

NGHIÊN CỨU QUY TRÌNH TỔNG HỢP VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH GÂY ĐỘC TẾ BÀO CỦA MỘT SỐ ANALOGUE STYRYL-LACTONE

Đoàn Thị Mai Hương^{1,*}, Phạm Văn Cường¹, Nguyễn Văn Hùng¹,
Triệu Quý Hùng¹, Daniele Bonnet-Delpon², Châu Văn Minh¹

¹Viện Hóa sinh biển – Viện HLKHCNVN, 18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội

²Trường đại học Paris XI – CH Pháp

* Email: doanhuong7@yahoo.com

Đến Tòa soạn: 10/11/2012; Chấp nhận đăng: 15/10/2013

TÓM TẮT

Styryl-lactones là một lớp chất chính được phân lập từ chi *Goniothalamus*- họ Na (Annonaceae). Trong số các styryl-lactone phân lập được, một số hợp chất thể hiện hoạt tính chống ung thư đối với các dòng tế bào ung thư khác nhau như howiinol A, goniotriol, gioniodiol và goniothalamin. Trước đây, chúng tôi công bố quy trình tổng hợp howiinol A. Trong bài báo này, chúng tôi công bố quy trình tổng hợp và kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của 6 hợp chất styryl-lactone. Trong đó hợp chất **3** thể hiện hoạt tính tốt nhất đối với dòng tế bào ung thư KB với giá trị $IC_{50} = 0,88 \mu\text{g/ml}$. Cấu trúc của các hợp chất được xác định bằng các phương pháp phổ như COSY, HSQC, HMBC, NOESY, MS, ^{19}F NMR.

Từ khoá: styryl-lactone, *Goniothalamus*, howiinol A.

1. MỞ ĐẦU

Các hợp chất tự nhiên hoặc các sản phẩm được tổng hợp mô phỏng dựa theo các hợp chất tự nhiên đã, đang và sẽ đóng một vai trò quan trọng trong việc cung cấp cho nhân loại những vũ khí để chống lại bệnh tật, nâng cao sức khỏe loài người. Việt Nam là nước có khí hậu nhiệt đới với hệ thực vật đa dạng, trong đó tiềm ẩn nhiều loài thực vật được sử dụng để làm thuốc trong y học cổ truyền, ví dụ như một số loài thuộc chi *Goniothalamus*- họ Na (Annonaceae) [1]. Các công trình nghiên cứu trên thế giới cho thấy đây là một chi chứa rất nhiều styryl lactone có hoạt tính chống ung thư lý thú [2, 3, 4], cũng từ các kết quả nghiên cứu đó, đã có rất nhiều hợp chất styryl-lactone có hoạt tính chống ung thư đã được tổng hợp dựa theo các styryl lactone phân lập từ các loài *Goniothalamus* L. [5, 6]. Trước đây chúng tôi đã công bố về quy trình tổng hợp hợp chất howiinol A và một số dẫn xuất của nó [7, 8]. Trong bài báo này, chúng tôi thông báo một số kết quả nghiên cứu tổng hợp và thử hoạt tính độc tế bào của một số analogue styryl lactone.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Thiết bị, hoá chất

Phổ NMR được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz với TMS làm chất chuẩn nội. Phổ khối lượng được đo trên máy MS 5989B Engine (Hewlett Packard) và máy sắc kí lỏng ghép khối phổ với đầu đo MSD (LC/MSD Agilent series 1100), sử dụng mode ESI và đầu dò DAD. Tủ ám CO₂ INNOVA CO-170, tủ cấy sinh học an toàn cấp II, máy li tâm Universal 320R, kính hiển vi ngược Zeiss, tủ lạnh sâu -25 °C, -80 °C, buồng đếm tế bào của Fisher, máy quang phổ Genios Tecan được sử dụng để thử hoạt tính gây độc tế bào.

Hoá chất dùng cho tổng hợp hữu cơ được mua của hãng Merck và Aldrich. Bốn dòng tế bào ung thư ở người được cung cấp bởi ATTC gồm: KB - ung thư biểu mô (CCL – 17TM); Hep G2 - ung thư gan (HB – 8065TM); MCF-7 - ung thư vú (HTB – 22TM) và LU-1 HTB-57TM - ung thư phổi.

2.2. Tổng hợp

Hợp chất **2** được tổng hợp từ D-glycero-D-glucoheptono- γ -lactone (**1**) qua 9 bước đã được chúng tôi trình bày trong công trình công bố trước đây [8].

Tổng hợp (E) - (2,2 - dimethyl - 6 - oxo - 4, 4a, 6, 8a - tetrahydropyrano [3, 2-d] [1,3] dioxin -4 - yl) (phenyl) methyl 4,4,4-trifluorobut-2-enoate (3)

Cho 49 mg 4,4,4-trifluoro crotonic acid (0,35 mmol, 2 eq) vào trong bình cầu chứa hỗn hợp gồm 50 mg chất **2** (0,17 mmol), 100 mg EDC (0,35 mmol), 83 mg DMAP (0,68 mmol) và 10 ml CH₂Cl₂ khan. Sau khi khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng trong 3 giờ, dừng phản ứng rồi thêm 10 ml nước và chiết với CH₂Cl₂ (4 \times 30 ml). Phần dung dịch hữu cơ được làm khan bằng Na₂SO₄ rồi quay cạn dung môi dưới áp suất giảm thu được 170 mg cặn thô. Cặn thô được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH gradient, cho 74 mg chất **3** dưới dạng chất rắn màu trắng. Hiệu suất của phản ứng đạt 94 %.

