

Tổng hợp và thử hoạt tính kháng khuẩn của các dẫn chất 1,3-benzodioxole

Nguyễn Ngọc Phương Kiều, Vũ Thanh Thảo, Trần Ngọc Châu*

Khoa Dược, Đại học Y Dược TP Hồ Chí Minh

Ngày nhận bài 4/8/2022; ngày chuyển phản biện 8/8/2022; ngày nhận phản biện 26/8/2022; ngày chấp nhận đăng 31/8/2022

Tóm tắt:

Trước tình trạng đề kháng kháng sinh ngày càng gia tăng hiện nay, việc nghiên cứu các khung cấu trúc mới có tác dụng ức chế sự phát triển của vi khuẩn là rất cần thiết. Cấu trúc 1,3-benzodioxole với nhiều hoạt tính sinh học tiềm năng là đối tượng chính của nghiên cứu này. Từ nguyên liệu piperonal, 5 dẫn chất mang khung cấu trúc 1,3-benzodioxole được tổng hợp bằng các phản ứng hóa học đa dạng khác nhau. Cấu trúc của sản phẩm được xác định bằng các phương pháp quang phổ. Hoạt tính kháng khuẩn *in vitro* được khảo sát bằng phương pháp khuếch tán trong thạch trên 5 chủng vi khuẩn: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* nhạy cảm methicillin (MSSA) và tụ cầu vàng đề kháng methicillin (MRSA). Dẫn chất base Schiff (2) thể hiện khả năng ức chế 4/5 chủng vi khuẩn thử nghiệm, trong đó có MRSA. Nghiên cứu dự đoán đích tác động và mô phỏng gắn kết *in silico* gợi ý khả năng gắn kết của chất (2) trên enzyme FabH của vi khuẩn. Kết quả nghiên cứu gợi ý về sự phối hợp giữa nhóm base Schiff và khung 1,3-benzodioxole trong phát triển các chất kháng khuẩn mới.

Từ khóa: base Schiff, kháng khuẩn, 1,3-benzodioxole.

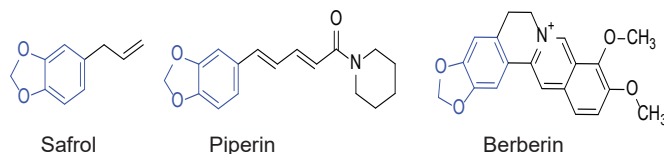
Chỉ số phân loại: 3.4

Đặt vấn đề

Thuốc kháng sinh giúp con người đẩy lùi các trường hợp nhiễm bệnh do vi khuẩn. Tuy nhiên, việc sử dụng kháng sinh không hợp lý lại gây ra nhiều cơ hội cho việc hình thành các chủng vi khuẩn đột biến, làm giảm hay mất hoàn toàn tác dụng của thuốc kháng sinh. Tình trạng đề kháng kháng sinh đang ngày càng gia tăng trên toàn thế giới, trong đó, Việt Nam được xem là một trong các quốc gia có tỷ lệ đề kháng kháng sinh cao. Theo báo cáo của Tổ chức Y tế Thế giới (WHO), danh sách các cấu trúc kháng khuẩn đang được thử nghiệm lâm sàng và tiền lâm sàng trên toàn thế giới còn khá khiêm tốn và chưa đáp ứng được nhu cầu [1]. Hơn nữa, hầu hết các chất trong danh sách đều thuộc các nhóm khung cấu trúc đã biết với một số cơ chế đề kháng thuốc đã được báo cáo. Chính vì vậy, việc nghiên cứu và tìm kiếm các hợp chất mới có tác dụng kháng khuẩn là rất cần thiết.

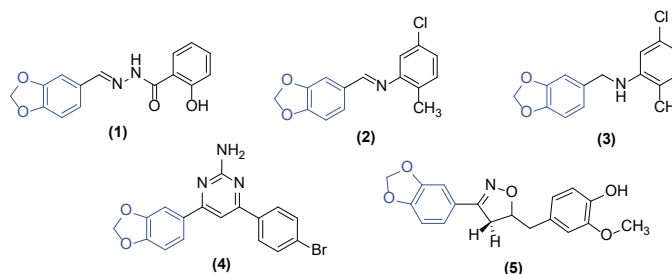
Khung 1,3-benzodioxole là một cấu trúc được tìm thấy rộng rãi trong các hợp chất tự nhiên với nhiều hoạt tính sinh học. Sự hiện diện của các chất này đóng vai trò quyết định tạo nên đặc điểm và công dụng của các loài thực vật. Ví dụ, hoạt chất piperin, thành phần tạo nên mùi vị của hạt tiêu (*Piper nigrum*), safrol có trong vỏ rễ cây xá xị (*Sassafras albidum*) và berberin trong cây vàng đắng (*Coscinium fenestratum* (Goetgh.) Colebr) chính là các hợp chất tự nhiên điển hình chứa khung cấu trúc này (hình 1). Đặc biệt, berberin được xem như một loại kháng sinh có nguồn gốc tự nhiên, hiện đang được dùng trong hơn 60 phối hợp thuốc lưu hành tại Việt Nam để điều trị các trường hợp nhiễm khuẩn đường ruột [2].

*Tác giả liên hệ: Email: tranchau@ump.edu.vn



Hình 1. Một số hợp chất tự nhiên mang khung cấu trúc 1,3-benzodioxole.

Dựa trên giả thuyết là khung cấu trúc 1,3-benzodioxole có thể kết hợp với các nhóm cấu trúc tiềm năng [3-6], các dẫn chất (1)-(5) được thiết kế với ý tưởng kết hợp khung cấu trúc 1,3-benzodioxole với các nhóm chức *N*-acyl hydrazone (chất 1), nhóm base Schiff (chất 2), kết hợp với dẫn chất amin (chất 3), lai hóa với cấu trúc dị vòng 2-amino pyrimidin (chất 4), hoặc lai hóa với khung 2-isoxazoline (chất 5). Mục tiêu của nghiên cứu này là tổng hợp các cấu trúc mang khung 1,3-benzodioxole như hình 2 và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của các dẫn chất này.



