



Original Article

A New Approach to the Synthesis of Vicinal Diol Derivatives from Eugenol and Evaluation of Biological Activities of Synthetics

Phan Thi Thanh Thuy¹, Le Kim Minh¹,
Nguyen Thanh To Nhi¹, Phan Minh Hoang^{2,*}

¹Nguyen Tat Thanh University, 300A Nguyen Tat Thanh, Ward 13, District 4, Ho Chi Minh City, Vietnam

²Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy at Ho Chi Minh City,
41 Dinh Tien Hoang, Ben Nghe, District 1, Ho Chi Minh City, Vietnam

Received 10 March 2024

Revised 02 May 2024; Accepted 10 June 2024

Abstract: The vicinal diol derivatives of eugenol were synthesized using the following steps: esterification with acid anhydrides/pyridine, followed by oxidation with KMnO_4 in a cold, dilute acetone/NaOH medium. The intermediate 4-allyl-2-methoxyphenyl acetate (EA) and the vicinal diol derivative 4-(2,3-dihydroxypropyl)-2-methoxyphenyl acetate (DIO) were synthesized with 97% and 43% yields, respectively. The byproduct of the EA oxidation reaction was identified as 4-acetoxy-3-methoxybenzaldehyde (ALD). Synthetic substances were investigated for biological activities, including antioxidant, antibacterial, and α -glucosidase inhibition. The antioxidant activity of EA, ALD, and DIO was modest, with %RSA₅₀ values exceeding 6666.67 $\mu\text{g/ml}$, 1174.53 $\mu\text{g/ml}$, and 59.47 $\mu\text{g/ml}$, respectively. Regarding antibacterial activity, EA exhibited antibacterial activity against MSSA (MIC = 256 $\mu\text{g/ml}$), and DIO could be active against *Streptococcus pyogenes* (MIC = 1024 $\mu\text{g/ml}$). While EA and DIO inhibited α -glucosidase with limited activity (at a screening concentration of 0.5 mg/ml, inhibition levels were $12.19 \pm 6.83\%$ and $43.98 \pm 2.34\%$, respectively), ALD showed potential (with an IC₅₀ of 0.27 mg/ml). Research indicates that eugenol derivatives have potential as antibacterials and α -glucosidase inhibitors.

Keywords: Eugenol, vicinal diol compound, antimicrobial, antioxidant, α -glucosidase.

* Corresponding author.

E-mail address: pmhoang@ump.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4586>

Hương tiếp cận mới trong tổng hợp dẫn xuất diol từ eugenol và đánh giá một số hoạt tính sinh học của các chất tổng hợp

Phan Thị Thanh Thủy¹, Lê Kim Minh¹,
Nguyễn Thanh Tố Nhi¹, Phan Minh Hoàng^{2,*}

¹Trường Đại học Nguyễn Tất Thành,

300A Nguyễn Tất Thành, Phường 13, Quận 4, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

²Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh,

41 Đinh Tiên Hoàng, Bến Nghé, Quận 1, Thành phố Hồ Chí Minh, Việt Nam

Nhận ngày 10 tháng 3 năm 2024

Chỉnh sửa ngày 02 tháng 5 năm 2024; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 6 năm 2024

Tóm tắt: Quy trình tổng hợp dẫn chất vic-diol của eugenol được xây dựng: ester hóa bằng các acid anhydrid/pyridin và oxy hóa sản phẩm bằng KMnO₄ trong môi trường aceton/NaOH loãng, lạnh. Tổng hợp được dẫn chất trung gian 4-allyl-2-methoxyphenyl acetat (EA) với hiệu suất 97%, dẫn chất 1,2-diol 4-(2,3-dihydroxypropyl)-2-methoxyphenyl acetat (DIO) với hiệu suất cải thiện từ 19% lên 43%. Xác định được sản phẩm phụ của phản ứng oxy hóa EA là 4-acetoxy-3-methoxybenzaldehyd (ALD). Các chất được đánh giá hoạt tính sinh học: khả năng chống oxy hóa EA (%RSA₅₀ > 6666,67 µg/ml), ALD (%RSA₅₀= 1174,53 µg/ml) và DIO (%RSA₅₀= 59,47 µg/ml); khả năng kháng vi khuẩn MSSA của EA (MIC=256 µg/ml), khả năng kháng vi khuẩn *Streptococcus pyogenes* của DIO (MIC=1024 µg/ml); khả năng ức chế α -glucosidase của EA (12,19±6,83% ở nồng độ 0,5 mg/ml), ALD (IC₅₀=0,27 mg/ml) và DIO (43,98±2,34% ở nồng độ 0,5 mg/ml). Kết quả nghiên cứu cho thấy các dẫn chất eugenol có tiềm năng sinh học kháng khuẩn và ức chế α -glucosidase.

Từ khóa: eugenol, dẫn chất vic-diol, kháng khuẩn, chống oxy hóa, α -glucosidase.

1. Mở đầu

Eugenol được sử dụng rộng rãi như một chất tạo mùi thơm và hương liệu trong các mỹ phẩm, thực phẩm. Eugenol có tác dụng kháng viêm, chống oxy hóa. Ngoài ra, eugenol còn có thể kháng khuẩn, kháng nấm, gây tê, giảm đau và có khả năng chống ung thư. Eugenol được sử dụng trong nha khoa vì khả năng giảm đau và sát khuẩn của eugenol [1].

Từ eugenol, nhiều dẫn xuất được tổng hợp ví dụ như dẫn xuất ether, dẫn xuất aldehyd, dẫn

xuất cắt cầu nối ete hay dẫn xuất thể vòng benzen. Các dẫn xuất thể hiện nhiều hoạt tính sinh học khác nhau [1]. Edyta Makuch và cộng sự tổng hợp các dẫn chất ester của eugenol bao gồm eugenyl cloroacetat, eugenyl dicloroacetat và eugenyl trichloroacetat và chứng minh hoạt tính chống oxy hóa của các dẫn chất này tốt hơn eugenol. Bên cạnh đó, nhóm nghiên cứu còn cho thấy việc tạo liên kết ester giúp tăng tính thấm của hoạt chất [2]. Da Silva và cộng sự đã chứng minh các dẫn xuất được tạo ra bởi phản ứng ester

* Tác giả liên hệ.

