Dược TP. Cần Thơ

<sup>2</sup>Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Chịu trách nhiệm chính: Lữ Thiện Phúc

Email: lthuc@ctump.edu.vn

Ngày nhận bài: 5.10.2023

Ngày phản biện khoa học: 14.11.2023

Ngày duyệt bài: 15.12.2023

bằng HPLC-PDA đủ điều kiện thiết lập chất chuẩn đối chiếu sử dụng trong kiểm nghiệm thuốc.

**Từ khóa:** Ethyl-(E/Z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethyl)amino pyrazol-4-carboxylat; HPLC-PDA

## SUMMARY

### SYNTHESIS AND REFERENCE STANDARD ESTABLISHMENT OF ALLOPURINOL IMPURITY F (ETHYL-(E/Z)-3-(2-CARBETHOXY-2-CYANOETHENYL)AMINO-1H-PYRAZOL-4-CARBOXYLAT)

**Background:** Allopurinol is a priority drug prescribed in gout treatment and is currently listed as an essential drug by the Ministry of Health of Vietnam [1]. Impurity F allopurinol (Ethyl-(E/Z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethenyl)amino-1H-pyrazol-4-carboxylate) is an impurity in processing the synthesis of allopurinol that has the potential to cause cancer mutated and regulated under mandatory testing in USP-NF-2023 [2],[6]. However, the F allopurinol impurity standard is currently very expensive (over 800 USD/25mg) and is not readily available, affecting testing and drug quality control [7].

**Objectives:** Synthesis of F allopurinol impurities at laboratory scale qualified to establish reference standards in Vietnam.

**Materials and methods:** Impurity F allopurinol is synthesized from ethyl (ethoxymethylene) cyanoacetate and hydrazine hydrate 50% with molar ratio and temperature and reaction time were investigated for ease of purification and high purity. Developed a process to determine purity using HPLC-PDA and evaluated vial uniformity and purity values at 03 GLP laboratories in the Institute of Drug Quality Control in Ho Chi Minh City.

**Results:** Successfully synthesized F allopurinol from ethyl(ethoxymethylene)cyanoacetate and hydrazine hydrate 50% with molar ratio 4 :1; reaction temperature 60°C, for 30 minutes. The substant structure was determined by UV-Vis spectroscopy; IR compared with standard, MS high-resolution, <sup>13</sup>C-NMR, and <sup>1</sup>H-NMR spectra showed results consistent with the F allopurinol impurity structure. The purity determination procedure by HPLC-PDA was validated with stationary phase: Gemini – NX C18 column (15 cm; 4.6 mm; 5µm), column temperature: 25 °C, mobile phase: acetonitrile – formic acid, pH = 2.5 (35:65), flow rate: 1 ml/min, sample concentration 50 µg/ml in mobile phase, sample injection volume: 10 µl, wavelength 254 nm. Results of interlaboratory evaluation of purity with published value reached 99.5%. **Conclusion:** 2.5g of allopurinol F impurity has been synthesized on a laboratory with a purity of over 99%, and a process for determining the F impurity purity by HPLC-PDA has been developed to qualify for establishing a reference standard.

**Keywords:** Ethyl-(E/Z)- 3-(2-carbethoxy-2-cyanoethyl) amino pyrazol-4-carboxylate, HPLC-PDA

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, allopurinol là một trong những thuốc ưu tiên sử dụng hàng đầu trong điều trị bệnh gút, tăng acid uric huyết và nằm trong

danh mục thuốc thiết yếu hiện hành của Bộ Y tế Việt Nam, được nhiều công ty dược phẩm sản xuất [1]. Bên cạnh đó trong chuyên luận Dược điển Mỹ (USP-NF) 2023, việc kiểm tra giới hạn các tạp chất liên quan của allopurinol, đặc biệt tạp F allopurinol có khả năng gây ung thư và đột biến gen là bắt buộc và cần sử dụng tạp chuẩn [6]. Tuy nhiên, công tác kiểm nghiệm còn gặp nhiều khó khăn do tạp chuẩn chưa sẵn có trong nước, phải nhập khẩu từ nước ngoài với thời gian đặt hàng kéo dài và giá thành rất đắt, cụ thể 1 lọ tạp F allopurinol đạt chuẩn Dược điển Mỹ (USP-NF 2023) có giá hơn 800 USD cho 25 mg [7]. Hiện chưa tìm thấy công trình trong nước công bố đầy đủ về tổng hợp tạp F allopurinol từ nguyên liệu là (Ethyl-(E/Z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethenyl)amino-1H-pyrazol-4-carboxylat và hydrazin hydrat 50% với phản ứng nhẹ nhàng qua một giai đoạn, dễ tinh chế, có thể áp dụng ở quy mô phòng thí nghiệm, cho hiệu suất và độ tinh khiết cao, đáp ứng yêu cầu theo tiêu chuẩn USP-NF-2023 [2],[8]. Xuất phát từ những lý do trên, nghiên cứu này công bố quy trình tổng hợp và thiết lập chất đối chiếu tạp F của allopurinol sử dụng trong kiểm nghiệm thuốc.

