

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP KHÁNG SINH FLOROQUINOLON MOXIFLOXACIN

Lê Nguyễn Thành^{1*}, Trần Hữu Giáp¹, Nguyễn Anh Dũng¹, Văn Thị Mỹ Huệ²,
Nguyễn Thị Minh Hằng¹, Nguyễn Văn Hùng¹

¹Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Trường Đại học Dược Hà Nội

Đến Tòa soạn 11-6-2014; Chấp nhận đăng 4-12-2014

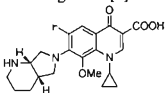
Abstract

The fluoroquinolones are one of the most useful types of synthetic antibacterial agents due to their broad spectrum of activity against gram-positive and gram-negative bacteria and mycoplasma pneumoniae. Moxifloxacin with fewer side effects and extended half life, is a novel fourth-generation fluoroquinolone antibiotic developed by Bayer AG. Moxifloxacin is prescribed for the treatment of bacterial infections, including respiratory, soft tissue, urinary tract, and joint infections. We have synthesized the fluoroquinolone core and the side chain amine. In this paper, we report the synthesis of moxifloxacin using difluoroboron complex method.

Keywords. Fluoroquinolone, antibiotic, moxifloxacin.

1. MỞ ĐẦU

Kháng sinh floroquinolon là một nhóm kháng sinh tổng hợp được sử dụng phổ biến do có phổ điều trị rộng chống vi khuẩn gây bệnh gram (+), gram (-). Moxifloxacin (hình 1) là kháng sinh quinolon thế hệ mới do hãng dược phẩm Bayer nghiên cứu phát triển với ưu điểm là ít tác dụng phụ và thời gian bán thải dài [1-3]. Moxifloxacin được sử dụng để điều trị cho các nhiễm khuẩn đường hô hấp, viêm phổi cộng đồng, nhiễm trùng tiết niệu và khớp. Thêm vào đó, moxifloxacin đang được nghiên cứu trên lâm sàng để sử dụng cho điều trị lao đa kháng thuốc [4].



Moxifloxacin

Hình 1: Cấu trúc hóa học của moxifloxacin và chế phẩm Avelox®

Chúng tôi đã nghiên cứu tổng hợp thành công nhân kháng sinh quinolone và amin mạch nhánh [5, 6]. Kháng sinh Moxifloxacin có thể được tổng hợp bằng cách kết hợp nhân kháng sinh với amin mạch nhánh theo các phương pháp và điều kiện khác nhau [3, 7-10]. Trong khuôn khổ bài báo này, chúng tôi thông báo kết quả nghiên cứu quy trình tổng hợp

kháng sinh moxifloxacin sử dụng phương pháp phức chất difloroboron. Phản ứng tạo thành sản phẩm Moxifloxacin với độ chọn lọc cao và với hiệu suất khá tốt.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, hoá chất

Sắc kí lớp mỏng (SKLM) thực hiện trên bản mỏng silica gel 60F₂₅₄ (Merck) và quan sát dưới đèn UV, bước sóng 254 nm. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz với TMS làm chất nội chuẩn, độ dịch chuyển hóa học được báo cáo theo số liệu ppm. Hóa chất và dung môi được mua từ những nhà cung cấp như công ty hóa chất Aldrich, Merck hay Acros và sử dụng không qua tinh chế.

2.2. Thí nghiệm

2.2.1. Tổng hợp phức difloroboron sử dụng tác nhân HBF₄

Hỗn hợp phản ứng gồm nhân kháng sinh 1 (1 g, 3,1 mmol) và dung dịch HBF₄ trong nước 50 % (5 ml; 31,4 mmol, 10 equiv) cho vào một bình cầu 10 ml. Đun nóng hồi lưu có khuấy trộn ở nhiệt độ 100 °C, theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng. Sau 20

giờ phản ứng kết thúc. Thêm 10 ml nước cất vào hỗn hợp, rồi làm lạnh phản ứng về 0-5 °C, sau 2 giờ đem lọc thu lấy kết tủa và rửa tủa bằng nước cất cho tới khi pH trung tính. Sản phẩm 2 đem sấy khô ở 40-50 °C tới khối lượng không đổi. Khối lượng thu được 0,97 g, hiệu suất là 91,3 %.