Hình 2. Cấu trúc các dẫn chất 1,3-benzodioxole được tổng hợp trong nghiên cứu.

Synthesise and test antibacterial activities of 1,3-benzodioxole derivatives

Ngoc Phuong Kieu Nguyen, Thanh Thao Vu,
Ngoc Chau Tran*

Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City

Received 4 August 2022; revised 26 August 2022; accepted 31 August 2022

Abstract:

Novel chemical entities are urgently needed to develop new antibacterial agents in order to tackle the increasing antibiotic resistance. This study focuses on the 1,3-benzodioxole scaffold with promising biological activities in the literature. Five 1,3-benzodioxole containing derivatives were synthesised from piperonal as starting material by various chemical reactions. Their structures were elucidated by standard spectroscopic methods. The *in vitro* antibacterial activities were studied by agar diffusion method against 5 pathogenic strains: *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus faecalis*, methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA), and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The Schiff base derivative (2) showed the ability to inhibit 4/5 tested strains, including MRSA. The target prediction study suggested the *in silico* binding ability of (2) on the bacterial FabH enzyme. These results demonstrated that novel 1,3-benzodioxole derivatives containing Schiff bases could be further studied as new antibacterial structures.

Keywords: antibacterial activity, Schiff base, 1,3-benzodioxole.

Classification number: 3.4

Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Nguyên, vật liệu

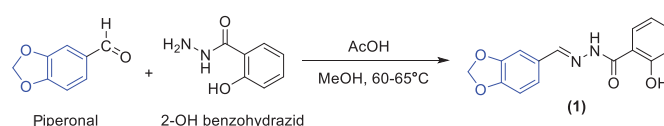
Tất cả nguyên liệu và dung môi dùng trong tổng hợp đạt mức độ tinh khiết dùng trong tổng hợp hóa học được mua từ các công ty: Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ), Merck (Đức), Acros Organics (Bi), ChemSol (Việt Nam), Guangdong Guanghua Sci-Tech Co Ltd. (Trung Quốc) và được sử dụng trực tiếp.

Nguyên, vật liệu dùng trong thử hoạt tính kháng khuẩn gồm: Tryptic soy agar (TSA), Mueller-Hinton agar (MHA) và Dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck, Đức). Đã kháng sinh amikacin chuẩn được mua từ Công ty Thermo Scientific™ (Hoa Kỳ). Các chủng vi khuẩn dùng trong thử nghiệm đều đạt theo tiêu chuẩn American Type Culture Collection (ATCC).

Phương pháp nghiên cứu

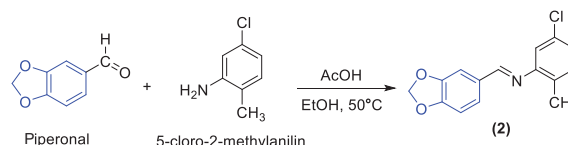
Phương pháp dự đoán *in silico* các thông số giống thuốc: Để đảm bảo các dẫn chất được thiết kế có thể tiếp tục phát triển thành phân tử thuốc mà không gặp trở ngại, một số thông số được, động học và tính chất giống thuốc được tính toán bằng máy chủ SwissADME [7].

Phương pháp tổng hợp các dẫn chất 1,3-benzodioxole các chất (1)-(5): Phương pháp tổng hợp dẫn chất *N*-acylhydrazone (chất 1) được thể hiện ở hình 3. 2-hydroxybenzohydrazide (0,36 g, 2,4 mmol) được hòa tan trong methanol (MeOH) (5 ml), sau đó thêm từ từ 5 ml dung dịch piperonal (0,3 g, 2 mmol) được pha trong MeOH. Phản ứng được xúc tác bằng acid acetic băng (AcOH) và khuấy, gia nhiệt ở 60-65°C đến khi hết nguyên liệu (theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng). Sản phẩm tạo thành ở dạng tủa trắng. Kết thúc phản ứng (sau khoảng 2 giờ), hỗn hợp được để nguội và làm lạnh để sản phẩm tủa hoàn toàn. Lọc và rửa tủa với MeOH. Sản phẩm thô được kết tinh lại trong ethanol (EtOH), thu được chất (1) với khối lượng 0,54 g (hiệu suất 95%).



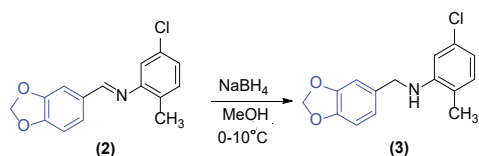
Hình 3. Phương pháp tổng hợp dẫn chất *N*-acylhydrazone (1).

Phản ứng ghép tổng hợp base Schiff (chất 2) được thể hiện ở hình 4. Hòa tan piperonal (1,5 g, 10 mmol) trong EtOH (10 ml). Sau đó thêm dẫn chất 5-cloro-2-methylanilin (1,7 g, 12 mmol) vào bình phản ứng. Thêm vào 3 giọt acid acetic băng và khuấy ở 50°C. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng đến khi không còn vết nguyên liệu. Phản ứng kết thúc sau 2 giờ và bình phản ứng được để nguội để sản phẩm kết tinh. Lọc và rửa tinh thể nhiều lần với EtOH. Sau đó kết tinh lại sản phẩm trong EtOH. Sấy khô thu được chất (2) với khối lượng 2,19 g (hiệu suất 80%).



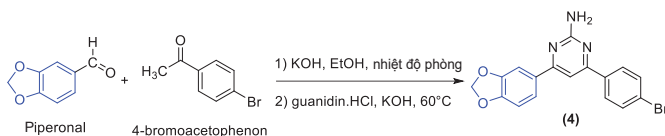
Hình 4. Phản ứng ghép tổng hợp dẫn chất base Schiff (2).