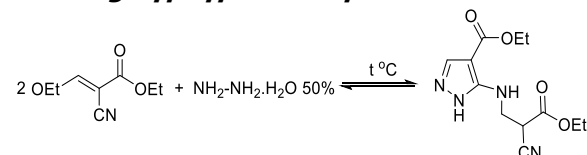
## II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

**2.1. Đối tượng nghiên cứu.** Tạp F allopurinol (ethyl-(E/Z)-3-(2-carbethoxy-2-cyanoethenyl)amino-1H-pyrazol-4-carboxylat); quy trình xác định độ tinh khiết bằng HPLC-PDA theo ICH Q2(R1).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

**Thiết kế nghiên cứu:** nghiên cứu thực nghiệm. Cỡ mẫu và phương pháp chọn mẫu: ethyl (ethoxymethylen)cyanoacetat số lô A0389628, hàm lượng 99,85% tính theo nguyên trạng. Tạp chuẩn F allopurinol chuẩn USP, số lô R028V0 độ tinh khiết 100% tính theo nguyên trạng. Hóa chất và dung môi: ethanol (Chemsol, > 99,5%), hydrazin hydrat (Guangdong Guanghua, 50%), acetonitril (ACN), methanol (Merk) đạt tiêu chuẩn dùng cho sắc ký lỏng.

### Tổng hợp tạp F từ allopurinol



### Sơ đồ 1. Tổng hợp tạp F allopurinol

Dựa theo tài liệu tham khảo [2],[8], nghiên cứu đề xuất thực hiện tổng hợp tạp F từ ethyl (ethoxymethylene) cyanoacetate với hydrazin hydrat 50% (sơ đồ 1). Trong quá trình tổng hợp,

tiến hành khảo sát các điều kiện phản ứng gồm tỷ lệ mol, nhiệt độ, thời gian phản ứng, phương pháp loại tạp và kết tinh tạp F. Sản phẩm tổng hợp được thử sơ bộ tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng (SKLM) với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau n-hexan – ethyl acetat (8:2), cloroform – ethyl acetat (7:2), ethyl acetat – methanol (5:5). Xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ nghiệm UV-Vis, phổ IR so sánh với chuẩn, phổ MS phân giải cao và phổ <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR.

**Xác định độ tinh khiết tạp F allopurinol.**

Độ tinh khiết của tạp F được xác định bằng phương pháp HPLC-PDA với điều kiện sắc ký: cột Gemini – NX C18 (15cm; 4,6mm; 5µm), nhiệt độ cột: 25°C, pha động: acetonitril – nước acid formic pH =2,5 (35:65), tốc độ dòng: 1ml/phút. Đánh giá tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, độ chính xác, tính tuyến tính, độ đúng theo hướng dẫn ICH Q2(R1).

**Đánh giá tạp F allopurinol.**

Tạp F allopurinol được đánh giá theo các chỉ tiêu cảm quan, độ tan, điểm chảy, định tính, độ tinh khiết sắc ký theo Dược điển Mỹ (USP-NF 2023) [8].

**Thiết lập chất đối chiếu tạp F allopurinol.** 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 độ tinh khiết của tạp C trong từng lọ được tiến hành theo phương pháp HPLC.

Đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm: Tạp F sau khi được đóng gói và đánh giá đồng nhất lọ được lấy mẫu ngẫu nhiên và tiến hành xác định độ tinh khiết tại 03 phòng thí nghiệm độc lập. đạt GLP hoặc ISO/IEC 17025. Các phòng thí nghiệm được lựa chọn để gửi mẫu là Khoa Thiết lập chất chuẩn – chất đối chiếu (PTN1), Khoa Nghiên cứu – Phát triển (PTN2) và Khoa Vật lý (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 [4], sử dụng phép phân tích phương sai một yếu tố ANOVA, phép kiểm Fisher.

