

4. Horiuchi T., Chiba J., Uoto K., Soga T. (2009), "Discovery of novel thieno[2,3-d]pyrimidin-4-yl hydrazone-based inhibitors of Cyclin D1-CDK4. Synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships", *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 305-308.

5. Kumar D., Judge V., Narang R., Sangwan S., Clercq E. D., Balzarini J., Narasimhan B. (2010), "Benzylidene/2-chlorobenzylidene hydrazides: Synthesis, antimicrobial activity, QSAR studies and antiviral evaluation", *Eur. J. Med. Chem.*, 45, 2806-2816.

6. Kumar G. V. S., Rajendraprasad Y., Mallikarjuna B. P. (2010), "Synthesis of some novel 2-substituted-5-[isopropylthiazole] clubbed 1,2,4-triazole and 1,3,4-oxadiazoles as potential antimicrobial and antitubercular agents", *Eur. J. Med. Chem.*, 45, 2063-2074

7. Li Y., Luo Y., Hu Y., Zhu D.-D., Zhang S. (2012), "Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4-oxadiazole scaffold as FabH inhibitors", *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 4316-4322.

8. Li Z.-L., Li Q.-S., Zhang H.-J., Hu Y. (2011), "Design, synthesis and biological evaluation of urea derivatives from o-hydroxybenzylamines and phenylisocyanate as potential FabH inhibitors", *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 4413-4420.

9. Lourenco M. C. d. S., Ferreira M. d. L., Souza M. V. N. d., Peralta M. A. (2008), "Synthesis and anti-

mycobacterial activity of (E)-N'-(monosubstituted-benzylidene)isonicotinohydrazide derivatives", *Eur. J. Med. Chem.*, 43, 1344-1347

10. Malhotra M., Sanduja M., Samad A. (2012), "New oxadiazole derivatives of isonicotinohydrazide in the search for antimicrobial agents: Synthesis and in vitro evaluation", *J. Serb. Chem. Soc.*, 77(1), 9-16

11. Malhotra M., Sharma G., Deep A. (2012), "Synthesis and characterization of (E)-N'-(substituted benzylidene)isonicotinohydrazide derivatives as potent antimicrobial and hydrogen peroxide scavenging agents", *Drug Research*, 69(4), 637-644.

12. Rashid M., Husain A., Mishra R. (2012), "Synthesis of benzimidazoles bearing oxadiazole nucleus as anticancer agents", *Eur. J. Med. Chem.*, 54, 855-866

13. Shi L., Fang R.-Q., Zhu Z.-W., Yang Y. (2010), "Design and synthesis of potent inhibitors of β -ketoacyl-carrier protein synthase III (FabH) as potential antibacterial agents", *Eur. J. Med. Chem.*, 45, 4358-4364

14. Bertolazzi P., Bock M. E. and Guerra C. (2013), "On the functional and structural characterization of hubs in protein-protein interaction networks", *Biotechnology Advances*, 31, 274-286.

15. Lee J.-Y., Jeong K.-W., Lee J.-U., Kang D.-I. and Kim Y. (2009), "Novel *E. coli* β -ketoacyl-carrier protein synthase III inhibitors as targeted antibiotics", *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 1506-1513.

(Ngày nhận bài: 03/05/2014 - Ngày duyệt đăng: 06/10/2014)

✓ Nghiên cứu tổng hợp pidotimod. Phần 2: Tổng hợp pidotimod từ chất trung gian ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat.HCl

Quách Thị Hà Vân¹, Lê Hồng Yến², Trần Việt Hùng³, Nguyễn Hải Nam⁴

¹ Học Viên Quân Y

² Trường Cao đẳng Y tế Phú Thọ

³ Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương

⁴ Trường Đại học Dược Hà Nội

* E-mail: quachhavan@y-mail.com

Summary

Pidotimod was synthesized from the intermediate (R)-ethyl thiazolidin-4-carboxylate hydrochloride (II). Some important modifications were devised. TEA was used as a base to convert ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylate hydrochloride into a base form, which was then condensed with L-pyrogutamic acid by CDI as a coupling reagent, and subsequently hydrolyzed by a phase transfer catalyst. The yield was relatively high (~82%).

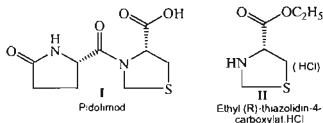
Keywords: Pidotimod, synthesis, immunostimulant.

● **Nghiên cứu - Kỹ thuật**

Đặt vấn đề

Nghiên cứu triển khai tổng hợp các hóa dược nhằm từng bước tự túc nguồn nguyên liệu phục vụ cho sản xuất thuốc trong nước là một mục tiêu lớn của Chương trình trọng điểm về công nghiệp hóa dược do Thủ tướng Chính phủ đã phê duyệt.

