

ĐẠI HỌC QUỐC GIA HÀ NỘI
TRƯỜNG ĐẠI HỌC
KHOA HỌC TỰ NHIÊN

VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN HOÁ HỌC

Nguyễn Văn Thắng

TỔNG HỢP VÀ NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH HẠ HUYẾT ÁP CỦA ATENOLOL

Chuyên ngành: Hoá Hữu cơ

Mã số: 60.44.27

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Người hướng dẫn khoa học: **TS. Lưu Văn Chính**

Hà Nội – Năm 2009

LỜI CẢM ƠN

Với lòng biết ơn sâu sắc em xin chân thành cảm ơn **TS. Lưu Văn Chính** đã giao đề tài và tận tình hướng dẫn em trong suốt quá trình làm luận văn.

Em cũng xin chân thành cảm ơn các thầy cô giáo trong bộ môn hoá Hữu cơ cũng như các thầy cô của khoa Hoá học – ĐH KHTN đã tận tình truyền đạt kiến thức và đóng góp nhiều ý kiến quý báu trong suốt quá trình em học tập và hoàn thành luận văn của mình.

Cuối cùng em xin cảm ơn các anh chị phòng hoạt chất Sinh học - Viện Hoá học các hợp chất Thiên nhiên - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo điều kiện và tận tình giúp đỡ trong quá trình tiến hành thực nghiệm.

Hà Nội, Ngày 25 tháng 11 năm 2009

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	4
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	6
1.1. Giới thiệu về nhóm thuốc chẹn thụ thể beta và atenolol	6
1.1.1. Vài nét về nhóm thuốc chẹn thụ thể beta	6
1.1.2. Giới thiệu về atenolol	8
1.2. Các phương pháp tổng hợp atenolol	13
1.2.1. Tổng hợp atenolol từ <i>p</i> -hydroxyacetophenon thông qua phản ứng Wilgerodt	13
1.2.2. Tổng hợp atenolol từ este của axit <i>p</i> -hydroxyphenylaxetic	16
1.2.3. Tổng hợp atenolol từ phenol	19
1.2.3.1 <i>Thông qua dẫn xuất nitrin</i>	19
1.2.3.2 <i>Thông qua dẫn xuất nitrin sử dụng xúc tác hydrat hoá</i>	19
1.2.3.3 <i>Thông qua dẫn xuất axit <i>p</i>-hydroxymandelic và <i>p</i>-hydroxyphenylaxetic</i>	21
1.2.4. Tổng hợp atenolol từ 4-hydroxybenzylancol và 4-hydroxi benzaldehyt	21
1.2.4.1 <i>Tổng hợp atenolol từ 4-hydroxybenzylancol</i>	21
1.2.4.2 <i>Tổng hợp atenolol từ 4-hydroxybenzaldehyt</i>	22
1.2.5. Tổng hợp (S)-atenolol	23
CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM	26
2.1. Các phương pháp thực nghiệm	26
2.1.1. Thiết bị, dụng cụ, và hoá chất dùng trong tổng hợp	26
2.1.2. Các phương pháp sử dụng trong tổng hợp và tinh chế sản phẩm	26
2.1.3. Các phương pháp nghiên cứu cấu trúc của các sản phẩm	27
2.1.3.1 <i>Phổ tử ngoại khả kiến (UV-VIS)</i>	27
2.1.3.2 <i>Phổ hồng ngoại (FT-IR)</i>	27
2.1.3.3 <i>Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối khối phổ (HPLC-MS)</i>	27
2.1.3.4 <i>Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)</i>	27
2.2. TỔNG HỢP ATENOLOL	28
2.2.1. Tổng hợp axit <i>p</i> -hydroxymandelic	28
2.2.2. Tổng hợp axit <i>p</i> -hydroxyphenylaxetic	29
2.2.3. Tổng hợp <i>p</i> -hydroxyphenylaxetamid	29
2.2.4. Điều chế hỗn hợp epoxi và halohydrin của <i>p</i> -hydroxyphenylaxetamid	30
2.2.4.1 <i>Điều chế hỗn hợp epoxi và halohydrin của <i>p</i>-hydroxyphenylaxetamid</i>	

<i>bằng phản ứng với kiềm</i>	30
2.2.4.2 <i>Điều chế hỗn hợp epoxi và halohydrin của p-hydrox phenylaxetamit bằng xúc tác chuyển pha</i>	30
2.2.4.3 <i>Điều chế hỗn hợp epoxi và halohydrin của p-hydroxyphenylaxetamit bằng hỗn hợp kiềm và xúc tác chuyển pha</i>	31
2.2.5. Tổng hợp atenolol	31
2.2.6. Tinh chế atenolol	31
2.3. NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH HẠ HUYẾT ÁP CỦA ATENOLOL	32
2.3.1. Nghiên cứu độc tính cấp của atenolol	32
2.3.2. Nghiên cứu hoạt tính hạ huyết áp của atenolol	32
2.3.2.1 <i>Đối tượng, thiết bị và hoá chất</i>	32
2.3.2.2 <i>Phương pháp nghiên cứu mô phỏng theo phương pháp của Evant</i>	33
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	34
3.1. Kết quả tổng hợp	34
3.1.1. Kết quả tổng hợp axit p- hydroxymadelic	34
3.1.2. Kết quả tổng hợp axit p-hydroxyphenylaxetic	38
3.1.3. Kết quả tổng hợp p-hydroxyphenylaxetamit	40
3.1.4. Kết quả tổng hợp hỗn hợp epoxi và halohydrin của p-hydroxyphenylaxetamit	43
3.1.5. Kết quả tổng hợp atenolol	48
3.2. Kết quả nghiên cứu hoạt tính của atenolol	56
3.2.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của atenolol	56
3.2.2. Kết quả nghiên cứu hoạt tính hạ huyết áp	58
3.2.2.1. <i>Kết quả đo huyết áp và nhịp tim trước và sau khi thắt động mạch thận</i>	58
3.2.2.2. <i>Kết quả nghiên cứu tác dụng hạ huyết áp</i>	59
3.2.2.3 <i>Kết luận</i>	67
KẾT LUẬN	67
TÀI LIỆU THAM KHẢO	68
PHỤ LỤC	74

MỞ ĐẦU

Bệnh cao huyết áp là bệnh thường gặp nhất trong xã hội hiện đại, đặc biệt ở những người có tuổi và ngày càng có xu hướng tăng lên ở những người ở độ tuổi thanh niên và trung niên, bệnh có quan hệ chặt chẽ với bệnh tim mạch, đây là một trong những bệnh nguy hiểm, gây tử vong cao, diễn biến bệnh đột ngột, khó lường. Một số yếu tố nguy cơ làm gia tăng nguy cơ cao huyết áp như tiểu đường, thuốc lá, tăng lipid máu, di truyền. Cao huyết áp là bệnh lý gây tử vong và di chứng thần kinh nặng nề như liệt nửa người, hôn mê với đời sống thực vật, đồng thời có thể thúc đẩy suy tim, thiếu máu cơ tim làm ảnh hưởng nhiều đến chất lượng sống (không cảm thấy khoẻ khoắn, mất khả năng lao động). Theo thống kê, bệnh tim mạch do cao huyết áp gây tử vong hàng đầu, đặc biệt ở các nước công nghiệp phát triển. Theo tổ chức y tế thế giới, trị số huyết áp tối ưu là 120/80 mmHg, trong đó chỉ số 120 là huyết áp tâm thu, chỉ số dưới 80 là huyết áp tâm trương. ở người bị huyết áp cao, 2 chỉ số đó cao hơn 140/90 mmHg. Việc sử dụng thuốc để điều trị cao huyết áp là nhằm đưa trị số huyết áp xuống dưới 140/90 mmHg đối với người trên 60 tuổi và dưới 135/85 mmHg đối với người trung niên hay mắc bệnh đái tháo đường.

Cho đến nay đã có nhiều loại thuốc được sử dụng để điều trị bệnh cao huyết áp và tim mạch như: Nhóm thuốc tác dụng lên thần kinh trung ương (metyldopa, clonidin, reserpin...); nhóm thuốc lợi tiểu (indapamid, amilorid, hydroclorothiazid, furosesemid, spironolacton, triamteren...); nhóm thuốc đối kháng canxi (nifedipin, nicardipin, amlodipin, isradipin, verapamil, diltiazem...); nhóm thuốc ức chế men chuyển (captopril, enalapril, benazepril, quinapril...); nhóm thuốc kháng thụ thể angiotensin II. (losartan, candesartan, valsartan...); nhóm thuốc chẹn thụ thể alpha (pazosin, alfurosine, terazosin, phentolamin...) [34].

Nhóm thuốc đang được dùng rộng rãi trong điều trị bệnh cao huyết áp và tim mạch là nhóm thuốc chẹn thụ thể beta (β -blockers). Điển hình của nhóm này là atenolol, metoprolol, propranolol, pindolol, nadolol, acebutolol... Cơ chế tác dụng của

thuốc này là ức chế thụ thể beta giao cảm ở tim, mạch ngoại vi, do đó sẽ làm chậm nhịp tim và hạ huyết áp. Trong số đó, atenolol được sử dụng rất rộng rãi vì có nhiều ưu điểm được học, ngoài làm giảm huyết áp, atenolol còn làm giảm nhịp tim và chống thiếu năng mạch vành, chống bệnh đau thắt ngực và nhồi máu cơ tim nên chúng rất có lợi, hay được chỉ định dùng cho các bệnh nhân tăng huyết áp có kèm theo loạn nhịp tim, tim nhanh, ngoại tâm thu, người hay bị hồi hộp trống ngực kèm theo bệnh mạch vành [35]. Đặc biệt các phản ứng phụ của nó không có hoặc rất nhẹ nên chỉ phải uống cả liều thuốc 1 lần trong ngày, liều cao đối với bệnh nặng mới phải dùng tới 2 lần/ngày.

Do đó điều trị huyết áp cao là vấn đề cần lưu ý trong cộng đồng vì những hậu quả to lớn của nó. Hiện nay, các thuốc điều trị cao huyết áp thường phải nhập ngoại, giá cả thường đắt mà nguồn thuốc không thể chủ động được. Do vậy, chúng tôi quyết định chọn đề tài:

Tổng hợp và nghiên cứu hoạt tính hạ huyết áp của atenolol.

Với mục tiêu đặt ra là:

Xây dựng được qui trình công nghệ tổng hợp hỗn hợp 2 dạng R và S của atenolol ở qui mô phòng thí nghiệm từ chất đầu đơn giản nhất là phenol và cải tiến qui trình sao cho có hiệu quả nhất phù hợp với điều kiện ở Việt nam. Nghiên cứu thử nghiệm tính an toàn và tác dụng dược lý của atenolol như xác định LD₅₀, thử nghiệm khả năng hạ huyết áp của atenolol trên mô hình chuột để có kết luận về hoạt tính hạ huyết áp của chất tổng hợp được.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Giới thiệu về nhóm thuốc chẹn thụ thể bêta và atenolol

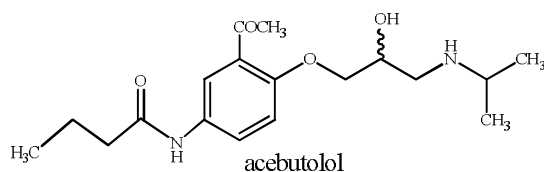
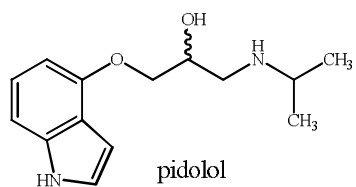
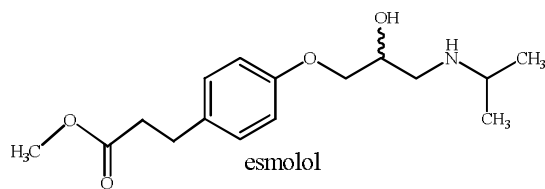
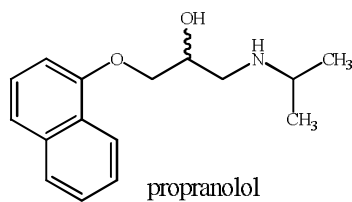
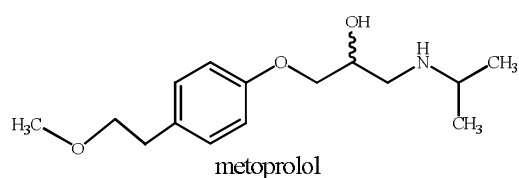
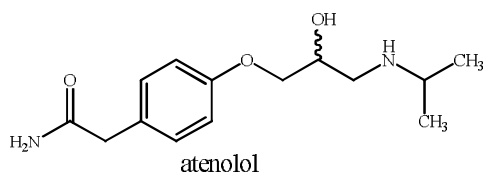
1.1.1. Vài nét về nhóm thuốc chẹn thụ thể bêta [33]

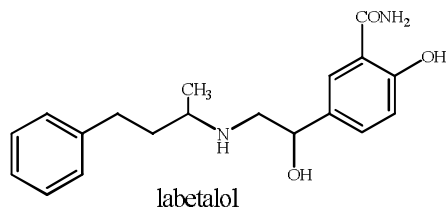
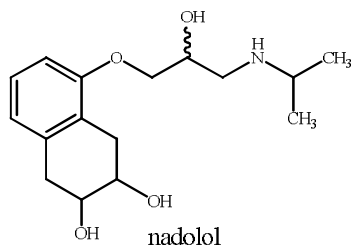
Nhóm thuốc chẹn thụ thể bêta là nhóm các thuốc được sử dụng để điều trị các chứng rối loạn tim mạch như chứng tăng huyết áp, chứng loạn nhịp tim, chứng thiếu máu cục bộ. Mỗi loại thuốc thuộc nhóm chẹn thụ thể bêta đều bao gồm ít nhất một trung tâm bất đối và hoạt tính quang hoạt của chúng tác động đến các thụ thể bêta – adrenergic. Với các chất thuộc nhóm chẹn thụ thể bêta mà có duy nhất một nguyên tử các bon bất đối thì các đồng phân (S) enantiomer (đối quang quay trái) sẽ có hoạt lực mạnh hơn các đối quang của nó. Các đối quang khác nhau của một số loại thuốc này có tác động khác nhau, như tác động kháng thụ thể alpha – adrenergic hoặc tác động chống loạn nhịp tim lớp III. Tuy nhiên các tác động này biểu hiện tính lập thể thấp hơn so với việc tác động đến các thụ thể bêta. Nhóm thuốc chẹn thụ thể beta khá đa dạng về chủng loại, ngoại trừ timolol, tất cả các thuốc này được sử dụng trong việc điều trị lâm sàng với các bệnh nhân huyết áp và tim mạch dưới dạng raxemic. Theo quan điểm dược động lực học, nhóm này có giá trị lớn trong việc gắn kết các thể plasma protein, phần lớn các thuốc này bị mất đi trong quá trình trao đổi chất, bài tiết qua đường nước tiểu và bị hấp thụ bởi gan, nồng độ tương đối của các đối quang trong thể plasma không phải là cố định mà nó thay đổi theo từng thành viên của nhóm. Ngoài ra, nhiều yếu tố liên quan đến thuốc hoặc bệnh nhân có thể ảnh hưởng tới dược lực của các thuốc nhóm chẹn thụ thể bêta. Sự hiểu biết về dược lực, về tác dụng lập thể có thể giúp giải thích và dự đoán sự khác biệt giữa các bệnh nhân trong việc phản ứng với loại thuốc này.

Trong điều trị lâm sàng, các thuốc chẹn thụ thể bêta chiếm một vị trí khá quan trọng và chúng được sử dụng rất phổ biến. Một số thuốc đã được tổng hợp và được sử dụng một cách có hệ thống trong điều trị các chứng rối loạn tim mạch như chứng tăng huyết áp, chứng loạn nhịp tim, chứng đau thắt ngực, tăng nhãn áp. Đối với các tác dụng

lâm sàng này, các nhóm chẹn thụ thể beta thường được phân biệt dựa trên sự chọn lọc của chúng đối với các thụ thể beta. Các thuốc chẹn thụ thể beta không chọn lọc bao gồm: propranolol, oxprenolol, pindolol, nadolol, timolol và labetalol, chúng có tác dụng đối kháng với các thụ thể beta-1, beta-2 adrenergic. Các thuốc chẹn thụ thể beta chọn lọc bao gồm: metoprolol, atenolol, esmolol và acebutolol, chúng có tác dụng gắn kết các thụ thể beta 1-adrenergic mạnh hơn nhóm không chọn lọc. Các thuốc chẹn thụ thể beta chọn lọc thường được chỉ định cho các bệnh nhân mà trong người có các thụ thể kết hợp có nguy cơ gây ra tác dụng phụ, đó là các bệnh nhân mắc các chứng bệnh như hen suyễn, tiểu đường, hay bệnh Raynaud.

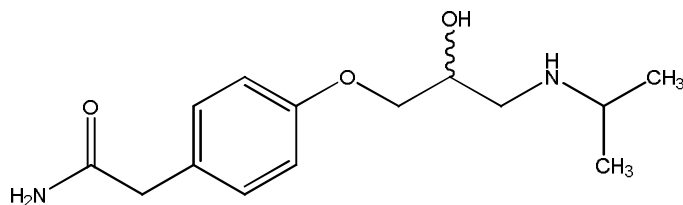
Một đặc điểm dễ nhận thấy nhất trong công thức cấu tạo của của nhóm chẹn thụ thể beta là có ít nhất một vòng thơm, kết hợp với một mạch ankyr có nhóm hydroxyl bậc hai và nhóm amin hoạt động. Mỗi chất trong nhóm này đều có một hoặc nhiều trung tâm bất đối trên mạch ankyr và gắn trực tiếp với nhóm hydroxyl. Ngoại trừ timolol chỉ có một đồng phân S, các chất còn lại đều có hai đồng phân tạo thành hỗn hợp raxemic. Dưới đây là công thức cấu tạo một vài chất thuộc nhóm chẹn thụ thể beta:



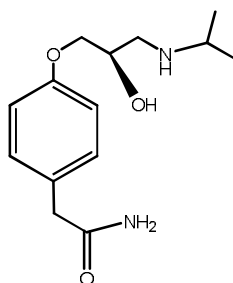


1.1.2. Giới thiệu về atenolol

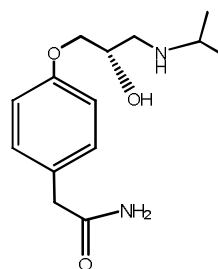
Atenolol là hợp chất hữu cơ, có công thức phân tử $C_{14}H_{22}N_2O_3$ và có công thức cấu tạo như ở phía dưới, thuộc nhóm thuốc chẹn thụ thể beta (β -blockers), atenolol tác dụng chủ yếu lên thụ thể beta-1. Đây là một hoạt chất đang sử dụng rất rộng rãi trong điều chế thuốc điều trị bệnh cao huyết áp, đau thắt ngực và nhồi máu cơ tim. Thuốc được cung cấp dưới các tên thương mại như: Atehexal (Hexal); Ateno basan (Sagitta); Atenol (CT); Cuxanorm (TAD); Ibinolo (IBI); Myocord (Elvetium-Rhodia); Prenormine (Zeneca); Seles Beta (Schwarz); Tenoblock (Leiras); Tenormin (Zeneca); Uniloc (Nycomed); Anselol; Antipressan; Ate; Atebeta; Atehexal; Atendol; Atenix; Ateno; Betatop; Blocotenol; Cuxanorm; Duratenol; Evitocor; Falitonsin; Jenatenol; Juvental; Noten; Tenlol; Teno; Tenormin(e); Tensig; Tonoprotect; Totamol; Xaten, Beta-Adalat, Kalten, Tenben, Tenchlor, Tenif, Tenoret(ic) and Totaretic....[11, 12]. Công thức cấu tạo của atenolol được biểu diễn như sau:



Trong công nghiệp, atenolol được sản xuất dưới dạng hỗn hợp racemic của hai dạng lập thể R(+) và S(-), có công thức cấu tạo như sau:



S(-) atenolol



R(+) atenolol

Trên thị trường atenolol được bán dưới dạng hỗn hợp racemic của 2 dạng đồng phân (S-) atenolol và (R+)atenolol và là một trong năm loại thuốc bán chạy nhất thế giới [8].

Bảng 1: Một số tính chất lý hoá và đặc trưng cấu trúc của atenolol

Tên thông thường	ATENOLOL
Tên hoá học	(RS)-4-(2-hydroxy-3-(isopropylamino)propoxy)phenylacetamide; 2-4-(2-Hydroxy-3-isopropylaminopropoxy)phenylacetamide; 4-(2'-hydroxy-3'-((1-methylethyl)amino) propoxy)benzeneacetamide; 1- <i>p</i> -carbamoymethyl phenoxy-3-isopropylamino-2-propanol.
Công thức phân tử	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃
Khối lượng phân tử	266,34
Thành phần nguyên tố	C 63,13%, H 8,33%, N 10,52%, O 18,02%
Nhiệt độ nóng chảy	146-148 ⁰ C (có tài liệu 152-154 ⁰ C)
Hằng số phân li pKa	9.6 ở 24 ⁰ C
Thử màu	Theo Liebermann Test màu đen; Thuốc thử Nessler: màu vàng – nâu (chậm)
Hệ số phân bố	0.008 (pH 7.0); 0.052 (pH 8.0) / (<i>n</i> -octanol/đệm photphat)

Moment lưỡng cực	5.71 ±0.20 D ở 20°C trong axit propionic
Dạng lập thể	Dạng R(+) và S(-)
Phổ tử ngoại UV _{max}	225, 275, 283 nm (đo trong metanol)
Phổ hồng ngoại	Peak chính: 1633, 1245, 1510, 1184, 805, 820 cm ⁻¹ .
Phổ khối lượng	m/z 72, 30, 56, 98, 43, 107, 41, 73.
Trạng thái	Dạng bột màu trắng, không mùi.
Tính tan	Tan hoàn toàn trong metanol; tan trong axit axetic, DMSO; tương đối ít tan trong etanol 96%; ít tan trong nước, isopropanol; rất ít tan trong axeton, dioxan; không tan trong axetonitrin, etylaxetat, clorofoc.

*** Một vài nét về hoạt tính hạ huyết áp của atenolol.**

Trong khi có nhiều tài liệu nghiên cứu chỉ ra rằng propranolol có tác dụng hạ huyết áp thông qua tác động lên thần kinh trung ương (TKTW) thì đối với atenolol chưa thấy có tài liệu nào cho biết thông tin về tác động này của nó. Thực tế, J.L. Montastruc và cộng sự [34] đã không thể chứng minh được tác dụng hạ huyết áp khi sử dụng atenolol với liều lượng 50µg/kg cho chó được gây tăng huyết áp thông qua thần kinh. Trái lại, Dayer và các cộng sự [52] đã thông báo là từ 1,0 đến 2,5 mg atenolol tiêm dưới da và tiêm tĩnh mạch ở mèo cho kết quả là mèo vẫn tỉnh táo, không bị tăng huyết áp, có thể gây ra tác dụng hạ huyết áp kéo dài và phụ thuộc liều dùng. Sau 1 đến 1,5 giờ tác dụng này đạt đến cực đại và kéo dài trong thời gian từ 3 đến 4 giờ.

Các kết quả nghiên cứu [51] chứng minh rằng atenolol có tác dụng hạ huyết áp chọn lọc lập thể qua tác động lên hệ TKTW. Chỉ có đối quang (S) của atenolol mới gây hạ huyết áp và làm chậm nhịp tim khi được sử dụng cho hệ TKTW thông qua vùng bề lớn của não hoặc theo đường tiêm tĩnh mạch. Mặt khác, các liều lượng tương tự của (R+)atenolol không có tác dụng hạ huyết áp động mạch hoặc làm giảm nhịp tim khi dùng tiêm tĩnh mạch hoặc dùng cho hệ TKTW, thông qua vùng bề lớn của não. Ngoài ra, với

liều lượng thấp nhất (33 $\mu\text{g}/\text{kg}$) được thử nghiệm trong nghiên cứu này, (S)-atenolol gây được tác dụng hạ huyết áp sau khi tiêm dưới da, nhưng không có tác dụng hạ huyết áp động mạch sau khi tiêm tĩnh mạch với cùng liều lượng như vậy. Do đó, tác dụng hạ huyết áp của (S)-atenolol được nhận thấy sau khi tiêm dưới da không thể lý giải được nếu dựa trên sự rò rỉ thuốc vào vòng tuần hoàn lớn. Tóm lại, các kết quả đó ủng hộ quan niệm cho rằng, hệ TKTW là vị trí tác dụng hạ huyết áp chọn lọc lập thể của atenolol. Việc phát hiện trong nghiên cứu về tác dụng hạ huyết áp của atenolol có thể quy cho đối quang chẹn beta của atenolol là (S)-atenolol, có lẽ sẽ mở rộng thêm các kết quả nghiên cứu đặc hiệu đối quang trước đây và propranolol. Rahn [55] đã thông báo rằng, tác dụng điều trị tăng huyết áp ở người được nhận thấy rõ (S)-propranolol, trong khi đối quang (R) không có tác dụng đó. Gần đây hơn, Danilell [54] đã phát hiện thấy rằng, huyết áp động mạch ở chó và chuột bị làm giảm có ý nghĩa nhờ điều trị trường diễn bằng (S)-propranolol, mà không phải bằng (R)-propranolol.

