

Identification and Chromatographic purity determination of mebendazole's impurity A reference standard

Nguyen Lam Hong^{1*}, Nguyen Trung Nghia¹, Ngo Duc Huy², Ngo Minh Thuy¹,
Nguyen Thị Thu Phương³, Nguyen Van Hai²

¹*Faculty of Analytical Chemistry and Drug Quality Control, Hanoi University of Pharmacy,
13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam*

²*Faculty of Pharmaceutical Chemistry and Technology, Hanoi University of Pharmacy,
13-15 Le Thanh Tong, Hoan Kiem, Hanoi, Vietnam*

³*Pasteur Institute in Ho Chi Minh City
167 Pasteur, Vo Thi Sau Ward, District 3, Ho Chi Minh City*

* *Corresponding author: Nguyen Lam Hong, email: hongnl@hup.edu.vn*

ABSTRACT

Background: Mebendazole's impurity A standard [methyl (5-benzoyl-1H-benzimidazol-2-yl) carbamate] is specified in pharmacopoeia monographs for mebendazole and mebendazole tablets (i.e., USP 43, BP 2020, EP11.0 and Vietnamese Pharmacopoeia V) and set at not more than 0.25 %. It is also a component of the standard mixture for mebendazole system suitability testing.

Aim: This study was carried out to establish spectral dataset for identification of mebendazole's impurity A standard and HPLC/DAD chromatographic method for its content determination.

Method: Mebendazole's impurity A standard was structurally identified by NMR, HR-MS, IR, UV spectroscopy, melting point. This standard's content was HPLC/DAD determined using the dilution method.

Results: A dataset (including HR-MS, 1D-NMR, IR, UV spectra and melting point) was successfully established for identification of mebendazole's impurity A standard. An HPLC method was also developed to quantify this standard. According to the validation data, the method was specific, linear in the range from 0.1 to 10 ppm, precise (RSD = 0.01 %). The content of mebendazole's impurity A standard was chromatographically determined to be 99.9 %.

Conclusions: Mebendazole's impurity A standard was structurally identified by HR-MS, 1D-NMR, IR, UV spectral dataset. Using the dilution method, it was HPLC/DAD quantified to be 99.9 %.

Key words: Mebendazole's Impurity A, chromatographic purity, HPLC/DAD, NMR, HR-MS, IR.



Nhận dạng và xác định độ tinh khiết sắc ký của nguyên liệu chất chuẩn tạp A mebendazol

Nguyễn Lâm Hồng*¹, Nguyễn Trung Nghĩa¹, Ngô Đức Huy², Ngô Minh Thuý¹,
Nguyễn Thị Thu Phương³, Nguyễn Văn Hải²

¹Khoa Hóa Phân tích và Kiểm nghiệm thuốc, Trường Đại học Dược Hà Nội
13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

²Khoa Công nghệ Hoá dược, Trường Đại học Dược Hà Nội
13-15 Lê Thánh Tông, Hoàn Kiếm, Hà Nội, Việt Nam

³Viện Pasteur Thành phố Hồ Chí Minh 167 Pasteur, phường Võ Thị Sáu, quận 3, TP. HCM

*Tác giả liên hệ, Nguyễn Lâm Hồng, email: hongnl@hup.edu.vn
(Ngày gửi đăng: 17/5/2023 - Ngày duyệt đăng: 15/6/2023)

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Chất chuẩn tạp A mebendazol tên khoa học là methyl (5-benzoyl-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate) được sử dụng trong các chuyên luận nguyên liệu và thuốc viên nén chứa mebendazol trong các dược điển USP 43, BP 2020, EP 11.0, DĐVN V để đánh giá giới hạn tạp chất A với yêu cầu không lớn hơn 0,25 % và hỗn hợp đánh giá độ phù hợp hệ thống (mebendazole for system suitability CRS) bao gồm chất chuẩn: mebendazol và các tạp liên quan, trong đó có tạp chất A.

Mục tiêu nghiên cứu: xây dựng bộ phổ để nhận dạng và phương pháp xác định độ tinh khiết sắc ký HPLC/DAD của nguyên liệu chất chuẩn tạp A mebendazol.

Phương pháp nghiên cứu: Đo phổ NMR, HR-MS, IR, UV, nhiệt độ nóng chảy khẳng định cấu trúc và xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết tạp A bằng HPLC/DAD sử dụng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử.

