

# Tổng hợp và tiêu chuẩn hóa tạp chất liên quan aceclofenac ethyl ester và aceclofenac benzyl ester của dược chất aceclofenac

Triệu Quốc Vương, Nguyễn Trần Ngọc Vi, Nguyễn Hữu Lạc Thủy, Trương Ngọc Tuyền\*

Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh, 41 Đinh Tiên Hoàng, phường Bến Nghé, Quận 1, TP Hồ Chí Minh, Việt Nam

Ngày nhận bài 21/6/2023; ngày chuyển phản biện 23/6/2023; ngày nhận phản biện 17/7/2023; ngày chấp nhận đăng 19/7/2023

## **Tóm tắt:**

Aceclofenac là thuốc kháng viêm, giảm đau không steroid (NSAID). Nghiên cứu tổng hợp aceclofenac ethyl ester (tạp E) và aceclofenac benzyl ester (tạp F) của dược chất aceclofenac ở quy mô phòng thí nghiệm, xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao, hướng đến việc thiết lập chất đối chiếu tạp E và tạp F. Quy trình tổng hợp tạp E và tạp F bằng phản ứng ester hóa aceclofenac và diclofenac sodium trong dimethyl formamide (DMF) được tối ưu hóa với hiệu suất tương ứng là 96 và 66%. Quy trình định lượng được thẩm định theo hướng dẫn của Hội nghị Quốc tế về Hải hòa hóa các Thủ tục đăng ký Dược phẩm sử dụng cho người (ICH). Quy trình xác định độ tinh khiết tạp E và tạp F đạt tính phù hợp hệ thống, với RSD % của các thông số sắc ký đều nhỏ hơn 2,0% và hệ số bất đối của pic tạp E và tạp F nằm trong khoảng 0,8-1,5. Về tính tuyến tính, giá trị R đối với cả hai tạp đều trong khoảng 0,9995-1,0000. Độ chính xác của tạp E và tạp F có RSD % tương ứng là 0,04 và 0,001%. Tỷ lệ phục hồi đạt quy định 98,0-102,0%. Nghiên cứu xây dựng các chỉ tiêu đánh giá tạp E và tạp F tổng hợp. Kết quả tạp E và F đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu với độ tinh khiết sắc ký được xác định lần lượt là 99,94 và 99,90% tính trên chế phẩm nguyên trạng.

**Từ khóa:** aceclofenac, aceclofenac benzyl ester, aceclofenac ethyl ester, sắc ký lỏng hiệu năng cao.

**Chỉ số phân loại:** 3.4

## Synthesis and standardisation of aceclofenac ethyl ester and aceclofenac benzyl ester as related aceclofenac impurity

Quoc Vuong Trieu, Tran Ngoc Vi Nguyen, Huu Lac Thuy Nguyen, Ngoc Tuyen Truong\*

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City, 41 Dinh Tien Hoang Street, Ben Nghe Ward, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 21 June 2023; revised 17 July 2023; accepted 19 July 2023

## **Abstract:**

Aceclofenac is a non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID). This study aimed to synthesise aceclofenac ethyl ester (E impurity) and aceclofenac benzyl ester (F impurity) of the drug aceclofenac at a laboratory scale and establish impurity criteria using high-performance liquid chromatography (HPLC) to create reference substances for E and F impurities. They were synthesised through the esterification of aceclofenac and diclofenac sodium in dimethyl formamide (DMF), optimised with yields of 96 and 66%, respectively. The HPLC method was validated in accordance with the International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) guidelines. The process of determining the purity of impurities E and F was found to be system-suitable, with RSD % of all chromatographic parameters being less than 2.0% and the asymmetry factors of E and F impurities in the range of 0.8-1.5. In terms of linearity, the R values for both impurities were in the range of 0.9995-1.0000. The intermediate precision relative standard deviation (RSD) values for E and F impurities were 0.04 and 0.001%, respectively. The recovery rate met the requirements of 98.0-102.0%. The research has developed criteria for evaluating synthetic E and F impurities. The synthesised products met the requirements for established as reference substances, with chromatographic purity determined to be 99.94 and 99.90%, respectively, in their purity forms.

**Keywords:** aceclofenac, aceclofenac benzyl ester, aceclofenac ethyl ester, high-performance liquid chromatography.

**Classification number:** 3.4

\*Tác giả liên hệ: Email: [truongtuyen@ump.edu.vn](mailto:truongtuyen@ump.edu.vn)

## 1. Đặt vấn đề

Kiểm soát chất lượng cũng như độ an toàn của thuốc là vấn đề được quan tâm trong sử dụng thuốc. Aceclofenac ethyl ester (tạp E) và aceclofenac benzyl ester (tạp F) là tạp chất liên quan của aceclofenac, có nguồn gốc từ quá trình tổng hợp aceclofenac. Theo Hệ thống Hòa toàn cầu về phân loại và ghi nhãn hóa chất (GHS), tạp E được ghi nhãn GHS06 và có những độc tính sau: độc nếu nuốt phải, gây kích ứng mắt nghiêm trọng và rất độc cho động vật thủy sinh với tác dụng lâu dài [1, 2], tạp F được ghi nhãn GHS07 và có những độc tính sau: độc nếu nuốt phải hay nghi ngờ ảnh hưởng khả năng sinh sản hoặc vô sinh và gây kích ứng mắt [1, 3]. Do đó, trong chuyên luận của aceclofenac của Dược điển châu Âu 9 (EP 9), cũng như Dược điển Anh 2019 (BP 2019) đều quy định về tạp chất liên quan bắt buộc phải được kiểm soát bao gồm tạp E và tạp F và quy định 2 tạp này trong nguyên liệu phải <0,2% [4, 5].

Hiện nay, tạp chuẩn E và F được thương mại hóa với giá khá cao, như ở Biosynth tạp E có giá 427,68 USD/100 mg và tạp F có giá 520 USD/100 mg với độ tinh khiết tối thiểu 95% [6], gây khó khăn cho công tác kiểm nghiệm những tạp chất này. Cho đến nay, ở Việt Nam, chỉ mới có 1 công trình nghiên cứu tổng hợp tạp A của diclofenac (cũng chính là tạp I của aceclofenac), còn các tạp khác (từ tạp A đến H) thì chưa nghiên cứu [7].

Với nhu cầu thực tế trên, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu tổng hợp tạp chất liên quan E và F của aceclofenac ở quy mô phòng thí nghiệm, đồng thời tiến hành xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết của tạp E và tạp F bằng kỹ thuật sắc ký lỏng hiệu năng cao nhằm hướng đến việc thiết lập chất đối chiếu tạp E và tạp F góp phần bổ sung vào ngân hàng chất chuẩn quốc gia phục vụ cho công tác kiểm nghiệm.

## 2. Nguyên liệu và thiết bị

### 2.1. Nguyên liệu

Aceclofenac của Công ty Aarti Drugs, số lô: ACF/19020004, hàm lượng: 99,83%, hạn dùng 1/2024.

Diclofenac sodium của Công ty Henan Dongtai Pharm, số lô: 301190404-5, hàm lượng: 100,3%, hạn dùng 4/2023.

