

TỔNG HỢP CÁC DẪN XUẤT MỚI CỦA 7-YDROXYL-5,3',4'-TRIMETHOXYFLAVONE TRÊN CƠ SỞ PHẢN ỨNG MANNICH THÔNG QUA SỰ HỖ TRỢ CỦA VI SÓNG VÀ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ TĂNG SINH CỦA CHÚNG TRÊN DÒNG TẾ BÀO HELA

NGUYỄN VĂN SƠN, VÕ THÀNH CÔNG, NGUYỄN LẬP TRƯỜNG
Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh
nguyenvanson@iuh.edu.vn

Tóm tắt. 7-hydroxy-5,3',4'-trimethoxyflavone (1) là một flavonoid tự nhiên đã được tổng hợp từ hesperidin tự nhiên. Dựa trên phản ứng Mannich của 1 với các amine bậc hai khác nhau và formaldehyde. 11 dẫn xuất flavonoid mới (2-12) được tổng hợp thông qua sự hỗ trợ của vi sóng. Quá trình aminometyl hóa diễn ra ở vị trí ưu tiên tại C-8 của vòng A của 1. Hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào ung thư cổ tử cung ở người (Hela) của các dẫn xuất được đánh giá thông qua phương pháp MTT tiêu chuẩn. Kết quả cho thấy các dẫn xuất thể hiện hoạt tính ức chế tăng sinh tế bào Hela tại nồng độ IC_{50} là 10.13-100 μ M, trong đó các hợp chất 3, 6 và 10 có hoạt tính tốt hơn khi so sánh với chất đối chứng dương (DDP) *cis*-Platin. Cấu trúc của các dẫn xuất được xác định bằng một số phương pháp hóa lý hiện đại như NMR và MS.

Từ khóa: Tổng hợp, Flavonoids, phản ứng Mannich, Vi sóng, Ức chế tăng sinh

SYNTHESIS OF NOVEL 7-HYDROXYL-5,3',4'-TRIMETHOXYFLAVONE MANNICH BASE DERIVATIVES VIA MICROWAVE –ASSISED NETHOD AND THEIR CYTOTOXIC ACTIVITY HALA CELLS

Abstract. 7-hydroxy-5,3',4'-trimethoxyflavone (1), a naturally occurring flavonoid, was synthesized from natural hesperidin. Based on the Mannich reaction of 1 with different quadratic amines and formaldehyde, 11 novel flavonoid derivatives (2-12) were synthesized via a microwave-assisted method. The aminomethylation mainly took place at C-8 position of the A-ring of 1. The cytotoxic activity against cervical cancer cells (Hela) of synthesized derivatives was tested using the standard MTT-test. The result demonstrated that some derivatives showed a cytotoxic activity against Hela cells at IC_{50} of 10.13-100 μ M. Compounds 3, 6 and 10 showed a better activity in the comparison with positive control *cis*-Platin (DDP). The structure of all synthesized compounds have been characterized by modern physicochemical methods such as NMR and MS.

Keywords: Synthesis, Flavonoids, Mannich reaction, Microwave-assisted method, Cytotoxic activity

1. TỔNG QUAN

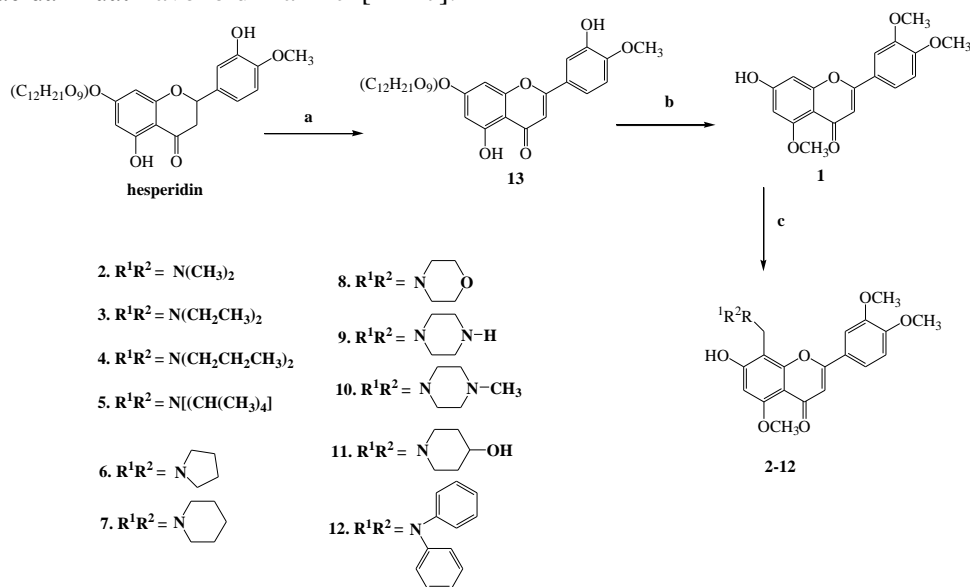
Flavonoid hiện diện rộng rãi trong tự nhiên, và hầu hết các loại thực vật đều chứa flavonoid. Các nghiên cứu hiện đại đã chỉ ra rằng flavonoid có chức năng làm giảm lipid máu[1], chống khối u[2-5], chống oxy hóa[4, 6, 7], thuốc chống đông máu[8], chống viêm[9, 10], cải thiện chuyển hóa đường và lipid,[11, 12] bảo vệ hệ thống tim mạch và mô gan[13], v.v., nó vừa có giá trị y học quan trọng nhưng lại có độc tính thấp nên trở thành đối tượng quan trọng trong nhiều nghiên cứu y dược. Tuy nhiên, flavonoid có hoạt tính sinh học cao trong tự nhiên có hàm lượng thấp ảnh hưởng đến việc nghiên cứu sâu của con người về cơ chế dược lý và các hoạt tính sinh học của chúng, điều này làm hạn chế sự phát triển và sử dụng của flavonoid. Vì vậy, việc tổng hợp các flavonoid có hoạt tính sinh học tiềm năng bằng phương pháp hóa học là rất quan trọng, có lợi cho sự phát triển của các flavonoid. Trong số các flavonoid có chứa nguyên tử hydro hoạt tính (tức các H_{α} so với nhóm hydroxyl) khi ngưng tụ với aldehyde và amine tạo ra sản phẩm tổng hợp gắn thêm các nhóm methyl hóa amine vào khung flavonoid trên cơ sở phản ứng Mannich đã tạo ra một loạt các dẫn xuất mới có hoạt tính dược lý như chống khối u, chống viêm, khử trùng và tiêu diệt vi khuẩn [14-21].