Trái với đáp ứng hạ huyết áp kiểu toàn thân được nhận thấy khi tiêm dưới da (S)-atenolol, việc tiêm đối quang (S) này của thuốc vào não thất bên không gây giảm huyết áp động mạch. Do thuốc sử dụng cho não thất bên sẽ tưới vào vùng quanh não thất của não trước trước khi tưới tiếp vào vùng quanh não thất của não sau, còn nếu tiêm thuốc vào vùng bể lớn của não, thì thuốc sẽ tưới vào vùng não sau trước khi được vận chuyển xuống tủy sống theo hướng dịch não tủy bình thường; các dữ kiện này gợi ý rằng, vị trí gây tác dụng hạ huyết áp chọn lọc lập thể của atenolol thông qua hệ TKTW có thể là ở vùng não sau. Phát hiện này phù hợp với các nghiên cứu với thành viên propranolol của Tackett [56], trong công trình đó đã phát hiện thấy rằng, não sau là vị trí quan trọng nhất đối với tác động hạ huyết áp của propranolol dùng theo đường TKTW. Gần đây hơn, vùng C1 của chồi tủy bụng bên đã được nhận thấy là vị trí mà propranolol có thể tác động để gây hạ huyết áp.

Cũng thú vị hơn khi nhận thấy rằng liều (S)-atenolol 33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ tiêm vào vùng bể dưới của não làm giảm có ý nghĩa huyết áp động mạch và nhịp tim, trong khi cùng liều như vậy tiêm tĩnh mạch thì gây giảm rõ ràng nhịp tim, nhưng không làm thay đổi huyết

áp động mạch. Như vậy, mặc dù liều (S)-atenolol này khi được tiêm tĩnh mạch là dưới ngưỡng tác dụng hạ huyết áp của thuốc đó, song có lẽ cũng đủ để gây ra sự chọn lọc các thụ thể adrenalin beta ngoại vi, như được gợi ý bởi tác dụng làm giảm có ý nghĩa nhịp tim. Các phát hiện trong nghiên cứu này cho thấy rằng tác dụng hạ huyết áp thông qua hệ TKTW của (S)-atenolol có thể là tách rời với tác dụng chọn thụ thể beta ở tim của thuốc đó.

Cơ chế được đề nghị cho tác dụng hạ huyết áp và làm chậm nhịp tim nhận thấy sau khi sử dụng các thuốc chặn thụ thể adrenalin beta thông qua hệ TKTW vẫn còn có sự phản đối. Các nghiên cứu trước đây từ phòng thí nghiệm này cho thấy rằng, tác dụng hạ huyết áp của propranolol dùng qua hệ TKTW là do thuốc này kích thích sự giải phóng norepinephrin từ các nơron trong hệ TKTW tiết noradrenalin (tức norepinephrin), mà hormon này kích thích các thụ thể adrenalin alpha 2 trong hệ TKTW, và kết quả là sự hoạt động của thần kinh giao cảm ngoại biên giảm và huyết áp động mạch hạ (Tavett và cộng sự). Phù hợp với giả thuyết này là sự chứng minh gần đây của Strickland [53] rằng, việc sử dụng phentolamin là một chất đối kháng adrenalin alpha theo đường hệ TKTW đã làm mất tác dụng hạ huyết áp của (S)-atenolol dùng theo đường hệ TKTW và làm giảm có ý nghĩa tác dụng hạ huyết áp của (S)-atenolol tiêm tĩnh mạch. Một kết quả tương tự cũng thu nhận được khi dùng theo đường hệ TKTW chất đối kháng thụ thể adrenalin alpha 2 là idazoxan. Hơn nữa, việc phát hiện sự chặn thụ thể adrenalin alpha 2 theo đường hệ TKTW làm giảm đáp ứng hạ huyết áp của (S)-atenolol tiêm tĩnh mạch cho thấy rằng, thuốc tương đối ưa nước này có thể đạt tới hệ TKTW sau khi sử dụng thuốc theo đường toàn thân. Cũng cố thêm điều này, Street et. al. [57] đã phát hiện thấy ở chuột thân lớn rằng, atenolol đánh dấu phóng xạ đã được phát hiện thấy ở não sau 5 phút tiêm tĩnh mạch, mặc dù lượng atenolol ở não thấp hơn sau khi dùng theo đường toàn thân.

Việc sử dụng (S)-atenolol theo đường bề lớn của não gây ra tác dụng làm chậm nhịp tim kết hợp với tác dụng hạ huyết áp. Việc sử dụng theo đường hệ TKTW các thuốc chặn adrenalin beta khác như propranolol, oxprenolol và practolol cũng gây ra tác

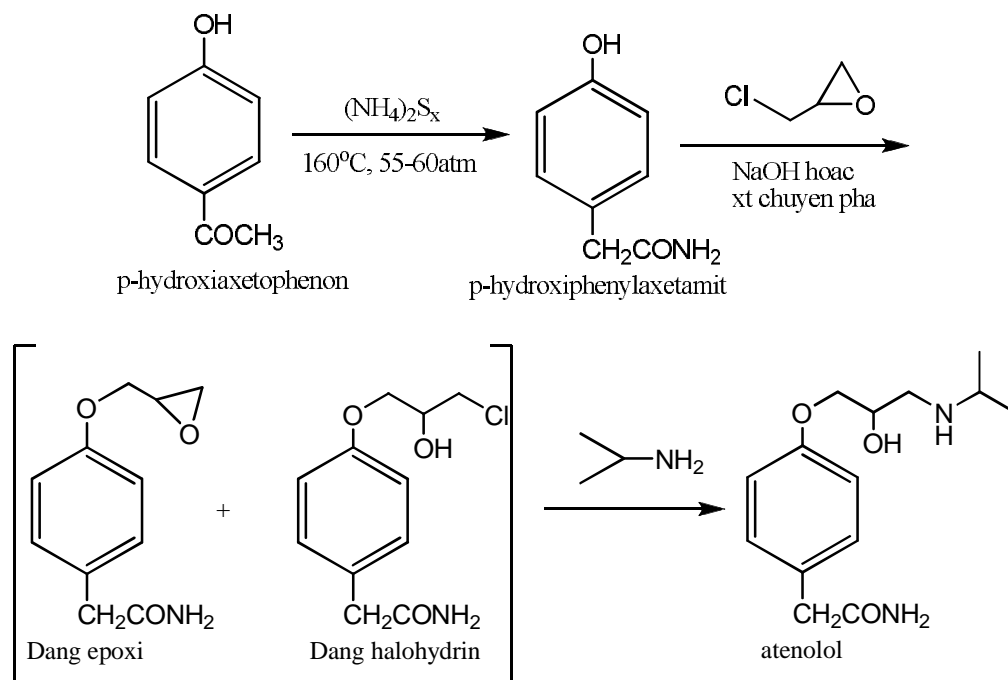
dụng làm chậm nhịp tim kết hợp với tác dụng hạ huyết áp thông qua hệ TKTW [38]. Tác dụng làm chậm nhịp tim này của (S)-atenolol tiêm dưới da có phải là kết quả tác dụng của thuốc thông qua hệ TKTW hay là do sự vận chuyển thuốc từ dịch não tủy tới vòng tuần hoàn lớn, điều đó không thể xác định được từ các dữ liệu nghiên cứu này. Tuy nhiên, Montastruc [34] đã thông báo là, cả hai tác dụng làm giảm nhịp tim và tác dụng hạ huyết áp thấy được sau khi dùng thuốc propranolol, bupranolol và oxprenolol tiêm dưới da đều có nguồn gốc hệ TKTW, bởi vì cùng các liều như vậy của các thuốc này dùng theo đường tiêm tĩnh mạch đều không có tác dụng làm thay đổi bất kỳ thông số nào trong hai thông số này. Thêm nữa, trước đây chúng tôi đã chứng minh rằng, cả tác dụng hạ huyết áp và làm giảm nhịp tim thấy được sau khi dùng propranolol theo đường tiêm dưới da đều có thể được ngăn cản bằng cách sử dụng trước đó theo đường hệ TKTW chất đối kháng adrenalin alpha là phentolamin.

Như vậy, các kết quả nghiên cứu cho thấy rằng, thuốc chẹn adrenalin beta ưa nước atenolol có tác dụng hạ huyết áp khi sử dụng theo đường hệ TKTW, mà tác dụng này có thể quy cho đối quang (S) hay đối quang hoạt động. Hơn nữa, các số liệu này còn cung cấp thêm bằng chứng củng cố quan niệm rằng, tác dụng hạ huyết áp chọn lọc lập thể thông qua hệ TKTW có thể là tính chất chung của các thuốc chẹn adrenalin beta và đóng vai trò điều trị tăng huyết áp của các thuốc này.

1.2. Các phương pháp tổng hợp atenolol

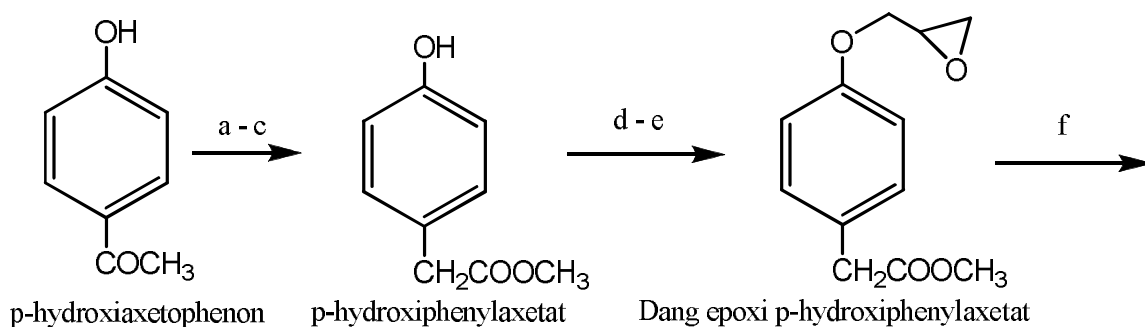
1.2.1. Tổng hợp atenolol từ *p*-hydroxyacetophenon thông qua phản ứng Wilgerodt

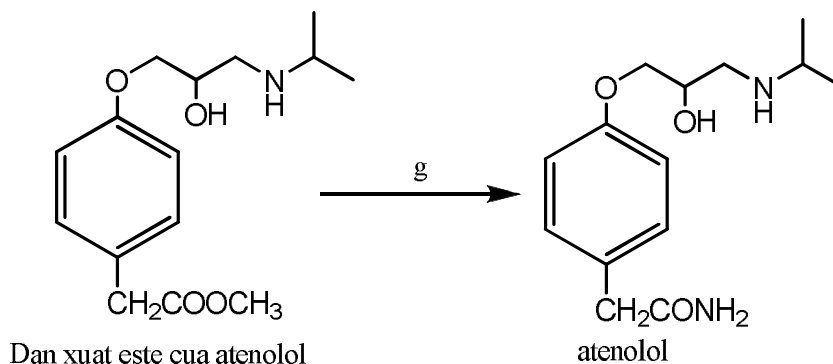
1.2.1.1 Phương pháp thứ nhất: Là sử dụng phản ứng Wilgerodt bằng cách cho *p*-hydroxyacetophenon phản ứng với amonipolysulfua ở nhiệt độ và áp suất cao để tạo thành *p*-hydroxyphenylacetamid [13]. Sau đó thực hiện phản ứng ngưng tụ với epichlorhydrin trong môi trường kiềm (hoặc xúc tác chuyên pha) để tạo thành hỗn hợp gồm 2 dẫn xuất dạng epoxi và dạng halohydrin của atenolol. Hỗn hợp này cuối cùng được cho phản ứng với isopropylamin để thu được atenolol



Phương pháp này ít có ý nghĩa về mặt thực tiễn do điều kiện phản ứng khá ngặt nghèo, cần nhiệt độ và áp suất cao. Hơn thế nữa giai đoạn một của phản ứng (Willgerodt) không chọn lọc, thường tạo ra hỗn hợp gồm axit *p*-hydroxi phenylaxetic và *p*-hydroxi phenylacetamid. Nên ít được sử dụng trong thực tế.

1.2.1.2 Phương pháp thứ 2: Trong phương pháp này *p*-hydroxiacetophenon cũng được chuyển hoá thành axit *p*-hydroxi phenylaxetic bởi lưu huỳnh và morpholin thông qua phản ứng Willgerodt. Axit sinh ra được chuyển sang dạng metyleste [14, 15], tiếp theo cho phản ứng với epichlorohydrin và isopropylamin để tạo ra dẫn xuất este của atenolol, cuối cùng thực hiện phản ứng ái nhân với NH_3 để tạo ra atenolol.





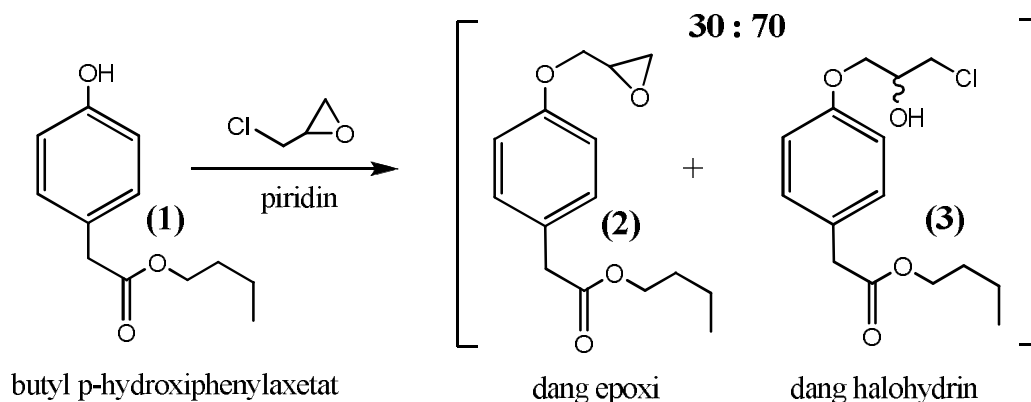
- a, Lưu huỳnh, morpholin* *b, NaOH – etanol* *c, SOCl₂, metanol*
d, Allylbromua *e, m-CPBA* *f, Isopropylamin,* *g, Dung dịch amoniac*
Sm(OTf)₃

Cũng giống như phương pháp trên, phương pháp này cũng gặp những khó khăn khi tiến hành, hiệu suất thấp vì qua quá nhiều giai đoạn, ngoài ra quá trình phản ứng tạo atenolol phải sử dụng các tác nhân đắt tiền và khó kiếm như axit *m*-clopebenzoic (*m*-CPBA), vì thế phương pháp này chỉ được sử dụng để điều chế từng dạng đối quang riêng biệt, đặc biệt là dạng S-atenolol.

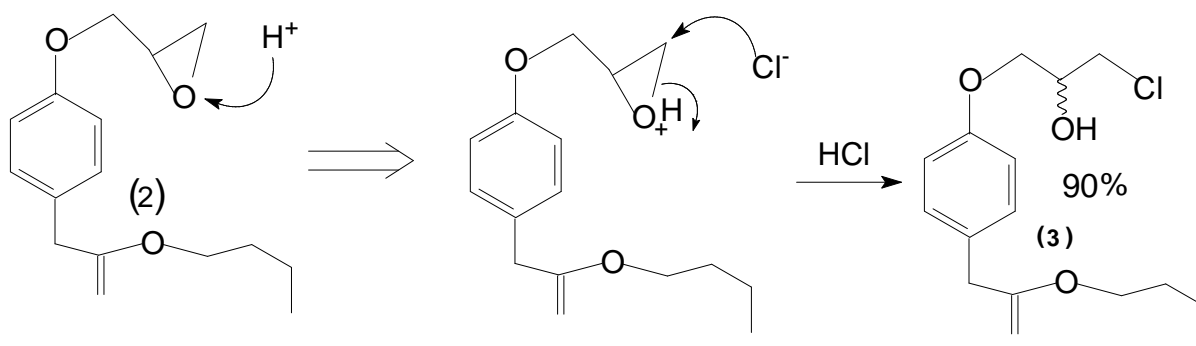
1.2.2. Tổng hợp atenolol từ este của axit *p*-hydroxyphenylaxetic.

Phương pháp này được giới thiệu để tổng hợp atenolol dưới dạng racemic hoặc dạng tinh khiết của các đồng phân R và S của atenolol (khi sử dụng enzym) [16, 17, 25, 26, 27, 28, 29].

Bước 1: Đầu tiên cho butyl *p*-hydroxyphenylaxetat (**1**) (chất này có thể dễ dàng được điều chế bằng phản ứng este hoá axit *p*-hydroxyphenylaxetic với 1-butanol) phản ứng với epichlorhydrin với sự có mặt của xúc tác bazơ (pyridin) để tạo thành hỗn hợp sản phẩm là 1-[*p*-[(butoxi-cacboxyl)metyl] phenoxi]-2,3-epoxipropan (**2**) và 1-[*p*-[(butoxi-cacboxyl)metyl]phenoxi]-3-clopropan-2-ol (**3**). Tỷ lệ sản phẩm (**2**) : (**3**) tạo thành là 30 : 70. [17]

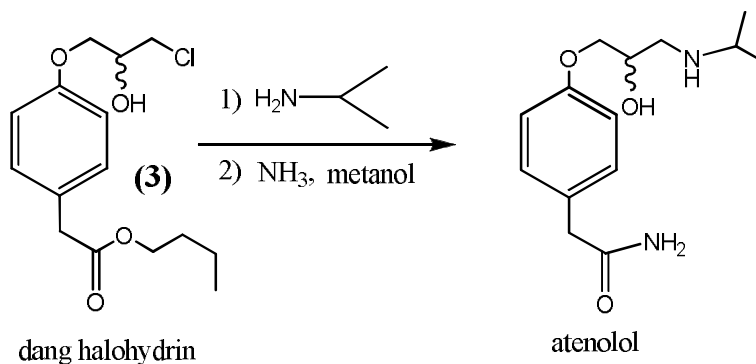


Bước 2: Hỗn hợp (2) và (3) được xử lý với HCl, H⁺ sẽ tấn công vòng epoxit của (2) để tạo thành sản phẩm dạng halohydrin mong muốn (3).



Từ sản phẩm (3) này có thể điều chế atenolol theo 3 cách như sau:

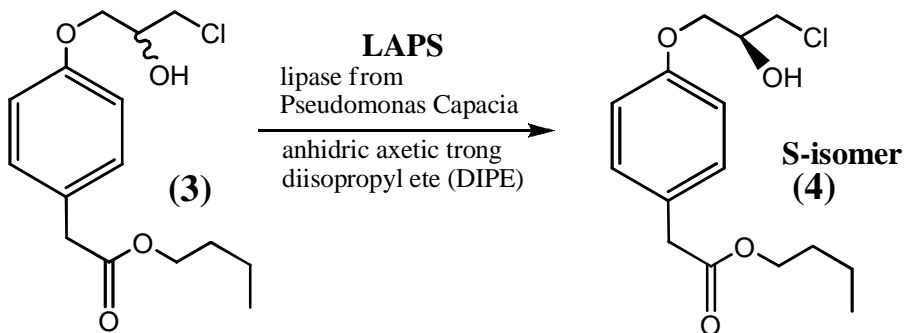
Bước 3.1 Tổng hợp atenolol dạng raxemic: Cho sản phẩm (3) cộng hợp với isopropylamin để tạo thành dẫn xuất este của atenolol. Cuối cùng thủy phân dẫn xuất este này bằng NH₃ trong metanol sẽ thu được hỗn hợp raxemic của atenolol. Sản phẩm atenolol tạo thành được tinh chế bằng cách kết tinh lại trong dung môi etylacetat (EtOAc).



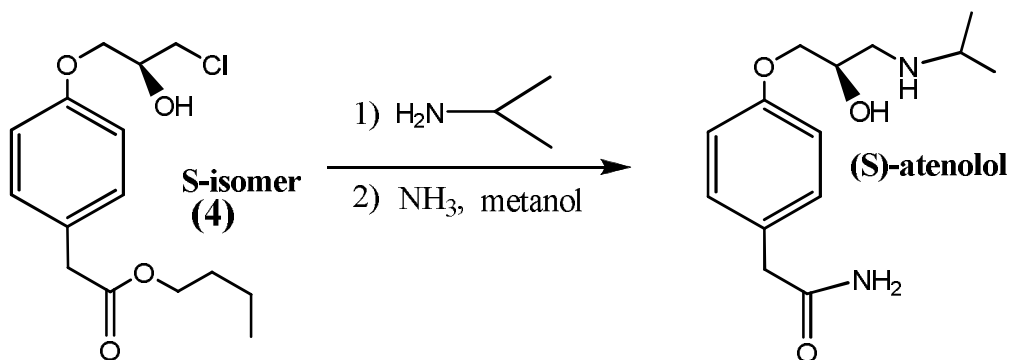
Bước 3.2: Điều chế S-atenolol:

Mặc dù cả 2 dạng atenolol đều có hoạt tính sinh học, tuy nhiên những nghiên cứu gần đây đã chỉ ra rằng (S)-atenolol ít gây phản ứng phụ hơn dạng hỗn hợp raxemic, như trong phần tổng quan đã đưa ra. Các bước sau đây sẽ mô tả chi tiết về cách điều chế các dạng đối quang của atenolol từ 1-[p-((butoxi-cacbonyl)metyl)phenoxi]-3-clopropan-2-ol (**3**) sử dụng xúc tác enzym Lipase Catalysis.

Từ 1-[p-((butoxi-cacbonyl)metyl)phenoxi]-3-clopropan-2-ol (**3**) sử dụng enzym Lipase từ *Pseudomonas Cepacia* trong hỗn hợp dung môi anhydrit axetic và diisopropyl ete (DIPE).

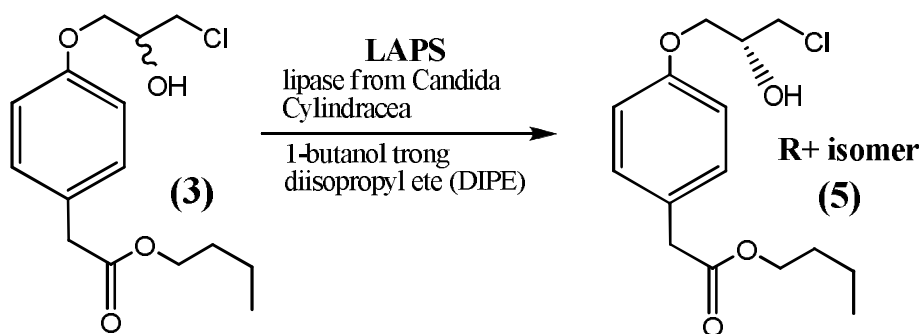


Dạng S-isomer (**4**) sau đó sẽ được tiến hành các bước điều chế tương tự như điều chế hỗn hợp raxemic của atenolol như đã nêu ở bước 3.1. Sản phẩm thu được là dạng (S)-atenolol.

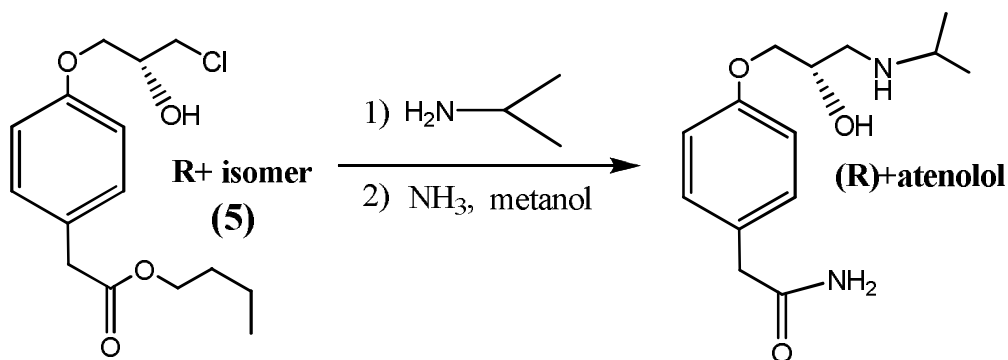


Bước 3.3: Điều chế R+atenolol

Cũng được tiến hành từ 1-[p-[(butoxi-cacbonyl)metyl]phenoxi]-3-clopropan-2-ol (**3**) nhưng sử dụng enzym Lipase từ *Candida Cylindracea* trong hỗn hợp dung môi 1-butanol và diisopropyl ete (DIPE).



Dạng (R+)isomer (**5**) sau đó cũng được cho phản ứng với isopropyl amin sau đó thủy phân bằng NH_3 trong metanol để thu được sản phẩm cuối cùng là (R)+atenolol.



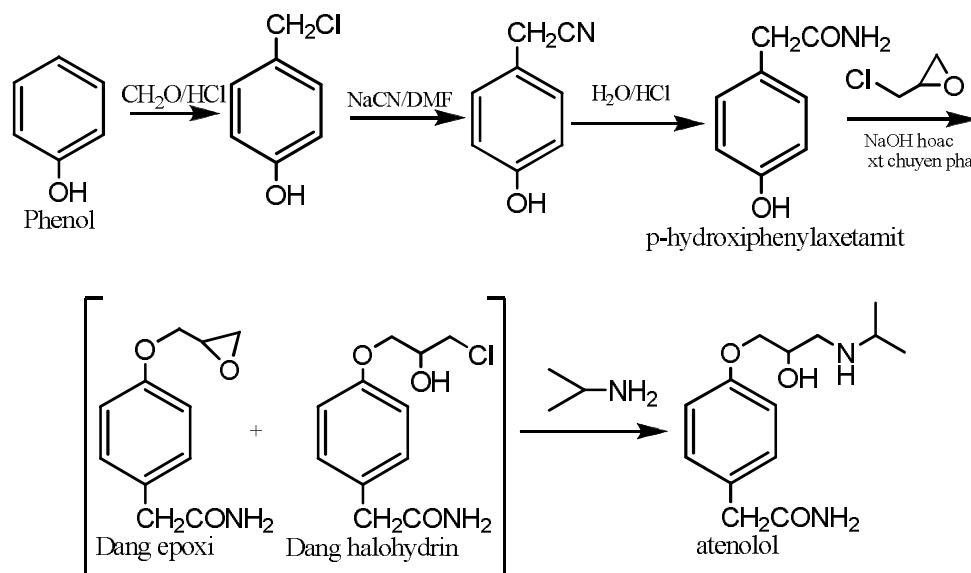
Các phương pháp sử dụng enzym cho một giai đoạn trong quá trình tổng hợp atenolol có ưu điểm là có thể tạo ra các đồng phân sạch (S)- hoặc (R)+atenolol theo như

ý muốn tùy thuộc vào enzym sử dụng. Tuy vậy phương pháp này ít được đưa vào thực tế do phải sử dụng enzym và điều kiện tiến hành phản ứng khó có thể triển khai ở quy mô lớn.

