



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0039449

(51)^{2020.01} C07C 69/157; A61K 31/222; A61K 31/235; A61P 7/02; A61P 9/10; C07C 229/26; C07D 233/64; C07C 279/02; C07C 279/14; C07C 67/08; C07C 69/78; A61K 31/155; C07C 277/08 (13) B

(21) 1-2021-02006 (22) 03/12/2018
(86) PCT/CN2018/118879 03/12/2018 (87) WO2020/107500 04/06/2020
(30) 201811440339.8 28/11/2018 CN
(45) 25/04/2024 433 (43) 25/10/2021 403

(73) JIANGSU KANION PHARMACEUTICAL CO., LTD. (CN)
No. 58, Kangyuan Road, Jiangning Industrial Park, Economic and Technological Development Zone, Lianyungang City, Jiangsu Province, China

(72) ZHANG, Yihua (CN); HUANG, Zhangjian (CN); WU, Jianbing (CN); ZHU, Jiayi (CN); Xiao Wei (CN); Wang Zhenzhong (CN); Wang Tuanjie (CN).

(74) Công ty TNHH Sáng chế ACTIP (ACTIP PATENT LIMITED)

(54) HỢP CHẤT ĐƯỢC TẠO THÀNH BỞI AXIT 2-(1-AXYLOXY-N PENTYL)BENZOIC VÀ AXIT AMIN BAZƠ HOẶC AMINOGUANIDIN, PHƯƠNG PHÁP ĐIỀU CHẾ, DƯỢC PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP BÀO CHẾ DƯỢC PHẨM CHỨA HỢP CHẤT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các hợp chất được tạo bởi axit 2-(1-axyloxy-n-pentyl)benzoic và axit amin bazơ hoặc aminoguanidin, phương pháp điều chế các hợp chất, dược phẩm có chứa các hợp chất này, và phương pháp bào chế dược phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị tim mạch và mạch máu não do thiếu máu cục bộ, chống huyết khối và cải thiện các rối loạn tuần hoàn tim - não sử dụng các hợp chất muối này. Hợp chất của sáng chế có tính hòa tan trong nước vượt trội, tính ổn định dung dịch nước và các đặc tính dược động học, cũng có khả năng chống kết tập tiểu cầu đáng kể, chống huyết khối, chống thiếu máu cục bộ não và hoạt tính bảo vệ thần kinh. Hợp chất của sáng chế có hiệu quả tốt hơn đáng kể so với (S)-butylphatalua và kali (R/S)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat (PHPB), có độc tính cấp tính thấp hơn đáng kể với chuột bằng tiêm tĩnh mạch so với butylphatalua và PHPB, có tỷ lệ ức chế thấp trong kênh kali hERG trong các tế bào CHO-hERG so với (S)-butylphatalua, và có kết quả dương tính trong Thử nghiệm đột biến ngược vi sinh vật (thử nghiệm A).

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế thuộc lĩnh vực hóa dược và dược trị liệu, cụ thể là liên quan đến các hợp chất được tạo bởi axit 2-(1-axyloxy-n-pentyl)benzoic và axit amin bazơ hoặc aminoguanidin, phương pháp điều chế chúng, các dược phẩm có chứa các hợp chất này, và ứng dụng y tế của chúng, cụ thể là ứng dụng trong phương pháp bào chế dược phẩm để phòng ngừa hoặc điều trị các bệnh tim mạch và mạch máu não do thiếu máu cục bộ, chống huyết khối và cải thiện các rối loạn tuần hoàn tim - não.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

3-N-butylphatalua (NBP), được viết tắt là butylphatalua, và có tên hóa học là raxemic (*R/S*)-3-N-butyl-1(3*H*)-isobenzofuranon, là chất tự phát triển và được lưu thông trên thị trường thuốc để điều trị đột quỵ nhẹ và vừa do thiếu máu cục bộ ở Trung Quốc. Mặc dù NBP có các hoạt tính sinh học nhất định trong chống lại sự kết tập tiểu cầu, chống huyết khối, giảm thể tích nhồi máu não, bảo vệ chức năng ty thể và cải thiện vi tuần hoàn não, hiệu quả tổng thể của thuốc đơn lẻ là không cao, và NBP thường được kết hợp với các thuốc khác nhau trong thử nghiệm lâm sàng. Ngoài ra, NBP là chất dầu có nhiệt độ sôi cao, đòi hỏi chưng cất chân không và nhiệt độ cao và nhiều lần để sản xuất sản phẩm dược đảm bảo chất lượng, và khó để sản xuất với số lượng lớn. Do khả năng hòa tan trong nước của NBP cực kỳ kém nên thuốc tiêm cần phải được bao bọc với hydroxypropyl- β -cyclodextrin và sau đó được pha chế với natri clorua và nước để tiêm. Do đó, quá trình sản xuất tương đối phức tạp và giá thành sản phẩm cao hơn so với các thuốc tiêm được sử dụng thông thường. Để cải thiện hoạt tính và/hoặc tăng khả năng hòa tan trong nước của NBP, người ta đã biến đổi và cải tiến cấu trúc của NBP.

Các Patent Trung Quốc số ZL 98125618.x và ZL 9910 9673.8 đã bộc lộ quá trình điều chế (*R*)- và (*S*)-NBP và chống lại sự kết tập tiểu cầu và các hoạt tính chống huyết khối của chúng, trong đó hoạt tính của (*S*)-NBP là tốt hơn so với hoạt tính của (*R*)-NBP

và NBP.

Patent Trung Quốc số ZL 01109795.7 đã bộc lộ phương pháp tạo thành muối của hợp chất mở vòng NBP, cụ thể là axit (*R/S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl)benzoic với kali, natri, canxi, magie, kẽm, anilin, benzylamin, morpholin hoặc dietylamín, và sử dụng chúng, trong đó muối kali ((*R/S*)-PHPB, viết tắt là PHPB) có khả năng hòa tan trong nước cao, có thể chuyển đổi thành NBP trong cơ thể để sử dụng hoạt tính chống thiếu máu cục bộ não, và có tính khả dụng sinh học tốt hơn NBP (*Acta Pharmacol. Sin.*, 2018, 39, 275–285).

Patent Trung Quốc số ZL 200410048268.9 đã bộc lộ quy trình và hoạt tính của các muối được tạo thành bởi axit (*S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl)benzoic với các ion kim loại hóa trị I như lithi, natri và kali, hoặc các ion kim loại hóa trị II như magie, canxi và kẽm, hoặc các bazơ hữu cơ benzylamin, tert-butylamine, N,N'-đibenzyletyleniamin, trong đó kali (*S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat ((*S*)-PHPB) có hoạt tính chống thiếu máu cục bộ não tốt hơn so với (*R*)-PHPB và (*S*)-NBP.

Patent Trung Quốc số ZL 201110115922.3 đã bộc lộ phương pháp điều chế và ứng dụng y tế của các đồng đẳng thio và seleno của NBP, trong đó các đồng đẳng thio có hoạt tính chống oxy hóa và chống thiếu máu cục bộ não tốt hơn NBP.

Hiện nay PHPB và (*S*)-NBP đã được đưa vào các giai đoạn II–III và giai đoạn I–II của các nghiên cứu lâm sàng tương ứng, để điều trị đột quỵ do thiếu máu cục bộ.

Các tác giả trước đây đã thiết kế và tổng hợp L-arginin (*R/S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat (AHPB) (Gao Yang, Luận văn thạc sỹ Đại học Dược Trung Quốc, 2016). Các nghiên cứu đã cho thấy AHPB có khả năng hòa tan trong nước vượt trội, và hoạt tính bảo vệ thần kinh, chống thiếu máu cục bộ não và chống lại sự kết tập tiểu cầu tốt hơn so với NBP đẳng mol – đẳng phân tử, nhưng tính ổn định hóa học kém.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế: Theo quan điểm kỹ thuật trước đây, sáng chế đề xuất hợp chất I được thu từ phản ứng của axit 2-(1-axyloxy-n-pentyl)benzoic với axit amin bazơ hoặc aminoguanidin, và đề xuất phương pháp điều chế hợp chất I, dược phẩm có chứa các hợp chất này, và ứng dụng dược phẩm của chúng.

Hiệu quả đạt được của sáng chế

Các hiệu quả đạt được của sáng chế như sau: Hợp chất của sáng chế có các đặc tính vượt trội như sau: (1) khả năng hòa tan trong nước và độ ổn định dung dịch nước vượt trội, tạo thuận lợi cho công nghiệp dược phẩm để sản xuất thuốc tiêm tĩnh mạch hoặc thuốc tiêm tĩnh mạch đông khô thích hợp để cấp thuốc cho các bệnh nhân bị đột quỵ do thiếu máu cục bộ; (2) giải phóng hai đoạn hoạt tính có thể hoạt động hiệp đồng trong cơ thể, và cải thiện đáng kể hiệu quả điều trị chống đột quỵ do thiếu máu cục bộ bởi (*R/S*)-, (*R*)- hoặc (*S*)-NBP và axit amin bazơ nhất định hoặc aminoguanidin hoạt động hiệp đồng trong cơ thể; (3) chống thiếu máu cục bộ não đáng kể và hoạt tính bảo vệ thần kinh; (4) các đặc tính dược động học vượt trội; và (5) tính an toàn cao. Các hiệu quả có lợi được mô tả chi tiết như sau:

Hợp chất I của sáng chế là hợp chất rắn có khả năng hòa tan tốt trong nước và độ ổn định dung dịch nước tốt, và có thể giải phóng tương ứng axit 2-(1-axyloxy-n-pentyl)benzoic và axit amin bazơ hoặc aminoguanidin trong cơ thể. Axit 2-(1-axyloxy-n-pentyl)benzoic còn có thể được thủy phân bởi esteraza để loại bỏ nhóm axyl, tạo ra axit (*R/S*)-, (*R*)- và (*S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl)benzoic tương ứng, được sử dụng để có tác dụng chống thiếu máu cục bộ não; và axit amin bazơ hoặc aminoguanidin cũng có các hiệu quả dược lý và hiệu quả thông thường cực kỳ quan trọng. L-arginin có thể được chuyển hóa bởi nitơ oxit (NO) tổng hợp (NOS) trong cơ thể thành NO có lợi cho hệ tim mạch (*Proc. Nutr. Soc.*, 2018, 77, 112–123). Bổ sung chế độ ăn uống với L-arginin có thể làm giảm khả năng phản ứng tiểu cầu trong các bệnh nhân có nồng độ cholesterol cao (*J Am Coll Cardiol*, 1997, 29, 479–485) và ngăn ngừa xơ vữa động mạch (*J Clin Invest*, 1992, 90, 1168–1172). L-arginin có thể đi vào não bộ từ máu ngoại vi thông qua chất vận chuyển amino axit cation (cationic amino acid transporter: CAT1) trên hàng rào máu não (blood-brain barrier: BBB), rất quan trọng với sự phát triển não bộ (*Microvasc. Res.*, 2018, 117, 16-21). Ngoài ra, sử dụng L-arginin thông qua đường uống hoặc truyền nhỏ giọt tĩnh mạch ở các bệnh nhân bị bệnh não do ty thể MELAS (Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes – MELAS: hội chứng não giât cơ, tăng acid lactic máu và giả tai biến) có thể làm tăng vi tuần hoàn lưu lượng máu não, làm giảm tổn thương do thiếu máu cục bộ khu trú cấp tính, và giảm

đáng kể tần suất và mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng đột quỵ (*Neurology*, 2005, 64, 710–712). Việc tiêm trực tiếp L-arginin vào não thất của chuột AD có thể tạo ra đáng kể hoạt động bảo vệ thần kinh và hoạt tính chống lại cơ chế gây chết tế bào theo chương trình (*Transl. Neurosci.*, 2018, 9, 43–53). L-lysin và L-histidin là các axit amin thiết yếu cho cơ thể con người, và đóng vai trò quan trọng trong việc truyền tín hiệu thần kinh và cung cấp năng lượng. Aminoguanidin có hoạt tính chống thiếu máu cục bộ não (*Neurosciences*, 2012, 17, 121-126), bảo vệ thần kinh (*Neurochem. Int.*, 2010, 56, 634-641) và chống lão hóa (*J. Proteomics*, 2017, 156, 104-112). Do đó, các hoạt động hiệp đồng (*R/S*)-, (*R*)- hoặc (*S*)-NBP với một trong những axit amin bazơ bên trên hoặc aminoguanidin trong cơ thể giúp tăng cường hiệu quả điều trị. Các kết quả nghiên cứu *in vivo* và *in vitro* chỉ ra rằng hợp chất của sáng chế tăng đáng kể tác dụng chống lại sự kết tập tiểu cầu, chống huyết khối, chống thiếu máu cục bộ, trong đó muối được tạo thành bởi axit của đồng phân (*S*) tốt hơn muối được tạo thành bởi axit của đồng phân (*R*) hoặc axit của (*R/S*)-racemat, và tốt hơn đáng kể so với (*S*)-NBP và PHPB. Các hợp chất của sáng chế cũng có các đặc tính dược động học vượt trội. Ngoài ra, bằng cách tiêm tĩnh mạch các hợp chất của sáng chế có độc tính cấp tính đối với chuột thấp hơn đáng kể so với NBP và PHPB, tỷ lệ ức chế của kênh hERG kali trong các tế bào CHO-hERG thấp hơn so với tỷ lệ ức chế của (*S*)-NBP, và kết quả âm tính của kiểm tra sự đột biến ngược vi khuẩn (Ames test).

Mô tả văn tắt hình vẽ

Fig.1 là ảnh phổ phân tích độ ổn định dung dịch mẫu của hợp chất I_{1s} trong H₂O;

Fig.2 là ảnh phổ phân tích độ ổn định dung dịch mẫu của hợp chất I_{1s} trong CH₃OH;

Fig.3 thể hiện ảnh hưởng của hợp chất thử nghiệm trên huyết khối bắc cầu động mạch ở chuột;

Fig.4 thể hiện ảnh hưởng của các hợp chất trên thể tích nhồi máu, phù não và khuyết tật thần kinh ở chuột MCAO;

Fig.5 thể hiện ảnh hưởng của hợp chất AHPB trên thể tích nhồi máu, phù não và khuyết tật thần kinh ở chuột MCAO;

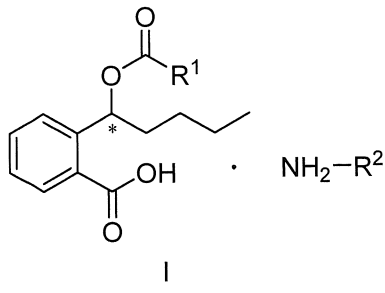
Fig.6 thể hiện đường cong sử dụng thuốc của từng chất chuyển hóa trong huyết

tương chuột sau khi sử dụng thuốc tiêm tĩnh mạch I_{1s}; và

Fig.7 thể hiện đường cong sử dụng thuốc, biểu đồ tần số nồng độ thuốc của từng chất chuyển hóa trong mô não chuột sau khi sử dụng thuốc tiêm tĩnh mạch I_{1s}.

Mô tả chi tiết sáng chế

Giải pháp kỹ thuật: Hợp chất của công thức chung I được mô tả trong sáng chế,



trong đó:

R¹ là C₁-C₈ alkyl, aryl hoặc heteroaryl; và

H₂N-R² là axit amin bazơ hoặc aminoguanidin,

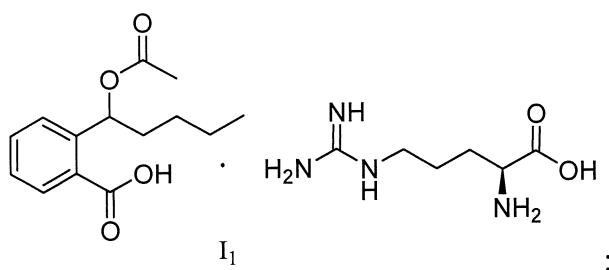
trong đó, tâm bất đối xứng của gốc axit 2-(1-axyloxy-n-pentyl)benzoic được biểu thị bởi * là cấu hình (*R*)-, (*S*)- hoặc (*R/S*).