Trong những năm gần đây, việc ứng dụng phản ứng Mannich trong phát triển thuốc mới, cùng với việc nghiên cứu phản ứng Mannich không ngừng được mở rộng theo chiều sâu, tạo ra nhiều dẫn xuất đã thâm nhập vào hầu hết các lĩnh vực sản xuất và đời sống của con người. Vì vậy, việc tiếp tục mở rộng tổng

hợp dựa trên phản ứng Mannich sẽ trở thành một trong những chủ đề quan trọng nghiên cứu hiện nay. Để nghiên cứu sâu hơn hoạt tính sinh học của các flavonoid tự nhiên cũng như nhiều dẫn xuất flavonoid Mannich này góp phần khám phá mối quan hệ cấu trúc hoạt động của chúng và đáp ứng nhu cầu phát triển thuốc mới.

7-hydroxy-5,3',4'-trimethoxyflavone **1** là một flavonoid tự nhiên được phân lập từ lá của *Murraya paniculata* L [22]. Mặt khác, tài nguyên thiên nhiên của hợp chất **1** bị hạn chế do hàm lượng thấp trong cây *Murraya paniculata* L làm giảm khả năng đánh giá hoạt tính sinh học của chúng. Do đó, các tổng hợp hóa học của **1** sẽ là một cách tiếp cận thay thế rất quan trọng để giải quyết vấn đề về tính sẵn có của nó.

Gần đây, hầu hết các nhóm thuốc quan trọng, đặc biệt là những loại dược phẩm có nguồn gốc tự nhiên là các hợp chất chứa nitơ. Phản ứng Mannich của flavonoid là sự thay đổi cấu trúc thông qua phản ứng aminomethyl hóa, từ đó có thể cải thiện hoạt tính sinh học của flavonoid và cải thiện tính chất hóa lý của chúng. Gốc amine trong cấu trúc phân tử có thể tăng cường các đặc tính hóa lý (ví dụ: khả năng hòa tan trong nước) và cải thiện các đặc tính sinh khả dụng của chúng của các phân tử[23]. Hợp chất **1** tham gia vào phản ứng Mannich thông qua quá trình chọn lọc thay đổi các điều kiện nhất định và tạo thành các dẫn xuất Mannich đa dạng, từ đó trong việc mở rộng nghiên cứu có hệ thống hoạt tính sinh học của flavonoid và các dẫn xuất flavonoid Mannich[24-27].



Sơ Đồ 1. Hóa chất và điều kiện: (a) I_2 , py, 90 °C, khuấy hồi lưu, 10 h, 95%; (b) $(CH_3)_2SO_4$, 10% NaOH(aq), 6 h, khuấy, sau đó H_2SO_4 , 120 °C, khuấy hồi lưu, 4 h, 89%; (c) HCHO, CH_3OH , amine, HCl, microwave, khuấy hồi lưu, 80 °C, 30 phút (56-93%).

2. THỰC NGHIỆM

Chúng tôi ở đây báo cáo bán tổng hợp đầu tiên của **1** từ naringin thương mại giá rẻ, và tổng hợp một loạt các dẫn xuất bazơ mới từ **1** dựa trên cơ sở của phản ứng Mannich đã tạo ra mười một hợp chất mới (**2-12**). Tất cả các hợp chất tổng hợp đã được xác nhận bằng phương pháp lý hiện đại như 1HMR , ^{13}C NMR và MS. Hơn nữa, các hợp chất tổng hợp đã được kiểm tra hoạt động ức chế tăng sinh trên tế bào ung thư Hela ở người bằng phương pháp MTT tiêu chuẩn[28].

2.1. Thiết bị đo

Điểm nóng chảy được xác định bằng thiết bị XRC-1. Phổ 1H và ^{13}C -NMR được đo trên máy quang phổ Bruker-AV400 tại Viện hợp chất thiên nhiên thuộc Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam với các chất chuẩn nội là tetramethylsilan (TMS). Khối phổ được xác định bằng máy quang phổ ZAB-HS bằng EI hoặc phép đo khối phổ có độ phân giải cao (HRMS) được thực hiện bởi khối phổ EPSRC. Các dịch chuyển hóa học (δ) được đo bằng ppm và hằng số ghép nối (J) được tính bằng hertz (Hz). Hỗ trợ vi sóng XH-MC-1 sử dụng trong tổng hợp hữu cơ có công suất (50-900 W, 2450 MHz) đã được sử dụng trong các quy trình thí nghiệm.

