

# NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP HAI DẪN XUẤT TAN TỐT TRONG NƯỚC CỦA ARTEMISININ

Hồ Quốc Trinh<sup>1</sup>, Trần Thị Bé Lan<sup>1</sup> và Nguyễn Công Hào<sup>2</sup>

## ABSTRACT

The objective of this study is to find the best conditions for the synthesis of two compounds *N*-(2-hydroxyethyl)-11-azaartemisinin (A) and *N*-hydroxy-11-azaartemisinin (B) which are highly water dissolvable. The two compounds A and B were synthesized from artemisinin by nucleophilic substitution into the carbonyl function to furnish amide intermediate. The molecular structures of the products were determined by the analysis of the spectrum of IR, <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR. The reaction was optimized using the 2<sup>nd</sup> level Box Behnken Design model; and the solubility of the products was determined according to Vietnamese Standard (TCVN). The results showed that the two compounds *N*-(2-hydroxyethyl)-11-azaartemisinin (A) and *N*-hydroxy-11-azaartemisinin (B) were produced from artemisinin with the yield of 35% and 40%, respectively. In addition, the solubilities of the two obtained derivatives were 12.5 times higher than artemisinin.

**Keywords:** Azaartemisinin, *N*-(2-hydroxyethyl)-11-azaartemisinin, nucleophilic substitution

**Title:** Study on the synthesis of two highly water dissoluble derivatives of artemisinin

## TÓM TẮT

Mục đích của nghiên cứu này là tìm điều kiện tốt nhất để tổng hợp hai hợp chất *N*-(2-hydroxyethyl)-11-azaartemisinin (A) và *N*-hydroxy-11-azaartemisinin (B) tan tốt trong nước. Hai dẫn xuất A và B được tổng hợp từ artemisinin bằng phản ứng thế thân hạch của ethanamine vào nhóm carbonyl của artemisinin thông qua hợp chất trung gian amide. Từ đó, cấu trúc phân tử sản phẩm được xác định bằng phương pháp phân tích phổ IR, <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR. Phản ứng được tối ưu hóa theo mô hình bậc 2 của Box Behnken Design và sản phẩm thu được được xác định độ tan theo tiêu chuẩn Việt Nam (TCVN). Kết quả cho thấy là đã chuyển hóa được artemisinin thành dẫn xuất *N*-(2-hydroxyethyl)-11-azaartemisinin (A) và *N*-hydroxyethyl-11-azaartemisinin (B); và hiệu suất tối ưu hóa đạt được là 35% hợp chất (A) và 40% hợp chất (B). Ngoài ra, hai dẫn xuất thu được có độ tan trong nước lớn hơn artemisinin 12,5 lần.

**Từ khóa:** Azaartemisinin, *N*-(2-hydroxyethyl)-11-azaartemisinin, phản ứng thế thân hạch

## 1 ĐẶT VẤN ĐỀ

Hợp chất artemisinin được chiết xuất từ cây thanh hao hoa vàng (*Artemisia Annu* L.), họ cúc (Asteraceae). Ưu điểm của artemisinin là có hiệu lực mạnh và điều trị nhanh trong những trường hợp ký sinh trùng kháng thuốc (Lê Hồng Hình *et al.*, 2005), nhưng không triệt để do độ tan của artemisinin thấp và dễ phân hủy. Hiện nay, artesunate là dẫn xuất tan tốt trong nước đầu tiên được sử dụng tiêm tĩnh mạch và tiêm cơ cho bệnh nhân. Tuy nhiên, artesunate ở dạng dung dịch thì không bền, nên hàm lượng sản phẩm thủy phân là dihydroartemisinin giảm đáng

<sup>1</sup> Trường Đại học Cần Thơ

<sup>2</sup> Viện Công Nghệ Hóa Học TP.HCM

kê (Ajit *et al.*, 2008). Vì vậy, việc tổng hợp những dẫn xuất tan tốt trong nước là vấn đề được đề cập cho nghiên cứu này.

## 2 THIẾT BỊ, DỤNG CỤ, HÓA CHẤT VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1 Thiết bị, dụng cụ, hóa chất

- Thiết bị : Máy đo phổ IR Bruker Equinox, máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Avance 500 NMR Spectrometer 125 MHz và 500 MHz dùng đo phổ  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$ .
- Dụng cụ: Cột sắc ký đường kính 10mm, bản mỏng silica gel 60 F<sub>254</sub> do hãng Merck (Darmstadt, Germany) cung cấp.
- Hóa chất: Chloroform, methanol, ethyl acetate, ethanolamine, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong EtOH, silica gel 60 (0,04÷0,06 mm) và một số hóa chất khác do hãng Merck (Darmstadt, Germany) cung cấp.