Phản ứng khử hóa base Schiff tạo amin (chất 3) được thể hiện ở hình 5. Hòa tan base Schiff (2) (0,27 g, 1 mmol) vào MeOH (10 ml). Làm lạnh bình cầu trong chậu đá và giữ lạnh (0°C) trong suốt quá trình phản ứng. Tiếp tục cho natri tetrahydroborat (NaBH_4) (0,38 g, 10 mmol). Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng đến khi không còn vết nguyên liệu. Phản ứng kết thúc sau 2 giờ. Cô quay dưới áp suất giảm để loại MeOH. Thêm nước vào bình phản ứng để hòa tan NaBH_4 dư. Lọc lấy phần tủa còn lại trong bình và rửa tủa nhiều lần với nước. Kết tinh lại sản phẩm trong EtOH, sấy khô thu được sản phẩm (3) với khối lượng 0,15 g (hiệu suất 55%).



Hình 5. Phản ứng khử hóa base Schiff tạo dẫn chất amin (3).

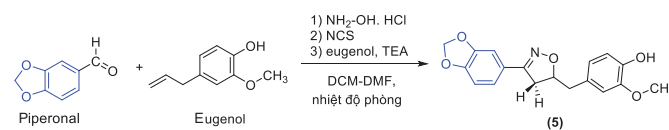
Phản ứng tổng hợp dẫn chất 2-amino pyrimidin (4) được thể hiện ở hình 6. Hòa tan piperonal (0,165 g, 1,1 mmol) trong 5 ml EtOH, tiếp tục thêm vào bình cầu 4-bromoacetophenon (0,2 g, 1,0 mmol) và 0,2 ml dung dịch KOH 50% trong EtOH. Hỗn hợp phản ứng được khuấy đều ở nhiệt độ phòng. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng đến khi hết nguyên liệu 4-bromoacetophenon (sau 2 giờ). Tiếp theo, cho dung dịch guanidin hydroclorid (0,11 g, 1,1 mmol) trong EtOH (5 ml) đã được điều chỉnh pH bằng KOH (0,11 g) đến pH 12 vào hỗn hợp phản ứng. Chalcon tan một phần trong hỗn hợp phản ứng tạo hỗn dịch màu vàng nhạt. Hỗn hợp phản ứng được khuấy đều và gia nhiệt ở 60°C. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng (vết sản phẩm vừa tắt quang ở UV 254 nm, vừa phát quang ở UV 365 nm). Phản ứng kết thúc sau 16 giờ. Bình phản ứng được làm nguội về nhiệt độ phòng và có tủa xuất hiện. Tủa được lọc và rửa với nước để hòa tan muối KCl. Sản phẩm được kết tinh lại trong EtOH thu được sản phẩm (4) với khối lượng 0,15 g (hiệu suất 41%).



Hình 6. Phản ứng tổng hợp dẫn chất 2-amino pyrimidin (4).

Phản ứng tổng hợp dẫn chất 2-isoxazoline (5) được thể hiện ở hình 7. Hòa tan piperonal (0,165 g, 1,1 mmol) trong hỗn hợp dung môi dicloromethan (DCM): *N,N*-dimethylformamid (DMF) (7,5:0,75 ml). Sau đó hydroxylamin hydroclorid (0,114 g, 1,65 mmol) được thêm vào hỗn hợp phản ứng và pH được điều chỉnh bằng KOH đến pH 12. Phản ứng được khuấy đều ở nhiệt độ phòng đến khi toàn bộ lượng piperonal được chuyển thành piperonaldoxim (theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng). Tiếp theo *N*-clorosuccinimid (NCS) (0,22 g, 1,65 mmol) được thêm từ từ vào hỗn hợp phản ứng. Sau 1 giờ khuấy đều ở nhiệt độ phòng thí nghiệm, toàn bộ lượng piperonaldoxim đã được chuyển thành dẫn chất hydroxymoyl clorid tương ứng. Tiếp theo, eugenol (0,16 g, 1 mmol) được thêm vào hỗn hợp phản ứng. Ngay sau đó, dung dịch 0,4 ml triethylamin (TEA) trong DCM (7,5 ml) được nhỏ từng giọt vào hỗn hợp phản ứng đang khuấy đều ở nhiệt độ phòng (tốc độ ~5 giọt/phút, tổng thời gian 60 phút). Hỗn hợp phản ứng được tiếp tục khuấy đều tại nhiệt độ phòng và theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng đến khi hết nguyên liệu và vết sản phẩm xuất hiện rõ. Hỗn hợp phản ứng được đổ vào bình lắng gan chứa 20 ml nước cất và chiết lấy lớp DCM. Lớp dung môi hữu cơ được rửa lần lượt với 10 ml HCl 10% (1 lần) và 10 ml nước cất đến pH 7 (3 lần) và 15 ml dung dịch NaCl bão hòa trước khi làm khan bằng Na_2SO_4 khan. Pha hữu cơ sau đó được loại bỏ dung môi DCM dưới áp suất giảm

để tạo thành sản phẩm thô dạng chất rắn trắng ngà. Kết tinh lại sản phẩm thô trong EtOH thu được chất (5) với khối lượng 0,0436 g (hiệu suất 13%).



Hình 7. Phản ứng tổng hợp dẫn chất 2-isoxazoline (5).

Phương pháp xác định cấu trúc và độ tinh khiết: Cấu trúc của các chất tổng hợp được xác định và biện giải bằng các phương pháp phổ. Phổ hồng ngoại (IR) được đo bằng phương pháp phản xạ toàn phần suy giảm (Attenuated total reflectance - ATR) trên máy IRAffinity-1S (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Nhật Bản). Phổ khối (MS) được đo trên máy MSQ Plus™ single quadrupole mass spectrometer (Thermo Scientific™, Waltham, MA, Hoa Kỳ) bằng phương pháp ion hóa đầu phun điện tử (Electrospray ionization - ESI). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton ($^1\text{H-NMR}$) được đo trên máy Bruker Avance với phổ tần số 400/500... (Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts, Hoa Kỳ). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân cacbon ($^{13}\text{C-NMR}$) được đo trên cùng máy ở tần số tương ứng 100/125/150 MHz. Các từ viết tắt được sử dụng trong biện giải phổ $^1\text{H-NMR}$: singlet (s), doublet (d), triplet (t), doublet of doublets (dd), doublet of triplet (dt), multiplet (m).