Pidotimod (hình 1) được tổng hợp đầu tiên bởi Poli Industria Chimica (Milan, Italy)^[1-7] vào cuối những năm 90 của thế kỷ XX, là một thuốc có tác dụng biến đổi đáp ứng sinh học (biological response modifier) với những tính chất đáng chú ý về khả năng trợ giúp cơ thể chống lại những tác nhân gây bệnh thường gặp^[8,9]. Hiện nay, pidotimod đang được sử dụng tại nhiều nước với



Hình 1: Công thức cấu tạo của pidotimod và chất trung gian ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat.HCl

Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

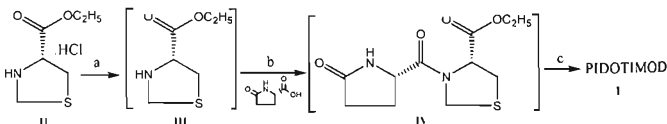
Các hóa chất và dung môi thông thường được nhập từ Công ty Merck hoặc Sigma-Aldrich và được sử dụng trực tiếp không tinh chế gì thêm. Nhiệt độ nóng chảy được đo bằng máy đo điểm chảy nhiệt điện SMP3 của Stuart. Sắc ký cột được tiến hành với silica gel Merck 70-230 mesh. Sắc ký lớp mỏng sử dụng bản mỏng nhôm tráng sẵn silica gel GF-254, quan sát dưới đèn tử ngoại ở bước sóng 365 và 254 nm. Phổ hồng ngoại được ghi bằng máy Perkin-Elmer, hiệu chỉnh dựa vào pic 1600 cm^{-1} của polystyren. Phổ cộng

những biệt dược khác nhau như một thuốc tăng cường miễn dịch khá hiệu quả.

Với mục đích góp phần tạo nguồn nguyên liệu trong nước cho sản xuất thuốc điều hòa miễn dịch, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu triển khai quy trình tổng hợp pidotimod. Quy trình bắt đầu từ L-cystein trải qua 5 bước với chất trung gian là ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat.HCl (hình 1). Trong bài báo trước^[10], kết quả nghiên cứu tổng hợp chất trung gian ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat.HCl đã được công bố. Bài báo này trình bày tiếp các kết quả nghiên cứu liên quan đến phản ứng ngưng tụ giữa ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat.HCl và acid L-pyroglyutamic, sau đó thủy phân tạo sản phẩm cuối cùng pidotimod.

hường từ hạt nhân ^1H và ^{13}C được ghi bằng máy Bruker AV-300 dùng DMSO- d_6 (dimethyl sulfoxid đã deuterat hóa) hoặc CDCl_3 (cloroform deuterat hóa) làm dung môi. Độ chuyển dịch hóa học (δ) được biểu thị bằng đơn vị phần triệu (ppm), lấy mốc là pic của chất chuẩn nội tetramethylsilan (TMS). Phổ khối lượng được ghi bằng máy khối phổ HP-5989B-MS.

Pidotimod có thể được tổng hợp thông qua quy trình ba bước từ chất trung gian là ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat.HCl (II). Tuy nhiên, ba bước này cũng có thể tiến hành liên tiếp gộp trong cùng bình phản ứng. Sơ đồ minh họa như sau.



Điều kiện và tác nhân phản ứng: a) base, dung môi thích hợp; b) DCC (dicyclohexylcarbodiimid) hoặc tác nhân thích hợp khác, dung môi thích hợp; c) NaOH, nước, xúc tác khác

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Tiến hành khảo sát thay đổi một số điều kiện từ phương pháp lựa chọn (tác nhân phản ứng) và khảo sát thay đổi phương pháp tinh chế.

Thực nghiệm và kết quả nghiên cứu

Khảo sát lựa chọn phương pháp dựa trên các tài liệu tham khảo

Trong các tài liệu tham khảo có một số phương pháp tổng hợp pidotimod đi từ chất II đã được công bố¹¹⁻¹⁴. Về cách tiến hành, có một số cách tiến hành như sau:

Phương pháp A1

Thêm 6,07 g K_2CO_3 (0,044 mol) vào dung dịch ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat hydroclorid (II, 5,93 g, 0,03 mol) trong nước (15 ml). Lắc đều và chiết bằng 15 ml ethyl acetat hai lần. Gộp dịch chiết ethyl acetat, làm khan bằng natri sulfat khan, lọc và pha loãng đến 45 ml bằng ethyl acetat. Làm lạnh dung dịch đến 0-5°C. Thêm từ từ DCC (6,18 g, 0,03 mol) và acid L-pyrogultamic (3,87 g, 0,03 mol) vào dung dịch. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở 0-5°C trong 1 giờ sau đó tiếp tục khuấy ở nhiệt độ phòng (25°C) trong 12 giờ. Lọc loại tủa (dicyclohexylurea) tạo thành và cô loại dung môi phản ứng thu được cần dạng dầu. Phần tan cần dạng dầu thu được trong 15 ml nước sau đó nhỏ giọt từ từ 4,0 ml dung dịch NaOH 30% vào hỗn hợp thu được. Sau khi khuấy ở nhiệt độ phòng 30 phút, làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến 0-5°C và acid hóa bằng acid hydrocloric đặc đến pH ~ 1. Giữ hỗn hợp tạo thành ở 5°C trong 2 giờ thu được tủa trắng. Lọc và rửa tủa bằng nước lạnh. Kết tinh lại từ hỗn hợp isopropanol-nước (6/4), sau đó sấy khô thu được 4,82 g bột màu trắng (hiệu suất: 65,85%). Lặp lại phản ứng 2 lần thu được hiệu suất trung bình đạt 65,23%. Sản phẩm được khẳng định là acid (R)-3-[(S)-(5-oxo-2-pyrrolidinyl) carbonyl]thiazolidin-4-carboxylic (Pidotimod) (I) dựa trên phân tích phổ như: phổ hồng ngoại (IR), phổ khối (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H NMR), kết hợp với so sánh với các dữ liệu phổ chuẩn và một số phương pháp khác

- R_f = 0,55 (DCM/MeOH = 5/1).