### 2.2 Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1 Thực nghiệm tổng hợp dẫn xuất *N*-(2-hydroxyethyl)-11-azaartemisinin (A) và *N*-hydroxy-11-azaartemisinin (B)

Hòa tan 1g artemisinin với 10 mL hỗn hợp dung môi MeOH: CHCl<sub>3</sub> (7:3) trong bình 3 cổ đáy tròn, đặt lên máy khuấy từ. Sau đó, cho thêm từ từ 0,5 mL ethanolamine. Hỗn hợp được khuấy trong 45 phút ở 0°C. Sau khi phản ứng mở vòng kết thúc đem cô dưới áp suất kém thu được sản phẩm màu trắng có dạng như bông gòn. Sản phẩm này được hòa tan trong dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Tiếp tục cho thêm 47 mg hợp chất 2,6-di-*tert*-butyl-4-methylphenol (BHT), sau đó nhỏ từ từ 15 giọt H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15% và thêm 4 g silica gel.

Dung dịch được khuấy qua đêm từ 0°C đến nhiệt độ phòng. Phản ứng kết thúc sau 15 giờ. Hỗn hợp sản phẩm được lọc, silica gel trong hỗn hợp phản ứng được tách và rửa bằng dung môi CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Phần dung dịch hữu cơ và dịch rửa đem cô dưới áp suất thấp thu được một hỗn hợp sản phẩm thô có dạng gel. Tiến hành tách chất bằng sắc ký cột hở với hệ dung môi *n*-hexane: acetone và nhận dạng sản phẩm bằng sắc ký bản mỏng với hệ dung môi chloroform: ethyl acetate ở nhiều tỷ lệ khác nhau. Bản mỏng được để khô ở nhiệt độ phòng, phun thuốc thử là H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10% trong EtOH, sấy khô ở 110°C trong 3 phút.

#### 2.2.2 Phương pháp xác định cấu trúc phân tử sản phẩm

Sản phẩm thu được đem xác định cấu trúc bằng phân tích phổ IR,  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$  ở Viện Công nghệ Hóa học, Hà Nội.

#### 2.2.3 Tối ưu hóa phản ứng theo mô hình bậc 2 của Box Behnken Design

Lượng thí nghiệm cần thiết *N* khi hoạch định theo yếu tố toàn phần được xác định bằng công thức:  $N = 2^k$  (*k*: số yếu tố) (Nguyễn Cảnh, 1993; Nguyễn Minh Tuyên *et al.*, 2001).

Với mục tiêu khảo sát ba yếu tố ảnh hưởng là hàm lượng ethanolamine, H<sup>+</sup> và thời gian phản ứng thì số thí nghiệm cần phải tiến hành  $N = 2^3 = 8$  thí nghiệm. Mỗi thí nghiệm lặp lại 2 lần và lấy giá trị hiệu suất trung bình ( $y_{tb}$ ). Tính giá trị các biến

như hàm lượng ethanolamine,  $H^+$  và thời gian phản ứng, đồng thời tính các giá trị ở tâm và khoảng biến thiên.

Thực hiện các phản ứng cho mô hình tối ưu bậc 2 theo quy trình tổng hợp ở mục 2.2.2. *Hiệu suất thu được cho chạy tự động trên phần mềm Mode 5.*

### 2.2.4 Thí nghiệm xác định độ tan sản phẩm theo TCVN

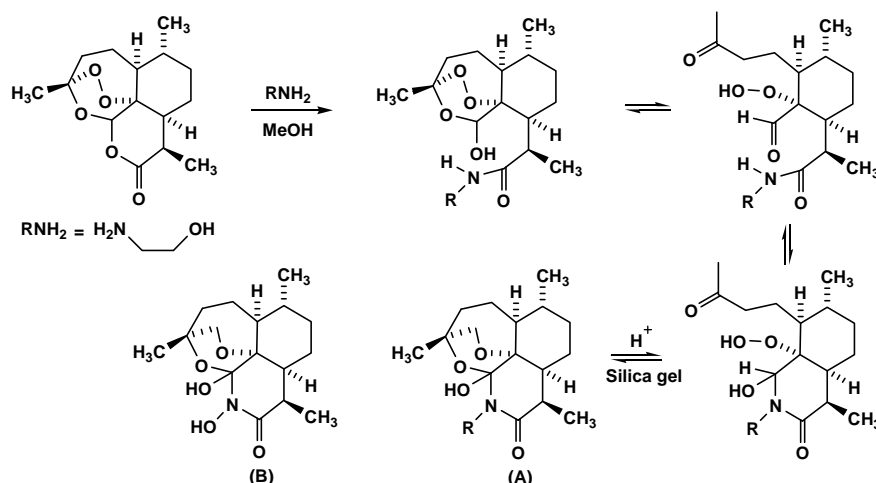
Cho dung môi nước vào 1g chất thử để ở nhiệt độ  $25^{\circ}C$  trong 30 phút, cứ 5 phút đem lắc trong 30 giây. Khi bằng mắt thường không còn nhìn thấy bất kỳ một tiểu phân nào của chất khảo sát trong dung dịch thì coi như sản phẩm đã tan hoàn toàn.