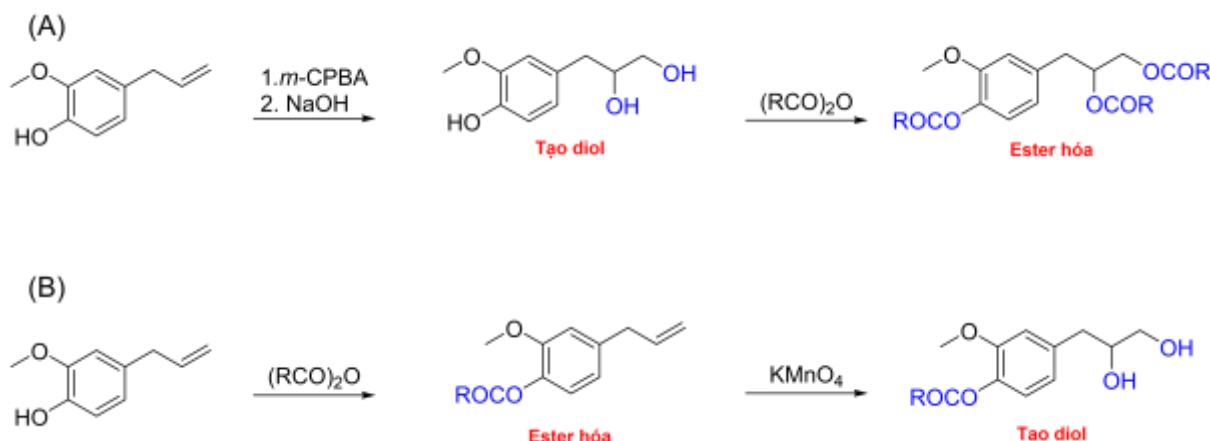
Địa chỉ email: pmhoang@ump.edu.vn

<https://doi.org/10.25073/2588-1132/vnumps.4586>

hóa nhóm hydroxy của eugenol với các acid carboxylic khác nhau và sản phẩm của phản ứng cộng trên liên kết đôi của nhóm allyl có tiềm năng kháng khuẩn. Các dẫn xuất này có hoạt tính chống lại các chủng vi khuẩn (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) mà ngay cả eugenol không có hoạt tính hoặc có hoạt tính yếu, do đó mở rộng phổ kháng khuẩn [3]. Một nghiên cứu khác thử nghiệm một loạt các dẫn xuất eugenol về hoạt tính kháng khuẩn của chúng. Trong đó, hợp chất 4-allyl-1-benzyloxy-2-methoxybenzen, 4-allyl-1-(4-isopropyl-benzyloxy)-2-methoxybenzen, 4-allyl-2-methoxy-1-(4-trifluoromethyl-benzyloxy)-benzen thể hiện hoạt tính kháng *Staphylococcus epidermidis*,

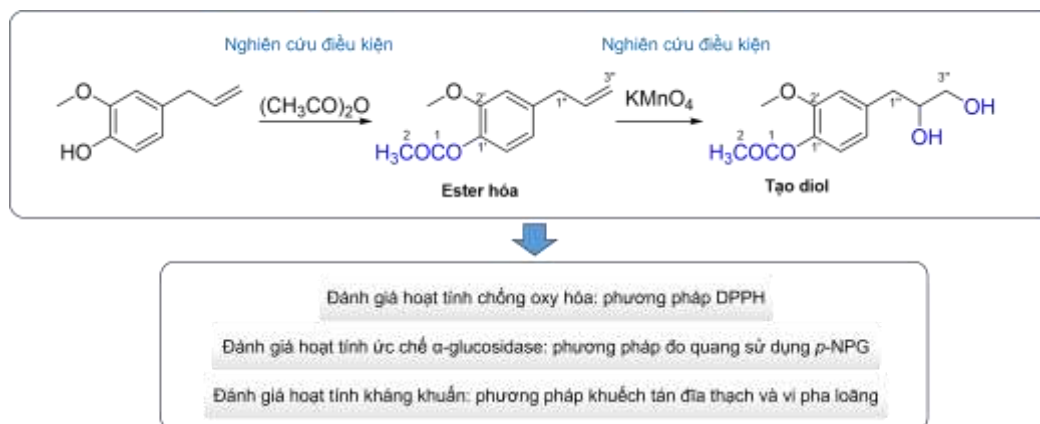
hợp chất 4-allyl-2-methoxyphenyl 4-bromobenzoat thể hiện hoạt tính kháng *Staphylococcus aureus* [4].

Trong hướng nghiên cứu của Da Silva và cộng sự, các dẫn xuất của eugenol được tổng hợp thông qua quá trình biến đổi gồm ester hóa, epoxy hóa nối đôi, oxy hóa nối đôi tạo dẫn xuất vic-diol [3]. Trong đó, chúng tôi chú ý đến quá trình tạo dẫn xuất vic-diol. Theo nghiên cứu của Da Silva và cộng sự, vic-diol được tổng hợp bằng phương pháp tạo dẫn xuất epoxid dùng chất oxy hóa acid *meta*-chloroperoxybenzoic (*m*-CPBA) rồi thủy phân bằng dung dịch NaOH. Tiếp theo đó, dẫn chất ester được thực hiện bằng cách acyl hóa 3 nhóm hydroxy (Hình 1).



Hình 1. Quy trình tổng hợp dẫn xuất vic-diol từ eugenol:

- (A) Quy trình của Da Silva và cộng sự: với quy trình này sẽ thu được dẫn xuất acyl hóa tại 3 nhóm hydroxy;
 (B) Quy trình của chúng tôi: với quy trình này có thể thu được dẫn xuất acyl hóa tại 1 nhóm hydroxy nhân thơm.



Hình 2. Tóm tắt nghiên cứu.

Chúng tôi nhận thấy rằng nếu muốn tổng hợp dẫn xuất vic-diol của eugenol và chỉ ester hóa một nhóm hydroxy nhân thơm thì khi áp dụng quy trình của Da Silva và cộng sự sẽ rất khó để thực hiện vì quá trình gắn nhóm acyl tạo ester không ưu tiên trên hydroxy nhân thơm. Với mục tiêu tìm hiểu tác dụng sinh học của đa dạng các dẫn xuất eugenol, góp phần cung cấp dữ liệu về các dẫn chất eugenol và tác dụng sinh học của chúng, chúng tôi đề xuất quy trình tổng hợp dẫn xuất vic-diol của eugenol với chỉ một nhóm hydroxy nhân thơm được ester hóa bằng cách đảo ngược lại quy trình của nhóm Da Silva và cộng sự. Theo đó, dẫn xuất ester sẽ được tạo ra trước và nối đôi sau đó sẽ được oxy hóa bằng tác nhân oxy hóa KMnO_4 rở tiền và dễ tìm để tạo dẫn xuất vic-diol (Hình 1). Các chất tổng hợp sẽ được đánh giá hoạt tính sinh học về khả năng kháng oxy hóa, khả năng kháng khuẩn và khả năng ức chế enzym α -glucosidase (Hình 2).

2. Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu, hóa chất, thiết bị

2.1.1. Nguyên liệu, hóa chất

Hóa chất tổng hợp: Eugenol (Sigma Aldrich), anhydrid acetic (Sigma Aldrich), bản mỏng silicagel (Merck), KMnO_4 (Xilong – Trung Quốc) và các dung môi, hóa chất khác (Xi-long-Trung Quốc và Chemsol-Việt Nam)

Hóa chất thử hoạt tính: Enzym α -glucosidase từ *Saccharomyces cerevisiae* (12,74U/mg, số lô: 118M4045V, Sigma Aldrich), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Aldrich), acid ascorbic (Sigma Aldrich), chủng vi khuẩn MSSA (ATCC 25923), MRSA (ATCC 33591), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 19615), *Escherichia coli* (ATCC 25922) và *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), nước thẩm thấu ngược (nước RO, từ máy tạo nước RO Casada III.I, Pall-USA), resazurin (Sigma Aldrich), amikacin (Sigma Aldrich), môi trường Mueller – Hinton Broth (MHB), thạch dịch truyền não tim (Brain heart infusion agar) và các dung môi hóa chất khác (Sigma Aldrich).

2.1.2. Trang thiết bị nghiên cứu

Máy quang phổ hồng ngoại (IR) Shimadzu IRAffinity-1S, máy Shimadzu LCMS, máy NMR Bruker Avance III, máy đo nhiệt độ nóng chảy Stuart SMP30, máy đo quang phổ UV-vis Shimadzu Model 1800, máy đo UV Ao Absorbance Microplate Reader – Azure Biosystem.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp tổng hợp và xác định cấu trúc

Tổng hợp eugenyl acetat: cho lần lượt 2,00 g (0,0122 mol) eugenol, 4 ml (0,0424 mol) anhydrid acetic, 2 ml pyridin vào erlen. Khuấy từ 10 phút ở nhiệt độ phòng rồi chuyển vào bình lắc gan. Cho 20 ml ethylacetat vào bình lắc gan, thêm dung dịch CuSO_4 20% (3×30 ml) chiết lấy lớp hữu cơ. Rửa lớp hữu cơ bằng nước muối (3×10 ml), làm khan bằng Na_2SO_4 và cô quay loại bỏ dung môi. So sánh với phương pháp dùng 1 giọt acid sulfuric đặc làm xúc tác, thực hiện ở nhiệt độ lạnh trong thau nước đá, thay dung dịch CuSO_4 bằng nước cất.

Tổng hợp 4-(2,3-dihydroxypropyl)-2-methoxyphenyl acetat: hòa tan 0,79 g (0,005 mol) KMnO_4 trong 10 ml NaOH 0,1 M vào cốc có mỏ, làm lạnh. Cho 13 ml acetone vào erlen, làm lạnh đến 0 °C. Thêm 0,5 g (0,0024 mol) eugenyl acetat vào erlen chứa acetone, khuấy từ. Cho dung dịch KMnO_4 trên từ từ vào erlen. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng đến khi hết nguyên liệu. Sau khi phản ứng kết thúc, lọc áp suất giảm, thu dịch chiết, rửa cặn bằng acetone. Thêm 15 ml dung dịch NaCl bão hòa vào và chiết bằng *n*-hexan (5×20 ml). Làm khan bằng Na_2SO_4 và loại bỏ dung môi bằng thiết bị cô quay. Tinh chế sản phẩm bằng sắc ký cột với hệ dung môi *n*-hexan: ethyl acetat (1:1). Các điều kiện oxy hóa khác nhau dựa trên các tài liệu tham khảo được thực hiện trên cùng lượng nguyên liệu nhằm chọn ra quy trình tổng hợp tối ưu có thể, bao gồm: i) KMnO_4 trong môi trường acetone/nước (thay thế NaOH 0,1 M bằng nước cất) [5]; ii) KMnO_4 trong môi trường acetone/NaOH 0,1 M [6]; iii) KMnO_4 trong môi

trường aceton/acid acetic 0,1 M (thay thế NaOH 0,1 M bằng acid acetic 0,1 M); và iv) KMnO₄ và H₂O₂ đồng làm chất oxy hóa trong môi trường aceton/nước (thay thế NaOH 0,1 M bằng nước cất, sau khi cho dd KMnO₄ từ từ vào erlen thì thêm từ từ 3 ml H₂O₂ 30% vào trong vòng 1 giờ) [7].

Độ tinh khiết các chất được đánh giá qua sắc ký lớp mỏng với 03 hệ dung môi khác nhau cho 01 vết duy nhất. Cấu trúc của các chất được xác định bằng phổ IR, MS và NMR.

2.2.2. Phương pháp thử hoạt tính chống oxy hóa

Phương pháp DPPH để đánh giá khả năng chống oxy hóa của mẫu thử được tham khảo theo quy trình của Mahdi-Pour [8] và Hsu [9]. Dung dịch được đo trong cuvet thạch anh có bề dày 1 cm. Sử dụng chất đối chiếu là acid ascorbic. Dung dịch DPPH 0,006% và các mẫu thử được pha trong methanol. Các chất được cho vào cuvet và ủ 30 phút trong tối trước khi tiến hành đo ở bước sóng 517 nm. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Công thức tính:

$$\%RSA = \frac{A_{chứng} - (A_{thử} - A_{trắng})}{A_{chứng}} \times 100\%$$

Trong đó:

A_{chứng}: độ hấp thụ của mẫu chứng, gồm 0,5 ml dd DPPH 0,006% và 1 ml methanol;

A_{thử}: độ hấp thụ của mẫu thử, gồm 0,5 ml dd DPPH và 1 ml dung dịch mẫu thử;

A_{trắng}: độ hấp thụ của mẫu trắng, gồm 0,5 ml MeOH và 1 ml dung dịch mẫu thử;

%RSA (Radical scavenging activity): hoạt tính dọn dẹp gốc tự do.