- MP = 194-196°C

- $EI-MS$ (70 eV) m/z : 242,29 [M-2H]

- IR (KBr) (cm^{-1}): 3276 (-OH), 2880 ((-CH, CH_2), 1705 (C=O), 1656 (C=O), 1625 (C=O), 1250 (C-O).

- ¹H-NMR (DMSO- d_6) δ (ppm): 13,00 (1H, -OH), 7,78 (1H, -NH), 4,87 (2H, H-8, H-11), 4,53

(1H, H-5), 3,32-3,12 (2H, H-10), 2,36 (2H, H-4), 2,12 (2H, H-3).

- ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 182,11 (-COOH), 173,45 (-C=O, C-6), 172,46 (-C=O, C-2), 62,20 (C-11), 55,49 (C-5), 48,37 (C-8), 32,05 (C-10), 29,09 (C-3), 23,95 (C-4).

- CTPT: $C_8H_{10}NO_5$; KLPT: 244,26.

Phương pháp A2

Phân tán 5,93 g ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat hydroclorid (II, 0,03 mol) trong 60 ml toluen. Thêm 2,77 g natri bicarbonat ($NaHCO_3$, 0,033 mol). Đun hồi lưu hỗn dịch thu được trong 5 giờ. Dung môi được hồi lưu qua lớp calci clond khan nhằm loại nước tạo thành. Làm lạnh hỗn hợp phản ứng đến 0-5°C, sau đó thêm vào 3,87 g acid L-pyrogultamic (0,03 mol). Tiếp theo, hòa tan 6,18 g DCC (0,03 mol) trong 10 ml toluen và nhỏ giọt vào hỗn hợp phản ứng ở 0°C. Hỗn hợp được khuấy tiếp ở 0-5°C trong 1 giờ, sau đó nâng nhiệt độ lên 20-25°C và tiếp tục khuấy trong 12 giờ. Để lắng hỗn hợp, lọc loại tủa (dicyclohexylurea), muối vô cơ (NaCl) tạo thành và $NaHCO_3$ dư.

Thêm vào dịch lọc 10 ml nước và 0,51 g tetrabutylamoni hydrogen sulfat (1,5 mmol). Làm lạnh đến 0-5°C rồi thêm từ từ 1,2 g NaOH đã được hòa tan trong 10 ml nước. Sau khi khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 30 phút, lớp nước được tách riêng, làm lạnh xuống 0-5°C trong 30 phút và acid hóa bằng acid hydrocloric đặc đến pH 1, sau đó để lắng trong 2 giờ ở 5°C. Lọc và rửa tủa tạo thành bằng nước lạnh. Kết tinh lại từ hỗn hợp isopropanol-nước (6/4), rồi sấy khô thu được 5,18 g bột màu trắng (hiệu suất: 70,77%). Sản phẩm được khẳng định là acid (R)-3-[(S)-(5-oxo-2-pyrrolidinyl)carbonyl]thiazolidin-4-carboxylic (Pidotimod) (I) dựa trên phân tích phổ như: phổ hồng ngoại (IR), phổ khối (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H NMR) và một số phương pháp khác. Các dữ liệu phổ phù hợp với chất nhận được theo phương pháp A. Lặp lại phản ứng 2 lần thu được hiệu suất trung bình đạt 70,53%

Phương pháp A3

Tiến hành tương tự phương pháp A2 với dung môi sử dụng là dicloromethan. Sản phẩm thu được 5,21 g (hiệu suất: 71,17%) Lặp lại phản ứng 2 lần thu được hiệu suất trung bình đạt 71,55%

Phương pháp A4

Tiến hành tương tự phương pháp A2 với dung môi sử dụng là n-hexan. Tuy nhiên hiệu

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

suất thu được chỉ đạt 33,45%.

Khảo sát thay đổi một số điều kiện từ phương pháp lựa chọn ở trên

Từ kết quả nghiên cứu lựa chọn phương pháp ở trên, phương pháp A2 là phương pháp có nhiều ưu điểm và cho hiệu suất cao nhất. Tuy nhiên, tác nhân base NaHCO_3 hay tác nhân DCC sử dụng còn có nhiều nhược điểm. Vì vậy chúng tôi tiếp tục khảo sát nhằm tìm các điều kiện thay thế cho hai tác nhân này.

Khảo sát thay đổi tác nhân NaHCO_3 bằng một số base khác

Một số base khác như triethylamin (TEA), 4-dimethylaminopyridin (DMAP) được khảo sát thay thế cho NaHCO_3 .

Phương pháp A3-1 (Sử dụng TEA)

Phân tán 5,93 g ethyl (R)-thiazolidin-4-

carboxylat hydroclorid (II, 0,03 mol) trong 60 ml DCM. Thêm từ từ 4,57 ml TEA (0,033 mol). Đun hồi lưu hỗn hợp thu được trong 5 giờ. Tiếp theo các bước tiến hành như phương pháp A2. Lặp lại phản ứng 2 lần thu được hiệu suất trung bình đạt 74,45%.

