

Nghiên cứu tổng hợp carbocystein

Đào Nguyệt Sương Huyền,
Phạm Thị Hiền, Nguyễn Đình Luyện
Trường đại học Dược Hà Nội

Đặt vấn đề

Carbocystein có tên khoa học là S-(Carboxymethyl)- L- Cystein (S-CMC) thuộc nhóm thuốc điều trị các bệnh đường hô hấp hoặc các trường hợp rối loạn chất nhầy [3]. Ngoài ra carbocystein còn được chứng minh có tác dụng điều trị bệnh tắc nghẽn phổi mạn tính (COPD) [1, 2] và ức chế lây nhiễm cúm A [5]. Nhằm tiếp tục hướng nghiên cứu triển khai tổng hợp các dẫn chất L-cystein, trong bài báo này chúng tôi công bố kết quả nghiên cứu triển khai tổng hợp carbocystein đạt tiêu chuẩn BP 2007 [6], dựa theo kết quả của các công trình nghiên cứu trên thế giới đã công bố [4, 7].

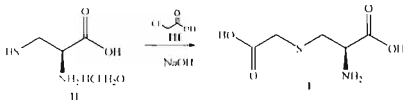
Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu, hóa chất

L-Cystein hydrochlorid monohydrat (L-CHM), acid acetic, acid hydrochloric (HCl), acid monocloacetic (AMCA), ethanol tuyệt đối, natri hydroxyd (NaOH), nước cất

Kết quả và bàn luận

Kết quả tổng hợp carbocystein từ L-cystein hydrochloric monohydrat



Trong bình cầu đáy tròn 100ml, hòa tan hỗn hợp gồm 1,76g (10 mmol) L-cystein hydrochlorid monohydrat (II), 1,00g (10,58 mmol) acid monocloacetic (III) và 2,5ml nước. Vừa khuấy vừa nhỏ từ từ dung dịch NaOH 7 M đến khi pH của khối phản ứng đạt 9. Sau đó khuấy thêm 15 phút, rồi điều chỉnh pH của dung dịch về 5 bằng acid acetic. Làm lạnh khối phản ứng bằng nước đá trong 2h. Lọc loại tủa, thu lấy dịch lọc. Điều chỉnh pH của dịch lọc về 2 bằng acid hydrochloric 6M, sau đó làm lạnh bằng nước đá trong 2h. Lọc thu lấy tinh thể. Hòa tan tinh thể S-CMC trong 200ml nước sôi, lọc nóng thu dịch lọc. Dịch lọc được để

Thiết bị

Sử dụng các thiết bị tổng hợp hữu cơ thông thường, sắc ký lớp mỏng (SKLM) được tiến hành trên bản mỏng silicagel Kieselgel 60 F254 (Merck), nhiệt độ nóng chảy đo trên máy EZ-Melt tại Bộ môn Công nghiệp Dược-ĐH Dược Hà Nội. Phổ hồng ngoại (IR), phổ khối lượng (MS), và phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) được ghi trên các thiết bị tại Viện Hóa học Việt Nam.

Phương pháp nghiên cứu

Áp dụng phương pháp thực nghiệm trong tổng hợp hóa dược. Theo dõi quá trình phản ứng bằng SKLM. Sơ bộ kiểm tra độ tinh khiết của sản phẩm bằng SKLM và đo nhiệt độ nóng chảy. Xác định cấu trúc của carbocystein tổng hợp được dựa trên kết quả phân tích phổ hồng ngoại (IR), phổ khối lượng phân giải cao (MS); Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$).

Kiểm nghiệm carbocystein tổng hợp được theo tiêu chuẩn dược điển Anh BP 2007.

kết tinh lạnh qua đêm. S-CMC sẽ kết tinh dưới dạng tinh thể trắng, bóng ánh. Lọc, rửa bằng nước lạnh, sấy ở 60°C . Khối lượng sản phẩm thu được 1,25g, hiệu suất phản ứng khoảng 70%, nhiệt độ nóng chảy $206,3-211^\circ\text{C}$.

Phổ IR (KBr), ν_{max} (cm^{-1}): 3019 ($-\text{NH}_3^+$), 1591 ($>\text{CO}$), 2637, 2721 ($-\text{OH}$), 1687 ($>\text{C}=\text{O}_{\text{ac}}$) cm^{-1} .

Phổ MS phân giải cao 178 (M-1); 357 (2M-1).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (D_2O) δ : 3,03 (1H, dd, $\text{C}_3\text{-H}_\beta$), 3,15 (1H, dd, $\text{C}_3\text{-H}_\alpha$), 3,38 (2H, s, $\text{C}_5\text{-H}_2$); 3,92 (1H, dd, $\text{C}_2\text{-H}$) ppm.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (D_2O) δ 32,975 (C_3), 34,369 (C_5); 53,426 (C_2); 172,274 (C_1); 174,968 (C_6) ppm.

Từ kết quả phân tích các phổ của carbocystein tổng hợp được cho phép chúng tôi kết luận sản phẩm tổng hợp được tương đối tinh khiết và có cấu trúc như dự kiến.

