

PHÂN TÍCH CẤU TRÚC VÀ ĐỘ SẠCH CỦA THUỐC TADALAFIL TRONG QUÁ TRÌNH TỔNG HỢP BẰNG PHƯƠNG PHÁP HÓA LÝ HIỆN ĐẠI

Đến tòa soạn 15/12/2016

Vũ Đức Cường

Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp Việt Trì

Phạm Thị Thắm

Trường Đại học Thủy Lợi

Phạm Thế Chính, Nguyễn Thị Hiền, Đoàn Duy Tiên, Nguyễn Văn Tuyển

Viện Hóa học – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

SUMMARY

DETERMINATION OF STRUCTURE AND PURITY OF TADALAFIL DRUG BY MODERN PHYSICOCHEMICAL METHODS

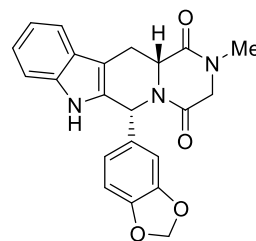
Tadalafil is used to treat male erectile dysfunction. It belongs to phosphodiesterase type-5 inhibitor (PDE5) class and inhibits cGMP specific PDE5 which is responsible for degradation of cGMP in the corpus cavernosum located around the penis. In this article, the spectrometry analysis to identify the structures and purity of tadalafil has been carried out. The results determined that 97.5% of the sample products containing tadalafil.

Keywords: tadalafil, PDE5, cGMP

1. MỞ ĐẦU

Tadalafil (**1**) là thuốc ức chế enzym phosphodiesterase-5 (PDE-5) được sử dụng hiệu quả điều trị bệnh rối loạn cương dương [1-2]. Thuốc có tác dụng ức chế enzym PDE-5 làm nhiệm vụ phân hủy chất sinh học nitric oxit (NO) và guanosin monophosphat vòng (cGMP) [3]. Rối loạn cương dương là do PDE-5 hoạt động quá mạnh dẫn đến NO và cGMP bị phân hủy, không tạo được sự giãn mạch cần thiết giúp cho quá trình cương. Thuốc ức chế

PDE-5 giúp bảo vệ và duy trì các chất sinh học tạo sự cương [3-7].



Tadalafil (**1**)

Tadalafil thương mại có tên là Cialis 20mg, thuốc mới nhất được công nhận sử dụng tại nhiều nước, có lợi trong việc kéo dài thời gian tác dụng đến 36 giờ. Tadalafil là chất ức chế chọn lọc có hồi

phục cGMP, đặc biệt là trên enzym PDE-5. Khi kích thích tình dục, nitric oxit được phóng thích tại chỗ, sự ức chế PDE-5 của tadalafil làm tăng nồng độ cGMP trong thể hang dẫn tới sự giãn cơ trơn và làm tăng dòng máu vào trong mô dương vật, từ đó gây cương dương vật. Khi không có kích thích tình dục, tadalafil không có tác dụng [3-5]. Đây là thuốc sắp hết hạn quyền bảo hộ nên được nhiều quốc gia trên thế giới quan tâm nghiên cứu tổng hợp, nhằm ứng dụng vào sản xuất thương mại. Trong công trình này, chúng tôi tập trung nghiên cứu phân tích cấu trúc và hàm lượng của thuốc tadalafil trong quá trình tổng hợp bằng các phương pháp hóa lý hiện đại.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Các hóa chất phục vụ cho việc tổng hợp hữu cơ và dung môi được mua của hãng Merck (Đức) và Aldrich (Mỹ), sử dụng trực tiếp. Các dung môi dùng cho quá trình chiết, chạy sắc ký cột là loại dung môi công nghiệp được cất lại và làm khan trước khi sử dụng. Bột silica gel cho sắc ký cột 100 - 200 mesh (Merck, Đức), bản mỏng sắc ký silica gel là bản nhôm trắng sẵn Art. 5554 DC - Alufolien Kiesel 60 F₂₅₄ (Merck, Đức).