Các sản phẩm tổng hợp được kiểm tra độ tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng trên bản mỏng silica gel 60 GF254 (Merck 60F 254, Darmstadt, Đức) được quan sát dưới đèn UV nước sóng 254 nm kết hợp với biện giải kết quả phổ $^1\text{H-NMR}$. Nhiệt độ nóng chảy được xác định trên máy Stuart SMP10 (Cole Palmer, Anh) với nhiệt kế không hiệu chỉnh.

Phương pháp khảo sát hoạt tính kháng khuẩn: Hoạt tính kháng khuẩn được khảo sát trên 5 chủng vi khuẩn gây bệnh. Đại diện cho vi khuẩn gram âm là *E. coli* ATCC 25922 và *P. aeruginosa* ATCC 27853. Đại diện cho vi khuẩn gram dương gồm có *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) và *S. aureus* đề kháng methicilin ATCC 43300 (MRSA).

Các vi khuẩn được hoạt hóa trong môi trường thạch TSA, sau đó được nuôi cấy trên môi trường thạch Mueller-Hilton (MHA) khi tiến hành thử nghiệm. Môi trường MHA đã trải sẵn các chủng vi khuẩn được đục các lỗ tròn đường kính Ø7 mm bằng dụng cụ tiệt trùng. Chất thử được hòa tan trong DMSO để đạt nồng độ tương ứng là 5 và 2,5 mg/ml và cho vào mỗi lỗ một thể tích là 60 µl. Mỗi chất được thử tại 2 nồng độ tương đương với lượng chất thử trong mỗi lỗ lần lượt là 300 và 150 µg. Mẫu thử sau khi được cho vào các lỗ được để yên khoảng 15 phút cho các chất thử nghiệm khuếch tán vào lớp thạch. Sau đó, hộp thạch được ủ trong tủ ấm 37°C trong 24 giờ và đọc kết quả. Hoạt tính kháng khuẩn (nếu có) được thể hiện qua việc xuất hiện các vùng ức chế không có sự phát triển của vi khuẩn trên bề mặt đĩa thạch. Kết quả được xác định qua đường kính vùng ức chế được đo bằng thước đo đơn vị mm [8]. Trong các khảo sát này, DMSO (dung môi pha chất thử) được dùng như mẫu chứng âm và đĩa giấy kháng sinh amikacin 30 µg được dùng như mẫu chứng dương.

Chất thử có hoạt tính trong thử nghiệm sơ bộ được tiếp tục xác định nồng độ tối thiểu có khả năng ức chế sự mọc của vi khuẩn (Minimum inhibitory concentration - MIC). Chất thử được pha trực tiếp với môi trường thử nghiệm MHA tạo thành dải nồng độ như sau: 512, 256, 128, 64, 32, 16 và 8 µg/ml. Khi pha chất thử vào môi trường phải đảm bảo nồng độ DMSO nhỏ hơn 2,5%. Cho 2 µl huyền phù dịch vi khuẩn lên đĩa thạch đã được làm khô bề mặt với mật độ vi khuẩn trên thạch là 10⁴ CFU/ml. Bàn thạch được để yên khoảng 15 phút để vết chấm khô sau đó được ủ trong tủ ẩm 37°C trong 24 giờ và đọc kết quả. Kết quả chỉ có giá trị khi vi khuẩn trong đĩa chứng (DMSO 2,5%) mọc bình thường. Đặt đĩa thạch trên một bề mặt sẫm màu, không phản xạ ánh sáng, quan sát sự tạo thành khóm của vi khuẩn thử nghiệm. Tìm đĩa có nồng độ thấp nhất ức chế hoàn toàn sự tạo khóm, nồng độ của đĩa thạch này được xác định là MIC của chất thử đối với vi khuẩn thử nghiệm [9, 10].

Kết quả và bàn luận

Dự đoán in silico các thông số giống thuốc của các dẫn chất

Theo kết quả dự đoán từ SwissADME, các dẫn chất (1)-(5) đều thỏa mãn Luật 5 Lipinski về điều kiện được dùng làm thuốc đường uống. Kết quả chi tiết được trình bày ở bảng 1. Ngoài ra, cả 5 chất đều được phần mềm dự đoán có thể được hấp thu tốt qua đường tiêu hóa. Từ các kết quả dự đoán trên, chúng tôi tiến hành tổng hợp 5 dẫn chất mang khung cấu trúc 1,3-benzodioxole như đã thiết kế.

Bảng 1. Kết quả các thông số giống thuốc được dự đoán từ SwissADME.

Chất	MW	MLogP	nHBA	nHBD	nRB	TPSA (Å ²)	Ro5	GI absorption
<i>Yêu cầu</i>	<500	≤4,15	≤10	≤5	≤10	<160	Thỏa	Cao
(1)	284,27	1,44	5	2	4	80,15	Thỏa	Cao
(2)	273,71	3,04	3	0	2	30,82	Thỏa	Cao
(3)	275,73	3,12	2	1	3	30,49	Thỏa	Cao
(4)	370,20	2,62	4	1	2	70,26	Thỏa	Cao
(5)	327,33	1,84	6	1	4	69,51	Thỏa	Cao

MW: molecular weight (khối lượng phân tử); MLogP: calculated lipophilicity (hàng số cân bằng thân dầu - thân nước); nHBA: number of hydrogen bond acceptor (số nhóm nhận liên kết hydro); nHBD: number of hydrogen bond donor (số nhóm cho liên kết hydro); nRB: number of rotatable bond (số liên kết có thể quay); TPSA: topological polar surface area (diện tích bề mặt phân cực topo); Ro5: thỏa theo Luật 5 Lipinski; GI absorption: khả năng hấp thu qua đường tiêu hóa.