Kết quả nghiên cứu: Đã xây dựng được bộ dữ liệu nhận dạng tạp A mebendazol gồm: phổ NMR, HR-MS, IR, UV, nhiệt độ nóng chảy và phương pháp xác định độ tinh khiết sắc ký tạp A mebendazol bằng HPLC/DAD. Thẩm định phương pháp xác định độ tinh khiết sắc ký đã xây dựng có độ đặc hiệu cao, khoảng tuyến tính từ nồng độ 0,1 đến 10 ppm, độ lặp lại tốt với RSD% = 0,01 % < 2 % và độ tinh khiết sắc ký của nguyên liệu chất chuẩn tạp A mebendazol là 99,9 %.

Kết luận: Đã nhận dạng được tạp A mebendazol bằng phổ HR-MS, 1D-NMR, IR, UV và xây dựng được phương pháp HPLC/DAD sử dụng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử và xác định độ tinh khiết của nguyên liệu chất chuẩn tạp A mebendazol là 99,9 %.

Từ khóa: Tạp A mebendazol, độ tinh khiết sắc ký, HPLC/DAD, NMR, HR-MS, IR.

Đặt vấn đề

Là một nước ở vùng nhiệt đới, khí hậu nóng ẩm, điều kiện vệ sinh kém nên Việt Nam có tỉ lệ nhiễm giun, sán khá là cao. Đa số các thuốc chống giun đều có hiệu quả cao, ít tác dụng không mong muốn và dễ sử

dụng, điển hình là các thuốc chứa mebendazol [1], [2]. Hiện nay có nhiều chế phẩm có chứa mebendazol được sản xuất trong nước đang được lưu hành trên thị trường. Để kiểm soát chất lượng của nguyên liệu cũng như thành phẩm có chứa



mebendazol, một số Dược điển hiện hành yêu cầu thử tạp chất liên quan, trong đó có tạp A (tên khoa học là methyl (5-benzoyl-1H-benzimidazol-2-yl)carbamate) với yêu cầu giới hạn không được lớn hơn 0,25% và hỗn hợp đánh giá độ phù hợp hệ thống (*mebendazole for system suitability CRS*) bao gồm các chất chuẩn: mebendazol và các tạp liên quan của mebendazol (7 tạp chất trong đó có tạp A), [3], [4], [7], [8]. Tuy nhiên, chất chuẩn tạp A và hỗn hợp chất chuẩn tạp này hiện nay chưa được sản xuất tại Việt Nam, phải nhập khẩu từ nước ngoài với giá thành từ 5-10 triệu/lọ 10 mg. Vì vậy, để có thể sử dụng chất chuẩn tạp A và hỗn hợp chất chuẩn đánh giá độ phù hợp hệ thống sắc ký cần có nguyên liệu chất chuẩn tạp A mebendazol. Nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu: xây dựng bộ phổ để nhận dạng và phương pháp xác định độ tinh khiết sắc ký HPLC/DAD của nguyên liệu chất chuẩn tạp A mebendazol.

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu:

Nguyên liệu tạp A mebendazol do nhóm nghiên cứu tự tổng hợp theo quy trình sau: thủy phân mebendazol trong dung dịch NaOH 2M và dung môi MeOH, đun hồi lưu ở 70 °C, sau 3 giờ trung hòa tới pH=8 bằng dung dịch HCl 10 % thu được kết tủa. Hòa tan tủa bằng acid formic (HCOOH) 96 %, trung hòa bằng NH₃ đặc tới pH = 6-7, thu được nguyên liệu tạp A mebendazol.

Hóa chất và thiết bị nghiên cứu:

Cân phân tích Mettler Toledo (d=0,1mg), máy sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1200, cột sắc ký InertSustain C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) của GL Sciences, máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker 600MHz, máy cận hồng ngoại Nilolet iS50 NIR (Thermo).

Hóa chất, dung môi: dicloromethan (CH₂Cl₂), metanol (MeOH), aceton ((CH₂)₂CO), acid formic (HCOOH), ethanol (EtOH), n-butanol, natri hydroxid (NaOH), amoniac (NH₃), acid hydrochloric (HCl), amoni acetat (CH₃COONH₄): đạt tinh khiết phân tích; acetonitril (ACN) Merck: đạt tinh khiết sắc ký.

Phương pháp nghiên cứu:

Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng tạp A mebendazol: Tiến hành đo phổ khối (HR-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), phổ hồng ngoại (IR), phổ UV (nồng độ tạp A mebendazol 10 ppm trong dung môi ACN - H₂O = 1:1), đo nhiệt độ nóng chảy đối với nguyên liệu tạp A mebendazol và so sánh với các tài liệu đã được công bố [6].

Xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết sắc ký tạp A mebendazole sử dụng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử: qua tham khảo chỉ tiêu thử tạp chất liên quan của chuyên luận Mebendazol trong các dược điển USP 43, BP 2020, EP11, ĐVN V [2, 3, 7, 8], tiến hành khảo sát điều kiện sắc ký để xác định độ tinh khiết sắc ký tạp A mebendazol như sau: cột C18 (25 cm × 4,6 mm, 5 μm), nhiệt độ cột 25 °C, dung môi pha mẫu: ACN - H₂O (1:1), pha động gồm: kênh A: ACN và kênh B: dung dịch amoni acetat 0,75 %, tốc độ dòng: 1,0 ml/min, thể tích tiêm: 20 μL, detector UV (bước sóng 250 mm).

Cách tính:

$$\% \text{ tổng tạp} = \frac{\sum S_{\text{tạp}}}{S_{\text{tạp A/ĐC}(1)}}$$

Trong đó: $\sum S_{\text{tạp}}$ là tổng diện tích pic của các tạp chất liên quan trên SKĐ dung dịch thử, $S_{\text{tạp A/ĐC}(1)}$: diện tích pic tạp A mebendazol trên SKĐ dung dịch đối chiếu (1)

Độ tinh khiết pic chính trên sắc ký đồ dung dịch thử được tính bằng 100% trừ đi tổng tạp chất liên quan.

Phương pháp đã xây dựng được tiến hành thẩm định về độ đặc hiệu, LOQ, đường chuẩn, độ chính xác theo hướng dẫn của ICH.

Kết quả nghiên cứu

Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng tạp A mebendazol

Nhiệt độ nóng chảy: 205 - 209 °C.

Phổ khối (HR-MS): Chất tạp A có phổ HR-ESI-MS cho pic ở m/z : 238,0975 [M+H]⁺ cho phép xác định công thức phân tử của chất là C₁₄H₁₁N₃O (giá trị m/z lý thuyết ứng với công thức này là 238,0980).

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Phổ ¹H-



NMR cho tín hiệu của 8 proton ở vùng trường thơm ở δ_H 7,27- 7,76 ppm, trong đó có tín hiệu của 1 hệ ABX ở δ_H 7,69 (d, $J = 1,8$ Hz, H-3); 7,56 (dd, $J = 1,8; 8,4$ Hz, H-5); 7,28 (d, $J = 8,4$ Hz, H-6). Còn lại là tín hiệu của 5 proton của vòng phenyl thế. Phổ ^{13}C -NMR kết hợp phổ HSQC xác định được chất có 1 nhóm cacbonyl ở δ_C (199,1 ppm), 8 nhóm methin sp^2 phù hợp với phổ ^1H -NMR và các nguyên tử cacbon không liên kết trực tiếp với hydro. Trên phổ HMBC quan sát thấy proton H-3 (δ_H 7,69 ppm) tương tác với C=O (δ_C 199,1 ppm)/C-5 (δ_C 125,6 ppm) và tương tác của H-5 (δ_H 7,56 ppm) với C=O (δ_C 199,1 ppm)/C-3 (δ_C 129,3)/ C-7 (δ_C 114,5 ppm), proton H-6 (δ_H 7,28 ppm) tương tác với C-2/C-4/C-7 cho phép gắn kết vòng B với vòng C và vòng B liên kết với C=O qua C-4. Ngoài ra còn quan sát thấy tương tác của H-10/H-14 với C=O

chứng tỏ vòng phenyl thế liên kết trực tiếp với C=O qua C-9. Dựa vào các dữ liệu phổ ESI-MS, 1D, 2D-NMR và so sánh tài liệu tham khảo [6] xác định được chất là methyl (5-benzoyl-1H-benzimidazol-2-yl) carbamat là tạp A mebendazol và có công thức cấu tạo như hình 1.

Phổ hồng ngoại (IR).

Phổ IR (KBr), ν_{max} (cm^{-1}) của tạp A mebendazol có các đỉnh đặc trưng sau: 3324, 3057, 1720, 1648, 1629, 1577, 1473, 1455, 1391, 1319, 1288, 1243, 1210, 1110, 1047, 975, 892, 831, 769, 702, 690, 640, 563

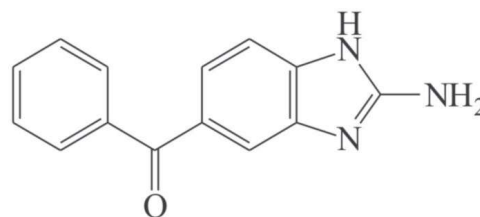
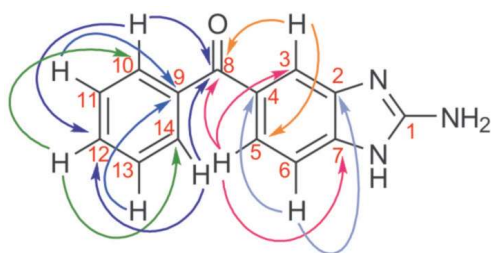
Phổ hấp thụ UV:

Nguyên liệu chuẩn tạp A mebendazol pha trong dung môi ACN - H_2O (1:1) để được dung dịch có nồng độ 10 ppm. Tiến hành quét phổ từ 190 - 400 nm cho cực đại tại 220, 250 và 330 nm (Hình 2).

