TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA DẪN XUẤT FLAVONOIDS MỚI TRÊN CƠ SỞ PHẢN ỨNG MANNICH

NGUYỄN VĂN SƠN*, VÕ THÀNH CÔNG, PHẠM VĂN HƯNG
Khoa Công nghệ Hóa học, Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh
**Tác giả liên hệ: nguyenvanson@iuh.edu.vn*
DOIs: https://doi.org/10.46242/jstiuh.v62i02.4781

Tóm tắt. Chúng tôi đã thành công tổng hợp được dẫn xuất 3,7,3',4'-Tetra-*O*-acetyl-5-hydroxyflavonoid (**1**) từ Quercetin với anhydride acetic, sau đó dựa trên cơ sở của phản ứng Mannich chúng tôi đã tổng hợp được sáu dẫn xuất mới của **1**. Các dẫn xuất mới của **1 (2-7)** được tạo thành ở 80 ℃ từ 1-3 giờ với hiệu suất khoảng 65-86 %. Quá trình aminometyl hóa xảy ra ưu tiên ở vị trí C-6 trên vòng A của **1**. Tất cả các hợp chất tổng hợp đều được xác định cấu trúc phân tử bằng phương pháp phân tích hóa lý hiện đại như FT-IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR và MS. Hơn nữa, các hợp chất tổng hợp đã được đánh giá khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp ABTS tiêu chuẩn, cho thấy các hợp chất đều có khả năng kháng oxy hóa, trong đó các hợp chất tốt nhất là **3** (IC_{50} 64.02±0.15 μM), **7 (**IC_{50} 156.71±0.11 μM**)** và **5 (**163.14±0.14 μM**)** cao hơn chất chuẩn Trolox (IC_{50} 221.31±0.17 μM) gấp 1.4-3.4 lần. Đây là những hợp chất tiềm năng cho ứng dụng kháng oxy hóa.
Từ khóa: Tổng hợp, Mannich, Kháng oxy hóa, Flavonoid, Quercetin, ABTS

1. TỔNG QUAN

Quercetin (tên IUPAC là 3,5,7-trihydroxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-4*H*-chromene-4-one) là một flavonoid tự nhiên được biết đến với hoạt tính chống tăng sinh một số dòng tế bào ung thư trên người [1-3]. Cả Quercetin (Qu) và các dẫn xuất của nó đều tham gia vào một số chức năng sinh lý. Qu tạo ra một loạt các ức chế sinh học như: chống viêm [4], chống nhiễm trùng [5], chống ung thư [6, 7], bảo vệ thần kinh[8], hạ huyết áp [9, 10] và hạ đường huyết đã được báo cáo [11]. Qu được coi là chất chống oxy hóa mạnh [12] do khả năng loại bỏ các gốc tự do và liên kết các ion kim loại chuyển tiếp. Các thuộc tính này chủ yếu được gán cho sự hiện diện của hai dược chất chống oxy hóa trong phân tử. Nhóm catechol và nhóm OH ở vị trí C3 cung cấp cho Qu cấu hình tối ưu để ức chế gốc tự do. Mặc dù Qu có tính hấp dẫn đối với các nhà nghiên cứu, nhưng do một số hạn chế của nó như độ tan kém trong nước làm cho phân tử của Qu có sinh khả dụng đường uống kém. Vì vậy Qu khó được sử dụng như một loại thuốc trên thực tế. Nếu sử dụng sau một liều uống duy nhất Qu chỉ có gần 2% được chuyển hóa, quá trình chuyển hóa của nó rất phức tạp, liên quan đến sự hấp thu của ruột hoặc khử oxy hóa, glucuronid hóa, sulfate hóa, methyl hóa và có thể khử các vòng thơm [13].

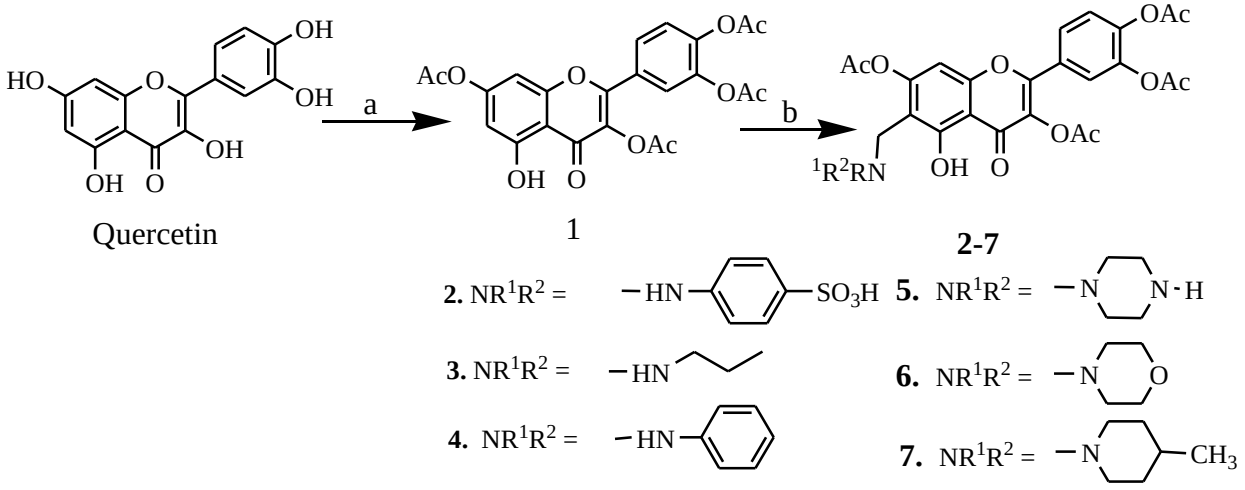
Phản ứng Mannich, còn được gọi là phản ứng methyl hóa amine, là một phản ứng hữu cơ quan trọng được nghiên cứu từ đầu thế kỷ 20 và được đặt tên theo nhà hóa học người Đức Carl Ulvich Franz Mannich (1877-1947) [14, 15]. Mannich phát hiện vào năm 1917 bằng phản ứng của amine trong acid hydrochloric khi có mặt của formaldehyde và các hợp chất có liên kết C-H linh hoạt, đặc biệt là hợp chất có nhóm ketone, có thể tạo ra các bazơ ketone. Hơn nữa, các chất có tính chất tương tự alkaloid có thể được tổng hợp bằng cách lựa chọn các thành phần phản ứng thích hợp. Trong đó, một số báo cáo nghiên cứu đã được tổng hợp bởi phản ứng Mannich. Cụ thể, các phản ứng với ketone béo, ketone thơm và ketone carboxylic là các hợp chất thành phần đã được nghiên cứu nhiều [16, 17]. Các dẫn xuất bazơ Mannich và các dẫn xuất của nó trước tiên được sử dụng làm thuốc. Theo thời gian, các sản phẩm của phản ứng Mannich được lan truyền rộng rãi trong các lĩnh vực sản xuất thuốc và hàng tiêu dùng, ví dụ như: chúng có thể được sử dụng để tổng hợp các thuốc an thần, thuốc chống nấm, thuốc chống đông máu và các chất tương tự về thuốc, chất chống oxy hoá, thuốc nhuộm hoạt tính, hương vị thực phẩm [18-24]. Các điều kiện cổ điển của phản ứng Mannich đối với các hợp chất hydroxyl dựa trên tỷ lệ chất nền, amine và formaldehyde trong rượu với sự gia nhiệt trong thời gian dài [25, 26].