Tốt hơn là, R¹ là metyl, etyl, n-propyl hoặc phenyl.

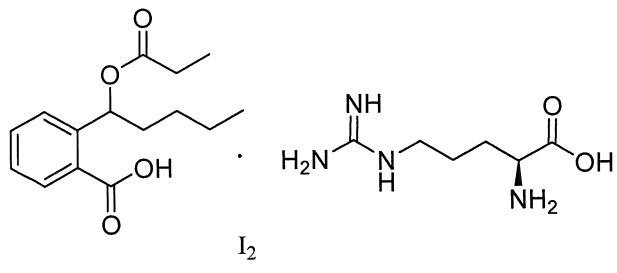
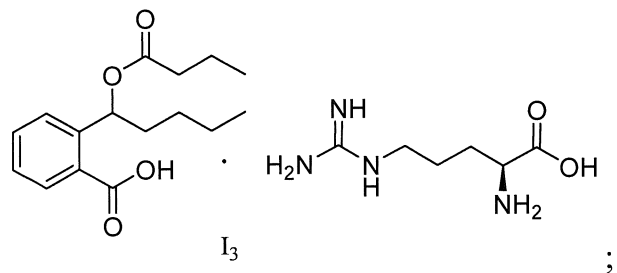
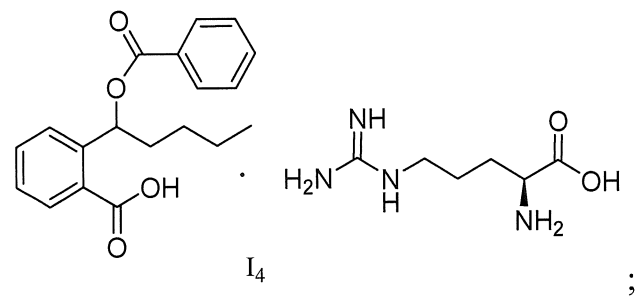
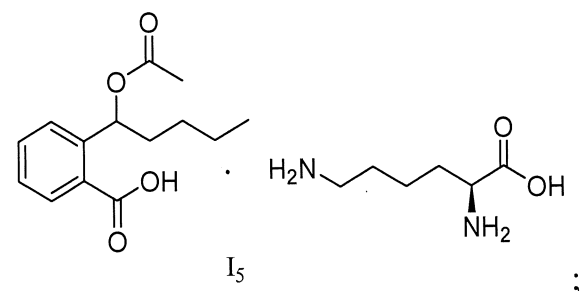
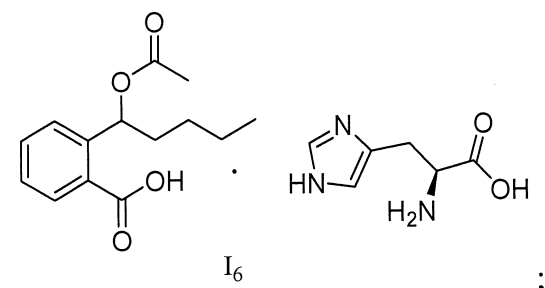
Tốt hơn là, axit amin bazơ là L-arginin, L-lysin hoặc L-histidin.

Tốt nhất là, hợp chất của công thức chung I được lựa chọn từ các hợp chất sau:

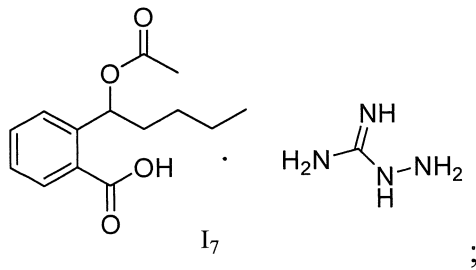
L-arginin (*R/S*)-2-(1-axetoxo-n-pentyl) benzoat



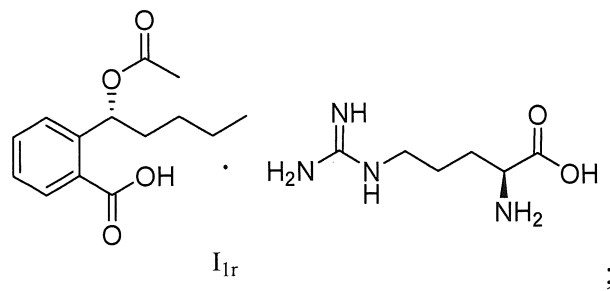
L-arginin (*R/S*)-2-(1-propionyloxy-n-pentyl) benzoat

L-arginin (*R/S*)-2-(1-N-butyryloxy-n-pentyl) benzoatL-arginin (*R/S*)-2-(1-benzoyloxy-n-pentyl) benzoatL-lysin (*R/S*)-2-(1-axetoxy-n-pentyl) benzoatL-histidin (*R/S*)-2-(1-axetoxy-n-pentyl) benzoat

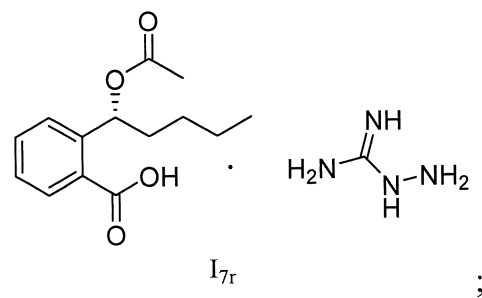
aminoguanidin (*R/S*)-2-(1-axetoxi-n-pentyl) benzoat



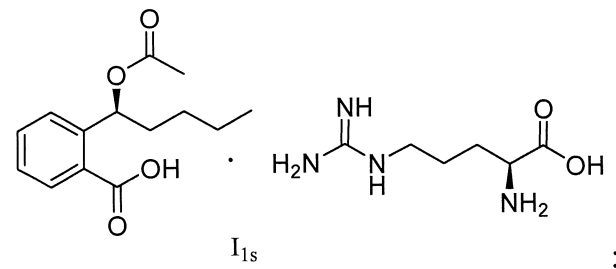
L-arginin (*R*)-2-(1-axetoxi-n-pentyl) benzoat



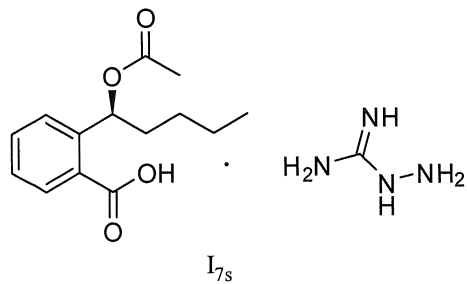
aminoguanidin (*R*)-2-(1-axetoxi-n-pentyl) benzoat



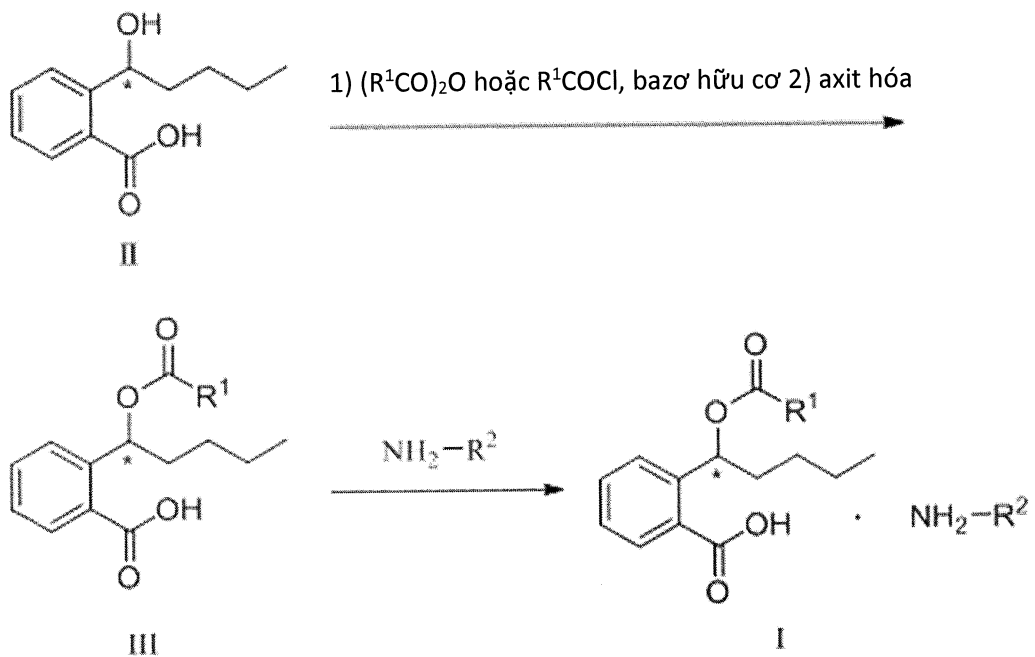
L-arginin (*S*)-2-(1-axetoxi-n-pentyl) benzoat



aminoguanidin (*S*)-2-(1-axetoxi-n-pentyl) benzoat



Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều chế hợp chất của công thức chung I, bao gồm các bước sau đây:



(1) thêm từng giọt axit anhydrit hoặc axyl clorua vào dung dịch dung môi hữu cơ của hợp chất II ở nhiệt độ thấp và trong sự có mặt của bazơ hữu cơ, và axit hóa dung dịch phản ứng sau khi phản ứng tạo kết tủa hợp chất rắn III màu trắng; và

(2) hòa tan hợp chất III được thu trong bước (1) trong rượu, bổ sung H_2N-R^2 để tạo thành muối, và sau phản ứng, lọc và kết tinh lại chất kết tủa với rượu để thu được hợp chất I.

Ngoài ra, trong bước (1), nhiệt độ phản ứng là từ -30 đến $-5^\circ C$; bazơ hữu cơ là 4-dimethylaminopyridin, diethylamin, triethylamin hoặc pyridin; dung môi hữu cơ là một hoặc kết hợp của hai ete dietyl, tetrahydrofuran, diclometan, trichlorometan hoặc axeton; axit là axit clohydric được cô đặc hoặc pha loãng, axit sulfuric hoặc axit nitric; và dung dịch phản ứng được axit hóa tới độ pH 2-6.

Trong bước (2), nhiệt độ phản ứng là từ -5 đến 30°C, rượu là etanol, metanol, propanol hoặc isopropanol, và axit amin bazơ là L-arginin, L-lysin hoặc L-histidin.

Sáng chế đề xuất được phẩm bao gồm hợp chất I và chất mang dược dụng.

Ứng dụng của hợp chất I trong điều chế các thuốc để phòng ngừa hoặc điều trị tim mạch và mạch máu não do thiếu máu cục bộ, chống huyết khối và cải thiện các rối loạn tuần hoàn tim - não cũng thuộc phạm vi bảo hộ của sáng chế.

Các dạng bào chế khác nhau của dược phẩm của sáng chế có thể được điều chế bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật theo các phương pháp sản xuất thông thường trong lĩnh vực dược phẩm. Ví dụ, thành phần hoạt tính được trộn với một hoặc nhiều chất mang (cũng được gọi là tá dược), và sau đó được điều chế thành dạng bào chế mong muốn, bao gồm viên nén, viên nang, và hạt nhỏ. Thành phần hoạt tính cũng có thể được làm thành dạng thuốc tiêm tĩnh mạch hoặc thuốc tiêm tĩnh mạch đông khô theo phương pháp sản xuất thuốc tiêm thông thường.

Hợp chất và dược phẩm của sáng chế có thể được sử dụng để điều chế các thuốc để phòng ngừa và điều trị tim mạch và mạch máu não do thiếu máu cục bộ, chống huyết khối và cải thiện các rối loạn tuần hoàn tim - não, chẳng hạn như nhồi máu cơ tim, đau thắt ngực, rối loạn nhịp tim, nhồi máu não và đột quy.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết dưới đây với các ví dụ cụ thể.

Nguồn nguyên liệu:

(*S*)-butylphthalua ((*S*)-NBP) được điều chế bằng cách tham khảo phương pháp của Patent Trung Quốc số ZL 98125618.x.

Kali (*R/S*)-2-(1-hydroxy-*n*-pentyl) benzoat (Potassium (*R/S*)-2-(1-hydroxy-*n*-pentyl) benzoate: PHPB) được điều chế bằng cách tham khảo phương pháp của Patent Trung Quốc số ZL 01109795.7.

Các axit (*R/S*)-, (*R*)- và (*S*)-2-(1-hydroxy-*n*-pentyl)benzoic được điều chế bằng cách tham khảo phương pháp của Patent Trung Quốc số ZL 200410048268.9.

Aspirin, L-arginin, và Edaravone được đặt mua từ Saen Chemical Technology Co.,

Ltd.

Clopidogrel được đặt mua từ Shanghai Yuanye Bio-Technology Co., Ltd.

Ví dụ 1: Điều chế L-arginin (*R/S*)-2-(1-axetoxy-n-pentyl) benzoat (I₁)

Trong điều kiện nhiệt độ từ -30 đến -5°C, bổ sung 21,8 ml (157,8 mmol) triethylamin và 0,6 g (5,2 mol) DMAP vào dung dịch 10,9 g (52,6 mmol) axit (*R/S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl)benzoic (II) trong ete dietyl (300 ml), sau đó thêm từ từ từng giọt 11,1 ml (157,8 mmol) axetyl clorua, và dung dịch đã trộn được khuấy trong 5 giờ. Sau phản ứng, khoảng 35 ml axit clohydric 10% được bổ sung để axit hóa dung dịch phản ứng đến độ pH 2-3. Dung dịch phản ứng được khuấy trong 2 giờ. Phần lớp hữu cơ được tách ra, sấy khô với Na₂SO₄ dạng khan, lọc, cô đặc dưới áp suất giảm, và thực hiện sắc ký cột [ete dầu mỏ: etyl axetat (v:v) = 10:1] để thu được 9,96 g của các tinh thể axit (*R/S*)-2-(1-axetoxy-n-pentyl)benzoic hình kim màu trắng với hiệu suất 76%; m.p.: 65–66°C; MS (m/z): 249 [M₁– H]⁻; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (phần triệu (parts per million: ppm): 0,97 (t, 3H, CH₃, J = 6,9 Hz), 1,38–1,52 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,84–1,99 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2,17 (s, 3H, CHOCOCH₃), 6,69 (dd, 1H, CH₂CHOCOCH₃, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 4,5 Hz), 7,38–7,44 (m, 1H, ArH), 7,56–7,65 (m, 2H, ArH), 8,09–8,12 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 174,4; 131,2; 128,8; 128,3; 127,2; 74,9; 61,1; 54,4; 40,5; 27,6; 27,2; 23,9; 21,7; 13,3.

Trong điều kiện nhiệt độ từ -5 đến 30°C, hòa tan 9,96 g (39,8 mmol) axit (*R/S*)-2-(1-axetoxy-n-pentyl)benzoic trong 25 ml etanol nguyên chất. Trong khi khuấy, bổ sung 6,9 g (39,8 mmol) L-arginin để tạo thành muối. Kết tủa được lọc và kết tinh lại với etanol 95% để thu được 9,4 g chất rắn dạng bột màu trắng I₁ với hiệu suất 56%; m.p.: 178–179°C; [α]²⁰_D = +5,2° (c = 1,00, CH₃OH); MS (m/z): 249 [M₁– H]⁻, 175 [M₂ + H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm): 0,80 (t, 3H, CH₃, J = 6,0 Hz), 1,10–1,30 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,54–1,72 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1,81–1,88 (m, 4H, CH₂CH₂CHCOOH), 2,06 (s, 3H, CHOCOCH₃), 3,18 (t, 2H, NHCH₂CH₂, J = 6,9 Hz), 3,70 (dd, 1H, CH₂CHCOOH, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 6,0 Hz), 6,10 (dd, 1H, CH₂CHOCOCH₃, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 6,6 Hz), 7,29–7,43 (m, 4H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (ppm): 177,5; 174,3; 173,8; 138,1; 136,8; 128,7; 127,7; 126,9; 125,8; 74,9; 54,4; 40,6; 35,2; 27,6; 27,2; 24,5; 23,9; 21,7; 20,7; 13,3.