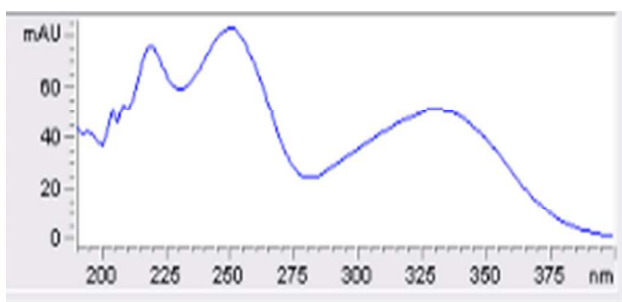
Bảng 1. Dữ liệu phổ ^{13}C -NMR và ^1H -NMR của chất tạp A

TT	* $\delta_C^{d,e}$	DEPT	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ mult. (J in Hz)	HMBC (H-C)
1	157,68	Cq	159,0	-	-
2	139,03	Cq	137,0	-	-
3	127,78	CH	129,3	7,69 (d, 1,8)	C-5, C=O
4	131,51	Cq	130,7	-	-
5	123,56	CH	125,6	7,56 (dd, 1,8; 8,54)	C=O, C-7, C-3
6	111,92	CH	112,5	7,28 (d, 8,4)	C-2, C-4
7	112,64	Cq	114,5	-	-
8	195,47	(C=O)	199,1	-	-
9	145,25	Cq	140,3	-	-
10, 14	129,22	CH	130,7	7,75 m	C-12, C=O
11, 13	128,32	CH	129,3	7,54 m	C-9
12	136,62	CH	133,0	7,63 m	C-10, C-14

a: CD_3OD , b: 200 MHz, c: 600 MHz, d; DMSO, e: 400 MHz [6]



Hình 1. Một số tương tác chính trên phổ HMBC và công thức cấu tạo của tạp A mebendazol
Phổ hồng ngoại (IR):



Hình 2. Phổ hấp thụ UV của tạp A mebendazol

Xây dựng phương pháp xác định độ tinh khiết sắc ký tạp A mebendazol

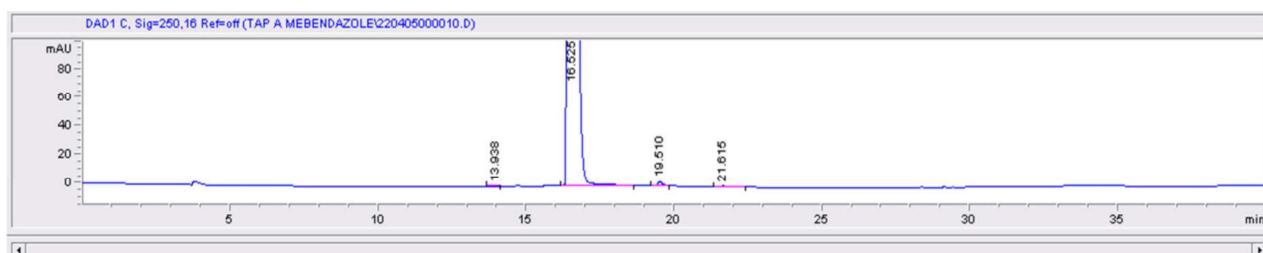
Điều kiện sắc ký được tiến hành khảo sát như mục 2 phương pháp nghiên cứu, để đảm bảo phát hiện và tách hoàn toàn tạp chất liên quan khỏi tạp A mebendazol, nghiên cứu đã sử dụng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử và điều chỉnh các điều kiện sau:

Chương trình dung môi

Tiến hành điều chỉnh tỷ lệ pha động theo chương trình dung môi (bảng 2) để đảm bảo pic của tạp A mebendazol tách hoàn toàn khỏi các tạp chất liên quan và sắc ký đồ thu được pic sắc ký gọn, cân đối, thời gian lưu tạp A mebendazol khoảng 17 phút (hình 3).

