

## NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH TỔNG HỢP AXIT ZOLEDRONIC

Phạm Văn Cường<sup>1</sup>, Đoàn Thị Mai Hương<sup>1</sup>,  
Trần Văn Hiệu<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Quỳnh Giang<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Hùng<sup>1</sup>, Châu Văn Minh<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện Hóa sinh biển, Viện Khou học và Công nghệ Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Hóa học, Trường đại học Vinh

Đề án Toà soạn 30-8-2011

### Abstract

Zoledronic acid (marketed by Novartis under the trade names Zometa) is a bisphosphonate. Zometa is used to prevent skeletal fractures in patients with cancers such as multiple myeloma and prostate cancer, as well as for treat or prevent osteoporosis in postmenopausal women, and to increase bone mass in men with osteoporosis. Herein, we describe the method for the synthesis of Zoledronic acid from imidazole in 3 steps. The structure of Zoledronic acid and intermediate products were established by MS and NMR spectroscopies.

**Keywords.** Zometa, zoledronic acid, skeletal fractures, multiple myeloma.

### 1. MỞ ĐẦU

Loãng xương là bệnh lý của toàn hệ thống xương làm suy yếu sức mạnh của toàn khung xương, ảnh hưởng lớn tới chất lượng cuộc sống của số đông người có tuổi, đặc biệt là phụ nữ. Dự báo tới năm 2050, toàn thế giới sẽ có tới 6,3 triệu trường hợp gãy cổ xương đùi do loãng xương, và 51% số này sẽ ở các nước Châu Á, nơi mà khẩu phần ăn hàng ngày còn rất thiếu canxi, nơi mà việc chẩn đoán sớm và điều trị tích cực bệnh loãng xương còn gặp rất nhiều khó khăn [1]. Ở Việt Nam, một nghiên cứu dịch tễ học cho thấy hơn 20% phụ nữ trên 50 tuổi có triệu chứng loãng xương [2]. Như vậy, nhu cầu sử dụng thuốc Zometa tại Việt Nam là rất lớn. Tuy nhiên, do phải nhập ngoại nên giá thành thuốc cao, gây khó khăn cho người bệnh trong việc tiếp cận thuốc. Hiện nay, axit zoledronic được công ty Novartis bảo chế và đăng ký bản quyền sử dụng đến năm 2013, với tên thương mại là Zometa [3, 4]. Đối với điều trị bệnh ung thư xương, cho tới nay, thuốc Zometa là một trong các thuốc đầu bảng được sử dụng. Mặt khác, gần đây các nhà nghiên cứu Mỹ đã chứng minh được hiệu quả của việc sử dụng kết hợp doxorubicin và axit zoledronic trong điều trị ung thư vú tiên triển. Kết quả cho thấy hiệu quả điều trị rất cao và ít tác dụng phụ. Để có thể tiến tới sản xuất hợp chất này khi liệt hạn bảo hộ bản quyền, chúng tôi quyết định nghiên cứu quy trình tổng hợp hoạt chất axit zoledronic. Việc tổng hợp toàn phần axit zoledronic đã thu hút sự quan tâm của nhiều nhóm nghiên cứu trên thế giới. Nhiều phương pháp tổng

hợp axit zoledronic đã được công bố trên các tạp chí chuyên ngành [5-8]. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi áp dụng phương pháp của Pulla Reddy và cs. để nghiên cứu quy trình tổng hợp axit zoledronic qua 3 bước chính đi từ imidazole.

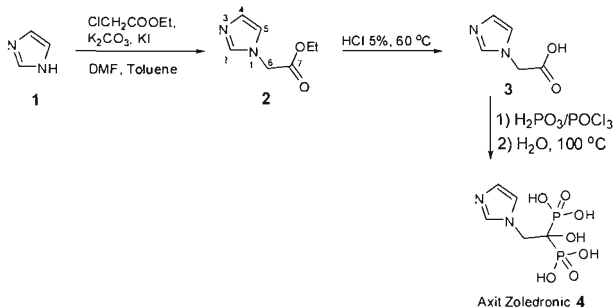
### 2. THỰC NGHIỆM

#### 2.1. Thiết bị, hoá chất

Phổ NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz với TMS làm chất nổi chuẩn. Phổ khối lượng được đo trên máy sắc ký lỏng ghép khối phổ với đầu dò MSD (LC/MSD Agilent series 1100), sử dụng mode ESI và đầu dò DAD. Hoá chất dùng cho tổng hợp hữu cơ được mua của hãng Merck và Aldrich.