Ví dụ 2: Điều chế L-arginin (*R/S*)-2-(1-propionyloxy-*n*-pentyl) benzoat (I₂)

Trong điều kiện nhiệt độ từ -30 đến -5°C, bổ sung 21,8 ml (157,8 mmol) triethylamin và 0,6 g (5,2 mol) DMAP vào dung dịch 9,96 g (39,8 mmol) axit (*R/S*)-2-(1-hydroxy-*n*-pentyl)benzoic (II) trong ete dietyl (300 mL), sau đó thêm từ từ từng giọt 13,1 ml (157,8 mmol) propionyl clorua, và dung dịch trộn được khuấy trong 5 giờ. Sau phản ứng, khoảng 35 ml axit clohydric 10% được bổ sung để axit hóa dung dịch phản ứng đến độ pH 2-3. Dung dịch phản ứng được khuấy trong 2 giờ. Phần lớp hữu cơ được tách ra, sấy khô với Na₂SO₄ dạng khan, lọc, cô đặc dưới áp suất giảm, và thực hiện sắc ký cột [ete dầu mỏ: etyl axetat (v:v) = 10:1] để thu được 9,0 g axit (*R/S*)-2-(1-propionyloxy-*n*-pentyl)benzoic đầu với hiệu suất 65%; MS (m/z): 263 [M₁- H]⁻; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ (ppm): 0,96 (t, 3H, CH₂CH₂CH₃, J = 6,9 Hz), 1,21 (t, 3H, COCH₂CH₃, J = 7,8 Hz), 1,32–1,51 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,80–1,98 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2,43 (q, 2H, COCH₂CH₃, J = 7,5 Hz), 6,68 (dd, 1H, CH₂CH₂COCH₂, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 6,6 Hz), 7,33–7,44 (m, 1H, ArH), 7,52–7,64 (m, 2H, ArH), 8,03–8,10 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 172,8; 171,3; 143,8; 133,5; 130,6; 126,7; 125,7; 72,3; 36,0; 25,9; 27,4; 21,7; 17,9; 13,4; 13,1.

Trong điều kiện nhiệt độ từ -5 đến 30°C, sản phẩm đầu được hòa tan trong 25 ml etanol nguyên chất. Trong khi khuấy, bổ sung 5,9 g (33,9 mol) L-arginin để tạo thành muối. Kết tủa được lọc và kết tinh lại với etanol 95% để thu được 7,8 g chất rắn dạng bột màu trắng I₂ với hiệu suất 52%; m.p.: 169–171°C; [α]²⁰_D = +5,5° (c = 1,00, CH₃OH); MS (m/z): 263 [M₁- H]⁻, 175 [M₂ + H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm): 0,81 (t, 3H, CH₂CH₂CH₃, J = 6,0 Hz), 1,06 (t, 3H, COCH₂CH₃, J = 7,5 Hz), 1,18–1,37 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,53–1,73 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1,83–1,91 (m, 4H, CH₂CH₂CHCOOH), 2,38 (q, 2H, COCH₂CH₃, J = 7,5 Hz), 3,19 (t, 2H, NHCH₂CH₂, J = 6,9 Hz), 3,72 (dd, 1H, CH₂CH₂COOH, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 6,0 Hz), 6,18 (dd, 1H, CH₂CH₂COCH₂, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 6,6 Hz), 7,30–7,43 (m, 4H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (ppm): 179,9; 179,8; 176,9; 159,4; 140,9; 139,1; 131,5; 130,2; 129,6; 128,2; 77,2; 56,9; 43,1; 38,0; 30,3; 20,1; 29,9; 26,5; 24,3; 15,9; 11,1.

Ví dụ 3: Điều chế L-arginin (*R/S*)-2-(1-*N*-butyryloxy-*n*-pentyl) benzoat (I₃)

Trong điều kiện nhiệt độ từ -30 đến -5°C, bổ sung 21,8 ml (157,8 mmol) triethylamin và 0,6 g (5,2 mol) DMAP vào 9,96 g (39,8 mmol) dung dịch axit (*R/S*)-2-

(1-hydroxy-n-pentyl)benzoic (II) trong ete dietyl (300 mL), sau đó thêm từ từ từng giọt 15,9 ml (157,8 mmol) n-butyryl clorua, và dung dịch đã trộn được khuấy trong 5 giờ. Sau phản ứng, khoảng 35 ml axit clohydric 10% được bổ sung để axit hóa dung dịch phản ứng đến độ pH 2-3. Dung dịch phản ứng được khuấy trong 2 giờ. Phần lớp hữu cơ được tách ra, sấy khô với Na₂SO₄ dạng khan, lọc, cô đặc dưới áp suất giảm, và thực hiện sắc ký cột [ete dầu mỏ: etyl axetat (v:v) = 10:1] để thu được 8,4 g (*R/S*)-2-(1-N-butyryloxy-n-pentyl)benzoic acid dầu với hiệu suất 58%; MS (m/z): 277 [M₁-H]⁻; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 0,89–1,06 (m, 6H, 2×CH₃), 1,33–1,51 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,7–1,78 (m, 2H, COCH₂CH₂CH₃), 1,85–1,98 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2,41 (t, 2H, COCH₂CH₂, J = 7,5 Hz), 6,70 (dd, 1H, CH₂CHOC(=O)CH₂, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 4,5 Hz), 7,35–7,45 (m, 1H, ArH), 7,55–7,64 (m, 2H, ArH), 8,06–8,11 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 173,6; 171,4; 143,9; 132,5; 130,1; 128,1; 126,9; 125,5; 72,4; 36,1; 33,9; 21,5; 21,3; 21,7; 13,4; 8,5.

Trong điều kiện nhiệt độ từ -5 đến 30°C, sản phẩm dầu được hòa tan trong 25 ml etanol nguyên chất. Trong khi khuấy, bổ sung 5,2 g (29,9 mol) L-arginin để tạo thành muối. Kết tủa được lọc và kết tinh lại với etanol 95% để thu được 7,3 g chất rắn dạng bột màu trắng I₃ với hiệu suất 54%; m.p.: 152–153°C; [α]²⁰_D = +4,6° (c = 1,00, CH₃OH); MS (m/z): 277 [M₁-H]⁻, 175 [M₂ + H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm): 0,71–0,84 (m, 6H, 2×CH₃), 1,18–1,36 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 1,5–1,58 (m, 2H, COCH₂CH₂CH₃), 1,63–1,73 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1,73–1,95 (m, 4H, CH₂CH₂CHCOOH), 2,26 (t, 2H, CHOC(=O)CH₂CH₂, J = 7,2 Hz), 3,19 (t, 2H, NHCH₂CH₂, J = 6,6 Hz), 3,74 (dd, 1H, CH₂CHCOOH, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 6,0 Hz), 6,34 (dd, 1H, CH₂CHOC(=O)CH₂, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 6,6 Hz), 7,23–7,49 (m, 4H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (ppm): 176,1; 175,2; 174,3; 156,9; 138,3; 131,5; 129,1; 127,8; 127,4; 125,3; 74,3; 54,4; 40,5; 36,3; 35,8; 27,6; 27,4; 24,1; 21,9; 18,2; 13,4; 13,1.

Ví dụ 4: Điều chế L-arginin (*R/S*)-2-(1-benzoyloxy-n-pentyl) benzoat (I₄)

Trong điều kiện nhiệt độ -30 đến -5°C, bổ sung 21,8 ml (157,8 mmol) trietylamin và 0,6 g (5,2 mmol) DMAP vào 9,96 g (39,8 mmol) dung dịch axit (*R/S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl)benzoic (II) trong ete dietyl (300 mL), sau đó thêm từ từ từng giọt 21,1 ml (157,8 mmol) benzoyl clorua, và dung dịch đã trộn được khuấy trong 5 giờ. Sau phản ứng, khoảng 35 ml axit clohydric 10% được bổ sung để axit hóa dung dịch phản ứng

đến độ pH 2-3. Dung dịch phản ứng được khuấy trong 2 giờ. Phần lớp hữu cơ được tách ra, sấy khô với Na₂SO₄ dạng khan, lọc, cô đặc dưới áp suất giảm, và thực hiện sắc ký cột [ete dầu mỏ: etyl axetat (v:v) = 10:1] để thu được 10,0 g (*R/S*)-2-(1-benzoyloxy-*n*-pentyl)benzoic acid dầu với hiệu suất 61%; MS (m/z): 311[M₁-H]⁻; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 0,99 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 1,33–1,63 (m, 4H, CH₂CH₂CH₂CH₃), 2,03–2,12 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 6,94 (dd, 1H, CH₂CH₂COAr, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 6,0 Hz), 7,40–7,45 (m, 1H, ArH), 7,45–7,72 (m, 5H, ArH), 8,13–8,22 (m, 3H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 171,4; 165,8; 143,8; 133,2; 132,1; 132,5; 130,8; 129,7; 129,1; 126,9; 126,8; 125,5; 73,8; 73,3; 36,2; 27,6; 22,0; 21,8; 13,4.

Trong điều kiện nhiệt độ từ -5 đến 30°C, sản phẩm dầu được hòa tan trong 25 ml etanol nguyên chất. Trong khi khuấy, bổ sung 5,5 g (31,6 mmol) L-arginin để tạo thành muối. Kết tủa được lọc và kết tinh lại với etanol 95% để thu được 8,8 g chất rắn dạng bột màu trắng I₄ với hiệu suất 58%; m.p.: 113–115 °C; [α]²⁰_D = +3,8° (c = 1,00, CH₃OH); MS (m/z): 311[M₁-H]⁻, 175 [M₂ + H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm): 0,83 (t, 3H, CH₃, J = 7,2 Hz), 1,22–1,42 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,56–1,72 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1,72–2,07 (m, 4H, CH₂CH₂CHCOOH), 3,12 (t, 2H, NHCH₂CH₂), 3,38 (dd, 1H, CH₂CHCOOH, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 6,0 Hz), 7,00 (dd, 1H, CH₂CH₂COAr, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 6,0 Hz), 7,15–7,24 (m, 1H, ArH), 7,29–7,39 (m, 2H, ArH), 7,43–7,47 (m, 1H, ArH), 7,51–7,56 (m, 1H, ArH), 7,63–7,68 (m, 1H, ArH), 7,72–7,75 (m, 1H, ArH), 7,89–7,91 (m, 1H, ArH), 8,00–8,08 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (ppm): 174,4; 133,8; 131,1; 129,5; 128,9; 128,8; 128,7; 128,3; 127,7; 127,0; 125,7; 114,7; 105,3; 84,1; 80,1; 75,4; 54,4; 40,5; 35,6; 27,6; 27,3; 23,9; 21,7; 15,1; 13,3.

Ví dụ 5: Điều chế L-lysin (*R/S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (I₅)

Trong điều kiện nhiệt độ từ -5 đến 30°C, hòa tan 9,96 g (39,8 mmol) axit (*R/S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl)benzoic (được điều chế bằng phương pháp của ví dụ 1) trong 25 ml etanol nguyên chất. Trong khi khuấy, bổ sung 5,7 g (39,0 mmol) L-lysin để tạo thành muối. Kết tủa được lọc và kết tinh lại với etanol 95% để thu được 7,6 g chất rắn dạng bột màu vàng I₅ với hiệu suất 49%; m.p.: 122–124°C; [α]²⁰_D = +4,8° (c = 1,00, CH₃OH); MS (m/z): 249 [M₁-H]⁻, 147 [M₂ + H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ ppm: 0,93 (s, 6H, 2×CH₃), 1,28–1,48 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,47–1,67 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1,71–1,86

(m, 2H, CH_2CHCOOH), 1,86–2,03 (m, 4H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 2,18 (s, 3H, CHOCOCH_3), 3,09 (m, 2H, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$), 3,82 (dd, 1H, CH_2CHCOOH , $J_1 = 7,5$ Hz, $J_2 = 6,0$ Hz), 6,28 (dd, 1H, $\text{CH}_2\text{CHOCOCH}_3$, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 6,6$ Hz), 7,35–7,60 (m, 4H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ (ppm): 177,1; 176,3; 141,0; 139,1; 131,5; 130,3; 129,0; 128,4; 77,5; 57,1; 41,1; 37,9; 32,4; 29,8; 29,0; 24,4; 24,1; 23,3; 19,5; 15,9.

Ví dụ 6: Điều chế L-histidin (*R/S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (I₆)

Trong điều kiện nhiệt độ từ -5 đến 30°C, hòa tan 9,96 g (39,8 mmol) axit (*R/S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl)benzoic (được điều chế bằng phương pháp của ví dụ 1) trong 25 ml etanol nguyên chất. Trong khi khuấy, bổ sung 6,1 g (39,3 mmol) L-histidin để tạo thành muối. Kết tủa được lọc và kết tinh lại với etanol 95% để thu được 8,4 g chất rắn dạng bột màu trắng I₆ với hiệu suất 53%; m.p.: 137–139°C; $[\alpha]^{20}_{\text{D}} = +2,4^\circ$ ($c = 1,00$, CH_3OH); MS (m/z): 249 $[\text{M}_1 - \text{H}]^-$, 156 $[\text{M}_2 + \text{H}]^+$; ^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ ppm: 0,88 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3$), 1,21–1,43 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,81–2,00 (m, 2H, CHCH_2), 2,14 (s, 3H, CHOCOCH_3), 3,25–3,36 (m, 2H, CH_2CHCOOH), 4,05 (dd, 1H, CH_2CHCOOH , $J_1 = 7,5$ Hz, $J_2 = 6,0$ Hz), 6,19 (dd, 1H, $\text{CH}_2\text{CHOCOCH}_3$, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 6,6$ Hz), 7,28–7,35 (m, 1H, ArH), 7,38 (s, 1H, $\text{NHCH}=\text{C}$), 7,41–7,53 (m, 3H, ArH), 8,42 (s, 1H, $\text{NHCH}=\text{N}$); ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ (ppm): 177,3; 173,8; 172,8; 138,3; 136,9; 134,7; 128,9; 127,7; 126,9; 125,8; 117,5; 101,2; 74,9; 53,9; 35,2; 27,2; 26,5; 21,7; 20,7; 13,3.

Ví dụ 7: Điều chế aminoguanidin (*R/S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (I₇)

Hòa tan 5,3 g (39,8 mol) aminoguanidin bicarbonat trong 50 ml nước. Trong khi khuấy, dung dịch được làm nóng từ từ đến 60°C. Sau khi làm lạnh, trong điều kiện nhiệt độ từ -5 đến 30°C, bổ sung 9,96 g (39,8 mmol) dung dịch axit (*R/S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl)benzoic (được điều chế bằng phương pháp của ví dụ 1) trong etanol nguyên chất (25 ml). Dung dịch phản ứng được cô đặc đến khi khô cạn dưới áp suất giảm và kết tinh lại với etanol 95% để thu được 6,5 g chất rắn dạng bột màu trắng I₇ với hiệu suất 43%; m.p.: 109–111°C; MS (m/z): 249 $[\text{M}_1 - \text{H}]^-$, 75 $[\text{M}_2 + \text{H}]^+$; ^1H NMR (300 MHz, D_2O): δ ppm: 0,97 (t, 3H, CH_3 , $J = 6,9$ Hz), 1,38–1,52 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$), 1,84–1,99 (m, 2H, CHCH_2CH_2), 2,17 (s, 3H, CHOCOCH_3), 6,69 (dd, 1H, $\text{CH}_2\text{CHOCOCH}_3$, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 4,5$ Hz), 7,38–7,44 (m, 1H, ArH), 7,56–7,65 (m, 2H, ArH), 8,09–8,12 (m, 1H, ArH); ^{13}C NMR (75 MHz, D_2O): δ (ppm): 174,4; 158,1; 131,2; 128,8; 128,3; 127,2; 74,9; 61,1; 54,4; 40,5; 27,6; 27,2; 23,9; 21,7; 13,3.