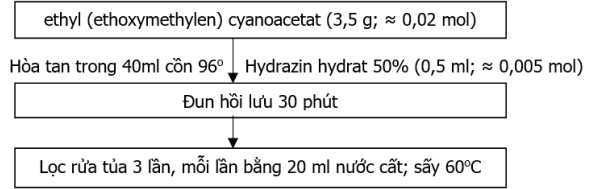
Xác định giá trị ấn định và độ không đảm bảo đo: Giá trị ấn định trên nhiều kiểm nghiệm tạp F, độ không đảm bảo đo  $U_x = 1,25s^*/\sqrt{p}$  được thực hiện theo hướng dẫn của ISO 13528 [4].

**III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU**

**Tổng hợp tạp F allopurinol.**

Cho 3,5 g nguyên liệu ethyl (ethoxymethylen) cyanoacetat (≈ 0,02 mol) vào bình cầu 2 cổ và cho vừa đủ cồn ethanol 96° khuấy tan, cho vào 0,5ml

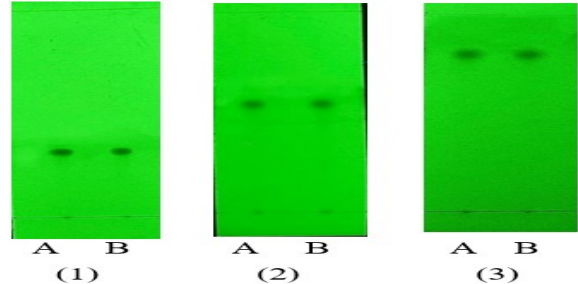
hydrazin hydrat 50% (≈ 0,005 mol) đun hồi lưu hỗn hợp trên bếp khuấy từ kết hợp hệ thống sinh hàn. Cho phản ứng xảy ra trong 30 phút. Lọc và rửa tủa 3 lần, mỗi lần với 20 ml nước cất. Thu sản phẩm và sấy ở 60°C. Sơ đồ phản ứng.



**Sơ đồ 2. Sơ đồ tối ưu tổng hợp tạp F allopurinol**

**Thử tinh khiết sản phẩm tổng hợp.**

Sản phẩm tổng hợp được hòa tan trong methanol, sau đó được triển khai sắc ký lớp mỏng với 3 hệ dung môi khác nhau. Kết quả cho thấy sản phẩm tổng hợp chỉ cho một vết duy nhất và tinh khiết trên SKLM (hình 1). Kết quả thử tinh khiết bằng phương pháp HPLC-PDA phổ 3D cho sắc ký đồ đạt độ tinh khiết pic. Hình 2 minh họa sắc ký đồ HPLC kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm.



**Hình 1. Sắc ký lớp mỏng sản phẩm tổng hợp tạp F allopurinol**

A: Sản phẩm tổng hợp

B: Tạp F chuẩn

1. n-hexan – ethyl acetat (8:2), R<sub>f</sub> = 0,30
2. Cloroform – ethyl acetat (7:2), R<sub>f</sub> = 0,65
3. Ethyl acetat – methanol (5:5), R<sub>f</sub> = 0,85

**Xác định cấu trúc sản phẩm tổng hợp**

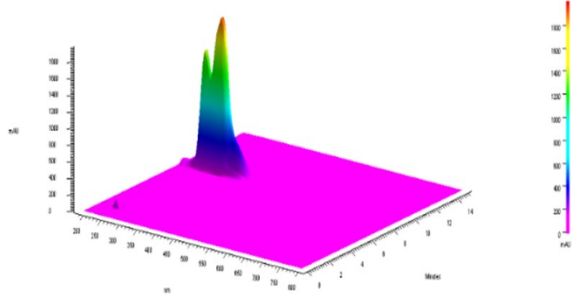
**Phổ UV-VIS** (dung dịch NaOH 0,1 M): 2 cực đại hấp thụ tại 254 nm và 295 nm phù hợp với phổ UV – Vis của tạp F

**Phổ IR** (KBr, cm<sup>-1</sup>): 3438,7 (-NH-); 2235,5 (-C ≡N); 1712,7 (-C=O) phù hợp với kết quả phổ IR của tạp F chuẩn

**Phổ MS<sup>+</sup>** (ESI<sup>+</sup>) cho tín hiệu [M+Na]<sup>+</sup> là 301,09189 phù hợp với [M+Na]<sup>+</sup> lý thuyết qua đánh giá độ lệch khối:

**Điều kiện sắc ký:** cột Gemini – NX C18 (15 cm; 4,6 mm; 5 µm), nhiệt độ cột: 25 °C, pha động: acetonitril – nước acid formic pH = 2,5 (35:65), tốc độ dòng: 1 ml/phút, nồng độ 50

µg/ml trong pha động, thể tích tiêm mẫu: 10 µl, đầu dò: bước sóng 254 nm.