2.2.2. Tổng hợp phức difluoroboron sử dụng tác nhân $BF_3 \cdot Et_2O$

Hòa tan nhân kháng sinh 1 (10 g, 30,9 mmol) trong 30 mL THF, sau đó cho thêm tác nhân boron triflorid $BF_3 \cdot Et_2O$ (40 mL, 318 mmol), hỗn hợp được đun hồi lưu ở nhiệt độ 70-75 °C. Kiểm tra tiến độ phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng. Phản ứng kết thúc sau 48 giờ, đưa hỗn hợp về nhiệt độ phòng và để sản phẩm kết tinh ở nhiệt độ thấp. Lọc, rửa bằng diethyl ete thu được sản phẩm 2 với khối lượng 9,27 g, hiệu suất 87,5%.

Bột kết tinh màu trắng; t^0 nc: 270-272°C; 1H -NMR (500MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 9,04 (s, 1H, H-2); 7,98 (m, 1H, H-5); 4,35 (m, 1H, CH-N); 4,10 (s, 3H, OCH_3); 1,29-1,27 (m, 2H, CH_2 -cyclopropyl); 1,21 (m, 2H, CH_2 -cyclopropyl).

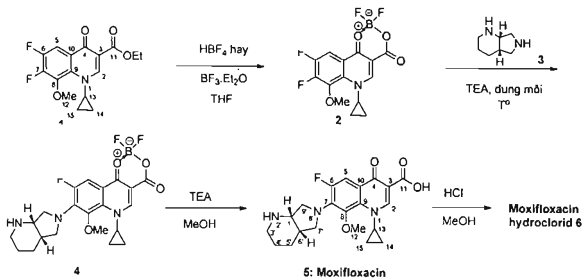
2.2.3. Quy trình chung tổng hợp moxifloxacin (5) từ phức difloroboron (2)

Hòa tan phức difloroboron 2 (1 g, 2,91 mmol)

trong dung môi phản ứng (MeCN, MeOH hay EtOH) (8 mL), sau đó cho triethylamin (0,61 mL, 4,4 mmol), và amin 3 (405 mg, 3,21 mmol). Phản ứng được khuấy trộn ở nhiệt độ phòng hay đun nóng ở nhiệt độ xác định. Kiểm tra tiến trình phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng.

Kết thúc phản ứng, loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm để thu được sản phẩm thô 4 là chất bột màu vàng. Hòa tan lại trong MeOH (5 ml), cho thêm tiếp triethylamin (0,28 mL, 2 mmol) và hỗn hợp được đun nóng ở nhiệt độ 70-80 °C trong 5 giờ. Bốc hơi dung môi dưới áp suất giảm, cho thêm nước và chiết lấy sản phẩm bằng diclometan. Dịch hữu cơ được làm khô qua natri sulfat, lọc và cất loại dưới áp suất giảm.

Sản phẩm 5 thu được có dạng bột màu vàng nhạt; t^0 nc: 206-208 °C; IR (cm^{-1}): 3478, 3168, 2942, 1709, 1623, 1521, 1454, 1318, 1186. 1H -NMR (500MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 8,62 (s, 1H, H-2); 7,60 (d, $J = 14,5$ Hz, 1H, H-5); 4,12-4,10 (m, 1H, H-13); 3,98-3,94 (m, 1H); 3,88-3,86 (m, 1H); 3,54 (s, 3H, H-12); 3,37-3,23 (m, 3H); 2,88-2,86 (m, 1H); 2,54-2,51 (m, 1H); 2,24 (m, 1H); 1,73-1,59 (m, 3H); 1,41 (m, 1H); 1,21-1,17 (m, 1H); 1,13-1,08 (m, 1H); 1,02-0,96 (m, 1H); 0,89-0,84 (m, 1H). ^{13}C -NMR (125MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 175,8; 165,9; 153,7; 149,9; 140,2; 137,3; 134,5; 116,4; 106,3; 106,1; 61,1; 58,5; 56,0; 52,1; 44,4; 40,6; 36,3; 22,9; 21,5; 9,6; 8,1. ESI-MS m/z [M-H] $^-$: 400.



Sơ đồ 1: Quy trình tổng hợp moxifloxacin sử dụng phức difloroboron

2.2.4. Tạo muối Moxifloxacin hydroclorid 6

Lấy 5 g moxifloxacin 5 hòa tan trong hỗn hợp dung môi methanol và diclometan (25 mL: 5 mL). Thêm vào đó dung dịch HCl 3,5 N trong metanol đến khi pH axit, kết tủa moxifloxacin hydroclorid được tạo thành. Để lạnh dung dịch trong vòng 3-4

giờ và lọc để thu được muối moxifloxacin hydroclorid với hiệu suất 90,3 %.