Hoạt tính được đo ở các nồng độ khác nhau. Lập phương trình hồi quy $\hat{y} = ax + b$ thể hiện mối tương quan giữa %RSA (y) và log cơ số 10 của nồng độ chất (x) nhờ sự hỗ trợ của phần mềm Microsoft Excel. Sau đó, xác định %RSA₅₀ dựa vào phương trình hồi quy tìm được.

2.2.3. Phương pháp thử hoạt tính kháng khuẩn

Phương pháp được thực hiện theo hướng dẫn của Viện tiêu chuẩn phòng thí nghiệm và lâm sàng (Clinical and Laboratory Standards Institute) có điều chỉnh nhỏ để phù hợp điều kiện tại phòng thí nghiệm [10].

Phương pháp khuếch tán thạch khảo sát khả năng kháng khuẩn: huyền dịch vi khuẩn (có độ hấp thụ quang khoảng 0,08-0,10 ở bước sóng 625 nm tương đương với nồng độ 1-5×10⁸ CFU/mL đo trong cuvet thạch anh 1 cm) được cấy lên đĩa thạch chứa môi trường MHA 2,1%. Cho 50 μL mẫu thử nồng độ 10 mg/ml trong DMSO 10% vào lỗ đường kính 6 mm được đục trên thạch. Ủ ở 37 °C trong tủ ẩm. Chứng âm sử dụng DMSO 10% thay cho mẫu thử. Đánh giá sau 24 giờ.

Phương pháp vi pha loãng dùng thuốc nhuộm resazurin để xác định MIC: cho các chất pha trong DMSO vào các giếng của đĩa 96 giếng ở nồng độ xác định và nồng độ DMSO <2%. Dịch chứa vi khuẩn được cho vào giếng để đạt nồng độ 2-8×10⁵ CFU/mL. Ủ ở 37 °C trong 24 giờ. Chứng âm sẽ sử dụng môi trường không chứa vi khuẩn cho vào. Chứng dương sẽ sử dụng dung dịch amikacin thay cho mẫu thử.

2.2.4. Phương pháp thử hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase

Hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase được đánh giá bằng phương pháp đo quang ở bước sóng 405 nm với cơ chất là *p*-NPG, thực hiện trên đĩa 96 giếng theo quy trình của Granados-Guzmán và cộng sự [11] và của Zhi-Wei Wang và cộng sự [12] và có điều chỉnh nhỏ để phù hợp với điều kiện của phòng thí nghiệm.

Cho 150 μL đệm phosphat pH 6,8 vào giếng đo. Thêm 10 μL mẫu thử được hòa tan trong DMSO ở các nồng độ khác nhau. Thêm 10 μL dung dịch α -glucosidase 0,5 U/ml. Hỗn hợp được ủ 30 phút ở 37 °C. Thêm 30 μL dung dịch *p*-NPG 0,5 mM. Hỗn hợp được tiếp tục ủ 30 phút ở nhiệt độ 37 °C. Đo độ hấp thụ ở bước sóng 405 nm. Mẫu chứng sử dụng 10 μL DMSO thay cho 10 μL mẫu thử. Mẫu trắng sử dụng 10 μL đệm thay cho 10 μL dung dịch α -glucosidase. Acarbose được sử dụng làm chất đối chiếu. Mỗi thí nghiệm được lặp lại 3 lần.

Công thức tính phần trăm (%) ức chế:

$$I\% = \left(1 - \frac{A_{TE} - A_T}{A_{CE} - A_C}\right) \times 100$$

Trong đó:

A_{TE}: độ hấp thụ của mẫu thử có enzym;

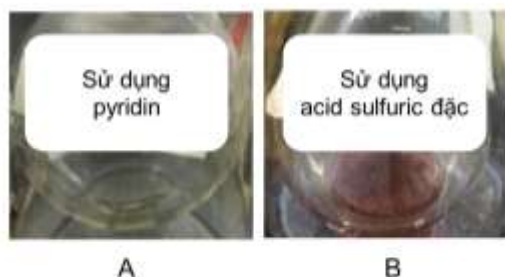
A_T: độ hấp thụ của mẫu thử không enzym;
 A_{CE}: độ hấp thụ của mẫu chứng có enzym;
 A_C: độ hấp thụ của mẫu chứng không enzym.

Hoạt tính được đo ở các nồng độ khác nhau. Lập phương trình hồi quy $\hat{y} = ax + b$ thể hiện mối tương quan giữa % ức chế α -glucosidase (y) và nồng độ (x) nhờ sự hỗ trợ của phần mềm Microsoft Excel. Sau đó, xác định IC₅₀ dựa vào phương trình hồi quy tìm được.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Tổng hợp

3.1.1. Tổng hợp eugenyl acetat (EA)



Hình 3. Sản phẩm thu được của phản ứng acetyl hóa eugenol: (A) Chất lỏng màu vàng nhạt thu được ở điều kiện xúc tác pyridin; (B) Chất lỏng màu đỏ thu được ở điều kiện xúc tác H₂SO₄ đặc.

Khảo sát 2 điều kiện xúc tác sử dụng là pyridin và acid sulfuric đặc (1 giọt), sử dụng xúc tác pyridin thu được sản phẩm có hiệu suất cao hơn so với điều kiện xúc tác bằng H₂SO₄ đặc (97% so với 89%). Ngoài ra, ở điều kiện xúc tác bằng pyridin, sản phẩm thu được sau khi tinh chế

bằng phương pháp lắc phân bố là chất lỏng màu vàng, khác với điều kiện xúc tác bằng acid đậm đặc là chất lỏng có màu hồng đậm. Điều này chứng tỏ là sử dụng xúc tác acid đậm đặc tạo ra những tạp màu. Nguyên nhân có thể đến từ nhóm phenolic của eugenol dễ bị oxy hóa.

Nghiên cứu tiếp tục thực hiện tổng hợp eugenyl acetat sử dụng xúc tác pyridin với lượng nguyên liệu lớn hơn (từ 2,00 g đến 10,00 g). Kết quả vẫn cho được hiệu suất cao > 95%.