Phản ứng Mannich là một phản ứng đa năng dẫn đến sự kết hợp các amine vào các hợp chất hữu cơ khác nhau có chứa nguyên tử Hα linh động thành các phân tử hữu cơ có chứa nguyên tử nitrogen [27]. Sự hiện diện của gốc amine trong nhiều sản phẩm tự nhiên có thể làm tăng hiệu lực sinh học do số lượng lớn hơn

© 2023 Trường Đại học Công nghiệp thành phố Hồ Chí Minh

các vị trí phân tử đối với sự tấn công của các thành phần tế bào, cũng như do tác dụng trên các thụ thể của tế bào (receptor). Thụ thể tế bào có tính đặc hiệu, tức là chỉ có thể gắn kết với một số phối tử nhất định. Một cách đơn giản, thụ thể giống như một ổ khóa và phối tử chính là chìa khóa. Chỉ có những chất chìa khóa (các phối tử nhất định) mới gắn được vào ổ khóa đó (thụ thể cụ thể). Dạng gốc amine trong thuốc cũng có thể là các phối tử nhất định tăng cường các đặc tính hóa lý (ví dụ, khả năng hòa tan trong nước) và cải thiện sinh khả dụng của các phân tử hoạt tính sinh học [28, 29].

Do đó, việc tổng hợp các dẫn xuất flavonoids từ Qu đi qua chất trung gian (**1**) và dựa trên base Mannich là cần thiết, nhằm tìm kiếm hoạt tính mới cho các dẫn xuất. Quá trình tổng hợp đã được thiết kế theo **Sơ đồ 1.**



Sơ đồ 1: Tổng hợp các dẫn xuất flavonoid từ quercetin với amine

Tác chất: (a) anhydride acetic, đun hồi lưu và khuấy ở 40 ^{o}C; (b) amine, HCHO, HCl, MeOH, đun hồi lưu và khuấy ở 80 ^{o}C.

2. THỰC NGHIỆM

2.1 Thiết bị và hóa chất

Phổ hồng ngoại được ghi lại trên máy quang phổ Bruker Tensor-27, sử dụng KBr để ép viên. Phổ ^{1}H và ^{13}C NMR được ghi lại trên thiết bị Bruker-AV400 với tetramethylsilane làm chất chuẩn nội, các hằng số ghép nối (*J*) tính bằng Hertz (Hz). Khối phổ (MS) được xác định bằng máy quang phổ VG Autospec-3000 hoặc Mat 95 XP bằng phương pháp EI hoặc ESI.

Nguyên liệu và hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này của Sigma - Aldrich có độ tinh khiết phân tích gồm có Quercetin, anhydride acetic, methanol, formaldehyde 37 %, acid hydrochloric, ethyl acetate, n-hexane, methanol; các amine: 4-aminobenzenesulfonic acid, propan-1-amine, aniline, piperazine, morpholine và 4-methylpiperidine.

2.2. Tổng hợp (1)

Cân (2 g, 6.61 mmol) Quercetin, (1,5 g, 10.85 mmol) K_2CO_3 cho vào bình phản ứng rồi thêm tiếp (50 mL, 0.52 mol) anhydride acetic và khuấy thành hệ đồng nhất. Đun hoàn lưu ở 40 ℃ trong 4 giờ và sử dụng sắc ký bản mỏng để theo dõi sự tạo thành chất mới. Kết thúc phản ứng, chiết sản phẩm với ethyl acetate (20 mL x 3). Loại bớt dung môi (dùng cô quay chân không), còn lại khoảng 7 mL và để nguội rồi thêm n-hexane cho đến khi sản phẩm được kết tinh. Sản phẩm được rửa lại bằng n-hexane và sấy khô ở 70 ℃ trong 1 giờ, thu hợp chất có dạng tinh thể ~~có~~ màu trắng đục. ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 12.11 (s, 1H, 5-OH), 7.76 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 7.74 (s, 1H, H-2'), 7.37 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 6.86 (s 1H, H-8), 6.61 (s, 1H, H-6), 2.38 (s, 3H, 7-O$\underline{CH_3}$), 2.34 (d, *J* = 1.6 Hz, 9H, 3-OCH_3, 4'-OCH_3 và 5'-OCH_3).^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 176.2, 168.2, 167.9 (d), 167.8, 161.7, 156.3, 155.9, 155.5, 144.4, 142.2, 132.2, 127.5, 126.6, 124.0, 108.8, 105.5, 101.2, 21.2, 20.7, 20.4; EI-MS: m/z 471 $[M+1]^{+}$.