Hóa chất và dung môi: *N,N*-dimethylformamide (DMF) (Fisher, Đức), diethyl sulfate (Acros, Bỉ), potassium carbonate (Merck, Đức), benzyl 2-bromoacetate (AKSci, Mỹ), diethyl ether, sodium sulfate và ethyl acetate (Xilong, Trung Quốc), acetone, dichloromethane, chloroform và methanol (Chemsol, Việt Nam) đạt tiêu chuẩn phân tích. Các hóa chất được sử dụng ngay mà không cần tinh chế thêm. Acetonitrile đạt tiêu chuẩn dùng sắc ký lỏng (Fisher, Đức). Bùn mỏng silica gel F<sub>254</sub> (Merck, Đức).

### 2.2. Thiết bị

Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Waters Alliance e2695, đầu dò PDA. Máy quang phổ Shimadzu IR Affinity-1S. Máy LC-MS Agilent 1200 nguồn ESI. Máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Advance II. Máy quét nhiệt vi sai DSC TA Instrument Q10 dùng phần mềm Universal V4.7A TA Instruments. Máy quang phổ UV-Vis Shimadzu UV-2550. Máy cô quay chân không Buchi R210S. Tủ sấy chân không Jeiotech OV-12 và một số thiết bị, dụng cụ thông thường trong phòng thí nghiệm.

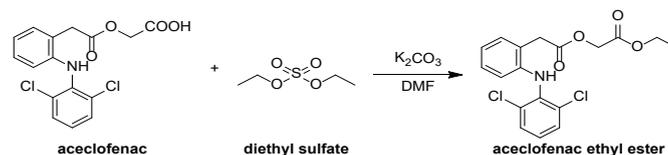
## 3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

### 3.1. Đối tượng

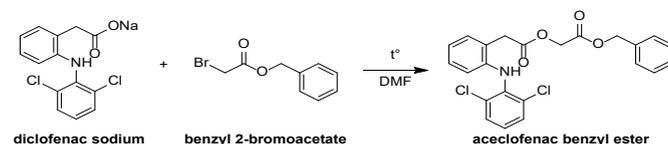
Aceclofenac ethyl ester (tạp E) và aceclofenac benzyl ester (tạp F của aceclofenac).

### 3.2. Phương pháp nghiên cứu

**Tổng hợp tạp E và tạp F:** Tạp E và tạp F có thể được tổng hợp bằng phản ứng ester hóa aceclofenac và diclofenac sodium trong DMF [8] như sơ đồ 1 và 2.



Sơ đồ 1. Phản ứng ester hóa aceclofenac tạo aceclofenac ethyl ester.



Sơ đồ 2. Phản ứng ester hóa diclofenac sodium tạo aceclofenac benzyl ester.

Quy trình tổng hợp tạp E: cho aceclofenac (0,5 g; 1,41 mmol), 8 ml DMF, potassium carbonate (0,22 g; 1,58 mmol) và diethyl sulfate (0,28 ml; 2,12 mmol) vào bình cầu, khuấy đều hỗn hợp ở nhiệt độ phòng. Kiểm tra phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi khai triển *n*-hexane-ethyl acetate (8:2), phát hiện bằng đèn UV 254 nm. Thời gian phản ứng 60 phút. Hỗn hợp sau phản ứng được làm lạnh, lọc dưới áp suất giảm. Thêm nước từ từ và khuấy nhẹ cho đến khi hỗn hợp kết tinh. Để yên hỗn hợp đến khi kết tủa hoàn toàn, lọc dưới áp suất giảm. Rửa kết tủa bằng nước cất, thu được tạp E dự kiến. Sấy đến khối lượng không đổi.

Quy trình tổng hợp tạp F: Cho diclofenac sodium (0,50 g; 1,57 mmol), 6 ml DMF và benzyl 2-bromoacetate (0,28 ml; 1,70 mmol) vào bình cầu, khuấy đều hỗn hợp ở nhiệt độ 50°C. Kiểm tra phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi khai triển *n*-hexane-dichloromethane-acetone (8:1:1), phát hiện bằng đèn UV 254 nm. Thời gian phản ứng 180 phút. Hỗn hợp sau phản ứng được để nguội đến nhiệt độ phòng, thêm vào hỗn hợp 40 ml diethyl ether, khuấy đều. Gạn lấy dịch ether, lắc dịch ether với nước (3 lần x 20 ml). Làm khan dịch ether bằng sodium sulfate. Cô quay loại ether, thêm 30 ml methanol, cô đến khi dịch còn một nửa. Làm lạnh dịch cô quay, để yên đến khi sản phẩm kết tinh hoàn toàn. Lọc dưới áp suất giảm, rửa sản phẩm bằng methanol lạnh. Thu được tạp F dự kiến. Sấy đến khối lượng không đổi.

**Tinh chế sản phẩm tổng hợp:** Sản phẩm tổng hợp được tinh chế bằng phương pháp thay đổi dung môi.

**Thử tinh khiết sản phẩm tinh chế:** Sản phẩm tinh chế được thử tinh khiết bằng phương pháp nhiệt vi sai (DSC) và sắc ký lớp mỏng, sử dụng bản mỏng silica gel F<sub>254</sub> với 3 hệ dung môi có độ phân cực khác nhau.

**Tạp E:** *n*-hexane-dichloromethane-acetic acid (6:4:0,2), *n*-hexane-ethyl acetate (8:2), petroleum ether-ethyl acetate (4:1).

Tạp F: *n*-hexane-diethyl ether (9:1), *n*-hexane-dichloromethane-acetone (8:1:1), *n*-hexane-chloroform-acetic acid (4:6:0,15).

**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 E và tạp F được xác định độ tinh khiết bằng phương pháp HPLC quy về 100% diện tích pic.

**Điều kiện sắc ký:** cột Eurospher II C18 (250x4,6 mm, 5 μm), dung môi hòa tan và pha động là hỗn hợp acetonitrile-nước, nhiệt độ cột 40°C, tốc độ dòng 1,0 ml/phút và thể tích tiêm mẫu 10 μl [4, 9, 10].

**4. Kết quả và bàn luận**

**4.1. Tổng hợp và tinh chế aceclofenac ethyl ester**

Phản ứng tổng hợp tạp E là phản ứng ester hóa aceclofenac với diethyl sulfate trong DMF. Nghiên cứu đã khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng như tỷ lệ mol giữa aceclofenac và diethyl sulfate (từ tỷ lệ 1:1 đến 1:2); nhiệt độ (từ 30 đến 50°C) và thời gian phản ứng (từ 30-180 phút). Các yếu tố này đều ảnh hưởng đến hiệu suất sản phẩm phản ứng, sản phẩm phụ và độ tinh khiết sản phẩm. Với tỷ lệ 1:1 phản ứng xảy ra chậm và không hoàn toàn, khi tăng đến tỷ lệ 1:1,5 thì cho hiệu suất cao nhất (quan sát đậm độ của vết được cho là sản phẩm trên bản sắc ký lớp mỏng), tiếp tục tăng tỷ lệ thì bắt đầu xuất hiện các vết khác ngoài vết sản phẩm, càng tăng tỷ lệ thì các vết khác càng nhiều trong khi vết được cho là sản phẩm không đậm thêm và việc tinh chế khó khăn do không loại được hết các vết khác. Do vậy, chọn tỷ lệ mol là 1:1,5. Tiếp tục khảo sát yếu tố nhiệt độ, ở 30°C trên bản sắc ký lớp mỏng chỉ cho một vết là sản phẩm, nếu tiếp tục tăng nhiệt độ lên đến 40, 50°C thì xuất hiện thêm các vết khác, nên chọn 30°C cho phản ứng. Tiếp tục khảo sát thời gian phản ứng, ở thời điểm 30 phút phản ứng đã xảy ra nhưng vết nguyên liệu vẫn còn, tiếp tục tăng đến 60 phút phản ứng không còn vết nguyên liệu trên sắc ký lớp mỏng, nếu tiếp tục thực hiện phản ứng thì các vết tạp bắt đầu xuất hiện, do đó chọn 60 phút làm điều kiện phản ứng. Các tạp thường xuất hiện có thể alkyl hóa nhóm amin (vết này có Rf cao hơn vết sản phẩm khi tăng tỷ lệ mol, nhiệt độ và thời gian phản ứng) và tạp thủy phân nguyên liệu đầu (vết có Rf thấp hơn vết sản phẩm và nguyên liệu khi tăng nhiệt độ và thời gian phản ứng kéo dài). Nghiên cứu chỉ tập trung vào cải thiện hiệu suất nên không xác định cấu trúc của các vết khác. Điều kiện tối ưu cho phản ứng tổng hợp tạp E là tỷ lệ mol aceclofenac: diethyl sulfate là 1:1,5; nhiệt độ phản ứng là 30°C và thời gian phản ứng là 60 phút với hiệu suất 96%.