1.2.3. Tổng hợp atenolol từ phenol

1.2.3.1 Thông qua dẫn xuất nitrin

Từ phenol, thực hiện phản ứng clometyl hóa để tạo dẫn xuất *p*-clometylphenol. Sau đó chuyển hóa tiếp với natri xianua trong dung môi dimetyl focmamit để tạo ra sản phẩm là *p*-hydroxiphenylaxetonitrin, tiếp đó thủy phân sản phẩm này bằng xúc tác khác nhau sẽ thu được *p*-hydroxiphenylaxetamid, chuyển hóa tiếp với epiclohydrin để tạo hỗn hợp 2 dạng epoxi và halohydrin của *p*-hydroxiphenylaxetamid. Cuối cùng hóa hợp với lượng dư isopropylamin để tạo ra hỗn hợp raxemic của atenolol [13, 18, 19, 35]



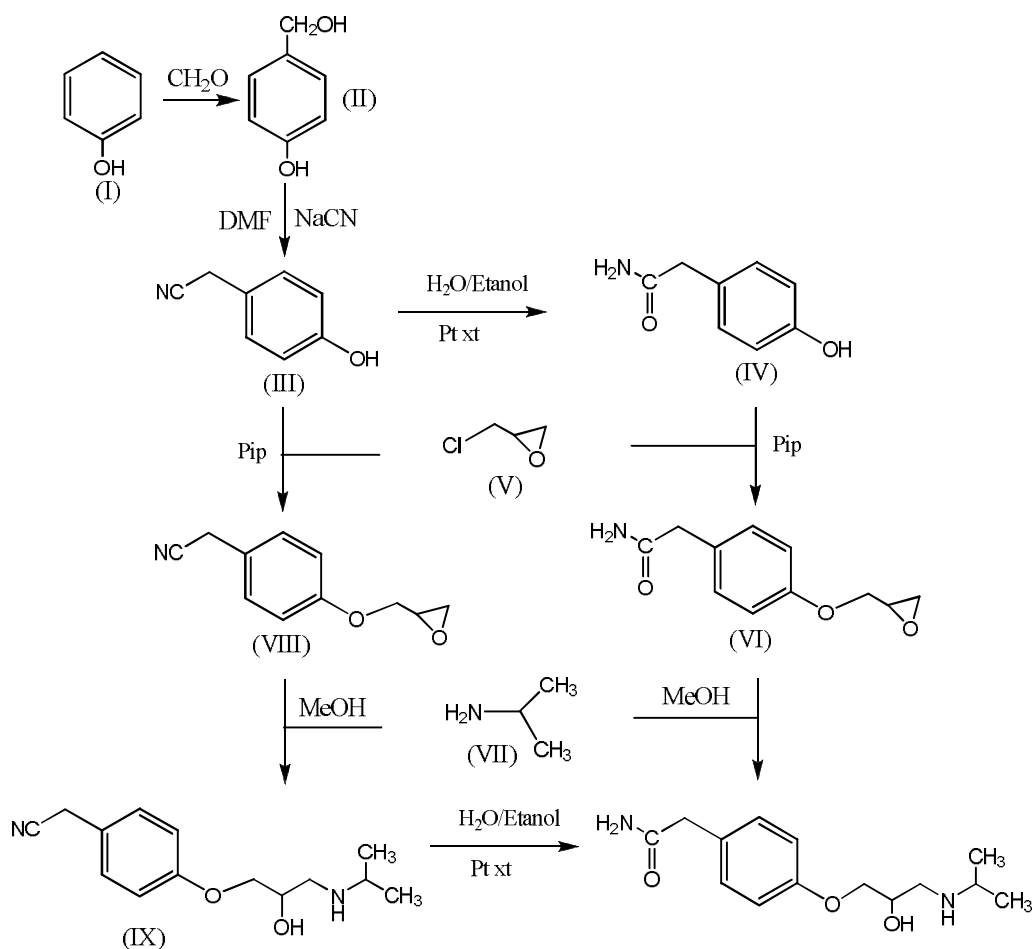
1.2.3.2 Thông qua dẫn xuất nitrin sử dụng xúc tác hydrat hoá

Có thể điều chế atenolol thông qua dẫn xuất nitrin bằng 2 cách [20]:

Thứ nhất: phản ứng của phenol (I) với focmandehit để tạo thành 4-hydroximetylphenol (II), sau đó cho (II) phản ứng tiếp với NaCN trong dung môi dimetylfocmamit (DMF) nóng để tạo thành 2-(4-hydroxiphenyl)axetonitrin (III). Thủy phân sản phẩm (III) bằng

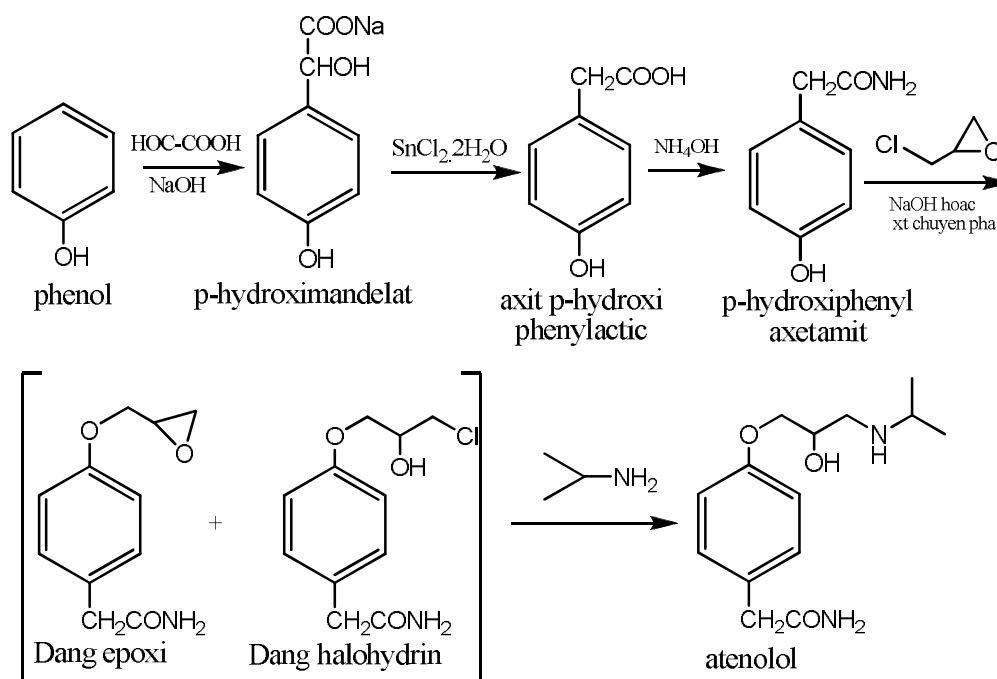
cách đun hồi lưu trong hỗn hợp etanol/nước, với xúc tác Pt sẽ thu được dẫn xuất axetamid (IV). Sau đó cho (IV) ngưng tụ với lượng dư epichlorhydrin (V) nóng trong piperidin sẽ tạo thành 2-[4-(2-oxiranylmethoxy)phenyl]axetamid (VI). Cuối cùng thực hiện phản ứng mở vòng oxiran (VI) với isopropylamin trong metanol để thu được atenolol.

Thứ hai: 2 bước đầu tương tự như trên, tiếp theo ngưng tụ sản phẩm dẫn xuất axetonitrin (III) với epichlorhydrin (V) để tạo thành 2-[4-(2-oxiranylmethoxy)phenyl]axetonitrin (VIII), sau đó cho phản ứng tiếp với isopropylamin (VII) trong metanol để tạo thành 2-[4-[2-hydroxi-3-(isopropylamin)propoxi]phenyl]axetonitrin (IX). Cuối cùng thủy phân sản phẩm (IX) này bằng cách đun hồi lưu trong hỗn hợp dung môi etanol/nước, xúc tác Pt để thu được atenolol.



1.2.3.3 Thông qua dẫn xuất axit *p*-hydroximandelic và *p*-hydroxiphenylaxetic

Trước hết, phenol được chuyển hóa thành các dẫn xuất *p*-hydroximandelic (hoặc muối natri) sau đó khử hóa với các tác nhân khác nhau [9, 10, 21, 22, 23] và cuối cùng chuyển hóa thành *p*-hydroxiphenylaxetamid trước khi cho phản ứng với epiclohydrin và isopropylamin. Sơ đồ để tổng hợp atenolol từ phenol như sau:



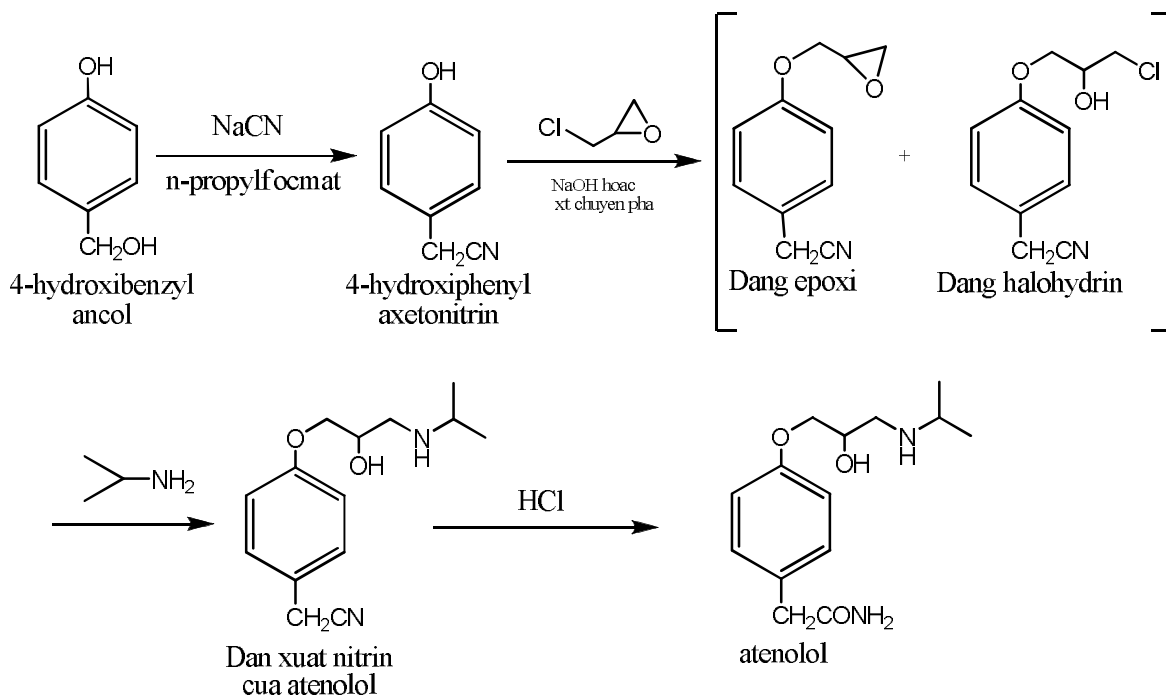
Phương pháp này đi từ các hoá chất thông dụng rẻ tiền, điều kiện phản ứng cũng không quá ngặt nghèo nên có thể tiến hành ở quy mô lớn.

1.2.4. Tổng hợp atenolol từ 4-hydroxibenzylancol và 4-hydroxibenzaldehyt [18, 30, 32]

So với phương pháp tổng hợp atenolol thông qua dẫn xuất nitrin ở mục 1.2.3.1 và 1.2.3.2, phương pháp được các tác giả đưa ra dưới đây không thủy phân ngay dẫn xuất nitrin để tạo thành amit mà quá trình thủy phân này chỉ được thực hiện ở giai đoạn cuối cùng của quá trình điều chế atenolol.

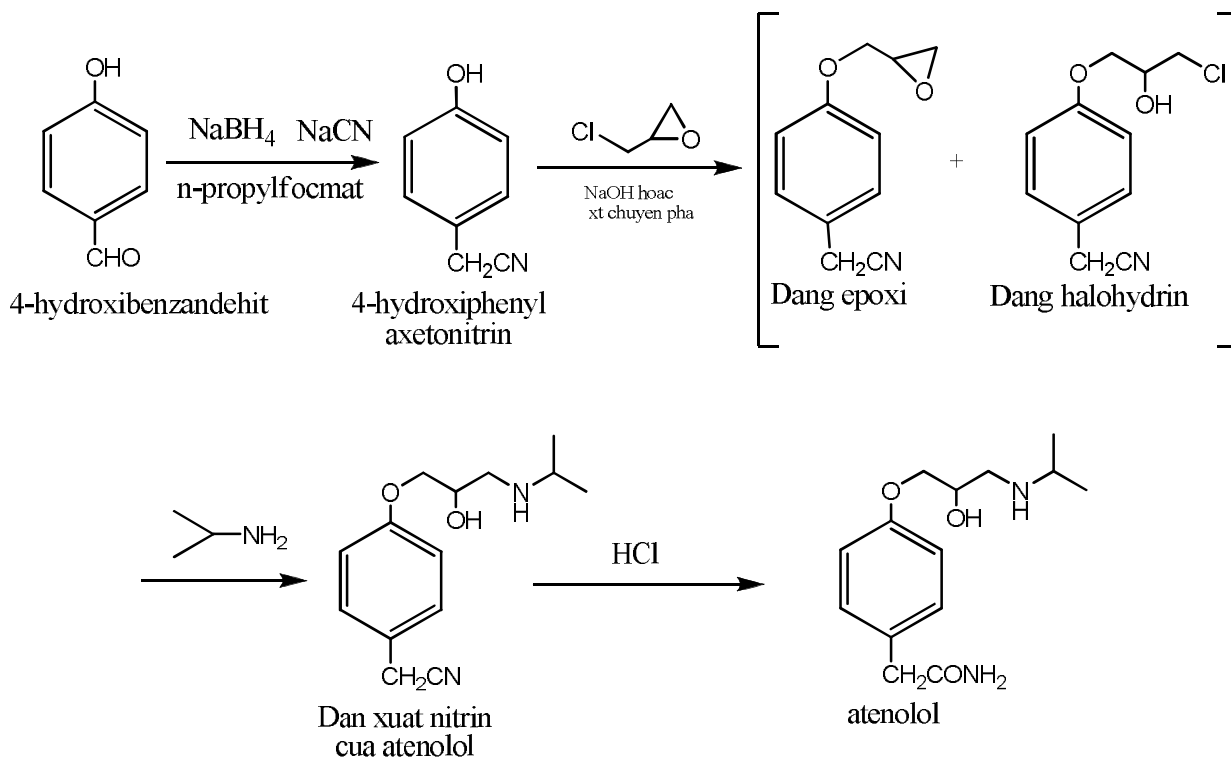
1.2.4.1 Tổng hợp atenolol từ 4-hydroxibenzylancol

Từ hợp chất ban đầu 4-hydroxibenzylancol, sau đó được nitrin hoá bằng muối xianua kim loại kiềm với xúc tác là alkylfocmat. Sản phẩm tạo thành 4-hydroxiphenylaxetonitrin sau đó cho phản ứng với epiclohydrin trong môi trường kiềm (hoặc xúc tác chuyển pha), sản phẩm thu được là một hỗn hợp dạng epoxi hoặc halohydrin. Hỗn hợp này được cho phản ứng với isopropylamin để tạo thành dẫn xuất nitrin của atenolol. Thủy phân dẫn xuất này trong HCl sẽ thu được atenolol.



1.2.4.2. Tổng hợp atenolol từ 4-hydroxibenzandehit

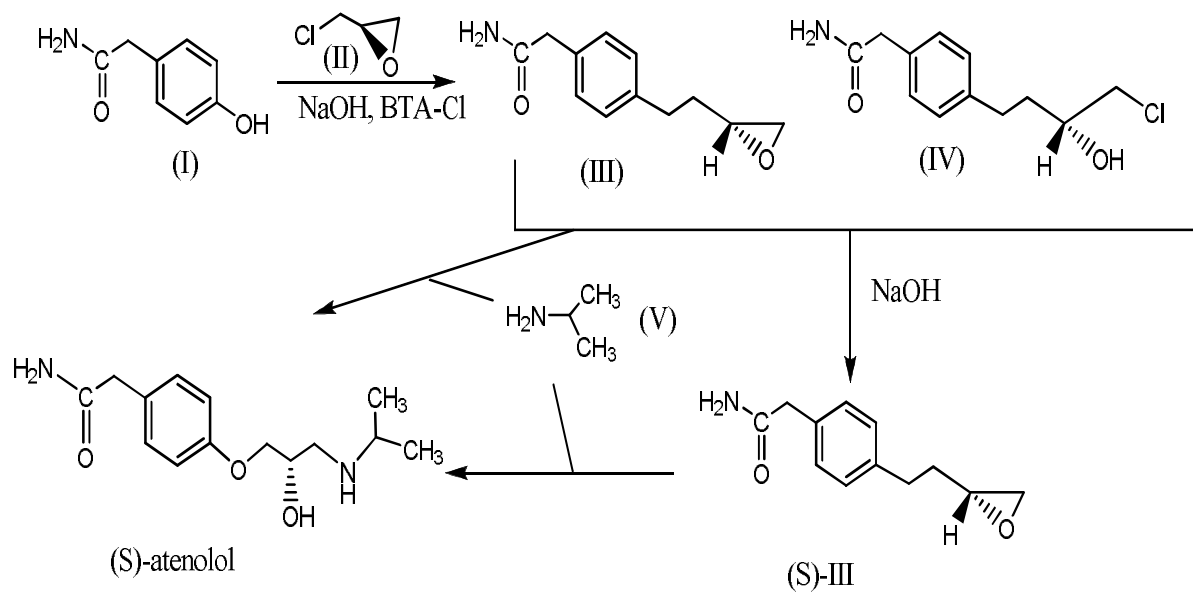
Phương pháp này tương tự như phương pháp tổng hợp từ 4-hydroxibenzylancol đã nêu ở trên, trong đó 4-hydroxibenzylancol sẽ được điều chế ‘tại chỗ’ bởi phản ứng khử 4-hydroxibenzandehit với tác nhân là một muối bo tetrahydrua của kim loại kiềm.



1.2.5. Tổng hợp (S)-atenolol [24, 25]

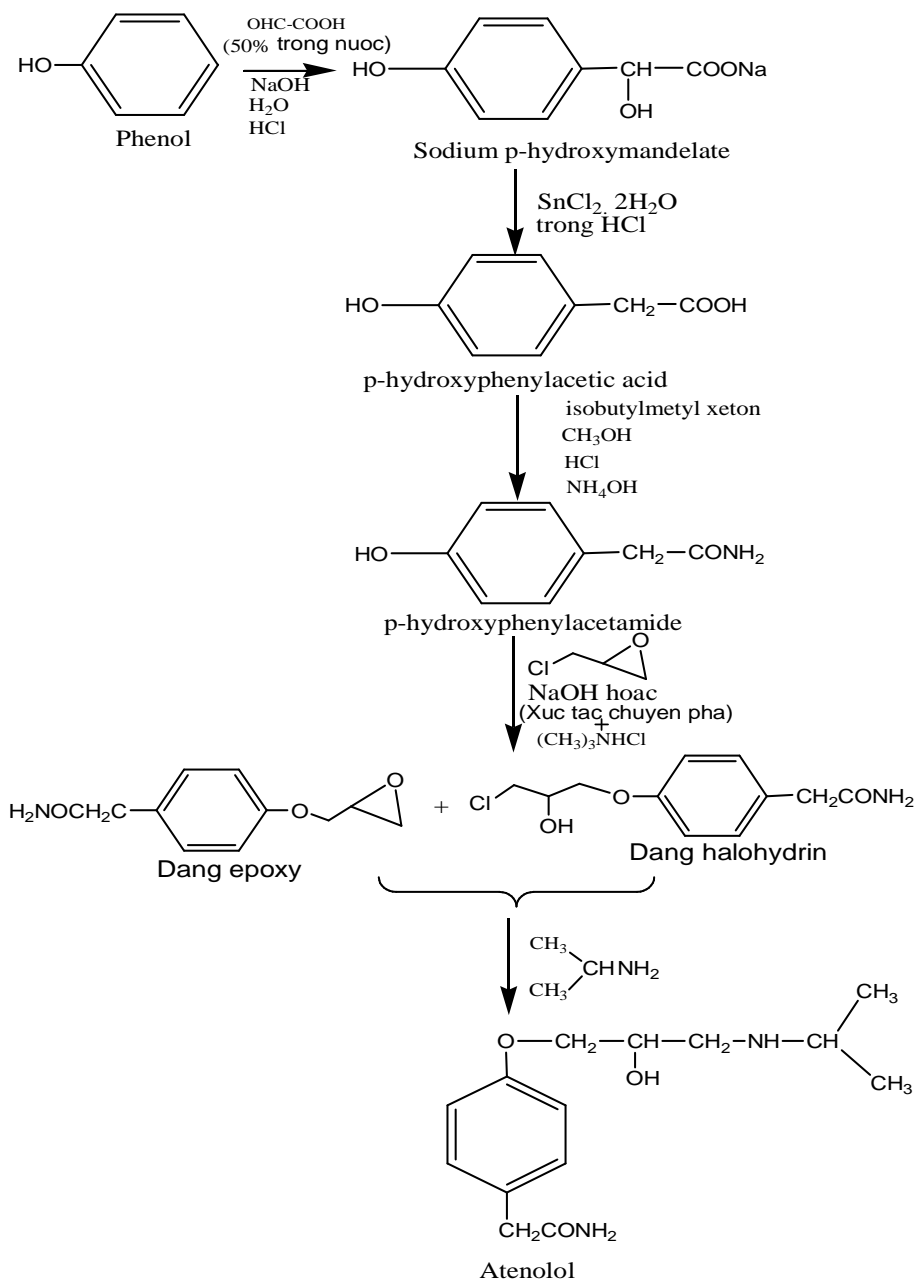
Phương pháp này sử dụng để tổng hợp dạng đồng phân tinh khiết (S)-atenolol.

Đầu tiên ngưng tụ axetamid (I) với (R)-epiclohydrin (II) trong dung dịch NaOH (hoặc LiOH; NaOH/benzyltrimetylamonium clorua (BTA-Cl)) để tạo thành hỗn hợp gồm 2 dạng dẫn xuất là epoxipropan (III) và clopropanol (IV). Từ đó có thể điều chế trực tiếp thành (S)-atenolol bằng phản ứng trực tiếp với isopropylamin (V) trong metanol. Hoặc là trước hết cho hỗn hợp gồm (III)/(IV) phản ứng với NaOH để tạo thành (S)-(III) và sau đó cho phản ứng với isopropylamin (V) như trên để tạo thành sản phẩm mong muốn.



Sau khi tham khảo các con đường tổng hợp atenolol, chúng tôi lựa chọn con đường khả thi nhất cho mục đích tổng hợp chất này phù hợp với điều kiện ở Việt Nam và có thể đưa ra sản xuất ở qui mô lớn: **Đó là tổng hợp bằng con đường hóa học từ chất đầu phenol thông qua hợp chất trung gian chìa khóa *p*-hydroxyphenylacetamid** và sơ đồ của qui trình tổng hợp atenolol như sau :

SƠ ĐỒ TỔNG HỢP ATENOLOL



CHƯƠNG 2. THỰC NGHIỆM

2.1. Các phương pháp thực nghiệm

2.1.1. Thiết bị, dụng cụ và hoá chất dùng trong tổng hợp.

- + Máy khuấy từ gia nhiệt Heidolph MR Hei-Standard của Đức
- + Máy cắt quay chân không IKA RV 06.2 của Đức, bơm chân không Buchi Vac V-500 của Thụy Sĩ
- + Bếp đun bình cầu Trung Quốc
- + Dụng cụ thủy tinh: Bình cầu 3 cổ các loại; sinh hàn; cột vigơ; phễu nhỏ giọt; phễu chiết các loại; ống đong; cốc các loại; pipét...
- + Bàn nóng hồng ngoại Schott SLK 2 của Đức
- + Cân điện tử 10^{-3} Ohaus Explorer Pro EP613C (610 gam/1 mg)
- + Cân kỹ thuật 10^{-2} Ohaus Explorer Pro EP4102C (4100 gam/0.01 g)
- + Tủ hút khí độc Việt Nam

* Các hoá chất dùng trong tổng hợp đều được mua từ hãng Merck – Đức. Các dung môi mua từ Trung Quốc đều được cất qua cột vigơ trước khi sử dụng.

2.1.2. Các phương pháp sử dụng trong tổng hợp và tinh chế sản phẩm.

* Điểm nóng chảy được xác định trên máy Buchi Melting Point B-545 của Thụy Sĩ bằng phương pháp mao quản mở. Gradient nhiệt độ được đặt ở chế độ $3^{\circ}\text{C}/\text{phút}$, nhiệt độ tối đa được đặt tùy theo mỗi sản phẩm tạo thành ở mỗi giai đoạn.

* Sắc ký bản mỏng (SKBM) được thực hiện trên các tấm bản mỏng đế nhôm tráng silicagen 60 F₂₅₄ của hãng Merck – Đức. Hiện màu bằng đèn soi UV Camag Viewing Box 3 ở bước sóng 254 nm và 365 nm hoặc bằng bình phun thuốc thử H₂SO₄ 10% và đốt nóng ở 100°C .