Phương pháp A3-2 (Sử dụng DMAP)

Phân tán 5,93 g ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat hydroclorid (II, 0,03 mol) trong 60 ml DCM. Thêm từ từ 4,03 g DMAP (0,033 mol). Đun hồi lưu hỗn hợp thu được trong 5 giờ. Tiếp theo các bước tiến hành như phương pháp A2. Lặp lại phản ứng 2 lần thu được hiệu suất trung bình đạt 73,26%.

Tiếp tục khảo sát tỷ lệ II/TEA (mol), thời gian và nhiệt độ phù hợp cho bước chuyển II thành III. Kết quả thu được trình bày trên bảng 1 dưới đây.

Bảng 1: Kết quả khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện nhiệt độ, thời gian của bước chuyển II thành III và tỷ lệ mol II/TEA lên hiệu suất phản ứng

STT	Tỷ lệ II/TEA (mol)	Nhiệt độ (°C)	Thời gian (giờ)	KL sản phẩm (g)**	Hiệu suất (%)**
1	1 : 1,1	Hồi lưu*	5	5,45	74,45
2	1 : 1,1	Hồi lưu	2,5	5,38	73,50
3	1 : 1,1	Hồi lưu	1	5,45	74,45
4	1 : 1,1	Hồi lưu	0,5	5,09	69,54
5	1 : 1,1	20-25°C	1	4,99	68,17
6	1 : 1,1	20-25°C	2	5,50	75,14
6	1 : 1,1	20-25°C	3	5,48	74,86
7	1 : 1,2	20-25°C	2	5,42	74,04
8	1 : 1,3	20-25°C	2	5,44	74,32
9	1 : 1,0	20-25°C	2	4,94	67,49

Ghi chú: Lượng chất II sử dụng: 5,93 g (0,03 mol). *~45°C; **Kết quả là trung bình của ít nhất hai lần thí nghiệm với hiệu suất sai khác không quá 3%.

Khảo sát thay đổi tác nhân hoạt hóa nhóm carboxylic DCC bằng một số tác nhân khác

Một số tác nhân hoạt hóa khác thay thế cho DCC như isobutylchloroformat, CDI được sử dụng. Kết quả thu được như sau:

Bảng 2: Kết quả khảo sát ảnh hưởng tác nhân hoạt hóa nhóm carboxylic và tỷ lệ mol tác nhân hoạt hóa/acid L-pyrogultamic lên hiệu suất phản ứng

STT	Tác nhân hoạt hóa	Tỷ lệ mol tác nhân hoạt hóa/acid L-pyrogultamic	KL sản phẩm (g)*	Hiệu suất (%)*
1	DCC	1,1	5,50	74,45
2	CDI	1:1	5,64	77,05
3	Isobutyl cloroformat	1:1	4,77	65,16
4	CDI	0,9:1	5,35	73,09
5	CDI	1,1:1	6,02	82,24
6	CDI	1,2:1	6,04	82,51
7	CDI	1,3:1	6,03	82,38
8	CDI	1,05:1	5,75	78,55

Ghi chú Lượng chất II sử dụng: 5,93 g (0,03 mol); tỷ lệ TEA/II = 1,1; giai đoạn giải phóng III khuấy ở 20-25°C/2 giờ. *Kết quả là trung bình của ít nhất hai lần thí nghiệm với hiệu suất sai khác không quá 3%. DCC = dicyclohexylcarbodiimid. CDI = N,N'-carbodiimidazol.

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

Khảo sát thay đổi phương pháp tinh chế

Tiến hành phản ứng với các điều kiện đã được lựa chọn ở trên. Sau khi thu được tủa thô màu trắng đục hòa tan vào một lượng nước trong cốc thủy tinh có mỏ, đặt vào nồi cách thủy gia nhiệt 80°C và khuấy nhẹ (bằng đũa thủy tinh). Thêm dần nước cho đến khi tan hoàn toàn ở 80°C, hết khoảng 50 ml. Tỷ lệ tủa thô/nước ~ 1/7.

Bảng 3: Kết quả một số điều kiện kết tinh bằng các hệ dung môi khác nhau

STT	Dung môi kết tinh	KL sản phẩm (g)	Hiệu suất (%)	Nhiệt độ nóng chảy (°C)	Nhận xét
1	EtOH/H ₂ O (1/1)	5,42	74,04	194-195	Tinh thể trắng, ánh kim
2	EtOH/H ₂ O (1,5/1)	5,80	79,24	194-196	Tinh thể trắng, ánh kim
3	EtOH/H ₂ O (1,75/1)	6,08	83,06	193-196	Tinh thể trắng, ánh kim
4	EtOH/H ₂ O (2/1)	6,35	86,75	190-192	Tinh thể trắng đục
6	Isopropanol/ H ₂ O (6/4 = 1,5/1)	6,02	82,24	194-196	Tinh thể trắng, ánh kim

Ghi chú: Lượng chất II sử dụng: 5,93 g (0,03 mol). Lượng nước sử dụng hòa tan sản phẩm thô: ~50 ml. EtOH sử dụng loại 96%.