Ví dụ 8: Điều chế L-arginin (*R*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (I_{1r})

Trong điều kiện nhiệt độ từ -30 đến -5°C, bổ sung 5,7 ml (72,0 mmol) pyridin vào dung dịch axit (*R*)-2-(1-hydroxy-*n*-pentyl)benzoic (5,0 g, 24,0 mmol) trong điclometan (150 ml), sau đó thêm từ từ từng giọt 7,2 ml (72,0 mmol) anhydrit axetic, và dung dịch được khuấy trong 5 giờ. Sau phản ứng, khoảng 20 ml axit clohydric 10% được bổ sung để axit hóa dung dịch phản ứng đến độ pH 2-3. Dung dịch phản ứng được khuấy trong 2 giờ. Phần lớp hữu cơ được tách ra, sấy khô với Na₂SO₄ dạng khan, lọc, cô đặc dưới áp suất giảm, và thực hiện sắc ký cột [ete dầu mỏ: etyl axetat (v:v) = 10:1] để thu được 4,8 g các tinh thể axit (*R*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl)benzoic hình kim màu trắng với hiệu suất 81%; m.p.: 65–66°C; $[\alpha]^{20}_D = +38,2^\circ$ (c = 1,00, CH₃OH); MS (m/z): 249 [M₁–H]⁻; ¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ (ppm): 0,97 (t, 3H, CH₃, J = 6,9 Hz), 1,38–1,52 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,84–1,99 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2,17 (s, 3H, CHOCOCH₃), 6,69 (dd, 1H, CH₂CHOCOCH₃, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 4,5 Hz), 7,38–7,44 (m, 1H, ArH), 7,56–7,65 (m, 2H, ArH), 8,09–8,12 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 174,4; 131,2; 128,8; 128,3; 127,2; 74,9; 61,1; 54,4; 40,5; 27,6; 27,2; 23,9; 21,7; 13,3.

Trong điều kiện nhiệt độ từ -5 đến 30°C, hòa tan 4,8 g (19,2 mmol) axit (*R*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl)benzoic trong 25 ml etanol nguyên chất. Trong khi khuấy, bổ sung 3,3 g (19,2 mmol) L-arginin để tạo thành muối. Kết tủa được lọc và kết tinh lại với etanol 95% để thu được 4,6 g chất rắn dạng bột màu trắng I_{1r} với hiệu suất 57%; m.p.: 178–179°C; $[\alpha]^{20}_D = +32,8^\circ$ (c = 1,00, CH₃OH); MS (m/z): 249 [M₁–H]⁻, 175 [M₂ + H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm): 0,75 (t, 3H, CH₃, J = 6,0 Hz), 1,10–1,30 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,48–1,66 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1,74–1,82 (m, 4H, CH₂CH₂CHCOOH), 2,01 (s, 3H, COCH₃), 3,13 (t, 2H, NHCH₂CH₂, J = 6,6 Hz), 3,62 (dd, 1H, CH₂CHCOOH, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 6,0 Hz), 6,05 (dd, 1H, CH₂CHOCOCH₃, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 6,6 Hz), 7,21–7,38 (m, 4H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (ppm): 177,5; 174,3; 173,8; 138,1; 136,8; 128,7; 127,7; 126,9; 125,8; 74,9; 54,4; 40,6; 35,2; 27,6; 27,2; 24,5; 23,9; 21,7; 20,7; 13,3.

Ví dụ 9: Điều chế aminoguanidin (*R*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (I_{7r})

Hòa tan 2,6 g (19,2 mmol) aminoguanidin bicacbonat trong 15 ml nước. Trong khi khuấy, dung dịch được làm nóng từ từ đến 60°C. Sau khi làm lạnh, trong điều kiện nhiệt

độ từ -5 đến 30°C, bổ sung 4,8 g (19,2 mmol) dung dịch axit (*R*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl)benzoic (được điều chế bằng phương pháp của ví dụ 8) trong 25 ml etanol nguyên chất. Dung dịch phản ứng được cô đặc đến khi khô cạn dưới áp suất giảm và kết tinh lại với etanol 95% để thu được 1,9 g chất rắn dạng bột màu trắng I_{7r} với hiệu suất 43%; m.p.: 109–111°C; $[\alpha]^{20}_D = +28,9^\circ$ ($c = 1,00$, CH₃OH); MS (m/z): 249 [M₁– H]⁻, 75 [M₂ + H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm): 0,97 (t, 3H, CH₃, J = 6,9 Hz), 1,38–1,52 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,84–1,99 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2,17 (s, 3H, CHOCOCH₃), 6,69 (dd, 1H, CH₂CHOCOCH₃, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 4,5 Hz), 7,38–7,44 (m, 1H, ArH), 7,56–7,65 (m, 2H, ArH), 8,09–8,12 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (ppm): 174,4; 158,1; 131,2; 128,8; 128,3; 127,2; 74,9; 61,1; 54,4; 40,5; 27,6; 27,2; 23,9; 21,7; 13,3.

Ví dụ 10: Điều chế L-arginin (*S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (I_{1s})

Axit (*S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl)benzoic và L-arginin (*S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (I_{1s}) được điều chế bằng phương pháp tương tự phương pháp điều chế L-arginin (*R*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (I_{1r}) trong ví dụ 8.

Axit (*S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl)benzoic: m.p.: 65–66°C; $[\alpha]^{20}_D = -37,1^\circ$ ($c = 1,00$, CH₃OH); MS(m/z): 249 [M₁– H]⁻; ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 0,97 (t, 3H, CH₃, J = 6,9 Hz), 1,38–1,52 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,84–1,99 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2,17 (s, 3H, CHOCOCH₃), 6,69 (dd, 1H, CH₂CHOCOCH₃, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 4,5 Hz), 7,38–7,44 (m, 1H, ArH), 7,56–7,65 (m, 2H, ArH), 8,09–8,12 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ (ppm): 174,4; 131,2; 128,8; 128,3; 127,2; 74,9; 61,1; 54,4; 40,5; 27,6; 27,2; 23,9; 21,7; 13,3.

L-arginin (*S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (I_{1s}): hiệu suất 57%, m.p.: 178–179°C; $[\alpha]^{20}_D = -25,2^\circ$ ($c = 1,00$, CH₃OH); MS (m/z): 249 [M₁– H]⁻, 175 [M₂ + H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm): 0,76 (t, 3H, CH₃, J = 6,0Hz), 1,13–1,33 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,52–1,65 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 1,76–1,83 (m, 4H, CH₂CH₂CHCOOH), 2,01 (s, 3H, COCH₃), 3,14 (t, 2H, NHCH₂CH₂, J = 6,9Hz), 3,64 (dd, 1H, CH₂CHCOOH, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 6,0 Hz), 6,05 (dd, 1H, CH₂CHOCOCH₃, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 6,6 Hz), 7,24–7,38 (m, 4H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (ppm): 177,5; 174,3; 173,8; 138,1; 136,8; 128,7; 127,7; 126,9; 125,8; 74,9; 54,4; 40,6; 35,2; 27,6; 27,2; 24,5; 23,9; 21,7; 20,7; 13,3.

Ví dụ 11: Điều chế aminoguanidin (*S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (*I*_{7s})

Aminoguanidin (*S*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (*I*_{7s}) với hiệu suất 43% được điều chế bằng phương pháp tương tự với phương pháp điều chế aminoguanidin (*R*)-2-(1-axetoxy-*n*-pentyl) benzoat (*I*_{7r}) trong ví dụ 9; m.p.: 109–111°C; $[\alpha]^{20}_D = -30,2^\circ$ ($c = 1,00$, CH₃OH); MS (m/z): 249 [M₁ – H]⁻, 75 [M₂ + H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, D₂O): δ (ppm): 0,97 (t, 3H, CH₃, $J = 6,9$ Hz), 1,38–1,52 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,84–1,99 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 2,17 (s, 3H, CHOCOCH₃), 6,69 (dd, 1H, CH₂CHOCOCH₃, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 4,5$ Hz), 7,38–7,44 (m, 1H, ArH), 7,56–7,65 (m, 2H, ArH), 8,09–8,12 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, D₂O): δ (ppm): 174,4; 158,1; 131,2; 128,8; 128,3; 127,2; 74,9; 61,1; 54,4; 40,5; 27,6; 27,2; 23,9; 21,7; 13,3.

Ví dụ 12: Điều chế L-arginin (*R/S*)-2-(1-hydroxy-*n*-pentyl) benzoat (AHPB)

Trong điều kiện nhiệt độ từ -30 đến -5°C, dung dịch 1,9 g (10,3 mmol) arginin trong nước (20 ml) được thêm từ từ từng giọt vào (2,2 g, 10,5 mmol) dung dịch axit (*R/S*)-2-((1-hydroxy-*n*-pentyl)benzoic trong etanol (20 ml), và phản ứng được thực hiện trong khi khuấy trong 2 giờ. Dung dịch phản ứng được cô đặc đến khi khô cạn dưới áp suất giảm, và bổ sung một lượng thích hợp axeton. Kết tủa rắn màu trắng được lọc và sấy khô trong chân không để thu được 3,2 g AHPB. Chất rắn có thể hút ẩm rất dễ dàng, và hiệu suất đạt được là 79%; MS (m/z): 207 [M₁ – H]⁻, 175 [M₂ + H]⁺; ¹H NMR (300 MHz, MeOD): δ 0,89 (t, 3H, CH₃, $J = 7,0$ Hz), 1,30–1,36 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1,74–1,81 (m, 4H, CH₂CH₂CHCOOH), 1,82–1,92 (m, 2H, CHCH₂CH₂), 3,21 (t, 2H, NHCH₂CH₂), 3,57 (dd, 1H, CH₂CHCOOH, $J_1 = 7,5$ Hz, $J_2 = 6,0$ Hz), 4,86 (dd, 1H, CH₂CHOH, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 4,5$ Hz), 7,21–7,32 (m, 1H, ArH), 7,33–7,38 (m, 2H, ArH), 7,57–7,64 (m, 1H, ArH); ¹³C NMR (75 MHz, MeOD): δ 177,1; 160,9; 145,7; 141,9; 132,2; 132,1; 132,0; 130,3; 130,2; 129,9; 57,6; 43,9; 40,6; 31,8; 31,6; 27,8; 25,7; 16,5.

Ví dụ 13: Thử nghiệm độ hòa tan

Phương pháp thử nghiệm: cân 10 mg mẫu thử nghiệm (chất rắn được nghiền thành bột mịn) và thêm vào một lượng nhất định dung môi ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ (nhiệt độ bể nước được kiểm soát ở 25°C), và mỗi 5 phút dung dịch được lắc mạnh trong 30 giây. Quan sát quá trình hòa tan trong vòng 30 phút. Mẫu thử nghiệm được xem là hòa tan hoàn toàn khi không nhìn thấy các hạt hòa tan hoặc các giọt.

Kết quả thử nghiệm:

Bảng 1: Độ hòa tan bão hòa của các hợp chất trong nước*

Tên mẫu	Độ hòa tan bão hòa trong H ₂ O (mg/ml)		
	I _{1s}	PHPB	(S)-NBP
Lượng mẫu được hòa tan	133,80	148,30	0,72
	134,24	148,04	0,71
	138,23	145,97	0,35
	138,40	145,98	0,36
Trung bình	136,17	147,07	0,54
SD	2,49	1,27	0,21
RSD	1,83	0,86	38,90

* I_{1s}: L-arginin (S)-2-(1-axetoxy-n-pentyl) benzoat; PHPB: kali (R/S)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat; (S)-NBP: (S)-butylphatalua.

Kết luận: Độ hòa tan trong nước của hợp chất I_{1s} là tương đương với độ hòa tan của PHPB, và tốt hơn đáng kể so với độ hòa tan của S-NBP.

Ví dụ 14: Tính ổn định ban đầu

Phương pháp thử nghiệm:

Ngày 25/06/2018: 10 mg mẫu I_{1s} được cân chính xác và thêm vào ống đo màu, và pha loãng với dung môi (nước/metanol) đến 10 ml để điều chế dung dịch gốc có nồng độ là 1 mg/ml. Đối với từng mẫu thử nghiệm, dung dịch gốc được lấy và pha loãng mới.

Ngày /06/2018: hút 200 µL dung dịch gốc, bổ sung 3800 µL pha động theo tỷ lệ ban đầu, và điều chế được 10 µL mẫu thử nghiệm có nồng độ 50 µg/mL dùng để tiêm và phân tích.

Ngày 02/07/2018: hút 200 µL dung dịch gốc, bổ sung 3800 µL pha động theo tỷ lệ ban đầu, và điều chế được 10 µL mẫu thử nghiệm có nồng độ 50 µg/mL dùng để tiêm và phân tích.

Ngày 07/07/2018: hút 200 µL dung dịch gốc, bổ sung 3800 µL pha động theo tỷ lệ ban đầu, và điều chế được 10 µL mẫu thử nghiệm có nồng độ 50 µg/mL dùng để tiêm và phân tích.

Kết quả thử nghiệm:

Các ảnh phổ phân tích tính ổn định của hợp chất I_{1s} trong các ngày 29/06/ 2018, 02/07/2018, và 07/07/2018 được thể hiện trên Fig.1 và Fig.2, trong đó Fig.1 thể hiện tính ổn định của dung dịch mẫu trong H₂O, và Fig.2 thể hiện tính ổn định của dung dịch mẫu trong CH₃OH.

Kết luận: Hợp chất I_{1s} về cơ bản ổn định trong nước và metanol trong suốt quá trình thử nghiệm (ngày 29/06/2018, 02/07/2018, và 07/07/2018).

Ví dụ 15: Hoạt tính chống lại sự kết tập tiểu cầu in vitro

Các động vật thử nghiệm: thỏ trắng nuôi New Zealand, một nửa đực và một nửa cái, cân nặng từ 1,8-2,2 kg, được đặt mua từ Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., và được nuôi trong phòng động vật không mang mầm bệnh cụ thể (Specific pathogen free: SPF) sạch sẽ và hợp vệ sinh với nhiệt độ trong phòng được kiểm soát ở $25 \pm 2^\circ\text{C}$ và độ ẩm tương đối 60-75%. Sau 1 tuần động vật được sử dụng làm thí nghiệm.

Phương pháp thử nghiệm:

Điều chế huyết tương giàu tiểu cầu (platelet-rich plasma: PRP) và huyết tương nghèo tiểu cầu (platelet-poor plasma: PPP)

Thỏ bị bỏ đói trong 12-18 giờ được gây mê bằng cách tiêm màng bụng dung dịch uretan 20%. Động mạch cảnh chung được tách ra, và ống polyetylen được luồn vào động mạch cảnh chung để thu thập máu. Mẫu máu được đưa vào ống ly tâm silic hóa có chứa dung dịch natri xitrat 3,8% chiếm 1/10 thể tích ống. Máu được trộn đều nhẹ nhàng với chất chống đông, và được ly tâm với tốc độ 1000 vòng/phút trong 15 phút. Huyền phù màu be ở phía trên được hút ra để thu được huyết tương giàu tiểu cầu. Phần huyết tương còn lại được ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 15 phút, và dịch nổi được hút để điều chế huyết tương nghèo tiểu cầu (PPP). PRP được điều chỉnh với PPP để tạo thành số lượng tiểu cầu ở nồng độ $1 \times 10^8/\text{ml}$.

Xác định tỷ lệ kết tập tiểu cầu bằng cách đo độ đục ở 37°C

Lấy 260 μl huyết tương giàu tiểu cầu (PRP) cho vào ống đo độ đục. Sau đó thêm 10 μl các hợp chất thử nghiệm với các nồng độ khác nhau, các thuốc đối chứng dương hoặc nước muối sinh lý được thêm vào riêng rẽ, và huyết tương được ủ ở 37°C trong 5 phút. Sau đó bổ sung 30 μl chất cảm ứng vào theo thứ tự. Nồng độ cuối cùng của chất

cảm ứng APD là 10 μ M, và nồng độ cuối cùng của chất cảm ứng AA là 1 mM. Tỷ lệ kết tập tối đa trong 5 phút được xác định bởi máy đo kết tập, và tỷ lệ ức chế của các thuốc trên kết tập tiểu cầu được tính toán. Tỷ lệ ức chế của kết tập tiểu cầu (Inhibition rate of platelet aggregation: IRPA) = (tỷ lệ kết tập tiểu cầu của nhóm đối chứng - tỷ lệ kết tập tiểu cầu của nhóm thử nghiệm)/tỷ lệ kết tập tiểu cầu của nhóm đối chứng \times 100%.