2.2. Thiết bị

Phổ cộng hưởng từ proton ¹H-NMR (500 MHz) và cacbon ¹³C-NMR (125 MHz) được đo trên máy cộng hưởng từ hạt nhân Avance 500 (Bruker, Đức). Phổ FT-IR được đo trên máy Impact 410-Nicolet và phổ MS được đo trên máy Hewlett

Packard Mass Spectrometer 5989 MS và thiết bị HPLC Agilent 1100, cột C18 (150x4,6 mm, 5 μm), Detector DAD, bước sóng 292nm. Tất cả các thiết bị trên là của Viện Hoá học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.3. Tổng hợp chất 3 (sơ đồ 1)

Dung dịch của chất 2 (0,117 mol) và 0,175 mol Et₃N trong 400 mL dung môi diclorometan, được cho thêm cloaxetyl clorua (0,129 mol), hỗn hợp khuấy ở nhiệt độ 0-5 °C trong 24h. Kết thúc phản ứng, dung môi được loại bỏ ở áp suất thấp sau đó cho thêm nước và chiết 3 lần bằng CH₂Cl₂. Dịch hữu cơ được rửa ba lần bằng dung dịch K₂CO₃ 10%, sau đó làm khan với Na₂SO₄ và loại bỏ dung môi ở áp suất thấp thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được làm sạch bằng kết tinh lại trong dung môi diclorometan thu được hợp chất 3 (hiệu suất 98%). Hợp chất 3 là chất rắn màu trắng có điểm chảy 230-231°C, ¹H NMR-500 MHz (CDCl₃): 7,91 (1H, s, NH); 7,58 (1H, d, J=8,0 Hz, H-5); 7,28 (1H, d, J=8,0 Hz, H-8); 7,15-7,25 (3H, m, H-6, H-7, H-5'); 6,84 (1H, d, J=7,5 Hz, H-6'); 6,63 (1H, s, H-2'); 5,89 (2H, s, H-7'); 5,28 (1H, s, H-1); 4,93 (1H, sb, H-3); 4,33 (1H, sb, CH₂-Ha); 4,19 (1H, d, J=15,0 Hz, CH₂-Hb); 3,68 (3H, s, OCH₃); 3,46 (1H, d, J=16 Hz, H-4a); 3,18 (1H, m, H-4b).

2.4. Tổng hợp tadalafil (sơ đồ 1)

Dung dịch của 3 (54,85 g, 0,129 mol) và methyl amin (20,0 g, 0,645 mol) trong EtOH khan (600 mL) được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Kết thúc phản ứng

dung môi được loại bỏ ở áp suất thấp thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được kết tinh lại trong hỗn hợp nước-isopropyl ancol nhận được tadalafil **1** với hiệu suất 91%. Tadalafil là chất rắn màu trắng có điểm chảy 301-302 °C. ¹H NMR-500 MHz (CDCl₃): 11,05 (s, NH indol), 7,54 (1H, d, J=7,5 Hz), 7,24 (1H, d, J=8.0 Hz), 7,12 (1H, d, J=7,0 Hz), 7,00 (1H, d, J=7,0 Hz), 6,78 (1H, s), 6,77 (2H, s), 6,09 (1H, s), 5,80 (2H, s), 4,19 (1H, dd, J=4,0 Hz; 11,5 Hz), 4,17 (1H, d, J=17,0 Hz), 3,87 (1H, d, J=17,0 Hz), 3,52 (1H, dd, J=4,5 Hz; 16,0 Hz), 3,14 (1H, dd, J=12,0 Hz; 15,5 Hz), 2,97 (3H, s). ¹³C NMR (DMSO): 166,8; 166,5; 147,0; 146,0;

136,9; 136,2; 133,9; 125,7; 121,1; 119,3; 118,8; 118,0; 111,2; 107,9; 106,9; 104,7; 100,8; 55,5; 55,2; 51,4; 32,8; 23,0.

