

## NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP MOLNUPIRAVIR TỪ CYTIDIN

*Nguyễn Văn Giang<sup>1</sup>, Trương Thị Kim Lương<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Minh Ngân<sup>1</sup>  
Nguyễn Thị Ngọc<sup>2</sup>, Đào Nguyệt Sương Huyền<sup>1</sup>, Nguyễn Đình Luyện<sup>1</sup>  
Nguyễn Văn Hải<sup>1</sup>, Phạm Thị Hiền<sup>3\*</sup>*

### Tóm tắt

**Mục tiêu:** Tổng hợp molnupiravir từ cytidin ở quy mô phòng thí nghiệm bằng phương pháp đơn giản, không sử dụng sắc ký cột để tinh chế. **Phương pháp nghiên cứu:** Tổng hợp molnupiravir từ nguyên liệu ban đầu cytidin thông qua 4 giai đoạn phản ứng: Acetonid hóa cytidin tạo chất C1; Acyl hóa C1 tạo C2; Hydroxylamin hóa C2 tạo C3; Cuối cùng thủy phân C3 tạo molnupiravir. Tinh chế sản phẩm được thực hiện bằng các kỹ thuật cơ bản: Chiết phân bố, kết tinh, kết tủa, lọc, rửa. Cấu trúc các chất được khẳng định bằng các phương pháp phân tích phổ IR, MS và NMR. **Kết quả:** Hiệu suất các giai đoạn tổng hợp thu được như sau: 96,0% chất C1 từ cytidin; 90,6% chất C2 từ C1; 59,0% chất C3 từ C2; 44,6% sản phẩm cuối molnupiravir từ C3. Hiệu suất toàn quy trình là 22,9%, trong đó đã sử dụng phương pháp tinh chế các chất không sử dụng sắc ký cột, đạt tinh khiết theo sắc ký lớp mỏng và nhiệt độ nóng chảy. Cấu trúc các chất được khẳng định đầy đủ bằng các dữ liệu phổ. **Kết luận:** Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tổng hợp thành công molnupiravir từ cytidin ở quy mô phòng thí nghiệm với quy trình tổng hợp đơn giản, an toàn và có tiềm năng áp dụng ở Việt Nam.

**Từ khóa:** COVID-19; Cytidin; Molnupiravir; SARS-CoV-2.

## SYNTHESIS OF MOLNUPIRAVIR FROM CYTIDIN

### Abstract

**Objectives:** To synthesize molnupiravir in laboratory conditions from cytidine with a simple method and no need for column chromatography for purification.

---

<sup>1</sup>Khoa Công nghệ Hóa dược, Trường Đại học Dược Hà Nội

<sup>2</sup>Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thái Nguyên

<sup>3</sup>Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia, Trường Đại học Dược Hà Nội

\*Tác giả liên hệ: Phạm Thị Hiền (phamhien@hup.edu.vn)

Ngày nhận bài: 11/9/2023

Ngày được chấp nhận đăng: 25/9/2023

<http://doi.org/10.56535/jmpm.v48.506>

**Methods:** Four different reactions were used to synthesize molnupiravir from cytidine as the starting material. Acetonidation of cytidine to produce C1; Acylation of C1 to produce C2; Hydroxylamination of C2 to produce C3; and hydrolysis of C3 to produce molnupiravir. The fundamental techniques for product refinement included distributing extraction, crystallization, precipitation, filtering, and washing. The structures of the compounds were confirmed by spectral analysis methods such as IR, MS, and NMR. **Results:** Yield 96.0% of C1 from cytidine, 90.6% of C2 from C1, 59.0% of C3 from C2, and 44.6% of the final molnupiravir from C3 were obtained based on the yield of the synthesis stages. The overall efficiency of the process was 22.9%, and it used non-column chromatography to isolate products that were pure according to thin-layer chromatography and melting point. Spectral data provided a complete characterization of the structure of compounds. **Conclusion:** Molnupiravir was successfully synthesized in the lab using an easy, safe, and potentially efficient method.

**Keywords:** COVID-19; Cytidine; Molnupiravir; SARS-CoV-2.

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Molnupiravir là thuốc kháng vi rút (SARS-CoV-2) do Merck và Ridgeback Biotherapeutics hợp tác phát triển, được Cơ quan Quản lý thuốc và sản phẩm chăm sóc sức khỏe Anh (MHRA) phê duyệt tháng 11/2021, sau đó được Bộ Y tế Việt Nam chấp nhận vào tháng 02/2022 để điều trị bệnh nhân COVID-19 từ nhẹ đến trung bình [1]. Việc phát hiện và phát triển ban đầu của molnupiravir bắt đầu vào năm 2013, nhằm mục đích tìm ra một loại thuốc kháng vi rút đường uống để điều trị bệnh nhiễm vi rút viêm não [1]. Các nhà nghiên cứu Đại học Emory sau đó