Đ.n.c. 187 - 190°; $[\alpha]_D^{28} = + 60,1$ (0,24, CH₂Cl₂); Phổ IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3010, 1725, 1637, 1385, 1311, 1260, 1137, 989, 706; Phổ ESI-MS: positive m/z 435: [M+Na]⁺; Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), δ (ppm): 1,32 (3H, s, CH₃); 1,36 (3H, s, CH₃); 4,31 (1H, t, $J = 1,5$ Hz, H-5); 4,35 (1H, dd, $J = 1,5$; 9,0 Hz, H-6); 4,38 (1H, dd, $J = 1,5$; 6,0 Hz, H-4); 6,14 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-7); 6,25 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-2); 6,49 (1H, dq, $^3J_{H-H} = 15,5$ Hz, $^4J_{F-H} = 2,0$ Hz, H-2'); 6,79 (1H, dq, $^3J_{H-H} = 15,5$ Hz, $^3J_{F-H} = 6,5$ Hz, H-3'); 6,88 (1H, dd, $J = 9,5$; 6,0 Hz, H-3); 7,30 - 7,41 (5H, m, -C₆H₅); Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz), δ (ppm): 18,5 (CH₃); 29,0 (CH₃); 60,2 (C-4); 69,0 (C-6); 71,5 (C-7); 73,8 (C-5); 99,8 (-C(CH₃)₂); 121,9 (q, $^1J_{C-F} = 270,5$ Hz, C-F₃); 125,6 (C-2); 127,5 (C-9+C-13); 128,3 (q, $^3J_{C-F} = 6,2$ Hz, C-2'); 128,4 (C-10 + C-12); 128,7 (C-11); 132,2 (q, $^2J_{C-F} = 35,6$ Hz, C-3'); 136,7 (C-8); 140,3 (C-3); 161,8 (C-1'); 162,3 (C-1); Phổ ¹⁹F-NMR (CDCl₃, 188 MHz): -66,0 (3F, dd, $^3J_{H-F} = 6,4$ Hz; $^4J_{F-H} = 1,9$ Hz).

Tổng hợp (E)-2-hydroxy-2-(3-hydroxy-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-1-phenyl ethyl 4,4,4-trifluorobut-2-enoate (4)

Cho 5 ml dung dịch axit axetic 80 % vào bình cầu chứa 50 mg este **3** (0,12 mmol). Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 4 giờ ở 80 - 90 °C rồi sau đó quay khô dung môi dưới áp suất giảm và tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH gradient thu được 25 mg chất **4** dưới dạng chất rắn màu trắng. Hiệu suất của phản ứng đạt 57 %.

Đ.n.c. 117 - 119°; $[\alpha]_D^{28} = + 45,8$ (0,34, CH₂Cl₂); Phổ IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3357 (OH), 1703, 1630, 1312, 1266, 1136; Phổ ESI-MS: negative m/z 743: [2M-H]⁻; Phổ ¹H-NMR (CDCl₃,

500 MHz), δ (ppm): 4,25 (1H, br d, $J = 3,5$ Hz, OH-C-6); 4,37 (3H, m, H-4 + H-5 + OH-C-4); 4,58 (1H, m, H-6); 6,07 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-7); 6,10 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-2); 6,52 (1H, dd, $^3J_{H-H} = 15,5$ Hz, $^4J_{F-H} = 2,0$ Hz, H-2'), 6,81 (1H, dq, $^3J_{H-H} = 15,5$ Hz, $^3J_{F-H} = 6,5$ Hz, H-3'); 6,99 (1H, br d, $J = 9,5$ Hz, H-3), 7,38 (3H, m, H-10 + H-12 + H-11); 7,52 (2H, br d, $J = 6,5$ Hz, H-9 + H-13); Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz), δ (ppm): 62,6 (C-4); 73,1 (C-6); 75,4 (C-7); 77,9 (C-5); 122,2 (q, $^1J_{C-F} = 271,0$ Hz, CF_3); 122,7 (C-2); 127,9 (C-9+C-13); 128,3 (q, $^3J_{C-F} = 6,5$ Hz, C-2'); 128,7 (C-10+C-12); 129,1 (C-11); 132,4 (q, $^2J_{C-F} = 35,1$ Hz, C-3'); 135,8 (C-8); 143,9 (C-3); 162,6 (C-1'); 163,7 (C-1); ^{19}F (CDCl_3 , 188 MHz): -66,0 (3F, d, $^3J_{F-H} = 5,0$ Hz).

