

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

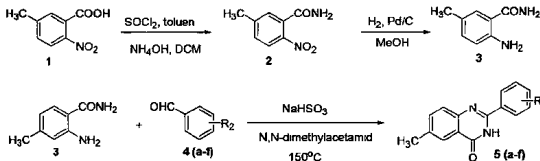


Hình 1: Phát triển và thiết kế các hợp chất 2-aryl-6-methyl-4-quinazolinon từ 3-aryl-isoquinolinon

Tiếp nối hướng phát triển sử dụng phương pháp đẳng cấu sinh học, trong nghiên cứu này, chúng tôi tổng hợp một số dẫn chất 2-aryl-6-methyl-4-quinazolinon và thử độc tính tế bào của các chất tổng hợp được trên 4 dòng tế bào ung thư biểu mô (KB), ung thư gan (Hep-G2), ung thư phổi (LU) và ung thư vú (MCF-7).

Nguyên vật liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên vật liệu và thiết bị



- 5a: R = 3'-OMe; 5b: R = 2'-CF₃
 5c: R = 3'-CF₃; 5d: R = 3'-OCF₃
 5e: R = 2'-OCF₃; 5f: R = 2'-N(CH₃)₂

Sơ đồ 1: Sơ đồ tổng hợp các dẫn chất 2-aryl-6-methyl-4-quinazolinon 5 (a-f)

Thử tác dụng sinh học

Tác dụng gây độc tế bào của các chất tổng hợp được thử trên 4 dòng tế bào ung thư: KB (Human epidemic carcinoma) - ung thư biểu mô, Hep-G2 (Hepatocellular carcinoma) - ung thư gan; LU (Human lung carcinoma) - ung thư phổi và MCF-7 (Human breast carcinoma) - ung thư vú theo phương pháp MTT của Viện Nghiên cứu Ung thư quốc gia Mỹ^[9]. Các chất có IC₅₀ ≤ 128 µg/ml được coi là có hoạt tính.

Kết quả nghiên cứu

Tổng hợp 5-methyl-2-nitrobenzamid (2)

Nhỏ từ từ thionyl clorid (7 ml; 90 mmol) vào bình cầu chứa 5,43 g (30 mmol) acid 5-methyl-

Hóa chất và dung môi được mua từ Công ty hóa chất Merck hay Aldrich, sử dụng không qua tinh chế. Sắc kí lớp mỏng thực hiện trên bản mỏng silica gel 60F₂₅₄ (Merck) và quan sát dưới đèn UV, bước sóng 254 nm. Phổ hồng ngoại được ghi trên máy Perkin Elmer. Phổ khối lượng được ghi trên máy LC/MS Agilent 1260. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi trên máy Bruker Avance 500 MHz với TMS làm chất chuẩn nội.

Phương pháp nghiên cứu

Tổng hợp hóa học

Các chất được tổng hợp theo sơ đồ sau^[7]:

2-nitrobenzoic (1), duy trì phản ứng ở 50°C trong 4 giờ. Loại thionyl clorid dư bằng cất loại chân không. Hòa tan sản phẩm thu được trong 30 ml dicloromethan, sau đó nhỏ từ từ vào 25 ml dung dịch NH₄OH ở 0°C, tiếp tục khuấy ở nhiệt độ phòng khoảng 4 giờ. Kết thúc phản ứng cất loại dung môi dưới áp suất giảm. Lọc, rửa bình cầu bằng nước, sấy khô thu được 5-methyl-2-nitrobenzamid (2) (4,42 g dạng bột màu trắng). Hiệu suất 82%.