Kết quả thử nghiệm:

Bảng 2: Hoạt tính ức chế của các hợp chất sáng chế do ADP và AA gây ra kết tập tiểu cầu ở thỏ*

Hợp chất	IC ₅₀ (mM)		Hợp chất	IC ₅₀ (mM)	
	ADP (10 μ M)	AA (1 mM)		ADP (10 μ M)	AA (1 mM)
Aspirin	0,78 \pm 0,05	0,16 \pm 0,01	I ₁	0,74 \pm 0,09	0,18 \pm 0,03
(<i>R/S</i>)-NBP	1,36 \pm 0,13	0,60 \pm 0,07	I ₂	0,65 \pm 0,04	0,19 \pm 0,02
(<i>S</i>)-NBP	1,29 \pm 0,11	0,50 \pm 0,04	I ₃	1,26 \pm 0,07	0,52 \pm 0,03
(<i>R</i>)-NBP	1,60 \pm 0,15	0,66 \pm 0,07	I ₄	0,82 \pm 0,05	0,17 \pm 0,07
L-arginin	5,86 \pm 0,69	5,13 \pm 0,65	I ₅	1,15 \pm 0,08	0,46 \pm 0,03
(<i>R/S</i>)-APB	0,81 \pm 0,04	0,47 \pm 0,04	I ₆	0,77 \pm 0,05	0,14 \pm 0,01
(<i>S</i>)-APB	0,79 \pm 0,08	0,43 \pm 0,05	I ₇	1,18 \pm 0,06	0,28 \pm 0,07
(<i>R</i>)-APB	0,76 \pm 0,07	0,19 \pm 0,02	I _{1r}	0,73 \pm 0,07	0,18 \pm 0,03
(<i>S</i>)-APB + L-arginin	0,75 \pm 0,05	0,37 \pm 0,03	I _{7r}	0,94 \pm 0,05	0,21 \pm 0,01
AHPB	0,98 \pm 0,21	0,34 \pm 0,04	I _{1s}	0,72 \pm 0,08	0,16 \pm 0,02
PHPB	0,96 \pm 0,07	0,35 \pm 0,09	I _{7s}	0,68 \pm 0,03	0,12 \pm 0,01

*ASP: Aspirin; (*R/S*)-, (*R*)-, và (*S*)-NBP: (*R/S*)-, (*R*)-, và (*S*)-butylphatalua tương ứng; L-Arg: L-arginin; (*R/S*)-, (*R*)-, và (*S*)-APB: axit (*R/S*)-, (*R*)-, và (*S*)-2-(1-axetoxyn-pentyl)benzoic tương ứng; AHPB: L-arginin (*R/S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat; PHPB: kali (*R/S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat; I₁, I_r, và I_{1s}: L-arginin (*R/S*)-, (*R*)-, và (*S*)-2-(1-axetoxyn-pentyl) benzoat tương ứng; các hợp chất I₂-I₇, I_{7r}, và I_{7s}: tham khảo các ví dụ 2-11.

Ví dụ 16: Hoạt tính chống huyết khối

1. Ảnh hưởng thời gian chảy máu ở chuột sau khi cắt đuôi

Động vật thử nghiệm:

Chuột Côn Minh SPF, cân nặng từ 18-22 g, được đặt mua từ Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., có số chứng nhận của SCXK (Bắc Kinh) 2010-0002, được nuôi trong phòng động vật SPF với nhiệt độ trong phòng được kiểm soát ở $23 \pm 2^\circ\text{C}$, và cho phép ăn uống thoải mái. Thời gian ngày đêm 12 giờ/12 giờ.

Phương pháp thử nghiệm:

48 chuột Côn Minh, cân nặng từ 18-22 g, 24 đực và 24 cái, được chia ngẫu nhiên vào 8 nhóm: nhóm đối chứng âm, nhóm ASP, nhóm clopidogrel, nhóm ASP + clopidogrel, nhóm I_{1s} , nhóm I_{1s} + Aspirin, nhóm I_{1s} + clopidogrel, và nhóm I_{1s} + aspirin + clopidogrel. Mức liều lượng sử dụng của nhóm đối chứng dương và nhóm thuốc thử nghiệm là 5 mg/kg, và liều lượng tương tự nước muối sinh lý được sử dụng cho nhóm đối chứng âm. Tất cả chuột được sử dụng thuốc qua đường miệng ngày 1 lần liên tục trong 14 ngày. 1 giờ sau liều cuối cùng, chuột được gây mê với isofluran 1-2%, và cắt 5 mm đuôi. Đầu của các đuôi được thấm khô với giấy lọc 30 giây 1 lần cho đến khi máu ngừng chảy tự nhiên. Thời gian chảy máu được xác định là khoảng giữa lúc bắt đầu và lúc dừng chảy máu.

Kết quả thử nghiệm:

Bảng 3: Kết quả chảy máu*

Hợp chất	Thời gian chảy máu (phút)
Nhóm đối chứng	$14,28 \pm 0,50$
Aspirin	$22,52 \pm 1,31$
Clopidogrel	$25,28 \pm 0,48$
Aspirin + clopidogrel	$27,36 \pm 1,36$
I_{1s}	$25,31 \pm 1,01$
I_{1s} + aspirin	$27,85 \pm 1,25$
I_{1s} + clopidogrel	$29,69 \pm 1,33$
I_{1s} + aspirin + clopidogrel	$29,77 \pm 1,18$

* I_{1s} : L-arginin (S)-2-(1-axetoxy-n-pentyl) benzoat.

Kết luận: Thời gian chảy máu của chuột dưới tác động của hợp chất I_{1s} là tương đương với thời gian chảy máu của clopidogrel, và dài hơn so với aspirin, cho thấy I_{1s} có hiệu quả chống huyết khối tốt hơn so với aspirin.

2. Tác dụng chống huyết khối bắc cầu động mạch ở chuột

Các động vật thử nghiệm:

Chuột đực SD, cân nặng từ 250-280 g, được đặt mua từ Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., được nuôi trong môi trường nuôi dưỡng SPF với nhiệt độ phòng được kiểm soát ở $23 \pm 2^\circ\text{C}$, và cho phép ăn uống thoải mái. Tổng số lượng chuột là 64.

Các nhóm thử nghiệm:

Nhóm mẫu: tiêm thể tích giống nhau nước muối sinh lý (có chứa DMSO 1%) thông qua tĩnh mạch đuôi, và sử dụng liên tục trong 7 ngày. Thử nghiệm bắt đầu sau 2 giờ sau liều cuối cùng ($n = 8$).

Các nhóm thuốc thử nghiệm: nhóm Aspirin, nhóm *S*-NBP(*S*-butylphatalua), nhóm Edaravone, nhóm PHPB (kali (*R/S*)-2-(1-hydroxy-*n*-pentyl) benzoat), nhóm I_1 , nhóm I_{1r} , và nhóm I_{1s} . Liều dùng của tất cả các thuốc là 10 mg/kg/ngày. Các thuốc được pha vào các dung dịch muối sinh lý có chứa DMSO 1%, và được tiêm thông qua tĩnh mạch đuôi liên tục trong 7 ngày. Thử nghiệm được bắt đầu 2 giờ sau liều dùng cuối cùng ($n = 8$).

Phương pháp thử nghiệm:

Chuột được tiêm màng bụng với dung dịch natri pentobarbital 3% (30 mg/kg). Sau khi gây mê, chuột được cố định ở tư thế nằm nửa, và tiến hành rạch ở giữa cổ để tách động mạch cảnh chung bên phải và tĩnh mạch cảnh trái. Sợi chỉ khâu dài 6 cm được đưa vào lòng ống polyetylen (sợi chỉ cần được cân trước khi đưa vào ống), và ống polyetylen chứa đầy dung dịch muối heparin (50 U/ml). Ống polyetylen được luồn vào các mạch máu riêng rẽ để tạo động mạch và tĩnh mạch dạng vòng. Sau 15 phút dòng máu lưu thông, sợi chỉ được lấy ra, và sợi chỉ có huyết khối được lấy và cân ngay. Sau đó, sau khi sợi chỉ được sấy khô ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, xác định được trọng lượng khô. Tổng trọng lượng trừ đi khối lượng của sợi chỉ là trọng lượng ướt của cục huyết khối, và trọng lượng khô trừ là trọng lượng khô của cục huyết khối. Tỷ lệ ức chế huyết khối (%) = (trọng lượng ướt/trọng lượng khô của cục huyết khối trong nhóm mẫu - trọng lượng ướt/trọng lượng khô của cục huyết khối trong nhóm sử dụng) ÷ trọng lượng ướt/trọng lượng khô của cục huyết khối trong nhóm mẫu $\times 100\%$

Kết quả thử nghiệm:

Tham chiếu trên Fig.3 và bảng 4. Như thể hiện trên Fig.3: (A) Trọng lượng ướt của cục huyết khối; (B) Trọng lượng khô của cục huyết khối; Dữ liệu được biểu thị dưới dạng trung bình \pm SD (n = 8), *P <0,05, **P <0,01; So với nhóm I_{1s}: # P <0,05, ## P <0,01.

Bảng 4. Ảnh hưởng của các hợp chất thử nghiệm với huyết khối bắc cầu động mạch ở chuột ^o

Hợp chất	Số lượng động vật	Trọng lượng ướt của cục huyết khối	Tỷ lệ ức chế (%)	Trọng lượng khô của cục huyết khối	Tỷ lệ ức chế (%)
Nhóm mẫu	8	36,21 \pm 1,16		10,04 \pm 0,62	
Aspirin	8	21,46 \pm 1,76 ^{**##}	40,74 ^{##}	6,06 \pm 0,46 ^{**##}	39,67 ^{##}
S-NBP	8	24,18 \pm 1,02 ^{**##}	33,24 ^{##}	7,44 \pm 0,37 ^{**##}	25,95 ^{##}
Edaravone	8	24,95 \pm 1,20 ^{**##}	31,12 ^{##}	8,23 \pm 0,53 ^{**##}	18,05 ^{##}
PHPB	8	30,64 \pm 10,21 ^{**}	15,39	8,90 \pm 0,45 ^{**}	11,32
I _{1s}	8	20,23 \pm 1,25 ^{**}	44,14	5,52 \pm 0,44 ^{**}	45,02
I ₁	8	25,81 \pm 2,20 ^{**}	28,72	7,64 \pm 0,40 ^{**}	23,94
I _{1r}	8	29,56 \pm 1,84 ^{**}	18,37	8,51 \pm 0,18 ^{**}	15,23

*P < 0,05, **P < 0,01, # P < 0,05, ## P < 0,01.

^oS-NBP: S-butylphatalua; PHPB: kali (R/S)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat; I₁, I_r, và I_{1s}: (R/S)-, (R)-, và L-arginin (S)-2-(1-axetoxy-n-pentyl) benzoat tương ứng.

Kết luận: So với nhóm mẫu, với liều dùng 10 mg/kg aspirin, S-NBP, Edaravone, PHPB, I_{1s}, I₁ và I_{1r} có thể giảm đáng kể trọng lượng ướt và trọng lượng khô của cục huyết khối ở chuột (p <0,01; p <0,01; p <0,01; p <0,01; p <0,01; p <0,01; p <0,01). Tác dụng ức chế của hợp chất I_{1s} trên huyết khối ở chuột mạnh hơn đáng kể so với cùng liều aspirin, S-NBP và Edaravone (p <0,01; p <0,01; p <0,01).

Ví dụ 17: Ảnh hưởng đến nhồi máu não, phù não và chức năng thần kinh ở chuột bị thiếu máu não cục bộ

Động vật thử nghiệm:

Chuột SPF SD, cân nặng từ 200-220 g, một nửa đực và một nửa cái, được đặt mua từ Beijing Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd., được nuôi trong môi trường nuôi dưỡng SPF với nhiệt độ trong phòng được kiểm soát ở 23 \pm 2°C, và cho

phép ăn uống thoải mái. Tổng số lượng chuột là 88.

Nhóm thử nghiệm:

Nhóm phẫu thuật giả: thể tích bằng nhau nước muối sinh lý (có chứa DMSO 1%) (tiêm tĩnh mạch 3 ngày), TTC (2, 3, 5-Triphenyl-2H-tetrazolium clorua), phù não và chức năng thần kinh (n = 8);

Nhóm mẫu: thể tích bằng nhau nước muối sinh lý (có chứa DMSO 1%) (tiêm tĩnh mạch 3 ngày, sử dụng 2 giờ sau tái truyền dịch), TTC, phù não và chức năng thần kinh (n = 8);

Nhóm *S*-NBP (*S*-butylphatalua), nhóm Edaravone, và nhóm PHPB (kali *R/S*-2-(1-hydroxy-*n*-pentyl) benzoat): 10 mg/kg/ngày (tiêm tĩnh mạch 3 ngày, sử dụng 2 giờ sau khi tái truyền dịch), TTC, phù não và chức năng thần kinh (n = 8);

Các nhóm *I*₁, *I*_r, *I*_{1s}, và *I*_{7s}: 10 mg/kg/ngày (tiêm tĩnh mạch 3 ngày, sử dụng 2 giờ sau khi tái truyền dịch), TTC, phù não và chức năng thần kinh (n = 8);

Nhóm sử dụng phối hợp đẳng mol *S*-APB (*S*-2-(1-axetoxi-*n*-pentyl)benzoic acid) + Arg (arginin): (*S*-APB 5,89 mg/kg + Arg 4,10 mg/kg)/ngày (tiêm tĩnh mạch 3 ngày, sử dụng 2 giờ sau tái truyền dịch), TTC, phù não và chức năng thần kinh (n = 8);

Nhóm sử dụng phối hợp đẳng mol *S*-APB + AGH (aminoguanidin hydroclorua): (*S*-APB 7,72 mg/kg + AGH 3,41 mg/kg)/ngày (tiêm tĩnh mạch 3 ngày, sử dụng 2 giờ sau khi tái truyền dịch), TTC, phù não và chức năng thần kinh (n = 8).

Phương pháp thử nghiệm:

Động mạch não giữa của chuột được chặn bằng phương pháp khâu kín, và tái truyền dịch sau 2 giờ. 2 giờ sau khi truyền dịch, chuột được tiêm với *S*-NBP, Edaravone, PHPB, *I*₁, *I*_r, *I*_{1s}, *I*_{7s}, phối hợp đẳng mol *S*-APB và arginin, phối hợp đẳng mol *S*-APB và aminoguanidin hydroclorua, và thể tích bằng nhau nước muối sinh lý (có chứa DMSO 1%) trong tĩnh mạch đuôi. Tất cả các thuốc được pha vào các dung dịch muối sinh lý có chứa DMSO 1% để sử dụng, và thời gian sử dụng được kiểm soát khoảng 1 phút. Các thuốc được sử dụng cho lần đầu tiên sau 2 giờ sau khi tái truyền dịch, và được sử dụng cứ 24 giờ một lần, tổng cộng là 3 lần. 2 giờ sau lần sử dụng cuối cùng, số điểm khuyết tật thần kinh thu được đầu tiên, và sau đó chuột từng nhóm được để chết. Toàn bộ não

bộ được lấy ra và cân trọng lượng (khối lượng ướt), nhuộm TTC, và để khô để xác định ảnh hưởng của các hợp chất với nhồi máu não và phù não.

