TỔNG HỢP VÀ KHẢO SÁT HOẠT TÍNH KHÁNG TỤ CẦU VÀNG CỦA CÁC DẪN CHẤT 2-PYRAZOLIN VÀ 2-ISOXAZOLIN

Trần Ngọc Châu[1], Phùng Bích Tuyền[1], Phan Cảnh Trình[1], Phạm Ngọc Thạch[1]

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: *Staphylococcus aureus được WHO xếp vào danh sách 12 vi khuẩn kháng kháng sinh được xem là mối đe dọa lớn cho sức khỏe con người. Việc nghiên cứu các hoạt chất mới kháng các chủng tụ cầu vàng này là điều cấp thiết.*

Mục tiêu: *Tổng hợp các dẫn chất 2-pyrazolin, 2-isoxazolin và khảo sát tác động kháng tụ cầu vàng.*

Đối tượng và phương pháp: *Các dẫn chất mục tiêu được tổng hợp qua 2 giai đoạn phản ứng. Sản phẩm tổng hợp được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ IR, MS và NMR. Độ tinh khiết được kiểm tra bằng sắc ký lớp mỏng và phổ NMR. Các dẫn chất được thử hoạt tính trên hai chủng MSSA (ATCC 29213) và MRSA (ATCC 43300) bằng phương pháp khuếch tán trong thạch.*

Kết quả: *5 dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e) và 5 dẫn chất 2-isoxazolin (3a-3e) được tổng hợp thành công. Cấu trúc của các dẫn chất được xác định bằng các phương pháp phổ đúng như dự đoán. Trong số đó có 1 chất mới (**3d**) chưa được công bố. Các dẫn chất 2-isoxazolin có tác động ức chế khá tốt đối với chủng MSSA với MIC khoảng 32 µg/mL. Nhóm -OMe trên cấu trúc các dẫn chất 2-isoxazolin có ảnh hưởng tốt lên hoạt tính.*

Kết luận: *Sự thay đổi cấu trúc từ dị vòng 2-pyrazolin qua 2-isoxazolin cải thiện hoạt tính kháng tụ cầu vàng. Nhóm 2-isoxazolin được xác định là cấu trúc tiềm năng để phát triển các hoạt chất kháng khuẩn mới.*

Từ khóa: *2-pyrazolin, 2-isoxazolin, kháng khuẩn, tụ cầu vàng, S. aureus*

ABSTRACT

SYNTHESIS AND ANTI-STAPHYLOCOCCUS AUREUS ACTIVITY OF 2-PYRAZOLINE AND 2-ISOXAZOLINE DERIVATIVES

Tran Ngoc Chau, Phung Bich Tuyen, Phan Canh Trinh, Pham Ngoc Thach

* Ho Chi Minh City Journal of Medicine * Vol. 25 - No. 2 - 2021: 48 - 55

Background: *Staphylococcus aureus is listed by WHO as one of the 12 antibiotic-resistant bacteria which are considered as major threat to human health. Research on novel active substances against these bacterial strains is critical.*

Objectives: *Synthesis and antibacterial effect evaluation of 2-pyrazoline, 2-isoxazoline derivatives*

Methods: *These derivatives were synthesized via 2 steps. Structure of synthetic compound were charaterized by IR, MS and NMR spectroscopy. Purity was checked by thin layer chromatography and NMR. Anti-Staphylococcus aureus activities were tested on two strains MSSA (ATCC 29213) and MRSA (ATCC 43300) by agar diffusion method.*

Results: *Ten substances were successfully synthesized: 2-pyrazoline derivatives (2a-2e) and 2-isoxazoline derivatives (3a-3e). Structure of these derivatives were confirmed by IR, MS and NMR. Among them, novel compound 3d has not been published in literature. 2-Isoxazoline derivatives showed a potential inhibitory effect against MSSA (MIC = 32 µg/mL). Substitution of methoxy group on benzen ring of 2-isoxazoline derivatives has a positive effect on the activity.*

Conclusions: *Replacement of 2-pyrazoline by 2-isoxazoline improves anti-staphylococcal activity. 2-Isoxazoline*

[1]Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh
Tác giả liên lạc: TS. Trần Ngọc Châu *ĐT*: 0938776635 *Email*: tranchau@ump.edu.vn

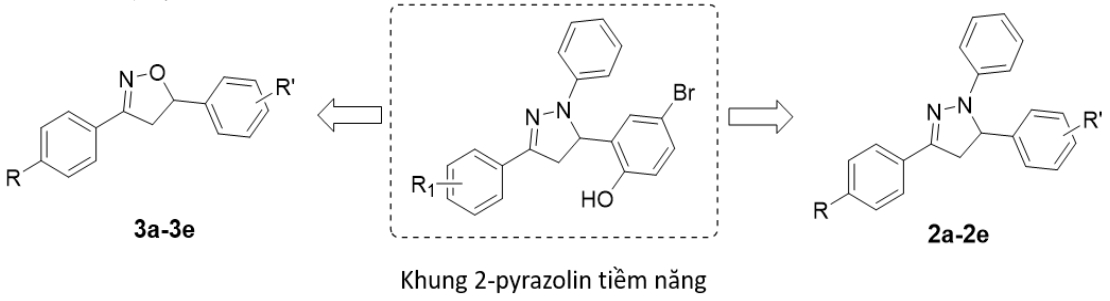
scaffold is potential to develop novel antibacterial agents.

