

Nghiên cứu tổng hợp (S)-(-)-atenolol bằng xúc tác enzym

Phạm Ngọc Tuấn Anh^{1*}, Đinh Hữu Thành²

Vũ Thanh Thảo³, Trần Cát Đông³

¹Khoa Dược, Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh

²Công ty Cổ phần Dược phẩm Bến Tre

³Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Summary

The present study describes an efficient chemoenzymatic synthesis of enantiopure (S)-(-)-atenolol, a selective β_1 -adrenergic receptor blocker, via 5-step procedure. The chiral key intermediate, (R)-1-(4-(2-amino-2-oxoethyl)phenoxy)-3-chloropropane-2-yl acetate, was obtained by using the Amano lipase from *Pseudomonas fluorescens*. The (R)-enantiomer intermediate was then hydrolyzed and the resulting product was reacted with isopropylamine to afford (S)-(-)-atenolol with the high enantiomeric excess.

Keywords: (S)-(-)-atenolol, lipase, Amano lipase, β -blocker.

Đặt vấn đề

Atenolol thuộc nhóm thuốc chẹn beta có tác động chủ vận chọn lọc trên thụ thể β_1 được sử dụng phổ biến trong điều trị các bệnh tim mạch như cao huyết áp, đau thắt ngực, nhồi máu cơ tim cấp. Các nghiên cứu đã chứng minh chỉ dạng đồng phân (S)-(-)-atenolol mới có tác dụng ức chế thụ thể β_1 và dạng đồng phân (S)-(-)-atenolol đơn trị liệu có tác dụng dược lý như dạng hỗn hợp racemic. Việc sử dụng đồng phân (S)-(-)-atenolol sẽ cho tác dụng chọn lọc trên tim, giúp tránh được một số tác dụng phụ gây ra của dạng đồng phân (R)-(+)-atenolol^[1]. Với những ưu điểm trên, việc nghiên cứu tổng hợp (S)-(-)-atenolol được ứng dụng trong bào chế thuốc đang ngày càng được chú ý. Trong nghiên cứu này, (S)-(-)-atenolol được nghiên cứu tổng hợp ở quy mô phòng thí nghiệm trong điều kiện Việt Nam. Đây cũng là tiền đề cho việc xây dựng quy trình công nghệ tổng hợp (S)-(-)-atenolol được ứng dụng phù hợp với định hướng phát triển nền công nghiệp hóa dược Việt Nam.

Chịu trách nhiệm: Phạm Ngọc Tuấn Anh

Email: pnt.anh81@hutech.edu.vn

Ngày nhận: 06/01/2021

Ngày phân biện: 21/01/2021

Ngày duyệt bài: 19/02/2021

Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu

Các nguyên liệu sử dụng trong nghiên cứu được mua từ các hãng hóa chất như Acros Organics (Geel, Bỉ), TCI Chemicals (Tokyo, Nhật) và Merck (Darmstadt, Đức).