Bảng 2: Chương trình dung môi pha động

Thời gian (min)	Pha động A ACN (%v/v)	Pha động B dung dịch amoni acetat 0,75% (%v/v)	Tốc độ dòng
0 – 5	90 → 75	10 → 25	1,0 ml/min
5 – 30	75 → 50	25 → 50	1,0 ml/min
30 – 35	50 → 90	50 → 10	1,0 ml/min
35 – 40	90	10	1,0 ml/min



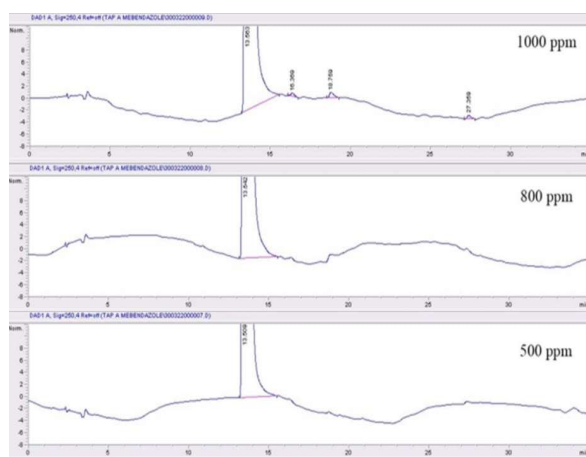
Hình 3. Sắc ký đồ mẫu thử 500 ppm với chương trình dung môi lựa chọn

Nồng độ dung dịch thử

Khảo sát độ tinh khiết sắc ký của tạp A mebendazol trên 3 dung dịch thử nồng độ 500, 800, 1000 ppm, nhận thấy dung dịch 800 và 1000 ppm pic chính quá lớn làm đỉnh pic bị tù đồng thời gây ra hiện tượng cột bị quá tải, kéo dài thời gian rửa cột. Độ tinh khiết sắc ký của nguyên liệu tạp chất A mebendazol được xác định bằng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử, ở nồng độ 1000 ppm, 800 ppm và 500 ppm khác nhau không đáng kể (tương ứng là 99,96 %, 100 % và 100 %) (hình 4). Vì vậy, dung dịch thử có nồng độ 500 ppm được lựa chọn vì ở nồng độ này pic tạp A thu được tín hiệu phù hợp để phát hiện đầy đủ các tạp chất liên quan và dung dịch này được chuẩn bị như sau: cân chính xác khoảng 10 mg nguyên liệu tạp A mebendazol trong bình định mức 20 ml, hoà tan và định mức vừa đủ bằng dung môi pha mẫu.

Nồng độ dung dịch đối chiếu

Lựa chọn kỹ thuật pha loãng dung dịch thử



Hình 4. Sắc ký đồ tại các nồng độ khác nhau



và giới hạn tổng tạp cho phép nên dung dịch đối chiếu (1) có nồng độ 5 ppm bằng 1/100 dung dịch thử và được chuẩn bị như sau: hút chính xác 1,0 ml dung dịch thử cho vào bình định mức 100 ml, định mức vừa đủ bằng dung môi pha mẫu.

Thẩm định phương pháp phân tích

Độ phù hợp hệ thống:

Tiêm lặp lại dung dịch đối chiếu (1) được chuẩn bị như trên tiêm lặp lại 6 lần.

Bảng 3. Kết quả thẩm định độ phù hợp hệ thống

TT	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (mAU.s)
Trung bình	16,726	405,2
RSD	0,04 % (≤ 1,0 %)	0,90 % (≤ 2,0 %)

Độ đặc hiệu:

Chuẩn bị mẫu trắng, dung dịch thử, dung dịch đối chiếu (1) và các dung dịch thử phân hủy ở các điều kiện khắc nghiệt: H₂SO₄ 1M trong 20 phút, NaOH 1M trong 50 phút, UV trong 24 giờ, H₂O₂ 30% trong 30 phút, đun

cách thủy 100°C trong 30 phút (hình 5).