Tổng hợp 2,2-dimethyl-4-(phenyl(2,2,2-trifluoroethoxy)methyl)-4,4a-dihydro pyrano [3,2-d][1,3]dioxin-6(8aH)-one (5) và 5-hydroxy-6-(1-hydroxy-2-phenyl-2-(2,2,2-trifluoroethoxy)ethyl)-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (6).

0,175 ml boron trifluoride diethyl etherate $\text{BF}_3 \cdot \text{OEt}_2$ (0,14 mmol, 0,2 eq) được nhỏ từng giọt vào hỗn hợp chứa 200 mg chất **2** (0,69 mmol) và 12 ml trifluoroethanol (0,16 mol) ở 0°C . Sau khi khuấy trong 3 giờ ở 0°C , thêm 12ml dung dịch bão hòa NaHCO_3 vào hỗn hợp phản ứng và chiết với Et_2O (3×40 ml). Pha hữu cơ được rửa lại bằng dung dịch nước muối và làm khan bằng MgSO_4 khan. Dịch lọc sau khi quay khô dưới áp suất thấp được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ gradient thu được 17 mg chất **5** (hiệu suất đạt 5,1 %) và 80 mg chất **6** (hiệu suất đạt 27,1 %).

Dữ kiện phổ của chất **5**: Đ.n.c. $97 - 99^\circ$; $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = + 53,6$ (c 1,20, CH_2Cl_2); Phổ IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 2988, 2917, 1732, 1632, 1255, 1166, 1129, 873; Phổ ESI-MS: negative m/z 743,1 [2M-H] $^-$; Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz), δ (ppm): 1,27 (6H, s, 2 x CH_3), 3,75 (2H, m, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$); 4,07 (1H, dd, $J = 2,0; 9,0$ Hz, H-6); 4,35 (1H, dd, $J = 6,0; 2,0$ Hz, H-4), 4,50 (1H, t, $J = 2,0$ Hz, H-5); 4,78 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-7); 6,27 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-2); 6,89 (1H, dd, $J = 9,0; 6,0$ Hz, H-3), 7,35 (5H, m, $-\text{C}_6\text{H}_5$); Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz), δ (ppm): 18,5 (CH_3); 29,0 (CH_3); 60,4 (C-4); 66,3 (q, $^2J_{C-F} = 34,3$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CF}_3$); 69,3 (C-5); 72,6 (C-6); 79,3 (C-7); 99,5 (C (CH_3) $_2$); 123,6 (q, $^1J_{C-F} = 276,4$ Hz, CF_3); 125,5 (C-2), 127,7 (C-9 + C-13); 128,4 (C-10 + C-12); 128,6 (C-11); 137,1 (C-8); 140,6 (C-3); 162,9 (C-1); Phổ $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3 , 188 MHz): -75,0 (t, $^3J_{H-F} = 8,6$ Hz, 3F, CF_3).

Dữ kiện phổ của chất **6**: Đ.n.c. $113-115^\circ$; $[\alpha]_{\text{D}}^{28} = + 103,6$ (c 0,58, CH_2Cl_2); Phổ IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}): 3356, 2926, 1713, 1629, 1277, 1158, 838; Phổ ESI-MS: negative m/z 663,2 [2M-H] $^-$; Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz), δ (ppm): 3,64 (2H, q, $^3J_{F-H} = 8,5$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CF}_3$); 4,13 (1H, OH-C-6); 4,25 (1H, m, H-6), 4,36 (1H, m, H-4); 4,58 (2H, br d, $J = 8,5$ Hz, H-7+OH); 4,66 (1H, t, $J = 2,5$ Hz, H-5); 6,09 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-2); 6,95 (1H, dd, $J = 6,0; 9,5$ Hz, H-3), 7,35 (5H, m, $-\text{C}_6\text{H}_5$); Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 125 MHz), δ (ppm): 63,3 (C-4); 65,7 (q, $^2J_{C-F} = 34,7$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CF}_3$); 74,4 (C-6); 77,5 (C-5); 81,0 (C-7); 122,7 (C-2), 123,8 (q, $^1J_{C-F} = 276,8$ Hz, CF_3); 128,1 (C-9+C-13); 128,7 (C-10+C-12); 128,9 (C-11); 136,6 (C-8); 144,0 (C-3); 164,2 (C-1); Phổ $^{19}\text{F-NMR}$ (CDCl_3 , 188 MHz): -76,0 (t, $^3J_{H-F} = 8,6$ Hz, 3F, CF_3).

Tổng hợp 4-(fluoro(phenyl)methyl)-2,2-dimethyl-4,4a-dihydropyrano [3,2-d][1,3] dioxin-6(8aH)-one (7)

Cách 1

Nhỏ từng giọt Deoxo-fluor (91,6 mg, 0,41 mmol) vào trong bình cầu chứa 50 mg chất **2** (0,17 mmol) và 5 ml CH_2Cl_2 ở 0°C . Đưa hỗn hợp phản ứng về nhiệt độ phòng rồi khuấy tiếp trong 2 giờ, sau đó dừng phản ứng, quay cạn dung môi dưới áp suất giảm thu được cặn chất.

Tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/ MeOH gradient thu được 25 mg chất **7** dưới dạng chất rắn màu trắng. Hiệu suất của phản ứng đạt 50 %.