2.3. Qui trình chung tổng hợp dẫn xuất của 4-(3,7-diacetoxy-5-hydroxy-4-oxo-4*H*-chromen-2-yl)-1,2-phenylene diacetate (1) với các amine

Cân (0.2 g, 1.176 mmol) hợp chất **1** cho vào bình phản ứng 250 mL đã có sẵn methanol rồi khuấy thành hệ đồng nhất. Thêm tiếp lượng dư amine và formaldehyde so với hợp chất **1** theo tỉ lệ (1:1.2:1.2) cùng 3 giọt HCl 37% làm xúc tác. Đun hoàn lưu ở 80 ℃ trong 3 giờ và sử dụng sắc ký bản mỏng để theo dõi sự tạo thành chất mới. Kết thúc phản ứng, để nguội hỗn hợp, rồi loại bớt dung môi (dùng cô quay chân không), còn lại khoảng 5 mL, rồi thêm 50 mL nước và chiết với ethyl acetate (20 mL x 3). Làm khan lớp hữu cơ bằng Na_2SO_4, lọc và cô đuổi dung môi dưới áp suất giảm. Chất dạng dầu thu thêm 5 mL ethyl acetate và thêm từ từ một lượng n-hexane vào chất dạng dầu thu được cho đến khi có kết tủa đục. Sản phẩm được kết tinh qua đêm, sau đó lọc và rửa bằng n-hexane, đem sấy khô ở 70 ℃ trong 1 giờ thu được sản phẩm dạng tinh thể.

2.3.1. Tổng hợp (2)

Sau khi kết tinh lại trong ethyl acetate/n-hexane thu được sản phẩm với hiệu suất 65 %, là chất có dạng tinh thể màu vàng nhạt. FT-IR (KBr, ν_{max} cm^{-1}): 3347 (C5-OH), 2984 (Ar-CH), 2796 (Ar-CH), 1759 (C=O), 1596 (C-O-C), 1406 (C-O-Ac), 1154, 1024, 1114 (C-N-); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 7.85 (s, 3H, H-2', H-5'' và H-7''), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 7.38 (t, J = 9.6 Hz, 3H, H-6', H-4'' và H-8''), 6.63 (s, 1H, H-8), 4.50 (s, 2H, H-1''), 2.12 (s, 12H, 4xOCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 178.35, 170.47, 169.24, 168.61, 157.25, 157.03, 156.75, 155.82, 154.96, 143.87, 143.02, 140.50, 130.68, 122.77, 121.45, 112.26, 108.29, 105.65, 97.18, 54.50, 53.69, 44.78, 20.67, 20.5, 20.2; ESI-MS: m/z 656 $[M+1]^+$.

2.3.2. Hợp chất (3)

Sau khi kết tinh lại trong ethyl acetate/n-hexane thu được sản phẩm với hiệu suất 82 %, là chất có dạng tinh thể màu vàng. FT-IR (KBr, ν_{max} cm^{-1}): 3430 (C5-OH), 2974 (Ar-CH), 2896 (Ar-CH), 1769 (C=O), 1652 (C-O-C), 1435 (C-O-Ac), 1371, 1024, 1114 (C-N-), 941 (Ar-C-H); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 7.85 (s, 1H, H-2'), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 7.40 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-5'), 6.63 (s, 1H, H-8), 3.87 (s, 2H, H-1''), 2.55 (s, 2H, H-2''), 2.12 (s, 12H, 4xOCH_3), 1.55 (d, J = 6.1 Hz, 2H, H-3'), 0.92 (t, J = 7.2 Hz, 3H, CH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 178.4, 170.5, 169.2, 168.6, 157.3, 157.0, 156.8, 155.8, 154.9, 143.9, 143.0, 140.5, 130.7, 122.8, 121.5, 112.3, 108.3, 105.7, 97.2, 51.9, 48.7, 23.4, 20.7, 20.5, 20.2, 11.6; EI-MS: m/z 542 $[M+1]^+$.

2.3.3. Hợp chất (4)

Sau khi kết tinh lại trong ethyl acetate/n-hexane thu được sản phẩm với hiệu suất 79 %, là chất có dạng tinh thể màu vàng cam. FT-IR (KBr, ν_{max} cm^{-1}): 3356 (C5-OH), 3215 (-NH), 2984 (Ar-CH), 2856 (Ar-CH), 1659 (C=O), 1514 (C-O-C), 1251 (C-O-Ac), 1178, 1114 (C-N-), 812 (Ar-CH); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 7.85 (s, 1H, H-2'), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 7.40 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-5'), 7.24 (t, J = 7.9 Hz, 2H, H-4'' và H-6''), 6.87 (t, J = 7.9 Hz, 1H, H-5''), 6.78 (d, J = 8.0 Hz, 2H, H-3'' và H-7''), 6.63 (s, 1H, H-8), 4.31 (s, 2H, H-1''), 2.12 (s, 12H, 4xOCH_3); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 178.4, 170.5, 169.2, 168.6, 157.4, 157.1, 155.82, 154.9, 147.8, 143.9, 143.0, 140.5, 130.9, 129.1, 124.7, 122.8, 121.5, 112.8, 112.3, 108.3, 105.7, 97.2, 48.7, 20.8, 20.5, 20.2; EI-MS: m/z 576 $[M+1]^+$.

2.3.4. Hợp chất (5)

Sau khi kết tinh lại trong ethyl acetate/n-hexane thu được sản phẩm với hiệu suất 86 %, là chất có dạng tinh thể màu vàng nhạt. FT-IR (KBr, ν_{max} cm^{-1}): 3447 (C5-OH), 2974 (Ar-CH), 2896 (Ar-CH), 1749 (C=O), 1586 (C-O-C), 1416 (C-O-Ac), 1244, 1132 (C-N-); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 7.85 (s, 1H, H-2'), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 7.40 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-5'), 6.63 (s, 1H, H-8), 3.95 (s, 2H, H-1''), 2.70 (s, 4H, H-3'' và H-5''), 2.56 (s, 4H, H-2'' và H-6''), 2.12 (s, 12H, 4x$COC\underline{H}_3$).^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ *(ppm)*: 178.4, 170.5, 169.2, 168.6, 157.3, 155.8, 154.9, 148.6, 143.9, 143.0, 140.5, 138.1, 130.7, 127.5, 122.8, 121.5, 119.3, 112.3, 108.3, 105.7, 97.2, 48.7, 20.67, 20.5, 20.2 ; EI-MS: m/z 569 $[M+1]^+$.