đã tổng hợp thành công molnupiravir từ uridin nhưng hiệu suất còn thấp và giá thành cao [2]. Các hướng đi sau này bắt đầu mở rộng phát triển việc tổng hợp qua cytidin, một nguyên liệu đầu vào giá thành thấp hơn và phổ biến hơn uridin [3, 4, 5, 6]. Với mục tiêu tìm ra quy trình tổng hợp molnupiravir đơn giản, an toàn và có thể ứng dụng ở quy mô lớn hơn từ cytidin có tiềm năng áp dụng ở Việt Nam, chúng tôi thực hiện nghiên cứu với mục tiêu: *Tổng hợp molnupiravir từ cytidin ở quy mô phòng thí nghiệm bằng phương pháp đơn giản, không sử dụng sắc ký cột để tinh chế.*

**ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP  
NGHIÊN CỨU****1. Đối tượng nghiên cứu**

\* *Hóa chất*: Được mua có nguồn gốc từ Đức, Trung Quốc và Việt Nam: Cytidin, 2,2-dimethoxypropan (DMP), aceton, acetonitril, acid acetic, acid sulfuric, acid formic, dung dịch amoniac 25%, anhydrid isobutyric ((*i*-PrCO)<sub>2</sub>O), dicloromethan (DCM), diethyl ether, ethanol, ethyl acetat (EtOAc), hydroxylamin sulfat, isopropanol (IPA), methanol (MeOH), natri clorid, natri hydrocarbonat, natri sulfat, *n*-butanol, nước cất, methyl *tert*-butyl ether (MBTE), tetrahydrofuran (THF), triethylamin (TEA), 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU), 4-dimethylaminopyridin (DMAP) đạt tiêu chuẩn tinh khiết tổng hợp (AR).

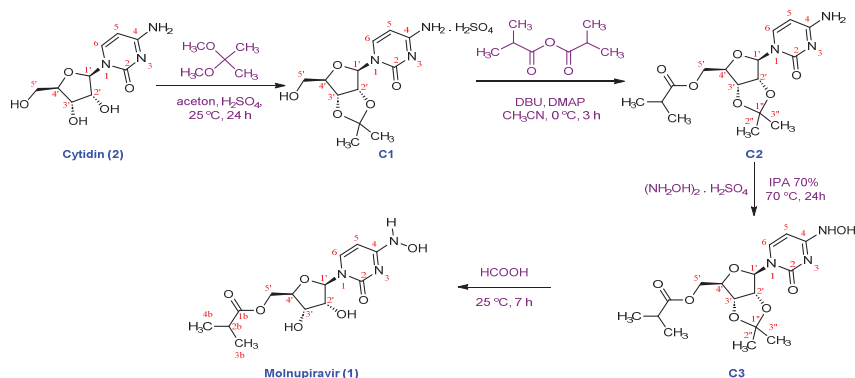
\* *Thiết bị dụng cụ sử dụng*: Bản mỏng silica gel 60 F<sub>254</sub>, bình cầu một cổ và hai loại dung tích (50mL, 100mL, 250mL), bình hút ẩm, bình nhỏ giọt dung tích 100mL, bình nón dung tích 100mL, bình sắc ký, cân kỹ thuật Sartorius BP 2001S, cốc có mở các loại dung tích (100mL, 250mL, 500mL), đèn hồng ngoại, đèn tử ngoại, máy cất quay chân không Buchi R210, máy đo nhiệt độ nóng chảy EZ-Melt, máy khuấy từ gia nhiệt IKA, nhiệt kế thủy ngân, pipet chia vạch (1mL, 2mL,

5mL, 10mL), sinh hàn hồi lưu, tủ sấy Memmert.

**2. Phương pháp nghiên cứu**

Molnupiravir được tổng hợp từ nguyên liệu cytidin thông qua 4 giai đoạn phản ứng (acetonid hóa, acyl hóa, hydroxylamin hóa và thủy phân), ba sản phẩm trung gian là C1, C2, C3 (Hình 1). Phản ứng được theo dõi bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (SKLM) thực hiện trên bản mỏng silica gel F<sub>254</sub> (Merck) với các hệ dung môi khai triển: *n*-butanol:acid acetic:nước (9,0:2,0:2,5); EtOAc (100%); quan sát sắc ký đồ dưới bước sóng 254nm của đèn tử ngoại.