Keywords: *2-isoxazoline, 2-pyrazoline, antibacterial, Staphylococcus aureus*

ĐẶT VẤN ĐỀ

Bên cạnh một số lợi khuẩn được ứng dụng trong cuộc sống, vi khuẩn phần lớn được xem là có hại vì gây ra sự nhiễm trùng dẫn đến bệnh tật và một số trường hợp nặng có thể gây tử vong. Sự khám phá ra thuốc kháng sinh đã giúp con người đẩy lùi được những trường hợp bệnh nhiễm do vi khuẩn. Tuy nhiên, đặc tính chọn lọc tự nhiên của vi khuẩn cùng với việc sử dụng kháng sinh không hợp lý đã dẫn đến sự xuất hiện các chủng vi khuẩn đề kháng làm thuốc kháng sinh giảm hay mất tác dụng. Hiện tượng trên ngày càng gia tăng đến mức báo động trên toàn thế giới. Gần đây, WHO đã đưa ra danh sách 12 chủng vi khuẩn kháng thuốc nổi bật mà thế giới nên tập trung nghiên cứu phát triển các loại kháng sinh mới để đối phó. Một trong những vi khuẩn trong danh sách trên là *Staphylococcus aureus*, còn được biết đến dưới tên tụ cầu vàng vì những đặc điểm hình thái đặc trưng[1]. Trong điều kiện sẵn có hiện nay của nhóm nghiên cứu, chúng tôi quan tâm đến chủng vi khuẩn trên.

Trong số các cấu trúc dị vòng, 2-pyrazolin được quan tâm vì xuất hiện trong một số hoạt chất như antipyrin, famprofazon, methampyron, sulfinpyrazon. Năm 2018, nhóm nghiên cứu tại khoa Dược - Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh đã tổng hợp các dẫn chất 2-pyrazolin và cho thấy tiềm năng kháng khuẩn của nhóm dẫn chất này[2]. Dựa trên cơ sở đó, đề tài được thực hiện nhằm tổng hợp và khảo sát hoạt tính kháng *S. aureus* của các dẫn chất 2-pyrazolin với sự thay đổi các nhóm thế trên khung cấu trúc này. Ngoài ra dẫn chất dị vòng tương đồng 2-isoxazolin với hoạt tính sinh học tiềm năng cũng được quan tâm.



Hình 1. *Hướng thiết kế của các dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e) và 2-isoxazolin (3a-3e)*

Mục tiêu của đề tài là tổng hợp 2 nhóm dẫn chất mang khung cấu trúc 2-pyrazolin và 2-isoxazolin (*Hình 1*) và khảo sát hoạt tính kháng tụ cầu vàng của các dẫn chất này. Dựa trên các kết quả thu được, đề tài nhằm mục đích tìm ra sự liên quan của các dị vòng nêu trên và vai trò của các nhóm thế với hoạt tính ức chế sự phát triển của tụ cầu vàng.

ĐỐI TƯỢNG - PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đối tượng và nguyên liệu

Các dẫn chất dị vòng 2-pyrazolin và 2-isoxazolin.

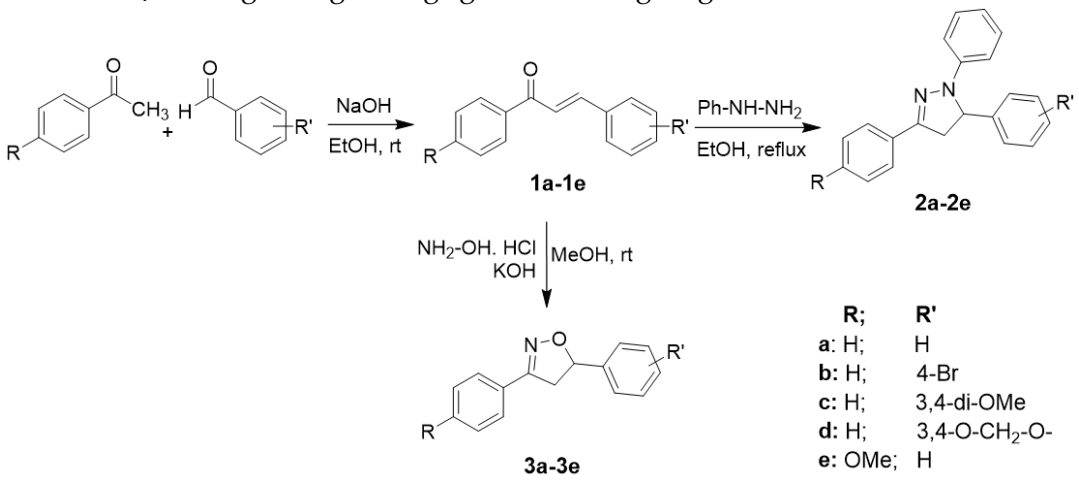
Tất cả nguyên liệu và dung môi dùng trong tổng hợp đạt mức độ tinh khiết dùng trong tổng hợp hóa học được mua từ các công ty Acros Organics (Bỉ), Merck (Đức), ChemSol (Việt Nam), Guangdong Guanghua Sci-Tech Co Ltd. (Trung Quốc), Amsal Chem Pvt Ltd. (Ấn Độ) và được sử dụng trực tiếp.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tổng hợp các dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e) và 2-isoxazolin (3a-3e)