## 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 3.1 Kết quả tổng hợp hai dẫn xuất

Cho đến năm 1995, tất cả các chuỗi phản ứng biến đổi từ artemisinin chủ yếu không thay đổi hệ thống vòng tetracyclic. Nhóm Ziffer (Jo Alen *et al.*, 2011) lần đầu tiên công bố chuỗi phản ứng mới, bắt đầu bằng phản ứng mở vòng lactone tạo ra amide, nhờ đó hệ thống vòng tetracyclic được cải thiện do sự biến đổi amide thành lactam. Đặc biệt, việc đưa nhóm hydroxyl (-OH) vào cấu trúc của hợp chất có hoạt tính kháng sốt rét sẽ giúp cải thiện được độ tan trong nước của hợp chất này, từ đó làm tăng hiệu quả trong điều trị bệnh.

Căn cứ vào kết quả của nhóm nghiên cứu Ziffer (Jo Alen *et al.*, 2011) và Phan Đình Châu (Phan Đình Châu *et al.*, 2005) để tiến hành tổng hợp hai hợp chất *N*-(2-hydroxyethyl)-11-azaartemisinin (A) và *N*-hydroxy-11-azaartemisinin (B). Dẫn xuất dihydroartemisinin khó phân hủy và bền hơn nhờ sự chuyển đổi vòng lactone trong khung artemisinin thành lactam theo hình 1.



Hình 1: Cơ chế phản ứng tạo vòng lactam

Sự chuyển hóa của lactone thành lactam dưới tác dụng của amine gồm 2 bước. Đầu tiên, trong môi trường kiềm amine tấn công vào vòng lactone để mở vòng tạo thành amide, được gọi là phản ứng thế. Tiếp theo, trong môi trường acid xảy ra sự ngưng tụ và đóng vòng tạo thành azaartemisinin (Jo Alen *et al.*, 2011).

Theo kết quả thực nghiệm cho thấy phản ứng giữa artemisinin và ethanolamine xảy ra chỉ trong vòng 45 phút là tạo thành hợp chất amide (theo dõi trên sắc ký bản mỏng với hệ dung môi chloroform: ethyl acetate = 4:1). Giai đoạn đóng vòng tạo lactam thì chậm hơn nhiều, phải sau ít nhất 12 giờ (nếu sử dụng H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> loãng trong silica gel 60 (0,04÷0,06 mm)) hoặc 10 giờ (nếu sử dụng nhựa trao đổi ion H<sup>+</sup>) thì phản ứng mới kết thúc. Ngoài ra, phản ứng không chỉ tạo ra sản phẩm là lactam 11-aza mà còn tạo ra sản phẩm là deoxy do làm mất liên kết peroxide và trong môi trường acid nên có xảy ra sự phân cắt tạo *N*-hydroxy-11-azaartemisinin (B). Ngoài ra, quá trình này cũng phụ thuộc vào điều kiện nhiệt độ, nếu nhiệt độ càng tăng thì tỉ lệ các hợp chất A:B càng giảm.

### 3.2 Kết quả xác định cấu trúc sản phẩm

Cấu trúc của (A) và (B) được khẳng định nhờ vào các phổ như IR, <sup>1</sup>H-NMR, <sup>13</sup>C-NMR, HSQC, HMBC, MS, cũng như so sánh dữ liệu này với các tài liệu phổ của artemisinin và các tài liệu đã công bố. Kết quả xác định các tính chất được thể hiện ở bảng 1.

**Bảng 1: Một số thông số lý hóa của sản phẩm**

| Thông số lý hóa  | (A)           | (B)           |
|--|---------------|---------------|
| Điểm chảy  | 142°C ÷ 143°C | 114°C ÷ 116°C |
| Dung môi kết tinh  | Chloroform    | Chloroform    |
| Giá trị R <sub>f</sub> ( <i>n</i> -hexane:acetone = 1:2) | 0,4545        | 0,3636        |
| Hiệu suất  | 41%           | 35%           |

Các phổ xác định cấu trúc của sản phẩm như sau:

HRMS của (A): Tính toán trên M<sup>+</sup> + 1, C<sub>17</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub> là 326,4; tìm thấy 326,2.