Độ tinh khiết được đánh giá sơ bộ bằng khoảng nhiệt độ nóng chảy ( $t_{nc}^{\circ}$ ,  $\Delta t$ ) đo trên máy EZ-Melt (Mỹ). Cấu trúc của sản phẩm được xác định bằng các phương pháp phổ: Khối lượng (MS), hồng ngoại (IR) và cộng hưởng từ hạt nhân (<sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR). Phổ ESI-MS được ghi trên máy 920-MS TQ-FT (Agilent Technologies). Phổ IR được ghi trên máy Shimadzu trong vùng 4000 - 400cm<sup>-1</sup>. Phổ NMR được ghi trên máy Bruker, dung môi DMSO-*d*<sub>6</sub>. Các phổ được ghi tại Khoa Hóa học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội và Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.



Hình 1. Sơ đồ tổng hợp molnupiravir từ cytidin qua 4 giai đoạn.

### 3. Đạo đức nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện với sự đồng thuận và tự nguyện của các tác giả. Việc công bố trên tạp chí được sự nhất trí từ các tác giả có tên trên bài báo.

## KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Tổng hợp muối 4-amino-1-((3aR,4R,6R,6aR)-6-(hydroxymethyl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)pyrimidin-2(1H)-on sulfat (C1)

Trong bình cầu một cổ 100mL, thêm 1,00g (4,12mmol) cytidin và 13mL aceton, thêm tiếp 2,6mL DMP. Hỗn hợp được trộn đều bằng máy khuấy từ, rồi nhỏ thêm từng giọt 0,55mL dung dịch H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đặc vào bình cầu. Duy trì khuấy trong 24 giờ ở nhiệt độ phòng thì thu được hỗn hợp màu đỏ nâu. Sau khi kết thúc, lọc thu tủa. Rửa với aceton 3 lần (mỗi lần 10mL), sau đó rửa tiếp với diethyl ether tới khi thu được chất rắn màu trắng, sấy khô dưới đèn hồng ngoại thu được C1 có khối lượng 1,50g, hiệu suất 96,0%;

$t_{nc}^{\circ}$  133,0 - 135,0°C;  $R_f = 0,56$  (*n*-butanol : acid acetic : nước = 9,0 : 2,0 : 2,5). ESI-MS ( $m/z$ ): 567,1 [2M-2H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>+H]<sup>+</sup> (CTPT: C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>.H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, M = 381,0). IR (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 3485 (N-H amin bậc 1); 3352 (O-H alcol); 2933 (C-H no); 1722 (C=O); 1674 (C=N vòng); 1119 và 1250 (C-O). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 9,49 (1H, s, NH<sub>a</sub>); 8,31 (1H, t,  $J = 3,6$  Hz, NH<sub>b</sub>); 8,13 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz, H-6); 6,08 (1H, d,  $J = 7,8$  Hz, H-5); 5,79 (1H, d,  $J = 2,4$  Hz, H-1'); 4,91 (1H, dd,  $J_1 = 6,0$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, H-2'); 4,75 (1H, dd,  $J_1 = 6,0$  Hz,  $J_2 = 2,4$  Hz, H-3'); 4,25 (1H, q,  $J = 4,2$  Hz, H-4'); 3,63 (1H, dd,  $J_1 = 12$  Hz,  $J_2 = 4,2$  Hz, H<sub>a</sub>-5'); 3,57 (1H, dd,  $J_1 = 11,4$  Hz,  $J_2 = 4,2$  Hz, H<sub>b</sub>-5'); 1,49 (3H, s, H-2''); 1,29 (3H, s, H-3''). <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),

$\delta$  (ppm): 159,24 (C-4); 146,31 (C-2); 112,63 (C-6); 93,22 (C-1"); 87,68 (C-5); 84,40 (C-1'); 80,47 (C-4'); 61,04 (C-2'); 52,88 (C-3'); 39,57 (C-5'); 26,89 (C-2"); 25,07 (C-3").

**2. Tổng hợp dẫn chất ((3aR,4R,6R,6aR)-6-(4-amino-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)-2,2-dimethyltetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methylsobutyrate (C2) từ C1**

Hòa tan 1,30g (3,41 mmol) C1 vào 13mL acetonitril trong bình cầu một cổ 100mL. Bổ sung 0,09g DMAP và 1,1mL (7,16 mmol) DBU, khuấy trộn đều hỗn hợp trong 10 phút tới khi tan hoàn toàn. Sau khi làm lạnh bình cầu xuống 0 - 5°C, nhỏ từ từ từng giọt anhydrid isobutyric (0,80mL). Duy trì khuấy trong khoảng 10 phút ở cùng nhiệt độ. Sau khi kết thúc, cất quay

loại dung môi đến cạn. Bổ sung 10mL DCM để hòa tan cặn, chuyển vào bình chiết. Tiến hành rửa pha dung môi DCM với dung dịch acid acetic 10% (10 mL/lần x 3 lần). Thêm từ từ từng giọt 10mL NaHCO<sub>3</sub> bão hòa, khuấy đều tới khi hết sủi bọt, thu lấy lớp DCM. Làm khan lớp DCM bằng Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> khan, cất quay loại dung môi thu được chất rắn màu trắng xốp có khối lượng 1,09g, hiệu suất 90,5%;  $R_f = 0,72$  (*n*-butanol:acid acetic:nước = 9,0:2,0:2,5). ESI-MS (*m/z*): 707,1 [2M+H]<sup>+</sup> (CTPT: C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>, M = 353,0).