Cách 2

Nhỏ từng giọt (diethylamino)sulfur trifluoride (32,8 mg, 0,20 mmol) vào trong bình cầu chứa 50 mg chất **2** (0,17 mmol) và 5 ml CH₂Cl₂ ở 0 °C. Hỗn hợp phản ứng được khuấy trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Cô cạn dung môi dưới áp suất giảm rồi tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi CH₂Cl₂/MeOH gradient thu được 40 mg chất **7**. Hiệu suất của phản ứng là 79,5 %.

Đ.n.c. 190 - 191°; $[\alpha]_D^{28} = + 287,6$ (c 0,88, CH₂Cl₂); Phổ IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 2993, 1732, 1633, 1255, 1126, 1052, 866; Phổ ESI-MS: positive m/z 293: [M+H]⁺; Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), δ (ppm): 1,36 (3H, s, CH₃); 1,38 (3H, s, CH₃); 4,24 (1H, ddd, $J = 1,5; 3,5; 9,0$ Hz, H-6); 4,42 (1H, dd, $J = 6,0; 2,0$ Hz, H-4); 4,49 (1H, ddd, $J = 2,0; 2,0; 1,5$ Hz, H-5); 5,79 (1H, dd, $^2J_{F-H} = 45,0$ Hz, $^3J_{H-H} = 9,0$ Hz, H-7); 6,31 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-2); 6,93 (1H, dd, $J = 6,0; 9,5$ Hz, H-3); 7,41 (5H, m, -C₆H₅); Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 125 MHz), δ (ppm): 18,6 (CH₃); 29,0 (CH₃); 60,2 (C-4); 69,1 (d, $^3J_{C-F} = 1,5$ Hz, C-5); 71,5 (d, $^2J_{C-F} = 34,8$ Hz, C-6); 89,2 (d, $^1J_{C-F} = 168,8$ Hz, C-7); 99,6 (C-1'); 125,6 (C-3); 126,8 (C-9+C-13); 128,3 (C-10+C-12); 128,9 (C-11); 136,7 (d, $^2J_{C-F} = 19,6$ Hz, C-8); 143,7 (C-3); 164,2 (C-1); Phổ ¹⁹F-NMR (CDCl₃, 188 MHz): -188,3 (1F, dd, $^2J_{F-H} = 45,1$ Hz; $^3J_{F-H} = 1,9$ Hz).

Tổng hợp 6-(2-fluoro-1-hydroxy-2-phenylethyl)-5-hydroxy-5,6-dihydro-2H-pyran-2-one (8)

40 mg chất **7** được hòa tan trong 5 ml dung dịch axit axetic 50 % rồi khuấy ở 80 – 90 °C trong 4 giờ. Hỗn hợp sau đó được quay khô và được tinh chế trên cột silica gel với hệ dung môi cyclohexan/AcOEt gradient thu được 20 mg chất **8** dưới dạng chất rắn màu trắng. Hiệu suất của phản ứng đạt 46,4 %.

Đ.n.c. 138 - 140°; $[\alpha]_D^{28} = + 154,7$ (c 0,84, CH₂Cl₂); Phổ IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹): 3385, 1720, 1630, 1379, 1255, 1052, 702; Phổ ESI-MS : positive m/z 527,6: [2M+Na]⁺; Phổ ESI-MS : negative m/z 503,5 [2M-H]⁻; Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz), δ (ppm): 3,89 (1H, d, $J = 4,5$ Hz, OH-C-6); 4,18 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, OH-C-4); 4,41 (2H, m, H-4 + H-6); 4,65 (1H, m, H-5); 5,53 (1H, dd, $^2J_{F-H} = 45,9$; $^3J_{H-H} = 8,5$ Hz, H-7); 6,15 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-2); 7,01 (1H, dd, $J = 5,5; 9,5$ Hz, H-3); 7,40 (5H, m, -C₆H₅); Phổ ¹³C-NMR (CDCl₃, 75 MHz), δ (ppm): 63,3 (C-4); 73,6 (d, $^2J_{C-F} = 38,9$ Hz, C-6); 77,3 (C-5); 90,6 (d, $^1J_{C-F} = 173,5$ Hz, C-7); 122,9 (C-2); 127,0 (C-9); 127,1 (C-13); 128,6 (C-10+C-12); 129,3 (C-11); 136,2 (d, $^2J_{CF} = 18,1$ Hz, C-8); 143,8 (C-3); 164,0 (C-1); Phổ ¹⁹F-NMR (CDCl₃, 188 MHz): -181,3 (1F, dd, $^2J_{F-H} = 45,1$ Hz; $^3J_{F-H} = 5,6$ Hz).

2.3. Phương pháp thử hoạt tính độc tế bào

Độ độc tế bào *in vitro* được thực hiện theo phương pháp của Monks (1991), được Viện Ung thư Quốc gia Hoa kỳ (NCI) xác nhận là phép thử độc tế bào chuẩn nhằm sàng lọc, phát hiện các chất có khả năng kìm hãm sự phát triển hoặc diệt tế bào ung thư ở điều kiện *in vitro* [9].