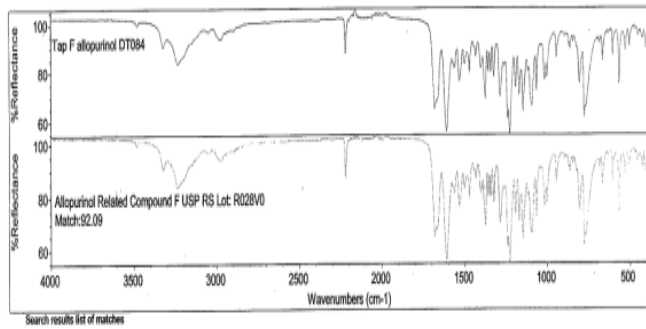
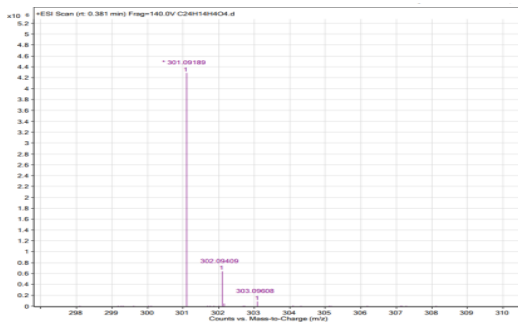
**Hình 2. Sắc ký đồ 3D kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm tổng hợp bằng HPLC-PDA**

$$\text{Độ lệch } m/z \text{ (ppm)} = \frac{m/z [M+Na]_{\text{thực nghiệm}} - m/z [M+Na]_{\text{lý thuyết}}}{m/z_{\text{lý thuyết}}} \times 1000000$$

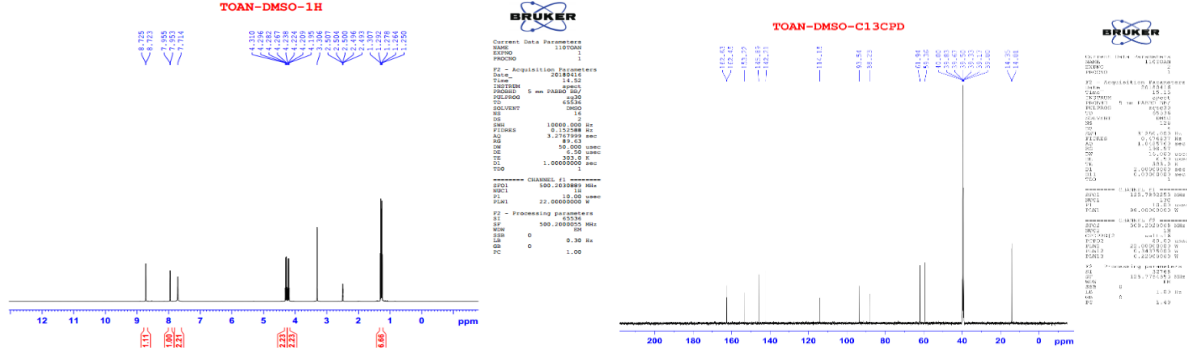
$$= \frac{301,0919 - 301,0907}{301,0907} \times 1000000 = 3,98 \text{ ppm} < 5 \text{ ppm}$$

**Phổ NMR** <sup>1</sup>H NMR và phổ <sup>13</sup>C NMR cho kết quả phù hợp cấu trúc tạp F allopurinol.

Các dữ liệu phổ UV, IR cũng tương đồng và phù hợp với tạp F. Cấu trúc phổ MS phân giải cao và phổ IR tạp F được trình bày ở hình 3. Cấu trúc phổ <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR được trình bày ở hình 4. Hiệu suất tổng hợp và tinh chế tạp F được trình bày trong bảng 2.