Thiết bị

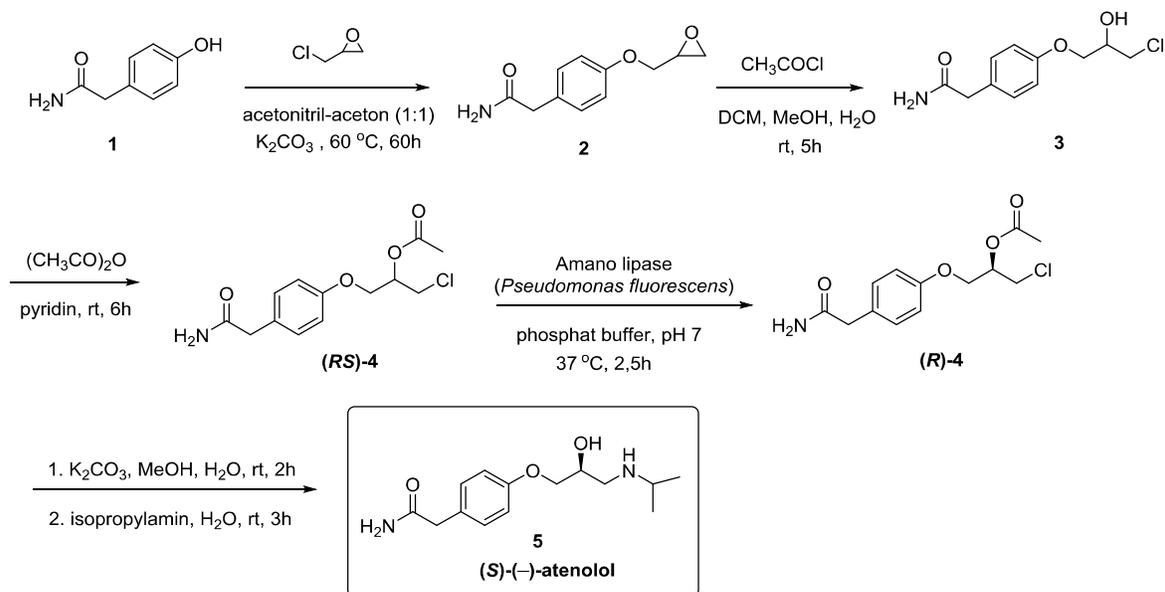
Nhiệt độ nóng chảy được đo trên máy đo điểm chảy Gallenkamp (Sanyo, Anh). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (¹H-NMR và ¹³C-NMR) được đo trên máy Bruker Avance 500 MHz (Bruker, Mỹ). Phổ khối đo trên máy Shimadzu LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Nhật Bản).

Phương pháp nghiên cứu

(S)-(-)-atenolol (**5**) được tổng hợp từ 4-hydroxyphenylacetamid (**1**) và epichlorohydrin tạo dẫn chất O-ether (**2**) dựa trên phản ứng Williamson^[2]. Dẫn chất O-ether (**2**) tham gia vào phản ứng mở vòng oxiran với tác nhân acetyl clorid tạo dẫn chất clorohydrin (**3**), theo sau bằng phản ứng ester hóa với tác nhân anhydrid acetic tạo dẫn chất (RS)-ester acetat (**4**)^[2]. Hỗn hợp racemic dẫn chất **4** được thủy phân chọn lọc bằng enzym Amano lipase từ chủng *Pseudomonas fluorescens* thu được (R)-ester acetat (**R**)-**4**^[2, 3]. Dẫn chất (**R**)-**4** được thủy phân ester trong môi trường kiềm theo sau được cho

phản ứng với isopropyl amin thu được (S)-(-)-atenolol (**5**) (sơ đồ 1) [2]. Các sản phẩm tổng hợp được kiểm tra độ tinh khiết bằng

sắc ký lớp mỏng (**SKLM**), nhiệt độ nóng chảy và xác định cấu trúc bằng phổ **MS**, **NMR**, xác định độ tinh khiết quang học bằng đo góc quay cực.



Sơ đồ 1. Sơ đồ tổng hợp (S)-(-)-atenolol

Thực nghiệm, kết quả và bàn luận Tổng hợp hóa học và đặc điểm sản phẩm thu được

Tổng hợp 2 - (4 - (oxiran - 2 - ylmethoxy) phenyl) acetamid (**2**)

Hòa tan 2-(4-hydroxyphenyl)acetamid (**1**) (3,02 g, 20 mmol) trong dung môi aceton (200 ml), sau đó thêm vào hỗn hợp phản ứng K_2CO_3 (3,31 g, 24 mmol), epichlorohydrin (15 ml, 120 mmol). Đun phản ứng ở 60 °C, theo dõi phản ứng bằng **SKLM** với hệ dung môi DCM-MeOH = 19:1 cho đến khi hết nguyên liệu **1** (60 giờ). Sau khi dừng phản ứng, lọc nóng hỗn hợp qua phễu Buchner, dịch lọc thu được để nguội tự nhiên ở nhiệt độ phòng, ngâm đá cho đến khi kết tinh hoàn toàn. Lọc, sấy khô trong tủ sấy chân không thu được 2,4 g sản phẩm **2**, hiệu suất 38%.