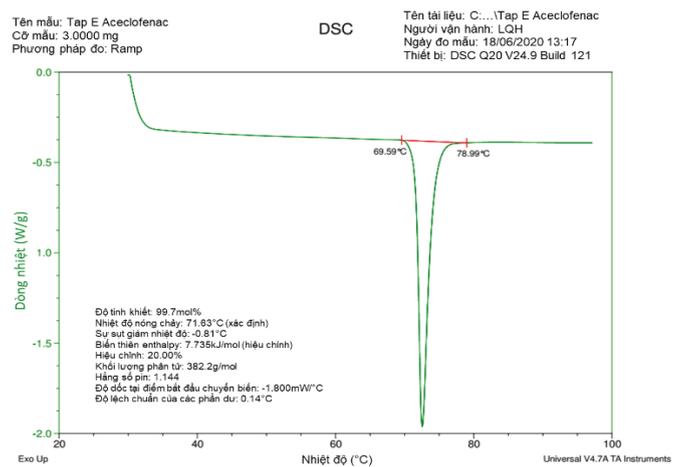
**4.2. Tổng hợp và tinh chế aceclofenac benzyl ester**

Tương tự như phản ứng tổng hợp tạp E, đây là phản ứng ester hóa nên tỷ lệ mol, nhiệt độ và thời gian phản ứng cũng ảnh hưởng đến hiệu suất và độ tinh khiết sản phẩm, do đó khảo sát các yếu tố ảnh hưởng như tỷ lệ mol giữa diclofenac sodium và benzyl 2-bromoacetate (tỷ lệ 1:1 đến 1:2,6); nhiệt độ phản ứng (30-70°C) và thời gian (từ 60-210 phút). Dựa vào đậm độ của vết được cho

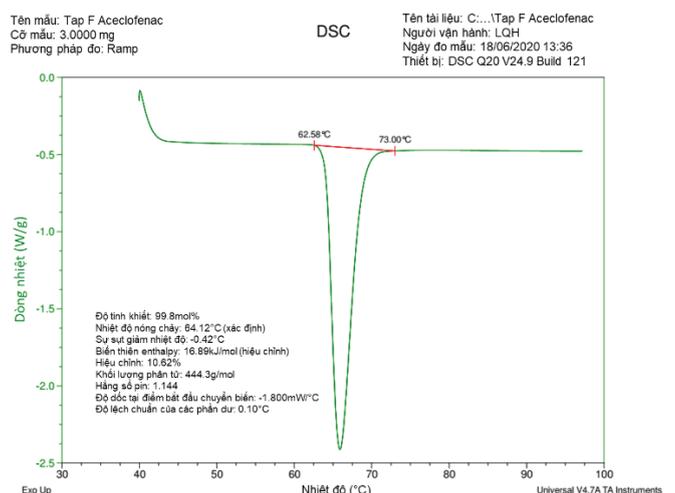
là sản phẩm cũng như sự xuất hiện các vết khác trên bản sắc ký lớp mỏng để xác định điều kiện tối ưu cho phản ứng và tinh chế. Điều kiện thích hợp cho phản ứng tổng hợp tạp F là tỷ lệ mol giữa diclofenac sodium và benzyl 2-bromoacetate là 1:2,2; ở nhiệt độ 50°C với thời gian 180 phút có hiệu suất là 66%.

**4.3. Thử tinh khiết aceclofenac ethyl ester và aceclofenac benzyl ester tinh chế**

Hòa tan tạp E và tạp F tinh chế trong methanol, triển khai sắc ký lớp mỏng với 3 hệ dung môi khác nhau. Tạp E và tạp F tinh chế chỉ cho một vết duy nhất trên bản mỏng. Thử tinh khiết bằng phương pháp DSC, nhiệt độ nóng chảy của tạp E là 71,6°C, độ tinh khiết 99,7% và tạp F là 64,1°C với độ tinh khiết 99,8% (hình 1, 2).



Hình 1. Kết quả xác định nhiệt nóng chảy bằng DSC của aceclofenac ethyl ester.

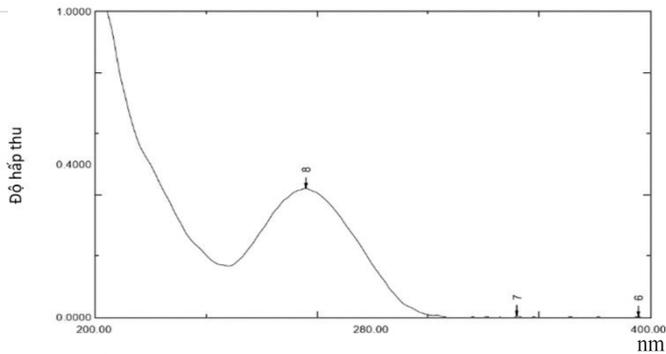


Hình 2. Kết quả xác định nhiệt nóng chảy bằng DSC của aceclofenac benzyl ester.

**4.4. Xác định cấu trúc aceclofenac ethyl ester**

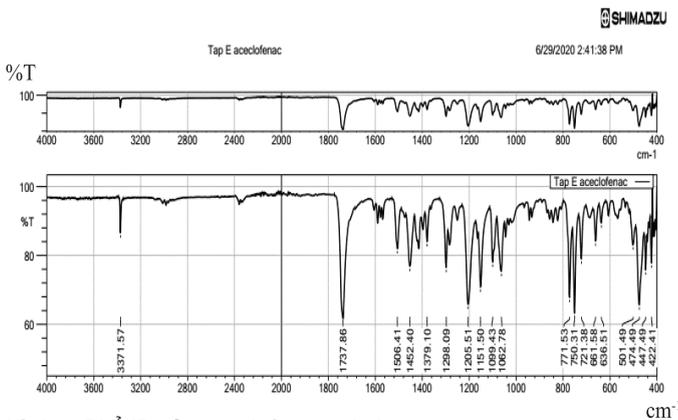
Phổ UV-Vis tạp E (pha trong acetonitrile, nồng độ 10 ppm) cho bước sóng hấp thụ cực đại tại 276±2 nm (hình 3).