HRMS của (B): Tính toán trên M<sup>+</sup> + 1, C<sub>15</sub>H<sub>27</sub>NO<sub>5</sub> là 298,35; tìm thấy 298,16.

**Bảng 2: Số liệu phổ IR và <sup>1</sup>H-NMR của (A) và (B)**

| Chất | Phổ IR  | Phổ <sup>1</sup> H-NMR (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> , δppm)  |
|------|---|---|
| A    | ν = 3397 (-OH),<br>ν = 2971, 2942,<br>2887<br>(CH, CH <sub>2</sub> , CH <sub>3</sub> ),<br>ν = 1620 (C=O<br>của amide). | Xuất hiện tín hiệu của proton 5,26 (s, 1H, H-12), 3,812 – 3,878 (m, 3H, H-14, H-13), 3.506-3.548 (m, 1H, H-13), 3,337-3,376 (m, 1H, H-9), 2,393-2,457 (m, 1H, H-4), 1,982-2,045 (m, 2H, H-4-5), 1,928 (s, 1H, OH), 1,784-1,824 (m, 1H, H-8), 1,675-1,757 (m, 2H, H-7-8a), 1,402-1,479 (m, 2H, H-5,6), 1,38 (s, 3H, H-13), 1,32-1,364 (m, 1H, H-5a), 1,153 (d, <i>J</i> =7,5, 3H, H-15), 1,023-1,054 (m, 1H, H-7), 1,005 (d, <i>J</i> =6, 3H, H-14), 0,955-0,987 (m, 1H, H-8). |
| B    | ν = 3120 (-OH),<br>ν = 1648 (C=O<br>của amide),<br>ν = 809 (O-O).   | Xuất hiện tín hiệu proton 5,437 (s, 1H, H-12), 3,428-3,481 (m, 1H, H-9), 2,451-2,478 (m, 1H, H-4), 2,04-2,094 (m, 1H, H-4), 1,985-2,033 (m, 1H, H-5), 1,782-1,803 (m, 1H, H-8), 1,685-1,766 (m, 2H, H-7-8a), 1,614 (s, 1H, OH), 1,481-1,567 (m, 1H, H-5), 1,458 (s, 3H, H-13), 1,345-1,439 (m, 2H, H-6,5a), 1,16 (d, <i>J</i> =7,5, 3H, H-15), 1,022-1,075 (m, 1H, H-7), 1,006 (d, <i>J</i> =6, 3H, H-14), 0,861-0,947 (m, 1H, H-8).  |

**Bảng 3: Số liệu phổ <sup>13</sup>C-NMR của (A) và (B)**

| Vị trí Carbon | (A)     | (B)     | Cấu trúc của carbon |
|---------------|---------|---------|---------------------|
| C-3           | 105,017 | 105,176 | >C<                 |
| C-4           | 36,646  | 36,536  | >CH-                |
| C-5           | 25,069  | 25,396  | >CH<                |
| C-5a          | 51,341  | 51,409  | >C<                 |
| C-6           | 37,565  | 37,423  | >CH-                |
| C-7           | 33,656  | 33,585  | CH <sub>2</sub> <   |
| C-8           | 22,85   | 22,869  | CH <sub>2</sub> <   |
| C-8a          | 45,787  | 46,746  | >CH-                |
| C-9           | 33,219  | 32,598  | >CH-                |
| C-10          | 174,131 | 169,504 | >CH-                |
| C-12          | 80,164  | 81,423  | >C<                 |
| C-12a         | 79,494  | 81,132  | >CH-                |
| C-13          | 25,396  | 22,869  | -CH <sub>3</sub>    |
| C-14          | 19,733  | 19,702  | -CH <sub>3</sub>    |
| C-15          | 12,764  | 11,744  | -CH <sub>3</sub>    |
| C-16          | 46,413  |         | CH <sub>2</sub> <   |
| C-17          | 62,799  |         | CH <sub>2</sub> <   |

**3.3 Kết quả tối ưu hóa theo mô hình bậc 2 của Box Behnken Design**

Chọn ba yếu tố khảo sát là hàm lượng ethanolamine, H<sup>+</sup> và thời gian.