2.3.5. Hợp chất (6)

Sau khi kết tinh lại trong ethyl acetate/n-hexane thu được sản phẩm với hiệu suất 83 %, là chất có dạng tinh thể ~~có~~ màu vàng nhạt. FT-IR (KBr) ν_{max} cm^{-1}: 3378 (C5-OH), 2950 (Ar-CH), 2852 (Ar-CH), 1732 (C=O), 1629 (O=C-Ac), 1446 (C-O-C), 1186, 1060 (C-N-); ^{1}H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 12.55 (s,1H. 5-OH), 7.85 (s, 1H, H-2'), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 7.40 (d, J = 8.3 Hz, 1H, H-5'), 6.63 (s, 1H, H-8), 4.00 (s, 2H, H-1''), 3.69 - 3.53 (m, 4H, H-3'' và H-4''), 2.59 - 2.36 (m, 4H, H-2'' và H- 5''), 2.12 (s, 12H, 4x$COC\underline{H}_3$).^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 178.4, 170.5, 169.2, 168.6, 157.3, 157.1, 156.8, 155.8,

154.9, 143.9, 143.0, 140.5, 130.7, 122.8, 121.5, 112.3, 108.3, 105.7, 97.2, 66.4, 53.7, 20.7, 20.5, 20.2; EI-MS: m/z 570 $[M+1]^+$.

2.3.6. Hợp chất (7)

Sau khi kết tinh lại trong ethyl acetate/n-hexane thu được sản phẩm với hiệu suất 82 %, là chất có dạng tinh thể màu vàng. FT-IR (KBr, ν_{max} cm^{-1}): 3350 (C5-OH), 3010 (Ar-CH), 2860 (Ar-CH), 1662 (C=O), 1576 (C-O-C), 1455 (C-O-Ac), 1218 (C-O-C của vòng B), 1080 (C-N-); ^{1}H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 12.55 (s, 1H, 5-OH), 7.85 (s, 1H, H-2'), 7.68 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-5'), 7.40 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-6'), 6.63 (s, 1H, H-8), 3.93 (s, 2H, H-1''), 2.54 (d, J = 2.7 Hz, 4H, H-2'' và H-6''), 2.12 (s, 12H, 4x$COCH_3$), 1.61 (d, J = 27.7 Hz, 1H, H-4''), 1.56 - 1.23 (m, 4H, H-3'' và H-5''), 0.89 (t, J = 12.9 Hz, 3H, CH_3). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (*ppm*): 178.4, 170.5, 169.2, 168.1, 157.3, 155.8, 154.9, 143.9, 143.0, 140.5, 130.7, 122.8, 121.5, 112.3, 108.3, 105.7, 97.2, 53.7, 52.2, 34.4, 30.5, 21.7, 20.7, 20.4, 20.2; EI-MS: m/z 582 $[M+1]^+$.

2.8. Khảo sát khả năng trung hòa gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$

Hoạt động loại bỏ gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$ được xác định bằng phương pháp khử màu $ABTS^{\bullet+}$ được báo cáo đầu tiên bởi Miller và Rice-Evans năm 1993 và cải tiến năm 1999. Chuẩn bị dung dịch với nồng độ ABTS (diamonium 2,2′-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)) 7 μM và $K_2S_2O_8$ 2,45 μM. Sau đó để dung dịch ổn định trong vòng 12-16 tiếng tại nhiệt độ phòng, tiếp theo pha loãng dung dịch $ABTS^{\bullet+}$ bằng methanol và điều chỉnh mật độ quang là 0,7±0,02 tại bước sóng 734 nm. Tiến hành khảo sát hoạt động ức chế gốc tự do $ABTS^{\bullet+}$ bằng cách cho 3.9 μL $ABTS^{\bullet+}$ vào 0.1 μL mẫu (ở các nồng độ ban đầu: 50, 100, 150, 200 và 300 μM và điều chỉnh lại để được giá trị IC_{50}). Hỗn hợp phản ứng được để trong 6 phút và tiến hành ghi nhận giá trị mật độ quang A tại bước sóng 734 nm. Chất đối chứng dương là Trolox được khảo sát ở nồng độ 25, 50, 100, 200, 300 và 400 μM.

Phần trăm hoạt tính chống oxy hóa (HTCO, %) được tính theo công thức :

$$\mathrm{HTCO}(\%) = \frac{\mathrm{Ao} - \mathrm{Am}}{\mathrm{Ao}} \times 100\%$$

Trong đó :

A_o: Mật độ quang của dung dịch $ABTS^{\bullet+}$ và methanol.

A_m: Mật độ quang của dung dịch $ABTS^{\bullet+}$, methanol và mẫu thử.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Với giả thuyết rằng đưa nguyên tử nitrogen vào phân tử flavonoids sẽ cải thiện hoạt tính sinh học của phân tử, chúng tôi đã bắt đầu tổng hợp các dẫn xuất flavonoid chứa nitrogen ester hóa các nhóm hydroxyl ở C3, C7, C4' và C5' của Qu bằng anhydride acetic để thu được 4-(3,7-diacetoxy-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-1,2-phenylene diacetate (**1**). Cấu trúc của Qu có nhóm hdroxyl tại vị trí C5 và nhóm ketone (C=O) tại vị trí C4 trong dung môi nó có thể tạo ra liên kết hydro tạo ra vòng sáu cạnh bền nên trong điều kiện nhiệt độ thấp (nhỏ hơn 40 ^{0}C) khi kết hợp với anhydride acetic thì không có sự hình thành ester của nhóm hydroxyl ở C5. Phản ứng Mannich đòi hỏi một nguyên tử hydro hoạt động. Nên hợp chất **1** với Hα ở C6 trên vòng A có thể kết hợp với các amine và formaldehyde theo tỷ lệ 1:1.2:1.2 trong xúc tác acid HCl để tạo ra sản phẩm mong muốn.