Các dẫn chất được tổng hợp qua 2 giai đoạn (*Hình 2*). Trong giai đoạn đầu, các dẫn chất chalcon trung gian (1a-1e) được tổng

hợp từ các dẫn chất benzaldehyd và acetophenon thương mại bằng phản ứng ngưng tụ Claisen-Schmidt. Sau đó các dẫn chất chalcon được đóng vòng trong giai đoạn 2 với các tác nhân phenylhydrazin hoặc hydroxylamin để tạo thành các dị vòng 2-pyrazolin (2a-2e) hoặc 2-isoxazolin (3a-3e) tương ứng.



Hình 2. *Tóm tắt quá trình tổng hợp hóa học*

Giai đoạn 1: Tổng hợp chất trung gian chalcon (1a-1e)

Dẫn chất benzaldehyd và acetophenon tương ứng được hòa tan vào lượng ethanol (EtOH) vừa đủ (khoảng 30-50 ml cho 0,01 mol acetophenon). Tỉ lệ mol acetophenon và benzaldehyd là 1:1,1 (benzaldehyd phải dư so với acetophenon để tránh phản ứng phụ ngưng tụ giữa các acetophenon xảy ra sinh ra tạp không mong muốn). Đặt becher phản ứng lên máy khuấy từ. Khi các nguyên liệu đã tan hoàn toàn thì cho từ từ dung dịch NaOH 50% (EtOH) vào đến pH 10. Hỗn hợp phản ứng được khuấy ở nhiệt độ phòng. Kết tủa xuất hiện. Phản ứng được theo dõi bằng sắc kí lớp mỏng (SKLM) với hệ dung môi cyclohexan - ethyl acetat (EtOAc) (tỉ lệ 7:3). Sau khi kết thúc phản ứng, lọc lấy tủa. Tủa thô được tinh chế lại bằng phương pháp kết tinh trong EtOH hoặc MeOH thu được các chalcon tương ứng (1a-1e).

Giai đoạn 2: Đóng vòng các chalcon

Tổng hợp các dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e)

Hòa tan chalcon (2 mmol) và phenylhydrazin (4 mmol) vào EtOH. Khuấy và đun hồi lưu ở nhiệt độ khoảng 70 ^{o}C. Theo dõi phản ứng bằng sắc kí lớp mỏng. Khi phản ứng kết thúc, lấy dịch phản ứng ra để nguội và làm lạnh trong thau nước đá, tủa từ từ xuất hiện. Lọc lấy tủa, rửa tủa nhiều lần với EtOH lạnh và nước cất để loại bỏ phenylhydrazin còn dư. Sản phẩm thu được có dạng rắn màu vàng nhạt. Tinh chế sản phẩm thô bằng phương pháp kết tinh lại trong EtOH thu được các dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e).

Tổng hợp các dẫn chất 2-isoxazolin (3a-3e)

Đề tài lựa chọn con đường tổng hợp 2-isoxazolin dựa trên phản ứng đóng vòng của chalcon với hydroxylamin hydroclorid trong MeOH ở nhiệt độ phòng với xúc tác là dung dịch kali hydroxyd (KOH) 50%. Hòa tan chalcon (1 mmol) và hydroxylamin hydroclorid (7 mmol) trong MeOH và đặt lên máy khuấy từ ở nhiệt độ phòng. Thêm từ từ dung dịch KOH 50% trong MeOH đến khi pH đạt đến khoảng kiềm (pH 12). Theo dõi phản ứng bằng sắc kí lớp mỏng. Hỗn hợp sau khi kết thúc phản ứng gồm dịch và chất rắn màu trắng (sản phẩm phụ KCl). Lọc loại bỏ muối. Thêm lượng nước cất vào dịch lọc cho đến khi dịch thoáng đục (lượng nước thường bằng lượng dịch). Làm lạnh hỗn hợp trong thau nước đá để sản phẩm kết tinh từ từ. Lọc lấy tinh thể, rửa với nước để loại sạch tạp thu được các dẫn chất 2-isoxazolin (3a-3e).