Tổng hợp 2-amino-5-methylbenzamid (3)

Hòa tan 4,42 g (24,5 mmol) hợp chất 5-methyl-2-nitrobenzamid (2) trong 200 ml methanol, thêm từ từ 220 mg 10% Pd/C vào bình phản ứng. Hỗn hợp phản ứng được hydro hóa ở nhiệt độ phòng

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

trong 8 giờ. Sau khi kết thúc phản ứng, hỗn hợp được làm lạnh, lọc loại bỏ xúc tác, cất loại dung môi thu được 2-amino-5-methylbenzamid (3) (3,46 g chất bột màu trắng). Hiệu suất 94%. ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ(ppm): 7,65-7,34 (2H, -CONH₂); 6,96 (m, 2H); 6,59 (d, 1H, J=8,5Hz); 6,30 (s, 2H, NH₂); 2,13 (m, 3H, CH₃).

Tổng hợp dẫn chất 2-aryl-4-quinazolinon (5 a-f)

Quy trình chung

NaHSO₃ (4 mmol) được thêm vào dung dịch gồm 2-amino-5-methylbenzamid (3) (2 mmol) và dẫn chất của benzaldehyd 4 (a-f) (2 mmol) trong N,N-dimethylacetamid (5 mL). Hỗn hợp được khuấy ở 150°C trong 2 - 3 giờ. Sau khi phản ứng kết thúc, để nguội bình phản ứng, đổ hỗn hợp phản ứng vào nước đá, kết tủa tạo thành được lọc hút, rửa tủa nhiều lần bằng nước cất và ethanol để thu được sản phẩm quinazolinon 5 (a-f).

2-(3-Methoxy-phenyl)-6-methyl-3H-quinazolin-4-on (5a)

Chất rắn màu trắng, 484 mg, hiệu suất 91%. T_{nc}: 213-215 °C. IR (cm⁻¹): 3420 (NH), 3041, 1682 (C=O). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12,4 (s, 1H); 7,94 (s, 1H); 7,77 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 7,72 (dd, J = 2,5, 1,5 Hz, 1H); 7,64 (s, 2H); 7,44 (t, J = 8,0 Hz, 1H); 7,13 (dd, J = 8,0, 2,5 Hz, 1H); 3,85 (s, 3H); 2,45 (s, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 162,1; 159,3; 151,3; 146,8; 136,3; 135,9; 134,0; 129,7; 127,4; 125,2; 120,7; 120,0; 117,4; 112,4; 55,3; 20,8. MS (ESI): m/z 267 (M+H)⁺

6-Methyl-2-(2-(trifluoromethyl)phenyl)quinazolin-4(3H)-on (5b)

Chất rắn màu trắng, 304 mg, hiệu suất 50%. T_{nc}: 195-196 °C. IR (cm⁻¹): 3414 (NH), 3069, 1664 (C=O). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12,6 (s, 1H); 7,97 (s, 1H); 7,89 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 7,80 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 7,79-7,74 (m, 2H); 7,66 (dd, J = 8,5, 1,5 Hz, 1H); 7,57 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 2,46 (s, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 161,2; 151,4; 146,3; 136,8; 135,8; 133,1; 132,3; 130,7; 130,4; 127,3; 127,0 (J_{C-F} = 30,7 Hz); 126,4 (J_{C-F} = 4,7 Hz); 125,1; 123,7 (J_{C-F} = 272,1 Hz); 120,9; 20,8. MS (ESI): m/z 305 (M+H)⁺.

6-Methyl-2-(3-(trifluoromethyl)phenyl)quinazolin-4(3H)-on (5c):

Chất rắn màu trắng, 498 mg, hiệu suất 82%. T_{nc}: 297-299 °C. IR (cm⁻¹): 3414 (NH), 3069, 1664 (C=O). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12,6 (s, 1H); 8,53 (s, 1H); 8,47 (d, J = 7,5