#### Tổng hợp hợp chất 2

Nhỏ từ từ 0,5 ml etyl cloroacetat (4,7 mmol) vào trong bình cầu đáy tròn dung tích 50 ml có chứa 200 mg imidazole (1, 2,94 mmol) trong 3 ml hỗn hợp dung môi DMF/toluen (1/9). Sau đó thêm 406 mg K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2,94 mmol) và 60 mg KI (0,36 mmol) vào hỗn hợp phản ứng. Hỗn hợp phản ứng sau đó được đun, khuấy ở 80-90°C trong 6 giờ. Dung dịch phản ứng sau đó được làm lạnh xuống nhiệt độ phòng và thêm 20 ml nước cất vào rồi chiết với EtOAc (5 × 20 ml). Dịch chiết EtOAc sau đó được cô cạn loại bỏ dung môi và cạn chiết được tinh chế bằng sắc ký cột (từ 5 đến 50% EtOAc trong *n*-hexan) thu được 190 mg hợp chất 2 đạt hiệu suất là 42%.



Sơ đồ 1: Quá trình tổng hợp axit zoledronic

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz): 1,23 (3H, t,  $J = 7$  Hz, O- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4,17 (2H, q,  $J = 7$  Hz, O- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 4,64 (2H, s, H-6), 6,90 (1H, s, H-4), 7,01 (1H, s, H-5), 7,46 (1H, s, H-2);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ , 125 MHz): 13,9 (O- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 47,9 (C-6), 61,9 (O- $\text{CCH}_2\text{CH}_3$ ), 119,9 (C-4), 129,3 (C-5), 137,8 (C-2), 167,4 (C-7).

#### Tổng hợp axit imidazol-1-yl-axetic (3)

Cho 150 mg hợp chất 2 (0,97 mmol) vào trong bình cầu đáy tròn, dung tích 25 ml có chứa 3 ml HCl 5%. Hỗn hợp dung dịch được đun ở 60°C trong 5 giờ. Dung dịch phản ứng sau đó được cô cạn dưới áp suất giảm. Cặn còn lại được rửa với axeton, sấy khô thu được 104 mg hợp chất 3 dưới dạng chất rắn màu trắng đục. Hiệu suất của phản ứng đạt 85%.

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz): 4,78 (2H, s, H-6), 7,39 (2H, s, H-4, H-5), 8,64 (1H, s, H-2);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz): 51,8 (C-6), 119,3 (C-4), 123,0 (C-5), 135,4 (C-2), 172,4 (C-7).

#### Tổng hợp axit zoledronic (4)

Cho 80 mg hợp chất 3 (0,63 mmol) vào trong bình cầu có chứa 2 ml toluen. Sau đó thêm 0,5 ml  $\text{H}_3\text{PO}_3$  vào và khuấy đều, rồi thêm từ từ 0,2 ml  $\text{POCl}_3$ . Hỗn hợp phản ứng sau đó được đun ở 80-90°C trong 8 giờ, sau đó thêm 2 ml nước cất vào và đun tiếp thêm 3 giờ nữa. Hỗn hợp phản ứng được làm lạnh xuống nhiệt độ phòng, sau đó thêm 5 ml axeton vào và khuấy đều. Giữ dung dịch phản ứng ở 0°C trong 3 giờ, sau đó lọc thu kết tủa. Rửa kết tủa với axeton và sấy khô thu được sản phẩm thô. Kết tinh sản phẩm thô trong nước, thu được 127 mg axit zoledronic sạch, dưới dạng tinh thể màu trắng đục, đạt hiệu suất 74%.

ESI-MS: 273  $[\text{M}+\text{H}]^+$ .  $^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 202 MHz): 14,9; Phổ  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz) và  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz). xem bảng 1.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất đầu được sử dụng trong quá trình tổng hợp axit zoledronic là imidazole. Đầu tiên, chúng tôi thực hiện phản ứng *N*-alkyl hóa imidazole với tác nhân ethyl mono-chloroacetat trong hỗn hợp dung môi DMF/toluen với sự có mặt của  $\text{K}_2\text{CO}_3$  và KI tạo sản phẩm trung gian 2 với hiệu suất đạt 42%. Sau đó, thủy phân hợp chất 2 trong dung dịch HCl 5% ở nhiệt độ 60°C thu được axit 3 với hiệu suất 85%. Cuối cùng hợp chất 3 được xử lý với hỗn hợp tác nhân  $\text{H}_3\text{PO}_3/\text{POCl}_3$  sau đó thủy phân ở nhiệt độ 100 °C thu được sản phẩm axit zoledronic (4). Kết tinh lại trong nước cất và khử màu bằng than hoạt tính cho phép thu được hợp chất axit zoledronic (4) đạt độ tinh khiết cao, với hiệu suất 74%. Các hợp chất trung gian thu được trong quá trình phản ứng đều được tinh chế và xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^1\text{H}$ -NMR,  $^{13}\text{C}$ -NMR, riêng hợp chất axit zoledronic được xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ khối lượng, phổ cộng hưởng từ hạt nhân  $^{31}\text{P}$ -NMR và  $^1\text{H}$ -NMR:  $^{13}\text{C}$ -NMR 1D và 2D và so sánh với tài liệu tham khảo [5-8].