Phương pháp nuôi cấy

Các dòng tế bào ung thư nghiên cứu được nuôi cấy trong các môi trường nuôi cấy RPMI 1640 và DMEM có bổ xung thêm 10% huyết thanh phôi bò (FBS) và các thành phần kèm theo gồm 2 mM L-Glutamine, 1mM sodium pyruvate, hỗn hợp kháng sinh 100 đơn vị Penicillin và 100 µg Streptomycin, điều kiện nuôi là 5 % CO₂; 37 °C; độ ẩm 98 %; vô trùng tuyệt đối. Thời gian cấy chuyển khác nhau tùy thuộc vào đặc tính của từng dòng tế bào. Tế bào phát triển ở pha log sẽ được sử dụng để thử độc tính.

Phép thử sinh học xác định độ độc tế bào

200 μ l dung dịch tế bào sau khi thu hoạch ở pha log với nồng độ 3×10^4 tế bào/ml được cho vào phiên vi lượng 96 giếng trong môi trường RPMI 1640 cho các dòng tế bào HepG₂, MCF₇, KB và môi trường DMEM cho dòng tế bào LU-1. Mẫu chất thử pha ở các nồng độ 64 μ g/ml; 16 μ g/ml; 4 μ g/ml; 1 μ g/ml và 0,25 μ g/ml được cho thêm vào phiên vi lượng 96 giếng ở trên. Giếng điều khiển (chuẩn) gồm 200 μ l dung dịch tế bào 3×10^4 tế bào/ml cũng được ủ ở 37 °C, 5 % CO₂ trong 3 ngày. Sau 3 ngày, thêm 50 μ l MTT (1mg/ml pha trong môi trường nuôi cấy không huyết thanh) vào phiên vi lượng 96 giếng và giếng điều khiển rồi ủ tiếp ở 37 °C trong 4 giờ, sau đó loại bỏ môi trường, thêm 100 μ l DMSO lắc đều, đọc kết quả ở bước sóng 540 nm trên máy spectrophotometer Genios TECAN. Giá trị IC₅₀ được tính dựa trên kết quả số liệu phần trăm kìm hãm sự phát triển của tế bào bằng phần mềm Tablecurve. Ellipticine được sử dụng làm đối chứng dương.

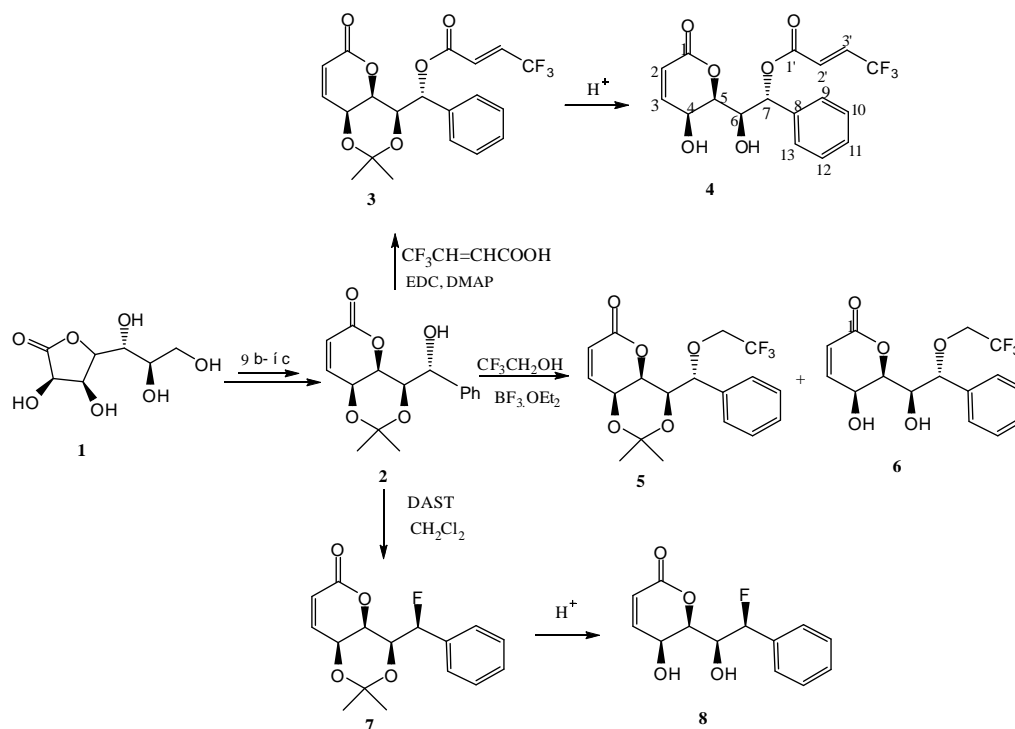
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Hợp chất **2** được tổng hợp từ D-glycero-D-glucoheptono- γ -lactone (**1**) qua 9 bước đã được chúng tôi trình bày trong công trình công bố trước [8]. Sáu dẫn xuất styryl-lactone được tổng hợp từ hợp chất trung gian **2** theo sơ đồ 1.