Kết quả tổng hợp các dẫn chất mang khung cấu trúc 1,3-benzodioxole

Dẫn chất mang nhóm N-acylhydrazone (1): Tên IUPAC: (E)-N'-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmetylen)-2-hydroxybenzohydrazid; tính chất cảm quan: chất rắn dạng bột mịn, màu trắng; nhiệt độ nóng chảy: 276-278°C; tính tan: tan trong MeOH và EtOH ở nhiệt độ cao, không tan trong MeOH, EtOH và nước ở nhiệt độ thường; sắc ký lớp mỏng: R_f=0,80 [chloroform - aceton (9:1)]; R_f=0,70 [DCM - MeOH (9,5:0,5)]; R_f=0,70 [toluen - aceton (8:2)]; phổ IR (ATR, ν cm⁻¹): 3250,05 (ν_{OH}); 2887,44 (ν_{N-CH}); 1624,06 (ν_{C=O}); 1564,27 (ν_{C=N}); 1446,61 (ν_{C-C-AP}); phổ ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 11,90 (s, 1H, O-H); 11,77 (s, 1H, CONH), 8,38 (s, 1H, N=C-H), 7,89 (dd, 1H, J=7,9 Hz, J=1,6 Hz,

Ar-H), 7,44 (dt, 1H, J=7,9 Hz, J=1,6 Hz, Ar-H), 7,31 (d, 1H, J=1,6 Hz, Ar-H), 7,20 (dd, 1H, J=8,0 Hz, J=1,6 Hz, Ar-H), 7,02-6,93 (m, 3H, Ar-H), 6,11 (s, 2H, CH₂-benzodioxole); phổ MS (ESI): [M-H]⁻ dự kiến: 283,07, tìm thấy: 283,18; [M+H]⁺ dự kiến: 285,09, tìm thấy: 285,22. Kết quả phân tích cấu trúc phù hợp với tài liệu đã công bố [11].

Dẫn chất mang nhóm base Schiff (2): Tên IUPAC: (E)-1-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-N-(5-cloro-2-methylphenyl) methanimin; tính chất cảm quan: tinh thể hình kim màu trắng ngà; nhiệt độ nóng chảy: 88-90°C; tính tan: tan nhiều trong DCM, chloroform, MeOH, EtOH, tan ít trong nước; sắc ký lớp mỏng: R_f=0,60 [n-hexan - aceton (15:2)]; R_f=0,75 [toluen - DCM (10:1)]; R_f=0,70 [n-hexan - ethyl acetat (10:1)]; phổ IR (ATR, ν cm⁻¹): 1622,13 (ν_{C=N}), 1446,61 (ν_{C=C}), phổ ¹H-NMR (600 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 8,20 (s, 1H, -CH=N-), 7,54 (d, J=1,75 Hz, 1H, Ar-H), 7,25 (dd, J=8,0 Hz, J=1,65 Hz, 1H, Ar-H), 7,12 (d, J=8,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,06 (dd, J=8,0 Hz, J=2,0 Hz, 1H, Ar-H), 6,90 (d, J=2,0 Hz, 1H, Ar-H), 6,88 (d, J=8,0 Hz, 1H, Ar-H), 6,04 (s, 2H, CH₂-benzodioxole), 2,29 (s, 3H, CH₃); phổ ¹³C-NMR (150 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 159,2, 151,9, 150,7, 148,5, 131,8, 131,2, 130,5, 128,6, 125,1, 117,8, 114,6, 108,2, 106,9, 101,7 (CH₂-benzodioxole); 17,3 (CH₃); phổ MS (ESI): [M(³⁵Cl) + H]⁺ dự kiến: 274,06, tìm thấy: 274,14; [M(³⁷Cl) + H]⁺ dự kiến: 276,06, tìm thấy: 276,30.

Dẫn chất mang nhóm amin (3): Tên IUPAC: N-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylmethyl)-5-cloro-2-methylanilin; tính chất cảm quan: tinh thể hình kim màu trắng; nhiệt độ nóng chảy: 90-95°C; tính tan: tan trong DCM, chloroform, MeOH, EtOH, không tan trong nước; sắc ký lớp mỏng: R_f=0,60 [n-hexan - ethyl acetat (10:1)]; R_f=0,80 [toluen - DCM (6:1)]; R_f=0,80 [cyclohexan - MeOH (50:1)]; phổ IR (ATR, ν cm⁻¹): 3452,58 (ν_{N-H}), 1238,30 (ν_{C-N}); phổ ¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 6,97 (d, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H), 6,85-6,78 (m, 3H, Ar-H), 6,64 (dd, 1H, J=8,0 Hz, J=2,0 Hz, Ar-H), 6,56 (d, 1H, J=2,0 Hz, Ar-H), 5,97 (s, 2H, CH₂-benzodioxole), 4,24 (d, 2H, J=5,3 Hz, NH-CH₂), 3,83 (t, J=5,3 Hz, 1H, NH), 2,10 (s, 3H, CH₃); phổ ¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 148,0, 147,0, 146,9, 132,7, 132,6, 130,8, 120,7, 120,2, 116,8, 109,9, 108,4, 108,0, 101,1 (CH₂-benzodioxole); 48,0 (-NH-CH₂-); 17,0 (CH₃); phổ MS (ESI): [M-H]⁺ dự kiến: 274,06, tìm thấy: 274,20.