Hz, 1H); 7,97 (s, 1H); 7,94 (d, J = 7,5 Hz, 1H); 7,79 (t, J = 7,5 Hz, 1H); 7,70-7,67 (m, 2H); 2,47 (s, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 161,0; 150,1; 146,4; 136,8; 135,9; 133,7; 131,6; 129,8; 129,5 (J_{C-F} = 30,7 Hz); 127,6 (J_{C-F} = 4,7 Hz); 127,5; 125,2; 124,3; 123,8 (J_{C-F} = 272,1 Hz); 120,9; 20,8. MS (ESI): m/z 305 (M+H)⁺

6-Methyl-2-(3-(trifluoromethoxy)phenyl)quinazolin-4(3H)-on (5d)

Chất rắn màu vàng nhạt, 499 mg (95%). T_{nc}: 201-202 °C. IR (cm⁻¹): 3420 (NH), 3022, 1676 (C=O). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12,6 (s, 1H); 8,23 (d, J = 7,0 Hz, 1H); 8,16 (s, 1H); 7,96 (s, 1H); 7,71-7,68 (m, 3H); 7,60 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 2,47 (s, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 162,0; 156,1; 149,8; 148,4; 136,7; 135,9; 135,0; 130,7; 127,5; 126,7; 125,2; 123,7; 120,1; 119,8 (J_{C-F} = 256 Hz); 109,5; 20,8. MS (ESI): m/z 321 (M+H)⁺.

6-Methyl-2-(2-(trifluoromethoxy)phenyl)quinazolin-4(3H)-on (5e)

Chất rắn màu vàng nhạt, 499 mg (78%). T_{nc}: 245-246 °C. IR (cm⁻¹): 3420 (NH), 3022, 1676 (C=O). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12,5 (s, 1H); 7,97 (s, 1H); 7,79 (dd, J = 8,0, 1,5 Hz, 1H); 7,70-7,66 (m, 2H); 7,61 (d, J = 8,5 Hz, 1H); 7,56 (dd, J = 7,5, 1,0 Hz, 1H); 7,53 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 2,46 (s, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 161,3; 149,5; 146,6; 145,6; 136,9; 135,8; 132,1; 131,3; 128,2; 127,6; 127,3; 125,2; 121,5; 120,8; 119,9 (J_{C-F} = 256 Hz); 20,8. MS (ESI): m/z 321 (M+H)⁺

2-(2-(Dimethylamino)phenyl)-6-methylquinazolin-4(3H)-on (5f)

Chất rắn màu trắng, 428 mg, hiệu suất 77%. T_{nc}: 204-206 °C. IR (cm⁻¹): 3414 (NH), 3069, 1664 (C=O). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 12,7 (s, 1H); 7,94 (s, 1H); 7,83 (dd, J = 8,0; 1,5 Hz, 1H); 7,65-7,61 (m, 2H); 7,47 (td, J = 7,5; 1,0 Hz, 1H); 7,25 (d, J = 8,0 Hz, 1H); 7,13 (td, J = 7,5, 1,0 Hz, 1H); 2,66 (s, 3H); 2,40 (s, 3H). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 161,1; 152,8; 151,8; 147,2; 136,2; 135,6; 131,6; 130,5; 127,3; 125,2; 122,1; 120,8; 119,1; 43,6; 20,8. MS (ESI): m/z 280 (M+H)⁺.

Hoạt tính kháng tế bào ung thư

Các chất tổng hợp được thử độc tính tế bào trên 4 dòng tế bào ung thư: KB, Hep - G2, LU và MCF-7. Kết quả hoạt tính gây độc tế bào của các chất tổng hợp IC₅₀ (μg/mL) trên các dòng tế bào

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

được thể hiện ở bảng 1. Ngoài ra, để có thể sơ bộ tìm hiểu mối liên quan giữa hoạt tính sinh học và tính chất lý hóa của các chất tổng hợp được, các dẫn chất **5 (a-f)** được tính giá trị logP bằng phần mềm KOWWIN, kết quả được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1: Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào và giá trị logP của các chất **5 (a-f)**

