

XÂY DỰNG QUY TRÌNH TỔNG HỢP PYRIDOSTIGMIN BROMUA DÙNG TRONG PHÒNG CHỐNG NHIỄM ĐỘC THẦN KINH CƠ PHOSPHO

NGUYỄN CÔNG TÌNH ⁽¹⁾, HOÀNG QUANG CƯỜNG ⁽¹⁾, LÊ THỊ HUỆ ⁽¹⁾

1. MỞ ĐẦU

Kể từ sau các cuộc chiến tranh thế giới, việc áp dụng vũ khí hóa học trên thực tế chiến trường đã xảy ra một cách thường xuyên hơn, gây ra tỷ lệ thương vong lớn chưa từng có cho cả quân đội và dân thường [1]. Trong các vũ khí hoá học chất độc thần kinh (CĐTK) được coi là một loại vũ khí nguy hiểm nhất, chúng thuộc nhóm các hợp chất phospho hữu cơ được tổng hợp có khả năng gây ra tác động độc hại trực tiếp lên con người, động vật và thực vật [2]. Vào những năm 1930, từ kết quả của nghiên cứu về thuốc trừ sâu, chất độc thần kinh đã được tổng hợp và dự trữ bởi một số quốc gia toàn thế giới. Chiến tranh Iran-Iraq trong những năm 1980 đã dẫn đến hàng ngàn thương vong từ việc sử dụng CĐTK của Iraq [3], và sau đó vào năm 1995, cuộc tấn công tàu điện ngầm Tokyo của giáo phái Aum Shinrikyo sử dụng khí Sarin dẫn đến 12 người thiệt mạng và 5300 người bị thương [4]. Cuộc xung đột ở Syria cũng được coi là đã chứng kiến việc sử dụng CĐTK giết chết nhiều thường dân vô tội, và một tỷ lệ đáng kể những người sống sót chịu đựng những di chứng liên quan đến thần kinh lâu dài.

Có 2 loại chất độc thần kinh chính đó là: Các tác nhân nhóm G và các tác nhân nhóm V. Các tác nhân G-series, hoặc các tác nhân G, bao gồm GA (tabun), GB (sarin), GD (soman), và GF (cyclosarin), do Đức Quốc xã phát triển trước và trong Thế chiến II. Tác nhân V-series bao gồm VX; các hợp chất này được tổng hợp sau Thế chiến II [5].

Các chất độc thần kinh này rất dễ bay hơi và gây tử vong cao, thường không màu, không mùi và không vị nên rất khó phát hiện, gây ra những khó khăn cho công tác dự phòng và điều trị khi bị phơi nhiễm. Hiện nay tình trạng lưu trữ, phát triển các loại vũ khí hóa học trên thế giới vẫn còn phức tạp. Các quốc gia trên thế giới như Hoa Kỳ, Vương quốc Anh, Nga, Israel, Đức và Nhật Bản đã rất tích cực nghiên cứu, triển khai đồng bộ các biện pháp đối phó với CĐTK thông qua các cách tiếp cận khác nhau [6, 7, 8]. Nhiều nhóm nghiên cứu ở nhiều nơi khác nhau trên thế giới đã tổng hợp thành công một số hợp chất có khả năng phòng chống, hỗ trợ điều trị giảm nhẹ các tác động tiêu cực của phơi nhiễm chất độc thần kinh cơ phospho.

Trong lịch sử, pyridostigmin bromua là hợp chất carbamat được chấp nhận rộng rãi nhất như một chất ức chế mang lại hiệu quả tốt nhất so với phần lớn các chất ức chế acetylcholinesterase (AChE) khác. Bản thân nó mang đến tác dụng rất nhanh đối với cơ thể, làm cho nó trở thành một chất được sử dụng phòng chống và giảm nhẹ tác động của các chất độc thần kinh cụ thể là soman và tabun. Tổng hợp pyridostigmin bromua (PB) được thực hiện lần đầu tiên vào năm 1945 bởi Hoffmann-La Roche từ 3-hydroxypyridine [9]. PB là thuốc chính sử dụng trong phác đồ điều trị nhiễm độc thần kinh do soman và tabun, nằm trong danh sách các loại thuốc thiết yếu của tổ chức Y tế Thế giới (WHO) và được coi là một trong những loại thuốc an toàn nhất và hiệu quả nhất tính đến nay [10].