Bảng 1. Hiệu suất phản ứng acetyl hóa eugenol bằng xúc tác pyridin với lượng nguyên liệu từ 2,00 g đến 10,00 g

Phản ứng	Khối lượng eugenol (g)	Sản phẩm thu được (g)	Hiệu suất (%)
1	2,00	2,44	97,0
2	6,00	7,18	95,1
3	10,00	12,45	99,0

Eugenyl acetat: chất lỏng màu vàng nhạt. Tan trong ethyl acetat, aceton, DMSO, ethanol, methanol, kém tan trong nước. Sắc ký lớp mỏng: hệ n-hexan: cloroform (7:3) cho R_f = 0,25, hệ n-hexan: cloroform (1:9) cho R_f = 0,5, hệ ethyl acetat: cloroform (5:5) cho R_f = 0,95. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ 6,98 (d, J = 8,0 Hz, 1H, H6'), 6,95 (d, J = 2,0 Hz, 1H, H3'), 6,76 (dd, J = 8,0; 1,9 Hz, 1H, H5'), 5,98 (ddt, J = 17,0; 10,0; 6,9 Hz, 1H, H2''), 5,12 (ddt, J = 17,0; 2,3; 1,5 Hz, 1H, H3a''), 5,07 (ddt, J = 10,0; 2,3; 1,5 Hz, 1H, H3b''), 3,76 (s, 3H, -OCH₃), 3,37 (ddd, J = 6,9; 1,5; 1,5 Hz, 2H, H1''), 2,24 (s, 3H, -COCH₃). Kết quả phổ proton phù hợp với cấu trúc eugenyl acetat và tương đồng với kết quả phổ của nhóm Da Silva và cộng sự [3].

Bảng 2. Kết quả phản ứng oxy hóa nối đôi của eugenyl acetat bằng KMnO₄

Phương pháp	Khối lượng eugenol (g)	Thời gian phản ứng (*)	Sản phẩm phụ ALD (g)	Hiệu suất (%)	Sản phẩm chính DIO (g)	Hiệu suất (%)
KMnO ₄ /nước	0,50	2 giờ	0,05	9,58	0,11	19,3
KMnO ₄ /NaOH loãng	0,50	2 giờ	0,04	7,63	0,25	43,3
KMnO ₄ /acid acetic loãng	0,50	2 giờ	0,06	11,86	0,15	25,1
KMnO ₄ + H ₂ O ₂ /nước	0,50	1 giờ	0,04	9,29	0,19	31,8

(*) Đánh giá dựa trên kết quả sắc ký lớp mỏng khi hết nguyên liệu.

3.1.2. Tổng hợp 4-(2,3-dihydroxypropyl)-2-methoxyphenyl acetat (DIO)

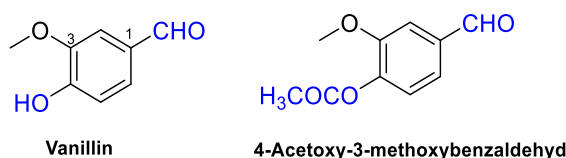
Khảo sát các điều kiện thực hiện phản ứng oxy hóa nối đôi của eugenyl acetat bằng KMnO_4 cho thấy phương pháp oxy hóa trong NaOH loãng lạnh thu được dẫn xuất diol của eugenyl acetat (kí hiệu DIO) với hiệu suất cao nhất (43,3%) và thời gian phản ứng trong vòng 2 giờ. Điều này có thể được giải thích bằng khả năng oxy hóa của KMnO_4 ở các môi trường pH khác nhau ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp, môi trường trung tính hoặc môi trường acid ưu tiên tạo ra sản phẩm khác DIO. Khi có thêm chất đồng oxy hóa H_2O_2 , phản ứng diễn ra nhanh hơn và chỉ trong vòng 1 giờ. Tuy nhiên, hiệu suất đạt được 31,8% thấp hơn phương pháp oxy hóa trong NaOH loãng lạnh (Bảng 2).

4-(2,3-Dihydroxypropyl)-2-methoxyphenyl acetate: chất lỏng, màu vàng nhạt. Tan trong ethyl acetat, DMSO, aceton, methanol, tan ít trong nước. Sắc ký lớp mỏng: hệ *n*-hexan: ethylacetat (1:1) cho $R_f = 0,15$, hệ ethylacetat: methanol (5:1) cho $R_f = 0,6$, hệ ethyl acetat: cloroform (5:5) cho $R_f = 0,35$. Khối phổ ESI-MS: $[\text{M}-\text{H}]^+$ dự đoán 241,10, kết quả thực nghiệm 241,10. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 6,98 (d, $J = 1,9$ Hz, 1H, H3'), 6,94 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, H6'), 6,79 (dd, $J = 8,0; 1,9$ Hz, 1H, H5'), 4,57 (s, 2H, 2 -OH), 3,75 (s, 3H, -OCH₃), 3,66 (m, 1H, H2''), 3,30 (m, 2H, H3''), 2,78 (dd, $J = 13,6; 4,6$ Hz, 1H, H1''), 2,58 (dd, $J = 13,6; 8,0$ Hz, 1H, H1''), 2,24 (s, 3H, -COCH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (126 MHz, DMSO-*d*6) δ 169,12 (C=O); 150,73 (C2'); 139,15 (C1'); 137,85 (C4'); 122,55 (C6'); 121,74 (C5'); 114,27 (C3'); 72,82 (-CHOH-); 65,85 (-CH₂OH); 56,07 (-OCH₃); 40,05 (C1''); 20,87 (C2).

3.1.3. Sản phẩm phụ 4-acetoxy-3-methoxybenzaldehyd (ALD)

Ngoài dẫn xuất vic-diol, trong phản ứng oxy hóa dùng KMnO_4 chúng tôi còn tách được sản phẩm phụ là dẫn xuất aldehyd (kí hiệu ALD) với hiệu suất khoảng 10% (Bảng 2). Dẫn xuất được xác định là aldehyd 4-acetoxy-3-methoxybenzaldehyd dựa vào các dữ kiện (Hình 5): i) Phản ứng tráng gương; ii) Thủy phân nhóm

ester cho R_f tương ứng với vanillin trên bảng mỏng sắc ký; iii) Phổ IR cho thấy đỉnh 1747 cm^{-1} đặc trưng cho nhóm C=O, kết quả IR phù hợp với kết quả IR của phổ vanillin acetat trên thư viện NIST; và iv) Phổ $^1\text{H-NMR}$ phù hợp với cấu trúc vanillin acetat hay 4-acetoxy-3-methoxybenzaldehyd. Kết quả cho thấy phản ứng oxy hóa eugenyl acetat với KMnO_4 thu được nhiều sản phẩm khác nhau, sản phẩm chính thu được là dẫn xuất vic-diol. Ngoài ra chúng tôi còn chứng minh quá trình oxy hóa còn có thể cắt 2 carbon của dây nhánh và hình thành nhóm chức aldehyd.