* Sắc ký cột sử dụng silicagel có cỡ hạt 0,040–0,063 mm của hãng Merck – Đức.

2.1.3. Các phương pháp nghiên cứu cấu trúc của các sản phẩm.

2.1.3.1 Phổ tử ngoại khả kiến (UV-VIS)

Phổ tử ngoại khả kiến được đo trên máy GBC cintra 40 UV-VIS Spectrophotometer của Đức tại Viện Hoá học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chế độ đo: đo độ hấp thụ Abs, máy đo hai chùm tia, dải bước sóng 200-600 nm, độ rộng khe phổ 1,0 nm, tốc độ quét 600 nm/phút, dung môi metanol.

2.1.3.2 Phổ hồng ngoại (FT-IR)

Phổ IR của các chất được đo SHIMADZU FTIR 8107M của Nhật tại viện Hoá học các hợp chất Thiên nhiên - viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Chế độ đo: đo độ truyền qua, dải số sóng 4000-500 cm^{-1} , độ phân giải 0,25 cm^{-1} , số lần quét 32 lần/phổ; mẫu được chuẩn bị bằng cách nghiền mịn với bột KBr theo tỷ lệ 5 ÷ 10 mg chất / 1gam KBr và ép thành viên trong suốt ở 600 psi trong 5 phút.

2.1.3.3 Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao ghép nối khối phổ (HPLC-MS)

Phân tích Sắc ký lỏng - khối phổ HPLC/DAD/MS trên máy Agilent HPLC 1200 series / Agilent 6310 Ion Trap của Mỹ tại phòng phân tích cấu trúc, Viện Hoá học các hợp chất Thiên nhiên – Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Điều kiện phân tích:

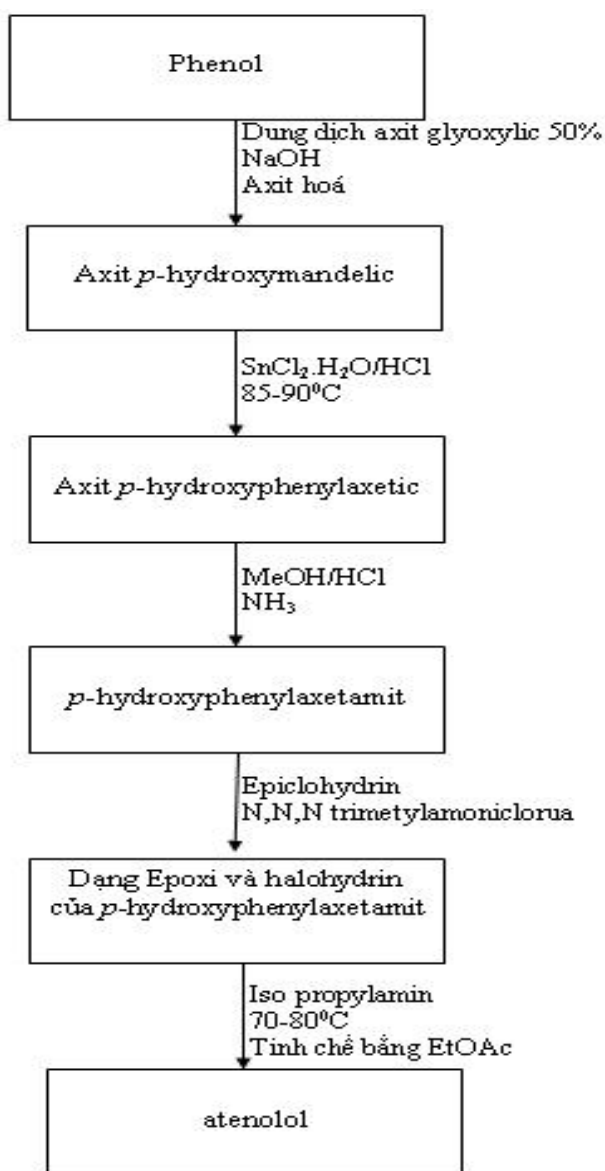
- + Sắc ký lỏng (HPLC): cột không phân cực pha đảo HPLC Zorbax C₁₈ đường kính 3.0 mm x dài 150mm, kích thước hạt nhỏ 5 μm , dung môi MeOH: H₂O 0,1% axit fomic, tốc độ dòng 0,5 - 0,8ml/phút, detector DAD
- + Khối phổ MS: nguồn ion hoá sử dụng chế độ ion hoá phun điện ESI⁺/ESI (Electrospray ionization) với khí N₂ là khí phun bụi ở áp suất phun 40 psi và nhiệt độ khí 380⁰C, bộ tách khối sử dụng kiểu bẫy ion (iontrap).

2.1.3.4 Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR)

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT được đo trên máy Bruker Advance - 500 của Đức tại Phòng phân tích cấu trúc, Viện Hoá học - Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các điều kiện đo: tần số 500 MHz và 125MHz, dung môi $\text{DMSO-}d_6$, chất chuẩn nội TMS.

2.2. TỔNG HỢP ATENOLOL

Sơ đồ cho quá trình tổng hợp atenolol từ phenol được đưa ra như sau :



2.2.1. Tổng hợp axit *p*-hydroxymandelic

Cho vào bình cầu ba cổ đáy tròn dung tích 2000 ml đã được lắp máy khuấy, phễu nhỏ giọt và sinh hàn hồi lưu 225,6g (213 ml, 2,4 mol) phenol, 199,8g (150 ml, 1,35 mol) dung dịch axit glyoxylic 50% trong nước, rồi thêm 600ml H₂O. Làm lạnh hỗn hợp bằng đá muối bên ngoài sao cho nhiệt độ của hỗn hợp ở khoảng 10-15⁰C. Từ phễu nhỏ giọt, vừa khuấy hỗn hợp phản ứng, vừa nhỏ giọt dung dịch NaOH 50% (khoảng 130 ml) vào trong hỗn hợp và luôn duy trì nhiệt độ của phản ứng ở 10-15⁰C trong suốt quá trình nhỏ giọt. Quá trình thêm dung dịch NaOH 50% chỉ kết thúc khi pH của hỗn hợp phản ứng đạt 10,5-11. Nâng nhiệt độ của phản ứng lên 35⁰C và duy trì phản ứng ở nhiệt độ này trong 3 giờ. Điều chỉnh pH của phản ứng về đến 7 bằng axit HCl đặc và chiết ở 35⁰C với benzen (11 lần x 300 ml) và metylbutylxeton (2 lần x 300 ml) để loại hết phenol dư không phản ứng hết. Tiếp tục axit hoá bằng HCl đến pH = 2 và chiết 5 lần với etyl axetat (mỗi lần 300 ml). Hoá hợp các dịch chiết lại với nhau, cất loại dung môi thu được 150g axit *p*-hydroxymadelic (hiệu suất 65%).

2.2.2. Tổng hợp axit *p*-hydroxyphenylaxetic

Qui trình này liên quan đến quá trình khử hóa axit *p*-hydroxymadelic monohidrat bằng SnCl₂. 2H₂O thành axit *p*-hydroxyphenylaxetic (không phải từ muối natri của nó).

Cho vào trong bình cầu đáy tròn dung tích 50ml được đặt trên máy khuấy từ 8ml HCl đặc, 8 ml nước và 7,0g axit *p*-hydroxymadelic monohidrat. Hỗn hợp này được khuấy kĩ, sau đó cho tiếp 9g SnCl₂.2H₂O vào hỗn hợp phản ứng. Đặt hỗn hợp phản ứng trong nồi cách thuỷ trên bếp từ và đun sôi nồi cách thuỷ khoảng 1 giờ. Kết thúc phản ứng, hỗn hợp được làm lạnh đến 10⁰C, kết tủa trắng được lọc, rửa nhanh với axeton và sấy khô ở 50⁰C trong chân không.

2.2.3. Tổng hợp *p*-hydroxyphenylaxetamid

22,8g (0,15mol) Axit *p*-hydroxyphenylaxetic được hoà tan trong 45ml isobutylmetylketon trong bình cầu đáy tròn đặt trên bếp từ và được đun nóng đến nhiệt độ bay hơi 105⁰C ở áp suất khí quyển, khi hỗn hợp đẳng phí của nước và isobutylmetylketon

được cất loại ra, dung dịch được làm lạnh đến 10⁰C và 30ml metanol và một vài giọt HCl đặc (37%, d=1,18g/ml) được thêm vào. Hỗn hợp phản ứng được hồi lưu 4 tiếng và dung môi được cất loại dưới áp suất giảm (50mmHg) ở nhiệt độ bên trong 100⁰C. Phần còn lại được làm lạnh đến 10⁰C và 51ml dung dịch amoni hydroxit (1,5 mol, d = 0,880g/ml) được thêm vào và hỗn hợp được khuấy ở 20 – 25⁰C cho khoảng 10 – 12 giờ. Lượng NH₄OH dư được cất loại ở nhiệt độ bên trong 100⁰C, và phần còn lại được làm lạnh đến nhiệt độ phòng. Hỗn hợp phản ứng được lọc và chất rắn thu được được rửa 2 lần với một ít nước lạnh và làm khô trong chân không ở 80⁰C. Sản phẩm thu được là *p*-hydroxyphenylaxetamid. Để thu được *p*-hydroxyphenylaxetamid sạch, sản phẩm được kết tinh lại từ nước có khối lượng 16,5g (hiệu suất 75%).

2.2.4. Điều chế hỗn hợp epoxi và halohydrin của *p*-hydroxyphenylaxetamid

2.2.4.1 Điều chế hỗn hợp epoxi và halohydrin của *p*-hydroxyphenylaxetamid bằng phản ứng với kiềm

Hỗn hợp của *p*-hydroxyphenylaxetamid và epiclohydrin theo tỷ lệ 1:3 được khuấy trong bình cầu. Tiếp đó, cho vào hỗn hợp này một lượng nhỏ NaOH và nước. Khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng khoảng 3-5 ngày và sau đó sản phẩm ở dạng chất rắn màu trắng được lọc, làm khô và kiểm tra khả năng chuyển hóa cũng như tỷ lệ của hai dạng sản phẩm là epoxi và halohydrin bằng máy sắc khí lỏng ghép nối khối phổ (LC-MS).

2.2.4.2 Điều chế hỗn hợp epoxi và halohydrin của *p*-hydroxyphenylaxetamid bằng xúc tác chuyển pha

Hỗn hợp của *p*-hydroxyphenylaxetamid và epiclohydrin theo tỷ lệ 1:4 và một lượng nhỏ xúc tác chuyển pha trimetyl amoni clorua được đựng trong bình cầu đáy tròn đặt trên bếp khuấy từ. Hỗn hợp phản ứng được gia nhiệt lên đến 90⁰C và duy trì ở nhiệt độ này trong 1 giờ. Kết thúc phản ứng, một lượng nhỏ nước được thêm vào để loại hết các hợp chất vô cơ. Lọc lấy sản phẩm màu trắng, làm khô đến khối lượng không đổi và xác định hiệu suất phản ứng và tỷ lệ giữa hai dạng epoxi và halohydrin.

+ *Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ đến hiệu suất của phản ứng và tỷ lệ giữa hai dạng epoxi và halohydrin của p-hydroxyphenylaxetamid*

Các hỗn hợp phản ứng gồm *p*-hydroxyphenylaxetamid, epiclohydrin và xúc tác chuyển pha trimetylamonium clorua với tỉ lệ như trên được thực hiện phản ứng ở các nhiệt độ 40, 50, 60, 70, 80 và 100⁰C và duy trì ở các nhiệt độ đó trong 1 giờ. Sản phẩm được lọc, làm khô và xác định hiệu suất phản ứng và tỷ lệ giữa hai dạng bằng máy sắc khí lỏng - khối phổ LC-MS.

2.2.4.3 *Điều chế hỗn hợp epoxi và halohydrin của p-hydroxyphenylaxetamid bằng hỗn hợp kiềm và xúc tác chuyển pha*

Các hỗn hợp của *p*-hydroxyphenylaxetamid và epiclohydrin theo tỷ lệ 1:3 được cho vào trong bình cầu rồi thêm vào đó một lượng nhỏ hỗn hợp xúc tác bao gồm NaOH, trimetylamonium clorua và nước. Hỗn hợp này được khuấy ở các nhiệt độ từ 40-80⁰C trong 1,5 giờ. Kết thúc phản ứng, lọc chất rắn thu được, làm khô, xác định hiệu suất phản ứng và tỷ lệ giữa hai dạng epoxi và halohydrin.

2.2.5. Tổng hợp atenolol

Thêm 16 g hỗn hợp epoxi và halohydrin của *p*-hydroxyphenylaxetamid vào bình cầu đáy tròn dung tích 500ml có chứa 240ml isopropylamin, lắp sinh hàn hồi lưu hiệu lực và đặt bình cầu trên bếp từ. Vừa khuấy vừa đun hồi lưu hỗn hợp phản ứng trong 3 ngày. Kết thúc phản ứng, hỗn hợp được làm lạnh đến nhiệt độ phòng và đuổi hết isopropylamin dư. Axit hoá dịch phản ứng thu được bằng 20ml dung dịch HCl 6N, khuấy kỹ và lọc dịch thu được trên phễu Busner, điều chỉnh pH của dịch lọc đến 10 bằng dung dịch NaOH 30%. Để yên qua đêm cho atenolol kết tinh. Lọc thu sản phẩm và tinh chế bằng cách kết tinh lại trong etylaxetat thu được 68g atenolol sạch.

2.2.6. Tinh chế atenolol

Atenolol thô và etylaxetat theo tỷ lệ 1g: 10ml được đun hồi lưu 20 phút trên nồi cách thủy, lọc nóng và bay hơi ở áp suất giảm đến khi còn 1/2 thể tích, để nguội, atenolol sẽ kết tinh, lọc và rửa vài lần bằng etylaxetat lạnh, làm khô.

2.3. NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH HẠ HUYẾT ÁP CỦA ATENOLOL

Độc tính cấp và hoạt tính hạ huyết áp của atenolol được thực hiện ở Khoa Sinh học - Đại học Khoa học Tự nhiên - Đại học Quốc gia Hà Nội và Trường Đại học Y Hà Nội

2.3.1. Nghiên cứu độc tính cấp của atenolol

Động vật thực nghiệm:

Chuột nhắt trắng, cả hai giống, khoẻ mạnh, trọng lượng từ 18 – 22g do Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương cung cấp.

Chuột được nuôi trong phòng thí nghiệm 4 ngày trước khi nghiên cứu, được nuôi bằng thức ăn chuẩn do Viện vệ sinh Dịch tễ Trung ương sản xuất, uống nước tự do.

Chuột được cân để xác định trọng lượng và được phân lô ngẫu nhiên, mỗi lô 10 con. Sau đó xác định LD₅₀ của atenolol trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [3].

Trước khi tiến hành thí nghiệm, cho chuột nhịn ăn qua đêm.

Từng lô chuột nhắt được uống thuốc thử theo liều tăng dần từ 3g/kg đến 21g/kg, uống 3 lần trong 24 giờ, mỗi lần uống cách nhau ít nhất 2h.

Theo dõi tình trạng chung của chuột và số lượng chuột chết ở mỗi lô trong 72 giờ. Sau đó tiếp tục theo dõi tình trạng chung của chuột đến hết ngày thứ 7 sau khi uống thuốc thử lần đầu và tính toán LD₅₀.

2.3.2. Nghiên cứu hoạt tính hạ huyết áp của atenolol

2.3.2.1 Đối tượng, thiết bị và hoá chất

Đối tượng: Gồm 75 con chuột cống trắng, cả hai giống, khoẻ mạnh, trọng lượng từ 195 – 243g do Học viện Quân y cung cấp.

Chuột được nuôi trong phòng thí nghiệm 3 ngày trước khi nghiên cứu, được nuôi bằng thức ăn chuẩn do Viện vệ sinh dịch tễ Trung ương sản xuất, uống nước tự do. Chuột được cân để xác định trọng lượng và được phân thành 5 lô ngẫu nhiên, mỗi lô 15 con.

Thiết bị:

- + Hút khử mùi của hãng ESCO, Singapore
- + Máy đo huyết áp từ đuôi chuột (LE 5002 Storage pressure meter, Italy)
- + Và các thiết bị nhỏ lẻ khác (bộ đồ mổ, kim cong, chỉ...).

Hoá chất: Dung dịch nước muối sinh lý, cồn 90⁰ và ete, thuốc atenolol (viên 50mg của hãng STADApHarm GmbH, Germany sản xuất).

2.3.2.2 Phương pháp nghiên cứu mô phỏng theo phương pháp của Evant [28]

Nghiên cứu tác dụng hạ huyết áp của dược chất atenolol trên chuột cống trắng theo mô hình thắt động mạch thận. Đo huyết áp gián tiếp từ đuôi chuột cống trắng.

Dùng ete để gây mê chuột và phẫu thuật thắt động mạch thận trong hút khử mùi. Đo huyết áp và nhịp tim trước 24 giờ và sau 6 - 7 ngày thắt động mạch thận.

Các lô nghiên cứu bao gồm:

Lô 1 (n = 15): uống nước bình thường (Lô đối chứng âm)

Lô 2 (n = 15): uống liều 56mg/kg trọng lượng/ngày

Lô 3 (n = 15): uống liều 84mg/kg trọng lượng/ngày

Lô 4 (n = 15): uống liều 112mg/kg trọng lượng/ngày

Lô 5 (n = 15): uống thuốc atenolol (viên 50mg/kg) 14mg/kg trọng lượng/ngày (Lô đối chứng dương)

Chuột được uống thuốc trong 3 ngày liên tiếp sau 7 ngày thắt động mạch thận. Mỗi ngày uống 1 liều duy nhất vào khoảng 7 – 8 giờ sáng. Đo huyết áp và nhịp tim sau uống thuốc 3 giờ và 7 giờ mỗi ngày.

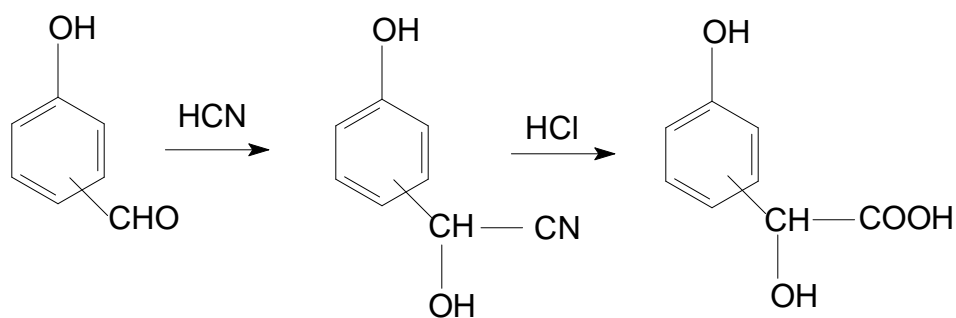
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả tổng hợp

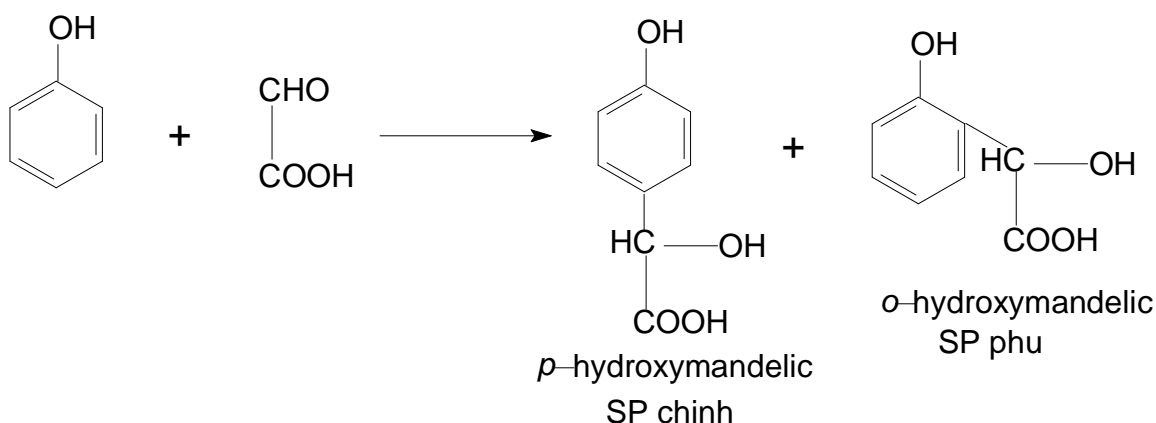
3.1.1. Kết quả tổng hợp axit *p*-hydroxymandelic

Axit *p*-hydroxymandelic là hợp chất trung gian quan trọng trong tổng hợp atenolol. Ngoài axit *p*-hydroxymandelic, 2 đồng phân nữa của nó là các axit *o* và *m*-hydroxymandelic cũng được biết đến như là các hợp chất kháng khuẩn *in vitro* (Kháng *E.typhi* và *staphylococcus aureus*). Về mặt cấu tạo, axit *p*-hydroxymandelic có trung tâm bất đối, do đó axit này xuất hiện các đồng phân quang học. Trong thực tế, khi điều chế các axit này bằng phương pháp hoá học chúng ta nhận được hỗn hợp raxemic của các axit hydroxymandelic.

Để tổng hợp hỗn hợp raxemic của axit *p*-hydroxymandelic, có khá nhiều phương pháp được giới thiệu. Tuy nhiên, hai con đường thường hay được sử dụng nhất là đi qua dẫn xuất nitrin và hydroxyankyl hoá trực tiếp phenol, ví dụ tổng hợp axit *p*-hydroxymandelic qua con đường nitrin:



Ngoài ra một con đường khác được lựa chọn để tổng hợp các axit *p*-hydroxymandelic là thực hiện phản ứng trực tiếp giữa phenol và axit glyoxylic



So với các phương pháp trên thì phương pháp này thực hiện ở điều kiện nhiệt độ và áp suất thường, quy trình phản ứng không phức tạp và hiệu suất có thể chấp nhận được. Do đó chúng tôi lựa chọn phương pháp này để tổng hợp axit *p*-hydroxymandelic từ phenol và axit glyoxylic loại 50% trong nước trong môi trường kiềm. Theo lý thuyết phản ứng thì sản phẩm tạo thành luôn là 2 dạng đồng phân axit *o* và *p*-hydroxymandelic và tỷ lệ 2 dạng này phụ thuộc vào nhiệt độ phản ứng. Ở đây chúng tôi tiến hành phản ứng ở nhiệt độ lúc đầu là 10-15⁰C, sau đó nâng nhiệt độ phản ứng lên 35⁰C trong thời gian 3 giờ, sau khi axit hoá, loại bỏ phenol dư và chiết bằng etylaxetat (EtOAc) để thu lấy sản phẩm axit *p*-hydroxymandelic màu trắng, có nhiệt độ nóng chảy 98-100⁰C phù hợp với tài liệu [49], hiệu suất 65%. Thực nghiệm cho thấy, hiệu suất phản ứng phụ thuộc vào nhiệt độ lúc nhỏ giọt và nhiệt độ lúc duy trì phản ứng. Ảnh hưởng của các yếu tố này đến hiệu suất của phản ứng cũng đã được khảo sát và kết quả được đưa ra ở bảng 2.

Bảng 2: ảnh hưởng của nhiệt độ đến phản ứng tổng hợp axit *p*-hydroxymandelic

Ảnh hưởng của nhiệt độ lúc nhỏ giọt			Ảnh hưởng của nhiệt độ lúc phản ứng		
STT	Nhiệt độ	Hiệu suất	STT	Nhiệt độ	Hiệu suất
1	10-15	65	1	35	65
2	20	62	2	45	60

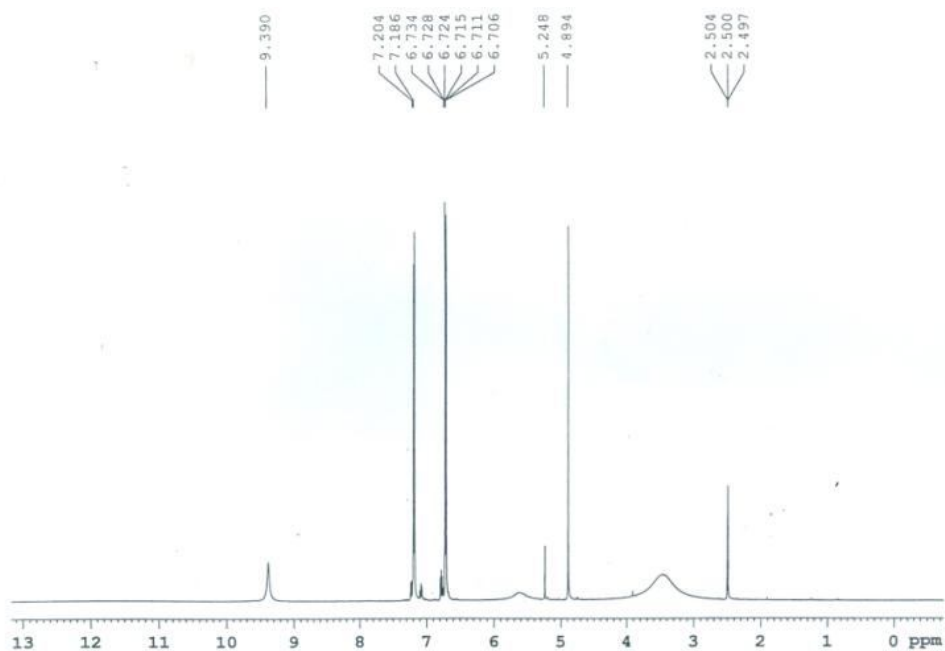
3	30	45	3	60	56
4	50	28	4	80	40
5	Không k/ soát	0	5	100	30

Kết luận: Phản ứng tổng hợp axit *p*-hydroxymandelic được tiến hành với lượng dư phenol trong môi trường kiềm ở nhiệt độ 35⁰C cho hiệu suất tốt trong điều kiện nghiên cứu. Nhiệt độ khi cho dung dịch NaOH vào và nhiệt độ phản ứng được không chế lần lượt là 10-15⁰C và 35⁰C. Nhiệt độ cao hơn sẽ ưu tiên cho phản ứng phụ tạo dẫn xuất axit *o*-hydroxymandelic và phản ứng Canizzaro làm giảm hiệu suất của phản ứng tạo axit *p*-hydroxymandelic.