PB ức chế acetylcholinesterase (AChE) trong khe hở synap, do đó làm chậm quá trình thủy phân acetylcholin, điều này ngăn cản liên kết cộng hóa trị của chất độc thần kinh với AChE và do đó giảm nhẹ tác động gây chết người của chất độc thần kinh cơ phospho [11].

Có rất nhiều nghiên cứu về tập trung về hiệu quả sử dụng và ảnh hưởng của PB trong phòng chống chất độc thần kinh như:

- Nghiên cứu về cơ chế tác dụng, tính hiệu quả và độ tin cậy của PB trên cả người và động vật của T Dodd-Butera, Đại học Bang California Hoa Kỳ [12].

- Nghiên cứu về liều dùng PB, các dạng bào chế cho tác dụng tốt nhất và kéo dài của PB [13, 14].

- Thống kê thực trạng sử dụng cũng như hiệu quả của pyridostigmin bromua trong chiến tranh vùng Vịnh năm 1991 [15]. Tác giả đã có những kết luận cụ thể về khả năng phòng nhiễm chất độc thần kinh của PB, tính an toàn của sản phẩm này.

- Nghiên cứu về độc tính cấp và LD₅₀ của viên pyridostigmin bromua 30 mg (trong sử dụng để phòng chống nhiễm chất độc thần kinh) của Bigoniya và cộng sự đăng trên tạp chí Drug Metabolism & Toxicology (2013; 4). Thử nghiệm tiến hành trên thỏ và chuột qua đó đã xác định được liều chết LD₅₀ của viên nén PB 30 mg là 66,9 mg/kg [13].

Những dữ liệu thực tế được đệ trình cho Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Thuốc Hoa Kỳ (FDA) vào năm 1991 cho thấy tỷ lệ bảo vệ chống lại chất độc soman đã tăng từ 1,6 lên 40 lần bằng cách sử dụng PB trước khi tiếp xúc. Trong chiến tranh vùng vịnh Mỹ đã bắt đầu sử dụng PB cấp cho 400000 binh sĩ để bảo vệ chống lại các chất độc thần kinh, với liều dự phòng theo quy định là 30 mg, 3 lần một ngày, tác dụng bảo vệ của 1 viên lên đến 8 giờ. PB cũng đã được Cục Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm hay FDA cấp phép chính thức nhằm trang bị cho quân đội nước này [16].

Hiện nay, tại thị trường Việt Nam, PB chủ yếu được nhập ngoại từ các nguồn cung nước ngoài dưới dạng biệt dược 60 mg, dùng để điều trị bệnh nhược cơ với liều cao và dùng kéo dài. Các công ty sản xuất dược phẩm có chứa PB như: Công ty dược phẩm Dermapharm AG (Đức), Công ty dược phẩm Labiana của Tây Ban Nha có các dây chuyền sản xuất và công thức được bảo mật theo quy định. Hợp chất PB có đặc tính hút ẩm mạnh nên rất khó bảo quản và bào chế. Trong thực tế học tập, luyện tập và sẵn sàng chiến đấu của quân đội ta vẫn chưa được trang bị chế phẩm PB 30 mg để dự phòng cho các sự cố liên quan đến chất độc thần kinh. Việc nghiên cứu tổng hợp hoạt chất PB trong nước nhằm đáp ứng nhu cầu sử dụng cũng chưa có cơ sở, tổ chức nào công bố.

Trong bài báo này, nhóm nghiên cứu trình bày quy trình tổng hợp hợp chất PB, kết quả khả quan bước đầu làm cơ sở tiến tới hoàn thiện quy trình, tạo tiền đề cho các phương hướng phát triển, ứng dụng sản phẩm tiềm năng này vào thực tế.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Sử dụng các hóa chất pyridin-3-yl dimethylcarbamate (Merck, 98%), methyl bromua (Merck, 98%), aceton tinh khiết phân tích (Merck, 99,5%), chất chuẩn pyridostigmin bromua (Merck, 99,5%), bản mỏng TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tổng hợp PB

PB được tổng hợp từ phản ứng giữa pyridin-3-yl-dimethylcarbamate và methyl bromua theo quy trình như sau:

Cân 5g (0,03 mol) pyridin-3-yl-dimethylcarbamate cho vào bình cầu, thêm vào 13 ml dung dịch aceton thu được hỗn hợp dung dịch A. Lấy 1,65 ml (0,03 mol) dung dịch methyl bromua hoà tan trong 4,5 ml dung dịch aceton thu được dung dịch B. Thêm từ từ dung dịch A vào B khuấy đều trong 5 phút ở nhiệt độ phòng sau đó để hỗn hợp trong 10-15 giờ. Thời điểm kết thúc phản ứng được xác định bằng bản mỏng TLC với hệ dung môi khai triển là methanol:ethyl acetat:triethyl amin: acetic acid (9:1:0.5:0.05 v/v). Kết thúc phản ứng lọc kết tủa thu được và rửa lại bằng dung dịch aceton (10 ml x 2 lần). Sấy khô sản phẩm thu được ở nhiệt độ 80 °C trong 3 h thu được sản phẩm PB.

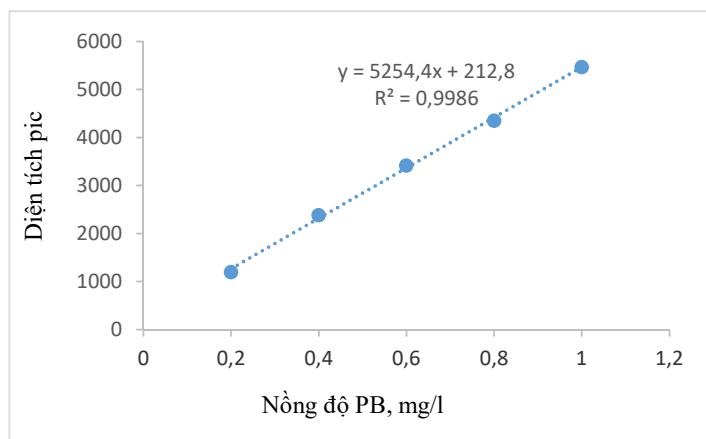
- Điểm nóng chảy của PB được đo trên máy đo nhiệt độ nóng chảy Kruss KSP1N của Đức.

Xác định độ tinh khiết của PB

Độ tinh khiết của PB được xác định trên hệ thống sắc ký Agilent 1120. Đường chuẩn PB được xây dựng với các nồng độ 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 mg/l. Điều kiện phân tích như sau:

- Cột phân tích: Agilent TC- C18 (250 x 4,6 mm, kích thước hạt nhồi 5µm);
- Thể tích bơm mẫu: 5 µl;
- Pha động: KH_2PO_4 5mM:acetonitril (60:40 v/v);
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút;
- Bước sóng UV phát hiện: 269 nm;
- Thời gian phân tích: 10 phút.

Căn cứ vào diện tích pic của PB tổng hợp được trên sắc ký đồ, dựa vào phương trình đường chuẩn PB và độ tinh khiết của chất chuẩn, tính được độ tinh khiết của PB tổng hợp được.

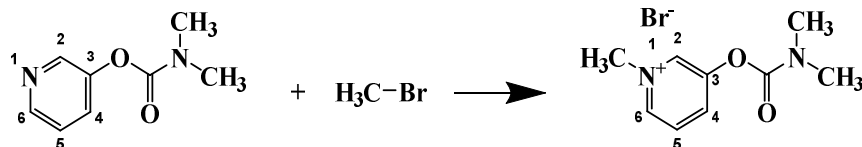


Hình 1. Đường chuẩn PB

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Tối ưu điều kiện phản ứng

Từ pyridin-3-yl-dimethylcarbammat tiến hành tổng hợp PB theo quy trình được trình bày ở mục 2.2. Phản ứng xảy ra theo phương trình sau:



Sơ đồ 1. Sơ đồ tổng hợp PB

Để nâng cao hiệu suất tổng hợp, nhóm nghiên cứu đã tiến hành khảo sát nhằm lựa chọn những điều kiện thích hợp của các yếu tố ảnh hưởng tới phản ứng theo sơ đồ 1.

3.1.1. Ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng tới hiệu suất tổng hợp PB

Thời gian thích hợp cho phản ứng tổng hợp PB được khảo sát ở các nhiệt độ 15, 25, 35 và 45°C. Phản ứng được tiến hành trong dung môi acetone với tỷ lệ các chất phản ứng pyridin-3-yl-dimethylcarbammat và methyl bromua là 1:1,2 (mol/mol) và thời gian phản ứng là 24 giờ. Hiệu suất phản ứng được tính theo pyridin-3-yl-dimethylcarbammat. Kết quả khảo sát được thể hiện trong bảng 1.