Hình 4. Cấu trúc vanillin và sản phẩm phụ 4-acetoxy-3-methoxybenzaldehyd trong phản ứng oxy hóa nối đôi của eugenyl acetat bằng KMnO_4 .

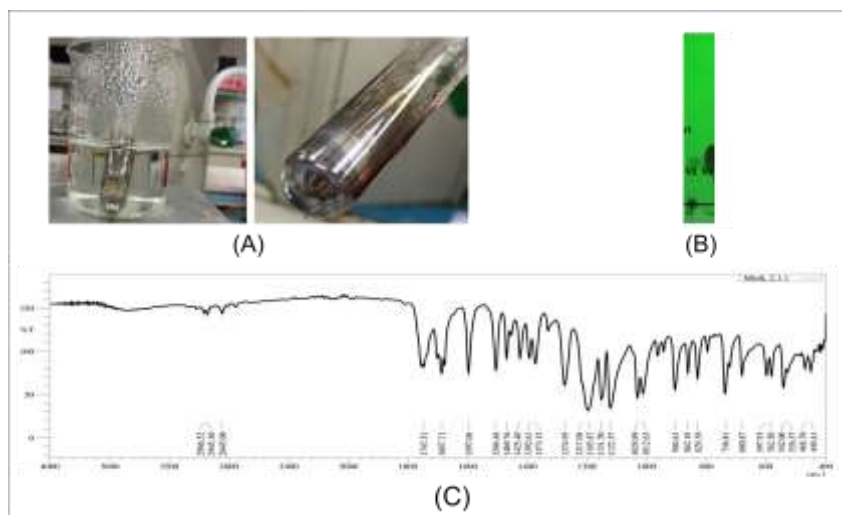
4-Acetoxy-3-methoxybenzaldehyd: tinh thể không màu. Nhiệt độ nóng chảy: 59,5 – 61,5 °C. Tan trong *n*-hexan, ethyl acetat, DMSO, aceton, kém tan trong nước. Sắc ký lớp mỏng: hệ *n*-hexan: ethylacetat (8:2) cho $R_f = 0,5$, hệ *n*-hexan: cloroform (7:3) cho $R_f = 0,15$, hệ ethyl acetat: cloroform (5:5) cho $R_f = 0,95$. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-*d*6) δ 9,98 (s, 1H, -CHO), 7,61 (d, $J = 1,8$ Hz, 1H, H2), 7,58 (dd, $J = 8,0; 1,8$ Hz, 1H, H6), 7,36 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, H5), 3,88 (s, 3H, -OCH₃), 2,30 (s, 3H, -COCH₃).

3.2. Kết quả thử hoạt tính chống oxy hóa

Kết quả thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH cho thấy 3 mẫu EA, ALD và DIO có khả năng chống oxy hóa thấp hơn acid ascorbic (%RSA₅₀ = 1,66 $\mu\text{g/ml}$). Trong 3 chất tổng hợp, chất DIO cho hoạt tính chống oxy hóa tốt nhất (%RSA₅₀ = 59,47 $\mu\text{g/ml}$), tiếp theo đó là mẫu EA (%RSA₅₀ = 1174,53 $\mu\text{g/ml}$), và mẫu ALD (%RSA₅₀ > trên 6666,67 $\mu\text{g/ml}$). Kết quả này tương đồng với kết quả của nhóm Da Silva và cộng sự [3] đối với hoạt tính chống oxy hóa của eugenyl acetat (>100 $\mu\text{g/ml}$). Khả

năng chống oxy hóa của các dẫn chất tổng hợp yếu được cho là do nhóm hydroxy nhân thơm không còn tự do như của eugenol. Kết quả bổ

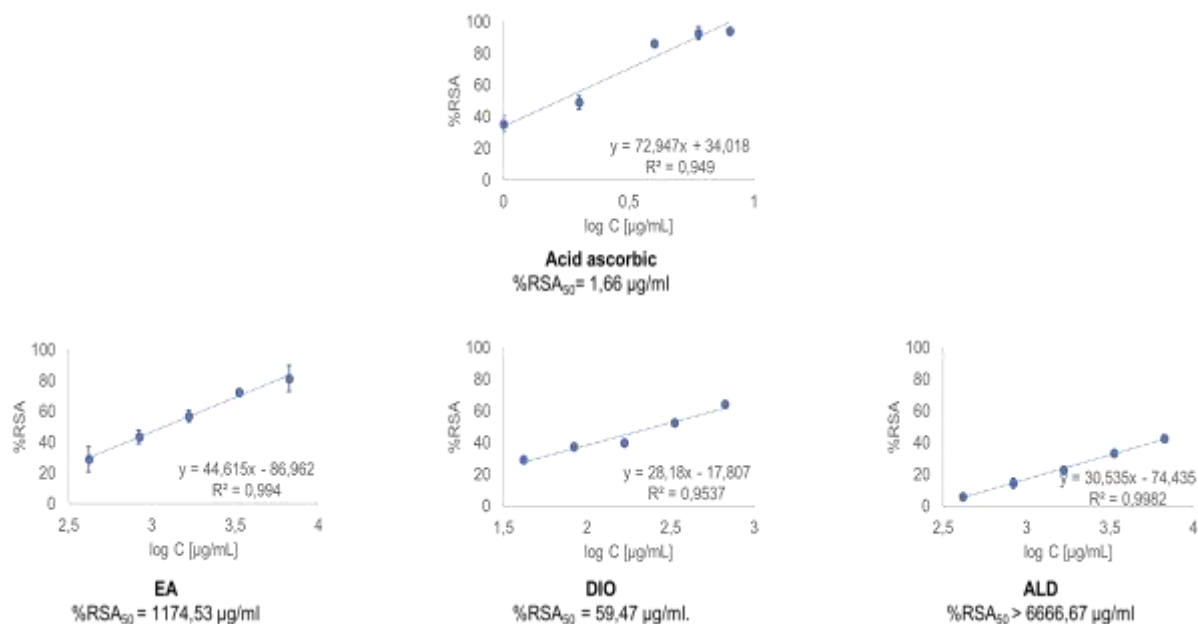
sung thêm cho dữ liệu nghiên cứu về khả năng chống oxy hóa của các dẫn chất eugenol.