Cấu trúc của sản phẩm được xác định bằng các phương pháp phổ hồng ngoại (FT-IR) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).

Phổ hồng ngoại FT-IR của sản phẩm đo ở dạng viên nén với KBr (phụ lục 1.1). Trên phổ hồng ngoại xuất hiện các băng sóng rộng, cường độ lớn với đỉnh ở 3477,36 cm⁻¹ của dao động hoá trị tự do nhóm -OH, dao động hoá trị đặc trưng của vòng benzen xuất hiện tại 3241,25 cm⁻¹ (C-H thơm), các băng sóng 2940,76 của liên kết C-H thẳng; 1693,45 của liên kết C=O của axit; 1610,52 cm⁻¹ của liên kết C=C trong vòng thơm.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR (hình 1) của sản phẩm đo trên máy Bruker Advance 500MHz cho thấy sản phẩm chứa vòng thơm có kiểu thế 1,4 với các vị trí proton của vòng thơm xuất hiện lần lượt tại 6,73 ppm và 7,19 ppm, tín hiệu của nhóm -CH- ngoài vòng gắn với nhóm COOH và OH xuất hiện như vạch đơn có δ_H = 4,89 ppm, proton gắn với nguyên tử oxi đính vào vòng thơm có δ_H = 5,65 ppm với cường độ tín hiệu thấp, proton của nhóm OH ngoài vòng có tín hiệu ở 3,45 ppm và proton của nhóm cacboxy (COOH) có tín hiệu thấp tại 9,39 ppm.



Hình 1: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của axit *p*-hydroxymandelic

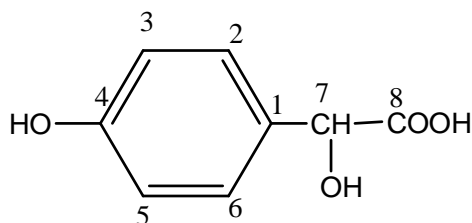
Trên phổ cộng hưởng từ $^{13}\text{C-NMR}$ của sản phẩm (phụ lục 1.3) xuất hiện 8 tín hiệu các bon, trong đó có 2 tín hiệu chập đôi của 4 nguyên tử các bon trong vòng thơm, điều này càng khẳng định kiểu cấu trúc thế 1,4 của vòng thơm này. Ngoài ra 1 tín hiệu các bon xuất hiện tại 175,34 ppm được gán cho nguyên tử các bon của nhóm COOH và tín hiệu ở 72,00 ppm được quy cho nhóm $-\text{CH}-$ ngoài vòng.

Kết quả xác định cấu trúc phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$ của sản phẩm *p*-hydroxymandelic được đưa ra ở bảng sau.

Bảng 3. Độ chuyển dịch hoá học trong phổ $^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$		Phổ $^1\text{H-NMR}$		
C (vị trí)	δ (ppm)	H (vị trí)	ppm	J(Hz)
C ₁	131,45	2 H _{3,5} ; ddd	6,72	$j_1=8, j_2=3, j_3=2$
C _{3,5}	115,73	2 H _{2,6} ; d	7,19	$j=8$
C ₄	157,79	1 H ₇ ; s	4,89	

C _{2,6}	128,80	1 H (-OH);	5,65	
C ₇	72,00	1H (COOH)	9,39	
C ₈	175,34	1 H (C ₇ OH)	3,45	

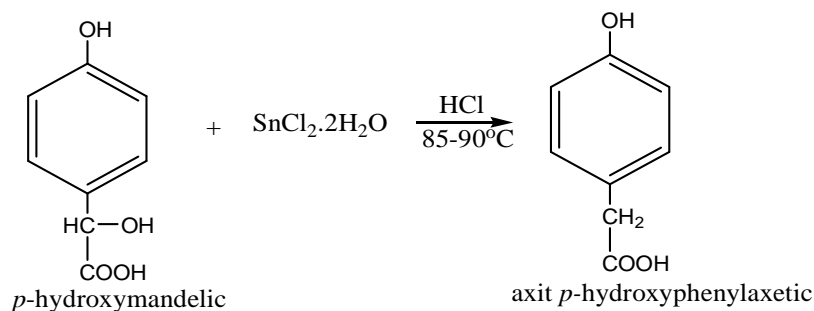


Cũng trên phổ $^1\text{H-NMR}$; $^{13}\text{C-NMR}$ còn cho thấy ngoài sản phẩm chính axit *p*-hydroxymandelic còn có một lượng nhỏ sản phẩm phụ là axit *o*-hydroxymandelic. Dựa vào phổ $^1\text{H-NMR}$ ta có thể tính được tỷ lệ giữa hai dạng là 47:3.

3.1.2. Kết quả tổng hợp axit *p*-hydroxyphenylaxetic

Quá trình khử hóa axit *p*-hydroxymandelic thành axit *p*-hydroxyphenylaxetic có thể được thực hiện bằng các tác nhân khử hóa khác nhau như H_2 xúc tác Pd/C 5% [20]; CrCl_3 [38] hoặc KH_2PO_4 và $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [7], trong các phương pháp trên xúc tác Pd/C 5% quá đắt, CrCl_3 và KH_2PO_4 phải điều chế tại chỗ khi tiến hành phản, như vậy sử dụng $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ để khử axit *p*-hydroxymandelic là thuận lợi hơn cả, phỏng theo tài liệu [7] chúng tôi tiến hành phản ứng khử hoá axit *p*-hydroxymandelic bằng $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ trong môi trường axit ở $85 - 90^\circ\text{C}$ và sản phẩm dễ dàng tách ra khi làm lạnh hỗn hợp xuống 10°C . Lọc thu lấy sản phẩm, tinh chế bằng nước thu được axit *p*-hydroxyphenylaxetic sạch với hiệu suất 95%, có nhiệt độ nóng chảy là 150°C , phù hợp với tài liệu [7].

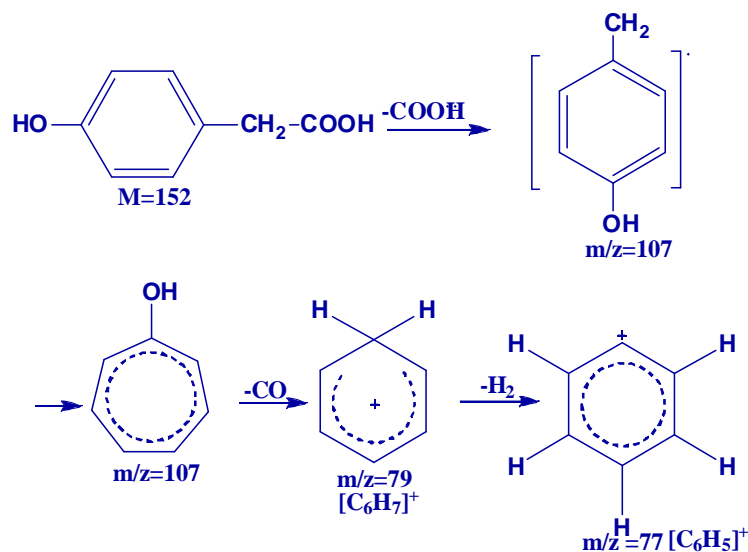
Phản ứng xảy ra như sau:



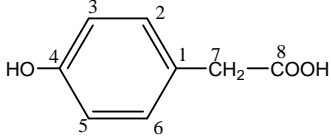
Để xác định cấu trúc của sản phẩm axit *p*-hydroxyphenylaxetic tạo thành, chúng tôi đã tiến hành đo phổ hồng ngoại (FT-IR), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) và phổ khối MS.

Phổ hồng ngoại được đo ở dạng viên nén với KBr (phụ lục 2.1). Từ phổ hồng ngoại các nhóm chức và liên kết được quy kết như sau: ν : 3246,82 cm^{-1} (O-H); 3057,83 cm^{-1} (C-H thơm); 2915,07 cm^{-1} (C-H thẳng); 1705,11 cm^{-1} (C=O); 1603,33 cm^{-1} (C=C).

Phổ MS của sản phẩm ở giai đoạn này (phụ lục 2.5) cho thấy, sản phẩm có $M=152$ trùng với khối lượng phân tử của axit *p*-hydroxyphenylaxetic. Trên phổ MS còn có các mảnh phân rã với các giá trị m/z lần lượt là 107, 79 và 77 cho phép chúng ta đưa ra sơ đồ phân mảnh của axit *p*-hydroxyphenylaxetic như sau:



Trong phổ ^{13}C -NMR của sản phẩm axit *p*-hydroxyphenylaxetic có 8 nguyên tử các bon trong đó $\delta_{\text{C}}=173,10$ ppm của cácbon axit, 2 tín hiệu cácbon chập đôi có $\delta = 115,01$ ppm và 130,23ppm chứng tỏ vòng benzen này bị thế 1,4, một nhóm $-\text{CH}_2-$ xuất hiện ở 39,00 ppm. Các vị trí tín hiệu, cường độ của các nguyên tử cacbon trong phổ ^{13}C -NMR và DEPT hoàn toàn phù hợp với công thức cấu tạo của axit *p*-hydroxyphenylaxetic. Các dữ kiện trong phổ proton (phụ lục 2.2) cũng khẳng định sản phẩm là axit *p*-hydroxyphenylaxetic. Sự quy kết các tín hiệu trên phổ ^1H -NMR; ^{13}C -NMR của sản phẩm được đưa như sau:

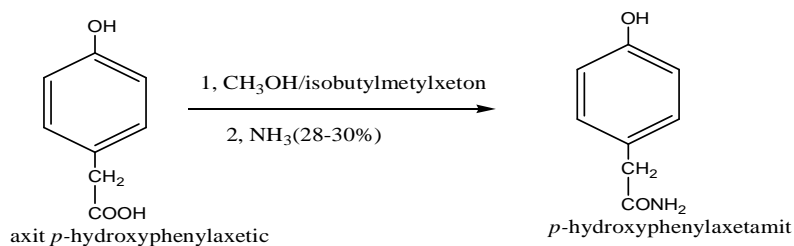
	$^1\text{H-NMR } \delta(\text{ppm}): \text{H}_{3,5} \text{ 6,69 (d, } J=8\text{Hz)}; \text{H}_{2,6} \text{ 7,04 (d, } J=8\text{Hz)}; 2\text{H}_7 \text{ 3,44 (s)}; \text{H}_{\text{axit}} \text{ 12,15}$
	$^{13}\text{C-NMR } \delta(\text{ppm}): \text{C}_1 \text{ 125,10}; \text{C}_4 \text{ 156,03}; \text{C}_{3,5} \text{ 115,01}; \text{C}_{2,6} \text{ 130,23}; \text{C}_7 \text{ 39,00}; \text{C}_8 \text{ 173,10}$

Cũng từ phổ NMR cho thấy, sản phẩm khử hóa thu được chỉ có axit *p*-hydroxyphenylaxetic mà không thấy xuất hiện sản phẩm phụ axit *o*-hydroxyphenylaxetic.

3.1.3. Kết quả tổng hợp *p*-hydroxyphenylaxetamid.

Theo các tài liệu tham khảo, amit có thể được tổng hợp từ nhiều nguồn khác nhau bao gồm đi từ axit tương ứng, đi từ dẫn xuất nitrin, từ *p*-hydroxyphenylmetylketon (như đã nêu ở phần tổng quan) hoặc đi từ các dẫn xuất halogen [39; 41], ngoài ra amit cũng có thể được tổng hợp từ axit cacboxylic và phương pháp chung để chuyển axit sang amit là thực hiện phản ứng thế ái nhân với NH_3 . Tuy nhiên, do khả năng phản ứng thế ái nhân của axit kém [39] nên để cho quá trình chuyển hóa được thuận lợi, bước đầu tiên là chuyển axit thành este, trong trường hợp này, axit *p*-hydroxyphenylaxetic được chuyển thành dạng metyleste với methanol trong dung môi isobutylmetylketon và xúc tác HCl ở nhiệt độ sôi, axit *p*-hydroxyphenylaxetic được điều chế từ axit *p*-hydroxymandelic không cần phải làm khô và được hoà trong isobutylmetylketon và đun nóng đến 105°C để loại bỏ hết nước trong hỗn hợp phản ứng nhờ hỗn hợp đẳng phí của dung môi này và nước sôi ở nhiệt độ đó, tiếp theo đó làm lạnh hỗn hợp đến 10°C và lượng dư metanol và xúc tác HCl được thêm vào, sản phẩm este thu được cho phản ứng trực tiếp với NH_3 dư (28-30%) trong khoảng 12 – 14 giờ ở nhiệt độ phòng để thu được *p*-hydroxyphenylaxetamid có màu trắng ngà, T^0 nóng chảy $172\text{-}174^\circ\text{C}$.

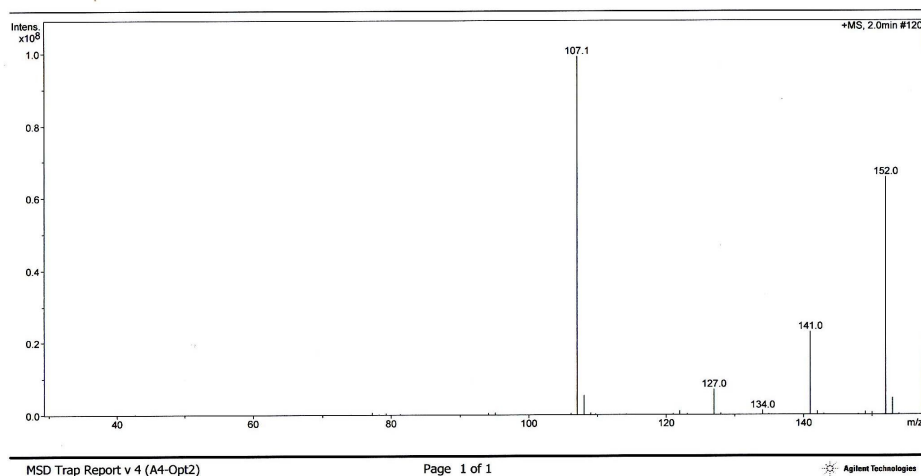
Phản ứng xảy ra như sau:



Để xác định cấu trúc của sản phẩm phản ứng chuyển hoá axit *p*-hydroxyphenylaxetic, chúng tôi sử dụng các phổ như FT-IR, MS và các phổ $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT.

Phổ IR của sản phẩm được đo ở dạng viên nén với KBr (phụ lục 3.1). Từ phổ hồng ngoại, các băng sóng hấp thụ và các liên kết được quy kết như sau: $3390,30\text{ cm}^{-1}$ (N-H), $3225,32\text{ cm}^{-1}$ (C-H thơm); $2931,23\text{ cm}^{-1}$ (C-H thẳng); $1659,55\text{ cm}^{-1}$ (C=O amit), $1613,55\text{ cm}^{-1}$ (C=C). Từ phổ hồng ngoại có thể sơ bộ nhận dạng được sự có mặt của các nhóm amin. -OH, liên kết C=C thơm trong cấu trúc của sản phẩm.

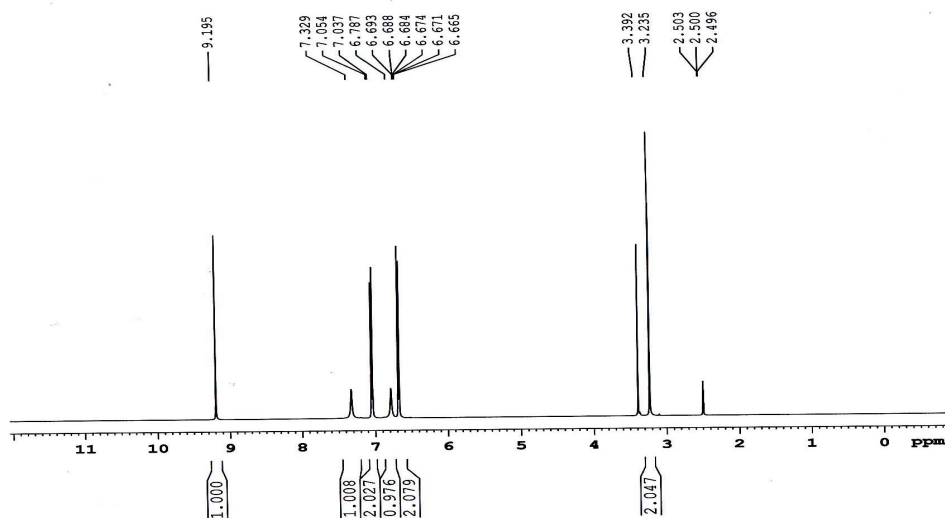
Để xem xét sản phẩm có phải là chất mong muốn không, phương pháp đơn giản nhất là đo phổ khối lượng trước khi đo phổ NMR. Phổ MS được đo trên máy LC-MS/Agilent 6310 Ion Trap của Mỹ cho pic ion phân tử có $M=151$ ($M + 1 = 152$), điều này chứng tỏ phân tử có một nguyên tử N nên số khối lẻ, phù hợp với khối lượng phân tử của *p*-hydroxyphenylaxetamid.



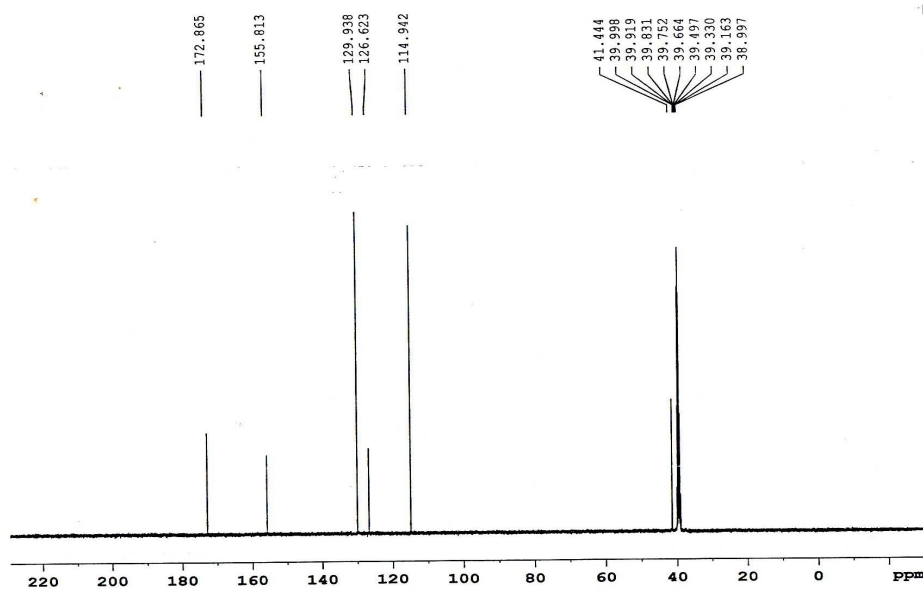
Hình 2: Phổ khối của *p*-hydroxyphenylaxetamid

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 Hz) cho thấy phân tử của nó có chứa 8 nguyên tử C với 2 tín hiệu của các nguyên tử Cacbon bị chập đôi có $\delta = 114,94\text{ppm}$ và $129,94\text{ppm}$ chứng tỏ vòng benzen này bị thế 1,4, một tín hiệu C bậc 4 ở $172,78\text{ppm}$ của C=O trong amit, ngoài ra các tín hiệu các bon ở nhóm $-\text{CH}_2-$ xuất hiện ở $41,44\text{ppm}$. Kết hợp với phổ

DEPT (Phụ lục 3.4) có thể nhận định các tín hiệu của các nguyên tử cacbon trong phổ hoàn toàn phù hợp với công thức của *p*-hydroxyphenylaxetamid.

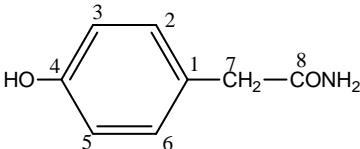


Hình 3: Phổ ^1H -NMR của *p*-hydroxyphenylaxetamid



Hình 4: Phổ ^{13}C -NMR của *p*-hydroxyphenylaxetamid

Kết quả xác định cấu trúc của *p*-hydroxyphenylaxetamid được đưa ra như sau :

	$^1\text{H-NMR } \delta(\text{ppm}): \text{H}_{3,5} \text{ 6,69 (ddd, } J_1=8,5\text{Hz; } J_2=3\text{Hz; } J_3=1,5 \text{ Hz) ; } \text{H}_{2,6} \text{ 7,04 (d, } J=8,5\text{Hz); } 2\text{H}_7 \text{ 3,24 (s); } \text{H}_{8\text{amit}} \text{ 6,79 (s); } \text{H}_{8\text{amit}} \text{ 7,33 (s); H(OH) 9,19}$
	$^{13}\text{C-NMR } \delta(\text{ppm}): \text{C}_1 \text{ 126,62; } \text{C}_4 \text{ 155,81; } \text{C}_{3,5} \text{ 114,94; } \text{C}_{2,6} \text{ 129,94; } \text{C}_7 \text{ 41,44; } \text{C}_8 \text{ 172,87}$

Như vậy, các dữ kiện vật lý và dữ kiện phổ đều phù hợp với cấu trúc của *p*-hydroxyphenylacetamid và sản phẩm thu được chính là **chất trung gian chìa khóa quan trọng *p*-hydroxyphenylacetamid**.

3.1.4. Kết quả tổng hợp hỗn hợp epoxi và halohydrin của *p*-hydroxyphenylacetamid

Sau khi đã điều chế được chất trung gian chìa khoá *p*-hydroxyphenylacetamid, bước tiếp theo chúng tôi tiến hành tổng hợp atenolol. Bước đầu tiên trong quá trình này là thực hiện phản ứng giữa *p*-hydroxyphenylacetamid với epichlorhydrin. Theo các tài liệu tham khảo được, phản ứng giữa các chất này có thể sử dụng kiềm hoặc xúc tác chuyển pha. Trước hết chúng tôi tiến hành phản ứng tổng hợp hỗn hợp epoxi và halohydrin của *p*-hydroxyphenylacetamid trong môi trường kiềm (dung dịch NaOH) theo tỷ lệ về khối lượng giữa *p*-hydroxyphenylacetamid : epichlorhydrin là 1:3. Phản ứng được khuấy trộn trong 5 ngày ở nhiệt độ phòng. Lọc thu sản phẩm và xác định khả năng chuyển hóa và tỷ lệ giữa hai dạng epoxi : halohydrin bằng (HPLC). Kết quả cho thấy, trong điều kiện nghiên cứu tỷ lệ giữa hai dạng là 2:1 và hiệu suất của phản ứng là 94%. Còn theo tài liệu [8] tỷ lệ hai dạng là 3:1 và hiệu suất 93 % (tính theo HPLC).

Tiếp theo, chúng tôi nghiên cứu phản ứng tổng hợp hai dạng epoxi và halohydrin nêu trên có sử dụng xúc tác chuyển pha N,N,N -trimetylamonoclorua ở 90°C trong một giờ với tỷ lệ giữa *p*-hydroxyphenylacetamid : epichlorhydrin là 1:4. Sau khi thu sản phẩm, xác định khả năng chuyển hóa tỷ lệ và tỷ lệ giữa hai dạng epoxi và halohydrin

bằng HPLC (của LC-MS). Đối với xúc tác chuyển pha N,N,N-trimetylamonoclorua, hiệu suất đạt 84 % và tỷ lệ giữa hai dạng là 4:1, còn theo tài liệu [50] thì tỷ lệ này là 4:1

Đối với phản ứng này, khi sử dụng xúc tác chuyển pha, hiệu suất phản ứng cũng khá cao 84% so với 94% của phản ứng sử dụng kiềm. Tuy nhiên, thời gian phản ứng chỉ còn là một giờ thay vì 5 ngày. Như vậy, hướng sử dụng xúc tác chuyển pha có thể ứng dụng ở quy mô lớn trong thực tiễn và khi sử dụng xúc tác này, nhiệt độ của phản ứng cũng đóng vai trò rất quan trọng đối với khả năng chuyển hóa. Để xác định nhiệt độ thích hợp nhất cho phản ứng này, các thí nghiệm nghiên cứu được tiến hành với các điều kiện như nhau nhưng ở các nhiệt độ 70⁰C, 80⁰C, 90⁰C, 100⁰C và không khống chế nhiệt độ. Kết quả nghiên cứu được chỉ ra ở bảng sau:

Bảng 4: Hiệu suất của phản ứng và tỷ lệ giữa hai dạng epoxi và halohydrin

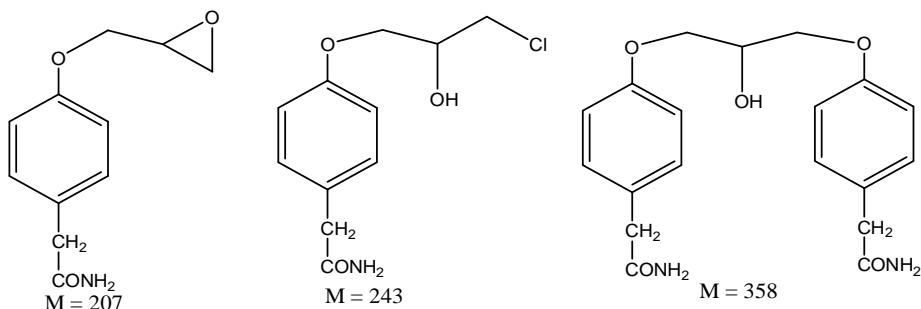
STT	Nhiệt độ (°C)	Tỷ lệ 2 dạng	n _{epoxi}	n _{halohydrin}	n _{tổng}	Hiệu suất(%)
1	70	1 : 3,35	0,0051	0,0057	0,0108	45,4
2	80	2,04 : 1	0,0131	0,0056	0,0189	79,4
3	90	3,9 : 1	0,0166	0,0036	0,0202	84,9
4	100	4,09 : 1	0,0160	0,0033	0,0193	81,1
5	Không khống chế					30

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, phản ứng giữa *p*-hydroxyphenylaxetamid và epiclohydrin với xúc tác N,N,N-trimetylamonoclorua cho hiệu suất tốt nhất 84,9% với tỷ lệ hai dạng sấp xỉ 4:1. Khi không khống chế nhiệt độ phản ứng tạo ra rất nhiều sản phẩm phụ và hiệu suất chỉ đạt 30%.