**Bảng 4: Các mức nghiên cứu**

| Biến nghiên cứu          | Biến mã hoá    | Đơn vị | Mức nghiên cứu |    |      |    |      |
|--------------------------|----------------|--------|----------------|----|------|----|------|
|                          |                |        | - α            | -1 | 0    | +1 | + α  |
| Hàm lượng ethanolamine   | x <sub>1</sub> | mg     | -1             | 1  | 2    | 3  | +1   |
| Hàm lượng H <sup>+</sup> | x <sub>2</sub> | g      | -2,5           | 10 | 12,5 | 15 | +2,5 |
| Thời gian                | x <sub>3</sub> | giờ    | -2,5           | 10 | 12,5 | 15 | +2,5 |

Cho chạy chương trình trên phần mềm Mode 5. Thu được phương trình hồi quy bậc hai như sau:

- Phản ứng tạo ra (A)

$$\hat{y} = 33,7 + 0,44x_1 + 0,2x_2 + 0,51x_3 - 0,05x_1x_2 + 0,32x_1x_3 + 0,45x_2x_3 - 1,66x_1^2 + 1,16x_2^2 - 1,11x_3^2$$

- Phản ứng tạo ra (B)

$$\hat{y} = 39,9 + 0,38x_1 + 0,59x_2 + 1,01x_3 + 0,15x_1x_2 + 0,3x_1x_3 - 0,48x_2x_3 - 0,44x_1^2 + 0,59x_2^2 - 0,89x_3^2$$

Kết quả tối ưu phỏng đoán theo mô hình bậc 2 của Box Behnken Design như sau:

- Với 2,1611g ethanolamine và 14,99 g nhựa amberlite H<sup>+</sup> trong 13,6 giờ sẽ cho hiệu suất tối đa là 35,3% hợp chất (A).
- Với 2,2g hydroxylamine và 10 g nhựa amberlite H<sup>+</sup> trong 15 giờ sẽ cho hiệu suất tối đa là 41,4% hợp chất (B).

Kết quả tối ưu thực nghiệm là: 35% hợp chất (A) và 40% hợp chất (B).

So sánh độ tan dựa trên Dược Điển Việt Nam IV (Bộ Y tế, 2009):

Artemisinin: Trên 10000 mL nước không hòa tan hết 1g Artemisinin. Nên có thể kết luận là Artemisinin thực tế không tan trong nước.

*N*-(2-hydroxyethyl)-11-azartemisinin (A): 850 mL nước hòa tan hết 1g *N*-(2-hydroxyethyl)-11-azartemisinin (A).

*N*-hydroxy-11-azartemisinin (B): 800 mL nước hòa tan hết 1g *N*-hydroxy-11-azartemisinin (B).

Vậy (A) và (B) tan trong nước tốt hơn artemisinin 12,5 lần.

#### 4 KẾT LUẬN

Từ kết quả thu được của nghiên cứu này một số kết luận có thể rút ra như sau:

- Đã chuyển hóa được artemisinin thành dẫn xuất *N*-(2-hydroxyethyl)-11-azaartemisinin và *N*-hydroxyethyl-11-azaartemisinin với hiệu suất tương ứng là 35% và 40%.
- Độ tan trong nước của hai dẫn xuất *N*-(2-hydroxyethyl)-11-azaartemisinin và *N*-hydroxyethyl-11-azaartemisinin cao hơn gấp 12,5 lần so với artemisinin.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ajit Shankar Singh, Ved Prakash Verma, Mohammad Hassam, Naikade Nij Krishna, Sunil K.Puri and Chandan Singh. 2008. *Amino-and Hydroxy-Functionalized 11-Azaartemisinins and Their Derivatives*, Organic Letters, V.10, No.23.
- Bộ y tế. 2009. *Dược điển Việt Nam VI*, Hội đồng dược điển Việt Nam, Nhà xuất Bản Y học Hà Nội, Tr. 46-519, PL-135, PL-138.
- Jo Alen, Bich Ngan Truong, Van Hung Nguyen and Wim Dehaena. 2011. *Synthesis, reactions and biological activity of 11- azaartemisinin and deviratives*, ARKIVOC, P.346-369.
- Lê Hồng Hình, Phạm Văn Thân. 2005. *Vi Sinh-Ký sinh trùng*, Bộ Y Tế, Vụ Khoa học và Đào tạo, Nhà xuất Bản Y học Hà Nội.
- Nguyễn Minh Tuyền và Phạm Văn Thiêm (2001), *Kỹ thuật hệ thống công nghệ hóa học*, Tập 1, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Phan Đình Châu, Hồ Đức Cường, Trần Thị Mỹ Hạnh, Trần Khắc Vũ, Trương Thị Thanh Nga, Nguyễn Văn Tuyền, Nguyễn Đức Vinh. 2005. *Nghiên cứu chuyển hóa artemisinin thành một số dẫn xuất azaartemisinin*, Tạp chí Dược học, số 356.