Tính chất của sản phẩm: Chất rắn màu trắng, tan tốt trong DMF, DMSO, kém tan trong aceton, không tan trong *n*-hexan. Nhiệt độ nóng chảy: 163,6–164,9 °C.

Kết quả biện giải phổ: **MS** (ESI) *m/z*: 230,0556 $[M+Na]^+$, tính toán: 230,0793 ($C_{11}H_{13}NNaO_3$). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*6)

δ (ppm): 7,40 (brs, 1H, NH_2); 7,17 (d, 2H, $J = 9,0$ Hz, $H_{Ar-2,6}$); 6,88 (d, 2H, $J = 8,5$ Hz, $H_{Ar-3,5}$); 6,81 (brs, 1H, NH_2); 4,28 (dd, 1H, $J = 2,5$ Hz, 11 Hz, CH_2O); 3,79 (dd, 1H, $J = 6,5$ Hz, 11,5 Hz, CH_2O); 3,41 (s, 2H, $CH_2C=O$); 3,29 (m, 1H, CH oxiran); 2,83 (dd, 1H, $J = 4,5$ Hz, 5,0 Hz, CH_2 oxiran); 2,7 (dd, 1H, $J = 2,5$ Hz, 5,0 Hz, CH_2 oxiran).

Tổng hợp 2-(4-(3-cloro-2-hydroxypropoxy) phenyl)acetamid (**3**)

Hòa tan **2** (2,4 g, 11,6 mmol) trong DCM (80 ml) và MeOH (40 ml), sau đó thêm nước cất (20 ml) vào khuấy đều. Nhỏ từ từ acetyl clorid (4 ml, 60 mmol) vào hỗn hợp phản ứng. Khuấy phản ứng ở nhiệt độ phòng, theo dõi phản ứng bằng **SKLM** với hệ dung môi DCM-MeOH = 9:1. Kết thúc phản ứng sau 5 giờ, tách lấy pha dung dịch trên, cô quay cho bay hơi hoàn toàn MeOH. Dung dịch còn lại sau cô quay, thêm ít nước đá vào sẽ thấy xuất hiện kết tủa trắng, tiếp tục làm lạnh trong nước đá cho đến khi kết tinh hoàn toàn. Lọc lạnh sản phẩm trên qua phễu Buchner, rửa tủa bằng nước lạnh, thu lấy sản phẩm, sấy khô trong tủ sấy chân không thu được 0,97 g sản phẩm **3**, hiệu suất 35%.

Tính chất của sản phẩm: Chất rắn màu trắng, tan tốt trong DMSO, aceton, kém tan trong nước, không tan trong *n*-hexan. Nhiệt độ nóng chảy: 132,2–132,9 °C.

Kết quả biện giải phổ: **MS** (ESI) *m/z*: 266,0500 [M+Na]⁺, tính toán: 266,0560 (C₁₁H₁₄ClNNaO₃). **¹H-NMR** (500 MHz, (CD₃)₂CO) δ (ppm): 7,23 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H_{Ar}-2,6); 6,89 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H_{Ar}-3,5); 6,70 (brs, 1H, NH₂); 6,17 (brs, 1H, NH₂); 4,17 (dd, 1H, *J* = 5,5 Hz, 10,5 Hz, CH₂O); 4,08–4,06 (m, 2H, CH₂O, CHOH); 3,81 (dd, 1H, *J* = 5,0 Hz, 11,0 Hz, CH₂Cl); 3,72 (dd, 1H, *J* = 5,5 Hz, 11,0 Hz, CH₂Cl); 3,42 (s, 2H, CH₂-C=O).

