

TỔNG HỢP MỘT SỐ DẪN XUẤT CỦA LUPEOL VÀ NGHIÊN CỨU HOẠT TÍNH KHÁNG VI SINH VẬT KIỂM ĐỊNH

Đến Tòa soạn 27-4-2006

NGUYỄN VĂN TUYẾN, NGUYỄN VĂN HÙNG, NGUYỄN QUYẾT CHIẾN
VÀ NGUYỄN ĐỨC VINH

Viện Hóa học, Viện Khoa học và Công Nghệ Việt Nam

SUMMARY

The lupane triterpenoid lupeol is found in a variety of plants. Its biological activities have attracted a great deal of interests. A number of studies on the antiinflammatory, antimycobacterial, antimalarial and anticancer activities of this compound and its derivatives have been reported. Based on our knowledge, there have not been any reports on the antimicrobial activity of lupeol and its derivatives. In order to investigate the relationship between the chemical structure and antimicrobial activities, several derivatives of lupeol, such as lupeol acetate, lupeol isobutyrate, lupeol benzoate and lupeol cinnamate were synthesized, and the antibacterial and antifungal effects of these derivatives were examined. It was found that these derivatives possessed only weak antimicrobial activities, and that the above acylation of the OH group at C-3 did not lead to an improvement of the antibacterial and anti-fungal activities.

I - MỞ ĐẦU

Hợp chất lupan triterpenoit lupeol là hợp chất tự nhiên có hoạt tính sinh học lý thú và được tìm thấy trong rất nhiều loài thực vật khác nhau. Hoạt tính chống viêm của lớp chất này đã được phát hiện và đã thông báo trong một số công trình [1 - 3]. Gần đây, lupeol được phát hiện có các hoạt tính hạn chế tác động gây ung thư của virút Epstein-Barr [4] và ngăn ngừa tiến trình phát triển ung thư nhờ các khả năng chống oxyhoá, chống phân bào, chống sinh mạch và xúc tiến quá trình apoptosis của tế bào [5]. Lupeol còn được phát hiện có hoạt tính gây độc trên một số dòng tế bào ung thư như Hep-G2, A-431 [6], B-16 [7] và hoạt tính chống kí sinh trùng sốt rét *Plasmodium falciparum* [8]. Tuy nhiên, hoạt tính sinh học của lupeol và các dẫn chất của nó phụ thuộc rất nhiều vào bản chất của các nhóm thế ở cacbon C-3. Takahashi và cộng sự khi nghiên cứu hoạt tính gây độc tế bào

của lupeol, lupeol axetat và lupeon trên dòng tế bào melanin của chuột B-16 (mouse melanoma cell) [7] đã phát hiện các nhóm thế ở vị trí C-3 của lupeol có vai trò rất quan trọng. Hoạt tính gây độc tế bào tăng lên rất nhiều khi nhóm hydroxy ở C-3 được chuyển hóa thành nhóm keton. Lupeol và lupeol axetat được phát hiện có hoạt tính chống lao gây ra bởi chủng *Mycobacterium tuberculosis* [9] và hoạt tính cũng phụ thuộc nhiều vào bản chất của nhóm thế ở C-3 của lupeol. Các hợp chất lupeon và lupeol axetat có hoạt tính kháng lao cao hơn nhiều so với lupeol. Tuy nhiên, Mitaine-Offer lại phát hiện lupeol có hoạt tính ức chế human leucocyte elastase cao gấp 6 lần so với lupeol axetat [2]. Ngoài ra, hoạt tính chống viêm của các dẫn chất lupeol, lupeol linoleat và lupeol palmiat thể hiện qua khả năng ức chế eucaryote protein kinases cũng rất khác nhau [1].

Về hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của lupeol và các dẫn chất của nó chưa thấy đề

cập trong tài liệu. Nhằm tìm kiếm các chất có hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định và nghiên cứu mối tương quan giữa hoạt tính và cấu trúc của các dẫn xuất này, chúng tôi đã tổng hợp một số dẫn xuất của lupeol (**2a-2d**) và thử hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của các chất này.

II - THỰC NGHIỆM

1. Thiết bị và nguyên liệu

Phổ cộng hưởng từ proton (500 MHz) và cacbon-13 (125 MHz) được đo trên máy cộng hưởng từ hạt nhân phân giải cao 500 MHz (Bruker, CHLB Đức). Phổ khối lượng được đo trên máy phổ khối MS 5989B (Hewlett Packard, Mỹ). Phổ IR được đo trên máy quang phổ hồng ngoại FTIR IMPACT 410 (CHLB Đức).

