

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

TRƯỜNG ĐẠI HỌC DƯỢC HÀ NỘI



NGUYỄN THỊ NGỌC HÀ

**NGHIÊN CỨU XÂY DỰNG QUY TRÌNH TỔNG HỢP
LEVOTHYROXIN MONONATRI VÀ LIOTHYRONIN
MONONATRI TỪ L-TYROSIN**

Chuyên ngành: Công nghệ dược phẩm và bào chế thuốc

Mã số: 62720402

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Hà Nội, năm 2016

Công trình này được hoàn thành tại:

- Bộ môn Công nghiệp Dược, trường Đại học Dược Hà Nội
- Bộ môn Bào chế, trường Đại học Dược Hà Nội
- Viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương
- Viện Hóa học, viện Hàn lâm khoa học Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

PGS. TS. Nguyễn Đình Luyện

TS. Nguyễn Văn Hân

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường
họp tại:

Vào hồi: giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại: Thư viện quốc gia Việt Nam

Thư viện trường Đại học Dược Hà Nội

CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Chữ viết tắt	Chữ đầy đủ hoặc nghĩa tiếng Việt
$^{13}\text{C-NMR}$	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon-13 (<i>Carbon13- Nuclear Magnetic Resonance</i>)
$^1\text{H-NMR}$	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (<i>Proton- Nuclear Magnetic Resonance</i>)
Ac	Acetyl ($\text{CH}_3\text{CO-}$)
Acac	Acetyl acetonat
ACN	Acetonitril
DMF	Dimethylformamid [$\text{HCON}(\text{CH}_3)_2$]
eq	Đương lượng (<i>equivalent</i>)
EI	Ion hóa va chạm điện tử (<i>electron impact</i>)
ESI	Ion hóa phun mù điện tử (<i>electrospray ionization</i>)
Et	Ethyl ($\text{C}_2\text{H}_5\text{-}$)
HPLC	Sắc ký lỏng hiệu năng cao (<i>High-performance liquid chromatography</i>)
IR	Phổ hồng ngoại (<i>Infrared Spectrophotometer</i>)
LD_{50}	Liều chết trung bình
Me	Methyl ($\text{CH}_3\text{-}$)
MS	Phổ khối lượng (<i>Mass Spectrometry</i>)
OECD	Tổ chức Hợp tác và Phát triển Kinh tế (<i>Organization for Economic Co-operation and Development</i>)
R_f	Hệ số lưu giữ (<i>retention factor</i>)

T ₂	Diiodothyronin (<i>3,5-diiodo-thyronin</i>)
T ₃	Triiodothyronin, liothyronin (<i>3,5,3'-triiodo-thyronin</i>)
T ₃ Na	Liothyronin natri
T ₃ diNa	Liothyronin dinatri
T ₄	Tetraiodothyronin, levothyroxin (<i>3,5,3',5'-tetraiodo-thyronin</i>)
T ₄ Na	Levothyroxin natri
T ₄ diNa	Levothyroxin dinatri
t _{nc} ^o	Nhiệt độ nóng chảy
Ts	Tosyl (<i>p</i> -CH ₃ -C ₆ H ₄ -SO ₂ -)
TsOH	Acid <i>p</i> -toluensulfonic

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

Khoảng 3 - 5% dân số Việt Nam bị suy tuyến giáp. Bệnh gặp ở nhiều lứa tuổi và nhiều đối tượng. Trẻ em bị suy giáp sẽ chậm lớn và kém phát triển trí tuệ. Bệnh cũng hay gặp ở phụ nữ có thai, gây hậu quả nghiêm trọng đến thai nhi. Ngoài số ít trường hợp suy giáp do dùng thuốc kháng giáp có thể hồi phục khi ngưng thuốc, còn đa số các trường hợp khác đều phải điều trị bằng hormon giáp trạng cả đời.

Hiện nay, nhu cầu sử dụng levothyroxin và liothyronin ở nước ta trong điều trị bệnh là khá lớn mà việc sản xuất nguyên liệu trong nước chưa thực hiện được. Con đường tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri chủ yếu đi từ L-tyrosin, nguyên liệu này có thể điều chế bằng phương pháp thủy phân các nguồn keratin khác nhau như sừng, tóc... Nếu chúng ta tiến hành nghiên cứu, sản xuất thành công levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri thì sẽ chủ động được nguồn nguyên liệu.

Quyết định số 61/2007/QĐ-TTg của Thủ tướng Chính phủ ngày 07/05/2007 về việc phê duyệt “Chương trình nghiên cứu khoa học công nghệ trọng điểm quốc gia phát triển công nghiệp hóa dược đến năm 2020” đã đặt ra cho ngành dược Việt Nam một mục tiêu quan trọng là tăng cường tự sản xuất nguyên liệu làm thuốc, tiến tới chủ động sản xuất thuốc trong nước.

Mục tiêu của luận án

- 1. Xây dựng được quy trình tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri từ L-tyrosin ở quy mô phòng thí nghiệm.*
- 2. Đánh giá được độ ổn định và độc tính cấp của sản phẩm.*

Nội dung của luận án

1. Khảo sát các phương pháp tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri từ L-tyrosin.
2. Chọn ra phương pháp phù hợp để triển khai tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri đạt tiêu chuẩn dược dụng.
3. Đánh giá độ ổn định của 2 sản phẩm ở 2 điều kiện: lão hóa cấp tốc và điều kiện thường.
4. Đánh giá độc tính cấp của 2 sản phẩm.

Những đóng góp mới của luận án

1. Đã xây dựng được quy trình tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri từ L-tyrosin sản xuất trong nước theo phương pháp của J. R. Chalmers và P. Bracco với cải tiến sau:

- Đã thực hiện thành công phản ứng khử hóa hợp chất 3,5-dinitro-4-*p*-methoxyphenoxy-*N*-acetyl-L-phenylalanin ethyl ester ở điều kiện áp suất thường.

- Đã cải tiến phương pháp tạo muối mononatri của levothyroxin và liothyronin bằng cách dùng natri bicarbonat bão hòa thay cho natri carbonat bão hòa.

2. Lần đầu tiên thực hiện thành công phương pháp tạo ether Ullmann trong tổng hợp *O*-methyl-*N*-acetyl-3,5-diiodo-L-thyronin ethyl ester từ phản ứng giữa dẫn chất L-tyrosin và 4-bromoanisol với xúc tác là muối đồng (I) iodid và phối tử sắt (III) acetylacetonat trong môi trường kali carbonat và dung môi dimethyl formamid.

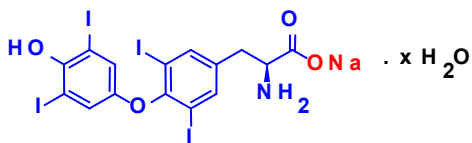
Cấu trúc của luận án

Luận án gồm 135 trang, 50 hình, 38 bảng, 148 tài liệu tham khảo. Bộ cục gồm: Đặt vấn đề (2 trang), Tổng quan (32 trang), Nguyên liệu, trang thiết bị và phương pháp nghiên cứu (9 trang), Thực nghiệm và kết quả nghiên cứu (65 trang), Bàn luận (25 trang), Kết luận và đề xuất (2 trang), Tài liệu tham khảo (17 trang), Danh mục các công trình khoa học đã công bố liên quan đến đề tài luận án (1 trang), Danh mục phụ lục (4 trang), Phụ lục (79 trang).