Cho hợp chất **2** tác dụng với 1,5 eq axit trifluoro crotonic với sự có mặt của EDC và 4-DMAP trong CH₂Cl₂ thu được este **3** với hiệu suất của phản ứng là 94 %. Loại bỏ nhóm acetonide của hợp chất **3** bằng dung dịch axit axetic 80 % ở 80 – 90 °C thu được hợp **4** với hiệu suất là 57 %. Phổ khối ion hóa bụi điện tử (ESI-MS) của **3** cho pic ion giả phân tử ở m/z 435[M+Na]⁺. Phổ ¹³C-NMR của **3** cho tín hiệu của 20 nguyên tử cacbon tương ứng với 12 cacbon lai hóa sp² và 8 cacbon lai hóa sp³ trong đó có 2 nhóm carbonyl, 13 nhóm CH, 1 nhóm CF₃, 2 nhóm CH₃ và 2 cacbon bậc 4. Sự có mặt của nhóm trifluoro crotonate được xác định trên phổ ¹³C-NMR ở δ_C 121,9 (q, ¹J_{C-F}= 270,5 Hz, C-F₃); 128,3 (q, ³J_{C-F}= 6,2 Hz, C-2'), 132,2 (q, ²J_{C-F}= 35,6 Hz, C-3') và 161,8 (C-1'). Phổ ¹H-NMR cũng cho thấy sự có mặt của 2 proton thuộc nhóm trifluoro crotonate ở δ_H 6,49 (1H, dq, ³J_{H-H}= 15,5 Hz, ⁴J_{F-H}= 2,0 Hz, H-2') và δ_H 6,79 (1H, dq, ³J_{H-H}= 15,5 Hz, ³J_{F-H}=6,5 Hz, H-3'), hằng số tương tác spin-spin của H-2' và H-3' rất lớn (J = 15,5 Hz) chứng tỏ 2 proton ở dạng đồng phân hình học *trans*. Trên phổ ¹⁹F của **3** cho thấy có tín hiệu của nhóm CF₃ dưới dạng doublet ở δ_F -66,0 (3F, ³J_{F-H}= 6,4 Hz; ⁴J_{F-H}= 1,9 Hz). Cấu hình của cacbon bất đối được xác định dựa vào việc so sánh độ chuyển dịch hóa học và hằng số tương tác với các dẫn xuất đã được tổng hợp. Phổ ¹H và ¹³C-NMR của **4** có dữ liệu phổ rất giống với chất **3**, chỉ vắng mặt tín hiệu của 2 nhóm methyl và 1 cacbon bậc bốn. Phổ ¹⁹F của chất howi F2 có tín hiệu của một doublet của nhóm CF₃ ở δ_F -182 (3F, ³J_{F-H}= 5,0 Hz). Phổ khối ion hóa bụi điện tử negative (ESI-MS) của **4** cho pic ion giả phân tử ở m/z 743 [2M-H]⁻. Kết hợp các dữ liệu phổ COSY, HSQC, HMBC, NOESY, MS cho phép ta xác định chất **3** và **4** là chất dự định tổng hợp.

Cho **2** tác dụng với trifluoroethanol với sự có mặt của boron trifluoride diethyl etherate (BF₃.Oet₂) thu được hợp chất **5** và **6**. Phổ khối ion hóa bụi điện tử negative (ESI-MS) của **5** cho pic ion giả phân tử ở m/z 743 [2M-H]⁻. Phổ ¹³C-NMR và DEPT của **5** cho tín hiệu của 18 nguyên tử cacbon tương ứng với 9 cacbon lai hóa sp² và 9 cacbon lai hóa sp³ trong đó có 1 nhóm CH₂, 11 nhóm CH, 2 nhóm CH₃, 1 nhóm C=O, 1 nhóm CF₃ và 2 cacbon bậc bốn. Nhóm CH₂ và nhóm CF₃ đều xuất hiện dưới dạng quartet ở δ_C 66,3 (q, ²J_{C-F}=34,3 Hz, C-CH₂-CF₃) và δ_C 123,6 (d, ¹J_{C-F}= 276,4 Hz, CF₃). Trên phổ ¹H-NMR cũng cho thấy sự có mặt của 2 proton thuộc nhóm CH₂ gần với nhóm CF₃ ở δ 3,71 – 3,82 (2H, m, -CH₂CF₃). Trên phổ HMBC của **5** có tương tác xa của H-