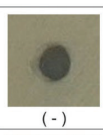
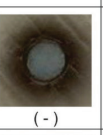
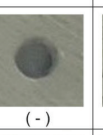
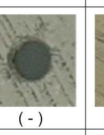

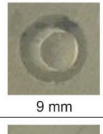
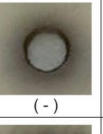
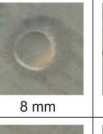
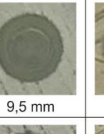
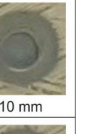
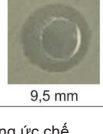
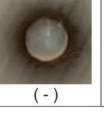
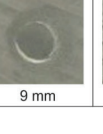
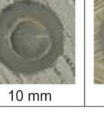
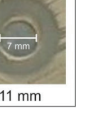
Dẫn chất chứa khung 2-amino pyrimidin (4): Tên IUPAC: 4-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-6-(4-bromophenyl)pyrimidin-2-amin; tính chất cảm quan: chất rắn dạng bột mịn, màu trắng ngà; nhiệt độ nóng chảy: 90-95°C; tính tan: tan trong MeOH, EtOH, DCM, không tan trong nước; sắc ký lớp mỏng: R_f=0,10 [toluen - DCM (1:2)]; R_f=0,70 [toluen - MeOH (15:1)]; R_f=0,80 [cyclohexan - MeOH (50:1)]; phổ IR (ATR, ν cm⁻¹): 3495,01 và 3305,99 (ν_{N-H}); 1633,71 (ν_{C=N}), 1249,87 (ν_{C-N}); phổ ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 8,18 (d, 2H, J=8,7 Hz, Ar-H), 7,86-7,81 (m, 2H, Ar-H), 7,72-7,70 (m, 2H, Ar-H), 7,68 (s, 1H, pyrimidin-H), 7,04 (d, 1H, J=8,2 Hz, Ar-H), 6,72 (s, 2H, NH₂), 6,11 (s, 2H, CH₂-benzodioxole); phổ ¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 164,8, 164,3, 163,9, 149,8, 148,3, 137,1, 132,0, 131,8, 129,5, 124,5, 122,2, 108,7, 107,4, 102,0, 101,6 (CH₂-benzodioxole); phổ MS (ESI): [M+H]⁺ dự kiến: 370,02, tìm thấy: 369,97.

Dẫn chất chứa khung 2-isoxazoline (5): Tên IUPAC: 4-((3-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-4,5-dihydroisoxazol-5-yl)methyl)-2-methoxy phenol; tính chất cảm quan: tinh thể hình kim màu trắng; nhiệt độ nóng chảy: 124-126°C; tính tan: tan trong DCM, ít tan trong EtOH, không tan trong nước; sắc ký lớp mỏng: $R_f=0,30$ [*n*-hexan - ethyl acetat (7:3)]; $R_f=0,45$ [toluen - ethyl acetat (9:1)]; $R_f=0,20$ [toluen - DCM (9:1)]; phổ IR (ATR, ν cm^{-1}): 3533,59 ($\nu_{\text{O-H}}$), 2912,51 ($\nu_{\text{C-H}}$), 1608,63, 1502,55, 1452,40, 1219,01, 1209,99, phổ $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 7,25 (d, $J=1,7$ Hz, 1H, Ar-H), 6,99 (dd, $J=8,0$ Hz, $J=1,7$ Hz, 1H, Ar-H), 6,85 (d, $J=8,0$ Hz, 1H, Ar-H), 6,79 (dd, $J=8,0$ Hz, $J=2,0$ Hz, 2H, Ar-H), 6,72 (dd, $J=8,0$ Hz, $J=2,0$ Hz, 1H, Ar-H), 5,99 (s, 2H, CH_2 -benzodioxole), 5,54 (brs, 1H, OH), 4,95-4,89 (m, 1H, CH_2 -isoxazoline), 3,89 (s, 3H, CH_3 -O-), 3,26 (dd, $J=16,5$ Hz, $J=10,2$ Hz, 1H, CH_2 -isoxazoline), 3,06 (dd, $J=14,0$ Hz, $J=6,5$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-$), 2,98 (dd, $J=16,5$ Hz, $J=8,0$ Hz, 1H, CH_2 -isoxazoline), 2,82 (dd, $J=14,0$ Hz, $J=6,5$ Hz, 1H, $-\text{CH}_2-$); phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, CDCl_3): δ (ppm) 156,1, 149,2, 148,1, 146,6, 144,5, 129,0, 124,0, 122,1, 121,4, 114,4, 112,0, 108,2, 106,4, 101,5 (CH_2 -benzodioxole), 82,0, 56,0, 40,7, 39,6; phổ MS (ESI): $[\text{M}+\text{H}]^+$ dự kiến: 328,12, tìm thấy: 328,21.

Dựa theo tra cứu trên SciFinder (2022) [12], ngoại trừ dẫn chất (1) có các kết quả phân tích phổ hoàn toàn phù hợp với tài liệu [11], các dẫn chất (2), (3), (4) và (5) đều là các dẫn chất mới hoàn toàn chưa được công bố. Kết quả phân tích cấu trúc phổ IR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và MS của các chất cho cấu trúc hoàn toàn phù hợp với dự kiến ban đầu. Điểm đặc biệt là khung cấu trúc 1,3-benzodioxole với nhóm CH_2 đặc trưng nằm giữa 2 nguyên tử oxy. Khi phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$, nhóm CH_2 này cho một đỉnh singlet 2H với độ dịch chuyển dao động trong khoảng từ 5,97 đến 6,11 ppm, tương ứng với một đỉnh nằm trong khoảng từ 101,1 đến 101,7 ppm khi phân tích phổ $^{13}\text{C-NMR}$. Độ tinh khiết của các chất tổng hợp được khảo sát sơ bộ bằng sắc ký lớp mỏng với 3 hệ dung môi khác nhau và không thấy vết lạ ngoài vết sản phẩm chính khi quan sát bản sắc ký lớp mỏng dưới đèn UV tại 2 bước sóng 254 và 365 nm. Ngoài ra, kết quả phân tích phổ $^1\text{H-NMR}$ của các chất đều không thấy các proton của tạp chất. Các kết quả phân tích trên sơ bộ cho thấy 5 dẫn chất tổng hợp phù hợp cho thử nghiệm sinh học.