Chương 1: TỔNG QUAN

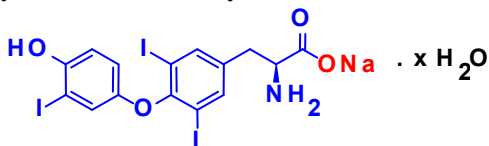
1.1. Tổng quan về levothyroxin và liothyronin

1.1.1. Levothyroxin mononatri hydrat



Hình 1.2. Công thức cấu tạo của levothyroxin mononatri hydrat

1.1.2. Liothyronin mononatri hydrat



Hình 1.4. Công thức cấu tạo của liothyronin mononatri hydrat

1.1.3. Tác dụng dược lý của hormon tuyến giáp

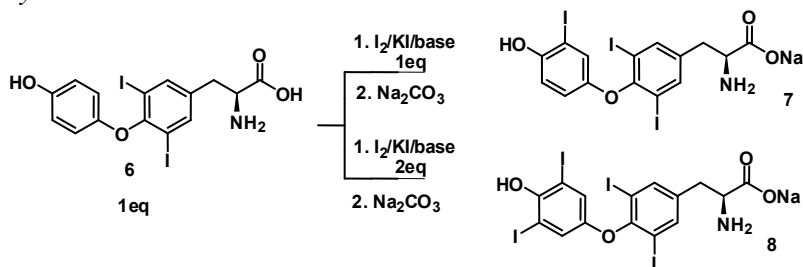
Kích thích các phản ứng trao đổi làm tăng chuyển hoá cơ bản, tăng hấp thu glucose ở ruột và tăng phân huỷ glycogen, nên gây tăng đường huyết, tăng phân huỷ triglycerid, phospholipid và cholesterol, tăng tổng hợp protein. Không đủ hormon tuyến giáp sẽ gây ra bệnh

suy giáp, trẻ chậm lớn và không phát triển trí tuệ, người lớn bị chứng mạch chậm, giảm thân nhiệt, giảm trao đổi chất cơ bản, giảm hoạt động trí não, bướu cổ.

1.2. Các phương pháp tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri

Có 2 phương pháp:

Phương pháp chính tổng hợp qua chất trung gian 3,5-diiodo-L-thyronin:



Hình 1.5. Sơ đồ tổng hợp levothyroxin mononatri (8) và liothyronin mononatri (7) từ 3,5-diiodo-L-thyronin (6)

Trong đó giới thiệu các phương pháp tổng hợp 6: Phương pháp của các tác giả như: C. R. Harington và cộng sự, A. David và cộng sự, W. Siedel và cộng sự, G. Hillmann, J. R. Chalmers và cộng sự (sau này có cải tiến của P. Bracco trong 1 số bước quan trọng), P. Z. Anthony và R. I. Meltzer.

Các phương pháp khác: Phương pháp của Salamonczyk, Phương pháp oxy hóa của L. G. Ginger.

1.3. Các phương pháp tạo hợp chất diaryl ether

Có 4 phương pháp: *Phương pháp ghép đôi nhờ xúc tác Cu:* Phản ứng Ullmann cổ điển; Phản ứng ghép đôi Ullmann các dẫn chất có nhóm

thế ortho; Phản ứng ghép đôi của các acid arylboronic nhờ xúc tác $\text{Cu}(\text{OAc})_2$. *Phản ứng thế ái nhân trong nhân thơm*: Phản ứng thế ái nhân chuẩn; Phản ứng thế ái nhân để tạo phức kim loại-aren; Với muối diaryl iodo. *Phản ứng oxy hóa*: Oxy hóa các phenol. *Các phương pháp khác*.

1.4. Phân tích, lựa chọn hướng nghiên cứu

Qua tổng quan tài liệu và dựa vào xu hướng nghiên cứu trên thế giới đã tổng kết được có 4 phương pháp tổng hợp 2 nguyên liệu từ L-tyrosin: *Phương pháp 1*: Oxy hóa dẫn chất 3,5-diiodo-L-tyrosin theo phương pháp của L. G. Ginger tạo levothyroxin; *Phương pháp 2*: Ngưng tụ với dẫn chất iodonid của G. Hillmann tạo levothyroxin và liothyronin; *Phương pháp 3*: Tổng hợp qua dẫn chất nitro của J. R. Chalmers tạo levothyroxin và liothyronin; *Phương pháp 4*: Tạo cầu nối diaryl ether từ dẫn chất của L-tyrosin với acid 4-methoxyphenylboronic, xúc tác là $\text{Cu}(\text{OAc})_2$ theo tác giả A. David tạo levothyroxin và liothyronin.

Từ các phương pháp trên chúng tôi dự định tiến hành khảo sát để tìm ra phương pháp phù hợp nhất với điều kiện thiết bị hiện có và có thể triển khai tổng hợp ở quy mô lớn hơn. Đồng thời nghiên cứu phương pháp tạo ether Ullmann giữa một aryl halogenid và L-tyrosin để tạo liên kết ether của hormon giáp trạng với hy vọng sẽ có đóng góp mới về mặt khoa học, sau đó tiến hành nghiên cứu tiếp khả năng ứng dụng vào thực tế sản xuất.

Chương 2: NGUYÊN LIỆU, TRANG THIẾT BỊ VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu, hóa chất, dung môi sử dụng trong nghiên cứu đều là loại đạt tiêu chuẩn tổng hợp. Các dung môi sắc ký đạt tiêu chuẩn dùng cho HPLC.

2.2. Thiết bị nghiên cứu

Sử dụng các thiết bị tổng hợp hóa dược chuyên dụng, các thiết bị dùng để định tính, định lượng tin cậy của trường Đại học Dược Hà Nội, viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam, viện Kiểm nghiệm thuốc trung ương.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp tổng hợp hóa học

Bằng các phản ứng hữu cơ cơ bản: iodo hóa, acetyl hóa, ester hóa, oxy hóa, thủy phân, nitro hóa, ngưng tụ, khử hóa, diazo hóa và phản ứng tạo muối natri từ phenol, từ acid carboxylic.

2.3.2. Phương pháp kiểm tra độ tinh khiết

Theo 2 phương pháp: Nhiệt độ nóng chảy và Sắc ký lớp mỏng.

2.3.3. Phương pháp phân tích cấu trúc

Để phân tích, khẳng định cấu trúc của các chất tổng hợp, đề tài đã sử dụng phương pháp phổ: IR, MS, $^1\text{H-NMR}$ $^{13}\text{C-NMR}$.

2.3.4. Phương pháp kiểm nghiệm

Theo USP 34 đối với T3Na và BP 2010 đối với T4Na.