Phương pháp xác định cấu trúc và độ tinh khiết

Các sản phẩm tổng hợp cuối cùng (2a-2e, 3a-3e) được kiểm tra độ tinh khiết bằng SKLM trên bản mỏng silica gel 60 GF_{254} (Merck 60F 254, Darmstadt, Đức) được quan sát dưới đèn UV bước sóng 254 nm kết hợp với phổ ^{1}H-NMR. Nhiệt độ nóng chảy được xác định trên máy Stuart SMP10 (Cole Palmer, Anh) với nhiệt kế không hiệu chỉnh. Cấu trúc sản phẩm được xác định bằng các phương pháp phổ. Phổ hồng ngoại (IR) được đo bằng phương pháp ATR trên máy IRAffinity-1S (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Nhật). Phổ khối (MS) được xác định trên máy Thermo Scientific™ MSQ Plus™ (Thermo Fisher, Mỹ) hoặc Shimadzu LCMS (Shimadzu Scientific Instruments, Kyoto, Nhật) bằng phương pháp ion hóa ESI. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton (^{1}H-NMR) được đo trên máy Bruker Avance 500 MHz (Bruker Corporation, Billerica, MA, USA). Phổ ^{13}C-NMR được đo trên cùng máy nhưng ở tần số 125 MHz. Các từ viết tắt được sử dụng trong biện giải phổ ^{1}H-NMR: singlet (s), doublet (d), triplet (t), doublet of doublets (dd), multiplet (m).

Phương pháp xác định hoạt tính kháng tụ cầu vàng

Hoạt tính kháng khuẩn của các dẫn chất 2a-2e và 3a-3e được khảo sát trên 2 chủng tụ cầu vàng gây bệnh là *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 (Methicillin-susceptible *S. aureus*, MSSA) và *Staphylococcus aureus* ATCC 43300 (Methicillin-resistant *S. aureus*, MRSA). Các vi khuẩn được nuôi cấy trên môi trường thạch Mueller Hilton (MHA). Quá trình khảo sát hoạt tính được tiến hành qua 2 bước. Trước hết, hoạt tính sơ bộ được khảo sát thông qua việc đánh giá đường kính vòng kháng khuẩn của các chất thử nghiệm (nồng độ 1024 µg/ml) bằng phương pháp khuếch tán trong giếng đục sẵn có đường kính (Ø) 8 mm trên bản thạch. Ở giai đoạn 2, các chất có đường kính vòng kháng khuẩn (≥ 9 mm) được tiến hành xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) bằng phương pháp vi pha loãng trong thạch. Giai mẫu được pha từ 1024 - 2 µg/ml. Trong các khảo sát này, DMSO được dùng như mẫu chứng âm và vancomycin được dùng như mẫu chứng dương.

KẾT QUẢ

Kết quả phần tổng hợp hóa học

Giai đoạn 1: Tổng hợp các dẫn chất trung gian chalcon (1a-1e)

Chất 1a

1-phenyl-3-phenylprop-2-en-1-on: hiệu suất 80%; cảm quan: tinh thể màu vàng; nhiệt độ nóng chảy: 55-56 ^{o}C; SKLM R_f = 0,61 (cyclohexan - ethyl acetat, 7:3); IR (ν cm^{-1}): 1660,7 (C=O); 1602,9 và 1573,9 (C=C); CTPT: $C_{15}H_{12}O$; P.t.l: 208,26.

Chất 1b

3-(4-bromophenyl)-1-phenylprop-2-en-1-on: hiệu suất 75%; cảm quan: tinh thể màu vàng; nhiệt độ nóng chảy: 123-125 ^{o}C; SKLM R_f = 0,70 (cyclohexan - ethyl acetat, 8:2); IR (ν cm^{-1}): 1656,8 (C=O); 1606,7 và 1579,7 (C=C); CTPT: $C_{15}H_{11}BrO$; P.t.l: 287,16.

Chất 1c

3-(3,4-dimethoxyphenyl)-1-phenylprop-2-en-1-on: hiệu suất 85%; cảm quan: tinh thể màu vàng đậm; nhiệt độ nóng chảy: 91-92 ^{o}C; SKLM R_f = 0,60 (cyclohexan - ethyl acetat, 7:3); IR (ν cm^{-1}): 1651,1 (C=O); 1566,2 (C=C); CTPT: $C_{17}H_{16}O_3$; P.t.l: 268,31.

Chất 1d

3-(benzo[1,3]dioxol-5-yl)-1-phenylprop-2-en-1-on: hiệu suất 75%; cảm quan: tinh thể hình kim, màu vàng nhạt; nhiệt độ nóng chảy: 119-121 ^{o}C; SKLM R_f = 0,60 (*n*-hexan -aceton, 8:2); IR (ν cm^{-1}): 1658,8 (C=O); 1604,8 và 1573,9 (C=C); CTPT: $C_{16}H_{12}O_3$; P.t.l: 252,27.

Chất 1e

1-(4-methoxyphenyl)-3-phenylprop-2-en-1-on; hiệu suất 60%; cảm quan: tinh thể hình kim, màu vàng nhạt; nhiệt độ nóng chảy: 106-107 ^{o}C; SKLM R_f = 0,70 (cyclohexan - ethyl acetat, 8:2); IR (ν cm^{-1}): 1653,0 (C=O); 1597,1 và 1570,1 (C=C); CTPT: $C_{16}H_{14}O_2$; P.t.l: 238,29.