Sản phẩm moxifloxacin hydroclorid 6 thu được có dạng bột màu ngà; t^0 nc: 240-243 °C; 1H -NMR (500MHz, D_2O) δ (ppm): 8,57 (s, 1H, H-2); 6,86 (d, $J = 13,5$ Hz, 1H, H-5); 4,08 (s, 1H); 4,04 (m, 1H); 3,94 (s, 1H); 3,78-3,65 (m, 3H); 3,52 (s, 3H, H-12);

3,35 (m, 1H); 3,06 (m, 1H); 2,77 (s, 1H); 1,87- 1,81 (m, 4H); 1,23 (m, 1H); 1,10 (m, 1H); 1,01 (m, 1H); 0,91 (m, 1H). ^{13}C -NMR (125 MHz, D_2O) δ (ppm): 175,0; 169,0; 152,4; 150,1; 141,2; 137,2; 134,4; 116,7; 106,0; 104,9; 61,7; 55,3; 53,8; 51,8; 42,6; 41,3; 34,4; 20,5; 17,5; 9,4; 8,3.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chúng tôi tiến hành nghiên cứu tổng hợp Moxifloxacin từ nguyên liệu đầu là nhân kháng sinh floroquinolon 1 và amin mạch nhánh 2 thông qua phức difloroboron. Các kết quả nghiên cứu trước đây kết hợp trực tiếp nhân kháng sinh và amin mạch nhánh trong dung môi DMSO đòi hỏi sử dụng lượng amin đầu tiên lớn, phản ứng tạo sản phẩm phụ là đồng phân vị trí, khó tách loại khỏi Moxifloxacin [3]. Tổng hợp Moxifloxacin qua phức chất boron có ưu điểm là phản ứng sẽ chọn lọc vào vị trí F số 7 và chỉ cần sử dụng lượng amin là đồng lượng với nhân moxifloxacin.

Trước tiên, chúng tôi khảo sát sự tạo phức difloroboron của hợp chất nhân kháng sinh (1) với tác nhân HBF_4 và boron trifloride [11, 12]. Kết quả cho thấy phức chất difloroboron được tạo thành với hiệu suất tương ứng là 91,3 % và 87,5 %. Việc sử dụng dung dịch HBF_4 50 % cho hiệu suất cao hơn nhưng tác nhân là đắt tiền và quá trình phản ứng tạo ra HF gây ăn mòn bình phản ứng thủy tinh [12]. Do vậy chúng tôi lựa chọn boron triflorid làm tác nhân tạo phức trên quy mô lớn. Trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton của sản phẩm, có các pic proton H-2 tại 9,04 ppm, pic hydro của vòng benzen tại 7,98 ppm, và pic của nhóm OMe tại 4,10 ppm. Vòng cyclopropyl có các pic 1 hydro ở 4,35 ppm và 4 hydro ở khoảng 1,29 đến 1,21 ppm. Trên phổ proton thấy mất đi pic của nhóm etyl ester của hợp chất nhân floroquinolon. Các tín hiệu phổ thu được là phù hợp với tài liệu tham khảo, cho phép xác định cấu trúc mong muốn [11].

Tiếp theo, chúng tôi tiến hành nghiên cứu phản ứng gắn nhóm amin 3 vào nhân thơm. Phản ứng có tính chọn lọc vị trí do hiệu ứng phân bố lại điện tử của phức chất difluoroboron, và khả năng phản ứng mạnh hơn của nhóm amin trong vòng pyrrolidin, amin 3 tấn công chọn lọc vào vị C-7 của phân tử [2].

Chúng tôi đã tiến hành phản ứng trong các điều kiện dung môi khác nhau lần lượt là acetonitril, metanol, etanol và toluen, phản ứng được đun nóng ở nhiệt độ 80 °C. Các kết quả thu được cho thấy với dung môi acetonitril cho hiệu suất cao nhất là 60,5 %, thời gian phản ứng ngắn. Các dung môi metanol và etanol cho phản ứng hiệu suất khá tương đương nhau đều xấp xỉ 56 %. Phản ứng sử dụng toluen cho hiệu

suất thấp 41,7 % (bảng 1)

Bảng 1: Kết quả khảo sát phản ứng sử dụng dung môi và nhiệt độ khác nhau

TT	Dung môi	Nhiệt độ, °C	Thời gian, giờ	Hiệu suất, %
1	MeCN	80	2	60,5
2	MeOH	80	5	56,1
3	EtOH	80	7	56,6
4	Toluen	80	12	41,7
5	MeCN	50	4	63,7
6	MeCN	25	6	67,8

Tiếp đó chúng tôi sử dụng dung môi axetonitril và khảo sát nhiệt độ phản ứng. Ở nhiệt độ thấp, thời gian phản ứng dài hơn, tuy nhiên hiệu suất phản ứng tăng lên. Chúng tôi thu được sản phẩm moxifloxacin với hiệu suất cao nhất là 67,8 % ở nhiệt độ thường.