2. Thử hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm

Các phép thử hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm được tiến hành theo phương pháp của Vanden Berghe and Vlietinck [10]. Các chủng vi sinh vật kiểm định được sử dụng gồm:

Vi khuẩn gram (-): *Escherichia coli* (*Ec*), *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*).

Vi khuẩn gram (+): *Staphylococcus aureus* (*Sa*), *Bacillus subtilis* (*Bs*).

Nấm mốc: *Aspergillus niger* (*An*), *Fusarium oxysporum* (*Fo*).

Nấm men: *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*), *Candida albicans* (*Ca*).

Nấm và vi khuẩn được duy trì trong môi trường dinh dưỡng SDB (Sabouraud Dextrose Broth) và TSB (Trypcase Soy Broth). Các chủng kiểm định được hoạt hóa trước khi tiến hành thí nghiệm trong môi trường dinh dưỡng dịch thể 24 giờ đối với vi khuẩn và 48 giờ đối với vi nấm.

3. Tổng hợp chất 2a-2d

Lupeol (**1**) được chiết tách từ cây *Xerospermum laevigatum* Radlk. (Sapindaceae) của Việt Nam [11], là tinh thể màu trắng, đnc 188 - 189°C. IR (KBr) ν_{\max} : 3335 (OH); 1642 (C=C). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 4,86 (1H, s, H-29a); 4,56 (1H, s, H-29b); 3,18 (1H, dd, $J = 11,3$ Hz; 4,9 Hz, H-3); 2,37 (1H, sextet,

H-19); 1,68 (3H, s, H-30); 1,03 (3H, s, H-26); 0,96 (3H, s, H-23); 0,94 (3H, s, H-27); 0,83 (3H, s, H-25); 0,79 (3H, s, H-28); 0,76 (3H, s, H-24). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 150,89 (C-20); 109,33 (C-29); 78,96 (C-3); 55,3 (C-5); 50,43 (C-9); 48,3 (C-18); 47,96 (C-19); 42,98 (C-17); 42,82 (C-14); 40,82 (C-8); 39,99 (C-22); 38,84 (C-4); 38,71 (C-1); 38,05 (C-13); 37,16 (C-10); 35,58 (C-16); 34,29 (C-7); 29,84 (C-21); 27,99 (C-23); 27,44 (C-2); 27,4 (C-15); 25,14 (C-12); 20,93 (C-11); 19,31 (C-30); 18,31 (C-6); 17,99 (C-28); 16,11 (C-25); 15,97 (C-26); 15,37 (C-24); 14,54 (C-27). MS, m/z (%): 426 (M^+ , 10).

Lupeol axetat (**2a**): Hỗn hợp phản ứng gồm lupeol (**1**) (55 mg, 0,13 mmol), anhidrit axetic (15 mg, 0,14 mmol), pyridin (16 mg, 0,2 mmol) và vài tinh thể của xúc tác dimetyl aminopyridin trong 10 ml của diclorometan. Hỗn hợp này được khuấy và duy trì ở 50°C trong khoảng 24 h. Sau khi kết thúc, hỗn hợp phản ứng được xử lý với nước, chiết bằng CH_2Cl_2 . Dịch chiết của sản phẩm phản ứng được rửa bằng H_2O , làm khan bằng Na_2SO_4 , sau đó cất loại dung môi, cho sản phẩm thô. Sản phẩm thô được làm sạch trên cột silica gel với hệ dung môi là hexan/axeton (85/15) nhận được 15,6 mg chất rắn màu trắng (chất **2a**), đnc 210°C, hiệu suất 92%.

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ 4,68 (1H, s, H-29a); 4,57 (1H, s, H-29b); 4,46 (1H, dd, $J = 11,3$ Hz; 4,9 Hz, H-3); 2,38 (1H, sextet, H-19); 2,03 (3H, s, CH_3); 1,68 (3H, s, H-30); 1,03 (3H, s, H-26); 0,93 (3H, s, H-23); 0,87 (3H, s, H-27); 0,86 (3H, s, H-25); 0,84 (3H, s, H-28); 0,79 (3H, s, H-24). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3): δ 171,02 (C=O); 150,98 (C-20); 109,35 (C-29); 81,00 (C-3); 55,4 (C-5); 50,37 (C-9); 48,32 (C-18); 48,02 (C-19); 43,01 (C-17); 42,82 (C-14); 40,88 (C-8); 40,01 (C-22); 38,41 (C-4); 38,07 (C-1); 37,82 (C-13); 37,11 (C-10); 35,59 (C-16); 34,24 (C-7); 29,86 (C-21); 27,96 (C-23); 27,45 (C-2); 25,13 (C-15); 23,73 (C-2'); 21,32 (C-12); 20,96 (C-11); 19,30 (C-30); 18,22 (C-6); 18,01 (C-28); 16,05 (C-25); 16,19 (C-26); 15,99 (C-24); 14,52 (C-27).