Hoạt tính kháng khuẩn của các dẫn chất 1,3-benzodioxole

Các chất tổng hợp (1)-(5) và nguyên liệu piperonal được khảo sát hoạt tính kháng khuẩn bằng cách đo đường kính vùng ức chế dựa theo phương pháp khuếch tán trong thạch [9]. 5 chủng vi khuẩn gây bệnh được dùng trong thử nghiệm gồm: *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *S. aureus* ATCC 29213 (MSSA) và *S. aureus* đề kháng methicilin ATCC 43300 (MRSA). Thử nghiệm với chứng dương cho thấy, 5 chủng vi khuẩn đều còn nhạy với kháng sinh amikacin với đường kính vùng ức chế trên các vi khuẩn thử nghiệm lần lượt là: 22 mm (*E. coli*), 26 mm (*P. aeruginosa*), 9 mm (*E. faecalis*), 23 mm (MSSA) và 16 mm (MRSA). Kết quả trên nằm trong khoảng giới hạn kiểm soát chất lượng đối với phương pháp khuếch tán đĩa của các chủng vi sinh vật phát triển nhanh trên mẫu chứng dương amikacin [10]. Như vậy, các chủng vi sinh vật chuẩn sử dụng phù hợp cho thử nghiệm.

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. faecalis</i>	MSSA	MRSA
DMSO (chứng âm)	 (-)	 (-)	 (-)	 (-)	 (-)
Chất (2) (150 µg)	 9 mm	 (-)	 8 mm	 9,5 mm	 10 mm
Chất (2) (300 µg)	 9,5 mm	 (-)	 9 mm	 10 mm	 11 mm

(-): không có vòng ức chế.

Hình 8. Hoạt tính kháng khuẩn của dẫn chất (2) trên 5 chủng vi khuẩn thử nghiệm.

Trong kết quả thử nghiệm (hình 8), chứng âm (DMSO) không thể hiện đường kính vòng ức chế trên cả 5 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Điều này chứng tỏ kết quả thu được trong thử nghiệm là đáng tin cậy. Trong 5 chất được thử nghiệm, chỉ duy nhất dẫn chất base Schiff (2) thể hiện đường kính vòng ức chế trên 4 chủng vi khuẩn: *E. coli*, *E. faecalis*, MSSA và MRSA. Trong đó, đường kính vòng ức chế trên chủng *E. faecalis* là nhỏ nhất ở cả 2 nồng độ thử nghiệm (8-9 mm). Kết quả này tương tự với chứng dương amikacin.

Dẫn chất (2) ức chế sự phát triển trên cả chủng vi khuẩn gram âm (*E. coli*) và 3 chủng vi khuẩn gram dương (*E. faecalis*, MSSA và MRSA). Đặc biệt, trên chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh MRSA thì dẫn chất (2) không chỉ thể hiện được vòng ức chế mà đường kính của vòng này lớn nhất so với trên 3 chủng còn lại. Khi tăng lượng chất thử nghiệm (2) lên gấp đôi (từ 150 lên 300 µg) thì đường kính của vòng ức chế trên cả 4 chủng cũng tăng lên. Điều này có thể sơ bộ nhận định khả năng kháng khuẩn của dẫn chất (2) phụ thuộc vào nồng độ. Nồng độ ức chế tối thiểu của chất (2) được xác định và trình bày ở bảng 2. Kết quả được so sánh với mẫu chứng dương là kháng sinh amikacin.

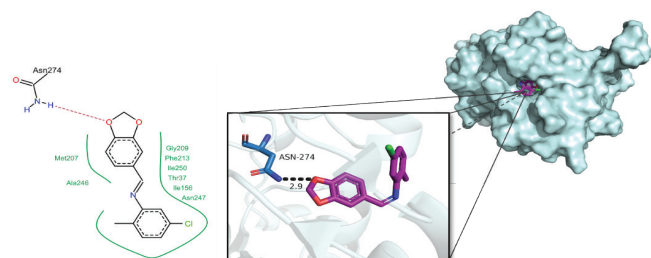
Bảng 2. Giá trị MIC của chất (2) trên các chủng vi khuẩn thử nghiệm.

Chất thử	Giá trị MIC (µg/ml)			
	<i>E. coli</i>	<i>E. faecalis</i>	MSSA	MRSA
Chất (2)	256	256	256	512
Amikacin	2	256	4	4

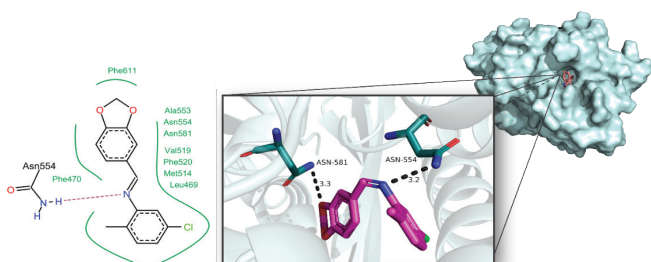
Dựa trên hoạt tính kháng khuẩn của dẫn chất (2), có thể khẳng định sự kết hợp giữa khung cấu trúc 1,3-benzodioxole và nhóm chức base Schiff góp phần vào khả năng ức chế sự phát triển của các chủng vi khuẩn thử nghiệm. Điều khá thú vị là hoạt tính kháng khuẩn của chất (2) trên 4/5 chủng vi khuẩn thử nghiệm bao gồm cả vi khuẩn gram âm và gram dương. Hơn nữa, với khả năng ức chế trên cả chủng MRSA, đích tác động dự kiến của chất (2) có thể không liên quan cơ chế tác động của các kháng sinh nhóm β -lactam.