**Hình 3. Phổ khối phân giải cao sản phẩm và phổ hồng ngoại so sánh với chuẩn**



**Hình 4. Dữ liệu phổ <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR của sản phẩm tổng hợp**

**Bảng 1. Dữ liệu phổ NMR của sản phẩm tổng hợp**

Vị trí	Nguyên tử	Sản phẩm tổng hợp (DMSO-d <sub>6</sub> )		Công thức cấu trúc tạp F allopurinol
		δH (ppm) (500 MHz)	δC (ppm) (125 MHz)	
1; 1'	-CH <sub>3</sub>	1,26 (t, J = 7 Hz, 3H) 1,29 (t, J = 7 Hz, 3H)	14,0; 14,4	
2; 2'	-CH <sub>2</sub> -	4,22 (q, J = 7 Hz, 2H) 4,29 (q, J = 7 Hz, 2H)	59,4; 61,9	
3; 3'	>C=O		162,5; 162,6	
4	>C=		88,2	
5	-CH=	7,95 (d, J = 1 Hz, 1H)	145,9	
6	-CN		114,2	
7	>C=		153,2	
8	>C=		93,5	
9	-CH=	8,72 (d, J = 1 Hz, 1H)	142,2	
	NH	7,71 (br s, 2H)		

**Bảng 2. Hiệu suất tổng hợp và tinh chế tạp F**

Khối lượng tạp F lý thuyết (g)	6,56
Khối lượng tạp F thực tế tổng hợp được sau tinh chế (g)	4,51
Hiệu suất tổng hợp và tinh chế	60,1%

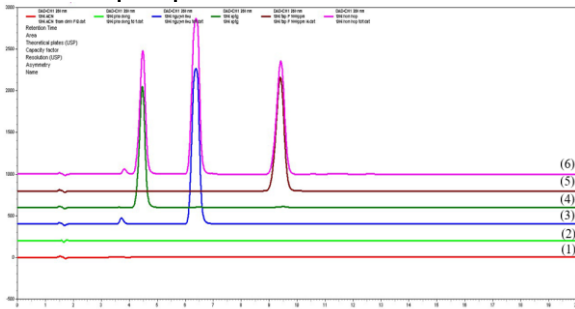
**Xác định độ tinh khiết tạp F bằng HPLC-PDA.** Quy trình xác định độ tinh khiết tạp F bằng HPLC-PDA được thẩm định theo hướng dẫn của ICH [3], bao gồm khảo sát tính phù hợp của hệ thống, tính đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ chính xác. Kết quả thẩm định được thể hiện ở bảng 3 và bảng 4.

**Bảng 3. Kết quả khảo sát tính phù hợp của hệ thống của phương pháp (n = 6)**

	Giá trị thống kê	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic ( $\mu V \times$ giây)	Hệ số đối xứng
Tạp F	Trung bình	9,24	114199002	1,09
	RSD	0,84%	1,12%	

RSD của các thông số sắc ký đều  $\leq 2,0\%$  và hệ số đối xứng của pic tạp F nằm trong khoảng 0,8 – 1,5. Như vậy quy trình xác định độ tinh khiết tạp F đạt tính phù hợp của hệ thống.

Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy: sắc ký đồ sản phẩm tổng hợp F allopurinol tách hoàn toàn khỏi các pic dung môi pha mẫu, dung môi pha động, nguyên liệu tổng hợp, sản phẩm phụ và có thời gian lưu trùng thời gian lưu của pic tạp F allopurinol chuẩn. Pic tạp F đạt độ tinh khiết theo phổ UV-Vis. Như vậy, quy trình đạt tính đặc hiệu. Hình 5 minh họa sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu.



**Hình 5. Sắc ký đồ khảo sát tính đặc hiệu: (1) đồ dung môi pha mẫu, (2) dung môi pha động, (3) nguyên liệu tổng hợp; (4) tạp D allopurinol; (5) tạp F tổng hợp và (6) hỗn hợp chuẩn tạp F, tạp D và nguyên liệu tổng hợp**

**Bảng 4. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính và độ chính xác**

	Tạp F
Phương trình hồi quy	$y = 2.10^6x$
Khoảng tuyến tính ( $\mu g/ml$ )	35 - 65 $\mu g/ml$

Hệ số tương quan (R)	1,0
Độ chính xác (RSD, n=12)	0,1%
Độ tinh khiết sắc ký*	99,5%

**Đánh giá tạp F.** Bảng 5 trình bày kết quả đánh giá tạp F. Với độ tinh khiết trên 99% nên hợp chất này đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu.