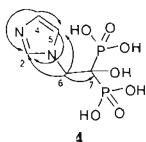
Hợp chất 4 thu được dưới dạng tinh thể màu trắng đục. Phổ ESI-MS của 4 cho pic ion phân tử proton hóa ở  $m/z$  273  $[\text{M}+\text{H}]^+$  ứng với công thức phân tử  $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_7\text{P}_2$ . Phổ  $^{13}\text{C}$ -NMR và DEPT của 4 cho tín hiệu của 5 nguyên tử cacbon tương ứng với 3 cacbon lai hóa  $\text{sp}^2$  và 2 cacbon lai hóa  $\text{sp}^3$  trong đó có 1 nhóm  $\text{CH}_2$ , 3 nhóm CH, và 1 cacbon bậc bốn. Cacbon bậc 4 xuất hiện dưới dạng triplet với hằng số tương tác  $J_{\text{C-P}} = 120,7$  Hz. Trên phổ  $^1\text{H}$ -NMR, có tín hiệu của 3 proton thuộc vòng imidazole ở  $\delta_1$  7,87 (1H, s, H-4); 8,01 (1H, s, H-5) và 9,19 (1H, s, H-2) và tín hiệu của 1 nhóm methylen ở  $\delta_1$  5,18 (1H, d,  $J = 10,5$  Hz, H-6a) và 5,20 (1H, d,  $J = 10,5$  Hz, H-6b). Trên phổ  $^{31}\text{P}$ -NMR của 4 cho

thấy có tín hiệu của nhóm bisphosphonate ở  $\delta$ , 14,9 ppm. Kết hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu

tham khảo [5-8] cho phép xác định chất thu được chính là axit zoledronic.

Bảng 1. Dữ liệu phổ  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$  của axit zoledronic

C	$\delta_{\text{H}}$ , ppm ( $J = \text{Hz}$ ) ( $\text{D}_2\text{O}$ , 500 MHz)	$\delta_{\text{C}}$ , ppm ( $J = \text{Hz}$ ) ( $\text{D}_2\text{O}$ , 125 MHz)	HMBC
2	9,19 (1H, s, H-2)	136,7	C-4, C-5
4	7,87 (1H, s, H-4)	119,0	C-2, C-5
5	8,01 (1H, s, H-5)	124,7	C-2, C-4
6a	5,18 (1H, d, $J = 10,5 \text{ Hz}$ , H-6a)	53,0	C-2, C-5, C-7
6b	5,20 (1H, d, $J = 10,5 \text{ Hz}$ , H-6b)		
7		73,4 (t, $J_{\text{CP}} = 120,7 \text{ Hz}$ )	



Hình 1. Một số tương tác chính trên phổ HMBC của axit zoledronic

#### 4. KẾT LUẬN

Đã tổng hợp thành công hoạt chất axit zoledronic từ chất đầu là imidazole với hiệu suất tổng là 26% qua 3 bước. Việc nghiên cứu thành công tổng hợp thâm độ này khẳng định khả năng có thể nghiên cứu cải tiến nhằm tối ưu hóa điều kiện phản ứng để thu được hiệu suất axit zoledronic cao hơn.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài cấp cơ sở và đề tài cấp Viện KH&CNVN Nghiên cứu quy trình tổng hợp và tinh chế axit zoledronic dùng làm thuốc điều trị bệnh

Liên hệ: **Phạm Văn Cường**

Viện Hóa sinh biển, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam  
Số 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội  
Email: doanhuong7@yahoo.com.

loãng xương, mã số VAST 06.03/11-12

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Lê Anh Thư, Bệnh loãng xương và các biện pháp điều trị, <http://www.medinet.hochiminhcity.gov.vn>
- Thuy VT, Chau TT, Cong ND, De DV, Nguyen TV, Assessment of low bone mass in Vietnamese comparison of QUS calcaneal ultrasonometer and data-derived T-scores. J. Bone, Miner Metab, 21(2), 114-119 (2003).
- National Prescribing Service. Zoledronic Acid for Osteoporosis, Medicines Update (2009)
- Lyles K, et al. Zoledronic Acid and Clinical Fractures and Mortality after Hip Fracture, N Engl J. Med. 357(18), 1799 (2007).
- P. Zaderenko, M. S Gil, P. Ballesteros, S Cerdán. J. Org Chem., 59, 6268-6273 (1994).
- V. M. Patel, T. R. Chitturi, R. Thennati. PCT Int. Pat. Appl. WO 2005/066188.
- M. Pulla Reddy, V. Usha Rani, N Venkaiah Chowdary PCT Int. Pat. Appl. WO 2005/063717.
- S K Singh, N. Manne, P. C. Ray, M Pal. Beilstein Journal of Organic Chemistry. 4(42) (2008)