Dự đoán đích tác động của chất (2) trên vi khuẩn

Nhằm dự đoán đích tác động của dẫn chất (2) trên vi khuẩn, chúng tôi đã dựa vào hệ thống máy chủ trực tuyến Similarity Ensemble Approach (<https://sea.bkslab.org/>) [13]. Kết quả phân tích gợi ý chất (2) có hoạt tính tốt đối với enzyme FabH của *E. coli*. Đây là một enzyme cần thiết để tổng hợp acid béo ở vi khuẩn. Thật vậy, một số nghiên cứu về các chất ức chế FabH được công bố [14, 15] cho thấy, các một số chất ức chế FabH có cấu trúc khá tương đồng với dẫn chất base Schiff (2) trong nghiên cứu này. Nghiên cứu được tiếp tục thực hiện bằng việc mô phỏng *in silico* khả năng gắn kết của chất (2) vào một số cấu trúc protein FabH của *E. coli* (PDB-ID: 6X7R) và của *S.aureus* (PDB-ID: 6KVS) [16] bằng phần mềm Autodock Vina 1.1.2. [17]. Kết quả cho thấy, chất (2) có khả năng gắn kết trên khoang xúc tác của enzyme FabH trên cả 2 chủng vi khuẩn. Kết quả phân tích các tương tác trong khoang gắn kết của chất số (2) và enzyme FabH được trình bày ở hình 9 (FabH của *E. coli*) và hình 10 (FabH của *S. aureus*).



Hình 9. Mô phỏng sự gắn kết của chất (2) vào enzyme FabH của *E. coli* (PDB-ID: 6X7R).



Hình 10. Mô phỏng sự gắn kết của chất (2) vào enzyme FabH của *S. aureus* (PDB-ID: 6KVS).

Kết luận

5 dẫn chất mang khung cấu trúc 1,3-benzodioxole kết hợp với các nhóm chức hóa học và khung cấu trúc đa dạng khác nhau đã được tổng hợp trong nghiên cứu này, 4 chất trong số đó có cấu trúc hoàn toàn mới theo tra cứu trên SciFinder. Kết quả khảo sát hoạt tính kháng khuẩn cho thấy, chất (2) với cấu trúc kết hợp giữa base Schiff và vòng 1,3-benzodioxole cho hoạt tính ở mức trung bình trên 4 chủng vi khuẩn bao gồm cả gram âm và gram dương, trong đó có chủng vi khuẩn đề kháng kháng sinh MRSA. Nghiên cứu dự đoán và mô phỏng tương tác *in silico* gợi ý về khả năng gắn kết của chất (2) đối với enzyme FabH của vi khuẩn. Các kết quả trên tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo về nhóm cấu trúc base Schiff và 1,3-benzodioxole nhằm phát triển thành thuốc kháng sinh tiềm năng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] World Health Organisation (2022), *2021 Antibacterial Agents in Clinical and Preclinical Development: An Overview and Analysis*, <https://www.who.int/publications/i/item/9789240047655>, accessed 27 July 2022.
- [2] Cục Quản lý Dược (2022), *Drug Bank*, <https://drugbank.vn>, truy cập ngày 27/07/2022.
- [3] Ł. Popiolek (2017), "Hydrazide-hydrazone as potential antimicrobial agents: Overview of the literature since 2010", *Med. Chem. Res.*, **26(2)**, pp.287-301, DOI: 10.1007/s00044-016-1756-y.
- [4] Huỳnh Thị Ngọc Phương, Trần Ngọc Châu, Lê Nguyễn Hồng Huyền, Nguyễn Thị Thu Thủy (2014), "Tổng hợp và khảo sát hoạt tính kháng khuẩn của một số base Schiff và dẫn chất amin tương ứng", *Tạp chí Y học TP Hồ Chí Minh*, **18(2)**, tr.347-352.
- [5] S. Prasad, V. Radhakrishna, T.K. Ravi (2019), "Synthesis, spectroscopic and antibacterial studies of some Schiff bases of 4-(4-bromophenyl)-6-(4-chlorophenyl)-2-aminopyrimidine", *Arab. J. Chem.*, **12(8)**, pp.3943-3947, DOI: 10.1016/j.arabj.2016.03.003.
- [6] N.B. Putarov, J.S. Cruz, E.M. Carvalho, et al. (2020), "Synthesis and bioactivity screening of dihydroisoxazoles derived from Eugenol", *Rev. Virtual Quim.*, **12(2)**, pp.345-355, DOI: 10.21577/1984-6835.20200027.
- [7] A. Daina, O. Michielin, V. Zoete (2017), "SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules", *Sci. Rep.*, **7(1)**, DOI: 10.1038/srep42717.
- [8] Clinical and Laboratory Standards Institute (2012), *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard*, 11th Ed. (M2-A11), **32(1)**, 76pp.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute (2018), *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11th Ed., 13pp.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute (2021), *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, M100-ed31, 31th Ed., 16pp.
- [11] T. Budiati, D.A. Stephanie, E.C. Widjajakusuma (2012), "Rapid solvent-free microwave assisted synthesis of some n'-benzylidene salicylic acid hydrazides", *Indo. J. Chem.*, **12(2)**, pp.163-166, DOI: 10.22146/ijc.21357.
- [12] SciFinder (2022), <https://scifinder.cas.org>, accessed 27 July 2022.
- [13] M.J. Keiser, B.L. Roth, B.N. Armbruster, et al. (2007), "Relating protein pharmacology by ligand chemistry", *Nat. Biotechnol.*, **25(2)**, pp.197-206, DOI: 10.1038/nbt1284.
- [14] Y. Zhou, Q.R. Du, J.Sun, et al. (2013), "Novel Schiff-base-derived FabH inhibitors with dioxygenated rings as antibiotic agents", *ChemMedChem*, **8(3)**, pp.433-441, DOI: 10.1002/cmdc.201200587.
- [15] X. Zhang, C.B. Sangani, L.X. Jia, et al. (2014), "Synthesis and antibacterial evaluation of novel Schiff's base derivatives of nitroimidazole nuclei as potent *E. coli* FabH inhibitors", *RSC Adv.*, **4(97)**, pp.54217-54225, DOI: 10.1039/C4RA08567A.
- [16] RCSB Protein Data Bank, <https://www.rcsb.org/>, accessed 3 March 2022.
- [17] O. Trott, A.J. Olson (2010), "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading", *J. Comput. Chem.*, **31(2)**, pp.455-461, DOI: 10.1002/jcc.21334.