**Bảng 5. Kết quả đánh giá tạp F allopurinol**

Chi tiêu	Phương pháp	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất	Cảm quan	Bột màu trắng	Đạt
	Độ tan	Ít tan trong nước, tan tốt trong Chloroform, DMSO, ethanol 96°	
Định tính	Phổ UV	$\lambda_{max}$ (NaOH) 254 nm; 295 nm	Đúng
	Phổ IR	(KBr, cm-1): 3438,7 (-NH-); 2235,5 (-C $\equiv$ N); 1712,7 (-C=O)	
	Phổ MS	ESI-MS(+) m/z = 301,09189 [M+Na] <sup>+</sup>	
	Phổ NMR	Phổ <sup>13</sup> C-NMR; <sup>1</sup> H-NMR: xem bảng 1	
Điểm chảy	Máy đo điểm chảy	247-248°C	Đạt (247,5°C)
Hàm ẩm	Mất khối lượng do làm khô	$\leq 0,5\%$	Đạt (0,1%)
Độ tinh khiết sắc ký	HPLC	$\geq 98\%$	Đạt (99,5%)

**Thiết lập chất đối chiếu tạp F.** Lấy 2,5 g tạp F allopurinol tổng hợp, đóng 220 lọ, mỗi lọ 10 mg và 18 lọ được lấy ngẫu nhiên theo phần mềm Excel. Kết quả xác định tính phù hợp của hệ thống tại ba phòng thí nghiệm đều đạt yêu cầu về hệ số đối xứng của pic tạp F và RSD của diện tích pic tạp F nên có thể tiếp tục tiến hành xác định độ tinh khiết. Bảng 6 và bảng 7 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 kiểm định F test với  $F_{tn} = 0,1451 < F_{tc} = 3,6823$  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.

**Bảng 6. Kết quả đánh giá độ đồng nhất của quá trình đóng lọ**



Số thứ tự lọ	Độ tinh khiết tạp F (%)	Số thứ tự lọ	Độ tinh khiết tạp F (%)
09	99,65	57	99,39
12	99,49	70	99,53
24	99,75	83	99,47
34	99,62	91	99,23
40	99,34	96	99,68
51	99,41	117	99,65

**Bảng 7. Kết quả đánh giá độ đồng nhất lọ liên phòng thí nghiệm**

Mẫu	Độ tinh khiết tạp F (%)		
	PTN1	PTN2	PTN3
1	99,52	99,37	99,76
2	99,53	99,45	99,66
3	99,47	99,60	99,48
4	99,23	99,80	99,57
5	99,85	99,34	99,6
6	99,65	99,47	99,29

**Bảng 8. Kết quả xác định giá trị ấn định của tạp F (n=18)**

Số lần thay đổi	Tạp F		
	x* 0	x* 1	x* 2
$\delta = 1,5s^*$	0,25	0,25	0,25
$x^* - \delta$	99,28	99,28	99,28
$x^* + \delta$	99,78	99,78	99,78
$x^*$ mới	99,53	99,53	99,53
$s^*$ mới	0,17	0,17	0,17

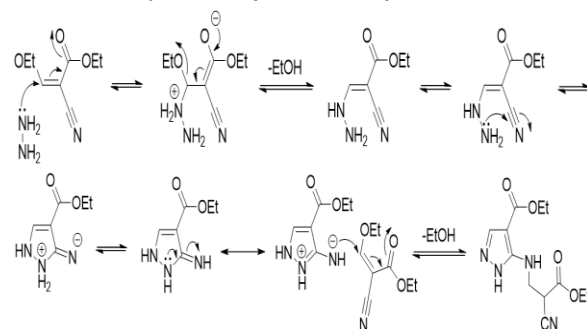
Sau hai lần thay đổi,  $s^* = 0,13$  không thay đổi, khi đó  $x^*$  được chọn là 99,72%. Vậy giá trị ấn định của tạp F là 99,72% và độ không đảm bảo đo:  $U_x = 0,038\%$ .

Như vậy tạp F allopurinol tổng hợp đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia với hàm lượng được xác định là 99,5% tính theo nguyên trạng. Tiến hành lập hồ sơ chất chuẩn, dán nhãn lọ và kèm theo phiếu kiểm nghiệm. Bảo quản các lọ chuẩn ở nhiệt độ 2 – 8 °C, tránh ánh sáng.

#### IV. BÀN LUẬN

Hình 6 minh họa cơ chế phản ứng tổng hợp tạp F allopurinol. Nguyên liệu ethyl (ethoxymethylen)cyanoacetat (EEMCA) được hòa tan với một lượng vừa đủ ethanol 96°, khi cho hydrazin hydrat 50% vào đun hồi lưu 30 phút xảy ra phản ứng cộng nucleophilin ( $A_N$ ) qua các giai đoạn. Giai đoạn 1: đôi điện tử tự do trên nhóm  $-NH_2$  ưu tiên tấn công vào carbonyl mang điện tích dương trên phân tử EEMCA, đồng thời loại 1 phân tử ethanol, giai đoạn này ảnh hưởng lớn đến tốc độ phản ứng. Giai đoạn 2: đôi điện tử tự do trên nitơ còn lại  $-NH-NH_2$  tấn công vào nhóm cyanid ( $-C\equiv N$ ), thực hiện đóng vòng pyrazol. Giai đoạn 3: Đôi điện tử trên  $-NH_2$  trong sản phẩm mới tạo thành phản ứng cộng nucleophilin tiếp với lượng dư EEMCA, đồng thời