Cấu trúc của sản phẩm được xác định bằng các phương pháp phổ hồng ngoại, cộng hưởng tử và phổ khối. Trên phổ hồng ngoại chúng tôi thấy có xuất hiện pic của nhóm N-H ở 3478 cm^{-1} , nhóm xeton và axit tại 1709 cm^{-1} và 1623 cm^{-1} . Trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton bên cạnh các tín hiệu của nhân floquinolon có xuất hiện thêm các pic của amin mạch nhánh với ở các vị trí từ 1,41-3,96. Trên phổ cộng hưởng từ cacbon xuất hiện các pic của nhóm xeton ở 175,8 ppm, pic của nhóm axit 165,9 ppm. 8 pic của nhân quinolon xuất hiện ở khoảng 106,1-153,7 ppm. Pic nhóm metoxy ở vị trí 61,1 ppm trong khi 10 pic của mạch nhánh amin và vòng cyclopropan ở vị trí từ 8,1 đến 58,6 ppm. Phổ khối có pic ion phân tử $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z = 400$ nên pic khối lượng phân tử là 401, tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{FN}_3\text{O}_4$. Các dữ liệu phổ trên cho phép khẳng định cấu trúc của sản phẩm thu được là moxifloxacin. Tiếp đó, chúng tôi tiến hành tạo muối moxifloxacin hydroclorid bằng cách phản ứng với dung dịch HCl trong metanol. Sản phẩm moxifloxacin hydroclorid 6 thu được với hiệu suất 90,3 % có dữ liệu phổ phù hợp với tài liệu tham khảo [13] (bảng 2).

4. KẾT LUẬN

Chúng tôi đã nghiên cứu thành công tổng hợp kháng sinh moxifloxacin bằng phương pháp tạo phức difloroboron. Phản ứng tạo moxifloxacin có hiệu suất tốt, có tính chọn lọc vị trí, không tạo sản phẩm phụ. Phản ứng tạo phức sử dụng $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ là hóa chất thông dụng cho hiệu suất cao, có khả năng sử dụng ở quy mô lớn. Ở phản ứng gắn amin tạo Moxifloxacin, chúng tôi đã khảo sát các điều kiện

dung môi và nhiệt độ của phản ứng. Sử dụng dung môi acetonitril cho hiệu suất cao nhất ở nhiệt độ phòng. Moxifloxacin được tổng hợp với hiệu suất hiệu suất tổng cộng là 60 %. Dạng dược dụng Moxifloxacin hydroclorid thu được từ Moxifloxacin

với hiệu suất 90,3 %. Tổng hợp Moxifloxacin floquinolon như Moxifloxacin hay Moxifloxacin bằng các phương pháp có hiệu quả cao đang được chúng tôi nghiên cứu và báo cáo trong những bài báo tiếp sau.

Bảng 2: Số liệu phổ ^1H và ^{13}C của sản phẩm 5, Moxifloxacin hydroclorid và chất tham khảo (Moxi.HCl)^a

Vị trí C	$^1\text{H-NMR}$ (δ)			$^{13}\text{C-NMR}$ (δ)		
	Moxi 5	Moxi.HCl 6	Moxi.HCl ^a	Moxi 5	Moxi.HCl 6	Moxi.HCl ^a
C-4				175,8	175,0	178,5
C-11				165,9	169,0	172,3
C-2	8,62 (s)	8,57 (s)	8,8 (s)	153,7	152,4	153,4
C-5	7,61 (d)	6,86 (d)	7,2 (d)	106,1	104,9	103,4
C-12	3,54 (s)	3,52 (s)	3,6 (s)	61,1	61,7	64,7
C-13				58,5	55,3	58,5
C-9'				56,0	53,8	57,0
C-7'	2,24-4,12 (m)	2,77-4,08 (m)	2,8-4,4 (m)	52,1	51,9	54,5
C-3'				44,4	42,6	45,6
C-1'				40,6	41,3	44,3
C-6'				36,3	34,4	37,4
C-4'				1,41-1,73 (m)	1,81-1,95 (m)	1,8-2,0 (m)
C-5'				21,5	17,5	20,4
C-15	0,84-1,25 (m)	0,9-1,3 (m)	0,9-1,4 (m)	9,6	9,4	12,4
C-14				8,1	8,3	11,2

^a Đo phổ trong D₂O, ^1H : 200 MHz, ^{13}C : 50 MHz.