2.3.5. Phương pháp đánh giá độ ổn định

- Đối tượng thử: 3 lô đóng lọ PE, tránh ánh sáng.
- Điều kiện thử nghiệm: Điều kiện lão hóa cấp tốc: Nhiệt độ $40 \pm 2^\circ\text{C}$; độ ẩm: $75 \pm 5\%$. Điều kiện thường: Nhiệt độ thường $30 \pm 2^\circ\text{C}$; độ ẩm: $75 \pm 5\%$

- Các chỉ tiêu khảo sát: tính chất, góc quay cực riêng, mất khối lượng do làm khô, giới hạn tạp chất liên quan và hàm lượng (theo USP 34 đối với liothyronin mononatri và theo BP 2010 đối với levothyroxin mononatri).

2.3.6. Phương pháp đánh giá độc tính cấp

Mô hình liều cố định theo hướng dẫn của OECD.

2.3.7. Xử lý và biểu thị các kết quả nghiên cứu

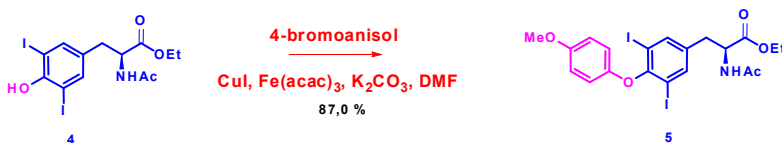
Các kết quả nghiên cứu được xử lý bằng công cụ thống kê thích hợp.

Chương 3: THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Tổng hợp *O*-methyl-*N*-acetyl-3,5-diiodo-*L*-thyronin ethyl ester

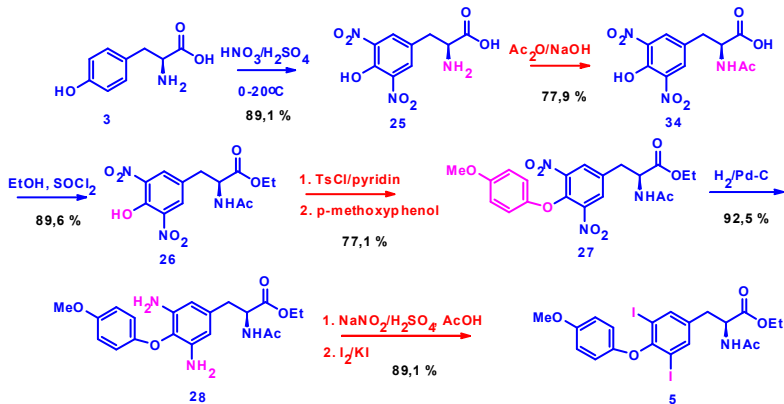
Đây là bước tạo cấu trúc diaryl ether, là phản ứng “chìa khóa” của quy trình. Tổng hợp theo 3 phương pháp sau:

3.1.1. Phương pháp mới tổng hợp *O*-methyl-*N*-acetyl-3,5-diiodo-*L*-thyronin ethyl ester (5)- Ứng dụng phương pháp tạo ether Ullmann



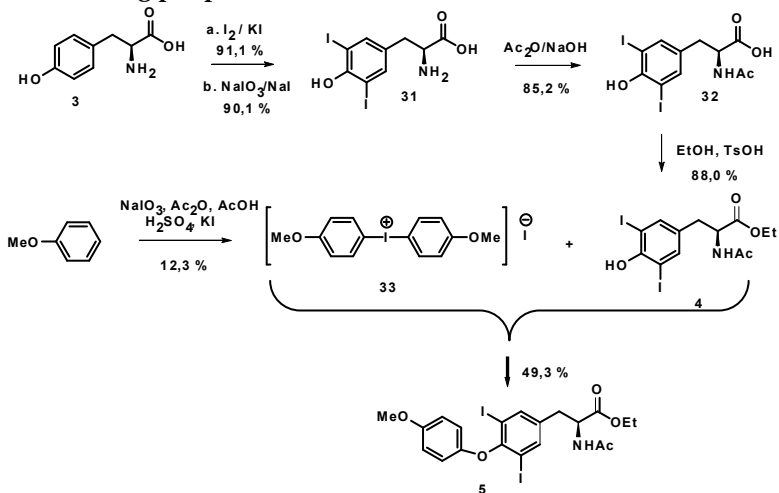
Hình 3.2. Phản ứng tạo 5 theo phương pháp Ullmann

3.1.2. Phương pháp của J. R. Chalmers và P. Bracco



Hình 3.3. Sơ đồ tổng hợp 5 theo phương pháp J. R. Chalmers và P. Bracco

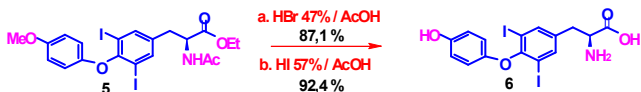
3.1.3. Phương pháp của G. Hillmann



Hình 3.4. Sơ đồ tổng hợp 5 theo phương pháp của G. Hillmann

3.2. Tổng hợp 3,5-diiodo-L-thyronin

Dùng 2 tác nhân: HBr 47% hoặc HI 57%:

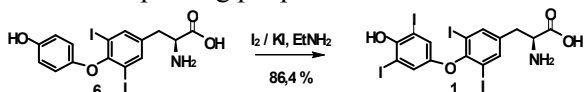


Hình 3.5. Sơ đồ tổng hợp 3,5-diiodo-L-thyronin (6)

3.3. Tổng hợp và tinh chế levothyroxin mononatri

3.3.1. Tổng hợp levothyroxin (1)

Tổng hợp 1 từ 6 theo phương pháp của J. R. Chalmers và P. Bracco.



3.3.2. Tinh chế levothyroxin

Kết tinh qua dạng muối dinatri.

Kết quả: t_{nc}° : 235-236°C; $R_f = 0,22$ [$NH_4OH-2-C_3H_7OH-CH_3COOC_2H_5$ (20:35:55)]; **HPLC**: không có pic lạ, thời gian lưu mẫu thử và mẫu chuẩn bằng nhau ($t_R = 5,8$ phút). Điều kiện sắc ký: Pha động: hỗn hợp (ACN : H_2O) = (60 : 40); thêm 0,5 mL acid H_3PO_4 trong 1000,0 mL. Tốc độ dòng: 1,5 mL/phút. Cột C_{18} - Phenomenex 4,6 mm x 25 cm, 5 μ m; bước sóng 225 nm; **Kết quả phân tích phổ:** **IR** (KBr), ν_{max} (cm^{-1}): 3243 (OH_{phenol}); 3080 ($C-H_{thom}$); 1638 ($C=O_{carboxylic}$); 2974 và 2885 ($C-H_{no}$); 2599 (N^+-H_{muoi} nội phân tử); 1638 ($C=O_{carboxylat}$ muối nội phân tử); 1559 ($C=C_{thom}$); 1178 ($C-O_{diaryl}$ ether); 526 (C-I). **ESI-MS** (m/z): 777,5 [$M+H$]⁺ (CTPT $C_{15}H_{11}I_4NO_4$, $M = 776,87$). **^1H-NMR** (500 MHz, $DMSO-d_6$), δ (ppm): 2,8 (1H, dd,

$^2J_{H3a-H3b} = 14,0$ Hz, $^3J_{H3a-H2} = 8,0$ Hz, H-3a); 3,1 (1H, dd, $^2J_{H3b-H3a} = 14,0$ Hz, $^3J_{H3b-H2} = 4,0$ Hz, H-3b); 3,5 (1H, dd, $^3J_{H2-H3a} = 7,5$ Hz, $^3J_{H2-H3b} = 4,5$ Hz, H-2); 7,1 (2H, s, H-2'', H-6''); 7,8 (2H, s, H-2', H-6').