Bàn luận

Về lựa chọn phương pháp tổng hợp

Trong các phương pháp trực tiếp tổng hợp pidotimod tham khảo được⁽¹⁻⁴⁾, phương pháp A1 về bản chất có 3 bước chính, gồm: i) Chuyển ester II từ dạng muối hydroclorid sang dạng base (chất III) bằng tác nhân kali carbonat và dung môi chiết là ethyl acetat. Đây thực chất chính là bước điều chế chất III in situ; ii) Ngưng tụ chất III với acid L-pyrogutamic bằng tác nhân hoạt hóa DCC. Dung môi dùng cho phản ứng chính là ethyl acetat; và iii) Cô dung môi phản ứng (ethyl acetat) thu sản phẩm trung gian ester thô, sau đó thủy phân thu sản phẩm cuối dùng pidotimod bằng dung dịch NaOH.

Nhìn chung, phương pháp này không khác phương pháp điều chế chất III trước, sau đó ngưng tụ với acid L-pyrogutamic, sau đó thủy phân sản phẩm. Phương pháp này cũng có một số nhược điểm là phải chiết lấy chất III, sau đó làm khan bằng natri sulfat khan. Sau khi làm khan cũng phải lọc loại natri sulfat. Tiếp đến, phải lọc loại dicyclohexylurea tạo thành từ DCC. Sau khi lọc loại dicyclohexylurea lại cần cô dung dịch rồi mới tiến hành thủy phân. Một phương pháp với nhiều thao tác sẽ gây khó khăn khi triển khai ở quy mô sản xuất. Hơn nữa, khi sử dụng K₂CO₃ và môi trường nước để chuyển ester II từ dạng muối hydroclorid sang dạng ester base (chất III)

Thêm từ từ một lượng ethanol (loại 96%) tương ứng lần lượt bằng 1, 1,5, 1,75, 2 lần lượng nước, vừa thêm, vừa khuấy và nhiệt độ duy trì ở khoảng 60-70°C. Để nguội về nhiệt độ phòng sau đó để ở nhiệt độ 2-8°C qua đêm (~12 giờ) thu được bột kết tinh trắng ánh kim đẹp. Kết quả hiệu suất cuối cùng của phản ứng với từng phương pháp kết tinh được thể hiện trong bảng 3.

khó tránh khỏi một phần ester bị thủy phân giải phóng ra acid, gây thất thoát nguyên liệu ester III ban đầu. Đây cũng là một trong các nguyên nhân làm cho hiệu suất của cả quá trình không cao.

Các phương pháp A2, A3 và A4 về cơ bản là giống nhau, chỉ thay dung môi phản ứng (toluen với A2, DCM với A3, và n-hexan với A4). Trong số các dung môi này DCM (phương pháp A2) cho hiệu suất cao nhất.

Phương pháp A1 sử dụng ethyl acetat làm dung môi phản ứng. Cả hai phương pháp A1 và A2 có điểm chung ở bước 1 là giải phóng ra ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat (III) dạng base trước. Phương pháp A1 sử dụng kali carbonat còn phương pháp A2 sử dụng natri bicarbonat. Về cách tiến hành, phương pháp A1 phức tạp hơn phương pháp A2 ở nhiều bước (chiết thu lấy dạng base từ (R)-ethyl thiazolidin-4-carboxylat hydroclorid trước, sau khi ngưng tụ dạng base này với acid L-pyrogutamic lại chiết nặng thu lấy sản phẩm trung gian ester thô rồi mới thủy phân tạo pidotimod). Cách tiến hành với nhiều thao tác phức tạp này sẽ gặp khó khăn khi triển khai sản xuất. Ngoài ra, sau bước chiết ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat (III) dạng base, mặc dù dịch chiết đã được làm khan bằng natri sulfat khan song có thể vẫn chưa loại được hoàn toàn nước.

Phương pháp A2 đã có sự cải tiến cơ bản. Sau khi giải phóng ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

(III) vào dung môi toluen, phản ứng ngưng tụ với acid L-pyrogultamic được thực hiện tiếp ngay. Sau đó, phản ứng thủy phân được tiến hành nối tiếp mà không qua bước cô dung môi để thu lấy dạng ester trung gian. Vì lý do này mà phương pháp A2 phải sử dụng tác nhân tetrabutylamoni hydrogen sulfat làm xúc tác chuyển pha. Cách tiến hành theo phương pháp A2 rất thuận tiện cho triển khai sản xuất do giảm bớt được nhiều bước cô cất dung môi trung gian. Tuy nhiên, ở bước giải phóng ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat (III), phản ứng giữa NaHCO_3 với HCl kết hợp sinh ra nước nên cần phải loại nước bằng cách hồi lưu dung môi toluen qua ống đựng calci clorid khan. Đây cũng chính là nhược điểm của phương pháp này.

Khảo sát thay đổi một số điều kiện từ phương pháp lựa chọn ở trên

Khảo sát thay đổi tác nhân NaHCO_3 bằng một số base khác

Để khắc phục nhược điểm gây ra bởi NaHCO_3 , một số base khác như triethylamin (TEA), 4-dimethylaminopyridin (DMAP) được khảo sát thay thế cho tác nhân base này.