Sắc ký cột được thực hiện bằng cách sử dụng silica gel 200–300 μm (Hàn Quốc). Hóa chất là loại tinh khiết phân tích và sử dụng dung môi khan đã loại bỏ nước bằng cách chưng cất lại.

2.2.1. Tổng hợp diosmin

Hỗn hợp của hesperidin (20 g, 32,78 mmol) trong 150 mL pyridine được khuấy mạnh ở 90 °C trong 30 phút và sau đó đổ I_2 (12 g, 226,4 mmol) vào. Sau khi khuấy trong 10 giờ, để nguội đến nhiệt độ phòng và sau đó hỗn hợp phản ứng được đổ vào nước lạnh và sau đó được sử dụng HCl 3% (3x 150 mL) và dung dịch bão hòa $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, được lọc và rửa bằng nước, làm khô thu được **13** (18.903 g, hiệu suất 95%) ở dạng sản phẩm màu trắng (lit. nhiệt độ nóng chảy 252–255 °C[29], nhiệt độ nóng chảy 252–254 °C).

2.2.2. Tổng hợp của 7-hydroxy-5,3',4'-trimethoxyflavone (1)

Một hỗn hợp của hợp chất **13** (8 g, 13,15 mmol) trong dung dịch NaOH (150 mL, 7% trong nước) và sau đó cho từ từ $(\text{CH}_3)_2\text{SO}_4$ (17 mL, 63,05 mmol) vào hỗn hợp trên. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 6 giờ. Sau đó, thêm từng giọt 15 mL acid sunfuric đặc, phản ứng được hồi lưu ở 120 °C trong 4 giờ, phản ứng được làm lạnh đến nhiệt độ phòng và đổ hỗn hợp phản ứng vào nước lạnh, chất rắn được lọc, rửa bằng nước. Cặn lọc được làm khô, cặn được tinh chế bằng cách kết tinh lại từ dung dịch hỗn hợp của methanol và ete dầu hỏa để thu được **1** (3.702 g, hiệu suất 87%) ở dạng chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 283–284 °C, (lit. nhiệt độ nóng chảy 284–285 °C [30]); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.72 (s, 1H, 7-OH), 7.58 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6'), 7.48 (s, 1H, H-5'), 7.08 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, H-2'), 6.69 (s, 1H, H-3), 6.56 (s, 1H, H-8), 6.37 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, H-6), 3.86, 3.83, 3.79 (each, s, each 3H, -OCH₃); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 178.8, 161.6, 160.6, 160.2, 151.7, 149.2, 124.1, 119.2, 111.2, 108.5, 107.6, 104.2, 101.8, 96.8, 58.8, 56.3, 56.1; EIMS: m/z 328 [M]⁺.

2.3. Quy trình thực nghiệm chung cho các dẫn xuất bazơ Mannich (2-12).

Một hỗn hợp gồm fomandehit (0,36 mmol) và amine bậc hai (0,36 mmol) trong methanol (10 mL) và 0,02 mL HCl được hồi lưu ở 60 °C cho đến khi đồng nhất hóa hoàn toàn, và sau đó hỗn hợp được đổ vào hỗn hợp gồm hợp chất **1** (120 mg, 0,36 mmol) và methanol (10 mL), sau đó phản ứng được khuấy dưới sự hỗ trợ của vi sóng (600 W) trong 30 phút ở 80 °C. Sau khi phản ứng hoàn thành kiểm tra phản ứng bằng sắc ký bản mỏng, dung môi được loại bỏ bằng cách cô quay. Sản phẩm thô thu được được chiết bằng ethyl axetat (20 mLx3) và nước (50 mL). Pha hữu cơ được tách ra và làm khô bằng natri sulfat khan. Dung môi đã được loại bỏ bằng máy cô quay, chất rắn được thu được tinh chế bằng sắc ký cột trên silica gel (ethylacetat / ete dầu hỏa / triethylamine, v / v, 5: 1: 0,01) để thu được (2-12) với hiệu suất thu được (65–93%).

2.3.1. Tổng hợp của 7-hydroxy-5-methoxy-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-[(dimethylamino)methyl]-4H-chromen-4-one (2)

Quy trình tương tự thu được **2** (hiệu suất 86%) chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 97–98 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.44 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6'), 7.28 (s, 1H, H-5'), 6.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-2'), 6.57 (s, 1H, H-3), 6.31 (s, 1H, H-6), 4.11 (s, 2H, 8-CH₂N), 3.96 (s, 6H, 3'-OCH₃ và 4'-OCH₃), 3.94 (s, 3H, 5-OCH₃), 2.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, (CH₃)₂); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 177.8, 164.9, 160.2, 159.6, 156.4, 151.5, 149.2, 124.3, 119.0, 111.1, 108.4, 107.5, 107.4, 99.9, 96.9, 56.2, 56.0, 55.9, 50.1, 46.8; EIMS: m/z 385 (M)⁺.

2.3.2. Tổng hợp của 7-hydroxy-5-methoxy-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-[(diethylamino)methyl]-4H-chromen-4-one (3).