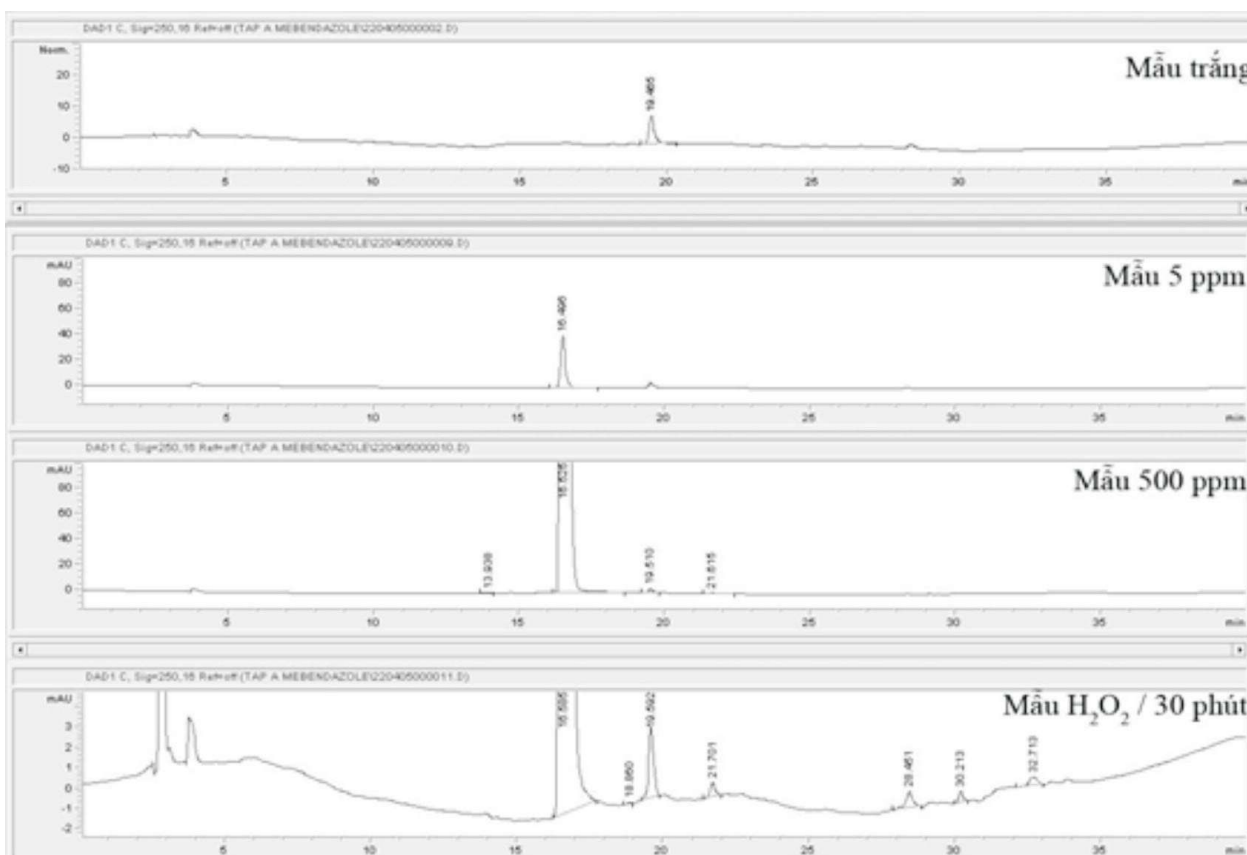
Sắc kí đồ của mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu trùng với thời gian lưu của pic tạp A mebendazol trên sắc kí đồ của dung dịch thử và dung dịch đối chiếu (1).

Các pic tạp chất xuất hiện trên sắc kí đồ dung dịch thử và dung dịch thử phân hủy trong điều kiện khắc nghiệt tách hoàn toàn khỏi pic tạp A mebendazol.

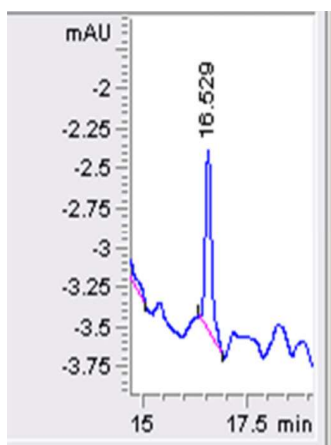
Giới hạn định lượng (LOQ):

Pha loãng dung dịch chuẩn đối chiếu (1) đến nồng độ phù hợp và tính giá trị S/N nằm trong khoảng từ 10-20, thu được tại nồng độ 0,1 ppm tỷ số tín hiệu trên nhiễu S/N ≈ 10 (hình 6), chuẩn bị 10 mẫu có nồng độ 0,1 ppm và tiêm sắc ký, tính RSD% của diện tích pic lặp lại 10 lần là 14,4%. Như vậy, giới hạn định lượng tạp chất liên quan là 0,1 ppm.