Chúng tôi đã tiến hành khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng tới hiệu suất của phản ứng tổng hợp carbocystein như: pH của phản ứng, nhiệt độ phản ứng, tỉ lệ mol L-CHM : AMCA

Khảo sát ảnh hưởng của pH tới hiệu suất phản ứng

Để đánh giá được ảnh hưởng của pH tới phản ứng alkyl hóa, chúng tôi đã liên thay đổi pH sau khi cho NaOH. Kết quả thu được trong bảng sau

Bảng 1: Ảnh hưởng pH của phản ứng tới hiệu suất tạo carbocystein

STT	pH của phản ứng	Khối lượng S-CMC (g)	Hiệu suất (%)
1	7	0,5	27,93
2	8	1,19	66,48
3	9	1,28	71,31
4	10	1,12	62,50
5	11	0,34	18,99

Nhận xét: pH của phản ứng ảnh hưởng rất lớn đến hiệu suất. Với pH dưới 8 và trên 10, hiệu suất rất thấp. Điều này được giải thích như sau. Nếu pH quá thấp, không thể hòa tan hết L-CHM do vậy gây khó khăn cho phản ứng xảy ra. Nếu tại pH quá cao thì L-cystein lại rất dễ bị oxy hóa trong môi trường kiềm mạnh. Vì vậy chúng tôi lựa chọn pH sau phản ứng là 9 với hiệu suất phản ứng là 71,3%

Bảng 3: Kết quả khảo sát tỉ lệ mol chất tham gia phản ứng

STT	Khối lượng L-CHM(g)	Khối lượng AMCA(g)	Tỉ lệ mol L-CHM:AMCA	Khối lượng S-CMC (g)	Hiệu suất (%)
1	1,76	0,95	1: 1,0	1,25	70,00
2	1,76	1,13	1: 1,2	1,31	73,10
3	1,76	1,32	1: 1,4	1,48	82,59
4	1,76	1,52	1: 1,6	1,44	80,36
5	1,76	1,70	1: 1,8	1,45	80,91
6	1,76	1,89	1: 2,0	1,45	80,91

Nhận xét: Tỉ lệ mol của các chất tham gia phản ứng ảnh hưởng đến hiệu suất của phản ứng. Tỉ lệ L-CHM : AMCA tăng từ 1:1,0 đến 1:1,4 thì hiệu suất của phản ứng tăng từ 74,59 lên 82,35%. Nhưng khi tăng từ 1: 1,6 đến 1: 2 thì hiệu suất của phản ứng gần như là không thay đổi. Do vậy lựa chọn tỉ lệ mol là 1:1,4.

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng

Tương tự như trên, căn cứ vào quy trình đã tổng hợp S-CMC, lựa chọn pH của phản ứng là 9. Chúng tôi tiếp tục khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ tới hiệu suất của phản ứng, kết quả thu được như sau:

Bảng 2: Kết quả khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hiệu suất tạo S-CMC

STT	Nhiệt độ phản ứng (°C)	Khối lượng S-CMC (g)	Hiệu suất (%)
1	10	1,21	67,52
2	20	1,28	71,43
3	30	1,26	70,31
4	40	1,12	62,50
5	50	1,09	60,82
6	60	1,02	56,92

Nhận xét. Từ bảng trên cho thấy, tại nhiệt độ 20°C cho hiệu suất phản ứng cao nhất trong khoảng đã khảo sát. Nhiệt độ càng tăng cao, hiệu suất càng giảm xuống, do trong môi trường kiềm, nếu nhiệt độ cao sản phẩm rất dễ bị oxy hóa. Như vậy chúng tôi sẽ lựa chọn nhiệt độ phòng để thực hiện khảo sát tiếp theo.

Khảo sát ảnh hưởng của tỉ lệ mol chất L-CHM và AMCA

Tiếp theo, để đánh giá ảnh hưởng của tỉ lệ mol chất tham gia phản ứng, chúng tôi tiến hành thí nghiệm theo quy trình trên với điều kiện pH 9 và ở nhiệt độ phòng, thay đổi tỉ lệ mol L-CHM : AMCA từ 1: 1 đến 1:2, kết quả thu được trong bảng 3:

Triển khai tổng hợp carbocystein ở quy mô phòng thí nghiệm với quy mô 100g/mẻ.

Căn cứ vào kết quả khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất, chúng tôi đã triển khai tổng hợp thử 3 mẻ với quy mô 100g/mẻ. Các thông số phản ứng như sau: 105,40g L-CHM (0,60 mol); 79,4g AMCA (tỉ lệ mol 1:1,4),

● Nghiên cứu – Kỹ thuật

pH phản ứng là 9; nhiệt độ phản ứng ở nhiệt độ phòng. Kết quả thu được trong bảng 4.