Dữ liệu: Tap E ACN 10 ppm\_070452.spc – Dữ liệu thô



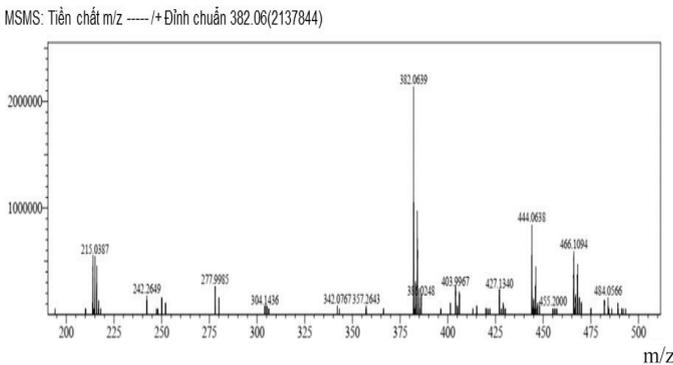
Hình 3. Phổ UV-Vis của aceclofenac ethyl ester.

Phổ IR tap E có một số đỉnh đặc trưng: 3371,6 (N-H), 1737,9 (C=O ester), 1506,4; 1452,4 (C=C nhân thơm), 1298,1 (C-O acid), 1205,5; 1062,8 (C-O ester), 750,3 (C-Cl) (hình 4).



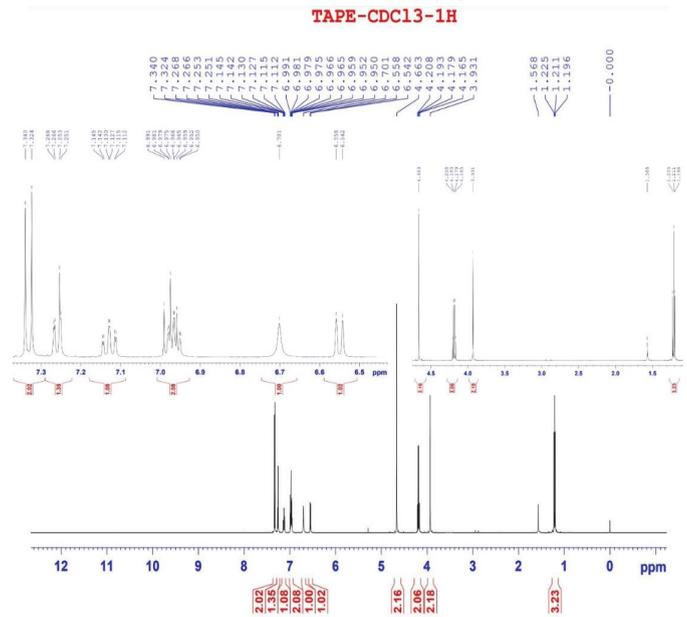
Hình 4. Phổ IR của aceclofenac ethyl ester.

Phổ khối (ESI,  $m/z$ )  $[M + H]^+$  tính toán 382,0613;  $[M + H]^+$  tìm thấy 382,0639 (hình 5).



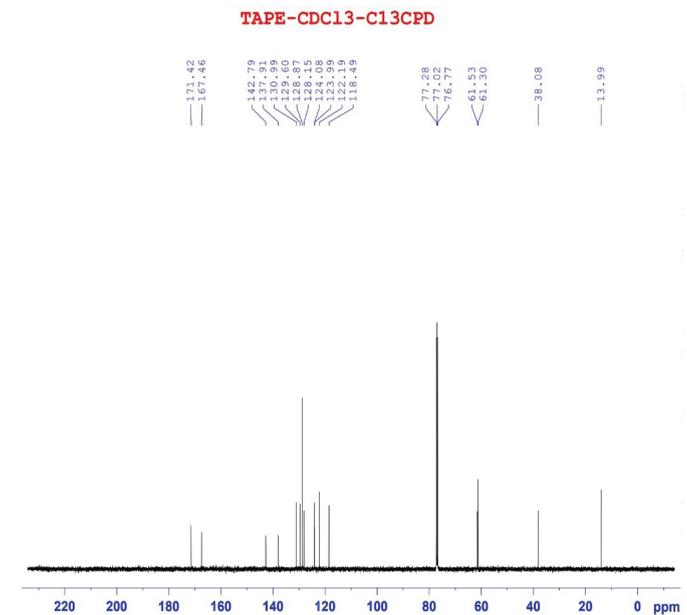
Hình 5. Phổ MS của aceclofenac ethyl ester.

Phổ  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm): 7,33 (d, 2H,  $J=8,0$  Hz,  $H_{13}, H_{15}$ ); 7,26 (dd, 1H,  $J=1$  Hz; 7,5 Hz,  $H_{10}$ ); 7,13 (td, 1H,  $J=1,5$  Hz; 7,5 Hz,  $H_8$ ); 6,98 (t, 1H,  $J=8$  Hz,  $H_{14}$ ); 6,97 (td, 1H,  $J=1$  Hz; 7,25 Hz,  $H_9$ ); 6,70 (s, 1H, -NH-); 6,55 (d, 1H,  $J=8$  Hz,  $H_7$ ); 4,66 (s, 2H,  $H_2$ ); 4,19 (q, 2H,  $J=7,5$  Hz,  $H_{17}$ ); 3,93 (s, 2H,  $H_4$ ); 1,21 (t, 3H,  $J=7,0$  Hz,  $H_{18}$ ) (hình 6).



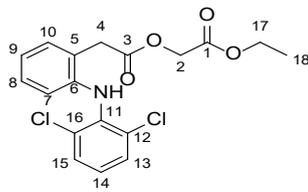
Hình 6. Phổ  $^1H$  NMR của aceclofenac ethyl ester.

Phổ  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ ,  $\delta$  ppm): 171,4; 167,5; 142,8; 137,9; 130,99; 129,6; 128,9; 128,2; 124,1; 124,0; 122,2; 118,5; 61,5; 61,3; 38,1; 13,99 (hình 7).



Hình 7. Phổ  $^{13}C$  NMR của aceclofenac ethyl ester.

Các kết quả phổ nghiệm như MS tăng số khối phù hợp với phần thêm vào,  $^1H$  NMR xuất hiện thêm 2 đỉnh của nhóm ethyl ( $-CH_2$  ( $H_{17}$ ) ở 4,19 ppm có đỉnh bốn và  $-CH_3$  ( $H_{18}$ ) ở 1,21 ppm có đỉnh ba) và H của nhóm acid trong aceclofenac không còn trên phổ này.  $^{13}C$  NMR xuất hiện thêm 2 đỉnh của nhóm ethyl ở 13,99 và 61,5 ppm, đồng thời đối chiếu với nghiên cứu tương tự trước đây cho thấy, sản phẩm phù hợp với cấu trúc của ethyl [[2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetyl]oxy]acetate (tạp E của aceclofenac) [7]. Chứng tỏ sản phẩm chính là tạp E của aceclofenac (hình 8).