Hợp chất	R	Giá trị IC ₅₀ (µg/mL)				LogP
		KB	Hep-G2	LU	MCF-7	
5a	3'-OMe	>128	kt	kt	kt	3,90
5b	2'-CF ₃	4,48	5,81	62	74	4,79
5c	3'-CF ₃	>128	kt	kt	kt	4,79
5d	3'-OCF ₃	>128	kt	kt	kt	4,87
5e	2'-OCF ₃	1,18	1,36	2	25,33	4,87
5f	2-N(CH ₃) ₂	0,84	5,27	8	>128	4,03
Ellipticin		0,31	0,35	0,45	0,53	

Ghi chú: kt. không thử

Bàn luận

Các chất mẫu tiêu **5 (a-f)** được tổng hợp từ hai chất ban đầu là 2-amino-5-methyl-benzamid (**3**) và các dẫn chất benzaldehyd tương ứng **4 (a-f)**. Dẫn chất benzamid **2** được điều chế từ acid 5-cloro-2-nitro-benzoic (**1**) với hiệu suất cao (82%) qua hai giai đoạn: hoạt hóa nhóm acid với thionyl clorid tạo dẫn chất acyl clorid, rồi phản ứng với dung dịch NH₄OH. Tiếp theo, phản ứng hydro hóa nhóm -NO₂ với xúc tác 10% Pd/C thu được sản phẩm 2-amino-5-methyl-benzamid **3** với hiệu suất cao (94%)^[7].

Tiếp đó, các dẫn chất 2-aryl-4-quinazolinon (**5**) được tổng hợp theo cơ chế ngưng tụ/dehydro hóa giữa hợp chất 2-amino-5-methyl-benzamid (**3**) và các dẫn chất benzaldehyd (**4 a-f**) ở 150°C trong môi trường N, N-dimethylacetamid với hiệu suất 50-95%. Sản phẩm kết tinh trong nước, sau đó được rửa nhiều lần với EtOH^[7]. Phương pháp tổng hợp này có nhiều ưu điểm vì nguyên liệu và các hợp chất aldehyd thơm ban đầu sẵn có, đa dạng; phản ứng tiến hành dễ dàng, hiệu suất cao; sản phẩm thu được là các chất kết tinh trong nước, dễ tinh chế. Cấu trúc của các dẫn chất **5 (a-f)** được khẳng định bằng các phương pháp phổ IR, NMR và MS.

Tiếp đó, các dẫn chất 2-aryl-4-quinazolinon (**5**) được tổng hợp theo cơ chế ngưng tụ/dehydro hóa giữa hợp chất 2-amino-5-methyl-benzamid (**3**) và các dẫn chất benzaldehyd (**4 a-f**) ở 150°C trong môi trường N, N-dimethylacetamid với hiệu suất 50-95%. Sản phẩm kết tinh trong nước, sau

đó được rửa nhiều lần với EtOH^[7]. Phương pháp tổng hợp này có nhiều ưu điểm vì nguyên liệu và các hợp chất aldehyd thơm ban đầu sẵn có, đa dạng; phản ứng tiến hành dễ dàng, hiệu suất cao; sản phẩm thu được là các chất kết tinh trong nước, dễ tinh chế. Cấu trúc của các dẫn chất **5 (a-f)** được khẳng định bằng các phương pháp phổ IR, NMR và MS.