Giai đoạn 2: Đóng vòng để tạo thành các dẫn chất 2-pyrazolin và 2-isoxazolin

Kết quả tổng hợp các dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e)

Chất 2a

Tên IUPAC: 1,3,5-triphenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol. Hiệu suất 25%; cảm quan: tinh thể hình kim ngắn màu vàng nhạt; nhiệt độ nóng chảy: 134-136 ^oC; SKLM: R_f = 0,80 (cyclohexan - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,90 (toluen - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,80 (*n*-hexan - aceton, 7:3); IR (ν cm^{-1}): 1595,1 (C=N); CTPT: $C_{21}H_{18}N_2$; P.t.l: 298,39; MS (ESI) *m/z* $[M+H]^+$ dự kiến 299,1470 ; tìm thấy 299,1545; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7,73-7,71 (m, 2H, H-Ar); 7,39-7,35 (m, 2H, H-Ar); 7,33-7,31 (m, 6H, H-Ar,); 7,17 (dd, *J* = 9,0; 7,3 Hz, 2H, H-Ar); 7,08-7,06 (m, 2H, H-Ar); 6,79-6,75 (m, 1H, H-Ar); 5,27 (dd, *J* = 12,5; 7,2 Hz, 1H, CH-pyrazolin); 3,84 (dd, *J* = 17,0; 12,5 Hz, 1H, CH_2-pyrazolin); 3,14 (dd, *J* = 17,0; 7,2 Hz, 1H, CH_2-pyrazolin).

Chất 2b

Tên IUPAC: 5-(4-bromophenyl)-1,3-diphenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol. Hiệu suất 22%; cảm quan: tinh thể hình kim, màu vàng ánh xanh lá; nhiệt độ nóng chảy: 145-146 ^oC; SKLM: R_f = 0,80 (cyclohexan - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,90 (toluen - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,80 (*n*-hexan - aceton, 7:3); IR (ν cm^{-1}): 1595,1 (C=N); CTPT: $C_{21}H_{17}BrN_2$; P.t.l: 377,29; MS (ESI): *m/z* $[M(^{79}Br)+H]^+$ dự kiến 377,0648, tìm thấy 377,0614 ; $[M(^{81}Br)+H]^+$ dự kiến 379,0627, tìm thấy 379,0609 ; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ (ppm) 7,72-7,70 (m, 2H, H-Ar); 7,47-7,31 (m, 6H, H-Ar); 7,21-7,14 (m, 3H, H-Ar); 7,04-7,02 (m, 2H, H-Ar); 6,82-6,78 (m, 1H, H-Ar); 5,24 (dd, *J* = 12,2; 7,0 Hz, 1H, CH-pyrazolin); 3,84 (dd, *J* = 17,0; 12,2 Hz, 1H, CH_2-pyrazolin); 3,11 (dd, *J* = 17,0; 7,0 Hz, 1H, CH_2-pyrazolin).

Chất 2c

Tên IUPAC: 5-(3,4-dimethoxyphenyl)-1,3-diphenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol. Hiệu suất 20%; cảm quan: tinh thể hình kim màu vàng; nhiệt độ nóng chảy: 134-136 ^oC; SKLM: R_f = 0,50 (cyclohexan - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,80 (toluen - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,50 (*n*-hexan - aceton, 7:3); IR (ν cm^{-1}): 1591,3 (C=N); CTPT: $C_{23}H_{22}N_2O_2$; P.t.l: 358,44; MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ dự kiến 359,17; tìm thấy 359,35 ; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ(ppm) 7,73-7,71 (m, 2H, H-Ar); 7,39-7,36 (m, 2H, H-Ar); 7,37-7,30 (m, 1H, H-Ar); 7,19-7,16 (m, 2H, H-Ar); 7,09 (dd, *J* = 8,5; 1,2 Hz, 2H, H-Ar); 6,88 (dd, *J* = 8,5; 1,2 Hz, 1H, H-Ar); 6,82-6,73 (m, 3H, H-Ar); 5,18 (dd, *J* = 12,5; 7,5 Hz, 1H, CH-pyrazolin); 3,88-3,77 (m, 7H, 1H của CH_2 pyrazolin và 6H của 2xOMe); 3,13 (dd, *J* = 17,0; 7,5 Hz, 1H, CH_2 pyrazolin).

Chất 2d

Tên IUPAC: 5-(benzo[1,3]dioxol-5-yl)-1,3-diphenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol. Hiệu suất 20%; chất rắn màu xanh lá nhạt; nhiệt độ nóng chảy: 140-142 ^oC; SKLM: R_f = 0,70 (cyclohexan - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,80 (toluen - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,70 (*n*-hexan - aceton, 7:3); IR (ν cm^{-1}): 1595,1 (C=N); CTPT: $C_{22}H_{18}N_2O_2$; P.t.l: 342,40; MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ dự kiến 343,1402, tìm thấy 343,1403 ; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ(ppm) 7,72-7,70 (m, 2H, H-Ar); 7,39-7,36 (m, 2H, H-Ar); 7,33-7,31 (m, 1H, H-Ar); 7,20-7,17 (m, 2H, H-Ar); 7,09-7,07 (m, 2H, H-Ar); 6,81-6,74 (m, 4H, H-Ar); 5,97 (s, 2H, -O-CH_2-O-); 5,18 (dd, *J* = 12,2; 7,2 Hz, 1H, CH-pyrazolin); 3,79 (dd, *J* = 17,0; 12,2 Hz, 1H, CH_2-pyrazolin); 3,11 (dd, *J* = 17,0; 7,2 Hz, 1H, CH_2-pyrazolin).