phản ứng loại 01 phân tử ethanol tạo thành tạp F allopurinol. Phản ứng chọn lọc trong điều kiện lượng dư EEMCA với tỷ lệ mol EEMCA và hydrazin hydrat 50% khảo sát tối ưu là ( $\approx 4:1$ ) giúp phản ứng chuyển dịch mạnh theo chiều thuận tạo thành tạp F allopurinol, trường hợp tồn dư hydrazin hydrat 50% hoặc lượng EEMCA không đủ như trong phân tích khối phổ nghiên cứu của Wuxi Yew Pharmaceutical Co Ltd (2020) sẽ tạo nhiều sản phẩm phụ do phản ứng hydrazit hóa tấn công vào các nhóm carbonyl ( $-C=O$ )OEt tạo thành hydrazone ( $C=NH-NH_2$ ) [8].



**Hình 6. Cơ chế phản ứng tổng hợp tạp F allopurinol**

#### V. KẾT LUẬN

Tạp F của allopurinol đã được tổng hợp và được đánh giá để làm chất đối chiếu sử dụng trong kiểm nghiệm tạp chất liên quan của allopurinol. Quy trình tổng hợp tạp F allopurinol có hiệu suất khoảng 60% với độ tinh khiết sắc ký trên 99% tính theo nguyên trạng. Sản phẩm được đánh giá độ đồng nhất lọ và đánh giá độ tinh khiết liên phòng thí nghiệm đạt GLP với giá trị công bố đạt 99,5% đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bộ Y tế** (2018), Ban hành danh mục thuốc thiết yếu, Thông tư 19/2018/TT-BYT ngày 30/08/2018.
- G. G. Danagulyan, A. P. Boyakhchyan, V. G. Kirakosyan** (2010), "An example of a domino reaction in the synthesis of pyrazolo[1,5-a]pyrimidine derivative", Chemistry of Heterocyclic Compounds, 46(6), pp. 768-769.
- ICH Harmonized tripartite guideline** (2005), Validation of analytical procedures: text and methodology, pp. 1-13.
- ISO 13528:2005** (2005), Statistical methods for use in proficiency testing by inter-laboratory comparisons, p. 64.
- John D. FitzGerald, Nicola Dalbeth, Ted Mikuls, et al** (2020); American College of Rheumatology: "2020 American College of Rheumatology Guideline for the Management of Gout", Arthritis Care & Research, pp 1–17, DOI 10.1002/acr.24180 © 2020.

6. USP NF-2023, CD-ROMs.  
7. USP Reference Standards. <https://store.usp.org/product/1013024>. Ngày truy cập 01/08/2023.

8. Wuxi Yew Pharmaceutical Co Ltd (2020), "Allopurinol impurity F and preparation method thereof", China Patent CN111978259A.

## THỰC TRẠNG KHÔNG ĐÁP ỨNG VỚI THUỐC ADALIMUMAB VÀ MỘT SỐ YẾU TỐ LIÊN QUAN TRONG ĐIỀU TRỊ VIÊM CỘT SỐNG DÍNH KHỚP

Nguyễn Thị Như Hoa<sup>1,2</sup>, Nguyễn Duy Hiệp<sup>3</sup>

### TÓM TẮT

**Mục tiêu:** Xác định các yếu tố dự đoán không đáp ứng với thuốc Adalimumab và một số yếu tố liên quan đến tình trạng không đáp ứng với thuốc Adalimumab trong viêm cột sống dính khớp. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Nghiên cứu mô tả, tiền cứu trên 35 bệnh nhân được chẩn đoán viêm cột sống dính khớp theo tiêu chuẩn New York sửa đổi (1984) và có chỉ định điều trị bằng thuốc Adalimumab theo tiêu chuẩn ASAS/EULAR 2016 tại Trung tâm Cơ Xương Khớp, Bệnh viện Bạch Mai từ tháng 8/2018 đến tháng 8/2022. **Kết quả:** Tỷ lệ bệnh nhân không đáp ứng với thuốc Adalimumab: 22,9%, trong đó tỷ lệ không đáp ứng nguyên phát: 8,6% và không đáp ứng thứ phát: 14,3%. Chưa thấy mối liên quan giữa các đặc điểm lâm sàng và cận lâm sàng của bệnh nhân viêm cột sống dính khớp giữa nhóm đáp ứng và nhóm không đáp ứng với thuốc Adalimumab. **Kết luận:** Tỷ lệ bệnh nhân không đáp ứng với thuốc adalimumab: 22,9%. Chưa thấy mối liên quan giữa sự không đáp ứng thuốc adalimumab với một số yếu tố như tuổi, giới, thời gian mắc bệnh, tổn thương khớp ngoại vi, HLA B27, ASDAS-CRP, không tuân thủ điều trị, phối hợp methotrexat trong điều trị viêm cột sống dính khớp. **Từ khóa:** Viêm cột sống dính khớp, thuốc adalimumab, kháng trị với thuốc.