Cấu trúc các hợp chất đã tổng hợp được xác định bằng phương pháp phổ (FT-IR, ^{1}H, ^{13}C-NMR và MS). Trên phổ ^{1}H-NMR của hợp chất **1** xuất hiện tín hiệu proton có độ dịch chuyển hoá học δ_H 12.11 *ppm* được gán cho nhóm -OH ở vị trí C5, các mũi đôi (*d*) tại δ 7.37 và δ 7.76 *ppm* là được gán cho các proton của vị trí C5' và C6'. Xuất hiện 3 tín hiệu mũi đơn (*s*) lần lượt ở độ dịch chuyển hoá học δ 7.74 , 6.86 và 6.6 *ppm* được gán cho lần lượt các proton gắn trên C2' (vòng C), C8 (vòng B) và C6 (vòng A) tương ứng của **1**. Proton có độ dịch chuyển hóa học δ 2.34 và 2.38 *ppm* được gán cho 4 nhóm thế nhóm acetate (-$COCH_3$) trên vòng thơm, những vị trí này góp phần xác nhận cấu trúc hợp chất **(1)**. Sự tạo thành hợp chất **1** khung flavonoid còn được chứng minh bằng sự xuất hiện các tín hiệu trên phổ ^{13}C-NMR ở các vị trí δ 176.2 *ppm* được gán cho nhóm ketone (C=O) tại (C-4); 3 tín hiệu ở δ 20.4, 20.7 và 21.2 *ppm* được gán cho 4 nhóm methyl của các acetate; 2 tín hiệu ở δ 168.21, 167.84 *ppm* và 1 tín hiệu ở δ 167.76 *ppm* có cường độ mạnh được gán cho 4 nhóm carbonyl (C=O) của ester. Khối phổ EI-MS cho các giá trị 470 và 471 tương ứng là các ion M^+ và $[M+H]^+$ phù hợp với khối lượng phân tử (M = 470) của hợp chất **1**.

Bằng phản ứng Mannich, 6 dẫn xuất flavonoid là **2-7** từ **1** đã được amine hoá. Trên phổ FT-IR của hợp chất **2-7** có các vân phổ hấp thụ quanh vị trí 3347 và 1759 cm^{-1} đặc trưng cho các dao động của liên kết -OH và >C=O tương ứng. Ngoài ra các dao động liên kết C-N, C-O xuất hiện quanh các vị trí 1024-1114 và 1154 cm^{-1}. Trên phổ ^{1}H-NMR, các dẫn xuất **2-7** không còn tín hiệu proton xuất hiện ở δ_H 6.61 *ppm* là vị trí proton trên C6 vòng thơm A của hợp chất **1**, thay vào đó là sự xuất hiện các tín hiệu mới tại δ_H 3.87-4.5 *ppm* là của nhóm -CH_2N, xuất hiện tín hiệu proton có độ dịch chuyển hoá học δ_H 2.12 *ppm* được gán cho 4 nhóm thế nhóm acetate (-COCH_3) trên vòng thơm, các mũi đôi (*d*) tại δ 7.40 và δ 7.68 *ppm* là được gán cho các proton của vị trí C5' và C6'. Ở độ dịch chuyển hoá học δ 7.85 và 6.63 *ppm*, xuất hiện 2 tín hiệu mũi đơn (*s*) lần lượt được gán cho các proton gắn trên C2' và C8 tương ứng. Sự tạo thành các dẫn xuất **2-7** khung flavonoid còn được chứng minh bằng các tín hiệu xuất hiện trên phổ ^{13}C-NMR ở các vị trí δ 178,4 ppm được gán cho nhóm ketone (C=O) tại (C-4), 3 tín hiệu ở δ 20.2, 20.5 và 20.67 *ppm* được gán cho 4 nhóm methyl của các acetate; 4 tín hiệu ở δ 178.35, 170.47, 169.24, 168.61 *ppm* được gán cho 4 nhóm carbonyl (C=O) của ester. Trên phổ ESI-MS cho các giá trị M^+ và $[M+1]^+$ phù hợp với khối lượng phân tử của hợp chất **2-7**.

2.5. Kết quả khả năng chống oxy hóa của các hợp chất đã tổng hợp.

Bảng 1. Kết quả khả năng chống oxy hóa của các dẫn xuất bazơ Mannich của 1 (2-7) và Trolox

Hợp chất	C (μM)	Mật độ quang A_C	HTKO (%)	IC_{50} (µM)
2 (A_o=0.701)	50	0.601	12.89	185.59±0.107
	100	0.514	26.68	
	150	0.422	40.52	
	200	0.332	54.51	
	300	0.16	80.78	
3 (A_o=0.699)	20	0.548	16.61	64.02±0.15
	40	0.457	31.62	
	60	0.355	46.21	
	80	0.258	63.09	
	100	0.146	77.11	
4 (A_o=0.7)	50	0.632	13.86	177.68±0.13
	100	0.554	26.86	
	150	0.488	42.71	
	200	0.419	56.43	
	300	0.281	84.86	
5 (A_o=0.701)	50	0.481	16.18	163.14±0.14
	100	0.409	31.79	
	150	0.332	46.53	
	200	0.256	61.57	
	300	0.116	89.31	
6 (A_o=0.7)	50	0.648	13.24	176.92±0.19
	100	0.586	27.82	
	150	0.457	42.81	
	200	0.389	56.99	
	300	0.139	84.91	
7 (A_o=0.701)	50	0.381	19.59	156.71±0.11
	100	0.325	35.13	
	150	0.264	48.57	
	200	0.208	61.67	
	300	0.103	89.58	
Trolox (A_o=0.7)	25	0.601	5.29	221.31±0.17
	50	0.573	11.14	
	100	0.519	22.86	
	200	0.396	45.43	
	300	0.276	67.57	

Hợp chất	C (μM)	Mật độ quang A_C	HTKO (%)	IC_{50} (µM)
	400	0.156	71.71	

Trong đó:

- A là mật độ quang tương ứng với từng nồng độ.