Chất 2e

Tên IUPAC: 3-(4-methoxyphenyl)-1,5-diphenyl-4,5-dihydro-1*H*-pyrazol. Hiệu suất 30%; cảm quan: chất rắn màu vàng; nhiệt độ nóng chảy: 128-130 ^oC; SKLM R_f = 0,80 (cyclohexan - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,90 (toluen - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,80 (*n*-hexan-aceton, 7:3); IR (ν cm^{-1}): 1597,1 (C=N); CTPT: $C_{22}H_{20}N_2O$; P.t.l: 328,42; MS (ESI): *m/z* $[M+H]^+$ dự kiến 329,1609, tìm thấy 329,1604 ; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ(ppm) 7,67-7,64 (m, 2H, H-Ar); 7,33-7,31 (m, 4H, H-Ar); 7,26-7,23 (m, 1H, H-Ar); 7,18-7,14 (m, 2H, H-Ar); 7,05-7,03 (m, 2H, H-Ar); 6,92-6,89 (m, 2H, H-Ar); 6,77-6,74 (m, 1H, H-Ar); 5,21 (dd, *J* = 12,5; 7,5 Hz, 1H, CH pyrazolin); 3,84-3,77 (m, 4H, 1 H

của CH_2-pyrazolin và 3H của -OCH_3); 3,11 (dd, *J* = 17,0; 7,5 Hz, 1H, CH_2-pyrazolin).

Kết quả tổng hợp các dẫn chất 2-isoxazolin (3a-3e)

Chất 3a

Tên IUPAC: 3,5-diphenyl-4,5-dihydroisoxazol. Hiệu suất 18%; cảm quan: chất rắn màu vàng nhạt; nhiệt độ nóng chảy: 72-74 ^oC; SKLM: R_f = 0,80 (cyclohexan - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,80 (toluen - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,70 (n-hexan - aceton, 7:3); IR (ν cm-1): 1593,2 (C=N); CTPT: $C_{15}H_{13}NO$; P.t.l: 223,28; MS (ESI): m/z $[M+H]^+$ dự kiến 224,28, tìm thấy 224,49 ; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,70-7,68 (m, 2H, H-Ar); 7,42-7,35 (m, 7H, H-Ar); 7,33-7,30 (m, 1H, H-Ar); 5,74 (dd, *J* = 11,0; 8,0 Hz, 1H, CH-isoxazolin); 3,78 (dd, *J* = 16,7; 11,0 Hz, 1H, CH_2-isoxazolin); 3,34 (dd, *J* = 16,7; 8,0 Hz, 1H, CH_2-isoxazolin).

Chất 3b

Tên IUPAC: 5-(4-bromophenyl)-3-phenyl-4,5-dihydroisoxazol. Hiệu suất 16%; cảm quan: chất rắn màu vàng; nhiệt độ nóng chảy: 125-126 ^oC; SKLM: R_f = 0,60 (cyclohexan-ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,80 (toluen - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,70 (*n*-hexan - aceton, 7:3); IR (ν cm^{-1}): 1593,2 (C=N); CTPT: $C_{15}H_{12}BrNO$; P.t.l: 302,17; MS (ESI): *m*/*z* $[M(^{79}Br)+H]^+$ dự kiến 302,01, tìm thấy 302,09; $[M(^{81}Br)+H]^+$ dự kiến 304,01; tìm thấy 304,12; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ(ppm) 7,68-7,66 (m, 2H, H-Ar); 7,51-7,48 (m, 2H, H-Ar); 7,42-7,39 (m, 3H, H-Ar); 7,26 (dd, *J* = 8,5; 1,5 Hz, 2H, H-Ar); 5,70 (dd, *J* = 11,0; 8,0 Hz, 1H, CH-isoxazolin); 3,78 (dd, *J* = 16,5; 11,0 Hz, 1H, CH_2-isoxazolin); 3,29 (dd, *J* = 16,5; 8,0 Hz, 1H, CH_2-isoxazolin).