2.5. Xác định hàm lượng tadalafil theo phương pháp HPLC

Xây dựng đường chuẩn tadalafil: Cân 2 mg tadalafil chuẩn được pha loãng trong acetonitrile với các nồng độ như sau: 2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,1 mg/ml.

Điều kiện và thiết bị phân tích: Sử dụng hệ thiết bị HPLC Agilent 1100, cột C18 (150x4,6 mm, 5 μm), Detector DAD, bước sóng 292 nm. Pha động acetonitrile và dung dịch nước (ammonium acetate 2,0%, acid formic 0,2%) = 30:70. Hệ Pha động được cài đặt như bảng 1:

Bảng 1. Điều kiện phân tích HPLC

Thời gian (phút)	%B (acetonitrile)	Lưu lượng (ml/phút)
0,00	30	1,0
4,00	30	1,0
5,00	30	1,0
30	30	3,0

Xây dựng đường chuẩn: Đường chuẩn được xây dựng dựa trên phần mềm excel.

Bảng 2. Số liệu xây dựng đường chuẩn

Nồng độ (mg/ml)	Diện tích pic
2	5493,66
0,4	1107,07
0,2	505,55
0,1	23,97

Phương trình đường chuẩn:

$$Y = 2373x + 606,46$$

Trong đó: x là nồng độ của tadalafil (mg/ml); Y là diện tích pic

Xác định nồng độ tadalafil: Cân 0,8 mg chất cần phân tích, hòa tan trong 1 ml acetonitril. Kết quả đo diện tích pic 2466,9. Thay vào phương trình đường chuẩn ta được x = 0,78 mg/ml. Tính được mẫu phân tích chứa 97,5% tadalafil.

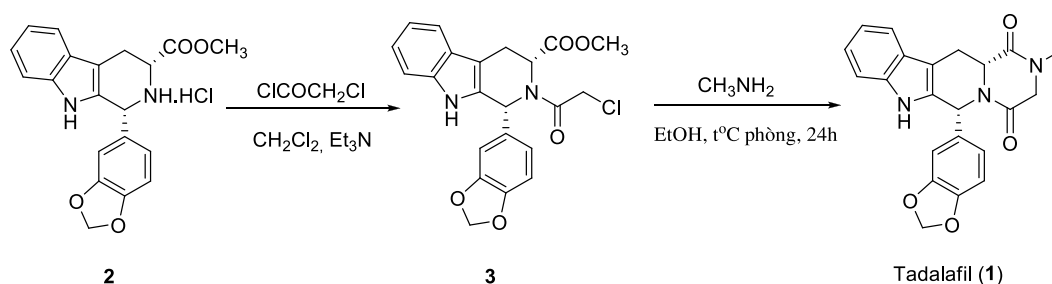
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Cấu trúc của tadalafil

Tadalafil được tổng hợp qua hai bước phản ứng theo sơ đồ 1. Đầu tiên, hợp chất **2** được axyl hóa nhờ phản ứng với 1,5 đương lượng cloaxetyl clorua, có mặt của tác nhân kiềm nhận được hợp chất **3**, tiếp theo được đóng vòng β-cacbolin nhờ phản ứng với 5 đương lượng metyl amin trong dung môi EtOH ở nhiệt độ phòng nhận

được tadalafil (1). Cấu trúc của hợp chất 3 được chứng minh trong công trình trước [15]. Bài báo này tập trung phân tích cấu