Khảo sát ảnh hưởng của xúc tác base, nhiệt độ phản ứng và tỷ lệ mol anhydrid isobutyric: C1 đến hiệu suất phản ứng. Tiến hành các thí nghiệm với 1,30g C1, thu được kết quả trong bảng 1 và bảng 2.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của xúc tác base và nhiệt độ đến việc tạo thành sản phẩm C2.

STT	Nhiệt độ (± 2°C)	Xúc tác base	Hiệu suất (%)	Đặc điểm sắc ký lớp mỏng theo dõi phản ứng
1	25	DBU	85,0	Hầu như không có tạp
2	25	TEA	-	Xuất hiện đáng kể tạp, không tách sản phẩm
3	0	DBU	90,6	Hầu như không có tạp
4	0	TEA	-	Xuất hiện đáng kể tạp, không tách sản phẩm

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của tỷ lệ mol anhydrid isobutyric:C1 đến hiệu suất phản ứng tạo C2 sử dụng xúc tác base DBU.

STT	Tỷ lệ mol ( <i>i</i> -PrCO) <sub>2</sub> O:C1	Khối lượng sản phẩm C2 (g)	Hiệu suất (%)
1	1,1:1	0,78	64,8
2	1,4:1	1,09	90,5
3	1,7:1	1,06	88,0
4	2,0:1	0,96	79,7

### 3. Tổng hợp ((3aR,4R,6R,6aR)-6-(4-(hydroxyamino)-2-oxopyrimidin-1(2H-yl)-2,2-dimethyl-tetrahydrofuro[3,4-d][1,3]dioxol-4-yl)methyl sobutytrat (C3) từ C2

Trong bình cầu một cổ 100mL chứa 1g (2,71mmol) C2 và 1,33g hydroxylamin sulfat, thêm tiếp 10mL IPA 70%, gia nhiệt lên 60°C và khuấy đều để chất rắn tan hoàn toàn tạo dung dịch đồng nhất. Khuấy trộn hỗn hợp ở 78°C trong 24 giờ. Sau khi kết thúc, thêm vào 10mL ethanol làm đồng dung môi, cất cô dung môi thu được sản phẩm dạng dầu sệt có màu nâu vàng lẫn chất rắn màu trắng. Thêm vào 10mL EtOAc và 10mL dung dịch NaCl bão hòa, lắc đều 5 phút, đợi đến khi hai pha tách ra rồi chiết lấy lớp ethyl acetat. Rửa lớp ethyl acetat với nước (10 mL/lần x 3 lần), làm khan bằng Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> khan, lọc thu dịch rồi cất quay loại dung môi thu được chất rắn màu trắng. Thêm 1mL

acetonitril vào bình sản phẩm lắc đều phân tán chất rắn tạo thành hỗn dịch màu trắng đục, sau đó cho thêm tiếp 5mL nước cất, khuấy đều thấy xuất hiện kết tinh dưới đáy bình; để kết tinh sản phẩm trong 2 giờ, sau đó tiến hành lọc rửa rửa tinh thể bằng nước cất, sấy, thu được chất rắn màu trắng ánh hồng nhạt, có khối lượng 0,59g, hiệu suất 59,0%; t<sub>nc</sub> 152,0 - 154,0; R<sub>f</sub> = 0,88 (*n*-butanol : acid acetic : nước = 9,0 : 2,0 : 2,5), 0,69 (EtOAc). ESI-MS (*m/z*): 367,9 [M-H]<sup>-</sup> (CTPT: C<sub>16</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>7</sub>, M = 369,0). IR (KBr),  $\bar{\nu}$  (cm<sup>-1</sup>): 2980 (C-H no); 1703 (C=O); 1674 (C=N); 1074, 1159, 1194 và 1273 (C-O). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 10,05 (1H, s, OH); 9,62 (1H, d, *J* = 1,8 Hz, NH); 6,88 (1H, d, *J* = 8,4 Hz, H-6); 5,72 (1H, d, *J* = 2,4 Hz, H-1'); 5,57 (1H, dd, *J*<sub>1</sub> = 8,4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2,4 Hz, H-5); 4,95 (1H, dd, *J*<sub>1</sub> = 6,0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2,4 Hz, H-2'); 4,76 (1H, dd, *J*<sub>1</sub> = 6,6 Hz, *J*<sub>2</sub> =