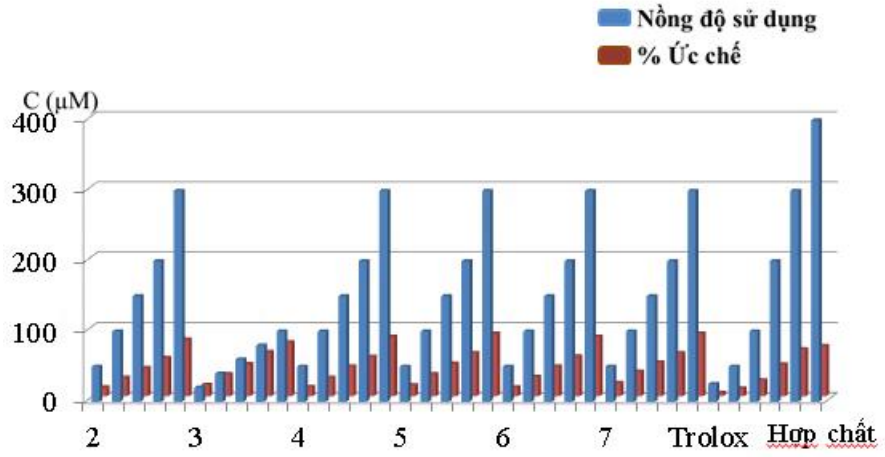
- A_0 là mật độ quang tại thời điểm t_0.

- HTKO % là hoạt tính kháng oxy hóa của từng hợp chất theo phần trăm.

- IC_{50} nồng độ ức 50% gốc tự do.

$$IC_{50}= \frac{50-b}{a}$$

Với: a và b là các hệ số từ phương trình y = ax+b.



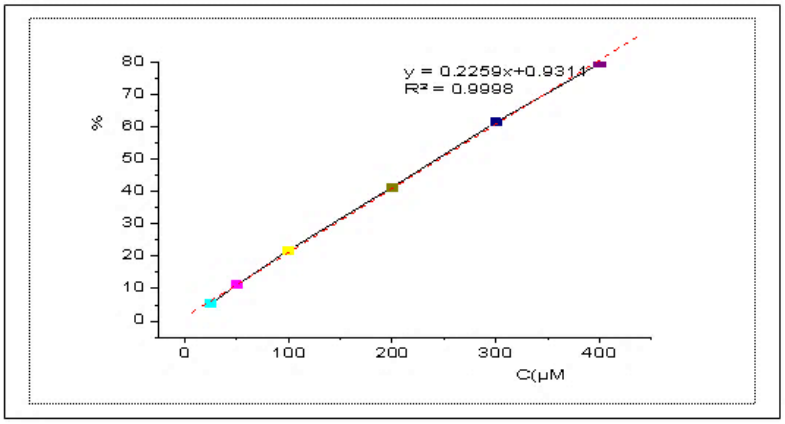
Hình 1: Đồ thị thể biểu diễn sự phụ thuộc của nồng độ của các hợp chất **2-7** và Trolox đến khả năng kháng oxy hóa theo nồng độ % ức chế

Tất cả các dẫn xuất bazơ Mannich của hợp chất **1** đều được thử hoạt tính kháng oxy hóa bằng phương pháp ABTS thể hiện trong Bảng 1. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng oxy hóa chỉ ra tất cả các hợp chất đã tổng hợp đều có hoạt tính kháng oxy hóa, trong đó, do có sự khác biệt giữa các cấu trúc dẫn đến khả năng trung hòa gốc tự do khác nhau mà hợp chất **3** có hoạt tính mạnh nhất, đạt được 77.11% ở nồng độ 100 (μM), và giá trị IC_{50} của hợp chất **3** là 64.02±0.15 (μM). Giá trị IC_{50} với các hợp chất **7**, **5**, **6, 4** và **2** còn lại tăng dần tương ứng là 156.74±0.10, 163.14±0.14, 167.92±0.19, 177.68±0.13 và 185.59±0.11 (μM). Nếu so sánh với hoạt tính kháng oxy hóa của chất chuẩn Trolox có giá trị IC_{50} là 221.31±0.17 (μM) thì khả năng chống oxy hóa của hợp chất **3, 7** và **5** mạnh hơn của chất chuẩn Trolox là 1.4-3.4 lần.

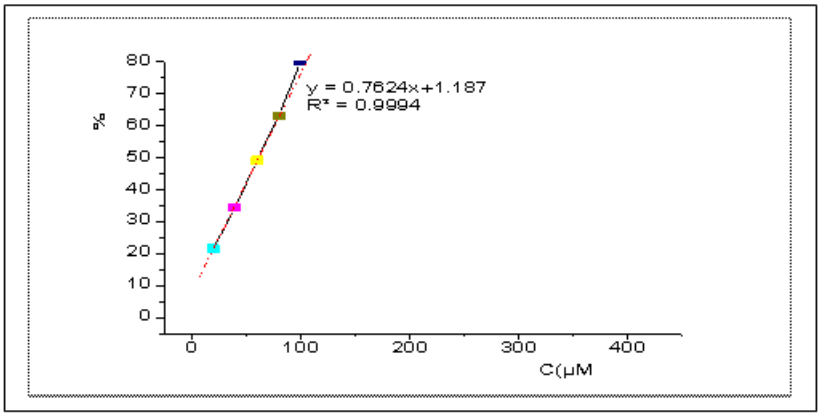
Quan sát cấu trúc của các hợp chất tổng hợp và kết quả kháng oxi hóa, chúng tôi thấy các cấu trúc khi tổng hợp thêm vào đều là các amine vòng, chỉ có hợp chất **3** là có gốc akyl béo với ba nguyên tử carbon điều này có thể làm cho gốc alkyl trên amine có tính tương thích với khả năng bắt gốc tự do, dẫn đến hợp chất **3** có khả năng ức chế hoạt tính kháng oxy hóa tốt nhất. Đây là cơ sở quan trọng để chúng tôi tiếp tục tiến hành thử nghiệm các hoạt tính sinh học khác với nhóm dẫn xuất này.