Quy trình tương tự thu được **3** (hiệu suất 93%) chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 110–111 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 7.45 (dd, $J = 8.4, 2.0$ Hz, 1H, H-6'), 7.29 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, H-5'), 7.00 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-2'), 6.58 (s, 1H, H-3), 6.32 (s, 1H, H-6), 4.12 (s, 2H, 8-CH₂N), 3.97 (s, 6H, 3'-OCH₃ và 4'-OCH₃), 3.95 (s, 3H, 5-OCH₃), 2.76 (q, $J = 7.2$ Hz, 4H, 2CH₂), 1.20 (t, $J = 7.2$ Hz, 6H, (CH₃)₂); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3): δ 177.7, 164.9, 160.2, 159.6, 156.4, 151.5, 149.2, 124.3, 119.0, 111.1, 108.4, 107.5, 107.4, 99.9, 96.9, 56.2, 56.0, 55.9, 50.1, 46.8, 10.9; EIMS: m/z 414 (M+1)⁺.

2.3.3. Tổng hợp của 7-hydroxy-5-methoxy-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-[(dipropylamino)methyl]-4H-chromen-4-one (4).

Quy trình tương tự thu được **4** (hiệu suất 85%) chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 257–258 °C; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 9.23 (s, 1H, 7-OH), 7.37 – 7.31 (m, 1H, H-6'), 7.19 – 7.15 (m, 1H, H-5), 6.90 (dd, $J = 8.5, 4.0$ Hz, 1H, H-2'), 6.5 (s, 1H, H-3), 6.21 (d, $J = 5.1$ Hz, 1H, H-6), 4.01 (d, $J = 3.3$ Hz, 2H, 8-CH₂N), 3.85 (dd, $J = 7.8, 4.3$ Hz, 9H, 3'-OCH₃, 4'-OCH₃ và 5-OCH₃), 2.55 – 2.48 (m, 4H, 2CH₂), 1.63 – 1.49 (m,

4H, 2CH₂), 0.85 (td, $J = 7.3, 3.3$ Hz, 6H, (CH₃)₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.6, 164.6, 160.2, 159.5, 156.3, 151.5, 149.1, 124.3, 119.0, 111.0, 108.4, 107.5, 107.4, 100.2, 96.8, 56.1, 55.9, 55.8, 55.7, 51.4, 19.27, 11.64; EIMS: m/z 441 (M)⁺.

2.3.4. Tổng hợp của 7-hydroxy-5-methoxy-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-[(diisopropylamino)methyl]-4H-chromen-4-one (5)

Quy trình tương tự thu được **5** (hiệu suất 63%) chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 158-159 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.35 (s, 1H, 7-OH), 7.43 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H-6'), 7.04 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, H-5'), 6.77 (s, 1H, H-2'), 6.51 (s, 1H, H-3), 6.23 (s, 1H, H-6), 4.11 (s, 2H, 8-CH₂N), 3.94 (s, 6H, 3'-OCH₃, 4'-OCH₃), 3.91 (s, 3H, 5-OCH₃), 2.73–2.69 (m, 2H, 2CH), 1.26-1.19 (m, 12H, 2(CH₃)₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.6, 164.5, 160.1, 159.5, 156.3, 151.6, 149.3, 124.2, 119.9, 111.2, 108.7, 107.5, 103.4, 96.7, 56.9, 56.6, 56.5, 55.7, 50.1, 46.8, 19.8; EIMS: m/z 441 (M)⁺.

2.3.5. Tổng hợp của 7-hydroxy-5-methoxy-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-(pyrrolidin-1-ylmethyl)-4H-chromen-4-one (6)

Quy trình tương tự thu được **6** (năng suất 86%) chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 156-157 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 8.48 (s, 1H, 7-OH), 7.47 – 7.40 (m, 1H, H-6'), 7.29 – 7.22 (m, 1H, H-5'), 6.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-2'), 6.56 (s, 1H, H-3), 6.37 (s, 1H, H-6), 4.23 (s, 2H), 3.96 (s, 6H, 3'-OCH₃ và 4'-OCH₃), 3.94 (d, $J = 4.5$ Hz, 3H, 5-OCH₃), 2.86 (s, 4H, 2CH₂), 1.96 (s, 4H, 2CH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.7, 164.7, 160.7, 159.8, 156.5, 151.7, 149.3, 124.2, 119.2, 111.2, 108.5, 107.6, 107.4, 99.8, 97.0, 56.2, 56.0, 53.7, 50.7, 29.7, 23.5; EIMS: m/z 411 (M)⁺.

2.3.6. Tổng hợp của 7-hydroxy-5-methoxy-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-(piperidin-1-ylmethyl)-4H-chromen-4-one (7)

Quy trình tương tự thu được **7** (năng suất 86%) chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 210-211 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.16 (s, 1H, -OH), 7.34 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6'), 7.16 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, H-5'), 6.89 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-2'), 6.45 (s, 1H, H-3), 6.21 (s, 1H, H-6), 3.91 (s, 2H, 8-CH₂N), 3.86 (d, $J = 1.1$ Hz, 6H, 3'-OCH₃ và 4'-OCH₃), 3.84 (s, 3H, 5-OCH₃), 2.96 – 2.17 (m, 4H, 2CH₂), 1.61 (s, 4H, 2CH₂), 1.46–1.37 (m, 2H, CH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.6, 164.3, 160.1, 159.5, 156.3, 151.5, 149.1, 124.2, 118.9, 111.0, 108.3, 107.4, 99.7, 96.7, 56.1, 55.9, 55.8, 54.9, 54.0, 25.3, 23.6; EIMS: m/z 425 (M)⁺.