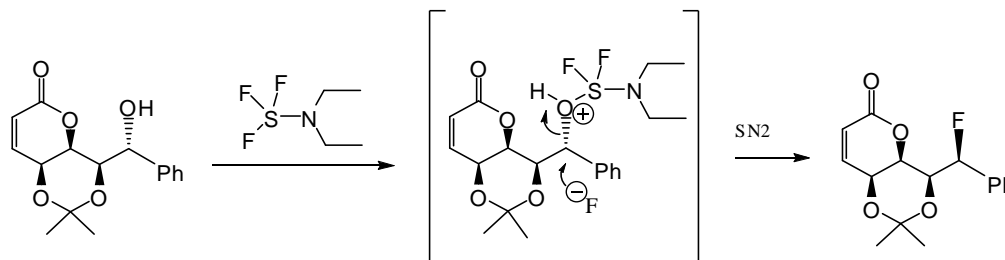
7 với CH₂, C-5, C-6, C-8; đồng thời proton của nhóm CH₂ tương tác với CF₃ và C-7, chứng tỏ nhóm OH ở vị trí C-7 đã bị thế bởi nhóm OCH₂CF₃. Trên phổ ¹⁹F của **5** cho thấy có tín hiệu của nhóm CF₃ dưới dạng triplet ở δ_F -75,0 (t, ³J_{H-F} = 8,6 Hz, 3F, CF₃). Hợp chất **6** có dữ liệu phổ NMR rất giống với chất **5**, trên phổ ¹H-NMR thấy vắng mặt tín hiệu của 2 nhóm methyl. Đồng thời trên phổ ¹³C-NMR của **6** chỉ có 15 nguyên tử cacbon, vắng mặt tín hiệu của 2 nhóm methyl và cacbon bậc 4. Phổ ¹⁹F-NMR của **6** cũng có 1 một triplet ở δ_F -76,0 (3F, ³J_{H-F} = 8,6 Hz, CF₃). Phổ khối ion hóa bụi điện tử negative (ESI-MS) của **6** cho pic ion ở m/z 663 [2M-H]⁻. Kết hợp các dữ liệu phổ COSY, HSQC, HMBC, NOESY, MS, ¹⁹F NMR cho phép xác định chất **5** và **6** chính là chất dự định tổng hợp.



Sơ đồ 1. Quy trình tổng hợp một số dẫn xuất styryl-lactone.

Để tổng hợp chất **7**, ban đầu chúng tôi sử dụng tác nhân phản ứng là Deoxo-fluor cho tác dụng với chất **2** ở 0 °C trong CH₂Cl₂. Hiệu suất của phản ứng với tác nhân này là 50 %. Để tăng hiệu suất phản ứng, chúng tôi thay đổi tác nhân phản ứng, sử dụng (dimethylamino)sulfur trifluoride (DAST). Kết quả cho thấy hiệu suất phản ứng cao hơn, đạt 79,5 %. Loại bỏ nhóm bảo vệ acetal của **7** trong dung dịch axit axetic thu được hợp chất **8** với hiệu suất là 60 %. Cơ chế của phản ứng giữa ancol với tác nhân DAST đã được nghiên cứu rất nhiều, trong phản ứng này có sự đảo cấu hình được giải thích theo sơ đồ 2. Phổ khối ion hóa bụi điện tử (ESI-MS) của **7** cho pic ion phân tử proton hóa ở m/z 293 [M+H]⁺. Phổ ¹³C-NMR của **7** cho tín hiệu của 16 nguyên tử cacbon, tương ứng với 9 cacbon lai hóa sp² và 7 cacbon lai hóa sp³ trong đó có 2 nhóm CH₃, 1 nhóm carbonyl, 11 nhóm CH và 2 cacbon bậc 4. Tín hiệu của C-6, C-7 và C-8 trên phổ ¹³C-NMR đều xuất hiện dưới dạng doublet ở δ_C 89,2 (¹J_{C-F} = 168,8 Hz, C-7); 71,5 (²J_{C-F} = 34,8 Hz, C-6) và δ_C 136,7 (d, J = 18,1 Hz, C-8), dựa vào hằng số tương tác giữa cacbon và flo cho phép xác định sơ bộ sự có mặt của nguyên tử F gắn với C-7. Phổ ¹H-NMR cho tín hiệu của proton H-7 ở δ_H 5,74 - 5,85 dưới dạng double doublet với hằng số tương tác ²J_{H-F} = 45,0 Hz và ³J_{H-H} = 9,0 Hz,

tín hiệu đặc trưng của 2 proton olefinic thuộc vòng unsaturated-lactone ở δ_H 6,31 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-2), 6,93 (1H, dd, $J = 9,5; 6,0$ Hz, H-3). Trên phổ ^{19}F -NMR của **7** có một tín hiệu double doublet ở δ_F -186,4 (1F, dd, $^2J_{\text{F-H}} = 47,0$ Hz; $^3J_{\text{F-H}} = 1,9$ Hz).



Sơ đồ 2. Cơ chế phản ứng tạo chất **7**.

Hợp chất **8** có dữ liệu phổ NMR gần giống với chất **7**, trên phổ 1D-NMR của **8** thấy vắng mặt tín hiệu của 2 nhóm methyl và 1 cacbon bậc 4. Phổ ^{19}F NMR của **8** cũng có 1 tín hiệu double doublet ở δ_F 181,3 (1F, dd, $^2J_{\text{F-H}} = 45,1$ Hz; $^3J_{\text{F-H}} = 5,6$ Hz). Kết hợp các dữ liệu phổ COSY, HSQC, HMBC, NOESY, MS, ^{19}F NMR cho phép xác định chất **7** và **8** chính là chất dự định tổng hợp.