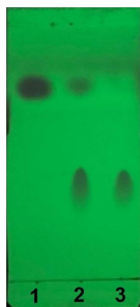
Bảng 1. Ảnh hưởng của nhiệt độ

Nhiệt độ, °C	Hiệu suất, %
15°C	60,38
25°C	75,68
35°C	60,46
45°C	57,77

Có thể thấy rằng hiệu suất phản ứng cao nhất thu được khi thực hiện phản ứng ở 25°C. Sự tăng dần nhiệt độ phản ứng trên mức 25°C không làm tăng hiệu suất phản ứng do ở nhiệt độ càng cao thì tỷ lệ methyl bromua bị bay hơi càng nhiều làm giảm nồng độ chất tham gia phản ứng. Do đó, nhiệt độ thích hợp cho phản ứng được chọn là 25°C.

3.1.2. Ảnh hưởng của tỷ lệ mol các chất phản ứng tới hiệu suất tổng PB

Khảo sát tỷ lệ thích hợp các chất tham gia phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ 25°C và thời gian phản ứng là 24 giờ. Theo phương trình phản ứng PB được tạo thành từ pyridin-3-yl-dimethylcarbammat và methyl bromua với tỷ lệ mol 1:1. Tuy nhiên ở tỷ lệ này, phản ứng chỉ xảy ra với hiệu suất đạt 60,87%. Kiểm tra bằng bản mỏng TLC với hệ dung môi khai triển là methanol:ethyl acetat:triethyl amin:acetic acid (9:1:0.5:0.05 v/v) cho thấy phản ứng xảy ra không hoàn toàn với chất đầu pyridin-3-yl-dimethylcarbammat vẫn còn dư (hình 2).



1 - pyridin-3-yl-dimethylcarbamate;
2 - tỷ lệ mol 1:1;
3 - tỷ lệ mol 1:1,2

Hình 2. Hình ảnh TLC khảo sát tỷ lệ mol các chất phản ứng

Chất đầu pyridin-3-yl-dimethylcarbamate chỉ phản ứng hoàn toàn khi tỷ lệ pyridin-3-yl-dimethylcarbamate và methyl bromua tham gia phản ứng là 1:1,2 đạt hiệu suất tổng hợp là 75,68%. Việc tăng tỷ lệ các chất phản ứng lên 1:1,3 không làm tăng hiệu suất phản ứng.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ mol các chất tham gia đến hiệu suất phản ứng

Tỷ lệ mol chất phản ứng		Hiệu suất, %
Pyridin-3-yl-dimethylcarbamate, mol	Methyl bromua mol	
1	1	60,87
1	1,1	71,57
1	1,2	75,68
1	1,3	75,72

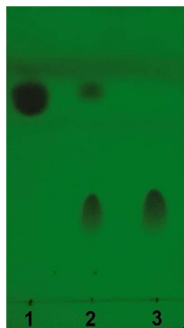
Từ những khảo sát trên cho thấy tỷ lệ pyridin-3-yl-dimethylcarbamate và methyl bromua thích hợp cho phản ứng là 1:1,2 mol/mol.

3.1.3. Ảnh hưởng của thời gian tới hiệu suất tổng hợp PB

Thời gian thích hợp cho phản ứng tổng hợp PB được tiến hành ở nhiệt độ 25°C, tỷ lệ pyridin-3-yl-dimethylcarbamate và methyl bromua là 1:1,2 mol/mol. Sau thời gian 10 giờ phản ứng, kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng TLC để xác định thời gian kết thúc phản ứng (mỗi lần cách nhau 1 giờ). Kết quả khảo sát được trình bày trong bảng 3 và hình 3.