2.3.7. Tổng hợp của 7-hydroxy-5-methoxy-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-(morpholinomethyl)-4H-chromen-4-one (8)

Quy trình tương tự thu được **8** (hiệu suất 89%) chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 208-209 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.41 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-6'), 7.24 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, H-5'), 6.96 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-2'), 6.54 (s, 1H, H-3), 6.30 (s, 1H, H-6), 4.01 (s, 2H, 8-CH₂N), 3.93 (s, 6H, 3'-OCH₃ và 4'-OCH₃), 3.91 (s, 3H, 5-OCH₃), 3.78 (s, 4H, 2CH₂), 2.66 (s, 4H, 2CH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 178.0, 163.7, 160.9, 160.2, 156.9, 152.0, 149.6, 124.5, 119.5, 111.5, 108.8, 108.3, 107.9, 99.6, 97.0, 66.9, 56.6, 56.4, 56.3, 54.9, 53.5; EIMS: m/z 427 (M)⁺.

2.3.8. Tổng hợp của 7-hydroxy-5-methoxy-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-((piperazin-1-yl)methyl)-4H-chromen-4-one (9)

Quy trình tương tự thu được **9** (năng suất 75%) chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 152-153 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.31 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-6'), 7.13 (s, 1H, H-5'), 6.94 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, H-2'), 6.48 (s, 1H, H-3), 6.31 (s, 1H, H-6), 5.29 (s, 1H, OH), 4.15 (s, 2H, 8-CH₂N), 3.87 (s, 6H, 3'-OCH₃, 4'-OCH₃), 3.85 (5-OCH₃), 2.93-2.73 (m, 8H, 4CH₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 178.1, 163.9, 160.9, 160.2, 156.9, 153.0, 149.6, 124.4, 119.4, 111.4, 108.8, 108.2, 107.0, 99.5, 97.1, 56.7, 56.4, 56.3, 54.9, 53.5; EIMS: m/z 426 (M)⁺.

2.3.4. Tổng hợp của 7-hydroxy-5-methoxy-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-((4-methylpiperazin-1-yl)methyl)-4H-chromen-4-one (10)

Quy trình tương tự thu được **10** (năng suất 87%) chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 210-211 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.43 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-6'), 7.27 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-5'), 6.98 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, H-2'), 6.57 (s, 1H, H-3), 6.32 (s, 1H, H-6), 4.05 (s, 2H, 8-CH₂N), 3.96 – 3.93 (m, 9H, 3'-OCH₃, 4'-OCH₃ và 5-OCH₃), 2.73 (dd, $J = 87.1, 79.5$ Hz, 8H, 4CH₂), 2.34 (s, 3H, CH₃), 2.03 (d, $J = 1.8$ Hz, 1H, CH); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.6, 163.6, 160.3, 159.7, 156.4, 151.6, 149.1, 124.1, 119.1, 111.1, 108.4, 107.8, 107.5, 99.5, 96.6, 56.2, 56.1, 55.9, 56.0, 55.9, 54.6, 54.1, 52.7, 45.6, 14.1; EIMS: m/z 440 (M)⁺.

2.3.9. Tổng hợp của 7-hydroxy-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-[(4-hydroxypiperidin-1-yl)methyl]-5-methoxy-4H-chromen-4-one (11)

Quy trình tương tự thu được **11** (năng suất 91%) chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 260-261 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 7.47 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-6'), 6.69 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, H-5'), 6.82 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, H-2'), 6.57 (s, 1H, H-3), 6.32 (s, 1H, H-6), 4.05 (s, 2H, 8-CH₂N), 3.95 (d, *J* = 2.3 Hz, 6H, 3'-OCH₃ và 4'-OCH₃), 3.94 (s, 3H, 5-OCH₃), 3.64 (s, 1H, OH), 3.31 (s, 1H, CH), 2.58-2.34 (m, 4H, 2N(CH)₂), 1.75-1.62 (m, 4H, 2(CH)₂); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 177.8, 164.5, 160.8, 159.5, 156.5, 151.8, 149.6, 124.3, 119.2, 111.3, 108.5, 107.6, 107.4, 99.8, 97.3, 67.8, 56.4, 56.0, 55.7, 50.3, 50.1.6, 33.2; EIMS: *m/z* 441 (M)⁺.

2.3.10. Tổng hợp của 7-hydroxy-5-methoxy-2-(3,4-dimethoxyphenyl)-8-[(diphenylamineo)methyl]-4H-chromen-4-one (12)

Quy trình tương tự thu được **12** (năng suất 83%) chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy 223-224 °C; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 9.63 (s, 1H, 7-OH), 7.34 (d, 2.7 Hz, 1H, H-6'), 7.01-6.76 (m, 10H), 6.59 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-5'), 6.55 (s, 1H, H-2'), 6.51 (s, 2H, Ar-H), 6.35 (s, 1H, H-6), 4.06 (s, 2H, NCH₂), 3.90 (s, 3H, 5-OCH₃), 3.87 (d, *J* = 2.7 Hz, 6H, 3'-OCH₃ và 4'-OCH₃); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ 178.6, 164.9, 160.9, 159.7, 156.4, 151.5, 149.2, 148.5, 129.8, 128.5, 124.2, 121.6, 119.0, 111.1, 108.4, 107.4, 106.4, 99.7, 98.7, 56.4, 56.1, 55.8, 54.1; EIMS: *m/z* 509 (M)⁺.