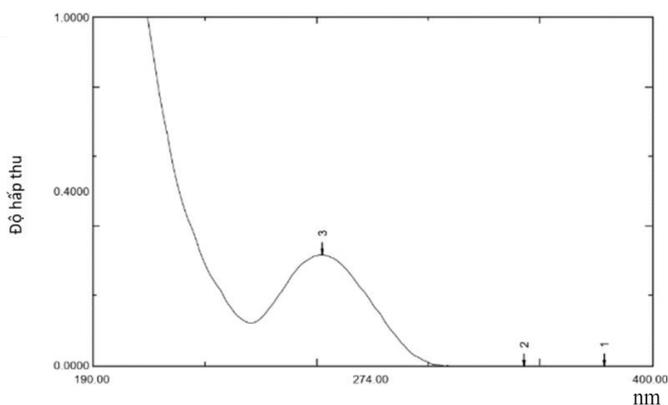


Hình 8. Công thức cấu tạo của aceclofenac ethyl ester.

#### 4.5. Xác định cấu trúc aceclofenac benzyl ester

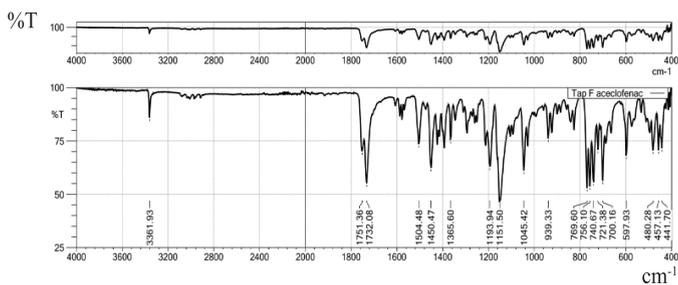
Phổ UV-Vis tập F (pha trong acetonitrile, nồng độ 10 ppm) cho bước sóng hấp thụ cực đại tại 276±2 nm (hình 9).

Dữ liệu: Tap F ACN 10 ppm.spc – Dữ liệu thô



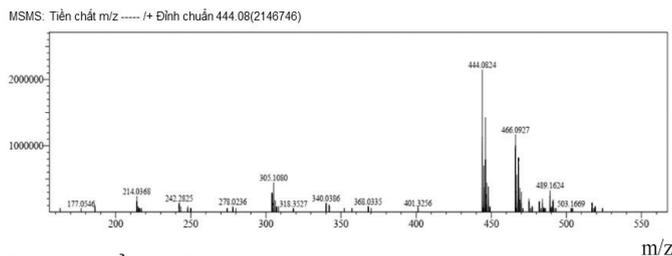
Hình 9. Phổ UV-Vis của aceclofenac benzyl ester.

Phổ IR tập F có một số đỉnh đặc trưng: 3361,9 (N-H), 1732,1 (C=O ester), 1504,5; 1450,5 (C=C nhân thơm), 1365,6 (C-O acid), 1193,9; 1151,5 (C-O ester), 756,1 (C-Cl) (hình 10).



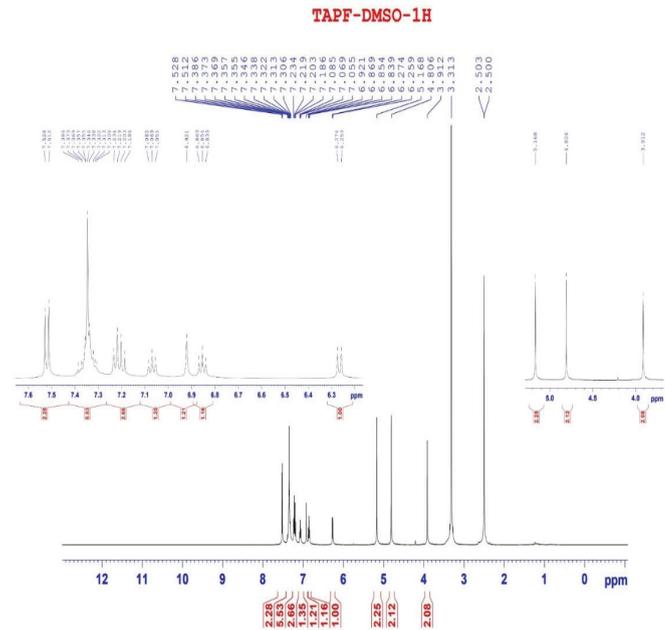
Hình 10. Phổ IR của aceclofenac benzyl ester.

Phổ khối (ESI,  $m/z$ )  $[M + H]^+$  tính toán 444,0769;  $[M + H]^+$  tìm thấy 444,0824 (hình 11).



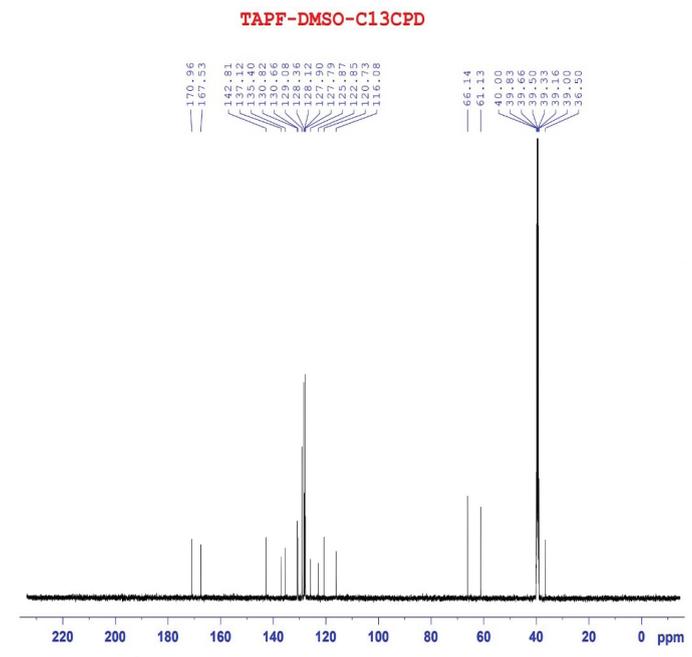
Hình 11. Phổ MS của aceclofenac benzyl ester.

Phổ  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 7,52 (d, 2H,  $J=8$  Hz,  $\text{H}_{13}$ ,  $\text{H}_{15}$ ); 7,30-7,39 (m, 5H;  $\text{H}_{19}$ ,  $\text{H}_{20}$ ,  $\text{H}_{21}$ ,  $\text{H}_{22}$ ,  $\text{H}_{23}$ ); 7,23 (d, 1H,  $J=7,5$  Hz,  $\text{H}_{10}$ ); 7,22 (t, 1H,  $J=8$  Hz,  $\text{H}_8$ ); 7,09 (t, 1H,  $J=8$  Hz,  $\text{H}_{14}$ ); 6,92 (s, 1H, -NH-); 6,85 (t, 1H,  $J=7,5$  Hz,  $\text{H}_9$ ); 6,27 (d, 1H,  $J=7,5$  Hz,  $\text{H}_7$ ); 5,17 (s, 2H,  $\text{H}_{17}$ ); 4,81 (s, 2H,  $\text{H}_2$ ); 3,91 (s, 2H,  $\text{H}_4$ ) (hình 12).



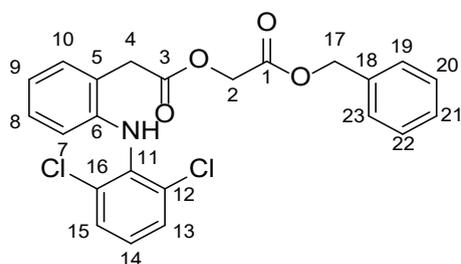
Hình 12. Phổ  $^1\text{H}$  NMR của aceclofenac benzyl ester.

Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ,  $\delta$  ppm): 171,0; 167,5; 142,8; 137,1; 135,4; 130,8; 130,7; 129,1; 128,3; 128,1; 127,9; 127,8; 125,9; 122,9; 120,7; 116,1; 66,1; 61,1; 36,5 (hình 13).



Hình 13. Phổ  $^{13}\text{C}$  NMR của aceclofenac benzyl ester.

Các kết quả phổ nghiệm như MS tăng số khối phù hợp với phần thêm vào, <sup>1</sup>H NMR xuất hiện thêm 1 đỉnh đơn của nhóm methylen (-CH<sub>2</sub> (H<sub>17</sub>) ở 5,17 ppm) và 5H ở vùng chuyển dịch của nhân thơm (7,30-7,39 ppm). <sup>13</sup>C NMR xuất hiện thêm 1 đỉnh của nhóm methylen ở 66,1 ppm so với aceclofenac, đồng thời đối chiếu với nghiên cứu tương tự trước đây cho thấy, sản phẩm phù hợp với cấu trúc của benzyl [[[2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetyl]oxy]acetate (tạp F của aceclofenac) [7]. Chứng tỏ sản phẩm chính là tạp F của aceclofenac (hình 14).



Hình 14. Công thức cấu tạo của aceclofenac benzyl ester.

#### 4.6. Xác định độ tinh khiết aceclofenac ethyl ester và aceclofenac benzyl ester bằng HPLC-PDA

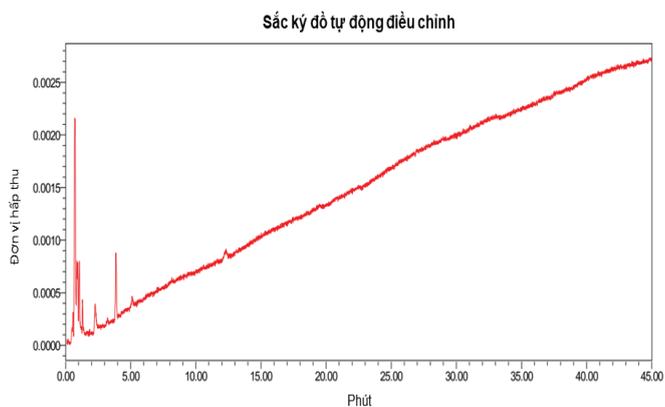
Xác định độ tinh khiết tạp E và tạp F bằng HPLC-PDA, bao gồm khảo sát tính phù hợp của hệ thống, tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng.

**Tính phù hợp hệ thống:** RSD % của các thông số sắc ký đều nhỏ hơn 2,0% và hệ số bất đối của pic tạp E và tạp F nằm trong khoảng 0,8-1,5. Như vậy, quy trình xác định độ tinh khiết tạp E và tạp F đạt tính phù hợp hệ thống (bảng 1).

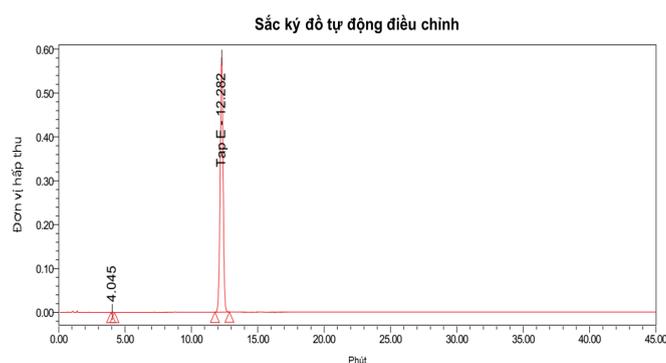
**Bảng 1. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của phương pháp (n=6).**

	Giá trị thống kê	Thời gian lưu (phút)	Diện tích pic (μV x giây)	Hệ số bất đối	Số đĩa lý thuyết biểu kiến
Tạp E	Trung bình	12,295	8896554	1,0	15041
	RSD (%)	0,13	0,60	0,00	0,44
Tạp F	Trung bình	8,592	17338003	1,1	13640
	RSD (%)	0,05	1,18	0,00	0,30

**Tính đặc hiệu:** Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy sắc ký đồ (SKĐ) mẫu trắng và dung môi pha mẫu không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với pic tạp E và tạp F trong mẫu thử. Trên SKĐ mẫu thử, pic tạp E và tạp F tách hoàn toàn các pic tạp khác và các pic từ mẫu trắng và dung môi pha mẫu; pic tạp E và tạp F đạt độ tinh khiết theo phổ UV-Vis. Như vậy, quy trình đạt yêu cầu về độ đặc hiệu (hình 15-22).

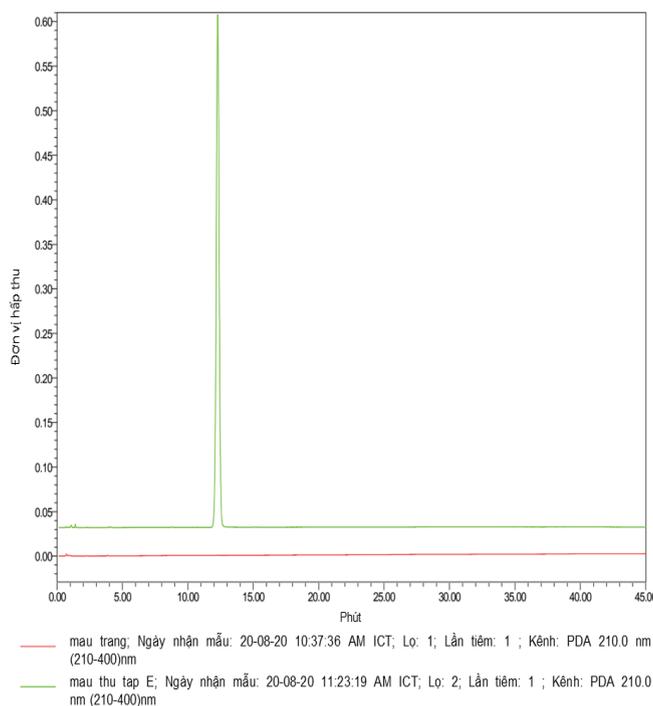


Hình 15. Sắc ký đồ dung môi pha mẫu và pha động aceclofenac ethyl ester.

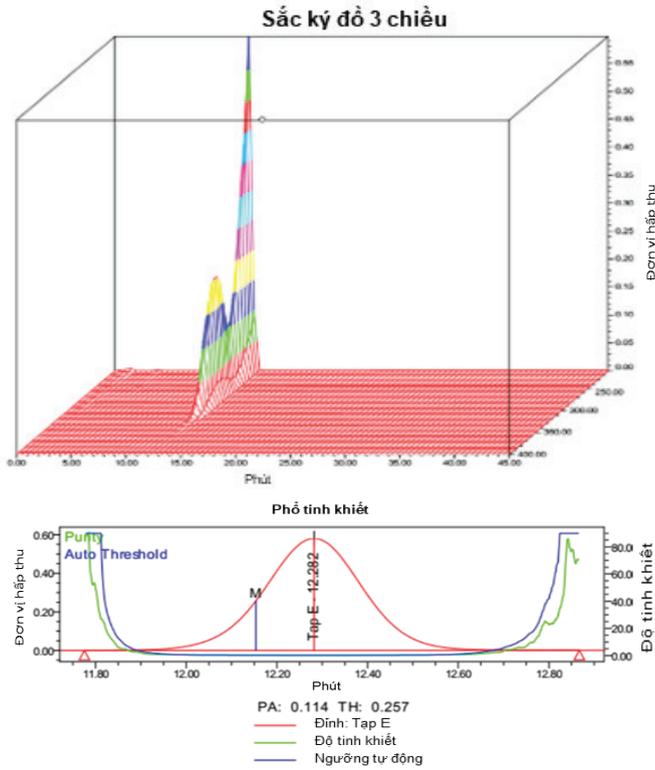


Kết quả											
Tên mẫu	Thời gian lưu	Góc tinh khiết	Ngưỡng tinh khiết	Diện tích	% Diện tích	Chiều cao	Yếu tố duy trì	Độ chọn lọc	Độ phân giải	Yếu tố kéo đuôi USP	Số đĩa lý thuyết
1	4.045	13.912	20.027	5333	0.06	1089	1.5			1.1	16168
2	Tạp E	12.282	0.114	0.257	8901819	99.94	580260	6.7	4.4	31.4	14969