Lupeol isobutyrat (**2b**): Chất **2b** được tổng hợp theo quy trình tổng hợp chất **2a** và dùng anhidrit isobutyric, nhận được chất rắn

màu trắng (chất **2b**), đnc 223 - 224°C, hiệu suất 95%. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4,68 (1H, s, H-29a); 4,56 (1H, s, H-29b); 4,46 (1H, dd, *J* = 11,3 Hz; 4,9 Hz, H-3); 2,53 (1H, dt, *J* = 6,5 Hz; 13,5Hz, H-2'); 2,37 (1H, sextet, H-19); 1,68 (3H, s, H-30); 1,16 (6H, t, *J* = 7 Hz, H_{3'}, 4'); 1,03 (3H, s, H-26); 0,96 (3H, s, H-23); 0,94 (3H, s, H-27); 0,83 (3H, s, H-25); 0,79 (3H, s, H-28); 0,76 (3H, s, H-24). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 176,85 (C=O); 150,98 (C-20); 109,36 (C-29); 80,41 (C-3); 55,3 (C-5); 50,37 (C-9); 48,32 (C-18); 48,03 (C-19); 43,01 (C-17); 42,86 (C-14); 40,88 (C-8); 40,02 (C-22); 38,37 (C-4); 38,08 (C-1); 37,97 (C-13); 37,13 (C-10); 35,6 (C-16); 34,48(C-2'); 34,24(C-7); 29,86 (C-21); 27,95 (C-23); 27,46 (C-15); 25,14 (C-12); 23,68 (C-2); 20,97 (C-11); 19,31 (C-30); 19,21 (C-3'); 18,95 (C-4'); 18,21 (C-6); 18,02 (C-28); 16,57 (C-25); 16,17 (C-26); 16,0 (C-24); 14,55 (C-27).

Lupeol benzoat (2c): Chất **2c** được tổng hợp theo quy trình tổng hợp chất **2a** và dùng anhidrit benzoic, nhận được chất rắn màu trắng (chất **2c**), đnc 260°C, hiệu suất 93%. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 8,03 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, H-3', H-7'); 7,54 (1H, t, *J* = 7,5 Hz, H-5'); 7,43 (2H, t, *J* = 7,5 Hz, H-6', H-4'); 4,72 (1H, dd, *J* = 11,3 Hz; 4,9 Hz, H-3); 4,69 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H-30a); 4,56 (1H, d, *J* = 2,2 Hz, H-30b); 2,39 (1H, sextet, H-19); 1,69 (3H, s, H-29); 1,05 (3H, s, H-26); 0,99 (3H, s, H-24); 0,95 (3H, s, H-27); 0,93 (3H, s, H-25); 0,91 (3H, s, H-28); 0,8 (3H, s, H-23). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 166,3 (C=O); 150,9 (C-20); 132,6 (=CH); 131,04 (CH); 129,5 (2x =CH); 128,3 (2x =CH); 109,33 (C-29); 81,6 (C-3); 55,4 (C-5); 50,3 (C-9); 48,3 (C-18); 48 (C-19); 43,01 (C-17); 42,87 (C-14); 40,9 (C-8); 40,01 (C-22); 38,42 (C-4); 38,22 (C-1); 38,08 (C-13); 37,16 (C-10); 35,59 (C-16); 34,24 (C-7); 29,86 (C-21); 28,13 (C-23); 27,47 (C-2); 25,13 (C-15); 23,78 (C-12); 20,99 (C-11); 19,31 (C-30); 18,25 (C-6); 18,02 (C-28); 16,8 (C-25); 16,2 (C-26); 16,01 (C-24); 14,56 (C-27).