2.4 Thử nghiệm cho hoạt động ức chế tăng sinh tế bào

Thử nghiệm ức chế tăng sinh của các hợp chất 1-12 đối với dòng tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung ở người (HeLa) bằng phương pháp MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) [31, 32]. Được thực hiện bằng cách lấy 5x10³ tế bào / giếng được nuôi cấy trong 96 giếng trong môi trường nước mô bò (100 µL) và sau đó được ủ ở 37 °C trong môi trường 5% CO₂. Sau 24 giờ, môi trường được loại bỏ và sau đó được xử lý với các nồng độ hợp chất khác nhau (100, 25, 6,25, 1,56, 0,39, 0,0976, 0,0244, 0,0061 µM) của các hợp chất 1-12 ủ trong 48 giờ. Sau đó 5% MTT được thêm vào mỗi giếng và ủ với độ ẩm 90% và 5% CO₂ trong 1-3 giờ nữa. Phần nổi phía trên được loại bỏ và 0,1 mL DMSO được thêm vào để hòa tan kết tủa. Hỗn hợp được lắc trên máy vi sóng trong 5 phút, và độ hấp thụ được đo ở bước sóng 570 nm bằng máy quang phổ tự động ELISA × 800 (Bio-Rad 680) để xác định nồng độ đã giết chết 50% tế bào (IC₅₀). Các đường cong liều lượng đáp ứng đã được xác định. Các phép đo đã được kiểm soát bằng các so sánh với chất đối chứng dương *cis*-Platin.

Giá trị IC₅₀ =

$$(1 - \text{Độ hấp thụ trung bình của chất được xử lý} / \text{Độ hấp thụ trung bình của chất đối chứng}) \times 100\%$$

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Con đường tổng hợp được sử dụng để tổng hợp **1** và các dẫn xuất Mannich của nó tạo ra (2-12) được minh họa (Sơ Đồ 1). Trước tiên Diosmin có thể thu được bằng cách khử hydro trong I₂/ pyridine. Tiếp theo là methyl hóa nhanh bằng (CH₃)₂SO₄ trong NaOH 3-5% và sau đó là thủy phân liên kết glucoside của **13** trong H₂SO₄ tạo ra **1**. Phản ứng được tiến hành dễ dàng trên quy mô lớn và mỗi hợp chất trung gian có thể được tinh chế bằng cách kết tinh lại.

Chiến lược của chúng tôi để tổng hợp các dẫn xuất C-amineomethyl dựa trên phản ứng thay thế electrophile một nguyên tử hydro linh hoạt tại C-8 của **1** trên vòng A. Điều này đạt được nhờ phản ứng Mannich của **1** với formaldehyde và các amine bậc hai trong methanol (Sơ đồ 1). Các điều kiện cổ điển của phản ứng Mannich[33-35] được thực hiện bằng các amine bậc hai và formaldehyde trong alcohol đun nóng kéo dài. Trong trường hợp của chúng tôi, hợp chất **1**, formaldehyde và các amine bậc hai theo tỷ lệ mol là 01:01.1:01.1 tương ứng được hồi lưu và khuấy trong methanol với thời gian 30 phút thông qua sự trợ giúp của vi sóng để tạo ra các dẫn xuất C-aminomethyl. Cấu trúc của các dẫn xuất Mannich thu được đã được xác định bằng phương pháp phổ cộng hưởng từ ¹H NMR, ¹³C NMR và phổ khối lượng (MS). Trên phổ ¹H NMR của các hợp chất 2-12 chỉ ra rõ ràng sự vắng mặt của tín hiệu tại δ 6,56 ppm ở vị trí H-8 của **1** trong hệ vòng A. Trong phổ ¹H NMR của 2-12, tín hiệu cho H-8 đã biến mất và tín hiệu ở δ 3,91-4,23 cho thấy sự hiện diện của nhóm aminomethyl ở C-8 trên **1**.

Cuối cùng, các dẫn xuất flavonoids Mannich 2 -12 mới được tạo ra từ phản ứng của **1** với formaldehyde và các amine bậc hai khác nhau trong methanol và dung dịch xúc tác acid HCl dựa trên phản ứng Mannich.

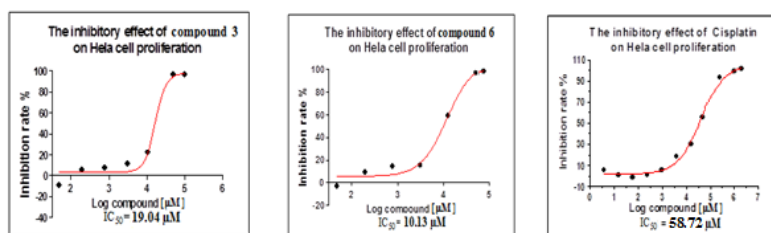
Tất cả các dẫn xuất Mannich tổng hợp đã được sàng lọc hoạt tính ức chế tăng sinh trên dòng tế bào ung thư cổ tử cung ở người Hela bằng phương pháp so màu sử dụng 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) tiêu chuẩn được thể hiện trong (Bảng 1). Thử nghiệm hoạt tính sinh học sơ bộ đã chứng minh rằng tất cả các hợp chất đều có hoạt tính sinh chống lại dòng tế bào ung thư Hela. Theo dõi các giá trị IC_{50} cho thấy hợp chất 6, 3 và 10 có khả năng ức chế mạnh nhất với nồng độ tương ứng 10.13 μ M, 19.04 μ M và 26.13 μ M, tiếp theo là hợp chất 1 với nồng độ tương ứng là 59.62 μ M. Chúng tốt hơn so với ức chế tăng sinh của *cis*-Platin (DDP) một chất đối chứng dương (58.72 μ M). Như trên Hình 1.1 là đường cong liều-đáp ứng theo phương pháp MTT của các hợp chất 3, 6 và *cis*-Platin trên dòng tế bào Hela.