### SUMMARY

#### CURRENT STATUS OF NON RESPONSE TO ADALIMUMAB IN ANKYLOSING SPONDYLITIS MANAGEMENT

**Aims:** To determine the prevalence of non - response to adalimumab and other factors related to the non - response to adalimumab in Ankylosing spondylitis patients. **Subjects and methods:** longitudinal, descriptive study in patients received adalimumab in Ankylosing spondylitis at Bach Mai Hospital from August 2018 to August 2022. **Results:** In this study of 35 ankylosing spondylitis patients (80,0% male, 27,9 ± 11,8 years of age), the percentages of primary lack of response (PLR) was

8,6% and secondary lack of response (SLR) - 14,3% respectively. **Conclusions:** The percentage of non - response to adalimumab in our Ankylosing spondylitis patients was 22,9%. No correlation was found between non - response to adalimumab and male sex, older age, disease duration, peripheral arthritis, HLA B27, ASDAS-CRP, medication non-adherence, concomitant methotrexat of ankylosing spondylitis patients under adalimumab. **Keywords:** adalimumab, lack of response (PLR), secondary lack of response (SLR), Ankylosing spondylitis.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Viêm cột sống dính khớp (VCSDK) chiếm tỉ lệ cao nhất trong nhóm bệnh viêm khớp cột sống thể trục, biểu hiện bởi tình trạng viêm tiến triển mạn tính chủ yếu ở cột sống, khớp cùng chậu, khớp háng và có thể ở các khớp ngoại vi. Nếu không được điều trị sớm và kịp thời, người bệnh nhanh chóng bị biến dạng cột sống và các khớp ngoại vi, làm giảm chất lượng cuộc sống [1]. Adalimumab là kháng thể đơn dòng IgG1 của người tái tổ hợp, thuộc nhóm thuốc kháng TNF- $\alpha$ , được khuyến cáo sử dụng ở những bệnh nhân VCSDK có mức độ hoạt động bệnh cao kéo dài, thất bại với điều trị cơ bản [2]. Trên thế giới, đã có nhiều nghiên cứu khẳng định hiệu quả và tính an toàn của thuốc adalimumab trên bệnh nhân VCSDK [3]. Tuy nhiên tỉ lệ kháng trị với adalimumab ở bệnh nhân VCSDK dao động 25-42% [4,5]. Kháng trị với thuốc adalimumab bao gồm kháng trị nguyên phát và kháng trị thứ phát, nguyên nhân có thể do bệnh nhân (di truyền, lối sống) hoặc do bệnh (giai đoạn hoạt động bệnh, thể bệnh), do thuốc (dược lực học, tính sinh miễn dịch) và chiến lược điều trị (phác đồ dùng thuốc, liệu pháp phối hợp). Nghiên cứu của Runsheng Wang năm 2022 gồm 1899 bệnh nhân trong 10 thử nghiệm lâm sàng, cho thấy kháng trị với thuốc kháng TNF- $\alpha$  trong VCSDK liên quan: giới tính nữ, tuổi lớn hơn, BMI cao, thời gian mắc bệnh dài, HLA-B27 (-), CRP ban đầu thấp [6]. Ở Việt Nam, đã có nghiên cứu về hiệu quả và tính an toàn của thuốc adalimumab trong điều trị bệnh VCSDK. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào đánh giá về tình trạng không đáp ứng với

<sup>1</sup>Bệnh viện Bạch Mai

<sup>2</sup>Trường Đại học Y Dược Quốc gia Hà Nội

<sup>3</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

Chịu trách nhiệm chính: Nguyễn Thị Như Hoa

Email: nhuhoanguyen83@gmail.com

Ngày nhận bài: 4.10.2023

Ngày phản biện khoa học: 14.11.2023

Ngày duyệt bài: 14.12.2023