Các dẫn xuất **3-8** được thử hoạt tính độc tế bào đối với 4 dòng tế bào ung thư LU-1, HepG₂, KB và MCF₇. Kết quả thử hoạt tính được trình bày trong bảng 1, hợp chất **3** có hoạt tính cao nhất đặc biệt là đối với dòng tế bào ung thư biểu mô KB với giá trị $\text{IC}_{50} = 0,88 \mu\text{g/ml}$.

Bảng 1. Kết quả thử hoạt tính độc tế bào của các chất.

| TT | Tên mẫu | Tên dòng tế bào ($\text{IC}_{50} \mu\text{g/ml}$) | | | |
|----|--------------------|---|-------------------|-----------|------------------|
| | | LU-1 HTB | HepG ₂ | KB | MCF ₇ |
| 1 | 3 | 1,61 | 2,07 | 0,88 | 1,23 |
| 2 | 4 | 7,5 | 2,78 | 2,78 | 2,67 |
| 3 | 5 | 2,35 | 2,5 | 2,05 | 2,03 |
| 4 | 6 | 7,97 | 8,77 | 7,04 | 6,05 |
| 5 | 7 | 1,91 | 2,50 | 2,16 | 1,88 |
| 6 | 8 | 5,09 | 8,81 | 7,21 | 6,5 |
| 7 | Ellipticine | 0,31-0,62 | 0,31-0,62 | 0,31-0,62 | 0,31-0,62 |

Lời cảm ơn. Công trình này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí của quỹ Nafosted, Bộ Khoa học và Công nghệ, mã số đề tài 104.01.76.09.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Võ Văn Chi - Từ điển thực vật thông dụng, Tập 2, Nhà xuất bản KH&KT, 2003, tr. 1302-1304.

2. Ze Tian, Chen S., Zhang Y., Huang M., Shi L., Huang F., Fong C., Yang M., Xiao P. - The cytotoxicity of naturally occurring styryl lactone, *Phytomedicine* **13** (2006) 181.
3. Christophe W. - *Goniothalamus* species: A source of drugs for the treatment of cancers and bacterial infection, *Evid Based Complement Alternat. Med.* **4** (3) (2007) 299.
4. Amparo Blazquez M., Bermejo A., Carmen Zafra-Polo M. and Cortes D. - Styryl-lactones from *Goniothalamus* species – A Review, *Phytochemical Analysis* **10** (1999) 161.
5. Masayoshi T., Kazuo K., Hiromasa N., and Toshio H. - Stereocontrolled Syntheses of Novel Styryl Lactones, (+)-Goniodiol, (+)-Goniotriol, (+)-8-Acetylgoniotriol, (+)-Goniofufurone, (+)-9-Deoxygonioppyrone, (+)-Gonipopyrone, and (+)-Altholactone from Common Intermediates and Cytotoxicity of Their congeners, *Tetrahedron* **55** (1999) 2493.
6. Tonny K. M. S. and Vicint W. F. T. - Facile and Enantiospecific Syntheses of Goniotriol Analogues, *J. Org. Chem* **64** (1999) 2140.
7. Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Đoàn Thị Mai Hương, Phạm Văn Cường, Nguyễn Văn Hùng - Nghiên cứu quy trình tổng hợp howiinol A, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ* **46** (6) (2008) 83.
8. Nguyễn Thị Hồng Hạnh, Đoàn Thị Mai Hương, Phạm Văn Cường, Nguyễn Văn Hùng, Bá Thị Châm - Nghiên cứu tổng hợp và hoạt tính độc tế bào của Goniotriol, dimer-goniotriol, howiinol A và một số tiền chất của chúng, *Tạp chí Khoa học và công nghệ* **48** (3) (2010) 43.
9. Scudiero D. A., Shoemaker R. H., Kenneth D. P., Monks A., Tierney S., Nofziger T. H., Currens M. J., Seniff D., Boyd M. R. – Evaluation of a Soluble Tetrazolium/Formazan Assay for Cell Growth and Drug Sensitivity in Culture Using Human and Other Tumor Cell Lines, *Cancer Research* **48** (17) (1988) 4827.

ABSTRACT

STUDY ON SYNTHESIS AND CYTOTOXIC ACTIVITY OF ANALOGUE STYRYL-LACTONE

Doan Thi Mai Huong^{1,*}, Pham Van Cuong¹, Nguyen Van Hung¹, Trieu Quy Hung¹,
Daniele Bonnet-Delpon², Chau Van Minh¹

¹*Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology*

²*University Paris XI – France*

*Email: doanhuong7@yahoo.com

The styryl-lactones belong to a group of secondary metabolites commonly isolated from the family Annonaceae. Among them, howiinol A, goniotriol, goniodiol and goniothalamine were demonstrated to have significant antitumour activity against several human tumor cell lines. Recently, we have announced the synthesis and cytotoxic evaluation of howiinol A and some derivatives. In this paper, we report about our continuing attempts to synthesize 6 analogue styryl-lactone. One of them, specially, compound **3** has high activity against KB cancer cell lines with $IC_{50} = 0.88 \mu\text{g/ml}$. The structure of all compounds were confirmed by spectral methods, including COSY, HSQC, HMBC, NOESY, MS, ¹⁹F NMR.

Keywords: styryl-lactone, *Goniothalamus*, howiinol A.