Điều thú vị là ngoại trừ các dẫn xuất 3, 6 và 10 các hợp chất khác không thể hiện khả năng ức chế tăng sinh tế bào Hela. Sự khác nhau trong cấu trúc của các dẫn xuất có thể dẫn tới một số khả năng khác nhau trong quá trình trao đổi chất trong tế bào dẫn đến sự ức chế khác nhau của các hợp chất này. Đây là cơ sở quan trọng để nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác dụng của các dẫn xuất đặt tiền đề khảo sát hoạt tính của các dẫn xuất trên các dòng tế bào khác nhau trong tương lai.

Bảng 1. Nồng độ nửa ức chế [IC_{50} (μ M)] của các hợp chất 1-12 trên Hela của dòng tế bào ung thư ở người.

Hợp chất	IC_{50}	Hợp chất	IC_{50}	Hợp chất	IC_{50}
1	59.62	6	10.13	11	>100
2	>100	7	>100	12	>100
3	19.04	8	>100	(DDP) ^a	58.72
4	>100	9	>100		
5	>100	10	26.13		

^a*Cis*-platin (DDP) đã được sử dụng như chất đối chứng dương.



Hình 1.1. Đường cong liều-đáp ứng theo phương pháp MTT của các hợp chất 3, 6 và *cis*-Platin trên dòng tế bào Hela

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này chúng tôi đã tổng hợp thành công 7-hydroxy-5,3',4'-trimethoxyflavone (1) từ hesperidin tự nhiên rẻ tiền. Dựa trên phản ứng Mannich, 11 dẫn xuất flavonoid Mannich mới (2-12) được tổng hợp từ 1. Các hợp chất tổng hợp đã được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ NMR và MS. Hơn nữa, tất cả các hợp chất tổng hợp đều được kiểm tra khả năng ức chế tăng sinh trên dòng tế bào ung thư Hela của người bằng phương pháp MTT tiêu chuẩn. Các hợp chất 6, 3 và 10 trên hoạt động ức chế tăng sinh trên dòng tế bào ung thư Hela tốt hơn các hoạt động của *cis*-Platin một chất đối chứng dương. Đây là cơ sở quan trọng bước đầu để tiếp tục nghiên cứu sâu hơn về cơ chế tác dụng của các dẫn xuất trên các dòng tế bào bệnh lý khác nhau trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. L. Z. Shengnan Guo, W. Shentao, L. Hongyi, State of the art paper Research progress of typical flavonoids in improving insulin resistance. *Archives of Medical Science*, 2002, vol 5, pp. e335–e342.
2. M. Chakrabarti, Synergistic anti-tumor actions of luteolin and silibinin prevented cell migration and invasion and induced apoptosis in glioblastoma SNB19 cells and glioblastoma stem cells. *Brain Res*, 2015, vol. 10, no. 1629, pp. 85-93.

3. L. Kaili, Y. Jingjing, X. Zhengchao, J. Dandan, M. Peizhi, Hispidulin: A promising flavonoid with diverse anti-cancer properties. *Life Sciences*, 2020, vol. 15, no. 259, pp. 118395.
- 4 J. F. Xia, Y. Inagaki, N. Kokudo, M. Nakata, W. Tang, Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: Recent approaches using HepG2 cell line. *Drug Discov Ther*, 2013, vol. 7, no. 1, pp. 1-8.
- 5 M. A. Ashrafizadeh, T. Farkhondeh, S. Samarghandian, Autophagy regulation using luteolin: new insight into its anti-tumor activity. *Cancer Cell Int*, 2020, vol. 4, no. 20, pp. 537.
6. M. Amzad Hossaina, Total phenolics, flavonoids and antioxidant activity of tropical fruit pineapple. *Food Research International*, 2011, vol. 44, pp. 672–676.
7. A. K. Verma, M. Satyanarayana, S. P. Srivastava, P. Tiwari, A. B. Singh, A. K. Dwivedi, S. K. Singh, M. Srivastava, C. Nath, R. Raghubir, A. K. Srivastava, R. Pratap, Flavone-based novel antidiabetic and antidyslipidemic agents. *J Med Chem* 2012, vol. 55, no. 10, pp. 4551-4567.
8. T. X. Wang, Y. Z. Zhaojian, T. Wang, Z. Qian, X. Y. Wang, Anti-coagulative and gastrointestinal motility regulative activities of Fructus Aurantii Immaturus and its effective fractions. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, vol. 90, pp. 244–252.
9. S. J. Maleki, J. F. Crespo, B. Cabanillas, Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 2019, VOL. 299, no. 30, pp. 125124.
10. M. Hämäläinen, P. Vuorela, M. Heinonen, E. Moilanen, Activation along with Their Inhibitory Effect on iNOS Expression and NO Production in Activated Macrophages. *Mediators of Inflammation*, 2007, vol. 2007, pp. 1–10.
11. U. J. Jung, Y. B. Park, M. A. Kang, M. S. Choi, Effect of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA levels in type-2 diabetic mice. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2006, vol. 38, pp. 1134–1145.
12. J. M. Sini, E. Huff, W. Murray, Citrus flavonoids and lipid metabolism. *Current Opinion in Lipidology*, 2013, vol. 24, no. 1, pp. 34–40.
13. M. K. Chahar, M. P. Dobhal, Y. C. Joshi, Flavonoids: aversatile source of anticancer drugs. *Phcog Rev*, 2001, vol. 1, no. 5, pp. 1–12.
14. S. Sogawa, H. Ueda, I. Akihiro, M. Tokutaro, M. Hitoshi, S. Toshio, 3,4-Dihydroxychalcones as potent 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 1993, vol. 36, no. 24, pp. 3904-3909.
15. B. P. Bandgar, R. N. Gacche, B. L. Korbadi, B. S. Hote, S. N. Kinkar, S. S. Jalde, Synthesis and biological evaluation of nitrogen-containing chalcones as possible anti-inflammatory and antioxidant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010, vol. 20, pp. 730-733.
16. I. Erlund, Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Research*, 2004, vol. 24, no. 10, pp. 851-874.
17. J. Shan, Y. Ma, R. Yang, Y. Jin, Flavonoids from leaves of *Murraya paniculata* L. (I). *J Chin Pharm*, 2010, vol. 45, no. 24, pp. 1910-1912.
18. D. F. Joshi, J. Murphy, J. Abdelrahim, M. Schönherr, H. Sparrow, J. R. Ellestad, G. Nakanishi, K. Zask, Synthesis of antioxidants for prevention of age-related macular degeneration. *J Nat Prod*, 2013, vol. 76, no. 3, pp. 450-454.
19. V. S. Nguyen, Yue Li, Qi-uan Wang, Synthesis of Citrus polymethoxyflavonoids and their antiproliferative activities on Hela cells. *Medicinal Chemistry Research*, 2017, vol. 26, no. 7, pp. 585–1592.