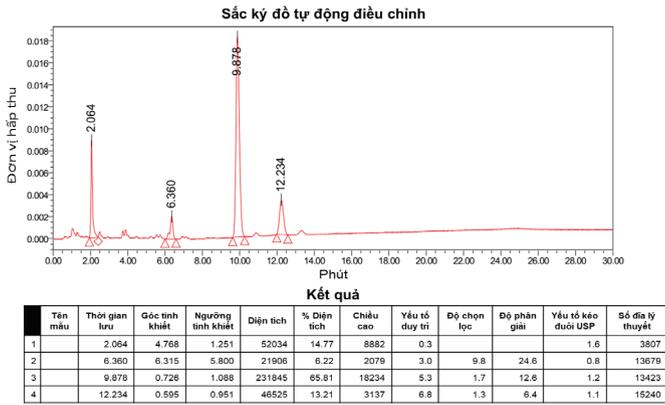
Hình 16. Sắc ký đồ mẫu thử aceclofenac ethyl ester.



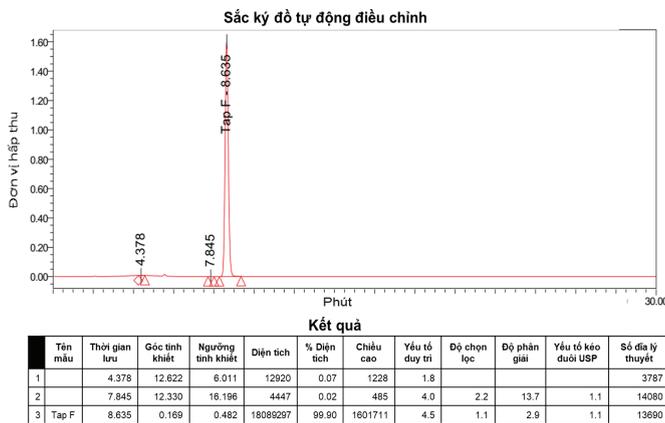
Hình 17. Sắc ký đồ mẫu trắng và mẫu thử aceclofenac ethyl ester.



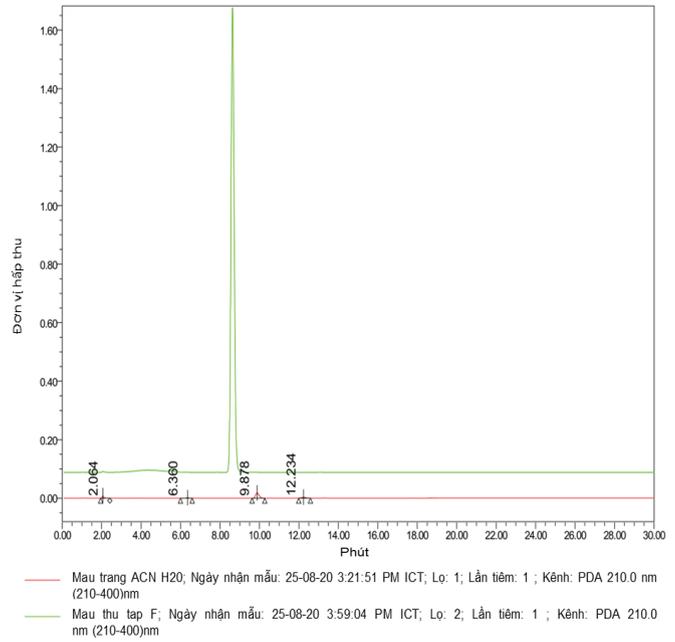
Hình 18. Sắc ký đồ 3 chiều và độ tinh khiết pic aceclofenac ethyl ester.



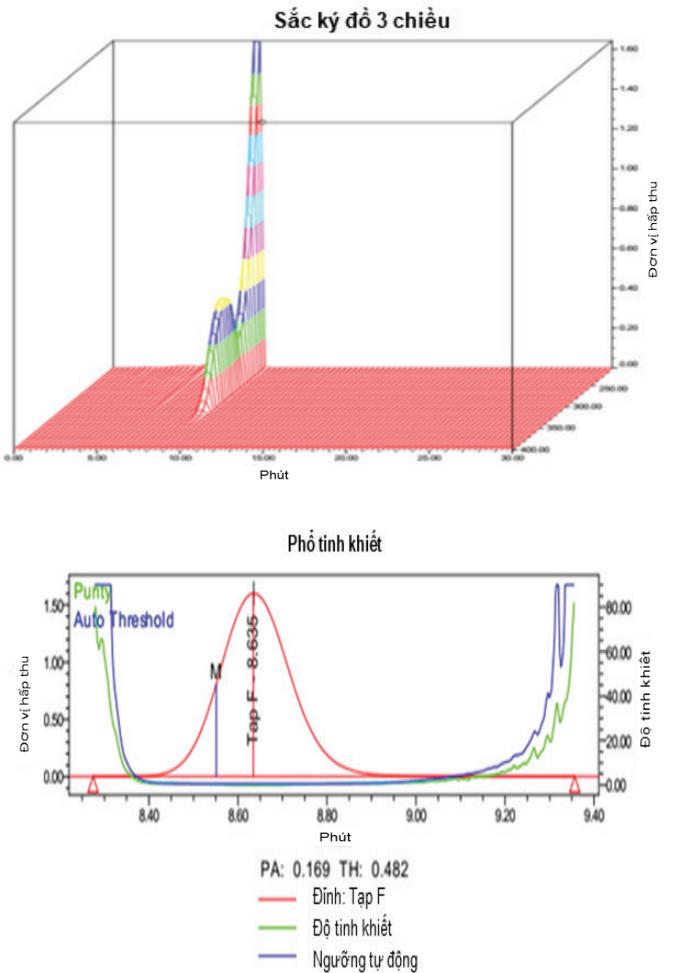
Hình 19. Sắc ký đồ dung môi pha mẫu aceclofenac benzyl ester.



Hình 20. Sắc ký đồ mẫu thử aceclofenac benzyl ester.



Hình 21. Sắc ký đồ mẫu trắng và mẫu thử aceclofenac benzyl ester.



Hình 22. Sắc ký đồ 3 chiều và độ tinh khiết pic aceclofenac benzyl ester.