Điểm khuyết tật thần kinh

2 giờ sau liều sử dụng cuối cùng, các khuyết tật thần kinh của động vật được phân loại và cho điểm bằng phương pháp của Longa. Các tiêu chí như sau: 0 điểm: không có dấu hiệu thần kinh; 1 điểm: khi động vật bị treo lơ lơ với đuôi được nâng lên, hoạt động của chân trước đối bên của con vật có biểu hiện gập cổ chân và khuỷu chân, xoay vai trong, gập khuỷu chân, và áp sát vào thành ngực; 2 điểm: khi đặt động vật trên mặt phẳng nhẵn và đẩy vai bên hoạt động về phía đối diện thì lực cản giảm; 3 điểm: khi động vật đi tự do, động vật quay đầu hoặc quay lại, xung quanh phía đối diện của hoạt động; và 4 điểm: động vật có biểu hiện liệt mềm, không quan sát thấy cử động tự phát của các chi.

Nhuộm TTC

Sau khi hoàn thành kiểm tra hành vi thần kinh, thực hiện bốn vết mổ xương sọ toàn bộ não của chuột trên giao thoa thị giác và các vị trí phía trước 2 mm của giao thoa thị giác. Sau khi toàn bộ não được cắt thành năm lát, các lát não nhanh chóng được đặt vào 5 ml dung dịch đệm phosphat có TTC 2%, và được ủ trong bóng tối ở 37°C. Trong quá trình ủ, các lát não được lật 5 phút một lần. Sau khi ủ 10 phút, các lát não được lấy ra và các hình ảnh được chụp bởi camera kỹ thuật số (Olympus C-4000, Nhật Bản). Sau đó vùng tái trắng (vùng nhồi máu) và vùng không tái trắng (vùng bình thường) được tách riêng bằng cách sử dụng các kẹp mắt, và phần trăm nhồi máu được tính bằng Image pro-plus 6.0 như sau:

Phần trăm nhồi máu (%) = khối lượng vùng tái trắng / (khối lượng vùng tái trắng + khối lượng vùng không tái trắng) × 100%;

Tỷ lệ ức chế vùng nhồi máu (%) = (phần trăm nhồi máu của nhóm mẫu (%) – phần trăm nhồi máu của nhóm sử dụng (%)) / phần trăm nhồi máu của nhóm mẫu (%) × 100%.

Mô não đã nhuộm được sấy khô trong lò sấy ở 105°C, và cân (khối lượng khô) sau 24 giờ. Công thức tính của hàm lượng nước trong não như sau:

Hàm lượng nước của mô não (%) = (khối lượng ướt của mô não – khối lượng khô

của mô não)/khối lượng ướt của mô não $\times 100\%$;

Tỷ lệ phù não (%) = hàm lượng nước trong mô não của từng nhóm (%) – hàm lượng nước trong mô não của nhóm phẫu thuật giả (%) / hàm lượng nước trong mô não của nhóm phẫu thuật giả (%) $\times 100\%$;

Tỷ lệ ức chế phù não (%) = (tỷ lệ phù não của nhóm mẫu (%) - tỷ lệ phù não của nhóm sử dụng (%)) / tỷ lệ phù não của nhóm mẫu (%) $\times 100\%$.

Kết quả thử nghiệm:

Các ảnh hưởng của các hợp chất trên thể tích nhồi máu, phù não và thiếu sót thần kinh của chuột MCAO được thể hiện trên Fig.4, bảng 5 và bảng 6. Như thể hiện trên Fig.4: (A) phân tích hình ảnh não bộ và nhuộm TTC; (B) dữ liệu thể tích nhồi máu; (C) hàm lượng nước trong não; và (D) đánh giá thiếu sót thần kinh. Ngoại trừ giá trị trung bình của điểm khuyết tật thần kinh ($n = 8$), dữ liệu khác được thể hiện là trung bình \pm SD. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$; # $P < 0,05$, ## $P < 0,01$.

Bảng 5: Các ảnh hưởng của các hợp chất trên thể tích nhồi máu não*

Hợp chất	Thể tích nhồi máu (%)	Tỷ lệ ức chế của thể tích nhồi máu (%)
Nhóm phẫu thuật giả	0	/
Nhóm mẫu	41,85 \pm 2,43	/
S-NBP	14,18 \pm 2,69	66,12
Edaravone	14,29 \pm 2,58	65,85
PHPB	20,23 \pm 3,02	51,66
I _{1s}	9,12 \pm 1,18	78,21
I ₁	16,11 \pm 2,74	61,50
I _{1r}	20,14 \pm 2,95	51,89
I _{7s}	24,83 \pm 2,02	40,67
S-APB + Arg	24,93 \pm 2,2	40,43
S-APB + AGH	25,27 \pm 1,80	39,61

* S-NBP: S-butylphatalua; PHPB: kali R/S-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat; I₁, I_r, và I_{1s}: L-arginin R/S-, R-, và S-2-(1-axetoxi-n-pentyl) benzoat tương ứng; I_{7s}: aminoguanidin S-2-(1-axetoxi-n-pentyl) benzoat; S-APB: axit S-2-(1-axetoxi-n-pentyl)benzoic; Arg: L-arginin; AGH: aminoguanidin hydroclorua.

Bảng 6: Các ảnh hưởng của các hợp chất trên phù não*

Hợp chất	Phù não (%)	Tỷ lệ ức chế của phù não (%)
Nhóm phẫu thuật giả	0	/
Nhóm mẫu	16,04 ± 2,82	0
S-NBP	4,45 ± 4,58	72,28
Edaravone	4,49 ± 4,84	72,01
PHPB	10,71 ± 3,55	33,23
I _{1s}	0,18 ± 3,96	98,85
I ₁	4,97 ± 3,30	69,00
I _{1r}	10,72 ± 4,19	33,20
I _{7s}	12,34 ± 4,57	23,07
S-APB + Arg	11,54 ± 4,57	28,05
S-APB + AGH	12,90 ± 4,86	19,58

* S-NBP: S-butylphatalua; PHPB: kali R/S-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat; I₁, I_r, và I_{1s}: L-arginin R/S-, R-, và S-2-(1-axetoxy-n-pentyl) benzoat tương ứng; I_{7s}: aminoguanidin S-2-(1-axetoxy-n-pentyl) benzoat; axit S-APB: S-2-(1-axetoxy-n-pentyl)benzoic; Arg: L-arginin; AGH: aminoguanidin hydroclorua.

Kết luận: L-arginin S-2-(1-axetoxy-n-pentyl) benzoat (I_{1s}) có hiệu quả ức chế đáng kể nhất đến nhồi máu não và phù não ở chuột và hiệu quả cải thiện thần kinh đáng kể ở chuột bị thiếu máu não cục bộ 2 giờ sau khi tái truyền dịch, là tốt hơn liều đẳng mol của S-APB và L-arginin ở dạng phối hợp, và tốt hơn so với liều tương tự của S-NBP, PHPB và Edaravone.

Phương pháp để kiểm tra các ảnh hưởng của L-arginin (R/S)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat (AHPB) trong nhồi máu não, phù não và chức năng thần kinh của chuột bị thiếu máu não cục bộ là như nhau giống bên trên, và các kết quả như sau:

Ảnh hưởng của hợp chất AHPB trên thể tích nhồi máu, phù não và khuyết tật thần kinh ở chuột MCAO được thể hiện trên Fig.5, bảng 7 và bảng 8. Như thể hiện trên Fig.5: (A) phân tích hình ảnh não bộ và nhuộm TTC; (B) Dữ liệu thể tích nhồi máu; (C) Hàm lượng nước trong não; (D) Đánh giá thiếu sót thần kinh 12 giờ sau khi tái truyền dịch; (E) Đánh giá thiếu sót thần kinh 24 giờ sau khi tái truyền dịch. Ngoại trừ giá trị trung bình của điểm khuyết tật thần kinh (n = 8), dữ liệu khác được thể hiện dưới dạng trung

binh \pm SD. *P <0,05, **P <0,01.

Bảng 7: Ảnh hưởng của L-arginin (*R/S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat (AHPB) trên thể tích nhồi máu*

Phương pháp sử dụng	Hợp chất (liều dùng)	Thể tích nhồi máu (%)	Tỷ lệ ức chế của thể tích nhồi máu (%)
/	Nhóm phẫu thuật giả	0	/
Tại thời điểm bắt đầu tái truyền dịch, sử dụng tiêm tĩnh mạch	Nhóm mẫu	49,19 \pm 11,16	/
	NBP (5 mg/kg)	28,55 \pm 8,25	41,96
	AHPB (5 mg/kg)	29,98 \pm 4,99	39,06
	AHPB (10 mg/kg)	19,83 \pm 3,95	59,69
	AHPB (20 mg/kg)	17,71 \pm 4,65	64,00
2 giờ sau khi bắt đầu tái truyền dịch, sử dụng tiêm tĩnh mạch	Nhóm mẫu	49,61 \pm 9,14	/
	NBP (5 mg/kg)	36,50 \pm 7,58	26,43
	AHPB (5 mg/kg)	37,54 \pm 6,94	24,34
	AHPB (10 mg/kg)	25,70 \pm 4,75	48,19
	AHPB (20 mg/kg)	23,56 \pm 5,29	52,51

* NBP: butylphatalua; AHPB: L-arginin (*R/S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat.

Bảng 8: Ảnh hưởng của L-arginin (*R/S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat (AHPB) trên phù não*

Phương pháp sử dụng	Hợp chất (Liều dùng)	Phù não (%)	Tỷ lệ ức chế phù não (%)
/	Nhóm phẫu thuật giả	0	/
Tại thời điểm bắt đầu tái truyền dịch, sử dụng tiêm tĩnh mạch	Nhóm mẫu	9,71 \pm 1,39	/
	NBP (5 mg/kg)	5,80 \pm 1,83	40,21
	AHPB (5 mg/kg)	5,94 \pm 2,45	38,82
	AHPB (10 mg/kg)	2,01 \pm 2,91	79,34
	AHPB (20 mg/kg)	2,08 \pm 4,58	78,57
2 giờ sau khi bắt đầu tái truyền dịch, sử dụng tiêm tĩnh mạch	Nhóm mẫu	9,44 \pm 4,17	/
	NBP (5 mg/kg)	6,72 \pm 4,05	28,80
	AHPB (5 mg/kg)	6,50 \pm 1,86	31,12
	AHPB (10 mg/kg)	3,03 \pm 2,87	67,94
	AHPB (20 mg/kg)	1,64 \pm 3,36	82,57

* NBP: butylphatalua; AHPB: L-arginin (*R/S*)-2-(1-hydroxy-n-pentyl) benzoat.

Kết luận: Tại cùng thời điểm tái truyền dịch hoặc 2 giờ sau khi truyền dịch, tiêm tĩnh mạch AHPB với liều lượng thấp (5 mg/kg) không có khác biệt đáng kể trong hiệu quả cải thiện nhồi máu não, phù não và chức năng thần kinh ở chuột bị thiếu máu não cục bộ so với NBP (5 mg/kg), trong khi liều lượng trung bình và cao (10, 20 mg/kg) của AHPB có hiệu quả tốt hơn trong cải thiện nhồi máu não và phù não so với NBP (5 mg/kg), và bằng với NBP (5 mg/kg) trong cải thiện chức năng thần kinh.

Ví dụ 18: Dược động học

Động vật thử nghiệm:

12 chuột đực SD, được cung cấp bởi Qinglongshan Animal Breeding Farm ở Quận Giang Ninh, Nam Kinh. Số sản xuất là SCXK (Giang Tô) 2017-0001. Trọng lượng cơ thể của chuột trong khoảng từ 180 đến 220 g. Chuột được sử dụng sau khi nuôi lớn trong phòng thí nghiệm của trung tâm động vật thí nghiệm trong 2 ngày sau khi đặt về, nhịn ăn trong 12 giờ trước khi sử dụng và 6 giờ sau khi sử dụng, và được cho phép uống thoải mái trong thời gian thử nghiệm.

Phương pháp thử nghiệm:

Chuột được tiêm với L-arginin (*S*)-2-(1-axetoxi-*n*-pentyl) benzoat (I_{1s}) (25 mg/kg) ở tĩnh mạch đuôi, và máu được lấy từ đám rối tĩnh mạch nền của chuột ở các thời điểm khác nhau. Nồng độ các thuốc ban đầu và chuyển hóa trong máu chuột được xác định bởi phân mền chuyên nghiệp dược động học và sử dụng phương pháp thống kê thời điểm để thu được các tham số dược động học tương ứng.

Kết quả thử nghiệm:

1. Hợp chất I_{1s} được chuyển hóa nhanh chóng thành axit cacboxylic và L-arginin tương ứng trong cơ thể. Chất chuyển hóa có hoạt tính axit (*S*)-2-(1-axetoxi-*n*-pentyl)benzoic (được viết tắt là chất chuyển hóa M2), axit (*S*)-2-(1-hydroxy-*n*-pentyl)benzoic (sản phẩm khử oxy hóa của M2) (M3) và (*S*)-NBP (M4) được tìm thấy trong huyết tương 2 phút sau khi sử dụng, trong đó M2 và M4 là chất chuyển hóa chính, và nồng độ của chất chuyển hóa trung gian M3 tương đối thấp.

2. Sau khi tiêm tĩnh mạch, nồng độ máu trước tiên giảm nhanh chóng theo thời gian, có thể liên quan tới sự phân phối nhanh chóng của thuốc trong cơ thể. Tương tự,

nồng độ máu giảm tương đối chậm và đi vào giai đoạn đào thải. Kết hợp với đường cong thời gian-logarit của nồng độ máu, thuốc cơ bản phù hợp với các đặc tính của mô hình hai ngăn (tham chiếu trên Fig.6).

3. Theo các thông số dược động học, thời gian bán hủy của các chất chuyển hóa có hoạt tính chính M2 và M4 trong huyết tương đều khoảng 3 giờ (tham khảo bảng 9) và lâu hơn thời gian bán hủy của NBP (44 phút), và PHPB (45 phút). (*Acta Pharmacol Sin.*, 2018, 39, 275-285).

4. Theo các thông số dược động học, các thể tích phân bố biểu kiến V_z và tốc độ thanh thải CL của M2, M3, và M4 tương đối lớn, cho thấy chúng được phân phối rộng rãi trong cơ thể và có thể được phân phối nhanh chóng từ huyết tương tới mô ngoại vi hoặc mô não (tham khảo bảng 9).

Bảng 9: Các thông số dược động học của từng chất chuyển hóa ở chuột sau khi sử dụng I_{1s}

Tham số	Đơn vị	M2			M3			M4		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
$t_{1/2}$	Giờ	2,71	3,34	3,87	5,13	5,79	16,57	2,99	3,43	3,39
C_{max}	ng/ml	51434,8	53513,2	52069,2	736,7	876,5	569,2	69795,2	65700,2	52513,6
AUC(0-t)	giờ*ng/ml	31712,4	28614,9	28503,7	517,6	577,8	492,6	40061,1	34160,8	32828,9
AUC(0-∞)	giờ*ng/ml	31765,4	28748,5	28703,5	624,1	673,9	858,7	40153,8	34287,8	32988,3
V_z	ml/kg	3075,2	4184,2	4858,4	296272,1	310110,9	695865,2	2683,8	3610,5	3704,0
Cl	ml/giờ/kg	787,02	869,61	870,97	40054,77	37097,53	29113,43	622,61	729,12	757,84

5. Các chất chuyển hóa có hoạt tính M2, M3, và M4 có thể được tìm thấy trong mô não. Nồng độ của M4 trong não bộ cao hơn so với các nồng độ liều đẳng mol của NBP và PHPB (*Acta Pharmacol Sin.*, 2018, 39, 275-285), và M2, M3, và M4 bị loại bỏ nhanh chóng theo thời gian, điều đó chỉ ra rằng M2, M3, và M4 có thể đi qua hàng rào máu não, phù hợp thực hiện chức năng trong mô não, và không tích tụ lại trong não trong khoảng thời gian dài để gây ra ngộ độc (tham khảo bảng 10 và Fig.7).