Cuối cùng, chúng tôi tiến hành thử nghiệm điều chế hỗn hợp epoxi và halohydrin của *p*-hydroxyphenylaxetamid bằng hỗn hợp kiềm NaOH và xúc tác chuyển

pha N,N,N-trimethylamonoclorua. Các phản ứng được thực hiện ở các nhiệt độ từ 40- 80⁰ C trong một giờ. Sau khi xác định khả năng chuyển hóa và tỷ lệ giữa hai dạng, chúng tôi thấy phản ứng sử dụng hỗn hợp kiềm và xúc tác chuyển pha (xem phần phụ lục) cho hiệu suất cao hơn (91% so với 85%) xúc tác chuyển pha và trong cùng điều kiện nghiên cứu.

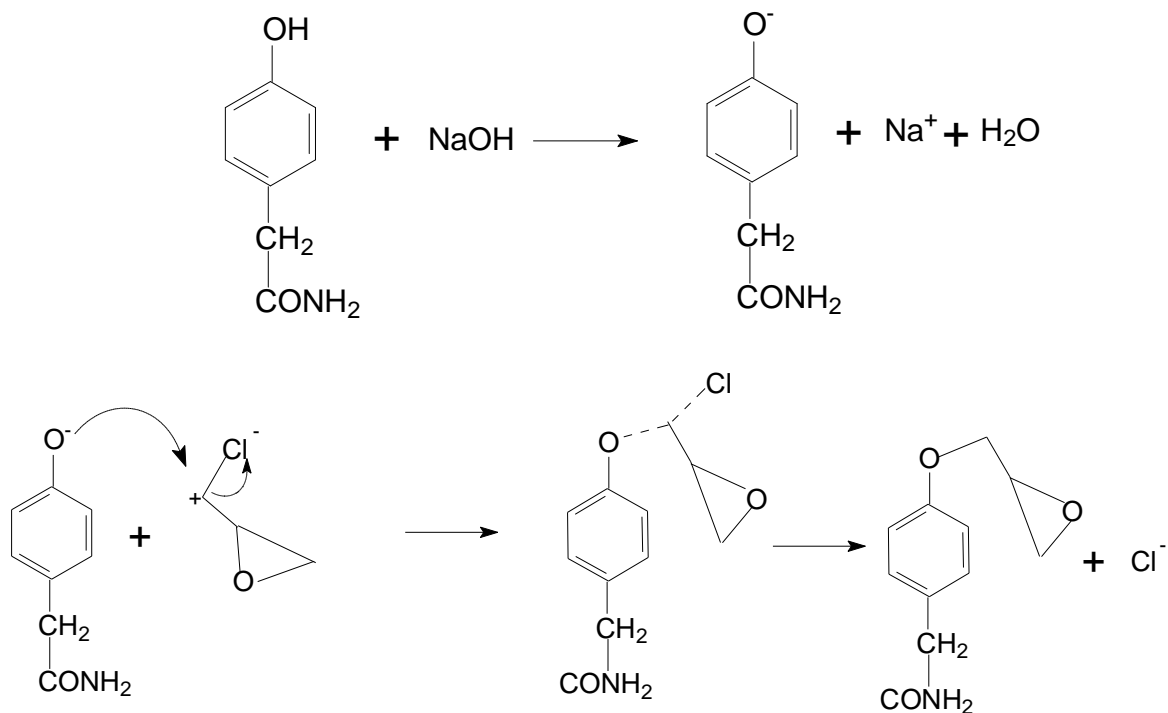
Trên phổ LC-MS của tất cả các mẫu khảo sát chỉ có hai pic lớn của sản phẩm cần quan tâm có các thời gian lưu tương ứng là t_{R1} và t_{R2} lần lượt là 10,9 và 12,4 phút tương ứng với các số khối là 207 và 243 hoàn toàn trùng khớp với số khối của hai dạng epoxi và halohydrin. Ngoài ra, trong tất cả các phổ LC-MS đều xuất hiện một pic có t_R = 12,9 phút tương ứng với số khối là 358 là sản phẩm phản ứng thế S_N2 2 lần, các kết quả đo LC-MS cũng cho thấy sản phẩm phụ không mong muốn có hàm lượng không đáng kể (chiếm từ 1-6,5%). Từ đó chúng tôi dự đoán sản phẩm chính và sản phẩm phụ của phản ứng này như sau:



Về mặt cơ chế, theo các tài liệu chúng tôi tham khảo được phản ứng xảy ra theo cơ chế S_N2 . Tốc độ và hướng của phản ứng cũng thay đổi tùy theo xúc tác được sử dụng. Do đặc điểm cấu trúc của epiclohydrin có chứa vòng epoxi không bền, không đối xứng và một liên kết phân cực C-Cl nên đây là chất chứa nhiều trung tâm cho phản ứng nucleophin, tuy nhiên phản ứng thế S_N2 chủ yếu xảy ra ở các vị trí 1 và 3 và như vậy phản ứng chỉ có thể xảy ra theo hai hướng như sau :

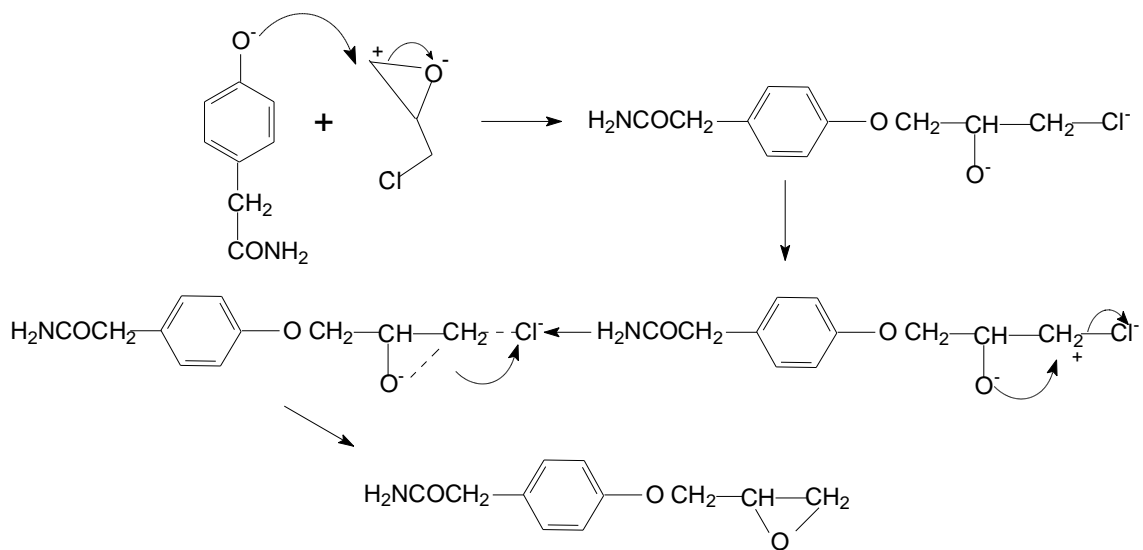
Hướng thứ nhất :

Trong môi trường kiềm, *p*-hydroxyphenylacetamid sẽ chuyển thành dạng phenolat của nó chính là tác nhân nucleophil tấn công vào liên kết C-Cl để tạo ra dạng epoxi:

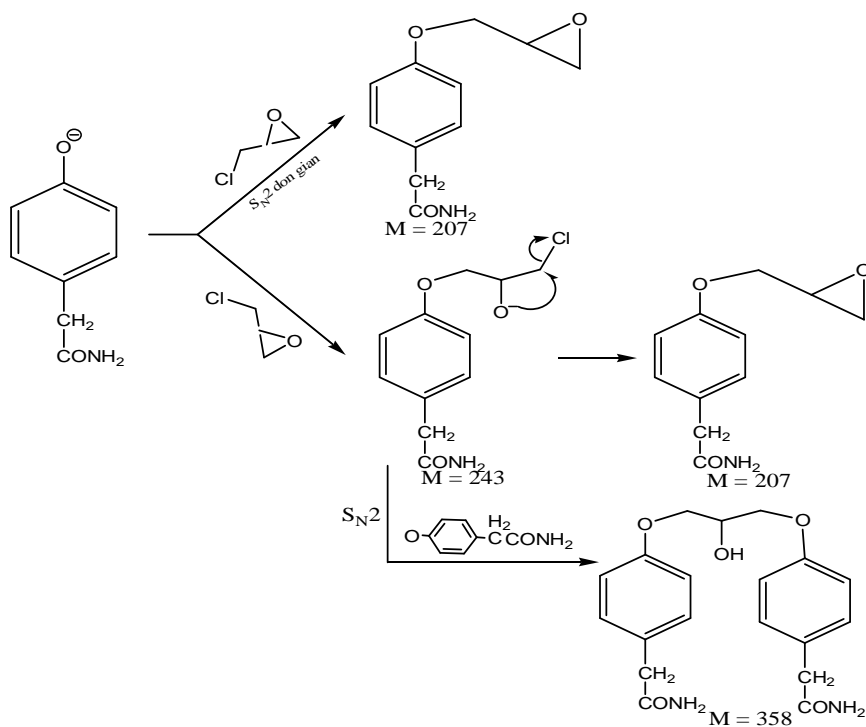


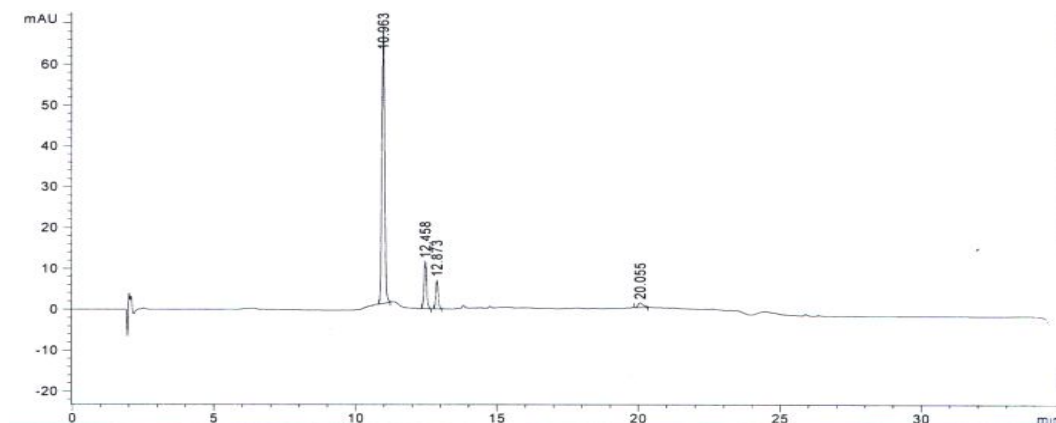
Hướng thứ hai :

Tác nhân nucleophil tấn công vào liên kết -CH₂-O- của vòng epoxi không bền để tạo thành dạng halohydrin, tiếp theo đó dạng này đóng vòng trở lại để tạo ra dạng epoxi như sau :



Về mặt lý thuyết, phản ứng này có thể tạo ra hỗn hợp gồm 4 dạng: epoxi, halohydrin, dạng diol và dạng amit đối xứng ($M=358$). Tuy nhiên, trong các điều kiện nghiên cứu phản ứng này, chúng tôi chỉ thấy có hỗn hợp hai dạng epoxi và halohydrin và sản phẩm phụ có $M=358$ là dạng amit đối xứng như dự đoán của chúng tôi. Từ các kết quả này, chúng tôi đưa ra sơ đồ chung cho các phản ứng này như sau :



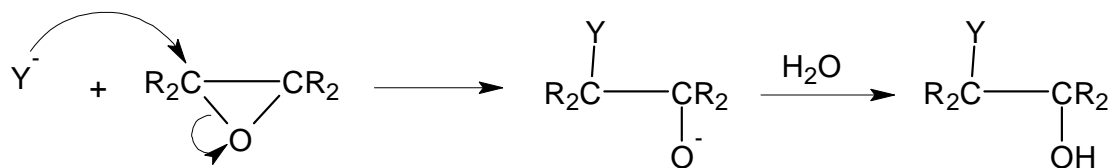


Hình 5: Phổ LC-MS của sản phẩm khi sử dụng hỗn hợp kiềm và xúc tác chuyển pha

Sau khi khảo sát ảnh hưởng của xúc tác và nhiệt độ đến hiệu suất của phản ứng, chúng tôi quyết định chọn hỗn hợp xúc tác chuyển pha N,N,N-trimetylamonoclorua và NaOH cho phản ứng này nhằm giảm bớt thời gian phản ứng mà hiệu suất chênh nhau không đáng kể.

3.1.5. Kết quả tổng hợp atenolol

Giai đoạn cuối cùng trong tổng hợp atenolol là thực hiện phản ứng mở vòng. Do đặc điểm cấu trúc của vòng epoxi mà các hợp chất này dễ dàng tham gia phản ứng cộng hợp nucleophin mở vòng. Các tác nhân nucleophin sẽ dễ dàng tham gia phản ứng với các epoxi.

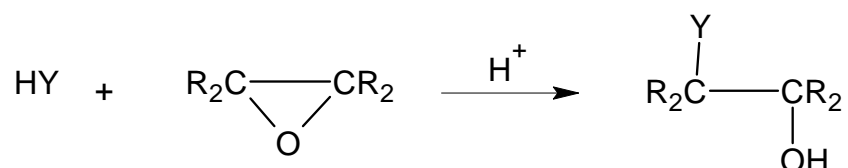


Trong đó: R là các gốc hydrocarbon

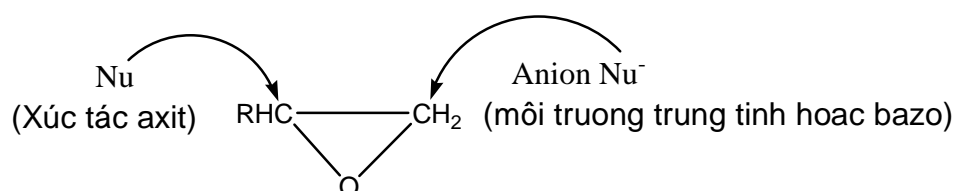
Y là tác nhân nucleophin

Đây là phản ứng của các anion nucleophin trong môi trường trung tính hoặc môi trường kiềm. Đối với phản ứng này, người ta thường sử dụng nước hoặc ancol làm dung môi để dạng anion ankoxit dễ dàng chuyển thành ancol.

Phản ứng cộng hợp nucleophin mở vòng cũng có thể được tiến hành với sự xúc tác của axit



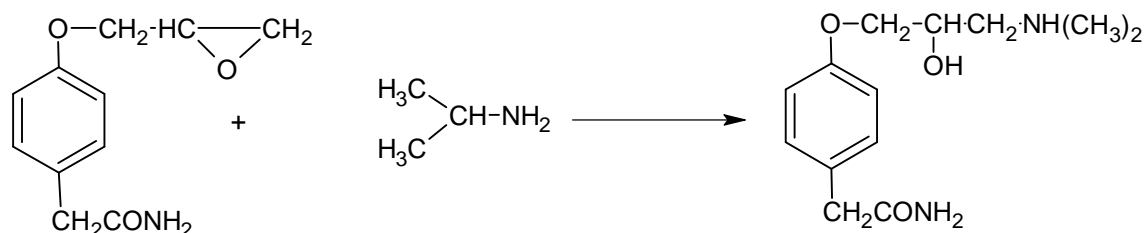
Một điều rất quan trọng ở đây là với xúc tác khác nhau, sự tấn công của các tác nhân nucleophin vào vòng epoxi không đối xứng cũng có sự khác biệt [30]:



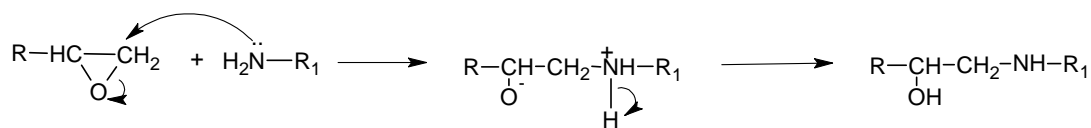
Với quá trình tổng hợp atenolol, dựa vào cấu trúc của sản phẩm tạo thành mà chúng ta có thể xác định được rằng, sự chuyển hóa dạng epoxi thành atenolol được tiến hành trong môi trường nước hoặc môi trường bazơ. Hơn nữa, tác nhân của phản ứng này là isopropylamin, một hợp chất có tính bazơ. Do vậy, môi trường cho phản ứng chuyển hóa này chính là môi trường bazơ.

Hợp phần amin được sử dụng để tổng hợp atenolol là một tác nhân nucleophin mạnh nên quá trình mở vòng epoxi khá dễ dàng.

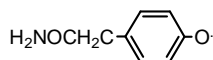
Phản ứng giữa dạng epoxi với isopropylamin:



Cơ chế phản ứng:

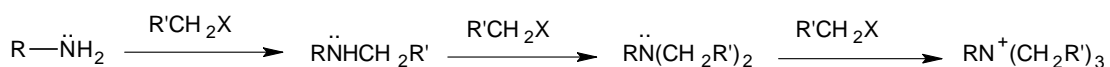


trong đó R:



Cơ chế của phản ứng này là sự cộng hợp mở vòng. Tác nhân nucleophilin là isopropylamin tấn công vào nguyên tử cacbon bậc 1 để mở vòng. Tiếp đến là quá trình tách proton từ hợp phần amin. Anion ankoxit sẽ kết hợp với proton này và sản phẩm cuối cùng tạo thành là atenolol.

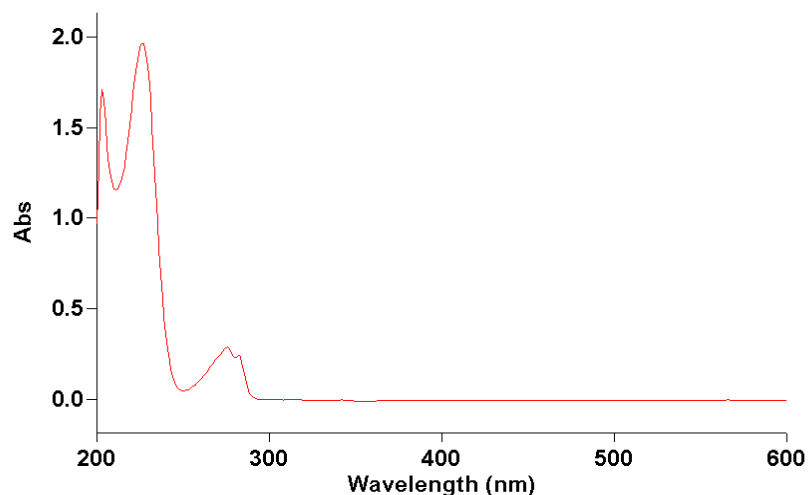
Nếu lượng amin bậc 1 (trong trường hợp này là isopropylamin) chỉ được dùng với lượng thiếu hoặc vừa đủ thì sản phẩm vừa được tạo ra là amin bậc 2 (chính là atenolol) sẽ trở thành tác nhân phản ứng, nó sẽ tiếp tục tấn công vào dẫn xuất halogen để tạo ra amin bậc 3, bậc 4:



Như vậy, với mục đích chỉ thu lấy sản phẩm amin bậc 2 là atenolol, số mol isopropylamin phải được lấy dư và phản ứng chỉ dừng lại ở giai đoạn đầu. Mặt khác phản ứng phải thực hiện ở nhiệt độ sôi của isopropylamin với việc sử dụng sinh hàn hồi lưu hiệu lực. Sau phản ứng, lượng dư của isopropylamin dễ dàng được loại bỏ nhờ phương pháp cất thông thường ở 95°C.

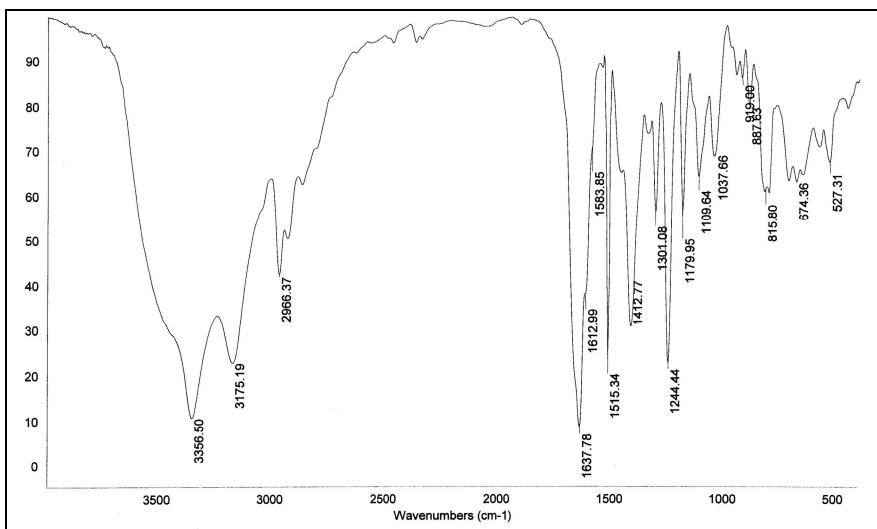
Sản phẩm atenolol được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại trong etylaxetat. Atenolol thu được có màu trắng, nhiệt độ nóng chảy 153 – 154°C, hiệu suất thu hồi của giai đoạn này đạt 73%.

Phổ UV-VIS của sản phẩm trong metanol cho 3 đỉnh hấp thụ cực đại ở giá trị λ_{max} 226, 276 và 282 nm tương ứng của dải E và dải B của vòng benzen liên hợp với nguyên tử O còn cặp đôi điện tử tự do, phù hợp với cấu trúc phân tử atenolol.



Hình 6: Phổ UV-VIS của sản phẩm

Phổ hồng ngoại FT-IR (hình 7): băng sóng hấp thụ tại $2251,14\text{ cm}^{-1}$ đã bị biến mất hoàn toàn, băng sóng hấp thụ sắc, nhọn xuất hiện tại $3356,50\text{ cm}^{-1}$ được cho là dao động hoá trị của nhóm -N-H . Ngoài ra, các tín hiệu của nhóm -C=O trong nhóm amit cũng xuất hiện tại $1637,38\text{ cm}^{-1}$. Kết quả xác định các nhóm trong phân tử atenolol bằng phổ hồng ngoại được đưa ra ở bảng 5.



Hình 7: Phổ hồng ngoại của sản phẩm

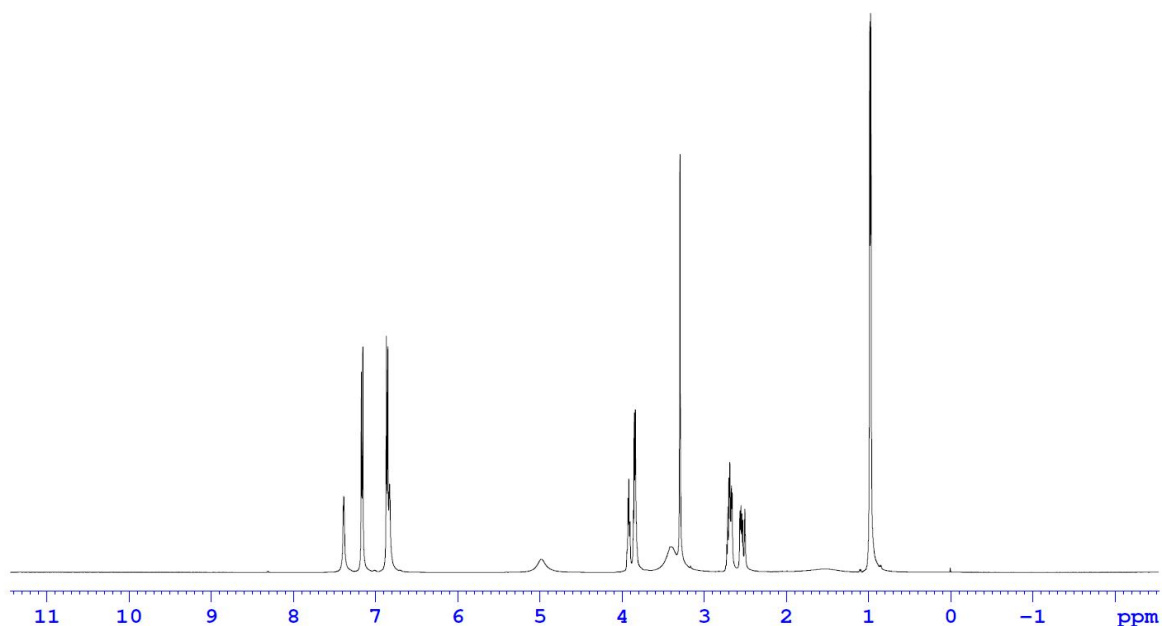
Bảng 5: Các giá trị hấp thụ của các nhóm chức trong phổ hồng ngoại

STT	Số sóng (cm ⁻¹)	Nhóm chức tương ứng
1	3356,50	-OH (hoá trị)
2	3175,19	-NH (hoá trị)
3	2966,37	C-CH ₃ (hoá trị)
	2924	CH ₂ (hoá trị)
	2870	CH (hoá trị)
3	1637,78	-C=O amit (hoá trị)
4	1612,99 và 1515,34	-C=C vòng thơm (hoá trị)
5	1412,77	CH(CH ₃) ₂ (hoá trị)
6	1244,44	-C-O (hoá trị)
7	900 – 800	C-H benzen (biến dạng ngoài vòng)

Từ các đỉnh hấp thụ và vị trí số sóng của chúng trên phổ hồng ngoại cho thấy được sự có mặt các nhóm chức –OH, –NH, –C=O (amit) và các liên kết C=C trong vòng thơm của sản phẩm, có trong cấu trúc phân tử của atenolol.