$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 34,8 (C-3); 54,7 (C-2); 87,8 (C-3'', C-5''); 91,8 (C-3', C-5'); 125,0 (C-2'', C-6''); 139,0 (C-1'); 140,9 (C-2', C-6'); 150,1 (C-4''); 151,0 (C-1''); 151,4 (C-4'); 169,4 (C=O_{carboxylic}).

3.3.3. So sánh và lựa chọn phương pháp tổng hợp levothyroxin

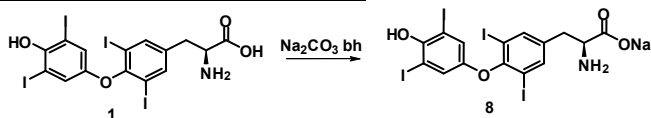
Bảng 3.6. So sánh các phương pháp tổng hợp levothyroxin

Đặc điểm	Phương pháp G. Hillmann	Phương pháp J. R. Chalmers và P. Bracco	Phương pháp tạo ether Ullmann
<i>Số phản ứng</i>	7	8	5
<i>HS 5 từ L-tyrosin (%)</i>	33,3	40,9	58,8
<i>HS 5 từ phản ứng có dùng Iod (%)</i>	33,3	82,4	58,8
<i>Các đặc điểm khác</i>	Hợp chất iodon 33 dễ gây nổ, khó tinh chế, hiệu suất thấp (12,2%)	Các phản ứng không quá phức tạp, trang thiết bị phù hợp với điều kiện hiện có. Quy trình khá ổn định. Không dùng iod từ đầu.	Phương pháp mới, khó tinh chế sản phẩm của phản ứng ether hóa, dùng iod ngay từ phản ứng đầu.

3.3.4. Tạo levothyroxin mononatri (8)

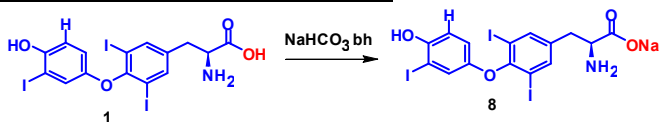
Khảo sát 2 phương pháp tạo muối với 2 tác nhân là Na_2CO_3 bão hòa và NaHCO_3 bão hòa. Hiệu suất tạo muối của 2 phương pháp tương đương nhau (78,0 %).

Tạo muối với natri carbonat bão hòa:



Kết quả: t_{nc}^o : 206,5-208,9 (phân hủy); R_f [CHCl_3 -MeOH-HCOOH (70:15:15)] = 0,42; Góc quay cực riêng: $+18,5^\circ$ (C = 2 trong HCl 0,2M / EtOH 96%); Hàm lượng: 97,9 %; Kết quả phân tích phổ: **IR** (KBr), ν_{\max} (cm^{-1}): 3458 (NH_2); 3060 (C-H_{thơm}); 2910 (C-H_{no}); 1591 (C=O_{carboxylat}); 1534 (C=C_{thơm}); 1242 và 1137 (C-O_{diaryl ether}); 543 và 436 (C-I). **ESI-MS** (m/z): 799,4 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (CTPT $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{I}_4\text{NNaO}_4$, M = 798,85). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 2,8 (1H, dd, $^2J_{\text{H}3\text{a}-\text{H}3\text{b}} = 14,0$ Hz, $^3J_{\text{H}3\text{a}-\text{H}2} = 8,0$ Hz, H-3a); 3,1 (1H, dd, $^2J_{\text{H}3\text{b}-\text{H}3\text{a}} = 14,0$ Hz, $^3J_{\text{H}3\text{b}-\text{H}2} = 4,0$ Hz, H-3b); 3,5 (1H, dd, $^3J_{\text{H}2-\text{H}3\text{a}} = 7,5$ Hz, $^3J_{\text{H}2-\text{H}3\text{b}} = 4,5$ Hz, H-2); 7,0 (2H, s, H-2'', H-6''); 7,8 (2H, s, H-2', H-6'). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 35,1 (C-3); 55,0 (C-2); 87,9 (C-3'', C-5''); 91,8 (C-3', C-5'); 124,91 (C-2'', C-6''); 139,2 (C-1'); 140,9 (C-2', C-6'); 148,2 (C-4''); 151,6 (C-1''); 153,4 (C-4'); 169,6 (C=O_{carboxylat}).

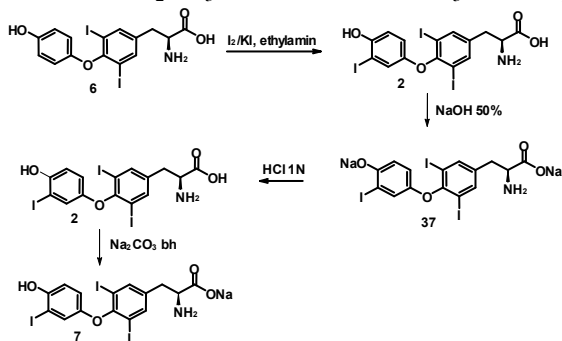
Tạo muối với natri bicarbonat bão hòa:



Kết quả: t_{nc}° : 207-209°C; R_f [CHCl₃-MeOH-HCOOH (70:15:15)] = 0,42; Góc quay cực riêng: +18,5° (C=2 trong HCl 0,2M/ EtOH 96%).

3.4. Tổng hợp và tinh chế liothyronin mononatri

Gồm 2 giai đoạn: Tổng hợp liothyronin từ 3,5-diiodo-L-thyronin (tinh chế qua muối dinatri); và Tạo muối mononatri (khảo sát với 2 tác nhân tạo muối là Na₂CO₃ bão hòa và NaHCO₃ bão hòa).



Hình 3.9. Sơ đồ phản ứng tạo liothyronin natri (7)

Kết quả:

Liothyronin: t_{nc}° : 236-237°C; R_f = 0,32 [NH₄OH-2-C₃H₇OH-CH₃COOC₂H₅ (20:35:55)]; **HPLC:** không có pic lạ, thời gian lưu mẫu thử và mẫu chuẩn bằng nhau (t_R = 4,3 phút). Điều kiện sắc ký: Pha động: hỗn hợp (ACN : H₂O) = (60 : 40); thêm 0,5 mL acid H₃PO₄ trong 1000,0 mL. Tốc độ dòng: 1,5 mL/phút. Cột C₁₈ - Phenomenex 4,6 mm x 25 cm, 5μm; bước sóng 225 nm; **Kết quả phân tích phổ:** IR (KBr), ν_{max} (cm⁻¹): 3178 (OH_{phenol}); 3035 (C-H_{thom}); 2762 (N⁺-H_{muối} nội phân tử); 1599 (C=O_{carboxylat} muối nội phân tử); 1570 và 1496 (C=C_{thom}); 1246 và 1175 (C-O_{diaryl ether}); 534 (C-I). **ESI-MS** (m/z): 651,6 [M+H]⁺ (CTPT C₁₅H₁₂I₃NO₄, M = 650,97). **¹H-NMR**