Từ kết quả nồng độ LOQ là 0,1 ppm, tiến hành chuẩn bị dung dịch đối chiếu (2) nồng độ 0,1 ppm bằng cách: pha loãng 2,0 ml dung dịch đối chiếu (1) thành 100 ml bằng dung



Hình 5. Sắc kí đồ thẩm định độ đặc hiệu



Hình 6. Kết quả tính S/N ở nồng độ 0,1 ppm (LOQ)

môi pha mẫu và dung dịch đối chiếu (3) là giới hạn phát hiện (LOD) có nồng độ 0,02 ppm bằng cách pha loãng 5 lần dung dịch đối chiếu (2): hút chính xác 2,0 ml dung dịch đối chiếu (2) cho bình định mức 10,0 ml, định mức vừa đủ bằng dung môi pha mẫu.

Khoảng tuyến tính

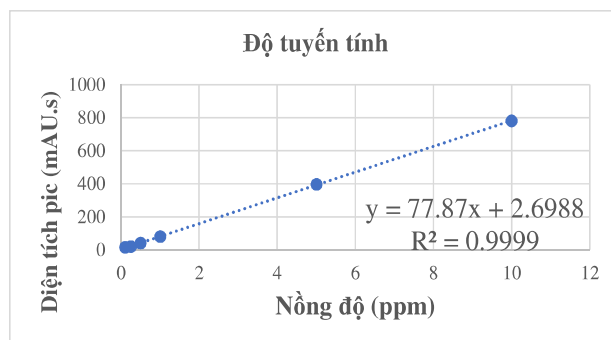
Tiến hành chuẩn bị và tiêm sắc ký dãy dung dịch tạp A mebendazol có nồng độ từ LOQ-200% giới hạn định lượng tạp chất, kết quả trong bảng 5 cho thấy trong khoảng nồng độ từ 0,1 tới 10 ppm có sự tương quan tuyến tính chặt chẽ giữa nồng độ và diện tích pic với hệ số tương quan $r = 0,999 > 0,998$ và hệ số chặn (**b/ S pic** tại nồng độ 100% định lượng), $Y = 0,68\% \leq 2,0\%$.

Bảng 5. Kết quả thẩm định khoảng tuyến tính

Nồng độ (ppm)	Diện tích pic (mAU.s)	
10	779,7	Phương trình hồi quy: $y = 77,87x + 2,70$ Hệ số tương quan: $r = 0,999$ Hệ số chặn $Y = 0,68\%$
5	395,9	
1	79,3	
0,5	40,5	
0,25	19	
0,1	13,9	

Độ lặp lại và độ tái lập

Mẫu nguyên liệu tạp A lô 1, tiến hành chuẩn bị 6 dung dịch thử 500 ppm và dung dịch đối chiếu (1), để đánh giá độ lặp lại của phương pháp tại 2 PTN: PTN (1) (Khoa Hoá



Hình 7. Đồ thị biểu diễn mối tương quan giữa diện tích và nồng độ

Phân tích và Kiểm nghiệm thuốc- Trường Đại học Dược Hà Nội) và PTN 2 (Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương).

Bảng 6. Bảng kết quả so sánh giữa 2 phòng thí nghiệm

TT	Độ tinh khiết pic sắc ký (%)	
	Phòng TN 1	Phòng TN 2
1	99,93	100,0
2	99,95	100,0
3	99,94	100,0
4	99,92	100,0
5	99,92	100,0
6	99,93	100,0
Trung bình	99,93	100,0
RSD	0,01%	0%

Từ kết quả so sánh giữa 2 phòng thí nghiệm ta thấy không có sự sai khác đáng kể về kết quả giữa 2 phòng thí nghiệm và độ tinh khiết sắc ký của tạp A mebendazol là 99,9 %.

Thảo luận

Nguyên liệu thiết lập chất chuẩn tạp A mebendazol được thủy phân từ mebendazol trong môi trường base, sản phẩm thu được đã được khẳng định cấu trúc bằng phổ HR-MS cho công thức cấu tạo là $C_{14}H_{11}N_3O$, phổ ^1H-NMR , $^{13}C-NMR$ và HMBC cho các độ chuyển dịch hoá học đặc trưng tương ứng với tài liệu đã công bố [6] khẳng định chất điều chế được là tạp A mebendazol (bảng 1 và hình 1), phổ IR, UV có các đỉnh đặc trưng với công thức cấu tạo tạp A là dữ liệu phổ để từ đó nhận dạng tạp A mebendazol.