Trước tiên các hợp chất tổng hợp được thử tác dụng độc tính tế bào trên dòng tế bào ung thư biểu mô KB. Kết quả cho thấy các hợp chất **5b**, **5e** và **5f** có hoạt tính ức chế tế bào ung thư, với giá trị IC₅₀ trong khoảng 0,84-4,48 µg/mL trong đó khi các hợp chất **5a**, **5c** và **5d** không thể hoạt tính ức chế tế bào ung thư. Chất **5f** với nhóm thế -N(CH₃)₂ có hoạt tính mạnh nhất với nồng độ 0,84 µg/mL, gần với chất chuẩn ellipticin. So sánh hoạt tính của các hợp chất **5c** và **5d** với cùng nhóm thế CF₃, **5e** và **5f** với cùng nhóm thế OCF₃ cho thấy các nhóm thế ở vị trí 2' trên vòng phenyl mang lại hoạt tính tốt hơn cho các dẫn chất tổng hợp so với nhóm thế ở vị trí 3'. Ngoài ra, chất **5a** mang nhóm thế methoxy ở vị trí 3' cũng không có hoạt tính ức chế tế bào ung thư, còn chất **5f** với nhóm thế dimethylamin ở vị trí 2' ức chế khá mạnh các dòng tế bào thử nghiệm.

Các hợp chất **5b**, **5e** và **5f** được tiếp tục thử hoạt tính trên các dòng tế bào gan Hep-G2, phổi LU và ung thư vú MCF-7. Hai chất **5b** và **5e** đều có hoạt tính với 3 dòng tế bào nêu trên với IC₅₀ lần lượt là 5,81, 62, 74 µg/mL và 1,36; 2; 25,33 µg/mL tương ứng. Chất **5f** chỉ có tác dụng trên 2 dòng tế bào Hep-G2 và LU với IC₅₀ lần lượt là 5,27 và 8 µg/mL, như vậy hợp chất **5f** có tác dụng độc tế bào khá chọn lọc trên dòng tế bào KB, mạnh hơn so với trên tế bào ung thư gan và phổi tương ứng từ 6-10 lần.

Để có thể sơ bộ tìm hiểu mối liên quan giữa hoạt tính sinh học và đặc tính dầu-nước của các chất tổng hợp được (logP), các chất **5 (a-f)** được tính giá trị logP dựa trên phần mềm KOWWIN. Các giá trị tính toán thu được là 3,90 - 4,87, thỏa mãn quy tắc 5 của Lipinsky trong thiết kế thuốc. Như vậy các chất tổng hợp được đều có khả năng là phân tử thuốc. Tuy nhiên chưa thấy có mối liên quan rõ ràng giữa độc tính tế bào và giá trị logP của các hợp chất này.

Kết luận

Đã thiết kế và tổng hợp được 6 dẫn chất 2-aryl-6-methyl-4-quinazolinon (**5 a-f**), các chất

● Nghiên cứu - Kỹ thuật

này đều chưa thấy công bố trong các tài liệu tham khảo được.

Đã thử hoạt tính gây độc tế bào của các chất tổng hợp được trên 4 dòng tế bào ung thư người là tế bào ung thư biểu mô KB, tế bào ung thư gan Hep-G2, tế bào ung thư phổi LU, tế bào ung thư vú MCF-7. Các nhóm thế trên vòng phenyl ở vị trí 2' là thuận lợi cho hoạt tính kháng tế bào ung thư. Hai chất **5b**, **5e** có hoạt tính ức chế 4 dòng tế bào thử nghiệm, còn chất **5f** có hoạt tính ức chế 3 dòng tế bào (KB, Hep-G2, LU).

Tài liệu tham khảo

1. Ardano C., Menedez J. C. (2008). *Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs*, Elsevier.
2. Cho, W. J., Yoo, S. J.; Park, M. J.; Chung, B. H., Lee, C. O. (1997), "Synthesis and antitumor activity of 3-arylisquinoline derivatives", *Arch. Pharm. Res.*, 20: 264-266.
3. Khadka D. B., Cho W. J. (2011), "3-Arylisquinolines as novel topoisomerase I inhibitors", *Bioorg. Med. Chem.*, 19, 724-734.

4. Yang S. H., Van T. M. H, Le N. T. *et al.* (2010), "Development of 3-aryl-1-isoquinolinamines as potent antitumor agents based on CoMFA", *Eur. J. Med. Chem.*, 45: 5493-5497.