Hình 5. Kết quả xác định aldehyd 4-acetoxy-3-methoxybenzaldehyd: (A) Phản ứng tráng gương: chất ALD cho phản ứng với dung dịch AgNO_3 trong môi trường NH_3 thấy xuất hiện một lớp bạc bám trên thành ống nghiệm; (B) Sắc ký lớp mỏng: chất ALD phản ứng với dung dịch KOH 10%, thêm dư dung dịch HCl 10%. Sản phẩm được chiết bằng etyl acetat và sắc ký lớp mỏng với hệ n -hexan: cloroform (5:5) cho vết có R_f tương tự vanilin.

Trên hình, V2 là sản phẩm sau phản ứng và Va là vanilin;

(C) Phổ IR cho thấy đỉnh 1747 cm^{-1} đặc trưng cho nhóm $\text{C}=\text{O}$. Phổ IR phù hợp với phổ IR của 4-acetoxy-3-methoxybenzaldehyd trên thư viện NIST.



Hình 6. Khả năng chống oxy hóa của các dẫn xuất eugenol tổng hợp so với chất chứng acid ascorbic.

3.3. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn

Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của các mẫu ở Bảng 3 cho thấy mẫu EA có khả năng kháng khuẩn trên MSSA và không có khả năng kháng khuẩn trên bốn chủng vi khuẩn thử

nhằm còn lại; mẫu DIO có khả năng kháng khuẩn trên chủng vi khuẩn *S.pyogenes* và không có khả năng kháng khuẩn trên bốn chủng còn lại; mẫu ALD không có khả năng kháng khuẩn trên cả 5 chủng vi khuẩn.

Bảng 3. Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn của các chất tổng hợp

Mẫu thử	<i>E.coli</i>	MSSA	<i>S.pyogenes</i>	MRSA	<i>P.aeruginosa</i>
EA	—	D = 12 mm MIC = 256 µg/ml	—	—	—
Alde	—	—	—	—	—
DIO	—	—	D = 15 mm MIC = 1024 µg/ml	—	—
Eugenol	D = 7 mm MIC >1024 µg/ml	D = 9 mm MIC = 1024 µg/ml	—	D = 7 mm MIC >1024 µg/ml	ND
Amikacin	MIC = 1,56 µg/ml	MIC = 3,125 µg/ml	MIC = 1,56 µg/ml	MIC = 1,56 µg/ml	MIC = 0,195 µg/ml

(D: đường kính vòng kháng khuẩn theo phương pháp khuếch tán đĩa thạch, nồng độ mẫu 10 mg/mL; MIC theo phương pháp vi pha loãng; (—): mẫu không ức chế sự tăng trưởng của vi khuẩn; ND: không có dữ liệu).

MIC của mẫu EA đối với chủng vi khuẩn MSSA (256 µg/ml) yếu hơn so với amikacin (12,5 µg/ml) và MIC của mẫu DIO đối với chủng vi khuẩn *Streptococcus pyogenes* (1024 µg/ml) yếu hơn so với amikacin (1,56 µg/ml). Theo kết quả Da Silva và cộng sự [3], EA không có khả năng kháng: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus*, *Klebsiella pneumoniae* và *Bacillus cereus*. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng cho thấy EA không có khả năng kháng *Pseudomonas aeruginosa* và *Escherichia coli*.

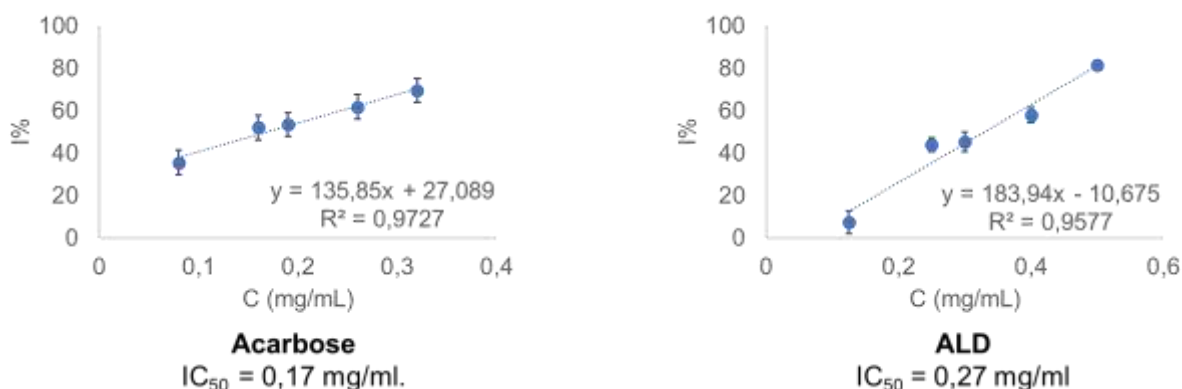
Khi so sánh với eugenol, kết quả của chúng tôi cho thấy EA có thể kháng MSSA với MIC là

256 µg/ml mạnh hơn eugenol 4 lần (1200 µg/ml trong nghiên cứu của Da Silva và cộng sự, 1024 µg/ml trong nghiên cứu của chúng tôi). Ngoài ra, dẫn xuất của eugenol là DIO có khả năng kháng *Streptococcus pyogenes* trong khi eugenol không có khả năng. Từ đó cho thấy dẫn xuất của eugenol có tiềm năng kháng khuẩn tốt hơn eugenol ở một số chủng vi khuẩn và có khả năng kháng được các vi khuẩn mà eugenol không thực hiện được.

3.4. Kết quả thử hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase

Bảng 4. Hoạt tính ức chế α -glucosidase ở nồng độ 0,5 mg/ml của các chất tổng hợp

	% Ức chế	Nhận xét
EA	12,19±6,83%	Hoạt tính chưa mạnh
ALD	72,98±3,31%	Có tiềm năng
DIO	43,98±2,34%	Hoạt tính chưa mạnh
Eugenol	17,60±5,73%	Hoạt tính chưa mạnh



Hình 7. Kết quả xác định IC₅₀ enzym α -glucosidase của acarbose và chất ALD.