Phương pháp xác định độ tinh khiết sắc ký tạp A của mebendazol đã xây dựng được dựa trên phương pháp xác định tạp chất liên quan trong nguyên liệu mebendazol trong EP 11.0 và USP 43. Phương pháp sử dụng hỗn hợp ACN và H₂O với tỷ lệ 1:1 làm dung môi pha mẫu giống với chuyên luận nguyên liệu mebendazol trong USP 43 [8], thay vì sử dụng một dung môi khác là dimethylformamid như trong EP 11.0 [3] vì ACN là dung môi sẵn có trong các phòng thí nghiệm. Phương pháp sử dụng cột C18, (250 × 4,6 mm, 5 μm) để phù hợp với điều kiện có sẵn tại nhiều phòng thí nghiệm thay vì cột C18, (100 × 4,6 mm, 3 μm) sử dụng trong EP 10.0 [8]. Cả 2 dược điển là EP 11.0 và USP 43 [3, 8] đều sử dụng hệ pha động gồm ACN và dung dịch amoni acetat 7,5%, nghiên cứu tiến hành điều chỉnh chương trình gradient (bảng 2) để phù hợp với mục đích tách hoàn toàn tạp A mebendazole khỏi các tạp chất liên quan.

Tiếp tục khảo sát nồng độ dung dịch thử ở 3 mức 500, 800, 1000 ppm, pic chính trên sắc ký đồ của dung dịch 800 và 1000 ppm quá lớn đỉnh pic bị tù do hiện tượng cột bị quá tải, gây khó khăn cho việc rửa cột. Ở nồng độ dung dịch thử 500 ppm với thể tích tiêm 20 μL thì pic tạp A có tín hiệu vừa đủ để phát hiện các tạp chất liên quan. Bên cạnh đó, kỹ thuật pha loãng dung dịch thử được khảo sát cho thấy độ tinh khiết sắc ký của tạp A không có nhiều

khác biệt (lần lượt là 100%, 100 % và 99,96 % tương ứng với nồng độ dung dịch thử 500, 800 và 1000 ppm) khi so sánh với diện tích pic tạp A mebendazol trong dung dịch đối chiếu (1) 5ppm. Vì vậy, dung dịch thử 500 ppm được lựa chọn và pha loãng thành dung dịch đối chiếu (1) 5 ppm. Đây là kết quả công bố lần đầu tiên về phương pháp xác định tạp liên quan của nguyên liệu chất chuẩn tạp A mebendazol.

Kết luận

Đã xây dựng được bộ dữ liệu nhận dạng tạp A mebendazol bằng phổ HR-MS, 1D-NMR, IR, UV và phương pháp xác định độ tinh khiết sắc ký HPLC/DAD tạp A mebendazol bằng kỹ thuật pha loãng dung dịch thử 500 ppm. Phương pháp đã xây dựng được thẩm định có độ đặc hiệu cao, khoảng tuyến tính từ nồng độ 0,1 đến 10 ppm, độ lặp lại tốt với RSD%=0,01 % < 2 % cho độ tinh khiết sắc ký của tạp A là 99,9 %.

Cần tiếp tục nghiên cứu thiết lập chuẩn tạp A mebendazol, đóng ống và nghiên cứu độ ổn định để có thể đưa sản phẩm của nghiên cứu sử dụng trong thực tiễn kiểm nghiệm.

Lời cảm ơn

Chúng tôi xin trân trọng cảm ơn Trường Đại học Dược Hà Nội đã cấp kinh phí cho đề tài cấp trường (theo quyết định số 1077/QĐ-DHN ngày 31 tháng 12 năm 2021) để thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Y tế (2012), *Dược lý học 2*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội, tr. 213.
2. Bộ Y tế (2017), *Dược điển Việt Nam V*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội
3. Council of Europe (2019), *European pharmacopoeia 10.0*, European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare of the Council of Europe (EDQM), France. pp 3180-3181
4. Devi, T., Krishnan, R., Kunju, A. (2005), "Synthesis and characterization of 2-amino-5-benzoylbenzimidazole complexes of manganese(II) and cobalt(II)", *Asian Journal of Chemistry*. 17, pp. 668-672.
5. H. E. Master, J. R. Kamath (1995), "Preparation of newer fused benzimidazoles", *Journal of Indian Chemical Society*. 72, pp. 645-646.
6. Liu, Jiaqi; Morgan, Sarah; Hoover, Jessica (2019), "Cobalt-catalyzed aerobic oxidative cyclization of 2-aminoanilines with isonitriles: Facile access to 2-aminobenzimidazoles", *ChemCatChem*. 12.
7. The British Pharmacopoeia Commission (2020), *British Pharmacopoeia, Vol. II, The Stationery Office, London (England)*, pp. 207-208.
8. The United States Pharmacopoeial Convention (2020), *The United States Pharmacopoeia 43*, The USA.