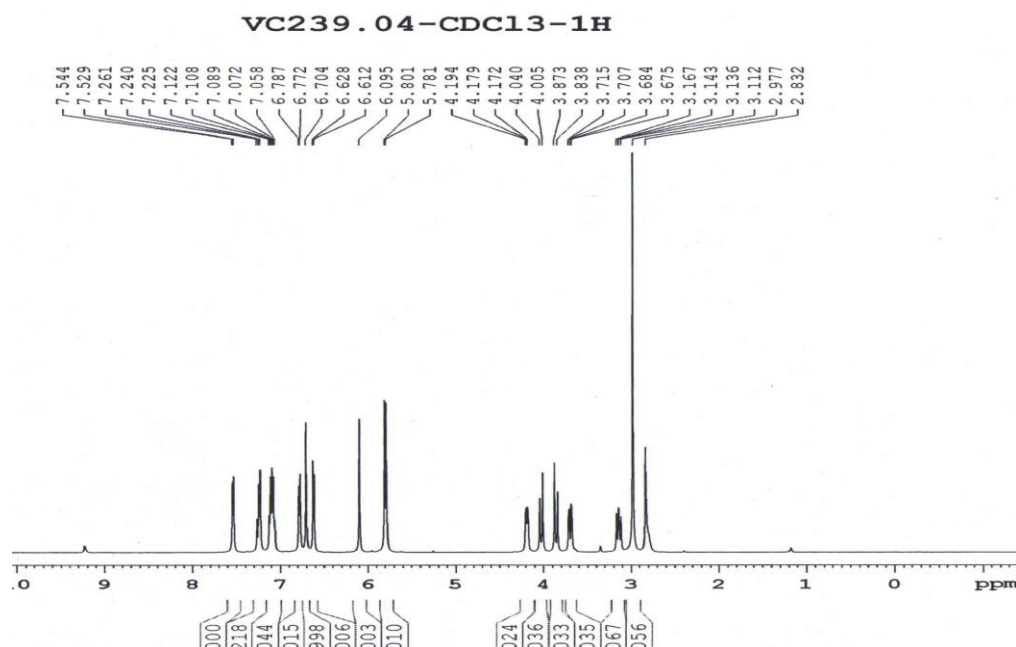
trúc của tadalafil bằng các phương pháp phổ hiện đại.



Sơ đồ 1. Tổng hợp tadalafil

Cấu trúc của các hợp chất tadalafil được chứng minh bằng các phương pháp phổ FT-IR, MS, ^1H -NMR và ^{13}C -NMR. Trên phổ FT-IR của hợp chất tadalafil (1) có đỉnh hấp phụ tại 3321 cm^{-1} đặc trưng của nhóm amin bậc hai, đỉnh hấp phụ tại 1674 cm^{-1} đặc trưng cho nhóm $\text{C}=\text{O}$, đỉnh hấp phụ tại 1040 cm^{-1} đặc trưng cho $\text{C}-\text{O}-\text{C}$.

Ngoài ra, trên phổ FT-IR còn xuất hiện các đỉnh hấp phụ của các liên kết $\text{C}-\text{H}$ bão hòa, $\text{C}-\text{H}$ và $\text{C}=\text{C}$ của nhân thơm. Trên phổ ESI-MS cho pic ion phân tử ở m/z 390,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ và 387,9 $[\text{M}-\text{H}]^+$ phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ của hợp chất tadalafil.

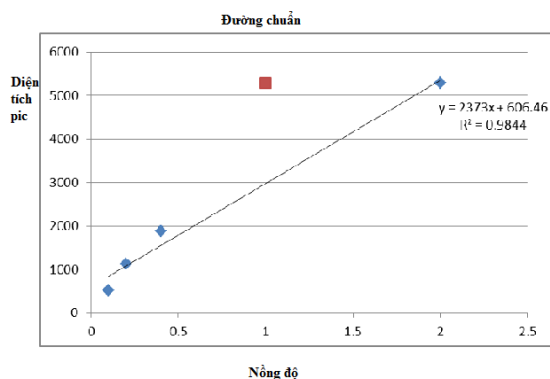


Hình 1. Phổ ^1H -NMR của tadalafil

Trên phổ ^1H -NMR của hợp chất 1 xuất hiện đầy đủ các tín hiệu cộng hưởng của proton có mặt trên phân tử. Tín hiệu cộng

hưởng singlet của ba proton tại 2,97 ppm là đặc trưng của nhóm $\text{N}-\text{CH}_3$. Tín hiệu cộng hưởng doublet-doublet với hằng số