4,2 Hz, H-3'); 4,24-4,14 (2H, m, H-5'); 80,56 (C-3'); 63,79 (C-5'); 39,5 (C-2"); 4,13-4,11 (H, m, H-4'); 2,56 (1H, sept, 33,04 (C-2"); 26,96 (C-3"); 25,16 (C- $J_1 = 7,2$  Hz, H-2"); 1,48 (3H, s, H-2"); 3"); 18,7 (C-4"). 1,29 (3H, s, H-3"); 1,10 (3H, s, H-3"); 1,09 (3H, s, H-4").  $^{13}\text{C-NMR}$  (150 MHz, DMSO- $d_6$ ),  $\delta$  (ppm): 175,87 (C-1"); 149,04 (C-2); 143,26 (C-4); 131,89 (C-6); 113,37 (C-1"); 98,66 (C-5); 91,22 (C-1'); 83,08 (C-2', C-4');

Khảo sát ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng đến hiệu suất phản ứng. Tiến hành các thí nghiệm với 1,00g C2, thay đổi nhiệt độ phản ứng thu được kết quả bảng 3.

**Bảng 3.** Ảnh hưởng của nhiệt độ tới việc hình thành sản phẩm C3.

STT	Nhiệt độ ( $\pm 2^\circ\text{C}$ )	Thời gian phản ứng (phút)	Hiệu suất (%)	Đặc điểm sắc ký lớp mỏng theo dõi phản ứng
1	60	30 giờ	48,2	Xuất hiện một phần tạp
2	70	24 giờ	59,0	Hầu như không có tạp
3	80	-	-	Xuất hiện đáng kể 2 vết tạp, không tách sản phẩm

#### 4. Tổng hợp molnupiravir từ C3

Trong bình cầu hai cổ 50mL, thêm 0,5g (1,36mmol) C3 và 5mL acid formic, khuấy đều dung dịch ở  $25^\circ\text{C}$  trong 7 giờ. Sau đó, nhỏ từ từ từng giọt  $\text{NH}_3$  đặc (20mL) ở nhiệt độ  $0 - 5^\circ\text{C}$  đến pH trung tính. Đưa dung dịch sang bình gạn, bổ sung 20mL THF, lắc trong 5 phút thu lớp dung môi THF. Rửa pha THF với 20mL dung dịch NaCl bão hòa. Làm khan pha hữu cơ bằng natri sulfat khan. Lọc lấy dịch, cô

dưới áp suất giảm loại dung môi thu được sản phẩm dạng dầu màu vàng nhạt. Thêm 5,0mL MTBE, xuất hiện chất rắn màu trắng bám quanh thành bình. Để kết tinh sản phẩm. Lọc, sấy thu được sản phẩm molnupiravir có màu trắng ngà, khối lượng 0,20g, hiệu suất 44,6%;  $t_{nc}^\circ$  154,0 -  $156,0^\circ\text{C}$ ;  $R_f = 0,78$  (*n*-butanol : acid acetic : nước = 9,0 : 2,0 : 2,5); 0,33 (EtOAc). ESI-MS ( $m/z$ ): 327,9 [ $\text{M-H}^-$ ] (CTPT:  $\text{C}_{13}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_7$ ,  $M = 329,3$ ); IR (KBr),  $\bar{\nu}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ): 3381

(N-H và OH); 2976, 2878 (C-H no); 1750 (C=O); 1639 (C=N); 1275, 1194 và 1125 (C-O). <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 10,01 (1H, s, -NH-OH); 9,49 (1H, d,  $J = 1,8$  Hz, NH); 6,82 (1H, d,  $J = 8,4$  Hz, H-6); 5,71 (1H, d,  $J = 6,0$  Hz, H-1'); 5,58 (1H, dd,  $J_1 = 8,4$  Hz,  $J_2 = 1,8$  Hz, H-5); 5,34 (1H, dd,  $J = 6,0$  Hz, OH tại C-2'); 5,21 (1H, d,  $J = 5,4$  Hz, OH tại C-3'); 4,21 (1H, dd,  $J_1 = 12,0$  Hz,  $J_2 = 3,0$  Hz, H-2'); 4,13 (1H, dd,  $J_1 = 12,0$  Hz,  $J_2 = 5,4$  Hz, H-3'); 4,00 (1H, q,  $J = 5,4$  Hz, H-4'); 3,94-3,89 (2H, m, H-5'); 2,57 (1H, sept,  $J = 7,2$  Hz, H-2''); 1,10 (6H, dd,  $J_1 = 6,6$  Hz,  $J_2 = 1,2$  Hz, H- 3'',4''). <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>),  $\delta$  (ppm): 175,95 (C-1''); 149,39 (C-2); 143,27 (C-4); 129,86 (C-6); 98,73 (C-5); 87,72 (C-1'); 80,68 (C-4'); 71,92 (C-2'); 69,91 (C-3'); 63,84 (C-5'); 39,50 (C-2''); 33,15 (C-3''); 18,75 (C-4'').