(500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 2,8 (1H, dd, $^2J_{\text{H}_{3\text{a}}-\text{H}_{3\text{b}}} = 14,0$ Hz, $^3J_{\text{H}_{3\text{a}}-\text{H}_2} = 8,0$ Hz, H-3a); 3,1 (1H, dd, $^2J_{\text{H}_{3\text{b}}-\text{H}_{3\text{a}}} = 14,0$ Hz, $^3J_{\text{H}_{3\text{b}}-\text{H}_2} = 4,0$ Hz, H-3b); 3,5 (1H, dd, $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_{3\text{a}}} = 7,5$ Hz, $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_{3\text{b}}} = 4,5$ Hz, H-2); 6,6 (1H, dd, $^3J_{\text{H}_{5''}-\text{H}_{6''}} = 9,0$ Hz, $^4J_{\text{H}_{5''}-\text{H}_{3''}} = 3,0$ Hz, H-5''); 6,8 (1H, d, $^3J_{\text{H}_{6''}-\text{H}_{5''}} = 9,0$ Hz, H-6''); 7,0 (1H, d, $^4J_{\text{H}_{2''}-\text{H}_{6''}} = 3,0$ Hz, H-2''); 7,8 (2H, s, H-2', H-6'). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 34,9 (C-3); 54,9 (C-2); 84,5 (C-3''); 91,9 (C-3', C-5''); 115,1 (C-5''); 116,2 (C-6''); 124,4 (C-2''); 138,8 (C-2', C-6'); 140,8 (C-1'); 148,9 (C-4'); 151,9 (C-1''); 152,1 (C-4''); 169,1 (C=O_{carboxylic}).

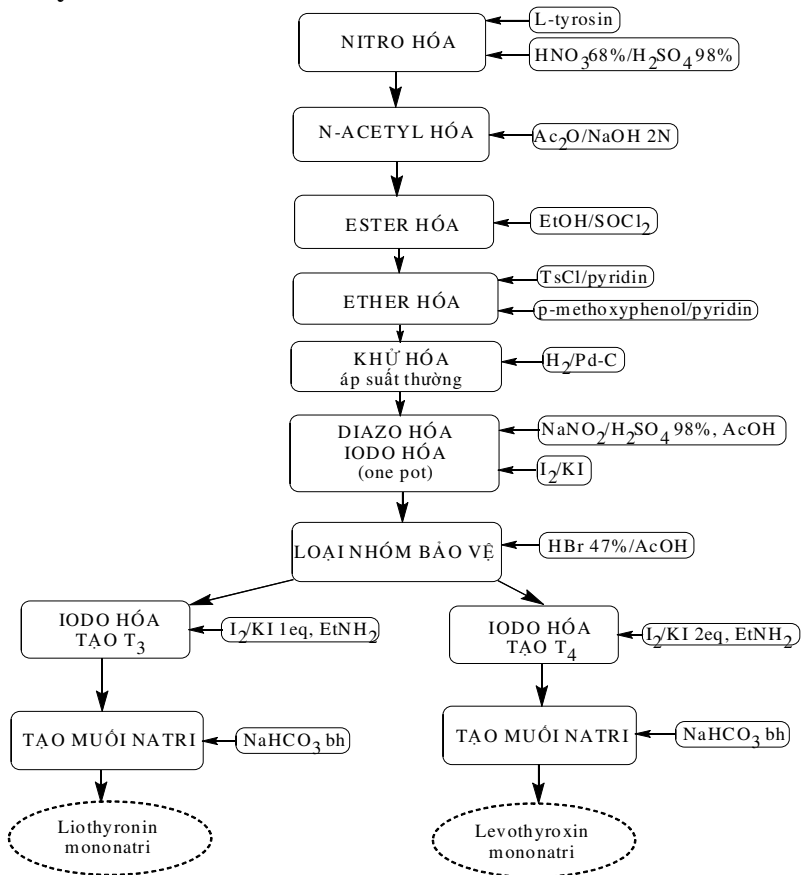
Liothyronin mononatri:

Khảo sát 2 phương pháp tạo muối mononatri với 2 tác nhân tạo muối là Na_2CO_3 bão hòa và NaHCO_3 bão hòa. Hiệu suất tạo muối của 2 phương pháp tương đương nhau (71,1 %).

Kết quả: t_{nc}^o : 205-206°C (phân hủy); $R_f = 0,31$ [CHCl_3 - MeOH - HCOOH (70:15:15)]; *Hàm lượng*: 98,2%; *Kết quả phân tích phổ:*
IR (KBr), ν_{max} (cm^{-1}): 3389 (NH_2); 2963 (C-H_{thom}); 1618 (C=O_{carboxylat}); 1498,08 (C=C_{thom}); 1246,27 (C-O_{diaryl ether}); 498,87 và 456,01 (C-I). **ESI-MS** (m/z): 673,64 [$\text{M}+\text{H}$]⁺ (CTPT $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{I}_3\text{NNaO}_4$, $\text{M} = 672,96$). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 2,8 (1H, dd, $^2J_{\text{H}_{3\text{a}}-\text{H}_{3\text{b}}} = 14,0$ Hz, $^3J_{\text{H}_{3\text{a}}-\text{H}_2} = 8,0$ Hz, H-3a); 3,1 (1H, dd, $^2J_{\text{H}_{3\text{b}}-\text{H}_{3\text{a}}} = 14,0$ Hz, $^3J_{\text{H}_{3\text{b}}-\text{H}_2} = 4,0$ Hz, H-3b); 3,4 (1H, dd, $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_{3\text{a}}} = 7,5$ Hz, $^3J_{\text{H}_2-\text{H}_{3\text{b}}} = 4,5$ Hz, H-2); 6,6 (1H, dd, $^3J_{\text{H}_{6''}-\text{H}_{5''}} = 9,0$ Hz, $^4J_{\text{H}_{6''}-\text{H}_{3''}} = 3,0$ Hz, H-6''); 6,8 (1H, d, $^3J_{\text{H}_{5''}-\text{H}_{6''}} = 9,0$ Hz, H-5''); 7,0 (1H, d, $^4J_{\text{H}_{2''}-\text{H}_{6''}} = 3,0$ Hz, H-2''); 7,8 (2H, s, H-2', H-6'). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO- d_6), δ (ppm): 35,3 (C-3); 55,1 (C-2); 84,5 (C-3''); 92,0 (C-3', C-5''); 115,1 (C-5''); 116,1 (C-6''); 124,4 (C-2''); 139,1 (C-2', C-6');

140,8 (C-1'); 148,9 (C-4'); 151,8 (C-1''); 152,1 (C-4''); 170,0 (C=O_{carboxylat}).

3.5. Triển khai quy trình tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri



Hình 3.11. Sơ đồ quy trình tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri

Khối lượng L-tyrosin: 525,0 g. Hiệu suất toàn chặng: levothyroxin mononatri đặđ 27,4 %, liothyronin mononatri đặđ 23,0 %. Các phầứng cho hiệu suất trườg đốứ ổn địnհ.