Chất 3c

Tên IUPAC: 5-(3,4-dimethoxyphenyl)-3-phenyl-4,5-dihydroisoxazol. Hiệu suất 18%; cảm quan: chất rắn màu trắng; nhiệt độ nóng chảy: 101-102 ^oC; SKLM: R_f = 0,70 (cyclohexan - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,60 (toluen - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,60 (*n*-hexan-aceton, 7:3); IR (ν cm^{-1}): 1591,3 (C=N); CTPT: $C_{17}H_{17}NO_3$; P.t.l: 283,33; MS (ESI): *m*/*z* $[M+H]^+$ dự kiến 284,33, tìm thấy 284,23; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$): δ(ppm) 7,71-7,69 (m, 2H, H-Ar); 7,43-7,40 (m, 3H, H-Ar); 6,94-6,85 (m, 3H, H-Ar); 5,71 (dd, *J* = 11,0; 8,7 Hz, 1H, CH-isoxazolin); 3,88 (s, 6H, 2 nhóm -OCH_3); 3,74 (dd, *J* = 16,5; 11,0 Hz, 1H, CH_2-isoxazolin); 3,34 (dd, *J* = 16,5; 8,7 Hz, 1H, CH_2-isoxazolin).

Chất 3d

Tên IUPAC: 5-(benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-phenyl-4,5-dihydroisoxazol. Hiệu suất 17%; cảm quan: tinh thể màu trắng; nhiệt độ nóng chảy: 75-77 ^oC; SKLM: R_f = 0,60 (cyclohexan - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,80 (toluen - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,60 (*n*-hexan - aceton, 7:3); IR (ν cm^{-1}): 1591,3 (C=N); CTPT: $C_{16}H_{13}NO_3$; P.t.l: 267,28; MS (ESI): *m*/*z* $[M+H]^+$ dự kiến 268,09; tìm thấy 268,26 ; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm): 7,70-7,66 (m, 2H, H-Ar); 7,42-7,39 (m, 3H, H-Ar); 6,88-6,78 (m, 3H, H-Ar); 5,95 (s, 2H, -O-CH_2-O-); 5,66 (dd, *J* = 11,0; 8,2 Hz, 1H, CH-isoxazolin); 3,72 (dd, *J* = 16,7; 11,0 Hz, 1H, CH_2-isoxazolin); 3,31 (dd, *J* = 16,7; 8,2 Hz, 1H, CH_2-isoxazolin); ^{13}C-NMR (125 MHz, $CDCl_3$) δ(ppm): 156,2; 148,1; 147,6; 134,8; 130,1; 129,5; 128,8, 126,7; 119,7; 108,3; 106,3; 101,9; 82,6; 43,1.

Chất 3e

Tên IUPAC: 3-(4-methoxyphenyl)-5-phenyl-4,5-dihydroisoxazol. Hiệu suất 15%; cảm quan: tinh thể hình kim màu vàng nhạt; nhiệt độ nóng chảy: 101-102 ^oC; SKLM: R_f = 0,50 (cyclohexan - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,80 (toluen - ethyl acetat, 8:2); R_f = 0,70 (*n*-hexan - aceton, 9:1); IR (ν cm^{-1}): 1593,2 (C=N); CTPT: $C_{16}H_{15}NO_2$; P.t.l: 253,30; MS (ESI): *m*/*z* $[M+H]^+$ dự kiến 254,11; tìm thấy 254,45 ; ^{1}H-NMR (500 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm): 7,64-7,61 (m, 2H, H-Ar); 7,40-7,25 (m, 5H, H-Ar); 6,93-6,90 (m, 2H, H-Ar); 5,70 (dd, *J* = 11,0; 8,5 Hz, 1H, CH-isoxazolin); 3,83 (s, 3H, -OCH_3); 3,75 (dd, *J* = 16,5; 11,0 Hz, 1H, CH_2-isoxazolin); 3,31 (dd, *J* = 16,5; 8,5 Hz, 1H, CH_2-isoxazolin).

Kết quả thử hoạt tính kháng S. aureus

Hoạt tính kháng tụ cầu vàng (*S. aureus*) của các dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e) và 2-isoxazolin (3a-3e) được trình bày trong *Bảng 1*.

Bảng 1. *Hoạt tính kháng S. aureus của các dẫn chất và giá trị logP dự đoán*

Kí hiệu chất	AlogP	*S. aureus* (ATCC 29213)		*S. aureus* (ATCC 43300)	
		Ø (mm)	MIC (µg/ml)	Ø (mm)	MIC (µg/ml)
2a	4,80	x	-	x	-
2b	5,44	x	-	x	-
2c	4,95	x	-	x	-
2d	4,21	x	-	x	-
2e	4,85	x	-	x	-
3a	3,09	x	-	x	-
3b	3,95	9	128	x	-
3c	3,36	12	32	9	>1024
3d	2,85	x	-	x	-
3e	3,29	10	>1024	x	-
DMSO	-	x	-	x	-
Vancomycin	-	-	2	-	256

"Ø" là ký hiệu của đường kính vòng kháng khuẩn (mm); "x" là ký hiệu chất không có hoạt tính kháng khuẩn (Ø ≤ 8 mm); "-" ký hiệu là phần này không tiến hành thực nghiệm; AlogP được xác định bằng phần mềm AlogP2.1

Các chất được khảo sát sơ bộ bằng cách đo đường kính vùng ức chế trên bản thạch. Cả 5 dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e) không thấy xuất hiện vòng kháng khuẩn trên 2 chủng vi khuẩn thử nghiệm. Ngược lại, kết quả thử hoạt tính sơ bộ cho thấy một số dẫn chất 2-isoxazolin (3b, 3c và 3e) có tác dụng ức chế sự phát triển của tụ cầu vàng với đường kính vòng kháng khuẩn từ 9-12 mm đối với chủng MSSA. Đặc biệt dẫn chất 3c còn có khả năng ức chế sự phát triển của chủng MRSA với đường kính vòng kháng khuẩn 9 mm.