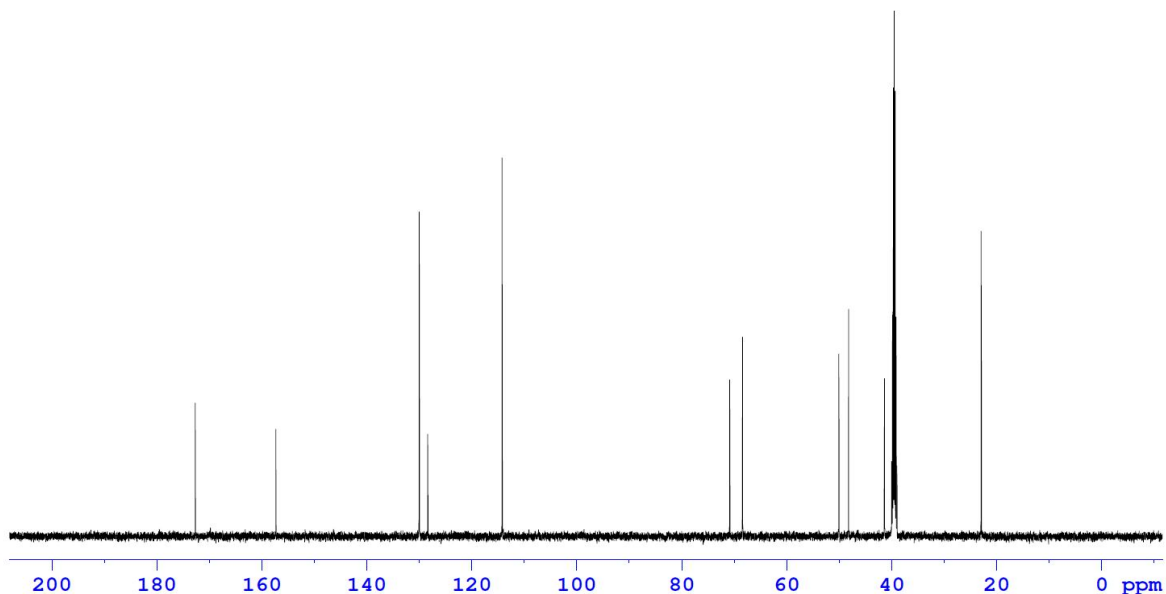
Phổ cộng hưởng từ proton : Phổ ¹H-NMR của atenolol được đo trong dung môi DMSO (dimetyl sulphoxide). Trên phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR của sản phẩm cho thấy các vạch phổ ứng với các proton có độ dịch chuyển hoá học, cường độ tích phân tín hiệu, độ bội hoàn toàn phù hợp với cấu trúc sản phẩm. Trong đó có 2 cặp với 4 proton trong vòng thơm xuất hiện ở độ dịch chuyển hoá học 7,25 ppm và 6,95 ppm; 6 proton trong 2 nhóm -CH₃ có độ dịch chuyển hoá học tại 0,97 và 0,99 ppm, các nhóm CH và CH₂ ngoài vòng xuất hiện tại các vị trí có độ dịch chuyển từ 0,97 ppm đến 3,95 ppm, trên phổ còn xuất hiện các tín hiệu proton ở δ = 6,83 ppm và 7,39 ppm được quy cho 2 hidro của nhóm amit, các tín hiệu tại 7,17 ppm và 6,86 ppm được quy cho 4

proton của vòng thơm, các tín hiệu từ 0,97 ppm đến 3,94 ppm là các proton mạch ngoài. Kết quả phân tích được đưa ra trong bảng 3.7.



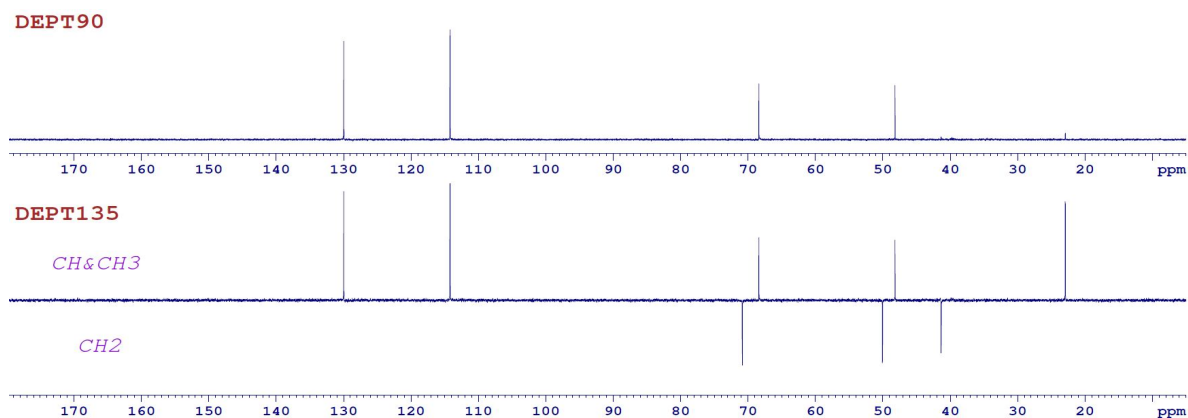
Hình 8: Phổ $^1\text{H-NMR}$ của sản phẩm

Phổ cộng hưởng từ $^{13}\text{C-NMR}$ (hình 9) của sản phẩm cho thấy phân tử của nó có 14 nguyên tử cacbon, trong đó có xuất hiện ba tín hiệu chập đôi lần lượt tại các vị trí có độ dịch chuyển $\delta_{\text{C}} = 22,95$ ppm ứng với hai nhóm methyl trong nhóm isopropyl; 114,22 ppm ứng với 2 nguyên tử các bon ở vị trí ortho và 130,00 ppm ứng với 2 nguyên tử các bon ở vị trí meta. Các tín hiệu chập đôi ($\text{C}_{2'}$, $\text{C}_{6'}$) và ($\text{C}_{3'}$, $\text{C}_{5'}$) chứng tỏ vòng benzen có hai nhóm thế ở vị trí 1,4, đồng thời sự có mặt của nhóm $\text{C}=\text{O}$ được khẳng định bởi tín hiệu có độ dịch chuyển $\delta_{\text{C}} = 172,69$ ppm. Ngoài ra, các tín hiệu xuất hiện trong vùng có độ dịch chuyển hóa học từ $\delta_{\text{C}} = 41,38$ ppm đến $\delta_{\text{C}} = 70,68$ ppm chứng tỏ rằng trong phân tử atenolol có các nhóm CH và CH_2 gắn với các dị tố oxi và nito. Kết quả phân tích được đưa ra trong bảng 6.



Hình 9: Phổ ^{13}C -NMR của sản phẩm

Các quy kết bằng các phổ ^1H -NMR và ^{13}C -NMR ở trên càng được củng cố thêm trong phổ DEPT (hình 10), trên phổ DEPT 14 nguyên tử các bon được phân bố như sau: 6 nhóm CH bao gồm hai cặp chập vào nhau có $\delta_{\text{C}} = 114,22$ ppm và $130,00$ ppm – là một đặc trưng rất dễ nhận của vòng benzen thế 1,4; hai tín hiệu CH còn lại có $\delta_{\text{C}} = 48,21$ ppm và $\delta_{\text{C}} = 68,41$ ppm của C_9 và C_7 ; 3 nhóm CH_2 có $\delta_{\text{C}} = 41,38$ ppm; $50,06$ ppm và $70,86$ ppm lần lượt là của C_{10} , C_8 và C_6 . Ba nguyên tử cacbon bậc 4 xuất hiện tại $\delta_{\text{C}} = 128,40$ ppm; $157,34$ ppm và $172,69$ ppm lần lượt là các nguyên tử C_4 , C_8 và C_1 , hoàn toàn phù hợp với cấu trúc của atenolol.

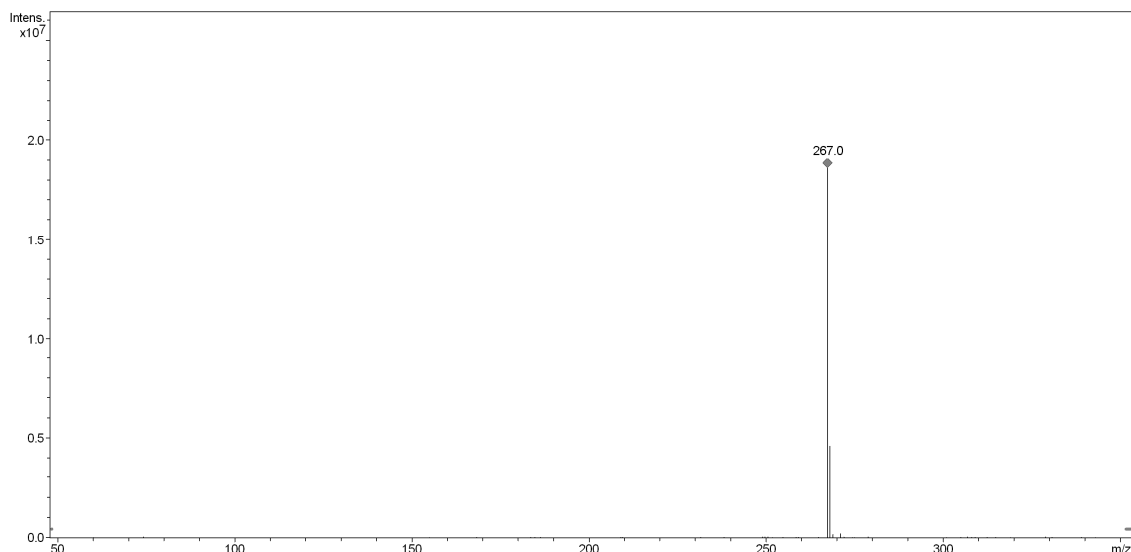


Hình 10: Phổ DEPT của sản phẩm

Bảng 6. Kết quả phân tích phổ NMR của atenolol

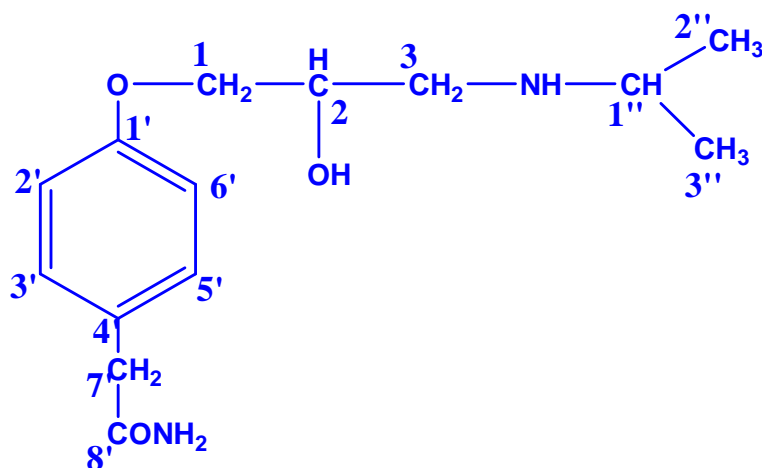
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$				Phổ $^1\text{H-NMR}$			
C(vị trí)	σ (ppm)	C(vị trí)	σ (ppm)	H(vị trí)	σ (ppm, Hz)	H(vị trí)	σ (ppm, Hz)
2'',3''	22,8	1	70,80	3H _{2''} , d	0,97, J=2	H _{1b,m}	3,90
7'	41,32	2',6'	114,18	3H _{3''} , d	0,98, J=2	H (OH)	4,9
1''	48,18	4'	128,37	H _{3a} , m	2,54	H _{8a} (NH ₂)	6,80
3	49,97	3',5'	129,95	(H _{3b} ,H _{1''}),m	2,67	H ₂ ,H _{6'}	6,86(J ₁ = 8,5; J ₂ = 3; J ₃ =2)
2	68,32	1'	157,29	2H _{7'} ,s	3,28	H ₃ ,H _{5'}	7,14 (J ₁ = 8,5; J ₂ = 3)
		8'	172,57	H ₂ ,H _{1a} ,m	3,83	H _{8b} (NH ₂)	7,36

Phổ khối lượng MS của sản phẩm: Các dữ kiện trên phổ khối cho biết sản phẩm có một pic ion phân tử $(\text{M-H})^+ = 267$, tức là số khối của phân tử là 266, vì số khối M là chẵn nên trong phân tử phải có 2 nguyên tử N. Các dữ kiện này hoàn toàn phù hợp với atenolol.



Hình 11: Phổ khối (MS) của sản phẩm

Bằng các phương pháp vật lý và hoá lý, chúng tôi có thể kết luận sản phẩm cuối cùng của phản ứng thu được là atenolol có công thức cấu tạo như sau:



3.2. Kết quả nghiên cứu hoạt tính của atenolol

3.2.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp của atenolol

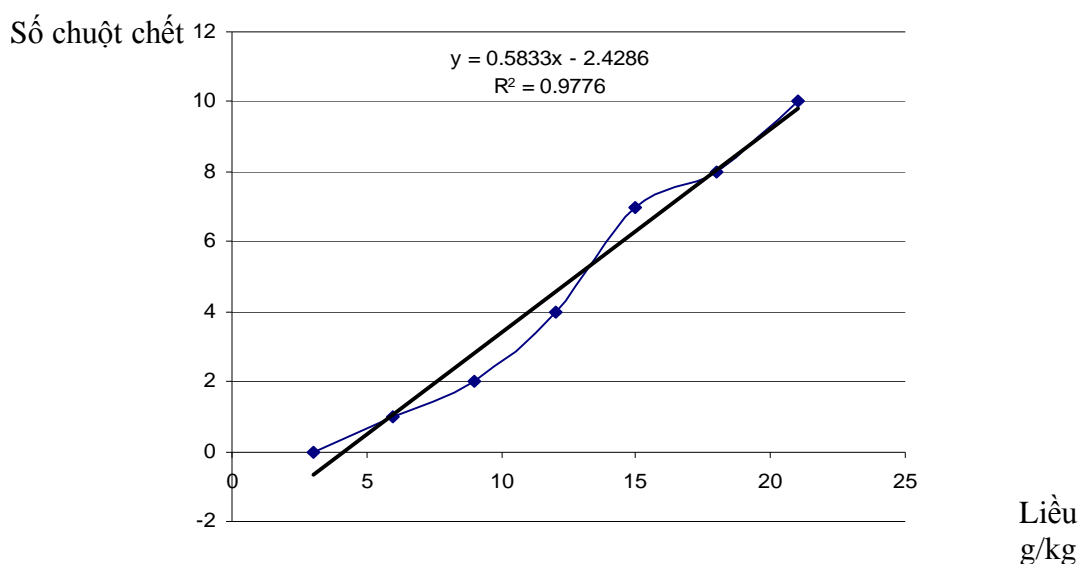
Sau khi uống thuốc thử, ở những lô dùng thuốc liều thấp dưới 6g/kg, chuột không có hiện tượng gì đặc biệt: ăn uống, vận động bình thường, chuột không bị khó thở, đi ngoài phân khô. Ở những lô chuột uống thuốc thử liều cao, chuột giảm vận động, có khi co rúm người lại, có hiện tượng khó thở, tai và đuôi tím tái. Từ liều 6g/kg

trở lên có chuột chết trong vòng 72 giờ sau khi uống thuốc thử lần đầu. Số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ được ghi lại ở bảng 7:

Bảng 7: Số lượng chuột chết trong vòng 72 giờ

STT	Liều dùng (g/kg)	n	Số chuột chết (con)	Tỉ lệ %
1	3	10	0	0
2	6	10	1	10
3	9	10	2	20
4	12	10	4	40
5	15	10	7	70
6	18	10	8	80
7	21	10	10	100

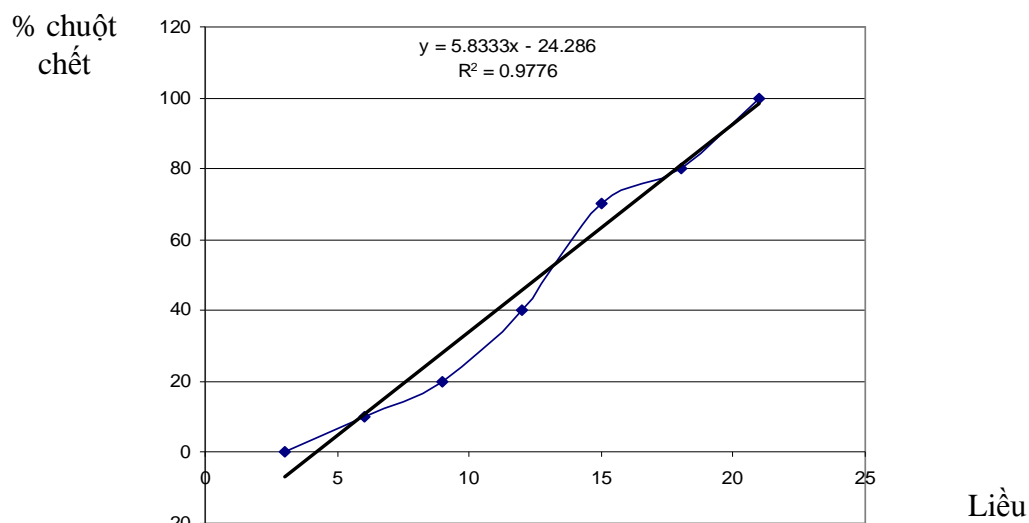
Từ kết quả bảng trên ta xây dựng được đồ thị về mối liên quan giữa liều dùng và số chuột chết trên hình 11.



Hình 11. Biểu đồ về mối tương quan giữa liều dùng và số chuột chết

Với $R^2 = 0,9776$ đã cho thấy hai đại lượng này có mối tương quan rất chặt, do đó ta có thể sử dụng phương trình $y = 0,5833x - 2,4286$ để tính được $LD_{50} = 12,7g/kg$.

Tính độ lệch chuẩn: Biểu diễn mối liên quan này qua tỉ lệ % (hình 12), tính LD_{16} và LD_{84} (tức là liều dùng làm chết lần lượt 16% và 84%)



Hình 12. Biểu đồ về mối tương quan giữa liều dùng và số chuột chết theo tỉ lệ %

Từ phương trình trên hình 2 ta tính được: $LD_{16} = 6,9g/kg$; $LD_{84} = 18,5g/kg$; với hệ số $k = 0,66$, $d = 3$. Như vậy, độ lệch chuẩn = 1,52.

Kết luận

LD_{50} của thuốc thử atenolol là: $12,7 \pm 1,52g/kg$

3.2.2. Kết quả nghiên cứu hoạt tính hạ huyết áp

3.2.2.1. Kết quả đo huyết áp và nhịp tim trước và sau khi thắt động mạch thận (bảng 8)

Bảng 8. Giá trị huyết áp và nhịp tim trước và sau khi thắt động mạch thận

Các lô nghiên cứu	N	Trước khi thắt (1)			Sau khi thắt (2)		
		Huyết áp (mmHg)		Nhịp tim (nhịp/phút)	Huyết áp (mmHg)		Nhịp tim (nhịp/phút)
		Tâm thu	Tâm		Tâm thu	Tâm	

			trương			trương		
Lô 1	15	107,7±11,8	60,8±8,5	384,4±9,3	146,7±11,2	89,5±6,4	400,9±12,6	
Lô 2	15	109,3±14,2	63,9±12,8	385,8±16,8	148,3±16,6	90,3±11,8	401,9±14,5	
Lô 3	15	111,0±13,9	62,9±13,6	382,2±16,8	150,1±13,7	92,1±11,9	406,6±14,9	
Lô 4	15	108,3±13,3	64,0±12,8	390,2±11,7	148,7±9,6	90,7±6,0	410,1±15,5	
Lô 5	15	112,5±15,2	63,1±12,1	389,1±18,9	150,7±12,3	91,9±12,2	402,9±13,2	
P		(1),(2) < 0,05						

Kết quả cho thấy các giá trị huyết áp và nhịp tim sau khi thắt động mạch thận cao hơn rõ rệt so với trước khi thắt ($p < 0,05$), điều này chứng tỏ đã xây dựng thành công mô hình tăng huyết áp thực nghiệm bằng cách thắt động mạch thận. Theo lý thuyết, khi giảm máu tới thận thì thận tăng tiết renin, chất có tác dụng chuyển angiotensinogen thành angiotensin I, sau đó angiotensin I chuyển thành angiotensin II (dưới tác dụng của emzym chuyển dạng ACE: angiotensin converting enzyme) làm co mạch dẫn đến tăng huyết áp nhưng lại làm giảm nhịp tim [42, 43]. Tuy nhiên, thực tế trong nghiên cứu của chúng tôi, sau khi thắt động mạch thận, huyết áp tăng cao và kèm theo rối loạn tăng nhịp tim.

3.2.2.2. Kết quả nghiên cứu tác dụng hạ huyết áp

* Đối với huyết áp tâm thu (bảng 9)

Bảng 9. Kết quả đo huyết áp tâm thu của các lô sau 3 ngày uống thuốc

Lô	N	BP sau thắt động mạch	Ngày thứ 1 (mmHg)		Ngày thứ 2 (mmHg)		Ngày thứ 3 (mmHg)	
			3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ
1	15	146,7±11,2	150,2±10,4 (1)		151,0±10,2 (2)		153,6±8,7 (3)	

		(a)						
P			(1),(2),(3) với (a) >0,05					
2	15	148,3±16, ,6 (b)	144,7±16, 1	143,8±16, 5	140,0±12, 5	140,3±12, 8	137,6±13, 6	137,2±13, 0
P			(1,3),(1,7),(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (b) >0,05					
3	15	150,1±13, ,7 (c)	141,8±10, 1	141,8±10, 3	129,2±9,7	129,9±10, 2	128,3±7,1	126,0±5,9
P			(1,3),(1,7) với (c) >0,05		(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (c) <0,05 (2,3),(2,7),(3,3),(3,7) >0,05			
4	15	148,7±9, 6 (d)	142,3±8,7	142,4±8,9	123,8±11, 9	121,5±10, 2	122,1±10, 9	118,9±9,7
P			(1,3),(1,7) với (d) >0,05		(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (d) <0,05 (2,3),(2,7),(3,3),(3,7) >0,05			
5	15	150,7±12, ,3 (e)	125,8±9,6	126,9±10, 9	121,3±9,7	122,6±12, 3	118,6±10, 2	120,2±8,2
P			Tất cả các ngày so với (e) <0,05					

Ghi chú. BP: Blood Pressure – Huyết áp; (1,3): ngày thứ 1 vào lúc 3 giờ

- Đối với huyết áp tâm trương (bảng 10)

Bảng 10. Kết quả đo huyết áp tâm trương của các lô sau 3 ngày uống thuốc

Lô	N	BP sau thất động mạch	Ngày thứ 1 (mmHg)		Ngày thứ 2 (mmHg)		Ngày thứ 3 (mmHg)	
			3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ
1	15	89,5±6,4 (a)	91,0±5,4 (1)		91,1±4,5 (2)		93,6±4,0 (3)	
P			(1),(2),(3) với (a) >0,05					
2	15	93,8±11,8 (b)	89,0±11,2	87,1±10,5	86,0±10,3	84,9±9,2	83,9±9,1	82,7±9,3
P			(1,3),(1,7),(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (b) >0,05					
3	15	92,1±11,9 (c)	97,3±8,6	86,3±8,4	73,9±4,8	75,8±4,9	73,5±5,9	73,8±7,4
P			(1,3),(1,7) với (c) >0,05		(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (c) <0,05 (2,3),(2,7),(3,3),(3,7) >0,05			
4	15	90,7±6,0 (d)	87,6±6,1	86,5±8,0	76,0±9,8	75,7±10,6	75,6±9,1	77,9±7,2
P			(1,3),(1,7) với (d) >0,05		(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (d) <0,05 (2,3),(2,7),(3,3),(3,7) >0,05			
5	15	91,9±12,2 (e)	78,8±8,7	79,9±8,9	76,3±7,7	76,0±9,1	73,7±9,2	74,9±8,2
P			Tất cả các ngày so với (e) <0,05					

* Đối với nhịp tim (bảng 11)

Bảng 11. Kết quả đo nhịp tim của các lô sau 3 ngày uống thuốc

Lô	N	BP sau thất động mạch	Ngày thứ 1 (nhịp/phút)		Ngày thứ 2 (nhịp/phút)		Ngày thứ 3 (nhịp/phút)	
			3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ
1	15	400,9±12 ,6 (a)	400,9±11,8 (1)		405,5±8,1 (2)		410,1±8,9 (3)	
P			(1),(2),(3) với (a) >0,05					
2	15	401,9±14 ,5 (b)	399,1±14, 7	398,3±13, 8	397,8±12, 2	396,5±12, 5	394,5±10, 4	394,6±12, 9
P			(1,3),(1,7),(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (b) >0,05					
3	15	406,6±14 ,9 (c)	400,1±11, 2	397,6±9,9	385,5±8,2	387,0±7,1	383,3±9,8	382,0±9,6
P			(1,3),(1,7) với (c) >0,05		(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (c) <0,05 (2,3),(2,7),(3,3),(3,7) >0,05			
4	15	410,1±15 ,5 (d)	404,3±14, 9	403,6±13, 9	392,8±12, 2	393,1±11, 1	391,3±9,3	393,8±10, 7
P			(1,3),(1,7) với (d) >0,05		(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (d) <0,05 (2,3),(2,7),(3,3),(3,7) >0,05			

5	15	402,9±13 ,2 (e)	388,7±8,7	390,3±10, 5	384,9±8,3	386,7±9,1	380,3±11, 2	382,1±11, 6
P			Tất cả các ngày so với (e) <0,05					

Từ các bảng kết quả trên cho thấy, ở lô đối chứng âm, các chỉ số về huyết áp và nhịp tim hầu như không thay đổi so với sau khi thắt động mạch ($p>0,05$). ở các lô thí nghiệm (từ lô 3 – lô 4) các chỉ số có xu hướng giảm dần trong 3 ngày uống thuốc thử ở 3 liều tương ứng (56mg/kg, 84mg/kg và 112mg/kg). Tuy nhiên:

Ở lô 2, các chỉ số về huyết áp và nhịp tim có giảm nhưng chưa thấy có sự giảm khác biệt so với giá trị sau thắt động mạch ($P>0,05$).