5. Yang S. H., Van T. M. H, Le N. T. *et al.* (2010), "Synthesis, *in vitro* and *in vivo* evaluation of 3-arylisquinolinamines as potent antitumor agents" *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 20: 5277-5281

6. Le N. T., Yang S. H., Khadka D. B. *et al.* (2011), "Design and synthesis of 4-amino-2-phenylquinazolines as novel topoisomerase I inhibitors with molecular modeling", *Bioorg. Med. Chem.*, 19: 4399-4404.

7. Hour M. J., Huang L. J., Kuo S. C. *et al.* (2000), "6-Alkylamino- and 2,3-dihydro-3'-methoxy-2-phenyl-4-quinazolinones and related compound. their synthesis, cytotoxicity, and inhibition of tubulin polymerization", *J. Med. Chem.*, 43, 4479-4487.

8. Scudiero, D. A., Shoemaker R. H., Kenneth D. P. *et al.* (1988), "Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines", *Cancer Res.*, 48, 4822-4833.

(Ngày nhận bài: 15/08/2015 - Ngày duyệt đăng: 01/10/2015)

Phân loại hình thái ... (Tiếp theo trang 38)

6. Chen Shu-kun (1995), "A classificatory system and geographical distribution of the Genus *Gynostemma* Bl. (Cucurbitaceae)", *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 33(4), 403-410.

7. Chen Xiuxiang, Qin Dehai (1988), "A new species of the Genus *Gynostemma* from Guangxi", *Acta Botanica Yunnanica*, 10(4), 495 - 496.

8. Ganepain F. (1921), *Cucurbitacées*. In: Lecomte M. H. (ed), *Flore Générale de l'Indochine*. Vol. 2, 1079-1082. Paris: Mason et C^o, Éditeurs.

9. Guangxi Institute of Botany Academia Guangxiana (1991), *Flora of Guangxi*, Vol. 1. Spermatophyta: 716-717.

10. He Shun-zhi (1996), "A new species of *Gynostemma* Bl. (Cucurbitaceae) from Guizhou, China", *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 34(2), 207-209.

11. Institutum Botanicum Academiae Sinicae (1975), "Iconographia Cormophytorum Sinicorum", *Tomus* 4, 349. Science Press. Beijing, China.

12. Li Yongkang (1989), *Flora Guizhouensis*, Vol. 7, 647 - 650. Sichuan Ethnic Publishing House, Chengdu Sichuan, China.

13. M. Keraudren-Aymonin (1975), "Flora

du Cambodge du Laos et du Vietnam", Vol 15, Cucurbitacées. 24 - 28. Laboratoire de Phanérogamie Muséum, National d' Histoire Naturelle Paris.

14. Trime H. (1893 - 1898), *A hand-book to the flora of Ceylon*, Atlas

15. W. J. J. O de Wilde & B. E. E. Duyfjes (2005), *Flora of Thailand*, Vol. 9(4), Cucurbitaceae, 447 - 454.

16. W. J. J. O. de Wilde & B. E. E. Duyfjes (2007), *Gynostemma* (Cucurbitaceae) in Thailand and Malasia. *Blumea*, Vol. 52, No. 2, 263 - 260

17. Wang Zhenping (1989), Four new species of *Gynostemma* and *Carex*, *Acta Botanica Yunnanica*, 11(2), 165 - 170.

18. Wu Cheng-Yih, Chen Shu-Kun (1983), "A study on the genus *Gynostemma* Bl. (Cucurbitaceae) from China", *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 21, 355-369.

19. Zheng Cha-zong (1986), *Flora of Zhejiang*, Vol 6. Scrophulariaceae through Compositae. Zhejiang Science and Technology Publishing House, Hangzhou, Zhejiang, China.

20. Zhang Zhi (1991), "A new species of *Gynostemma* from Anhui", *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 29(4), 370-371.

(Ngày nhận bài: 07/08/2015 - Ngày duyệt đăng: 01/10/2015)