tương tác 12,0 và 16,0 Hz tại 3,14 ppm được gán cho proton H-12a. Tín hiệu cộng hưởng của proton H-12b tại 3,52 ppm với hằng số tương tác 4,5 và 16,0 Hz. Proton ở vị trí H-3 thể hiện là cặp doublet tại 3,87 ppm và 4,17 ppm với hằng số tương tác 17,0 Hz. Proton ở vị trí H-13 là tín hiệu doublet-doublet tại 4,19 ppm với hằng số tương tác 4,0 và 11,5 Hz. Proton ở vị trí H-6 là tín hiệu singlet tại 6,09 ppm. Ngoài ra, trên vùng trường thấp trên ^1H -NMR của hợp chất **1** thể hiện tín hiệu cộng hưởng của 8 proton thơm, tín hiệu cộng hưởng của nhóm etylen tại 5,80 ppm. Độ dịch chuyển hóa học và các hằng số tương tác phù hợp với cấu trúc của tadalafil đã được công bố trong tài liệu [1-7]. Phổ ^{13}C -NMR thể hiện đầy đủ các tín hiệu cộng hưởng của 22 nguyên tử cacbon



Hình 2. Đường chuẩn định lượng tadalafil

4. KẾT LUẬN

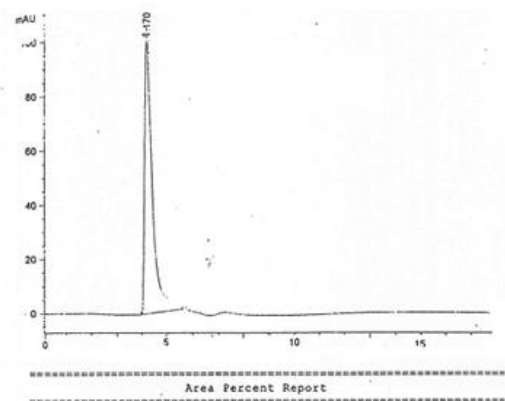
Đã phân tích cấu trúc của tadalafil và các hợp chất trung gian bằng phương pháp phổ hiện đại. Đã xác định hàm lượng của tadalafil theo phương pháp HPLC bằng việc xây dựng đường chuẩn, kết quả cho biết mẫu sản phẩm chứa 97,5% tadalafil.

của chất **1**, trong đó có hai tín hiệu của nhóm cacbonyl. Phân tích phổ trên cho phép khẳng định cấu trúc của hợp chất **1** là tadalafil.

3.2. Xác định hàm lượng tadalafil bằng phương pháp HPLC

Xây dựng đường chuẩn: Từ các dữ liệu trong bảng 2 chúng tôi xây dựng đường chuẩn dựa trên phần mềm excel (hình 2). Phương trình đường chuẩn: $Y = 2373x + 606,46$, $R^2 = 0,9844$, trong đó: X là Nồng độ của tadalafil (mg/ml); Y là diện tích pic.

Xác định nồng độ tadalafil: Kết quả HPLC cho biết độ sạch của tadalafil là 97,5%.



Hình 3. Phổ HPLC của tadalafil

Lời cảm ơn: Các tác giả cảm ơn sự tài trợ của đề tài thuộc chương trình Hóa dược mã số: CNHD.ĐT.055/14-16 để thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. J. Emmick, M. Mitchell, A. Bedding, "Pharmacodynamic interactions between