Bảng 4: Kết quả tổng hợp S-CMC với quy mô 100g/mẻ

Lô sản xuất	Khối lượng L-CHM (g)	Khối lượng AMCA (g)	Khối lượng S-CMC (g)	Hiệu suất (%)
NC 01	105,40	79,40	100,20	93,19
NC 02	105,40	79,40	99,97	92,97
NC 03	105,40	79,40	101,01	93,94
Trung bình				93,37

Như vậy, khi triển khai với quy mô sản xuất 100g/mẻ, hiệu suất trung bình của phản ứng khá cao, đạt 93,37%.

Tinh chế sản phẩm đạt tiêu chuẩn Dược điển Anh 2007

Quy trình tinh chế

S-CMC thô được hòa tan hoàn toàn trong HCl 2N, điều chỉnh pH của dung dịch về pH 2 bằng NaOH loãng. Để qua đêm, S-CMC sẽ kết tinh, lọc, rửa sản phẩm tới đạt chuẩn về tạp clorid. Sản phẩm phải đạt độ tinh khiết trên 98,5%.

Ba lô S-CMC đã tổng hợp được, đem tinh chế thu được kết quả như sau:

Bảng 5: Kết quả tinh chế sản phẩm

Lô sản xuất	Khối lượng SCMC trước tinh chế (g)	Khối lượng SCMC sau tinh chế (g)	Hiệu suất tinh chế (%)	Hiệu suất toàn quá trình (%)
NC 01	100,20	95,20	95,00	88,54
NC 02	99,97	94,91	94,93	88,27
NC 03	101,01	93,44	92,51	86,90
Trung bình			94,14	87,90

Với quy trình tinh chế đã đưa ra chủ yếu là sử dụng các hóa chất thông thường, phương pháp đơn giản, ổn định và cho hiệu suất tinh chế cao. Hiệu suất toàn quá trình trung bình thu được là 87,9%.

Kết quả kiểm nghiệm sản phẩm

Tiến hành kiểm nghiệm carbocystein theo tiêu chuẩn dược điển Anh BP 2007 tại Viện kiểm nghiệm thuốc TW

Kết quả kiểm nghiệm Căn cứ theo kết quả của phiếu kiểm nghiệm số 41G 812 ngày 25 tháng 8 năm 2011 của viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương - Bộ Y tế cho thấy carbocystein tổng hợp được đạt yêu cầu chất lượng về tất cả các chỉ tiêu theo BP 2007. Trong đó hàm lượng S-CMC là 99,6%.

Kết luận

Chúng tôi đã tiến hành khảo sát các thông số của phản ứng tổng hợp carbocystein và xác

định được các thông số thích hợp cho phản ứng tổng hợp carbocystein là:

- pH của phản ứng là 9
- Nhiệt độ phản ứng nhiệt độ phòng.
- Tỷ lệ mol L-CHM : AMCA 1:1,4
- Tiến hành triển khai tổng hợp carbocystein ở quy mô 100g/mẻ, hiệu suất trung bình 93,37%
- Xây dựng được quy trình tinh chế carbocystein đạt tiêu chuẩn dược điển Anh 2007. Hiệu suất tinh chế là 94,14% và hiệu suất toàn quá trình là 87,90%.
- Đã kiểm tra được độ tinh khiết của sản phẩm và xác định cấu trúc bằng phổ hồng ngoại, phổ khối lượng phân giải cao, phổ cộng hưởng từ proton, cộng hưởng từ hạt nhân.
- Sản phẩm đạt tất cả các chỉ tiêu chất lượng theo tiêu chuẩn dược điển Anh BP 2007

Summary

Carbocysteine was successfully synthesized from L-cysteine hydrochloride monohydrate in high yield (93.37%). Its structure was confirmed by physical parameters, IR, MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR. The quality of the synthesized carbocysteine was controlled showing to meet the requirements of BP 2007

Keyword: Carbocysteine, L-cysteine hydrochloride monohydrate, synthesis, high yield

Tài liệu tham khảo

1. Calvert C. and Hooper J., The role for S-carboxymethylcysteine (carbocysteine) in the management of chronic obstructive pulmonary disease. *Int J. Chron Obstruct Pulmon Dis*, (2008), 3(4), pp. 659-669.
2. Decramer M. and Janssens W., Mucoactive therapy in COPD, *Eur. Respir. Rev* (2010), 19 (116), pp 134-140.
3. Ishibashi Y., Takayama G., Inouye Y. and Taniguchi A., Carbocysteine normalizes the viscous property of mucus through regulation of fucosylated and sialylated sugar chain on airway mucins, *Eur J. Pharmacol*, (2010), 641 (2-3), pp 226-228.
4. Michaelis L. and Maxwell P. Schubert, The reaction of iodoacetic acid on mercaptans and amines, *J Biol Chem* 106, (1934), pp. 340
5. Mutsuo Yamaya et al., Inhibitory effects of carbocysteine on type A seasonal influenza virus infection in human airway epithelial cells, *AP- Lung physiol* (2010), 299 (2), pp 160-168.
6. The British Pharmacopoeia Commission, *British Pharmacopoeia*, the edition on Cd-rom, (2007)
7. Turner R. B., Voigt D. M., Preparation of DL-cysteinhydrochloride, *J. Am Chem. Soc.*, (1950), 72 (1), pp 628-629.