Theo kết quả sàng lọc hoạt tính ức chế α -glucosidase ở nồng độ 0,5 mg/ml, mẫu ALD thể hiện tiềm năng ức chế enzym α -glucosidase, mẫu eugenol, DIO và EA có hoạt tính ức chế nhưng chưa mạnh. Từ đó, chúng tôi tiếp tục thực hiện khảo sát mẫu ALD với các nồng độ khác nhau để xác định IC₅₀.

Kết quả cho thấy IC₅₀ của mẫu ALD là 0,27 mg/ml, tương ứng với nồng độ 1401 μ M. Kết quả IC₅₀ của chất acarbose là 0,17 mg/ml tương ứng với nồng độ 263,28 μ M. So sánh cấu trúc của 3 chất tổng hợp cho thấy nhóm aldehyd giúp gia tăng hoạt tính ức chế α -glucosidase. Mặc dù không thể hiện hoạt tính ức chế enzym α -glucosidase mạnh như acarbose, kết quả thử hoạt tính vẫn cho thấy tiềm năng ức chế enzym α -glucosidase của nhóm dẫn chất được tổng hợp từ eugenol.

4. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng được quy trình tổng hợp dẫn chất vic-diol của eugenol có nhóm hydroxy nhân thơm được acyl hóa. Dẫn xuất vic-diol DIO được tổng hợp trong nghiên cứu này là chất mới (tra cứu trên SCI-FINDER tháng 04/2024). Quy trình này có thể áp dụng để tổng hợp hàng loạt dẫn chất eugenol tương tự khác và là những chất mới trên thế giới. Bên cạnh đó có thể mở rộng quy trình như tổng hợp các dẫn chất vic-diol có nhóm hydroxy nhân thơm được ether hóa. Ngoài ra, hoạt tính ức chế α -glucosidase lần

đầu tiên được nghiên cứu trên nhóm dẫn chất của eugenol cũng cho thấy khả năng phát triển nhóm dẫn chất theo hướng hoạt tính sinh học này. Từ tiềm năng sinh học như kháng khuẩn và ức chế α -glucosidase, chúng tôi định hướng để nghiên cứu tiếp các hoạt tính trên nhóm dẫn chất của eugenol.

Lời cảm ơn

Nghiên cứu được tài trợ bởi Quỹ Phát triển Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Nguyễn Tất Thành, mã số đề tài 2023.01.113/HĐ-KHCN.

Tài liệu tham khảo

- [1] A. Abdou, A. Elmakssoudi, A. E. Amrani, J. J. Eddine, M. J. M. C. R. Dakir, Recent Advances in Chemical Reactivity and Biological Activities of Eugenol Derivatives, Medicinal Chemistry Research, Vol. 30, 2021, pp. 1011-1030, <https://doi.org/10.1007/s00044-021-02712-x>.
- [2] E. Makuch, A. Nowak, A. Günther, R. Pelech, Ł. Kucharski, W. Duchnik, A. Klimowicz, Enhancement of The Antioxidant and Skin Permeation Properties of Eugenol by the Esterification of Eugenol to New Derivatives, AMB Express, Vol. 10, 2020, pp. 1-5, <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01122-3>.
- [3] F. D. Silva, F. J. Monte, T. L. D. Lemos, P. G. D. Nascimento, A. K. D. M. Costa, L. M. D. Paiva, Eugenol Derivatives: Synthesis, Characterization,

- and Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities, *Chemistry Central Journal*, Vol. 12, 2018, pp. 1-9,
<https://doi.org/10.1186/s13065-018-0407-4>.
- [4] N. H. Rahim, A. Asari, N. Ismail, H. Osman, Synthesis and Antibacterial Study of Eugenol Derivatives, *Asian Journal of Chemistry*, Vol. 29, No. 1, 2017, pp. 22-26,
<https://doi.org/10.14233/ajchem.2017.20100>.
- [5] K. B. Wiberg, K. A. Saegbarth, The Mechanisms of Permanganate Oxidation. IV. Hydroxylation of Olefins and Related Reactions, *Journal of the American Chemical Society*, Vol. 79, No. 11, 1957, pp. 2822-2824,
<https://doi.org/10.1021/ja01568a042>.
- [6] J. E. Taylor, T. E. Janini, O. C. Elmer, Aqueous Permanganate Oxidations of Cycloalkenes to *cis*-Glycols and *cis* to *trans* Conversions, *Organic Process Research and Development*, Vol. 2, No. 3, 1998, pp. 147-150,
<https://doi.org/10.1021/op9701189>.
- [7] D. Dalmizrak, H. Göksu, M. S. Gültekin, A Facile Synthesis of Vicinal *cis*-Diols From Olefins Catalyzed by *in situ* Generated Mn_xO_y Nanoaggregates, *RSC Advances*, Vol. 5, No. 27, 2015, pp. 20751-20755,
<https://doi.org/10.1039/C5RA01646K>.
- [8] B. M. Pour, S. L. Jothy, L. Y. Latha, Y. Chen, S. Sasidharan, Antioxidant Activity of Methanol Extracts of Different Parts of *Lantana camara*, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, Vol. 2, No. 12, 2012, pp. 960-965,
[https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60007-6](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60007-6).
- [9] C. Y. Hsu, Antioxidant Activity of Extract from *Polygonum aviculare* L., *Biological research*, Vol. 39, No. 2, 2006, pp. 281-288,
<http://dx.doi.org/10.4067/S071697602006000200010>.
- [10] M. P. Weinstein et al., *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*, 11th Edition, National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA, 2018.
- [11] G. G. Guzmán, R. C. Ríos, N. W. D. Torres, R. S. Aranda, Optimization and Validation of A Microscale *in vitro* Method to Assess α -Glucosidase Inhibition Activity, *Current analytical chemistry*, Vol. 14, No. 5, 2018, pp. 458-464,
<https://doi.org/10.2174/1573411013666170911154755>.
- [12] Z. W. Wang, J. S. Wang, J. Luo, L. Y. Kong, α -Glucosidase Inhibitory Triterpenoids from the Stem Barks of *Uncaria laevigata*, *Fitoterapia*, Vol. 90, 2013, pp. 30-37,
<https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.07.005>.