- tadalafil and nitrates compared with sildenafil”, *Eur. Urol. Suppl.*, 2, 95 (2003).
2. K. Robert, E. Jeff, B. Alun, H. Dennis, “Pharmacodynamic interactions between tadalafil and nitrates”, *J. Am. Colleg. Card.*, 39 (Suppl. 2), 291 (2002).
 3. B. Patterson, A. Bedding, H. Jewell, C. Payne, M. Mitchell, “Dose-normalised pharmacokinetics of tadalafil administered as a single dose to healthy volunteers”, *Eur. Urol. Suppl.*, 1(1), 152 (2002).
 4. J. D. Corbin, S. H. Francis, “Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors”, *Int. J. Clin. Pract.*, 56, 453 (2002).
 5. D. T. Manallack, R. A. Hughes, P. E. Thompson, “The Next Generation of Phosphodiesterase Inhibitors: Structural Clues to Ligand and Substrate Selectivity of Phosphodiesterases”, *J. Med. Chem.*, 48, 3449 (2005).
 6. F. Giuliano, L. Varanese, “Tadalafil: a novel treatment for erectile dysfunction”, *Eur. Heart J. Suppl.*, 4, H24 (2002).
 7. A. B. Mitsi, B. Alfreda, Z. Roya, R. S. Konjeti, P. B. Emmanuel, H. F. Sharron, D. C. Jackie, “Binding of Tritiated Sildenafil, Tadalafil, or Vardenafil to the Phosphodiesterase-5 Catalytic Site Displays Potency, Specificity, Heterogeneity, and cGMP Stimulation”, *Mol. Pharmacol.*, 66, 144 (2004).
 8. A. V. Cinzia, G. Ignazio, M. Teresa, P. Rosario, R. Lorella, L. Carla, M. Claudio P. Donatella, P. Giovanni, “Physico-chemical characterization of disoxaril–dimethyl- β -cyclodextrin inclusion complex and in vitro permeation studies”, *Eur. J. Med. Chem.*, 41, 233 (2006).
 9. V. Vikrant, S. Pankajkumar, K. Poonam, S. Manali, P. Yogesh, “Physicochemical characterization of solid dispersion systems of tadalafil with poloxamer 407”, *Acta Pharm.*, 59, 453 (2009).
 10. S. Xiao-Xin, L. Shi-Ling, X. Wei, X. Yu-Lan, “Highly stereoselective Pictet–Spengler reaction of d-tryptophan methyl ester with piperonal: convenient syntheses of Cialis (Tadalafil), 12a-epi-Cialis, and their deuterated analogues”, *Tetrahedron Asymmetr.*, 19, 435 (2008).
 11. Y. Zhang, Q. He, H. Ding, X. Wu, Y. Xie, “Improved synthesis of tadalafil”, *Org. Prep. Proced. Int.*, 37, 99 (2005).
 12. W. Jiang, V. C. Alford, Y. Qiu, S. Bhattacharjee, T. M. John, D. Haynes-Johnson, P. J. Kraft, S. J. Lundeen, Z. Sui, “Synthesis and SAR of tetracyclic pyrroloquinolones as phosphodiesterase 5 inhibitors”, *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1505 (2004).
 13. Tuyen Nguyen Van, Pieter Claes, Norbert De Kimpe, “Synthesis of Functionalized Diketopiperazines as Cyclotryprostatin and Tryprostatin Analogues”, *Synlett and Synthesis*, 24(8), 1006 (2013).
 14. Nguyen Van Tuyen, Vu Duc Cuong, Ngo Quoc Anh, Pham The Chinh, Dang Thi Tuyet Anh, Hoang Thi Phuong, Pham

Thi Tham, Nguyen Thi Bich Thuan, Nguyen Thi Hanh and Vu Thi Thu Ha, *Vietnam Journal of Chemistry*, 51(5A), 17 (2013).

15. Đặng Thị Tuyết Anh, Phạm Thế Chính, Vũ Đức Cường, Hoàng Thị Phương, Nguyễn Hà Thanh, Phạm Thị Thắm, Đoàn Duy Tiên, Nguyễn Văn Tuyền, “Nghiên cứu qui trình tổng hợp

tadalafil”, *Tạp chí Hóa học*, 6e1-2(53), 272 (2015).

16. Phạm Thế Chính, Đặng Thị Tuyết Anh, Vũ Đức Cường, Nguyễn Hà Thanh, Phạm Thị Thắm, Nguyễn Tuấn Anh, Trần Thị Phương, Đoàn Duy Tiên, Nguyễn Văn Tuyền, “Tổng hợp một số dẫn xuất mới của tadalafil”, *Tạp chí Hóa học*, 6e1-2(53), 277 (2015).