## BÀN LUẬN

### 1. Về phản ứng acetonid hóa cytidin tạo C1

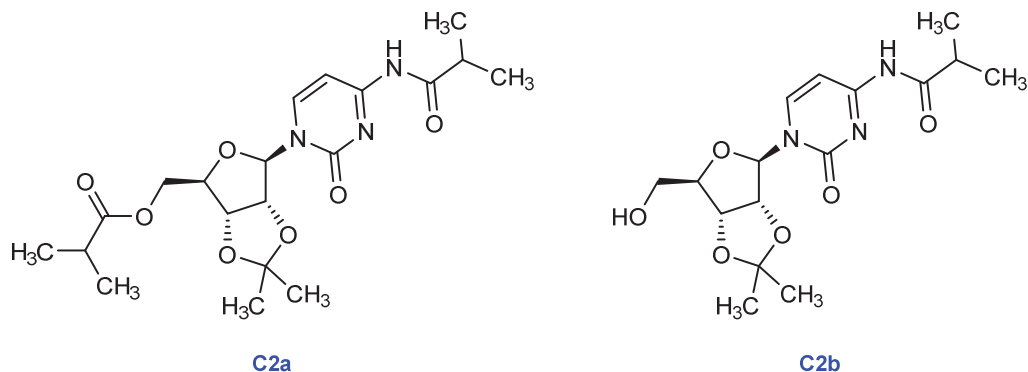
Đây là bước bảo vệ quan trọng vì quá trình cần thực hiện sau đó là phản ứng acyl hóa chọn lọc (gắn nhóm isobutyryl vào vị trí -OH tại C-5'). Tác nhân được lựa chọn để acetal hóa (acetonid hóa) ở đây là DMP trong aceton có mặt xúc tác acid đặc. Thực nghiệm chỉ ra, nếu sử dụng chỉ aceton

làm tác nhân để acetal hóa cytidin, thì không thu được sản phẩm mong muốn. Xúc tác H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đặc không chỉ có vai trò tạo môi trường acid cung cấp H<sup>+</sup>, ngưng tụ loại methanol, giúp đẩy nhanh phản ứng cetal hóa mà còn có vai trò tạo muối (với nitrogen trong cấu trúc), làm cho sản phẩm C1 kết tinh dưới dạng chất rắn, dễ dàng tách loại khi xử lý phản ứng. Lưu ý, chất C1 là muối amin dễ hút ẩm, có thể bị thủy phân thành nguyên liệu cytidin ban đầu, do đó, nếu chưa sử dụng ngay, cần bảo quản chất C1 ở điều kiện tránh ẩm và tránh ánh sáng.

### 2. Về phản ứng O-acyl hóa C1 tạo C2

Đây là phản ứng acyl hóa OH alcol, cần sự có mặt của base mạnh bậc 3 làm xúc tác như DBU và TEA. Các tác nhân acyl hóa có thể sử dụng trong phản ứng này là acid isobutyric, dẫn chất ester isobutyrat, isobutyryl halogenid hoặc anhydrid isobutyric. Trong nghiên cứu của chúng tôi, anhydrid isobutyric được lựa chọn với lý do là tác nhân này có khả năng acyl hóa mạnh, dễ thực hiện phản ứng và là một hóa chất thông dụng trong phòng thí nghiệm. Dẫn chất trung gian C1 tồn tại dưới dạng muối, dưới tác dụng của base mạnh như DBU, sẽ giải phóng gốc -NH<sub>2</sub>, có thể bị acyl hóa cùng với OH ở C-5', do đó, có thể tạo ra một số tạp acyl hóa không chọn lọc C2a, C2b (Hình 2).





**Hình 2.** Cấu trúc sản phẩm phụ có thể tạo ra trong quá trình tổng hợp chất C2.

Theo nghiên cứu của Gopalsamuthiram V và CS, sự có mặt của dẫn chất diacyl hóa C2a có thể tạo ra nhiều tạp cho phản ứng tiếp theo (tạo sản phẩm chính C3 với hiệu suất thấp), nên cần hạn chế việc tạo ra tạp C2a ở phản ứng hiện tại [5]. Do vậy, phản ứng này đã khảo sát các yếu tố ảnh hưởng tới tỷ lệ tạo thành sản phẩm C2 và tạp chất C2a, là xúc tác base và tỷ lệ mol anhydrid isobutyric:C1.