Bảng 10: Dữ liệu nồng độ của từng chất chuyển hóa trong mô não chuột sau khi tiêm tĩnh mạch I_{1s}

	Nồng độ trong mô não chuột (ng/g)

Thời gian (giờ)	M2				M3				M4			
	1	2	3	Trung bình	1	2	3	Trung bình	1	2	3	Trung bình
0,5	326,26	296,36	322,22	314,95	76,81	118,09	137,01	110,64	633,25	556,35	627,76	605,79
1	375,34*	39,1	58,82	48,96	35,51	39,47	32,78	35,92	388,42*	131,66	119,84	125,75
6	26,11	46,98	46,66	39,92	31,14	31,33	32,14	31,54	51,78	27,06	30,85	36,56

Kết luận: Hợp chất L-arginin (*S*)-2-(1-axetoxy-n-pentyl) benzoat (I_{1s}) có các đặc tính dược động học vượt trội.

Ví dụ 19: Hoạt tính ức chế trên cyclooxygenaza (cyclooxygenase: COX)

Các thiết bị thử nghiệm:

Máy làm sạch bằng sóng siêu âm SB-5200DT, Ningbo Scientz Biotechnology Co., Ltd.; tủ bảo quản thuốc YC-300L, Zhongke Meiling Cryogenics Co., Ltd.; lò sấy GZX-9140MBE, Shanghai Boxun Industrial Co., Ltd., Medical Equipment Factory; Direct-Q có đồng hồ nước siêu tinh khiết cho máy bơm, Millopore Corporation; cân điện tử BS224: Beijing Sartorius Instrument & System Co., Ltd.; máy khuấy từ 78-1, Changzhou Guohua Electric Co., Ltd.; máy ly tâm tốc độ cao nhiệt độ thấp 3K15, Sigma Corporation; đầu đọc vi tâm vi chức năng tầm vi giếng Berthold LB941, Berthold Corporation.

Phương pháp thử nghiệm:

Phần trăm ức chế của từng mẫu trên COX-1 và COX-2 được phát hiện. Công thức tính như sau: Tỷ lệ ức chế (%) = (RFU100% kiểm soát hoạt tính enzym - RFU mẫu)/(RFU100% kiểm soát hoạt tính enzym - RFU kiểm soát mẫu trắng) × 100%, trong đó RFU là đơn vị huỳnh quang tương đối (RFU: the relative fluorescence unit). Đối với chất ức chế được tìm thấy là có hiệu quả, giá trị IC₅₀ được phát hiện sau ảnh hưởng liều dùng thử nghiệm của chất ức chế.

Kết quả thử nghiệm:

Bảng 11: Các giá trị IC₅₀ của các hợp chất ức chế hoạt tính của COX-1 và COX-2

Hợp chất	IC ₅₀ (μM)	
	COX-1	COX-2
Aspirin	24,27 ± 2,15	1132 ± 76,51

I _{1s}	56,41 ± 3,79	1279 ± 102,5
-----------------	--------------	--------------

Kết luận: Hoạt tính của hợp chất I_{1s} trong ức chế COX-1 nhỏ hơn đáng kể so với hoạt tính của aspirin, cho thấy rằng hợp chất I_{1s} có ít phản ứng có hại với đường tiêu hóa hơn so với aspirin. Hoạt tính của hợp chất I_{1s} trong ức chế COX-2 là gần với aspirin, cho thấy rằng cả hợp chất I_{1s} và aspirin hiệu quả ức chế đáng kể đến chứng viêm qua COX-2 trung gian.

Ví dụ 20: Thử nghiệm tính an toàn sơ bộ

1. Thử nghiệm độc tính cấp tính

Các động vật thử nghiệm:

Chuột ICR, được cung cấp bởi Shanghai Lingchang Biotech Co., Ltd. Số đăng ký sản phẩm động vật phòng thí nghiệm là SCXK (Thượng Hải) 2013-0018, số chứng nhận 2013001834483, và số đăng ký sử dụng động vật phòng thí nghiệm là SYXK (Giang Tô) 2017-0015. Chuột khoảng 5-6 tuần tuổi, cân nặng 18-22g, con cái; và số lượng động vật là 50.

Phương pháp thử nghiệm:

Trên cơ sở thử nghiệm ban đầu, gradien nồng độ của thử nghiệm độc tính cấp tính của I_{1s} được đặt là: 1500, 1300, 1100, 900, 700 mg/kg; và nồng độ thuốc tương ứng là: 150, 130, 110, 90, 70 mg/ml. Thuốc thử nghiệm được điều chế thành các dung dịch thuốc với nồng độ tương ứng để sử dụng đồng thời cùng lúc (tiêm tĩnh mạch đuôi), các triệu chứng khác nhau của sốc thuốc và tử vong ở chuột được ghi nhận, và các động vật tử vong được mổ tử thi. Thời gian quan sát là 14 ngày.

Kết quả thử nghiệm:

Sau khi chuột được tiêm với liều lượng cao I_{1s} trong tĩnh mạch đuôi, chuột bị rối loạn và giảm hoạt động, và một số chuột bị chết sau 24 giờ. Chuột chết trong mỗi nhóm được được cắt ra, và không có bất thường rõ rệt nào ở các cơ quan khác. Các thay đổi trọng lượng cơ thể của từng nhóm mẫu được thể hiện trong bảng 12, và phân bố tử vong và các kết quả tính toán giá trị LD₅₀ (phương pháp Bliss) được thể hiện trong bảng 13.

Bảng 12: Ảnh hưởng của tiêm tĩnh mạch hợp chất I_{1s} trên trọng lượng cơ thể (M ±

SD)

Nhóm	Liều lượng (mg/kg)	Trọng lượng cơ thể (g)		
		D1	D7	D14
tiêm tĩnh mạch	1500	19,9 ± 0,2	21,0	23,6
	1300	19,5 ± 0,4	20,8 ± 0,6	22,1 ± 0,6
	1100	19,4 ± 0,6	21,0 ± 0,5	22,0 ± 0,5
	900	19,8 ± 0,5	20,9 ± 0,6	22,2 ± 0,6
	700	19,4 ± 0,6	21,0 ± 0,6	22,3 ± 0,7

Bảng 13: Tử vong và giá trị LD₅₀ tiêm tĩnh mạch hợp chất I_{1s}

Nhóm	Liều lượng (mg/kg)	Số lượng động vật (lượng)	Số lượng chết (lượng)	Giá trị LD ₅₀ (mg/kg)
tiêm tĩnh mạch	1500	10	9	1119,5038 (974,9831~1285,4466)
	1300	10	6	
	1100	10	4	
	900	10	2	
	700	10	1	

Kết luận: Giá trị LD₅₀ sử dụng tiêm tĩnh mạch của hợp chất L-arginin (S)-2-(1-axetoxy-n-pentyl) benzoat (I_{1s}) là 1119,5038 mg/kg.

2. Thử nghiệm ảnh hưởng trên kênh kali hERG

Sử dụng công nghệ phát hiện kẹp vá tự động, các ảnh hưởng của hợp chất I_{1s} và (S)-NBP với kênh kali hERG của tế bào CHO-hERG tại các nồng độ sử dụng khác nhau được nghiên cứu. Các kết quả thể hiện IC₅₀ của I_{1s} và (S)-NBP đều lớn hơn 40 µM, nhưng tỷ lệ ức chế (37,56%) của I_{1s} ở nồng độ cao nhất là thấp hơn so với tỷ lệ ức chế của (S)-NBP (41,45%), cho thấy rằng độc tố của I_{1s} với tim có thể thấp hơn độc tố của (S)-NBP.

3. Thử nghiệm đột biến ngược vi sinh vật

Thử nghiệm đột biến ngược vi sinh vật (thử nghiệm Ames) được thực hiện với hợp chất I_{1s} để xác nhận có I_{1s} có tiềm năng đột biến. Vi sinh vật thử nghiệm là các chủng thiếu hụt histidin TA97, TA98, TA100 và TA102 của *Salmonella typhimurium*, và phạm vi liều dùng của mẫu thử nghiệm là 0,1-1000 µg/đĩa. Thử nghiệm được thực hiện dưới điều kiện song song có và không có hỗn hợp enzyme gan động vật có vú (S9) và cho

các kết quả đều dương tính.

Ví dụ 21: Phương pháp bào chế dược phẩm

1. Viên nén

Thành phần	Hàm lượng (mg/viên)
(S)-2-(1-acyloxy-n-pentyl)benzoat	50
Tinh bột	30
Xenluloza vi tinh thể	20
Magie stearat	1
Natri cacboxymetyl xenluloza	3

Phương pháp điều chế: Các thành phần hoạt tính, tinh bột, xenluloza vi tinh thể và natri cacboxymetyl xenluloza được trộn đồng nhất với nhau theo tỷ lệ. Hỗn hợp được làm ẩm với nước và tạo thành hạt. Các hạt được sấy khô và định cỡ. Magie stearat được thêm vào, và sau khi trộn, hỗn hợp được ép để thu được các viên nén sản phẩm.

2. Viên nang

Thành phần	Hàm lượng (mg/nang)
(S)-2-(1-acyloxy-n-pentyl)benzoat	50
Tinh bột	30
Metyl xenluloza	5
PVP liên kết chéo	0,5

Phương pháp điều chế: Theo công thức, các thành phần hoạt tính và các chất phụ trợ được trộn, tạo hạt và sàng, và hỗn hợp thu được được đưa vào nang cứng có khả năng hòa tan trong dạ dày theo hàm lượng định trước để thu được các nang sản phẩm.

3. Thuốc tiêm tĩnh mạch

Thành phần	Hàm lượng
(S)-2-(1-acyloxy-n-pentyl)benzoat	10 mg/lọ
Nước để tiêm	Lượng thích hợp
Natri clorua để tiêm	Lượng thích hợp

Phương pháp điều chế: (S)-2-(1-acyloxy-n-pentyl)benzoat có khả năng hòa tan trong nước được hòa tan trong lượng nước thích hợp để tiêm. Lượng thích hợp natri clorua để tiêm được thêm vào. Đóng lọ và khử trùng được thực hiện trong các điều kiện

vô trùng để thu được dung dịch tiêm tĩnh mạch của sản phẩm.

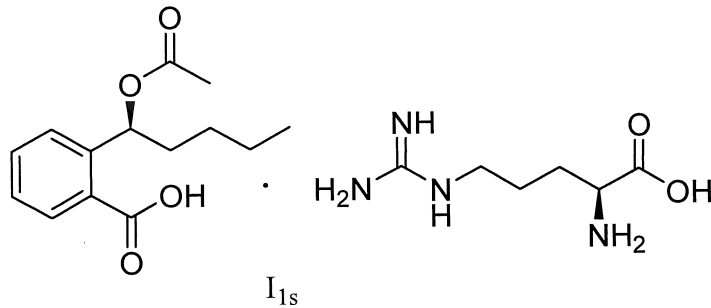
4. Thuốc tiêm tĩnh mạch đông khô

Thành phần	Hàm lượng
(<i>S</i>)-2-(1-acyloxy- <i>n</i> -pentyl)benzoat	10 mg/lọ
Nước để tiêm	Lượng thích hợp
Mannitol	Lượng thích hợp

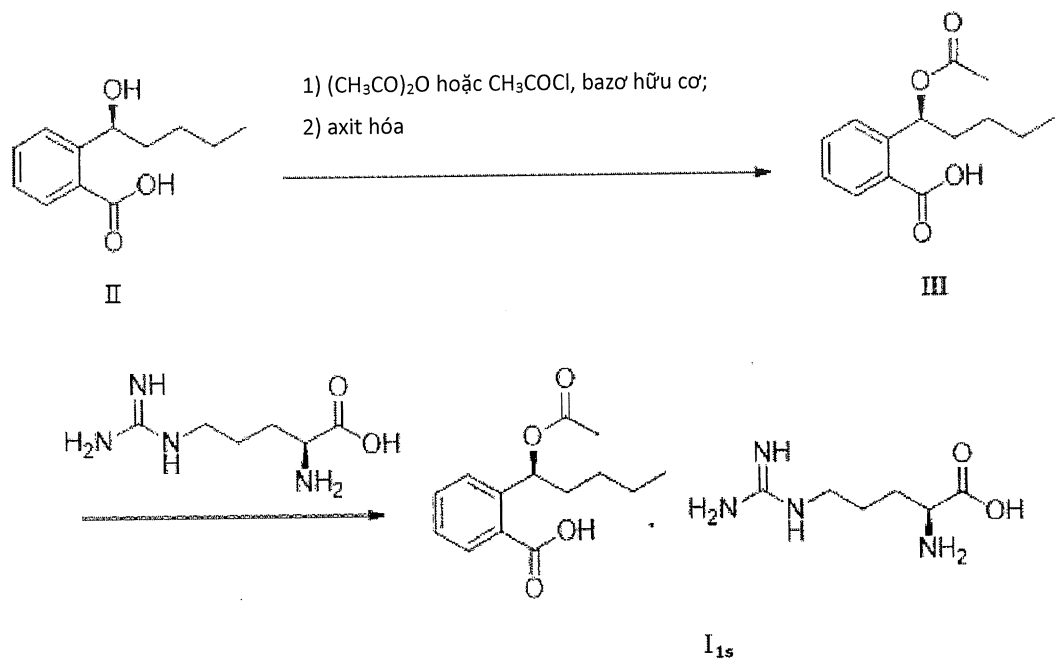
Phương pháp điều chế: (*S*)-2-(1-acyloxy-*n*-pentyl)benzoat có khả năng hòa tan trong nước được hòa tan với lượng nước thích hợp để tiêm và mannitol. Sau khi lọc, đóng lọ và đông khô, thu được thuốc tiêm tĩnh mạch đông khô. Khi sử dụng, thuốc tiêm tĩnh mạch đông khô được pha loãng với nước muối sinh lý 0,9% hoặc dextroza 5% để tiêm tĩnh mạch hoặc truyền nhỏ giọt.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Hợp chất có công thức chung I là muối được tạo thành bởi axit (S)-2-(1-axetoxy-N-pentyl)benzoic và L-arginin,



2. Phương pháp điều chế hợp chất theo điểm 1, trong đó phương pháp bao gồm các bước sau:



(1) bổ sung từng giọt axit anhydrit hoặc axyl clorua vào dung dịch hợp chất II trong dung môi hữu cơ với sự có mặt của bazơ hữu cơ, sau đó axit hóa sau phản ứng để kết tủa hợp chất rắn màu trắng III;

(2) hòa tan hợp chất III được thu trong bước (1) trong rượu, bổ sung L-arginin để tạo thành muối, sau phản ứng, kết tủa lắng được lọc và kết tinh lại từ rượu để thu được hợp chất I_{1s} .

3. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (1) nhiệt độ phản ứng là -30 đến -5°C ,

bazơ hữu cơ là 4-dimethylaminopyridin, diethylamin, triethylamin hoặc pyridin, dung môi hữu cơ là một hoặc tổ hợp của hai được chọn từ dietyl ete, tetrahydrofuran, điclometan, clorofom hoặc axeton; axit là axit clohydric đậm đặc hoặc axit clohydric loãng, axit sulfuric hoặc axit nitric, và axit hóa tới pH 2 đến 6.

4. Phương pháp theo điểm 2, trong đó ở bước (2), nhiệt độ phản ứng là -5 đến 30°C, và rượu là etanol, metanol, propanol hoặc isopropanol.