Ở lô 3 và 4, các chỉ số về huyết áp và nhịp tim cũng đều giảm so với các giá trị đó sau khi thắt động mạch, đặc biệt giảm rõ rệt sau 3 giờ uống thuốc của ngày thứ 2 ($P<0,05$). Chưa thấy có sự khác biệt về tác dụng hạ huyết áp của hai lô 3 và lô 4.

So sánh kết quả của các lô thí nghiệm với lô chuột uống thuốc atenolol (thuốc bán trên thị trường). Lô này được coi như lô đối chứng dương vì atenolol là một dược phẩm thường được kê đơn cho bệnh nhân cao huyết áp, bệnh mạch vành, làm chậm và điều hoà nhịp tim (thuốc nhập ngoại). Kết quả cho thấy tác dụng hạ huyết áp rõ rệt của thuốc atenolol này, làm hạ huyết áp ngay sau 3 giờ uống thuốc của ngày thứ nhất ($P<0,05$). Kết quả thu được cho thấy dược chất atenolol tổng hợp cũng có tác dụng làm giảm huyết áp và điều hoà nhịp tim nhưng có tác dụng chậm hơn so với thuốc atenolol nhập ngoại, theo chúng tôi điều này cũng có thể do các chỉ số sinh khả dụng của chúng là khác nhau. Mặc dù vậy, về hiệu quả hạ huyết áp và điều hoà nhịp tim của hai loại này là chưa thấy có sự khác biệt.

* Khi so sánh các giá trị huyết áp và nhịp tim ở 3 ngày uống thuốc với các giá trị ban đầu (trước khi thắt động mạch) ta có các bảng kết quả sau:

Bảng 12. Giá trị huyết áp tâm thu sau 3 ngày uống thuốc so với trước thất động mạch

Lô	N	BP trước thất động mạch	Ngày thứ 1 (mmHg)		Ngày thứ 2 (mmHg)		Ngày thứ 3 (mmHg)	
			3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ
2	15	139,3±14,2 (a)	144,7±16,1	143,8±16,5	140,0±12,5	140,3±12,8	137,6±13,6	137,2±13,0
P			(1,3),(1,7),(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (a) <0,05					
3	15	111,0±13,9 (b)	141,8±10,1	141,8±10,3	129,2±9,7	129,9±10,2	128,3±7,1	126,0±5,9
P			(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (b) <0,05					
4	15	108,3±13,3 (c)	142,3±8,7	142,4±8,9	123,8±11,9	121,5±10,2	122,1±10,9	118,9±9,7
P			(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (c) <0,05					
5	15	112,5±15,2 (d)	125,8±9,6	126,9±10,9	121,3±9,7	122,6±12,3	118,6±10,2	120,2±8,2
P			(1,3),(1,7) với (d) <0,05			(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (d) >0,05		

Bảng 13. Giá trị huyết áp tâm trương sau 3 ngày uống thuốc so với trước thắt động mạch

Lô	N	BP trước thắt động mạch	Ngày thứ 1 (mmHg)		Ngày thứ 2 (mmHg)		Ngày thứ 3 (mmHg)	
			3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ
2	15	63,9±12,8 (a)	89,0±11,2	87,1±10,5	86,0±10,3	84,9±9,2	83,9±9,1	82,7±9,3
P			(1,3),(1,7),(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (a) <0,05					
3	15	62,9±13,6 (b)	97,3±8,6	86,3±8,4	73,9±4,8	75,8±4,9	73,5±5,9	73,8±7,4
P			(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (b) <0,05					
4	15	64,0±12,8 (c)	87,6±6,1	86,5±8,0	76,0±9,8	75,7±10,6	75,6±9,1	77,9±7,2
P			(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (c) <0,05					
5	15	63,1±12,1 (d)	78,8±8,7	79,9±8,9	76,3±7,7	76,0±9,1	73,7±9,2	74,9±8,2
P			Tất cả các ngày so với (d) <0,05					

Bảng 14. Kết quả đo nhịp tim sau 3 ngày uống thuốc so với trước thắt động mạch

Lô	N	BP trước	Ngày thứ 1 (nhịp/phút)	Ngày thứ 2	Ngày thứ 3 (nhịp/phút)
----	---	----------	------------------------	------------	------------------------

		thắt động mạch			(nhịp/phút)			
			3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ	3 giờ	7 giờ
2	15	385,8±16, ,8 (a)	399,1±14, 7	398,3±13, 8	397,8±12, 2	396,5±12, 5	394,5±10, 4	394,6±12, 9
P			(1,3),(1,7) với (a) <0,05 (a) >0,05		(2,3) <0,05		(2,7),(3,3),(3,7) với	
3	15	382,2±16, ,8 (b)	400,1±11, 2	397,6±9,9	385,5±8,2	387,0±7,1	383,3±9,8	382,0±9,6
P			(1,3),(1,7) với (b) <0,05		(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (b) >0,05			
4	15	390,2±11, ,7 (c)	404,3±14, 9	403,6±13, 9	392,8±12, 2	393,1±11, 1	391,3±9,3	393,8±10, 7
P			(1,3),(1,7) với (c) <0,05		(2,3),(2,7),(3,3),(3,7) với (c) >0,05			
5	15	389,1±18, ,9 (d)	388,7±8,7	390,3±10, 5	384,9±8,3	386,7±9,1	380,3±11, 2	382,1±11, 6
P			Tất cả các ngày so với (d) >0,05					

Kết quả bảng 7 cho thấy hiệu quả tác dụng hạ huyết áp tâm thu ở các lô thí nghiệm kém hơn lô đối chứng dương vì khi so sánh giá trị huyết áp tâm thu trung bình ở các lô thí nghiệm sau 3 ngày uống thuốc với giá trị này trước khi thắt động mạch là

vẫn còn cao hơn một cách có ý nghĩa ($P < 0,05$). Còn ở lô đối chứng dương, sau 3 giờ ngày thứ 2 uống thuốc, giá trị huyết áp tâm thu gần như bằng với giá trị ban đầu trước khi thất ($p > 0,05$). Tuy vậy, hiệu quả này đối với huyết áp tâm trương (bảng 10) lại không rõ rệt vì ngay cả lô đối chứng dương cũng còn có trị số huyết áp tâm trương trung bình cao hơn trước khi thất một cách có ý nghĩa ($P < 0,05$).

Kết quả bảng 12 lại cho thấy tác dụng điều hoà nhịp tim, làm giảm nhịp tim của dược chất atenolol tổng hợp phát huy tác dụng ngay sau 7 giờ ngày thứ hai uống thuốc ở liều 56mg/kg trọng lượng (lô 2) ($P > 0,05$), mặc dù tác dụng đối với huyết áp ở lô 2 này là chưa rõ rệt (bảng 5 và 6). ở lô 3 và lô 4 có tác dụng rõ rệt sau 3 giờ ngày thứ 2 uống thuốc ($P > 0,05$). Còn ở lô đối chứng dương thì hiệu quả thể hiện rõ rệt ngay ngày đầu uống thuốc.

3.2.2.3 Kết luận

- Dược chất atenolol tổng hợp có tác dụng hạ huyết áp, điều hoà và làm giảm nhịp tim.
- Tác dụng hạ huyết áp, điều hoà và làm giảm nhịp tim rõ rệt ở liều 84mg/kg sau khoảng 3 giờ ngày thứ 2 uống thuốc.
- Dược chất atenolol tổng hợp có tác dụng chậm hơn so với thuốc atenolol nhập ngoại,

KẾT LUẬN

1. Từ phenol, bằng con đường hóa học, đã đưa ra qui trình tổng hợp khả thi atenolol với hiệu suất tổng 32%.
2. Đã nghiên cứu độc tính cấp (LD_{50}) của atenolol và nghiên cứu hoạt tính hạ huyết áp và giảm nhịp tim của chất này trên mô hình chuột cống trắng đã gây tăng huyết áp bằng phương pháp thắt động mạch thận, so sánh với thuốc chuẩn atenolol đang lưu hành ngoài thị trường. Kết quả cho thấy atenolol tổng hợp có $LD_{50} = 12,7 \pm 1,52$ g/kg thể trọng và hiệu quả hạ huyết áp và giảm nhịp tim tương đương với thuốc atenolol nhập ngoại nhưng thời gian phát huy tác dụng chậm hơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Phan Quốc Đống (2003). Vài nhóm thuốc điều trị cao huyết áp. *Thuốc và sức khỏe* số 224 trang 7-8.
2. Thạch Nguyễn (2007): *Một số vấn đề cập nhật trong chẩn đoán và điều trị bệnh tim mạch*. Nhà xuất bản y học 2007, trang 8.
3. Nguyễn Xuân Phách, Nguyễn Thế Minh, Trần Thanh Lâm (1995). *Toán Thống kê và tin học ứng dụng trong sinh y dược*. Nhà Xuất bản Quân đội Nhân dân
4. Nguyễn Đình Triệu (2007), *Các phương pháp phổ trong hoá học hữu cơ và hoá sinh*, Nhà xuất bản Đại học quốc gia Hà Nội, Hà Nội.
5. Nguyễn Minh Tuyển, Phạm Văn Thiêm (2000). *Kỹ thuật hệ thống công nghệ Hóa học*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
6. Lưu Văn Chính (2009): *Đề tài “Nghiên cứu tổng hợp atenolol trong điều trị bệnh huyết áp và tim mạch”*. Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tiếng Anh

7. Alan Mitchell (1983). Process for producing *p*-hydroxyphenylacetic acid. *Patent US 4393235*.
8. S.H. Bevinakatti (1992). Lipase catalysis in organic solvents. Application to the synthesis of (R)- and (S)-atenolol. *Journal of Organic Chemistry* 22, 57, 6003-6005
9. Graham N. Mott (1991). Preparation of Aromatic Acetamides from Arylmethyl ketones. *Patent US 5041657*.
10. K. Kitaori; Y. Furukawa; H. Yoshimoto and J. Otera (1999). CsF in Organic Synthesis. Regioselective Nucleophilic Reactions of Phenols with Oxiranes Leading to Enantiopure β -Blockers. *Tetrahedron* 55, 14381 – 14390
11. The Merck Index 13th edition 2001 Merck & Co., Inc.

12. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons 3e edition (*Pharmaceutical Press*, 2005).
13. Arnold C. Ott., Leonard A., Mattano and Gerald H. Coleman (1946). Preparation of hydroxyphenyl alkanolic by the Willgerodt reaction. *J. Am. Chem. Soc.* Vol. 68, pp. 2633-2634.
14. D. Subhas Bose and A. Venkat Narsaiah (2005). An Efficient Asymmetric Synthesis of (S)-Atenolol: Using Hydrolytic Kinetic Resolution. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 13, 627 – 630.
15. M. Degueil-Castaing ; B. De Jeso; S. Drouillard and B. Maillard (1987). Enzymatic reactions in organic synthesis: 2- ester interchange of vinyl esters. *Tetrahedron Letters* Vol. 28 (9), 953-954.
16. Rajyalakshmi G, Shireesha B, Rama Narsimha Reddy A, Achaiah G and Raghu Ram Rao A (January 2009). A modified asymmetric synthesis of (s)-atenolol: An enzymatic Resolution. *Journal of Pharmacy Research* Vol.2.Issue 1.
17. Jonathan Hutton (1981). Process for the manufacture of *p*-hydroxybenzyl cyanide. *US patent* 4,317,781.
18. Joseph Akisanya, Adrian W. Parkins and Jonathan W. Steed (1988). A synthesis of atenolol using a nitrile hydration catalyst. *Organic Process Research and Development*, pp. 274 – 276.
19. Akisanya, J.; et al.; A synthesis of atenolol using a nitrile hydration catalyst. *Organic Process Research and Development* 1998, pp. 2, 4, 274
20. K. Nakajima (1980). Process for preparing 4-hydroxyphenylacetic acid. *Patent GB* 2078011A.
21. N. Kaniss and A. Bauer (1982). Method for the production of 4-hydroxyphenylacetic acid. *Patent US* 4329497

22. W. Spielman (1986). Process for the manufacture of p- hydroxyphenyl acetic acid. *Patent US 4590295*
23. Kitaori, K.; et al(1987).; A practical synthesis of optically active atenolol from chiral epichlorohydrin. *Chem. Pharm. Bull.*, 45, 2, 412
24. Kitaori, K.; et al (1998).; Convenient preparation of enantiopure atenolol by means of preferential crystallization. *Chem. Pharm. Bull.*, 46, 3, 505
25. Damle, S.V.; et al (1999).; One pot synthesis of (R)/(S)-atenolol and (R)/(S)-propranolol by employing polymer supported reagent. *Synth. Commun.*, 29, 10, 1639
26. Damle, S.V.; et al (2000).; Biotransformations with *Rhizopus arrhizus* and *Geotrichum candidum* for the preparation of (S)-atenolol and (S)-propranolol. *Bio. Org. Med. Chem.*; 8, 8, 2067
27. Damle, S.V.; et al (1999).; Chemoenzymatic synthesis of (R)- and (S)-atenolol and propranolol employing lipase catalyzed enantioselective esterification and hydrolysis. *Synth. Commun.*; 29, 22, 3855
28. J. M. Evans; C. S. Fake; T. C. Hamilton and A. E. Watts (1983) *J. Med. Chem.* 26, 1582 – 1589.
29. Saragai, N.; Takehira, Y.; Kitaori, K. (Daiso Co., Ltd.); Process for producing optically active atenolol and intermediate thereof. *EP 0435068*
30. United Kingdom Specification No. 1,476,073
31. Martin A. Schwartz, Michael Zoda, Baburao Vishnuvajjala, and Ismail Mami (1976). A Convenient Synthesis of *o*- and *p*-Hydroxy Substituted Phenylacetonitriles and Phenethylamines. *Journal of Organic Chemistry*, 41, 2502-2503
32. *UK Patent Application GB 2 212 801 A*. Preparation of an alkanolamine derivatives.

33. Reza Mehvar and Dion R. Brocks: Stereospecific Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Beta-Adrenergic Blockers in Humans, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 4 (2001) 185-200.
34. J L Montastruc, P Montastruc. Antihypertensive effects of intra-cisternal beta-blocking agents in dogs with acute neurogenic hypertension. *Arch Int Pharmacodyn Ther Feb 1979 (Vol. 237, Issue 2, Pages 275-81)*
35. T.W. Graham Solomons (1997), *Fundamentals of Organic Chemistry*, fifth Edition, John Wiley & Son. INC
36. P.Y. Bruice, *Organic Chemistry*, Prentice Hall; 4 edition (May 1, 2003)
37. Thomas Laue and Andreas Plagens (2005). *Named Organic Reactions*, 2nd Edition. John Wiley & Son, Ltd
38. Ewards (1980). Process for the manufacture of *p*-hydroxyphenylacetic acid. *Patent US 4198526*.
39. T. G. Solomons (1998). *Fundamentals of Organic Chemistry*. Fifth Edition, John Wiley & Son, Ltd
40. S. S. Jovanovic; D. D. Djokovic and D. S. Balic (1992). Phase-Transfer Catalysis in the alkylation Reaction of α -Naphthol with Epichlorohydrin. *Journal of Molecular Catalysis* 73, 9-16.
41. Jan Chlebicki , Larisa Yu. Shiman , Andrey K. Guskov , Mikhail G. Makarov , Valerij F. Shvets (1999). The kinetics and mechanism of the reaction between 1-chloro-2,3-epoxypropane and *p*-cresol in the presence of basic catalysts. *International Journal of Chemical Kinetics*, Vol.29(1), 73-79
42. Christian Schmitz, Michael Gothardt, et al (2000), Normal blood pressure and plasma renin activity in mice lacking the renin-binding protein, a cellular renin inhibitors. *The Journal of Biological Chemistry*, Vol.275, No.20, Issue of May 19, pp 15357-15362.

43. Martin Paul, Ali Poyan Mehr and Reinhold Kreutz (2006), Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol. Rev.* Vol.86, pp. 747-789.
44. Ashok Kumar; Ramkrishna A. Rane; Vaikyparambil K. Ravindran; Suneel Y. Dike (1997). Facile 1,2-Aryl Migration of 2-Halomethyl-2-(4'-Hydroxyphenyl) Ketals: A Novel Single Step Synthesis of 4-Hydroxyphenylacetic Acid and Its Derivatives. *Synthetic communication* 27(7), 1133 – 1141
45. Tatsuya Tono (1982). Process for preparing aryl acetic acid derivatives *Patent US* 4544766.
46. Osamu Yonemitsu and Shunji Naruto (1969). Photo-induced friedel-crafts reaction. *Tetrahedron Letters* 28, 2387 – 2389.
47. Clayden J. (2000). *Organic Chemistry* (Oxford).
48. J. S. Yadav; A. R. Reddy; A. V. Narsaiah and B. V. S. Reddy (2007). An Efficient Protocol for Regioselective ring opening of epoxides using samarium triflate: synthesis of Propranolol, atenolol and RO363. *Journal of Molecular Catalysis A; Chemical* 261, 207 – 212.
49. Landenburg, Folkers, and Major (1936). The synthesis of 3-hydroxy-2-(3)-benzofuranone and of 4-hydroxymandelic Acid. *J.Am.Chem.Soc.*, 58,1249-1257.
50. Shyne-Ming Jang, Tian-shy Shich (1994). *UK patent Application*, GB 2276167.
51. Amy Adams Peason, Thomas E.Gaffney, Thomas Walle and Philip J. Privitera(1989). A Stereoselective Central Hypotensive Action of Atenolol. *Department of Cellular and molecular Pharmacology and Experimental Therapeutics and Medicine, Medial University of South Carolina, Charleston, South Carolina.*
52. Day, M. D. and Roach, A.G.(1974): Cardiovascular effects of β -adrenoreceptor blocking agents after intracerebroventricular administration in conscious normotensivecats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1: 333-339.

53. Strickland, J. A., Thibodeaux, H. and Pmvrrsa, P. J.: Site and mechanism of the central hypotensive action of β -l-atenolol in spontaneously hypertensive rats. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 2: A362, 1988.
54. Daniell, H. B., Webb, J. G., Walle, T., Oatis, J. E. and Gaffney, T. E (1988): Inhibitors of prostaglandin synthesis reverse the effects of chronic β_1 -receptor blockade to attenuate adrenergic neurovascular transmission in dogs. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 12: 300-307.
55. Rahn, K. H., Hawlins, A., Kersting, F. and Planz, G (1974): Studies on the antihypertensive action of the optical isomers of propranolol in man. *Naunyn-Schmiedelberg's Arch. Pharmacol.* 286: 319-323.
56. Tackett, R. L., Webb, J. G. and Privitera, P. J (1985): Site and mechanism of the centrally mediated hypotensive action of propranolol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 235: 66-70.
57. Street, J. A., Hemsworth, B. A., Roach, A. G. and Day, M. D (1979): Tissue levels of several radiolabelled β_1 -adrenoceptor antagonists after intravenous administration in rats. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 237: 180-190.

PHỤ LỤC

PHỤ LỤC 1.1: PHỔ IR CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC

PHỤ LỤC 1.2: PHỔ ¹H-NMR CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC

PHỤ LỤC 1.3: PHỔ ¹³C-NMR CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC

PHỤ LỤC 1.5: PHỔ MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC

PHỤ LỤC 1.6: PHỔ LC-MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC (NHỎ GIỌT Ở 10-15⁰C)

PHỤ LỤC 1.7: PHỔ LC-MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC VỚI THỜI GIAN LƯU LÀ 3,1 PHÚT

PHỤ LỤC 1.8: PHỔ LC-MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC VỚI THỜI GIAN LƯU LÀ 4,7 PHÚT

PHỤ LỤC 1.9: PHỔ LC-MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC (NHỎ GIỌT Ở 20⁰C)

PHỤ LỤC 1.10: PHỔ LC-MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC (NHỎ GIỌT Ở 30⁰C)

PHỤ LỤC 1.11: PHỔ LC-MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC (NHỎ GIỌT Ở 50⁰C)

PHỤ LỤC 1.12: PHỔ LC-MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC (NHIỆT ĐỘ PHẢN ỨNG Ở 45⁰C)

PHỤ LỤC 1.13: PHỔ LC-MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC (NHIỆT ĐỘ PHẢN ỨNG Ở 60⁰C)

PHỤ LỤC 1.14: PHỔ LC-MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC (NHIỆT ĐỘ PHẢN ỨNG Ở 80⁰C)

PHỤ LỤC 1.15: PHỔ LC-MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYMANDELIC (NHIỆT ĐỘ PHẢN ỨNG Ở 100⁰C)

PHỤ LỤC 2.1: PHỔ IR CỦA AXIT *P*-HYDROXYPHENYLAXETIC

PHỤ LỤC 2.2: PHỔ ¹H-NMR CỦA AXIT *P*-HYDROXYPHENYLAXETIC

PHỤ LỤC 2.3: PHỔ ¹³C-NMR CỦA AXIT *P*-HYDROXYPHENYLAXETIC

PHỤ LỤC 2.4: PHỔ DEPT CỦA AXIT *P*-HYDROXYPHENYLAXETIC

PHỤ LỤC 2.5: PHỔ MS CỦA AXIT *P*-HYDROXYPHENYLAXETIC

PHỤ LỤC 3.1: PHỔ IR CỦA *P*-HYDROXYPHENYLAXETAMIT

PHỤ LỤC 3.2: PHỔ ¹H-NMR CỦA *P*-HYDROXYPHENYLAXETAMIT

PHỤ LỤC 3.3: PHỔ ¹³C-NMR CỦA *P*-HYDROXYPHENYLAXETAMIT

PHỤ LỤC 3.4: PHỔ DEPT CỦA *P*-HYDROXYPHENYLAXETAMIT

PHỤ LỤC 3.5: PHỔ MS CỦA *P*-HYDROXYPHENYLAXETAMIT

PHỤ LỤC 3.6: PHỔ LC-MS CỦA SẢN PHẨM KHI SỬ DỤNG KIỀM

PHỤ LỤC 3.7: PHỔ LC-MS CỦA SẢN PHẨM KHI SỬ DỤNG KIỀM VỚI THỜI GIAN LƯU LÀ 11,1 PHÚT

PHỤ LỤC 3.8: PHỔ LC-MS CỦA SẢN PHẨM KHI SỬ DỤNG KIỂM VỚI THỜI GIAN LƯU LÀ 12,6 PHÚT

PHỤ LỤC 3.9: PHỔ LC-MS CỦA SẢN PHẨM KHI SỬ DỤNG XÚC TÁC CHUYỂN PHA Ở 70⁰C

PHỤ LỤC 3.10: PHỔ LC-MS CỦA SẢN PHẨM KHI SỬ DỤNG XÚC TÁC CHUYỂN PHA Ở 80⁰C

PHỤ LỤC 3.11: PHỔ LC-MS CỦA SẢN PHẨM KHI SỬ DỤNG XÚC TÁC CHUYỂN PHA Ở 90⁰C

PHỤ LỤC 3.12: PHỔ LC-MS CỦA SẢN PHẨM KHI SỬ DỤNG XÚC TÁC CHUYỂN PHA Ở 100⁰C

PHỤ LỤC 3.13: PHỔ LC-MS CỦA SẢN PHẨM KHI SỬ DỤNG XÚC TÁC CHUYỂN PHA KHÔNG KHÔNG CHẾ NHIỆT ĐỘ

PHỤ LỤC 3.14: PHỔ LC-MS CỦA SẢN PHẨM KHI SỬ DỤNG HỖN HỢP KIỂM VÀ XÚC TÁC CHUYỂN PHA Ở 40⁰C

PHỤ LỤC 3.15: PHỔ LC-MS CỦA SẢN PHẨM KHI SỬ DỤNG HỖN HỢP KIỂM VÀ XÚC TÁC CHUYỂN PHA

PHỤ LỤC 4.1: PHỔ IR CỦA ATENOLOL

PHỤ LỤC 4.2: PHỔ ¹H-NMR CỦA ATENOLOL

PHỤ LỤC 4.3: PHỔ ¹³C-NMR CỦA ATENOLOL

PHỤ LỤC 4.4: PHỔ DEPT CỦA ATENOLOL

PHỤ LỤC 4.5: PHỔ MS CỦA ATENOLOL

PHỤ LỤC 4.6: PHỔ UV CỦA ATENOLOL