3.6. Kiểm tra chất lượng sản phẩm theo tiêu chuẩn dược điểứ

Nguyên liệứ liothyronin mononatri tồứg hợp đượứ đặđ các tiêu chuẩn theo USP 34 và levothyroxin mononatri tồứg hợp đượứ đặđ các tiêu chuẩn theo BP 2010.

3.7. Đấứnh giá độ ổn địnհ của sản phẩm

Số liệứ độ ổn địnհ ở điểứ kiện lão hóứ cấứp tốc cho thấứ 2 sản phẩm không có biểứn đốứ đáng kể về các chỉ tiêu chất lượng đấứ theo dõi. Dữ liệứ độ ổn địnհ dài hạn cho thấứ hàm lượng trong giới hạn qui địnհ. Tuổi thọ của levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri đượứ dự đốứ đoán lầứn lượt là 26 thắứng và 30 thắứng.

3.8. Đấứnh giá độc t ínհ cấứp

Cả hai nguyên liệứ không độc, không xác địnհ đượứ LD₅₀.

Chương 4: BẦỨN LUẬỨN

4.1. Về tồứg hợp hóứ

4.1.1. Các phương pháp tồứg hợp 3,5-diiodo-L-thyronin

Qua tồứg quan tài liệứ chúng tôi tìm đượứ 5 phương pháp tồứg hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri từ L-tyrosin. Trong đốứ có 2 phương pháp chúng tôi không khắứo sát: Phương pháp oxy hóứ dẫn chất 3,5-diiodo-L-tyrosin theo phương pháp của L. G. Ginger; và Phương pháp tạo cầu nối diaryl ether từ dẫn chất của L-tyrosin với acid 4-methoxyphenylboronic, xúức táức là Cu(OAc)₂ theo táức giả A. David.

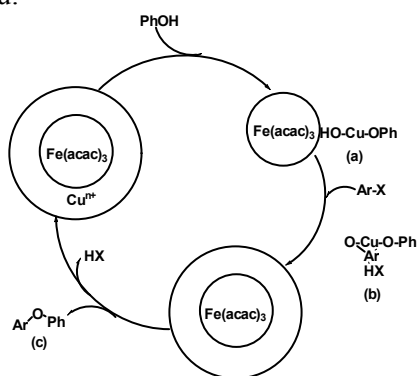
Đấứ khắứo sát 3 phương pháp sau đấứ:

Phương pháp mới sử dụng phản ứng tạo diaryl ether của

Ullmann: Cách đây hơn 100 năm, Ullmann đã đưa ra phương pháp tạo ether giữa phenol và aryl halogenid. Xúc tác cho phản ứng là bột đồng nguyên tố hay các muối đồng với lượng lớn, nhiệt độ phản ứng thường cao. Trong suốt hơn 100 năm qua đã có hàng trăm công trình tổng hợp ether theo phương pháp tạo ether Ullmann cổ điển được công bố, nhưng đặc biệt chưa có công trình nào áp dụng trong tổng hợp hormon giáp trạng. Trường hợp các aryl halogenid có nhóm thế *ortho* tạo phức với Cu như triazen hoặc trifluoroacetamid thì phản ứng có thể xảy ra ở nhiệt độ thấp hơn các phản ứng Ullmann cổ điển. Trường hợp trong phản ứng thay thế các aryl halogenid bằng các acid arylboronic thì phản ứng có thể xảy ra ở nhiệt độ phòng với các xúc tác như Cu (II) acetat, triethylamin hoặc pyridin. Phương pháp này đã được áp dụng trong tổng hợp levothyroxin với hiệu suất tạo ether là 81 %. Không chỉ dừng ở đó, đến năm 2010, hai tác giả người Trung Quốc là Xiaoyan Liu và Songlin Zhang cùng cộng sự đã tiếp tục cải tiến phương pháp tạo ether Ullmann kết hợp xúc tác Cu/Fe đã làm giảm đáng kể lượng chất xúc tác. Các tác giả này đã tổng hợp thành công cấu trúc diaryl ether của hàng chục chất với quy mô lớn và hiệu suất tương đối tốt. Nghiên cứu của Xiaoyan Liu và Songlin Zhang cùng cộng sự tạo ý tưởng cho chúng tôi trong quá trình tìm kiếm phương pháp mới tổng hợp cấu trúc diaryl ether của hormon giáp trạng. Chúng tôi thử nghiệm phản ứng tạo cấu trúc diaryl ether giữa 3,5-diiodo-*N*-acetyl-L-tyrosin ethyl ester và 4-bromoanisol với xúc tác là các nguồn đồng và phối tử là các nguồn sắt. Nghiên cứu bước đầu cho thấy, phản ứng có nhiều ưu điểm như: dễ tiến hành, thích

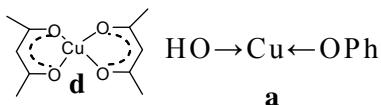
hợp để nâng cấp quy trình. Tuy nhiên cũng có một số vấn đề cần khắc phục như khi tiến hành phản ứng phải đặc biệt tránh nước, tất cả các chất tham gia phản ứng cũng như dung môi phải đảm bảo khan để hợp chất 4-brommoanisol không bị thủy phân tạo ra hợp chất phenol. Đồng thời khi kết thúc phải tiến hành xử lý ngay để tránh phản ứng thủy phân sản phẩm trong môi trường kiềm.

Về cơ chế của phản ứng, theo Ying-Peng Zhang và cộng sự, có thể giải thích như sau:



Hình 4.1. Sơ đồ cơ chế phản ứng tạo cấu trúc diaryl ether giữa phenol và aryl halogenid

Kết quả khảo sát ảnh hưởng của xúc tác tới hiệu suất phản ứng: xúc tác CuI cho hiệu suất phản ứng cao nhất, điều đó có thể giải thích như sau: Trong hỗn hợp phản ứng, đồng tồn tại dưới 2 dạng phức (**d**) và (**a**):



Cu (I) thường tạo phức với số phối trí 2, do đó nếu dùng xúc tác Cu (I) thì ưu tiên phức (**a**). Cu (II) thường tạo phức với số phối trí 4, do đó nếu dùng xúc tác Cu (II) thì ưu tiên phức (**d**). Phức (**a**) tham gia vào chu trình phản ứng theo cơ chế phản ứng đã đề cập ở trên nên hiệu suất phản ứng cao nhất khi dùng xúc tác CuI.

Kết quả khảo sát sự ảnh hưởng của phối tử: phối tử Fe(acac)₃ cho hiệu suất phản ứng cao nhất, có thể giải thích do có cấu trúc phức chất khác hẳn cấu trúc thông thường của các phối tử khác nên khả năng tham gia phản ứng của phối tử sắt (III) acetylacetonat cao nhất.

Mặc dù hiệu suất của phản ứng tạo ether theo phương pháp Ullmann tương đối cao nhưng do thời gian nghiên cứu hạn hẹp và nguyên liệu đắt tiền là iod lại được dùng ngay từ phản ứng đầu tiên của quy trình nên việc áp dụng để triển khai sản xuất trong thời điểm này là chưa thích hợp.