3. ĐƯỜNG CHUẨN THỂ HIỆN KẾT QUẢ ĐO KHẢ NĂNG KHÁNG OXY HÓA CỦA CÁC HỢP CHẤT ĐÃ TỔNG HỢP

3.1. Mẫu chuẩn



Hình 2a. Đường chuẩn thể hiện khả năng chống oxy hóa của mẫu chuẩn Trolox theo % ức chế



Hình 2b. Đường chuẩn thể hiện khả năng chống oxy hóa của hợp chất 3,7, 3',4'-Tetra-*O*-acetyl-5-hydroxyl-6-[methyl(propylamino)]flavonoid (**3**) theo % ức chế

KẾT LUẬN

Chúng tôi đã tổng hợp được dẫn xuất 4-(3,7-diacetoxy-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-1,2-phenylene diacetate (**1**) từ (Qu) và amine hoá (**1**) dựa trên cơ sở của phản ứng Mannich thành các dẫn xuất flavonoids mới **2-7** ở 80 ℃ trong 1-3 giờ cho hiệu suất 65-86%. Kiểm tra khả năng kháng oxy hóa bằng phương pháp ABTS tiêu chuẩn cho thấy các hợp chất đều có khả năng kháng oxy hóa, trong đó **3** (IC_{50} 64.02±0.15 μM), **7 (**IC_{50} 156.71±0.11 μM), **5** (163.14±0.14 μM) và **4 (**IC_{50} 177.68±0.13 μM**)** cao hơn chất chuẩn Trolox (IC_{50} 221.31±0.17 μM) 1.4-3.4 lần.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. P. Maleki Dana, F. Sadoughi, Z. Asemi and B. Yousefi, "Anti-cancer properties of quercetin in osteosarcoma," *Cancer Cell International*, vol. 21, pp. 39-46, 2021. doi: 10.1186/s12935-021-02067-8.

2. H. C. Li Chen, "Quercetin Has Antimetastatic Effects on Gastric Cancer Cells via the Interruption of uPA/uPAR Function by Modulating NF-*κ*b, PKC-*δ*, ERK1/2, and AMPK*α*," *Integrative Cancer Therapies*, vol. 1, pp. 1-13, 2017, doi: 10.1177/1534735417696702.

3. P. Asgharian, A. P. Tazehkand, S. R. Soofiyani, K. Hosseini, M. Martorell, V. Tarhriz, H. Ahangari, N. Cruz-Martins, J. Sharifi-Rad, Z. M. Almarhoon, A. Ydyrys, A. Nurzhanyat, A. Yessenbekova and W. C. Cho, "Quercetin

Impact in Pancreatic Cancer: An Overview on Its Therapeutic Effects," *Oxydative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2021, pp. 1-13, 2021. doi: 10.1155/2021/4393266.

4. S. C. Bischoff, "Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease," *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, vol. 11, pp. 733–740, 2008.

5. S. Chirumbolo, "The role of quercetin, flavonols and flavones in modulating inflammatory cell function. Inflamm," *Allergy Drug Targets*, vol. 9, pp. 263–285, 2010.

6. K.V. Hirpara PA, A. J. Mukherjee, N. J. Joshi, A. C. Burman, "Quercetin and its derivatives: synthesis, pharmacological uses with special emphasis on antitumor properties and prodrug with enhanced bioavailability," *Anticancer Agents Med. Chemistry*, vol. 9, pp. 138–161, 2009.

7. C. M. R. Spagnuolo, S. Bilotto, I. Tedesco, B. Laratta, G. L. Russo, "Dietary polyphenols in cancer prevention: the example of the flavonoid quercetin in leukemia," *Acad. Sci.*, vol. 1259, pp. 95–103, 2012.

8. B. Ossola, P. T. Mannisto, "The multiple faces of quercetin in neuroprotection," *Expert Opin. Drug Saf*, vol. 8, pp. 397–409, 2009.

9. A. J. Larson, T. Jalili, "Therapeutic potential of quercetin to decrease blood pressure: review of efficacy and mechanisms," *Adv. Nutr*., vol. 3, pp. 39-46, 2012.

10. F. Perez-Vizcaino, "Andriantsitohaina R. Endothelial function and cardiovascular disease: effects of quercetin and wine polyphenols," *Free Radic. Res*, vol. 40, no. 10, pp. 1054–1065, 2006.

11. S. Zunino, "Type 2 diabetes and glycemic response to grapes or grape products," *Journal Nutrition*, vol. 139, no. 9 pp. 1794S–1800S, 2009.

12. A. W. Boots, A. Bast, "Health effects of quercetin: from antioxydant to nutraceutical," *Eur. J. Pharmacol*, vol. 585, pp. 325–337, 2008.

13. G. D. Andrea, "Quercetin: a flavonol with multifaceted therapeutic applications?," *Fitoterapia*, vol. 106, pp. 256-271, 2015.

14. W. R. Glave, C. J. Hansch, "Relationship between lipophilic character and anesthetic activity," *J. Pharm. SCI-US*, vol. 61, pp. 589–591, 1972.

15. G. C. Mannich, "Ueber ein Kondensationsprodukt aus Formaldehyd, Ammoniak und Antipyrin," *Arch. Pharm. Pharm. Med. Chemistry*, vol. 250, pp. 647-667, 1912. doi:10.1002/ardp.19122500151

16. B. M. Kotecka, G. B. Barlin,M. D. Edstein and K.H. Rieckmann, "New quinoline di-Mannich base compounds with greater antimalarial activity than chloroquine, amodiaquine, or pyronaridine," *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 41, pp. 1369-74, 1997. doi: 10.1128/aac.41.6.1369

17. H. Liu, H. Fan, X. Gao, X. Huang, X. Liu, L. Liu, C. Zhou, J. Tang, Q. Wang, W. Liu, "Design, synthesis and preliminary structure-activity relationship investigation of nitrogen-containing chalcone derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors: a further study based on Flavokawain B Mannich base derivatives," *J. Enzyme Inhib Med Chemistry*, vol. 32, no. 4, pp. 580-589, 2016.