Lupeol xinamat (2d): Hỗn hợp phản ứng gồm lupeol (**1**) (55 mg, 0,13 mmol), xinamoyl clorua (28 mg, 0,14 mmol), pyridin (16 mg, 0,2 mmol) và vài tinh thể của xúc tác dimethyl aminopyridin trong 10 ml diclorometan. Hỗn

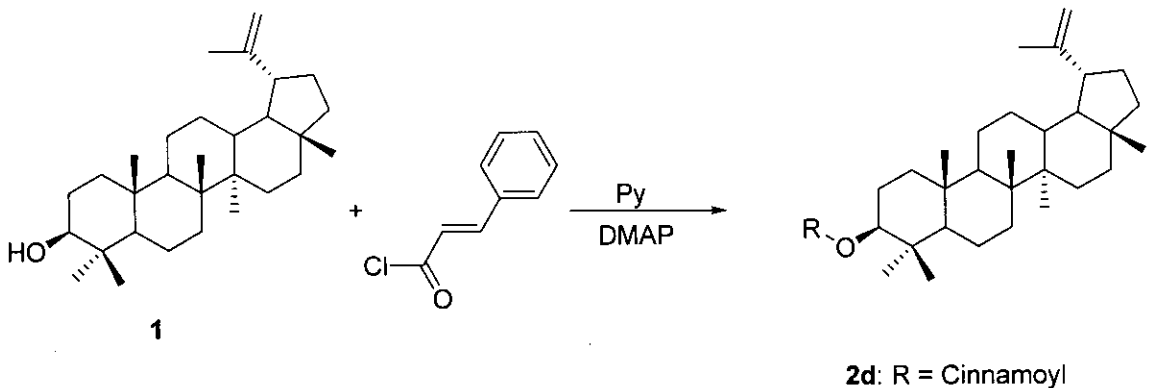
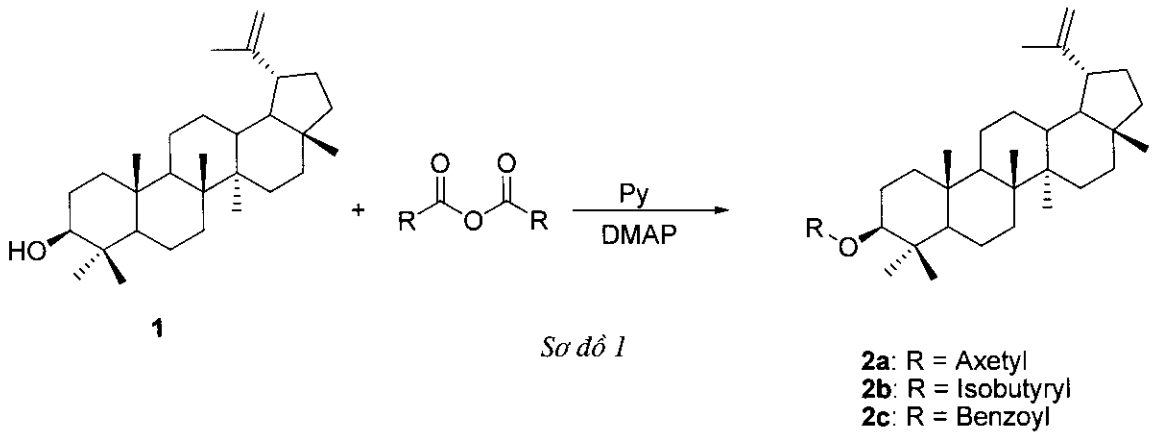
này được khuấy và duy trì ở 50°C trong khoảng 24 h. Sau khi kết thúc, hỗn hợp phản ứng được xử lý với nước và chiết bằng CH₂Cl₂. Dịch chiết của sản phẩm được rửa bằng H₂O, làm khan bằng Na₂SO₄, sau đó cất loại dung môi, cho sản phẩm thô. Sản phẩm thô được làm sạch trên cột silica gel với hệ dung môi là hexan/axeton (85/15) nhận được 12 mg chất màu trắng (chất **2d**), đnc 215°C, hiệu suất 91%. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 7,67 (1H, d, *J* = 16 Hz, H-4'); 7,52 (2H, m, H-6', 8'); 7,38 (3H, t, *J* = 8 Hz, H-5', 7', 9'); 6,45 (1H, d, *J* = 16 Hz, H_{3'}); 4,69 (1H, s, H-29a); 4,61 (1H, dd, *J* = 11,3 Hz; 4,9 Hz, H-3); 4,57 (1H, s, H-29b); 2,39 (1H, sextet, H-19); 1,69 (3H, s, H-30); 1,05 (3H, s, H-26); 0,99 (3H, s, H-23); 0,95 (3H, s, H-27); 0,93 (3H, s, H-25); 0,91 (3H, s, H-28); 0,8 (3H, s, H-24). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃): δ 166,8 (C=O); 150,9 (C-20); 144,24 (C-3'); 134,6 (=CH); 130,12 (=CH); 128,8 (2x =CH); 128,04 (2x =CH); 118,9 (C-2'); 109,36 (C-29); 81,0 (C-3); 55,45 (C-5); 50,39 (C-9); 48,32 (C-18); 48,03 (C-19); 43,02 (C-17); 42,87 (C-14); 40,9 (C-8); 40,02 (C-22); 38,45 (C-4); 38,08 (C-1); 37,14 (C-13); 35,06 (C-10); 34,26 (C-16); 29,87 (C-21); 28,03 (C-24); 27,47 (C-2); 25,14 (C-15); 23,84 (C-12); 20,99 (C-11); 19,31 (C-30); 18,25 (C-6); 18,02 (C-28); 16,68 (C-25); 16,2 (C-26); 16,01 (C-24); 14,56 (C-27).

III - KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chúng tôi đã tổng hợp các dẫn chất **2a-2d** của lupeol có cấu trúc phong phú hơn so với các công bố trước đây nhằm tìm hiểu vai trò của các nhóm thế đó đến hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm. Quá trình tổng hợp này được mô tả trong sơ đồ 1 và 2.

Từ sơ đồ 1 cho thấy, lupeol (**1**) tác dụng với anhidrit của các axit trong dung môi diclorometan, có mặt pyridin và 4-dimethyl aminopyridin, ở nhiệt độ khoảng 50°C trong khoảng 24 h, cho các chất **2a**, **2b** và **2c** với hiệu suất tương ứng là 92, 95 và 93%.

Chất **2d** được tổng hợp theo sơ đồ 2. Cho chất **1** phản ứng với xinamoyl clorua trong môi trường pyridin và xúc tác là dimethyl aminopyridin, ở nhiệt độ 50°C trong khoảng 24 h, nhận được chất **2d** với hiệu suất 91%.



Các chất **1** và **2a-2d** được thử hoạt tính kháng các chủng vi sinh vật kiểm định. Kết quả thử hoạt tính cho thấy tất cả các chất nói trên đều có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm yếu. Ở nồng độ chất nghiên cứu là 128 $\mu\text{g/ml}$ thì không thấy có khả năng kháng các chủng vi sinh vật nghiên cứu.

Tóm lại, chúng tôi đã tổng hợp được dẫn xuất **2a-2d** của lupeol (**1**) với hiệu suất cao. Các chất này đã được nghiên cứu khả năng kháng các vi sinh vật kiểm định. Kết quả cho thấy, tất cả các chất này đều có hoạt tính kháng một số chủng vi sinh vật nghiên cứu yếu.

Lời cảm ơn: Các tác giả chân thành cảm ơn sự tài trợ của IFS (the International Foundation for Sciences) Stockholm, Sweden, Grant F/2768-3, Tổ chức cấm phổ biến vũ khí OPCW (Organization for the Prohibition of Chemical Weapons), và đề tài nghiên cứu cơ bản.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. M. Hasmeda, G. K. Okai, T. Macrides, G. M. Polya. *Planta Medica*, 65, 14-18 (1999).
2. A. C. Mataine-Offer, W. Hornebeck, M. Sauvain, M. Ze'ches-Hanrot. *Planta Medica*, 68, P. 930 - 932 (2002).
3. T. Akihisa, K. Yasukawa, H. Oinuma, Y. Kasahara, S. Yamanouchi, M. Takido, K. Kumaki, T. Tamura. *Phytochemistry*, 43, P. 1255 - 1260 (1996).
4. M. Takasaki, T. Konoshima, H. Tokuda, K. Masuda, Y. Arai, K. Shiojima, H. Ageta. *Biol. Pharm. Bull.*, 57, 243 - 247 (1994).
5. M. A. Fernader, B. De las Heras, M. D. Garcia, M. T. Saenz, A. Villar. *J. Pharm. Pharmacol.*, 53, P. 1566 - 1539 (2001).
6. D. M. Moriarity, J. Huang, C. A. Yancey, P. Wang, W. N. Setzer, R. O. Lawton, R. B.

- Tates, S. Caldesa. *Planta Medica*, 64, P. 370 - 372 (1998).
7. K. Hata, K. Hori, S. Takahashi. *J. Nat. Prod.*, 65, P. 645 - 648 (2002).
 8. H. L. Ziegler, D. Staerk, J. Christensen, L. Hviid, H. Hagerstrand, J. W. Jaroszewski. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 1441 - 1446 (2002).
 9. C. L. Cantrell, S. G. Franzblau, N. H. Ficher. *Planta Medica*, 67, 685 - 694 (2001).
 10. D. A. Vanden Berghe, A. J. Vlietinck. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants, in: *Methods in plant biochemistry* by Hostettmann K. (edit.), London, Academic Press, Vol. 6, chapter 3, P. 47 - 69 (1991).
 11. Lê Anh Tuấn. Luận văn Thạc sĩ, Hà Nội (2004).