20. V. S. Nguyen, F. Q. Luan, Q. A. Wang, Synthesis of Kaempferide Mannich Base Derivatives and Their Antiproliferative Activify on Hela cells. *Acta Biochim Pol*, 2015, vol. 62, no. 3, pp. 547-552.
21. V. S. Nguyen, S. C. Wang and Q. A. Wang, The First Total Synthesis of Sophoflavescenol, Flavenochromane C and Citrusinol. *European Journal of Organic Chemistry*, 2015, vol. 2015, no. 10, pp. 2297-2302.
22. V. S. Nguyen, Y. Li, Q. A. Wang, Total Synthesis of Icaritin via Microwave-assistance Claisen Rearrangement. *Letters in Organic Chemistry*, 2014, vol. 1, no. 9, pp. 677 - 681.
23. J. C. Stockert, L. L. Colombo, A. Blázquez-Castro, "Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives". *Acta Histochemica*, 2018, vol. 120, no. 3, pp. 159-167.
24. N. G. Li, M. Z. Shen, Y. P. Tang, Z. H. Shi, H. Tang, Q. P. Shi, Y. F. Fu, J. A. Duan, Mannich bases of scutellarein as thrombin-inhibitors: Synthesis, biological activity and solubility. *Bioorg Med Chem*, 2012, vol. 20, pp. 6919-6923.
25. W. K. Carl Mannich, Ueber ein Kondensationsprodukt aus Formaldehyd, Ammoniak und Antipyrin. *Archiv der Pharmazie (in German)*, 1912, vol. 250, no. 1, pp. 647-667.
26. F. F. Blicke, "The Mannich Reaction". *Organic Reactions*. ISBN 978-0471264187, 2011, vol. 110, pp. 303-341.
27. Y. L. Shan, Q. A. Wang, Z. H. Li, Hesperidin semisynthetic five kinds of bioactive flavonoids. *Chin J Org Chem*, 2008, vol. 28, no. 6, pp. 1024-1028.
28. H. M. Shizuo, Glucoluteolin isolated from the leaves of Sophora angustifolia. *J Am Chem Soc*, 1954, vol. 76, pp. 5792-5792.
29. Z. Cao, A. Mishra, W. Xu, G. C. Wong, J. Cheng, Y. Lu, Reversible cell-specific drug delivery with aptamer-functionalized liposomes. *Angew Chem Int Ed*, 2009, vol. 48, pp. 6494 -6498.
30. A. H. Elbaz, H. L. Wang, G. O'Doherty, T. D. Lowry, M. L. Sargent, L. Wang, C. Z. Dinu, Y. Rojanasakul, Digitoxin and a Synthetic monosaccharide analog inhibit cell viability in lung cancer cells. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2012, vol. 258, pp. 51-60.
31. U. J. Jung, M. K. Lee, Y. B. Park, M. A. Kang, M. S. Choi, Effect of Citrus Flavonoids on Lipid Metabolism and Glucose-Regulating Enzyme Mrna Levels in Type-2 Diabetic Mice, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biolog*, vol. 38, 1134-1145, 2006.
32. V. S. Nguyen, L. Shi, Y. Li, Q. A. Wang, Total Synthesis of Icaritin Via Microwave-Assistance Claisen Rearrangement, *Letters in Organic Chemistry*, vol. 1, no. 9, 677 - 681, 2014.
33. V. S. Nguyen, L. Shi, F. Q. Luan, Q. A. Wang, Synthesis of Kaempferide Mannich Base Derivatives and Their Antiproliferative Activify on Hela Cells, *Acta Biochim Pol*, vol. 62, no. 3, 547-552, 2015.
34. V. S. Nguyen, Wei Li, Yue Li, Qi-uan Wang, Synthesis of Citrus Polymethoxyflavonoids and Their Antiproliferative Activities on Hela Cells, *Medicinal Chemistry Research*, vol. 26, no. 7, 585-1592, 2017.
35. Z. Cao, R. Tong, A. Mishra, W. Xu, G. C. Wong, J. Cheng, Y. Lu, Reversible Cell-Specific Drug Delivery with Aptamer-Functionalized Liposomes, *Angew Chem Int Ed*, vol. 48, 6494 -6498, 2009.

Ngày nhận bài: 04/02/2021

Ngày chấp nhận đăng: 28/07/2021