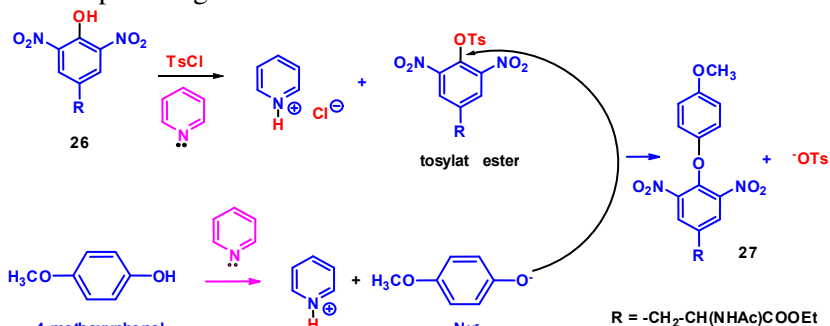
Phương pháp qua hợp chất nitro của tác giả J. R. Chalmers và P.

Bracco: Chúng tôi thực hiện các phản ứng trên cơ sở kết hợp phương pháp của J. R. Chalmers và P. Bracco. Tuy quy trình có số bước phản ứng nhiều nhất nhưng các phản ứng không quá khó thực hiện, đặc biệt đến phản ứng cuối mới dùng iod là nguyên liệu đắt tiền và hiệu suất tính từ phản ứng có dùng iod cao nhất. Phương pháp được lựa chọn để triển khai tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri.

Về phản ứng “chìa khóa”- tạo ether của quy trình: Phản ứng được khảo sát với 2 phương pháp: phương pháp của J. R. Chalmers và phương pháp của P. Bracco. Phương pháp của P. Bracco cho hiệu suất cao hơn phương pháp của J. R. Chalmers, việc thu sản phẩm

không phải qua giai đoạn chiết với dung môi dicloromethan, thích hợp khi triển khai ở quy mô lớn hơn. Tuy nhiên, cả hai quy trình đều phải lưu ý giai đoạn cất loại pyridin.

Cơ chế phản ứng:



Hình 4.3. Cơ chế phản ứng tạo cấu trúc diaryl ether trong phương pháp của J. R. Chalmers và P. Bracco

Cơ chế phản ứng cho thấy điểm mấu chốt ảnh hưởng đến hiệu suất phản ứng này là tỉ lệ mol giữa 4-methoxyphenol và hợp chất dinitro **26**, cách thêm 4-methoxyphenol và dung môi. Việc hòa tan 4-methoxyphenol trong pyridin tạo nucleophile $4\text{-MeO-C}_6\text{H}_4\text{O}^-$ sau đó nhỏ từ từ vào khối phản ứng, thúc đẩy phản ứng xảy ra nhanh hơn, tăng đáng kể hiệu suất, giảm lượng 4-methoxyphenol sử dụng.

Phương pháp của P. Bracco không chỉ làm tăng hiệu suất của phản ứng mà việc tách và tinh chế sản phẩm của phản ứng cũng được đơn giản hóa so với phương pháp của J. R. Chalmers. Việc tiến hành phản ứng một giai đoạn trong pyridin cho thấy quy trình thích hợp để triển khai quy trình ở quy mô lớn hơn.

Phương pháp qua muối iodoni của G. Hillmann: Tổng hợp **6** theo con đường qua muối iodoni qua 5 giai đoạn. Hiệu suất 3 phản ứng đầu tiên tương đối cao, hiệu suất toàn chặng 33,3% (không tính hiệu suất phản ứng tổng hợp muối iodoni). Riêng phản ứng tổng hợp muối iodoni, dùng đến các nguyên liệu natri iodat và kali iodid đắt tiền, nhưng cho hiệu suất rất thấp (12,3%). Hơn nữa, sản phẩm khó tinh chế và dễ gây nổ. Do vậy khó làm phản ứng với cỡ mẻ lớn hơn. Một số khảo sát thay đổi tỉ lệ natri iodat và anhydrid acetic nhưng không tăng được hiệu suất phản ứng.

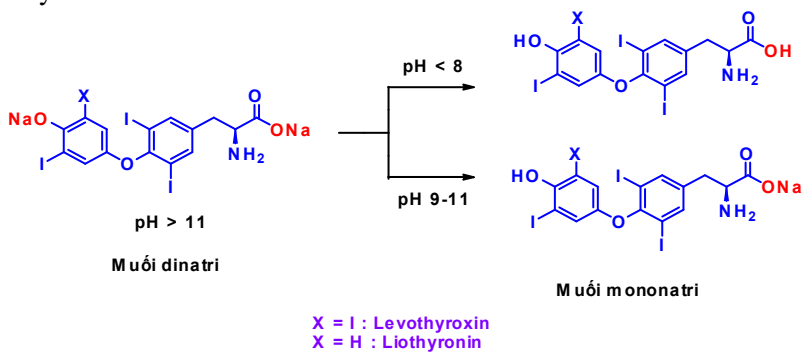
4.1.2. Về quá trình tổng hợp levothyroxin và liothyronin từ 3,5-diiodo-L-thyronin

Việc định hướng sản phẩm của phản ứng iodo hóa 3,5-diiodo-L-thyronin (**6** hoặc **T₂**) để được levothyroxin hay liothyronin khác nhau ở tỷ lệ mol I₂/3,5-diiodo-L-thyronin, tốc độ tiến hành phản ứng iodo hóa và nhiệt độ của phản ứng. Với tỷ lệ mol I₂/3,5-diiodo-L-thyronin = 1/1 thì quá trình iodo hóa chủ yếu xảy ra ở 1 vị trí *ortho*- so với nhóm OH phenol của 3,5-diiodo-L-thyronin. Với tỷ lệ mol I₂/3,5-diiodo-L-thyronin ≥ 2 sẽ tạo levothyroxin. Để hạn chế sự tạo thành levothyroxin trong phản ứng tổng hợp liothyronin, cần lưu ý dùng đúng tỉ lệ mol I₂/3,5-diiodo-L-thyronin và hạn chế tốc độ phản.

4.1.3. Phương pháp tạo muối mononatri của levothyroxin và liothyronin

Phương pháp tạo muối mononatri của levothyroxin (**T₄**) và liothyronin (**T₃**) thông qua muối dinatri về bản chất là để tinh chế **T₄** và **T₃**. Qua tổng quan tài liệu, chúng tôi nhận thấy để tạo muối mononatri tất cả các tác giả đều dùng Na₂CO₃ bão hòa.