Bảng 3. Khảo sát thời gian kết thúc phản ứng tổng hợp PB

Thời gian, giờ	Mức phản ứng của pyridin-3-yl-dimethylcarbamate trong dịch phản ứng
10	Chưa phản ứng hết
11	Chưa phản ứng hết
12	Chưa phản ứng hết
13	Chưa phản ứng hết
14	Phản ứng hết



Hình 3. Hình ảnh TLC khảo sát thời gian phản ứng

1 - pyridin-3-yl-dimethylcarbamate; 2 - sau 13 giờ; 3 - sau 14 giờ

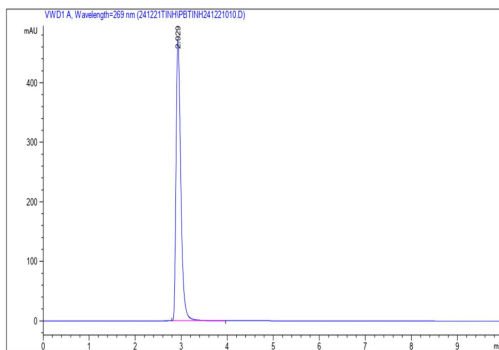
Kết quả khảo sát cho thấy chất đầu pyridin-3-yl-dimethylcarbamate tham gia phản ứng hết hoàn toàn sau 14 giờ. Như vậy, thời gian thích hợp được lựa chọn là 14 giờ.

Hiệu suất tổng hợp PB ở các điều kiện nhiệt độ, tỷ lệ mol và thời gian thích hợp đạt 75,68%.

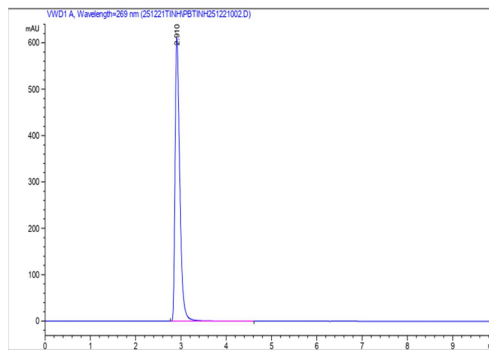
3.2. Kiểm tra độ tinh sạch của sản phẩm thu được

Sản phẩm PB tổng hợp được ở dạng bột màu trắng và có nhiệt độ nóng chảy là $152\div 153^{\circ}\text{C}$, hoàn toàn trùng khớp với nhiệt độ nóng chảy của chất chuẩn và các tài liệu đã được công bố [9].

Ngoài ra, khi định tính PB tổng hợp được bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC), nồng độ dung dịch đo là 0,8 mg/l, cho thấy trên sắc ký đồ của dung dịch thử chỉ quan sát thấy sự xuất hiện của 1 peak tại thời gian lưu là 2,91 phút, chiếm 100% như trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn (hình 4). Điều này khẳng định đã tổng hợp thành công PB với độ tinh khiết cao.



(a)



(b)

Hình 4. Sắc ký đồ của dung dịch PB tinh khiết (a) và sản phẩm PB tổng hợp (b) ở nồng độ 0,8mg/l

Kết quả đo trên máy sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) của mẫu PB tổng hợp được trình bày tại bảng 4.

Bảng 4. Kết quả thời gian lưu và diện tích peak của dung dịch PB tổng hợp ở nồng độ 0,8mg/l

TT	Thời gian lưu (min)	Diện tích peak (mAU*s)
1	2,911	4386,9
2	2,914	4383,1
3	2,910	4385,6
TB	2,911	4385,2

Căn cứ vào đường chuẩn và độ tinh khiết của chất chuẩn PB, diện tích peak và sắc ký đồ của dung dịch thử đã xác định PB tổng hợp được có độ tinh khiết đạt 99,3%.

4. KẾT LUẬN

- Đã khảo sát được các điều kiện thích hợp để tổng hợp thành công hợp chất PB với hiệu suất đạt 75,68%, cụ thể ở nhiệt độ phản ứng 25°C, tỷ lệ pyridin-3-yl-dimethylcarbamate:methyl bromua 1:1,2 (mol/mol) và thời gian phản ứng 14 giờ.