Kết quả khảo sát cho thấy TEA cho hiệu suất có thể coi như tương đương DMAP. Xét về mặt kinh tế, TEA có giá rẻ hơn so với DMAP. Ngoài ra, việc loại TEA dư cũng thuận lợi hơn so với DMAP do TEA là chất lỏng dễ tạo muối hydroclorid tan trong nước hơn DMAP. Vì vậy TEA được lựa chọn cho khảo sát tiếp về tỷ lệ II/TEA và thời gian, nhiệt độ của bước này. Kết quả thu được điều kiện tỷ lệ II/TEA = 1/1,1, khuấy 2 giờ ở nhiệt độ phòng cho hiệu suất cao và có thể sử dụng cho các nghiên cứu khảo sát tiếp theo.

Khảo sát thay đổi tác nhân hoạt hóa nhóm carboxylic DCC bằng một số tác nhân khác

DCC là tác nhân hoạt hóa nhóm carboxylic khá hiệu quả và được dùng phổ biến ở quy mô phòng thí nghiệm. Tuy nhiên, nhược điểm của DCC là tạo thành dicyclohexylurea không tan và cần phải lọc loại bỏ trước khi tiến hành giai đoạn tiếp theo. Ở quy mô lớn thì đây là một bước không dễ dàng và gây hao hụt sản phẩm. Chính vì vậy một số tác nhân hoạt hóa nhóm carboxylic khác được khảo sát như isobutylchloroformat, *N,N'*-carbodiimidazol (CDI). Một số tác nhân khác như *N*-(3-dimethylaminopropyl)-*N'*-ethylcarbodiimid, HCl hay bis(2-oxo-3-oxazolidinyl) phosphonic

clorid (BOP-Cl) cũng là những tác nhân có thể sử dụng song đây là những tác nhân đắt và cũng không phù hợp cho điều kiện dung môi sử dụng nên chúng tôi không khảo sát.

Kết quả thí nghiệm cho thấy khi sử dụng isobutyl chloroformat, hiệu suất tạo pidotimod giảm mạnh xuống trung bình 65,16%. Kết quả này có thể giải thích là do khả năng hoạt hóa của isobutyl chloroformat yếu hơn so với DCC. Tuy nhiên khi sử dụng tác nhân hoạt hóa là CDI thì hiệu suất phản ứng khá tốt, cao hơn so với khi dùng DCC trung bình khoảng gần 3%. Ngoài ra chúng tôi cũng khảo sát thao tác thêm CDI vào hỗn hợp phản ứng. Thay vì hòa tan CDI vào dung môi phản ứng DCM sau đó nhỏ giọt vào khối phản ứng, có thể thêm từ từ trực tiếp CDI vào khối phản ứng. Kết hợp với khuấy đều hỗn hợp. Cả hai cách đều cho hiệu suất tương tự. Đặc biệt khi sử dụng CDI thì không cần bước lọc loại urea. Đây cũng có thể là lý do hiệu suất tăng do sản phẩm trung gian không bị hao hụt trong quá trình lọc rửa.

Về tỷ lệ mol giữa tác nhân hoạt hóa và acid L-pyrogultamic, cho đến thời điểm này đều được sử dụng là 1:1. Để tìm được tỷ lệ phù hợp cho hiệu suất cao, các tỷ lệ 0,9:1, 1,1:1 đến 1,3:1 đã được khảo sát tiếp theo. Kết quả cho thấy khi tăng tỷ lệ CDI: acid L-pyrogultamic lên 1,1:1 hiệu suất phản ứng tăng rõ lên 82,24%. Khi tỷ lệ mol giữa CDI và acid L-pyrogultamic tăng tiếp lên 1,2:1 hoặc 1,3:1, hiệu suất không tăng thêm. Tuy nhiên, nếu tỷ lệ CDI:acid L-pyrogultamic giảm xuống 0,9:1, hiệu suất giảm mạnh. Nếu tỷ lệ CDI: acid L-pyrogultamic chỉ tăng từ 1:1 lên 1,05:1, hiệu suất tăng không nhiều. Như vậy có thể thấy tỷ lệ CDI:acid L-pyrogultamic = 1,1:1 là phù hợp nhất.

Như vậy, sau một quá trình khảo sát chúng tôi đã lựa chọn được một số điều kiện thay đổi cho phản ứng tổng hợp pidotimod từ IIa cho hiệu suất cao (82,44%), dễ thực hiện và dễ triển khai ở quy mô lớn hơn. Các điều kiện chính như sau: i) Bước 1: chuyển dạng muối hydroclorid II thành dạng base III bằng cách khuấy hỗn dịch II trong DCM với TEA, tỷ lệ mol TEA/II = 1,1; nhiệt độ thường (20-25°C), thời gian khuấy: 2 giờ; ii) Bước 2: tiếp theo, III được ngưng tụ *in situ* với acid L-pyrogultamic, sử dụng tác nhân hoạt hóa là CDI, tỷ lệ mol CDI:acid L-pyrogultamic = 1,1:1, dung môi sử dụng chính là DCM từ bước

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

1; iii) Bước 3: thủy phân pidotimod ethyl ester thành pidotimod thực hiện như đã trình bày trong phương pháp A2 không có gì thay đổi.