Tổng hợp (RS)-1-(4-(2-amino-2-oxoethyl)phenoxy)-3-cloropropan-2-yl acetat ((RS)-4)

Cho vào bình cầu chất **3** (0,5 g, 2 mmol), anhydrid acetic (30 ml) và pyridin (0,5 ml). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ phòng, theo dõi phản ứng bằng **SKLM** với hệ dung môi CHCl₃-MeOH = 9:1. Sau 6 giờ dừng phản ứng, thêm vào hỗn hợp phản ứng 50 ml nước lạnh, trung hòa bằng dung dịch HCl 3N. Chiết lấy sản phẩm bằng ethyl acetat, làm khan bằng natri sulfat khan. Cô quay dịch ethyl acetat, cẩn thu được chạy sắc ký cột silicagel với hệ dung môi CHCl₃-MeOH = 19:1 cho 0,42 g sản phẩm (RS)-4, hiệu suất 71%.

Tính chất của sản phẩm: Dạng keo màu trắng vàng, tan tốt trong DMSO, aceton, kém tan trong nước, không tan trong *n*-hexan.

Kết quả biện giải phổ: **MS** (ESI) *m/z*: 308,0625 [M+Na]⁺, tính toán: 308,0666 (C₁₃H₁₆ClNNaO₄). **¹H-NMR** (500 MHz, (CD₃)₂CO) δ (ppm): 7,23 (d, 2H, *J* = 9,0 Hz, H_{Ar}-2,6); 6,89 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H_{Ar}-3,5); 6,77 (brs, 1H, NH₂); 6,31 (brs, 1H, NH₂); 5,34–5,30 (m, 1H, CHOAc); 4,20–4,18 (m, 2H, CH₂O); 3,92–3,87 (m, 2H, CH₂Cl); 3,41 (s, 2H, CH₂-C=O); 2,05 (s, 3H, CH₃).

Tổng hợp (R)-1-(4-(2-amino-2-oxoethyl)phenoxy)-3-cloropropan-2-yl acetat ((R)-4)

Cho enzym Amano lipase (5,81 g) vào bình nón có chứa (RS)-4 (1,66 g, 5,8 mmol), MeOH (16,6 ml) và dung dịch đệm phosphat pH = 7 (564,4 ml). Lắc rung bình phản ứng ở 37 °C trong 2,5 giờ. Hỗn hợp sau phản ứng được chiết tách bằng DCM, làm khan bằng Na₂SO₄ khan, cô quay, tinh khiết hóa sản phẩm bằng

phương pháp sắc ký cột với hệ dung môi DCM-MeOH = 95:5 thu được 0,505 g sản phẩm (R)-4, hiệu suất 70%.

Tính chất của sản phẩm: tương tự sản phẩm (RS)-4. Góc quay cực riêng: [α]_D²⁵ = + 21,8° (c 1,00; MeOH).

Tổng hợp (S)-(-)-atenolol (5)

Hòa tan K₂CO₃ (1,0 g, 7,2 mmol) trong 4 ml nước rồi cho vào bình phản ứng có chứa (R)-4 (100 mg, 0,36 mmol) và MeOH (10 ml). Khuấy phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 2 giờ rồi thêm vào isopropylamin (10 ml). Kiểm tra phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi CHCl₃-MeOH = 9:2. Phản ứng được kết thúc sau 3,5 giờ, cô quay hỗn hợp để loại isopropylamin dư và dung môi. Tinh chế bằng sắc ký cột với hệ dung môi CHCl₃-MeOH = 9:2 thu được 60 mg sản phẩm **5**, hiệu suất 64%.

Tính chất của sản phẩm: Chất rắn màu trắng, tan tốt trong DMSO, aceton, kém tan trong nước, không tan trong *n*-hexan. Nhiệt độ nóng chảy: 157,3–159,1 °C (148 – 150 °C [4]; 152 – 155 °C [5]).