Trước tiên chúng tôi cũng áp dụng phương pháp tạo muối mononatri bằng cách cho dạng acid của T₄ và T₃ phản ứng với Na₂CO₃ bão hòa theo các tài liệu tham khảo được. Xét theo lý thuyết các giá trị pK_a thì Na₂CO₃ phản ứng được với cả hai nhóm COOH và OH của T₄ và T₃. Có thể giải thích quá trình tạo muối mononatri đã xảy ra theo thứ tự như sau: Khi cho Na₂CO₃ bão hòa phản ứng với T₄ và T₃ thì nhóm có COOH có tính acid mạnh hơn nhóm OH phenol sẽ phản ứng trước và sinh ra NaHCO₃. Khi đó trong dung dịch tồn tại cả 2 dạng muối là NaHCO₃ (mới được tạo ra) và Na₂CO₃ (còn dư). NaHCO₃ chỉ phản ứng với nhóm COOH của T₄ và T₃ tạo ra dạng muối mononatri còn Na₂CO₃ có khả năng phản ứng tiếp với nhóm OH phenol để tạo ra muối dinatri. Vì vậy, sản phẩm của phản ứng có thể có cả muối mononatri và muối dinatri của T₄ và T₃. Nhưng khi chỉnh pH của khối phản ứng về 9-10 ~ pK_{a2(acid carbonic)} (= 10) thì dạng muối dinatri chuyển hết về muối mononatri:



Từ phân tích trên, về mặt lý thuyết cho thấy có thể dùng NaHCO₃ thay cho Na₂CO₃ để tạo muối mononatri mà không cần dùng acid điều chỉnh về pH của hỗn hợp phản ứng về 9-10. Do đó, chúng tôi đã

thử nghiệm và thấy phương pháp tạo muối mononatri bằng NaHCO_3 cho hiệu suất tương đương với phương pháp dùng Na_2CO_3 .

Tóm lại, quy trình tổng hợp liothyronin mononatri và levothyroxin mononatri có nhiều ưu điểm: chỉ sử dụng những hóa chất và dung môi rẻ tiền, hiệu suất tính từ phản ứng dùng iod cao nhất, phản ứng dễ dàng tiến hành khi nâng cấp ở quy mô lớn hơn. Quá trình tổng hợp không xảy ra quá trình chuyển cấu hình hay racemic hóa. Cả hai hormon này đều được sử dụng với liều lượng thấp ($50\text{-}100\mu\text{g/ ngày}$), do đó có thể áp dụng để sản xuất hai hormon này tại Việt Nam.

4.2. Khẳng định cấu trúc

Các hợp chất trong luận án sau khi tổng hợp xong đều được nhận dạng cấu trúc bằng các phương pháp phổ hồng ngoại (IR), phổ khối lượng (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton và carbon 13 ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$). Việc xác định cấu trúc chủ yếu chứng minh phản ứng hóa học đã xảy ra.

4.3. Độ ổn định

Nghiên cứu độ ổn định levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri được thực hiện trên 3 mẻ, bảo quản ở điều kiện thường trong thời gian 18 tháng và ở điều kiện lão hóa cấp tốc trong thời gian 6 tháng. Các chỉ tiêu theo dõi theo BP 2010 đối với levothyroxin mononatri và theo USP 34 đối với liothyronin mononatri. Kết quả nghiên cứu cho thấy các mẫu nguyên liệu ổn định sau 18 tháng bảo quản ở điều kiện thường và sau 6 tháng ở điều kiện lão hóa cấp tốc trên các chỉ tiêu đã nghiên cứu. Tuổi thọ của liothyronin mononatri được dự đoán là 30 tháng, và tuổi thọ của levothyroxin mononatri được dự đoán là 26 tháng.

4.4. Độc tính cấp

Kết quả nghiên cứu cho thấy với liều levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri cao nhất 5000 mg/kg sau 7 ngày chuột vẫn hoạt động, ăn uống bình thường, phân và nước tiểu bình thường, niêm mạc hồng hào, lông mượt. Chuột không chết nên không thể xác định được liều LD₅₀. Vậy levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri không thể hiện độc tính cấp ngay cả khi thử với liều cao nhất là 5000 mg/kg.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ XUẤT

KẾT LUẬN

1. Đã xây dựng được quy trình tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri từ L-tyrosin sản xuất trong nước kết hợp phương pháp của J. R. Chalmers và P. Bracco ở quy mô phòng thí nghiệm với cải tiến sau:

-Đã cải tiến được phản ứng khử hóa hợp chất 3,5-dinitro-4-*p*-methoxyphenoxy-*N*-acetyl-L-phenylalanin ethyl ester ở điều kiện áp suất thường đảm bảo an toàn trong sản xuất, nhất là khi nâng cấp quy trình.

-Đã cải tiến phương pháp tạo muối mononatri của levothyroxin và liothyronin bằng cách dùng natri bicarbonat bão hòa thay cho natri carbonat bão hòa.

2. Lần đầu tiên thực hiện thành công phương pháp tạo ether Ullmann trong tổng hợp *O*-methyl-*N*-acetyl-3,5-diiodo-L-thyronin ethyl ester từ phản ứng giữa dẫn chất L-tyrosin và 4-bromoanisol với xúc tác là đồng (I) iodid và phối tử sắt (III) acetylacetonat trong môi trường kali carbonat và dung môi dimethyl formamid.

3. Đã đánh giá được độ ổn định của levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri tổng hợp được. Cả hai sản phẩm giữ chất lượng sau 6 tháng bảo quản ở điều kiện lão hóa cấp tốc và 18 tháng ở điều kiện thường. Tuổi thọ của levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri được dự đoán lần lượt là 26 tháng và 30 tháng.

4. Đã đánh giá được độc tính cấp của levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri tổng hợp được. Cả hai sản phẩm không độc, không xác định được LD₅₀.

ĐỀ XUẤT

1. Nghiên cứu triển khai tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri ở quy mô pilot.

2. Tiếp tục nghiên cứu hoàn thiện và triển khai tổng hợp levothyroxin mononatri và liothyronin mononatri theo phương pháp mới.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CỦA TÁC GIẢ

1. Nguyễn Văn Giang, **Nguyễn Thị Ngọc Hà**, Nguyễn Văn Hân, Đào Nguyệt Sương Huyền, Nguyễn Đình Luyện (2013), “Nghiên cứu tổng hợp 3,5-diiodo-L-thyronin từ L-tyrosin làm nguyên liệu tổng hợp hormon giáp trạng”, Tạp chí Dược học, số 8-2013, tr 41-45.
2. **Nguyễn Thị Ngọc Hà**, Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Văn Hân, Nguyễn Đình Luyện (2014), “Tổng hợp cấu trúc diaryl ether từ 4-methoxyphenol và N-acetyl-L-tyrosin ethyl ester với xúc tác *p*-toluensulfonyl clorid- Một phương pháp tổng hợp hormon tuyến giáp”, Tạp chí Nghiên cứu dược và Thông tin thuốc, số 1-2014, tr 22-24.
3. Nguyễn Văn Giang, **Nguyễn Thị Ngọc Hà**, Nguyễn Văn Hân, Đào Nguyệt Sương Huyền, Nguyễn Đình Luyện (2014), “Nghiên cứu tổng hợp liothyronin từ L-tyrosin làm nguyên liệu sản xuất thuốc”, Tạp chí Hóa học, số 1-2014, tr.53.
4. **Nguyễn Thị Ngọc Hà**, Nguyễn Văn Hải, Nguyễn Văn Giang, Nguyễn Văn Hân, Nguyễn Đình Luyện (2014), “Phương pháp mới tạo cấu trúc diaryl ether trong tổng hợp hormon tuyến giáp từ L-tyrosin”, Tạp chí Dược học, số 8-2014, tr 36-39.