Khảo sát thay đổi phương pháp tinh chế

Ở phương pháp A2, sản phẩm thô được thu bằng cách acid hóa dịch phản ứng đến pH 1, sau đó kết tinh lại trong isopropanol-nước để được sản phẩm màu trắng, có nhiệt độ nóng chảy đúng (194-196°C). Tuy nhiên, nhược điểm của isopropanol là khả năng bay hơi thấp hơn một số alcol khác như methanol hoặc ethanol nên quá trình sấy cần thời gian dài hơn cũng như đảo đều liên tục, đặc biệt khi sấy lượng lớn. Ngoài ra, isopropanol có mùi khó chịu.

Xem xét độ tan của pidotimod chúng tôi thấy pidotimod tan khá tốt trong nước, đặc biệt nước nóng, song ít tan trong ethanol. Vì vậy phương pháp tinh chế thân thiện hơn sử dụng ethanol được khảo sát.

Tiến hành phản ứng với các điều kiện đã được lựa chọn ở trên. Sau khi thu được tủa thô màu trắng đục hòa tan vào một lượng nước trong cốc thủy tinh có mỏ, đặt vào nồi cách thủy gia nhiệt 80°C và khuấy nhẹ (bằng đũa thủy tinh). Thêm dần nước cho đến khi tan hoàn toàn ở 80°C, hết khoảng 50 ml. Tỷ lệ tủa thô/nước ~ 1/7. Thêm từ từ một lượng ethanol (loại 96%) tương ứng lần lượt bằng 1, 1,5, 1,75, 2 lần lượng nước, vừa thêm, vừa khuấy và nhiệt độ duy trì ở khoảng 60-70°C. Để nguội về nhiệt độ phòng sau đó để ở nhiệt độ 2-8°C qua đêm (~12 giờ) thu được bột kết tinh trắng ánh kim đẹp.

Kết quả hiệu suất cuối cùng của phản ứng với từng phương pháp kết tinh như sau: Với tỷ lệ EtOH/H₂O = 1,75/1, hiệu suất thu được tương đương khi dùng isopropanol/ H₂O (6/4 = 1,5/1). Chất lượng sản phẩm cũng tương đương. Khi tăng tỷ lệ EtOH lên 2/1 so với nước, lượng sản phẩm thu được tăng lên. Tuy nhiên, tinh thể lẫn màu đục, không còn ánh kim. Nhiệt độ nóng chảy cũng giảm, dấu hiệu của tạp chất lẫn sản phẩm tăng. Kết quả này cho thấy hệ dung môi EtOH/H₂O (1,75/1) với thể tích nước sử dụng = 7 lần khối lượng sản phẩm thô có thể sử dụng làm dung môi kết tinh thay thế cho isopropanol/ H₂O (6/4) ban đầu. Phương pháp này cũng thân thiện hơn và giai đoạn sấy sản phẩm nhanh hơn so với khi sử dụng isopropanol.

Kết luận

Như vậy, chúng tôi đã nghiên cứu được quy trình tổng hợp được pidotimod từ chất trung gian ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat.HCl. Quy trình đã có những cải tiến cơ bản về cách tiến hành cũng như điều kiện phản ứng (tiến hành nhiều bước trong cùng một bình phản ứng, sử dụng TEA để chuyển dạng muối hydroclorid của ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat thành dạng base, dùng CDI làm tác nhân ngưng tụ với acid L-pyroglutamic, sử dụng xúc tác chuyển pha cho bước thủy phân pidotimod ethyl ester thành pidotimod). Hiệu suất tổng hợp pidotimod thu được cao (~82% từ chất trung gian ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat.HCl). Quy trình đã được áp dụng triển khai ở quy mô đến 100 g/mẻ và sản phẩm đã được sử dụng để xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho pidotimod tổng hợp được. Các kết quả liên quan đến xây dựng tiêu chuẩn cơ sở, kiểm nghiệm và theo dõi độ ổn định của pidotimod sẽ được trình bày trong bài báo tiếp theo.

Lời cảm ơn: Đề tài được hoàn thành nhờ kinh phí của đề tài cấp Bộ Y tế cấp cho Nguyễn Hải Nam. Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn.

Tài liệu tham khảo

1. Magni A., Signorelli G., Bocchiola G (1994). "Synthesis and preliminary pharmacological evaluation of pidotimod, its enantiomers, diastereomers and carboxamide derivatives", *Arzeim-Forsch/Drug Res*, 44 (II), 12A, 1402-1404.
2. Cimella T., Orlandi R., Bocchiola G., Anders U., Stradi R. (1994). "Analytical and chemical profile of pidotimod", *Arzeim-Forsch/Drug Res*, 44 (II), 12A, 1405-1410
3. Poli S., Corona L. D. (1990). "Process for the preparation of 3-(L-pyroglutamyl)-L-thiazolidin-4-carboxylic acid derivatives", *US patent No. 5, 110, 936*.
4. Poli S., Corona L. D. (1990). "A process for the preparation of 3-(L-pyroglutamyl)-L-thiazolidin-4-carboxylic acid derivatives", *EP 0 422 566 A1*
5. Poli S., Corona L. D. (1989). "Derivatives of thiazolidin-4-carboxylic acid, its preparation and pharmaceutical compositions containing it", *US Patent N° 4, 839,387*.
6. Poli S., Magni A., Bocchiola G. (1996). "A process for the quantitative synthesis of 3-(L-pyroglutamyl)-L-thiazolidin-4-carboxylic acid and derivatives thereof", *WO/1996/010036*.
7. Lourlet G. (1970). "Synthesis of pyroglutamy [histidylproline]nucleic by classical and solid phase methods", *J. Med. Chem.*, 13 843-845

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

8. Caramia G., Clemente E., Solli R., Mei Y., Cera R., Carnelli V., Venturoli V., Corsini A. (1994), "Efficacy and safety of Pidotimod in the treatment of recurrent respiratory infections in children", *Arzeim-Forsch/Drug Res.*, 44 (II), 12A, 1480-1484.