18. A. A. El-Emam, M. A. Al-Omar, K. A. Alrashood, E. E. Habib, "Synthesis and antimicrobial activity of novel 5-(1-adamantyl)-2-aminomethyl-4-substituted-1,2,4-triazoline-3-thiones," *European journal of medicinal chemistry*, vol. 68, pp. 96-102, 2013.

19. A. M. Isloor, P. Shetty, "Regioselective reaction: synthesis, characterization and pharmacological studies of some new Mannich bases derived from 1, 2, 4-triazoles," *European journal of medicinal chemistry*, vol. 44, pp. 3784-3787, 2009.

20. B. L. Wang, X. L. Zhang, J. F. Zhang, H. B. Song, Z. M. Li, "Synthesis, Structure and Biological Activity of Novel 1,2,4-Triazole Mannich Bases Containing a Substituted Benzylpiperazine Moiety," *Chemical biology & drug design*, vol. 78, pp. 42-49, 2011.

21. Y. Chen, S. L. Cass, S. K. Kutty, E. M. Yee, D. S. Chan, C. R. Gardner, O. Vittorio, E. Pasquier, D. S. Black and N. Kumar, "Synthesis, biological evaluation and structure-activity relationship studies of isoflavene based Mannich bases with potent anti-cancer activity," *Bioorg Med. Chem. Lett*., vol. 25, pp. 5377-83, 2015. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.09.027

22. C. Dyrager, M. Wickström, M. Fridén-Saxin, A. Friberg, K. Dahlén, E. A. Wallén, K. Luthman, "Inhibitors and promoters of tubulin polymerization: Synthesis and biological evaluation of chalcones and related dienones as

potential anticancer agents," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 19, pp. 2659–2665, 2011. doi:10.1016/j.bmc.2011.03.005

23. L. Ha, Y. Qian, S. Zhang, X. Ju, S. Sun, H. Guo, Q. Wang, K. Li, Q. Fan, Y. Zheng and H. Li, "Synthesis and Biological Evaluation of Scutellaria Flavone Cyclaneaminol Mannich Base Derivatives as Novel CDK1 Inhibitors," *Anticancer Agents Med Chemistry*, vol. 16, pp. 914-24, 2016. doi: 10.2174/1871520615666150928114425

24. S. Nantapap, S. Punyanitya, N. Nuntasaen, W. Pompimon, P. Meepowpan, "Flavones from Aerial Parts of Polyalthia bullata and Cytotoxycity Against Cancer Cell Lines," *Chemistry of Natural Compounds*, vol. 53, pp. 762–763, 2017. doi:10.1007/s10600-017-2114-0

25. V. S. Nguyen, L. Shi L, F. Q. Luan and Q. A. Wang, "Synthesis of kaempferide Mannich base derivatives and their antiproliferative activity on three human cancer cell lines," *Acta Biochim Pol*, vol. 62, pp. 547-52, 2015. doi: 10.18388/abp.2015_992

26. V. S. Nguyen, L. Shi , S. C. Wang and Q. A. Wang, "Synthesis of Icaritin and *β*-anhydroicaritin Mannich Base Derivatives and Their Cytotoxyc Activities on Three Human Cancer Cell Lines," *Anticancer Agents Med Chemistry*, vol. 17, pp. 137-142, 2017. doi: 10.2174/1871520616666160404111210

27. D. Joshi, J. Murphy, M. Abdelrahim, H. Schönherr, J. H. Sparrow, G. Ellestad, K. Nakanishi, A. Zask, "Synthesis of antioxydants for prevention of age-related macular degeneration," *J. Nat. Prod.*, vol. 76, pp. 450-454, 2013.

28. H. Peipei, Z. Wenhua, C. Mingxia, W. Qiuan, "Microwave-assisted Synthesis of Polymethoxychalcone Mannich Bases and Their Antiproliferative Activity," *Letters in Organic Chemistry*, vol. 16, no. 2, pp. 117 - 121, 2019.

29. G. Roman, "Mannich bases in medicinal chemistry and drug design," *Eur. J. Med. Chemistry*, vol. 89, pp. 743-816, 2015.

SYNTHESIS AND EVALUATION OF ANTIOXIDANT ACTIVITY OF NOVEL FLAVONOIDS RELY ON MANNICH BASE

NGUYEN VAN SON[1,*], VO THANH CONG[1], PHAM VAN HUNG[1]

[1]Faculty of Chemical Engineering, Industrial University of Ho Chi Minh City, Ho Chi minh City, Viet Nam

[*]Corresponding Author's E-mail: nguyenvanson@iuh.edu.vn

Abstract. We successfully synthesized 4-(3,7-diacetoxy-5-hydroxy-4-oxo-4H-chromen-2-yl)-1,2-phenylene diacetate (**1**) from Quercetin with acetic anhydride. Based on the Mannich reaction of **1** with various amines and formaldehyde, six novel derivatives **2-7** were synthesized and formed at 80℃ for 1-3 hours with yields of about 65- 86%. The aminomethylation occurred preferentially in the position at C-6 of the A-ring of **1.** All synthesized compounds were determined by molecular structure by modern physicochemical analysis methods such as FT-IR, ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, and MS. Moreover, the synthesized compounds were evaluated for their antioxidant capacity by the standard ABTS method, showing that all compounds have the antioxidant capacity, of which the best compounds were **3** (IC_{50} 64.02±0.15 μM), **5** (IC_{50} 164.74±0.14 μM) and **7** (IC_{50} 167.40±0.11 μM) 1.4-3.4 times higher than Trolox standard (IC_{50} 221.31±0.17 μM). These are potential compounds for antioxidant applications.

Keywords: Synthesis, Mannich, Antioxidant, Flavonoid, Quercetin, ABTS

Ngày nhận bài: 29/08/2022

Ngày chấp nhận đăng: 03/03/2023