Lời cảm ơn. Công trình này được thực hiện trong khuôn khổ đề tài "Nghiên cứu qui trình công nghệ tổng hợp thuốc kháng sinh fluoroquinolon thế hệ mới Moxifloxacin" thuộc chương trình "Nghiên cứu khoa học công nghệ trọng điểm quốc gia phát triển công nghiệp hóa được đến năm 2020" do Bộ công thương cấp kinh phí, mã số đề tài CNHD.DT.038/12-14.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Adrione V. T. *The Quinolones*, Academic Press, (2000).
2. Douglas S. J., Li J. J. *The Art of Drug Synthesis*, Wiley Interscience (2007).
3. Petersen, U., Schenke, T., Krebs, A., Grohe, K., Schriewer, M., Haller, I., Metzger, K. G., Endermann, R., and Zeiler, H.-J. *7-(1-Pyrrolidinyl)-3-quinolone- and naphthyridone-carboxylic acid derivatives as antibacterial agents and feed additives*, US 5607942 (1997).
4. Roly D. Gosling, Leonard O Uiso, Noel E. Sam, Emily Bongard, Esther G. Kanduma, Mramba Nyindo, Richard W. Morris, and Stephen H. Gillespie *The Bactericidal Activity of Moxifloxacin in Patients with Pulmonary Tuberculosis*, American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 168(11), 1573-1577 (2003).
5. Lê Nguyễn Thành, Trần Hữu Giáp, Nguyễn Thị Minh Hằng, Nguyễn Văn Hùng, Châu Văn Minh. *Nghiên cứu quy trình tổng hợp nhân kháng sinh fluoroquinolon ethyl 1-cyclopropyl-6,7-difluoro-1,4-dihydro-8-methoxy-4-oxo-3-quinolinecarboxylat*, Tạp chí Hóa học, 50(3), 323-326 (2012).
6. Lê Nguyễn Thành, Trần Hữu Giáp, Cao Thị Huệ, Nguyễn Thị Minh Hằng, Nguyễn Quốc Vương, Nguyễn Văn Hùng, Châu Văn Minh. *Nghiên cứu tổng hợp amin mạch nhánh của kháng sinh Moxifloxacin*, Tạp chí Hóa học, 51(6ABC), 866-869 (2013).
7. Ludescher Johannes, Pise Abhinay Chandrakant, Holkar Anil Ganpat, Metkar Shashikant, *Process for the Synthesis of Moxifloxacin Hydrochloride*, WO2008138759 (2008).
8. Chava S., et al. *An improved process for the preparation of moxifloxacin hydrochloride*, WO 2005012285 A1 (2005).
9. Dandala R., et al. *New crystalline form of moxifloxacin hydrochloride and process for its preparation*, WO 2006134491 A2 (2006).
10. Gottardo G., Padovan P., Osti S. *Process for the preparation of moxifloxacin hydrochloride and intermediate thereof*, European Patent, EP 2551268A1 (2013).
11. Sanchez J. P.; Gogliotti R. D.; Domínguez J. M.; Gracheck S. J.; Huband M. D.; Sessie J. M.; Cohen M. A.; Shapiro, M. A. *The Synthesis, Str...*

- Activity, and structure-Side Effect Relationships of a Series of 8-Alkoxy and 5-Amino-8-alkoxyquinolone Antibacterial Agents*, J. Med. Chem., **38(22)**, 4478-4487 (1995).
12. Cechetti V., Fravolini A., Palumbo M., Sissi C., Tabarrini O., Terzi P., Xin, T. *Potent 6-Desfluoro-8-methylisoquinolones as New Lead Compounds in Antibacterial Chemotherapy*, J. Med. Chem., **39(25)**, 4952-4957 (1995).
13. Djucevic P., Joksovic L., Jelic R, Djucevic A., Stankov M. J. *Solution Equilibria between Aluminum (III) Ion and some Fluoroquinolone Family Members Spectroscopic and Potentiometric Study*, Chem. Phar Bull., **55(12)**, 1689-1699 (2007).

Liên hệ: Lê Nguyễn Thành

Viện Hóa sinh biển

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Số 18, Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

E-mail: lethanh@imbc.vast.vn.