5. Dược phẩm chứa hợp chất theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

6. Phương pháp bào chế dược phẩm để ngăn ngừa hoặc điều trị các bệnh về tim và thiếu máu cục bộ não, chống huyết khối và cải thiện rối loạn mạch máu não, trong đó phương pháp này bao gồm bước trộn hoặc hòa tan hợp chất theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

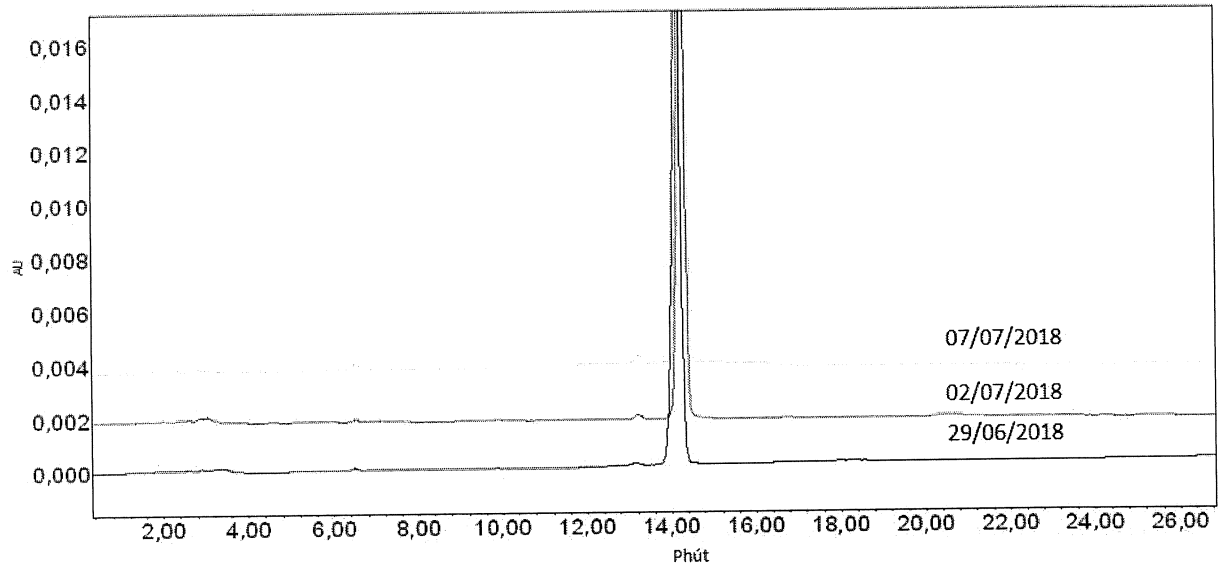


Fig.1

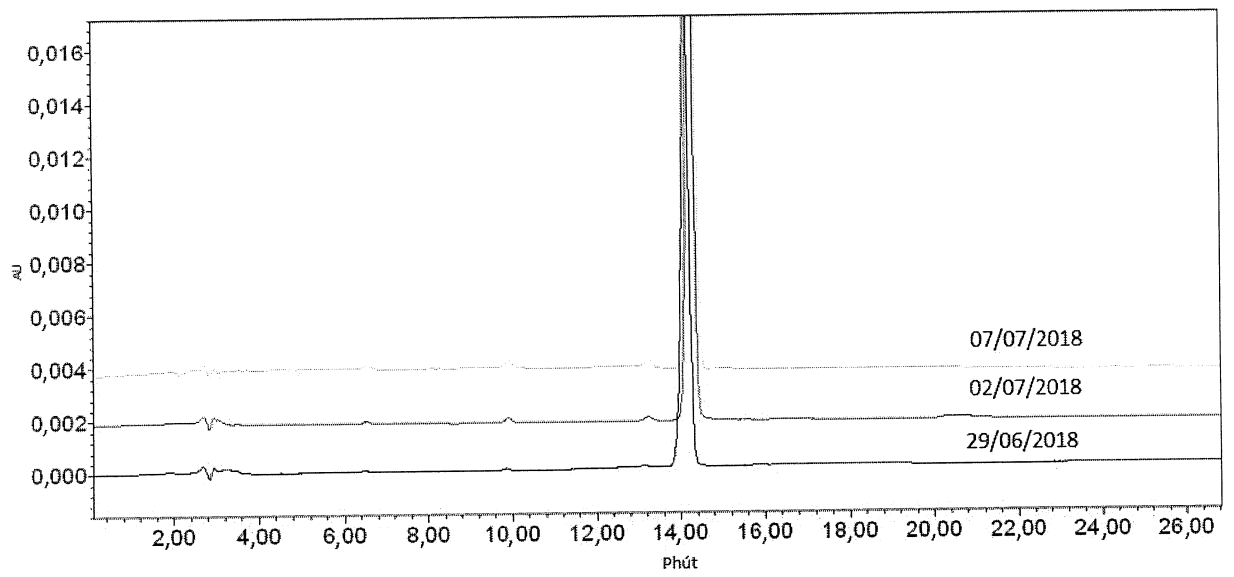


Fig.2

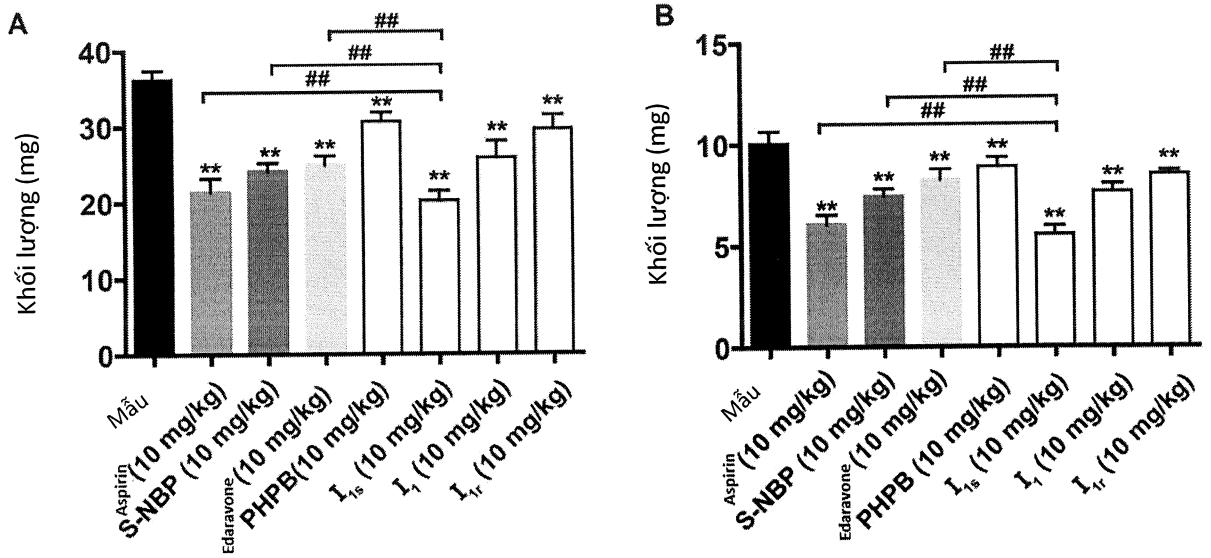


Fig.3

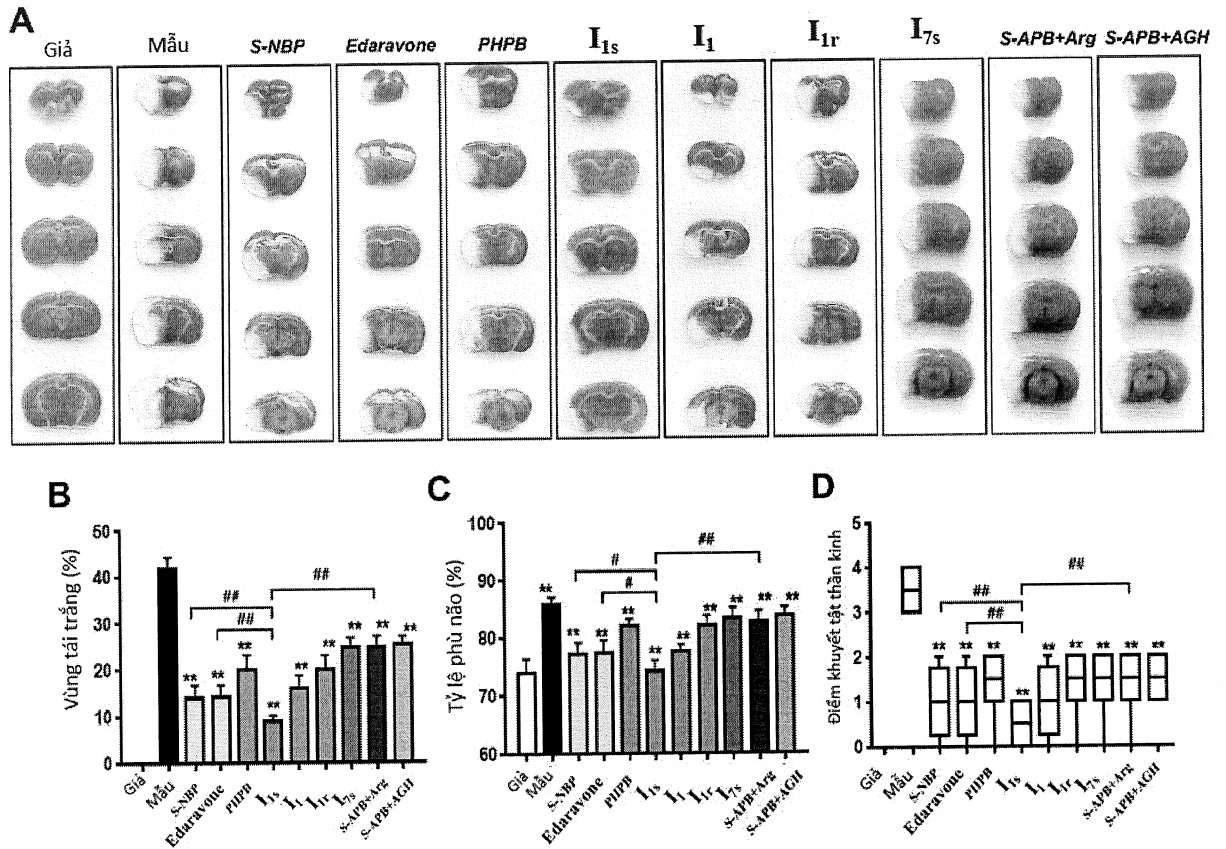


Fig.4

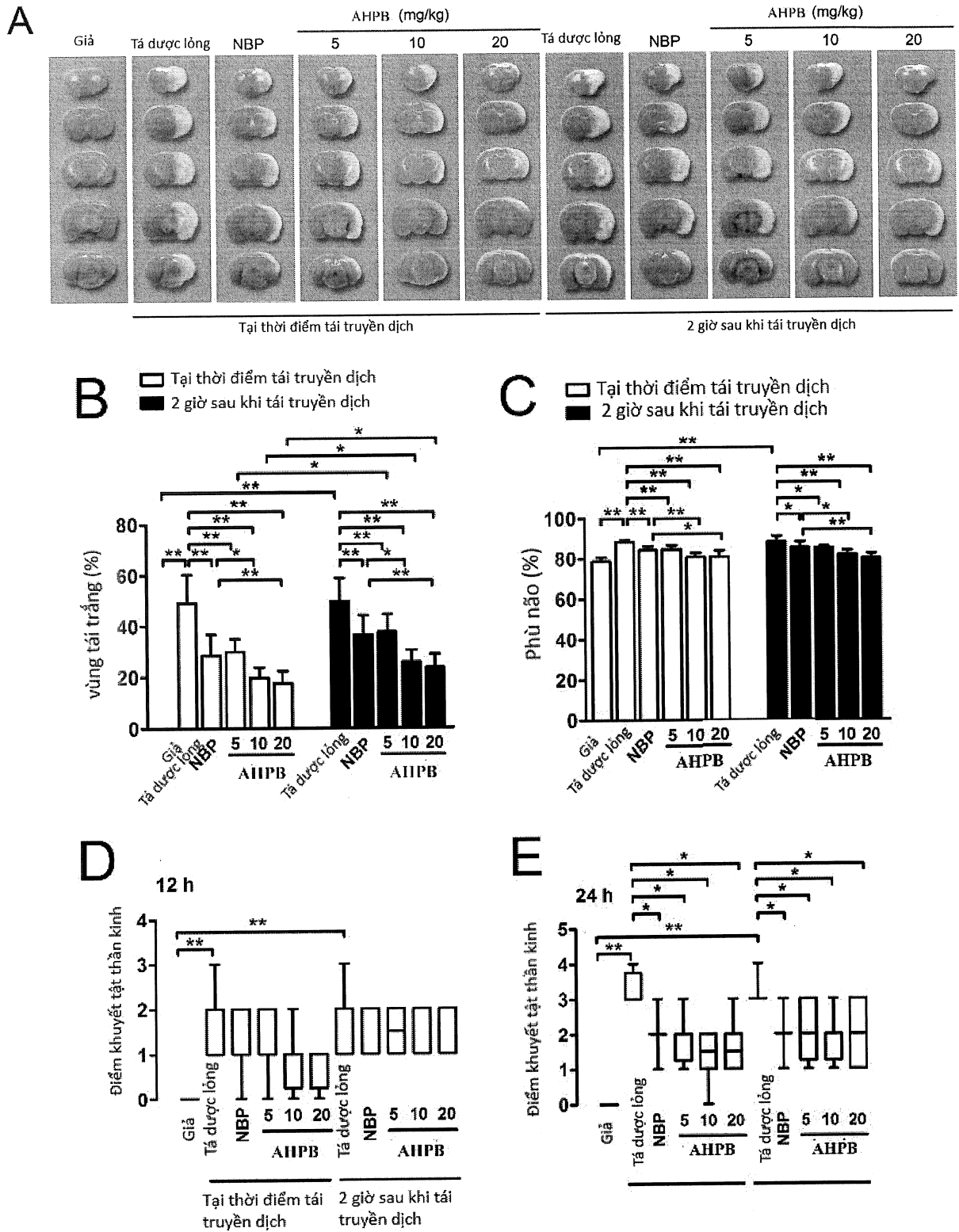


Fig.5

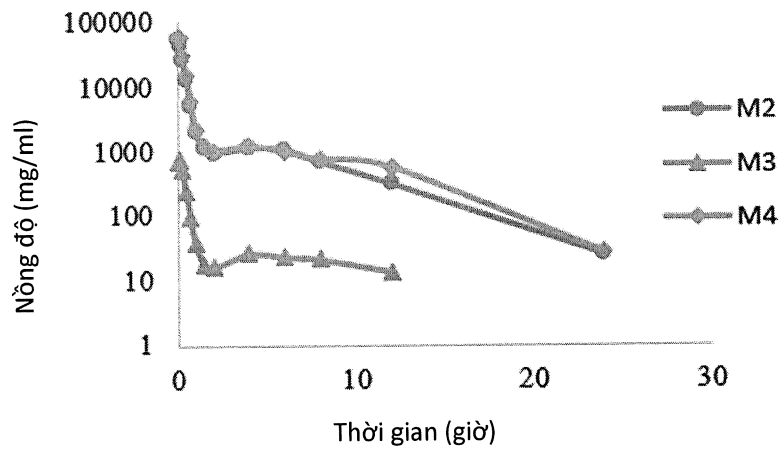


Fig.6

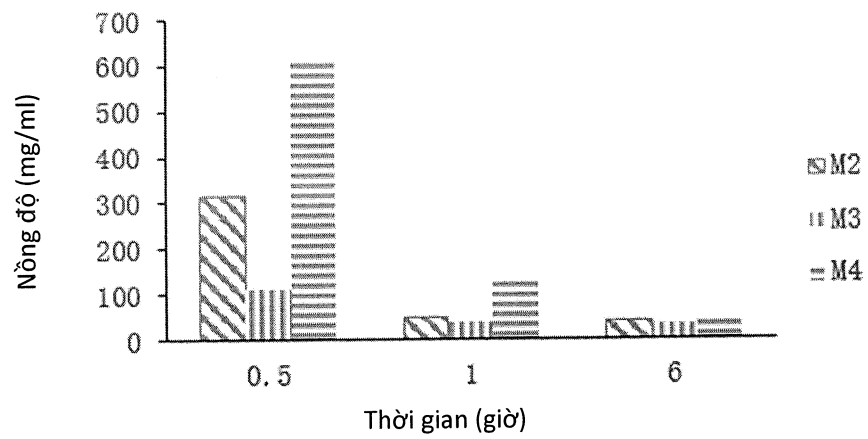


Fig.7