9. Manzardo S., Falcone A., Pinzetta A., Ieva G., Coppi G. (1994), "General Pharmacology of

Pidotimod and testing for drug interactions", *Arzeim-Forsch/Drug Res.*, 44 (II), 12A, 1441-1447.

10. Quách Hà Văn, Nguyễn Hải Nam (2013), "Nghiên cứu tổng hợp pidotimod: Phần 1. Tổng hợp chất trung gian ethyl (R)-thiazolidin-4-carboxylat", *Tạp chí Dược học*, số tháng 9, 25-29.

(Ngày nhận bài: 13/05/2014 - Ngày duyệt đăng: 06/10/2014)

Tác dụng của NL197... (Tiếp theo trang 42)

Bảng 2: Kết quả định lượng hàm lượng MDA, PC và tỷ lệ GSH/GSSG

MDA (nmol/mg protein)								
TB+S.E	Sal.	Gal.	TMT 2d	Gal.+TMT	GL80+TMT	GL160+TMT	NL12,5+TMT	NL18,5+TMT
	2,84±0,23	1,71±0,16	5,99±0,35	3,14±0,14	3,81±0,13	3,08±0,19	4,37±0,16	5,66±0,28
PC (nmol/mg protein)								
TB+S.E	Sal	Gal.	TMT 2d	Gal.+TMT	GL80+TMT	GL160+TMT	NL12,5+TMT	NL18,5+TMT
	3,81±0,22	3,38±0,32	11,55±0,71	6,37±0,25	7,32±0,37	6,01±0,22	10,48±0,60	10,47±0,33
Tỷ lệ GSH/GSSG								
TB+S.E	Sal.	Gal.	TMT 2d	Gal.+TMT	GL80+TMT	GL160+TMT	NL12,5+TMT	NL18,5+TMT
	43,53±2,35	48,33±2,01	17,41±0,62	35,63±1,90	31,33±1,91	39,51±1,79	27,09±1,37	24,96±1,61

Kết luận

Trimethyltin (TMT) đã được chứng minh gây thoái hóa tế bào thần kinh vùng hải mã [2-4]. Điều trị dài ngày cao chiết nấm linh chi đỏ (*Ganoderma lucidum*) ở liều 80 mg/kg cho hiệu quả chống thoái hóa tế bào thần kinh tốt hơn liều 12,5 mg/kg của dẫn 4(3H)-quinazolinon, NL 197. Hiệu quả này có liên quan đến khả năng chống stress oxy hóa tế bào do TMT gây ra. Thông qua việc định lượng MDA, PC và tỷ lệ GSH/GSSG đã chứng tỏ khả năng bảo vệ tế bào não khỏi quá trình peroxy hóa lipid, oxy hóa protein do tác động của TMT của hợp chất NL 197 và cao chiết từ nấm linh chi đỏ. Linh chi đỏ liều 80 mg/kg có khả năng làm giảm hàm lượng MDA tương đương NL 197 liều 12,5 mg/kg; nhưng lại có khả năng làm giảm hàm lượng PC và tăng tỷ lệ GSH/GSSG cao hơn so với NL 197 liều 12,5 mg/kg. Linh chi đỏ liều 160 mg/kg có khả năng làm tăng tỷ lệ GSH/GSSG cao hơn so với chất đối chứng dương galantamin liều 10 mg/kg.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được thực hiện với sự tài trợ chính của Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh. Nhóm nghiên cứu xin trân trọng cảm ơn.

Tài liệu tham khảo

1. Botsoglou N. A. et al (1994), "Rapid, sensitive, and specific Thiobarbituric acid method for measuring lipid peroxidation in animal tissue, food and feedstuff sample", *J. Agric. Food Chem.*, 42, 1931-1937.
2. Harry G. J., Mcpherson C. A. (2004), "Trimethyltin-Induced Neurogenesis in the Murine Hippocampus", *Neurotox Res.*, 5(8), 623-627.
3. Hoang-Yen P.T. et al (2012), "Protective potential of IL-6 against trimethyltin-induced neurotoxicity in vivo", *Free Radic Biol. Med.*, 52(7), 1159-74
4. MiChang L. W., Tiemeyer T. M., Wenger G. R., McMillan D. E. (1982), "Mouse hippocampus in acute trimethyltin intoxication", *Neurobehav Toxicol Teratol.*, 4, 149-156
5. Trần Phi Hoàng Yến và cộng sự (2013), "Khảo sát tác động chống suy giảm trí nhớ của NL197 và cao chiết nấm linh chi đỏ (*Ganoderma lucidum*) áp dụng mô hình trimethyltin trên chuột nhắt trắng", *Tạp chí Dược học*, 451(53), 2-6.

(Ngày nhận bài: 08/09/2014 - Ngày duyệt đăng: 06/10/2014)