- Hợp chất PB tổng hợp được có độ tinh khiết cao, đạt 99,3%. Đây là tiền đề tốt nhằm phát triển, hoàn thiện và tối ưu thêm quy trình tổng hợp PB tiến tới chủ động cung cấp nguồn nguyên liệu này dùng cho bào chế thuốc chống nhược cơ, cũng như thuốc phòng chống nhiễm độc thần kinh cơ phospho tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. Moshiri, E. Darchini-Maragheh, M. Balali-Mood, *Advances in toxicology and medical treatment of chemical warfare nerve agents*, Daru, 2012, **20**(1):1-24.
2. J. Chan, R. Yeung, S. Tang, *An overview of chemical warfare agents*, Hong Kong J. Emerg. Med., 2002, **9**(4):201-205
3. M. R. Gravett, F. B. Hopkins, M. J. Main, *Detection of the organophosphorus nerve agent VX and its hydrolysis products in white mustard plants grown in contaminated soil*, Anal. Methods, 2013, **5**(1):50-53.
4. Timothy C. Marrs, Robert L. Maynard, Frederick R. Sidell, *Chemical warfare agents: toxicology and treatment*, John Wiley & Sons Ltd, 2007, p.72-110.
5. S. Chauhan, V. Karthik, M. Singh, *Chemical warfare agents Environ, Toxicol. Pharmacol.*, 2008, **26**(2):113-122.
6. C. B. Millard, G. Kryger, A. Ordentlich, H. M. Greenblatt, M. Harel, M. L. Raves, Y. Segall, D. Barak, A. Shafferman, I. Silman, *Crystal structures of aged phosphorylated acetylcholinesterase: nerve agent reaction products at the atomic level*, Biochemistry, 1999, **38**(22):7032-7039.
7. F. Schmaltz, *Neurosciences and research on chemical weapons of mass destruction in Nazi Germany*, J. Hist. Neurosci., 2006, **15**(3):186-209.
8. J. Bajgar, *Organophosphates and nerve agents, in: Nerve agents poisoning its treat*, Schematic Fig. Tables, 2012, p.7-17.

9. J. A. Kepler, C. E. Twine, R. D. Austin, *Preparation of pyridostigmine bromide labeled with carbon-14 and tritium*, J. Label. Compd. Radiopharm, 1992, **31**(8):615-627.
10. WHO, *WHO model lists of essential medicines*, <http://apps.who.int/iris/>. Accessed 08 March 2020.
11. Jum P., "Neostigmine bromua", The American society of health-system Pharmacists, 2016.
12. T. Dodd-Butera, M. Broderick, *pyridostigmine, encyclopedia of toxicology*, 2014, p.1162-1164.
13. Papiya Bigoniya, Anil Kumar Singh, Dharmesh Bigoniya and Gopalan, *Pyridostigmine bromide and potassium iodate: subacute oral toxicity and stability*, Journal Drug Metab Toxicol, 2013, **4**(2):145.
14. Timothy C. Marrs, Robert L. Maynard, Frederick R. Sidell, *Chemical warfare agents: toxicology and treatment*, John Wiley & Sons Ltd, England, 2007.
15. Carolyn E. Fulco, Catharyn T. Liverman, Harold C. Sox, *Gulf War and health: Volume 1. depleted uranium, pyridostigmine bromide, sarin, and vaccines*, National Academy Press, 2000, **1**:432.
16. Reuben S., Maghembe, Andrew G., Mtewa Maghembe, *Applications of phytochemicals against nerve agents in counterterrorism*, Research Gate, 2021, **6**:70-118.

SUMMARY

SYNTHESIS OF PYRIDOSTIGMINE BROMIDE USED IN PREVENTION OF ORGANOPHOSPHATE NERVE AGENTS POISONING

Pyridostigmine, a quaternary carbamate inhibitor of acetylcholinesterase, is used to treat muscle weakness with myasthenia gravis or to reduce the effects of curariforms drug toxicity. Pyridostigmine bromide have been approved for military use as an agent for the protection of cholinesterase enzymes (against soman and tabun exposure). In this paper, we described the synthesis of pyridostigmine bromide from pyridine-3-yl-dimethylcarbamate. The highest yield (75.68%) was obtained using following reactional conditions: 25°C, 14h and the molar ratio of pyridine-3-yl-dimethylcarbamate:methyl bromide=1:1.2. HPLC analysis of synthetic pyridostigmine bromide showed a purity of 99.3%. This simple and efficient method can be used to scale up for the synthesis of pyridostigmine bromide as raw material in the production of myasthenic gravis drugs, as well as anti-nerve agent drugs in Vietnam.

Keywords: *Pyridostigmine bromide, AchE, pyridine-3-yl-dimethylcarbamate, chất độc thần kinh.*

Nhận bài ngày 30 tháng 3 năm 2022

Phản biện xong ngày 12 tháng 5 năm 2022

Hoàn thiện ngày 26 tháng 6 năm 2022

Phân viện Công nghệ sinh học, Trung tâm nhiệt đới Việt - Nga