**Tính tuyến tính và khoảng giá trị:** Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của tạp E và tạp F cho thấy giá trị R nằm trong khoảng 0,9995-1,0000. Như vậy, có sự tương quan tuyến tính giữa nồng độ tạp E và tạp F với diện tích pic.

**Độ chính xác:** Đạt độ chính xác RSD %=0,04% (tạp E) và RSD=0,001% (tạp F) với n=12.

**Độ đúng:** Đạt độ đúng với tỷ lệ phục hồi lần lượt là 100,37% (tạp E) và 100,06% (tạp F), đạt yêu cầu quy định 98,0-102,0%.

**Bảng 2. Kết quả khảo sát khoảng tuyến tính và độ chính xác.**

	Tạp E	Tạp F
Phương trình hồi quy	$\hat{y}=42117,2x$	$\hat{y}=45696x$
Khoảng tuyến tính ( $\mu\text{g/ml}$ )	50-300	50-500
Hệ số tương quan (R)	0,9999	0,9998
Độ chính xác (RSD, n=12, %)	0,04	0,001
Độ đúng (Tỷ lệ phục hồi, %)	100,37	100,06
Độ tinh khiết sắc ký	99,94%	99,90%

Kết quả bảng 2 cho thấy, quy trình xác định độ tinh khiết tạp E, tạp F bằng HPLC có tính đặc hiệu, độ đúng, độ chính xác cao và khoảng tuyến tính rộng. Kết quả xác định độ tinh khiết sắc ký tạp E và tạp F theo phương pháp quy về 100% diện tích pic là trên 99,9% tính trên chế phẩm nguyên trạng.

**4.7. Xây dựng tiêu chuẩn đánh giá - kết quả đánh giá chất lượng aceclofenac ethyl ester và aceclofenac benzyl ester**

Tiêu chuẩn đánh giá và kết quả đánh giá tạp E (bảng 3) và tạp F (bảng 4) được tóm tắt như sau.

**Bảng 3. Tiêu chuẩn đánh giá - kết quả đánh giá aceclofenac ethyl ester.**

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	Kết quả
	Cảm quan	Tinh thể hình kim màu trắng, không mùi	Đạt
Tính chất	Độ tan	Rất tan trong DMF, acetonitrile, chloroform; dễ tan trong dichloromethane, ethyl acetate, acetone; tan trong diethyl ether; hơi tan trong methanol; khó tan trong n-hexane, petroleum ether, ethanol; không tan trong nước	Đạt
Định tính	Phổ hồng ngoại	3371,6 ( $\nu_{\text{NH}}$ ); 1737,9 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ester); 1506,4; 1452,4 ( $\nu_{\text{C=C}}$ nhân thơm); 1298,1 ( $\nu_{\text{C-O}}$ acid); 1205,5; 1062,8 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ester); 750,3 ( $\nu_{\text{C-Cl}}$ )	Đúng
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân	Phổ $^1\text{H}$ NMR; $^{13}\text{C}$ NMR	Đúng
Điểm chảy	DSC	70-72°C	Đạt 71,6°C
Hàm ẩm*	KF	$\geq 0,2\%$	Đạt (0,12%)
Độ tinh khiết sắc ký	HPLC	$\geq 98,0\%$ tính trên chế phẩm nguyên trạng	Đạt (99,94%)

\*: xác định theo Dược điển Anh; DSC: phân tích nhiệt quét vi sai; KF: Karl Fischer, HPLC: sắc ký lỏng hiệu năng cao.

**Bảng 4. Tiêu chuẩn đánh giá - kết quả đánh giá aceclofenac benzyl ester.**

Chỉ tiêu	Phương pháp	Yêu cầu	Kết quả
	Cảm quan	Tinh thể hình kim màu trắng, không mùi	Đạt
Tính chất	Độ tan	Rất tan trong DMF, acetonitrile, chloroform, dichloromethane; dễ tan trong ethyl acetate, acetone, diethyl ether; tan trong petroleum ether; hơi tan trong methanol; khó tan trong n-hexane, ethanol; không tan trong nước	Đạt
Định tính	Phổ hồng ngoại	3361,9 ( $\nu_{\text{NH}}$ ); 1732,1 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ester); 1504,5; 1450,5 ( $\nu_{\text{C=C}}$ nhân thơm); 1365,6 ( $\nu_{\text{C-O}}$ acid); 1193,9; 1151,5 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ester); 756,1 ( $\nu_{\text{C-Cl}}$ )	Đúng
	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân	Phổ $^1\text{H}$ NMR; $^{13}\text{C}$ NMR	Đúng
Điểm chảy	DSC	63-65°C	Đạt 64,1°C
Hàm ẩm*	KF	$\geq 0,2\%$	Đạt (0,16%)
Độ tinh khiết sắc ký	HPLC	$\geq 98,0\%$ tính trên chế phẩm nguyên trạng	Đạt (99,90%)

\*: xác định theo Dược điển Anh; DSC: phân tích nhiệt quét vi sai; KF: Karl Fischer, HPLC: sắc ký lỏng hiệu năng cao.

**5. Kết luận**

Tạp E và tạp F đã được tổng hợp thành công bằng phản ứng ester hóa trong DMF từ nguyên liệu aceclofenac và diclofenac sodium với hiệu suất trung bình lần lượt khoảng 96 và 66%, đạt các tiêu chuẩn đánh giá chất lượng và có độ tinh khiết sắc ký trên 99,9% tính trên chế phẩm nguyên trạng, đủ điều kiện để thiết lập chất đối chiếu trong kiểm nghiệm tạp chất liên quan của aceclofenac. Các chất đối chiếu này sẽ làm phong phú thêm ngân hàng tạp chuẩn quốc gia, giúp Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP Hồ Chí Minh dễ dàng cung cấp cho các công ty sản xuất dược phẩm trong nước có hoạt chất aceclofenac, chủ động trong việc kiểm tra thành phần tạp trong thành phẩm của mình với chi phí hợp lý thay vì phải mua tạp chuẩn từ các công ty cung cấp nước ngoài với chi phí cao.

**TÀI LIỆU THAM KHẢO**

[1] United Nations Economic Commission for Europe (2017), "Classification and labelling of chemicals - The new hazard labelling of chemicals", *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals*, Seventh Revised Edition.

[2] LGC Standards (2023a), *Safety Data Sheet-Aceclofenac Ethyl Ester*, pp.1-16.

[3] LGC Standards (2023b), *Safety Data Sheet-Aceclofenac Benzyl Ester*, pp.1-15.

[4] European Pharmacopoeia (2019), *Monographs: Aceclofenac*.

[5] British Pharmacopoeia (2019), *Monographs: Aceclofenac*.

[6] Biosynth (2023), <https://www.biosynth.com/category/iaceclofenac>, accessed 10 June 2023.

[7] T.T. Le, T.Q.G. Nguyen, V.Q. Nguyen, et al. (2020), "Synthesize and purify impurity A of diclofenac to meet the quality standards used to establish impurities", *Journal of Drug Testing*, **18(70)**, pp.18-26 (in Vietnamese).

[8] P.L. Somashekar, S.Pai, G. Rao (2013), "Synthesis and characterization of specified impurities of aceclofenac", *Chemical Science Transactions*, **2(3)**, pp.813-820.

[9] M.D. White (2014), "An analytical profile of aceclofenac", *Microgram Journal*, **11(1-4)**, pp.29-41.

[10] International Conference on Harmonization (2005), *Harmonized Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Test and Methodology*, pp.1-13.