**Xúc tác base:** Dựa trên khảo sát với DBU và TEA, nhận thấy việc sử dụng DBU cho khả năng tạo ra sản phẩm chính với hiệu suất cao hơn và hình thành ít tạp chất C2a hơn so với TEA. Lý giải cho điều này có thể là: DBU có tính base lớn hơn so với TEA (pKa DBU-H lớn hơn pKa TEA-H), nên sẽ dễ dàng lấy  $H^+$  của alcol để tạo anion alkoxid  $RO^-$  với trung tâm ái nhân mạnh hơn cặp điện tử của nhóm  $-NH_2$ ,

giúp quá trình acyl hóa xảy ra chọn lọc vào OH của C-5' [7]. Khảo sát này đi kèm ảnh hưởng của nhiệt độ phản ứng. Kết quả thực nghiệm cho thấy phản ứng thu được ít tạp chất C2a khi thực hiện ở nhiệt độ duy trì ở  $0^\circ C$ , lý do có thể do sự giảm nhiệt độ làm giảm tốc độ phản ứng diacyl hóa, do đó, lượng tạp được tạo thành ít hơn (*Bảng 1*).

Tỷ lệ mol anhydrid isobutyric:C1, về lý thuyết, để tạo phẩm chính C2 chỉ cần tỷ lệ tác nhân:C1 = 1:1. Nếu tỷ lệ này càng lớn, khả năng tạo ra dẫn chất diacyl hóa càng cao, do đó, việc khống chế tỷ lệ để thu được sản phẩm chính cần được chú trọng. Chúng tôi đã chọn được tỷ lệ này là 1,4:1 giúp thu được sản phẩm hiệu suất cao nhất và có ít tạp nhất (*Bảng 2*).

Quá trình tinh chế cần phải loại bỏ được base DBU và một phần tác nhân anhydrid isobutyric còn dư. Do hai

chất đều là chất lỏng có độ nhớt cao, việc tồn dư trong sản phẩm sau phản ứng sẽ làm ảnh hưởng đến quá trình xử lý thu được sản phẩm chính [8]. DBU trong dung môi acetonitril có pKa lớn (24,34) trong khi nhóm chức amin trong sản phẩm C2 có pKa nhỏ (4,2) nên việc sử dụng một acid nhẹ có thể dễ dàng tạo muối với DBU, muối này bị loại đi khi chiết tách trong hệ hai pha nước - hữu cơ [5, 7]. Anhydrid isobutyric có khả năng tan trong nước, trong khi chất C2 (dạng cytidin acetonid ester) tan tốt trong DCM. Do đó, sử dụng hệ dung môi chiết  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ /dung dịch acid acetic 10% đã giúp loại bỏ được base DBU và tác nhân anhydrid tồn dư [5]. DMAP được loại đi dưới dạng muối acetat tan trong nước khi rửa với dung dịch acid acetic 10%. Acid acetic cũng dễ dàng được loại bỏ nhờ được trung hòa bằng natri hydrocarbonat.

### 3. Về phản ứng tạo C3 từ C2

Phản ứng diễn ra theo cơ chế  $\text{S}_\text{N}$ , với tác nhân nucleophin là  $\text{NH}_2\text{OH}$ , tấn công vào vị trí C-4, sau đó đẩy nhóm  $\text{NH}_2$  (dưới dạng  $\text{NH}_3$ ) ra ngoài. Để phản ứng xảy ra tốt, cần duy trì nhiệt độ cao và thời gian phản ứng kéo dài (24 giờ). Tác nhân được sử dụng là dạng muối hydroxylamin sulfat thay cho

hydroxylamin, giúp kiểm soát an toàn và ít độc hại hơn (hydroxylamin base khó bảo quản, có khả năng phát nổ khi đun nóng và gây kích ứng da, mắt, gây dị ứng). Theo kết quả khảo sát, khi nâng nhiệt độ lên cao ( $> 80^\circ\text{C}$ , hồi lưu), phản ứng sẽ sinh ra nhiều tạp. Chúng tôi chọn được mức nhiệt độ phù hợp là  $70 \pm 2^\circ\text{C}$  để đạt hiệu suất cao nhất. Khi xử lý sản phẩm, sử dụng hệ dung môi ethyl acetat/dung dịch NaCl bão hòa (1:1) giúp loại bỏ hoàn toàn hydroxylamin sulfat còn dư sau phản ứng [9]. Pha hữu cơ (hòa tan tốt sản phẩm C3) được rửa với nước, sau đó được cất kiệt để thu được sản phẩm thô (dạng siro). Theo các tài liệu tham khảo ở quy mô tương tự, phương pháp tinh chế bằng sắc ký cột là cách phổ biến nhất để có thể thu được sản phẩm ở dạng tinh khiết [4]. Tuy nhiên, để làm tiền đề nghiên cứu quy mô cao hơn, phương pháp sắc ký cột không phải là lựa chọn tối ưu. Vì vậy, phương pháp kết tinh để tinh chế sản phẩm C3 đã được sử dụng trong nghiên cứu này. Hệ dung môi  $\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{CN} = 5:1$  được lựa chọn để kết tinh thành công sản phẩm. Sản phẩm C3 thu được lúc này có chứa một lượng nhỏ molnupiravir (xuất hiện dựa theo vết quan sát trên sắc ký lớp mỏng).