Kết quả biện giải phổ: **MS** (APCI) *m/z*: 267 [M+H]⁺. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*6) δ (ppm): 7,35 (brs, 1H, NH₂), 7,15 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H_{Ar}-2,6); 6,85 (d, 2H, *J* = 8,5 Hz, H_{Ar}-3,5); 6,79 (brs, 1H, NH₂); 4,92 (brs, 1H, NH); 3,92–3,90 (m, 1H, CH₂-O); 3,85 - 3,81 (m, 2H, CH₂-O và CH-OH); 3,29 (s, 2H, CH₂-C=O); 2,72 - 2,65 (m, 2H, CH₂-N và CH-N); 2,56–2,52 (dd, 1H, *J* = 6,5 Hz, 11,5 Hz, CH₂-N); 0,97 (dd, 6H, *J* = 2,5 Hz, 6,5 Hz, 2CH₃). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*6) (δ, ppm): 172,5 (C=O); 157,3 (C_{Ar}-4); 129,9 (C_{Ar}-2, C_{Ar}-6); 128,4 (C_{Ar}-1); 114,2 (C_{Ar}-3, C_{Ar}-5); 70,8 (CH₂-O); 68,4 (CH-OH); 50,0 (CH-N); 48,1 (CH₂-N); 41,3 (CH₂-C=O); 22,9 (2CH₃). Góc quay cực riêng: [α]_D²⁵ = - 16,7° (c 1,00; HCl 1 N) (-17,0° (c 1,00; HCl 1 N) [4]).

Bàn luận

Nghiên cứu đã tổng hợp thành công (S)-(-)-atenolol có độ tinh khiết quang học cao với xúc tác enzym lipase từ *Pseudomonas fluorescens*. Tổng hợp dẫn chất epoxid (**2**) dựa trên phản ứng O-ether Williamson. Phản ứng có thời gian kéo dài, theo dõi phản ứng bằng **SKLM** cho thấy phản ứng xảy ra hoàn toàn sau 60 giờ. Tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại

có nhiều lợi điểm khi áp dụng trên quy mô lớn, tuy nhiên hạn chế còn gây hao hụt sản phẩm nhiều, hiệu suất sau tinh chế còn thấp (38%). Bên cạnh đó, nghiên cứu đã thực hiện khảo sát một số dung môi/hệ dung môi phản ứng như aceton, acetonitril, aceton/acetonitril = 1/1, kết quả cho thấy không có sự khác biệt giữa các dung môi này. Phổ **MS** (ESI) cho pic ion giả phân tử tại m/z 230,0556 $[M+Na]^+$ phù hợp với giá trị theo tính toán 230,0793 ($C_{11}H_{13}NNaO_3$). Kết quả phổ **^1H-NMR** phù hợp với cấu trúc dự đoán, trong đó tại δ 4,28 và 3,79 ppm ghi nhận được 2 tín hiệu đỉnh đôi (dd) tương ứng với 2H không tương đương của $CH_2=O$ chứng tỏ có sự tạo thành liên kết O-ether.

Phản ứng mở vòng oxiran với tác nhân acetyl clorid tạo dẫn chất clorohydrin (**3**) được thực hiện với hệ dung môi (DCM, MeOH và H_2O) tạo thuận lợi cho quá trình tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại, tuy nhiên hiệu suất sau tinh chế còn thấp. Phổ **MS** (ESI) cho pic ion giả phân tử tại m/z 266,0500 $[M+Na]^+$ phù hợp với giá trị theo tính toán 266,0560 ($C_{11}H_{14}ClNNaO_3$). Kết quả phổ **^1H-NMR** phù hợp với cấu trúc dự đoán.