#### 4. Về phản ứng thủy phân tạo molnupiravir từ C3

Khi tiến hành tinh chế bằng phương pháp chiết theo tài liệu [10], nhóm nghiên cứu nhận thấy molnupiravir tan kém trong ethyl acetat, do đó, cần thực hiện chiết nhiều lần gây tốn thời gian và chi phí sản xuất. Do đó, chúng tôi đã khảo sát một số dung môi và quyết định lựa chọn THF là dung môi để tinh chế sản phẩm. Sau đó, dung dịch chứa sản phẩm và dung môi THF được cô cạn để thu được sản phẩm dạng dầu. Molnupiravir gần như không tan trong dung môi MTBE, nên chúng tôi đã sử dụng MTBE để làm kết tủa molnupiravir thu được dạng tinh khiết. Phương pháp này giúp dễ dàng thu molnupiravir dạng rắn mà không cần sử dụng đến sắc ký cột. Mặt khác, do cấu trúc molnupiravir có một số nhóm thân nước là -OH và -NH nên tan được một phần trong nước. Do đó, trên thực tế khi chiết bằng hệ dung môi THF/NaCl bão hòa đã làm mất một phần sản phẩm molnupiravir trong pha nước muối. Do vậy, hiệu suất phản ứng này chưa cao.

#### KẾT LUẬN

Tổng hợp thành công molnupiravir từ nguyên liệu cytidin ở quy mô phòng thí nghiệm đạt hiệu suất 22,9% và đã thay đổi được phương pháp tinh chế,

không sử dụng sắc ký cột, giúp đơn giản hóa thao tác thực hiện, tiết kiệm thời gian và chi phí sản xuất. Cấu trúc của sản phẩm và các chất trung gian đã được chứng minh qua các phương pháp phân tích phổ IR, MS, NMR.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin chân thành cảm ơn Trường Đại học Dược Hà Nội đã hỗ trợ kinh phí thực hiện nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tian L, Pang Z, Li M. et al. (). Molnupiravir and its antiviral activity against COVID-19. *Frontiers in Immunology*. 2022; 13:855496.
2. Painter G, Bluemling G, Natchus M, Guthrie D. *N<sup>4</sup>-Hydroxycytidine and derivatives and anti-viral uses related thereto*, *World Intellectual Property Organization*. WO2019113462A1. 2019.
3. Ahlqvist GP, McGeough CP, Senanayake C, et al. Progress toward a large-scale synthesis of molnupiravir (MK-4482, EIDD-2801) from cytidine. *ACS Omega*. 2021; 6(15):10396-10402.
4. Gopalsamuthiram V, Williams C, Noble J, et al. A concise route to MK-4482 (EIDD-2801) from Cytidine: Part 2. *Synlett*. 2021; 32(03):326-328.

5. Gopalsamuthiram V, Kadam AL, Noble JK, et al. Toward a practical, nonenzymatic process for investigational COVID-19 antiviral molnupiravir from cytidine: Supply-centered synthesis. *Organic Process Research & Development*. 2021; 25(12):2679-2685.
6. Hu T, Xie Y, Zhu F, et al. “One-pot” synthesis of molnupiravir from cytidine. *Organic Process Research & Development*. 2022; 26(2):358-364.
7. Kütt A, Selberg S, Kaljurand I, et al. pKa values in organic chemistry - Making maximum use of the available data. *Tetrahedron letters*. 2018; 59(42):3738-3748.
8. [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1\\_8Diazabicyclo\\_5.4.0\\_undec-7-ene](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1_8Diazabicyclo_5.4.0_undec-7-ene), truy cập 23/06/2023.
9. Chen J, Yu C, Chen C. Preparation method of 4-oxime-5'-(2-methylpropionyl) uridine. *China patent*, CN112552288A. 2021.
10. McIntosh JA, Benkovics T, Silverman SM, et al. Engineered ribosyl-1-kinase enables concise synthesis of molnupiravir, an antiviral for COVID-19. *ACS Central Science*. 2021; 7(12):1980-1985.