Ở giai đoạn 3 và 4, nghiên cứu này không tác động trực tiếp vào carbon bất đối xứng, thay vào đó thực hiện acetyl hóa nhóm chức alcol để thu được hỗn hợp racemic dẫn chất ester acetat (***RS***)-**4**. Sau đó, enzym lipase từ *Pseudomonas fluorescens* được sử dụng để deacetyl hóa chọn lọc trên dạng đồng phân (***S***)-**4**. Kết quả thu được sản phẩm (***R***)-**4** với hiệu suất khá tốt 49% qua 2 bước, đây là điểm mới của nghiên cứu chưa được công bố trong các nghiên cứu trước đây. Kết quả phân tích phổ của (***RS***)-**4** phù hợp với cấu trúc dự đoán. Phổ **MS** (ESI) cho pic ion giả phân tử tại m/z 308,0625 $[M+Na]^+$ phù hợp với giá trị theo tính toán 308,0666 ($C_{13}H_{16}ClNNaO_4$). Phổ **^1H-NMR** ghi nhận tín hiệu đỉnh đơn tại δ 2,05 ppm tương ứng với 3H của gốc acetyl, cũng như proton CHO có sự chuyển dịch về trường yếu δ 5,34 - 5,30 (m) chứng tỏ có sự tạo thành ester acetat. Sản phẩm (***R***)-**4** là đồng phân hữu triền có góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{25} = +21,8^\circ$ (c 1,00; MeOH).

Ở giai đoạn 5, kết quả thu được atenolol ở dạng đồng phân quang học mong muốn (***S***)-(-)-atenolol có độ tinh khiết quang học cao. Phổ **MS** (APCI) cho pic ion giả phân tử tại m/z 267 $[M+H]^+$. Kết quả phổ **^1H-NMR** phù hợp với

cấu trúc dự đoán, trong đó có các tín hiệu H của nhóm isopropyl tại δ (ppm) 2,72 - 2,65 (m, CH-N) và 0,97 (dd, 2CH₃), chứng tỏ có sự tạo thành isopropyl amin trong giai đoạn phản ứng này. Kết quả phổ **$^{13}C-NMR$** cho có tín hiệu carbon phù hợp với cấu trúc dự đoán. Kết quả đo góc quay cực riêng $[\alpha]_D^{25} = -16,7^\circ$ (c 1,00; HCl 1 N) tương đương với nghiên cứu của Subhas Bose và CS. (-17°)^[4].

Kết luận

Nghiên cứu đã tổng hợp thành công đồng phân (***S***)-(-)-atenolol theo quy trình tổng hợp 5 bước trong đó có sử dụng xúc tác lipase từ *Pseudomonas fluorescens*. Sản phẩm tổng hợp được có độ tinh khiết quang học cao, tuy nhiên hiệu suất toàn quy trình còn thấp. Từ kết quả này, những nghiên cứu tiếp theo sẽ hướng tới tối ưu hóa quy trình tổng hợp nhằm nâng cao hiệu suất và đồng thời nghiên cứu nâng cấp quy mô phản ứng, xây dựng quy trình công nghệ tổng hợp (***S***)-(-)-atenolol được dụng phù hợp với điều kiện Việt Nam nhằm có thể ứng dụng đưa vào sản xuất nguyên liệu dược phẩm.

Tài liệu tham khảo

1. Stoschitzky K., Egginger G., Zernig G., Klein W., Lindner W. (1993), "Stereoselective features of (***R***)- and (***S***)-Atenolol: Clinical pharmacological, pharmacokinetic, and radioligand binding studies", *Chirality*, 5, pp. 15–19.
2. Prasad Dwivedee B., Ghosh S., Bhaumik J., Banoth L., Chand Banerjee U. (2015), "Lipase catalyzed green synthesis of *Enantiopure atenolol*", *RSC Adv.*, 5, pp. 15850–15860.
3. Ader U., Schneider M. P. (1992), "Enzyme assisted preparation of enantiomerically pure p-adrenergic blockers III: Optically active chlorohydrin derivatives and their conversion", *Tetrahedron: Asymmetr.*, 3, pp. 521–524.
4. Subhas Bose D., Venkat Narsaiah A. (2005), "An efficient asymmetric synthesis of (***S***)-atenolol: Using hydrolytic kinetic resolution", *Bioorg. Med. Chem.*, 13, pp. 627–630.
5. Bộ Y tế (2017), "Atenolol", *Dược điển Việt Nam*, lần xuất bản thứ năm, tập 1, NXB Y học, Hà Nội, tr. 116–118.