Hoạt tính kháng tụ cầu vàng của các dẫn chất 3b, 3c và 3e được đánh giá chi tiết hơn bằng thử nghiệm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (Minimum Inhibitory Concentration, MIC). Kết quả cho thấy dẫn chất 3c có hoạt tính ức chế chủng MSSA ở nồng độ từ 32 µg/ml. Dẫn chất 3b cho thấy khả năng ức chế ở nồng độ cao hơn (MIC=128 µg/ml).

BÀN LUẬN

Với định hướng ban đầu là tổng hợp các dẫn chất 2-pyrazolin mới với các nhóm thế khác nhau để khảo sát sự ảnh hưởng của các nhóm thế trên cấu trúc đến hoạt tính kháng tụ cầu vàng. Đề tài đã thành công trong việc tổng hợp 5 dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e). Quy trình tổng hợp qua 2 giai đoạn như đã được mô tả trong tài liệu[2]. Giai đoạn 1 là phản ứng ngưng tụ Claisen-Schmidt được thực hiện ở nhiệt độ phòng. Sản phẩm trung gian là các chalcon (1a-1e) thu được sau thời gian phản ứng khoảng 2 giờ, được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại và cho hiệu suất trung bình khá tốt (60-80%). Các kết quả về nhiệt độ nóng chảy và phổ hồng ngoại cho thấy phù hợp với các dữ liệu đã công bố[3-5]. Giai đoạn kế tiếp là phản ứng đóng vòng tạo dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e). Quá trình phản ứng trong giai đoạn này tuy không cần xúc tác nhưng thời gian phản ứng khá dài (8-10 giờ) và hiệu suất thu được sau tinh chế khá thấp (20-30%). Điều này có thể giải thích do nhiệt độ cao khi đun hồi lưu trong thời gian dài làm xảy ra một số phản ứng phụ. Cấu trúc của các sản phẩm hoàn toàn phù hợp với các dữ liệu đã được công bố[3-5].

Điều khá bất ngờ là 5 dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e) hoàn toàn không có tác dụng kháng tụ cầu vàng. Kết quả trên khi so sánh với cấu trúc trong tài liệu đã công bố[2] cho thấy vị trí của nhóm 2-OH và 5-Br trên vòng benzen (*Hình 1*) là rất quan trọng. Một giả thuyết được đặt ra nhằm giải thích cho sự giảm hoạt tính là do tính chất thân dầu của các dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e). Tính thân dầu cao làm cho khả năng khuếch tán trên thạch kém và làm giảm khả năng đi qua màng của vi khuẩn để có tác động. Quan sát về độ tan thực nghiệm cho thấy các chất dẫn chất (2a-2e) hầu như không tan trong nước, tan một phần trong EtOH, MeOH, tan tốt trong aceton, EtOAc. Kết quả tính toán thông số AlogP[6] cho thấy giá trị trong khoảng 4,21-5,44 nghĩa là tính thân dầu cao. Điều này có thể làm giảm khả năng khuếch tán qua màng tế bào để có tác động lên vi khuẩn.

Nhằm thay đổi cấu trúc để cải thiện tác động, chúng tôi tạo ra 2 sự thay đổi trong

cấu trúc đó là dị vòng 2-pyrazolin được thay bằng 2-isoxazolin và nhóm thế phenyl trên *N* được loại bỏ nhằm làm giảm tính thân dầu. Kết quả tính toán giá trị AlogP (2,85-3,95) cho thấy sự giảm khoảng 1 đơn vị (tức là khoảng 10 lần) tính thân dầu của các dẫn chất 2-isoxazolin (3a-3e) so với các dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e). Phản ứng tổng hợp các dẫn chất (3a-3e) được tiến hành trong điều kiện không gia nhiệt và thời gian kết thúc phản ứng khá ngắn (khoảng 10 phút) Điều này cho thấy sự ảnh hưởng của hiệu ứng hút điện tử của vòng thơm (trong trường hợp phenyl hydrazin) làm cản trở quá trình đóng vòng. Các sản phẩm 3a-3e thu được có độ tinh khiết phù hợp và kết quả phân tích cho thấy 4 dẫn chất 3a, 3b, 3c và 3e hoàn toàn phù hợp với các dữ liệu đã công bố[7,8]. Riêng sản phẩm 3d được xác định là cấu trúc hoàn toàn mới, chưa được công bố trong các tài liệu (theo tra cứu trên SciFinder ngày 15/12/2020).

Kết quả thực nghiệm cho thấy tính tan trong nước của các dẫn chất 3a-3e được cải thiện một phần, điều này giải thích cho hiệu suất thu được khá thấp (16-18%) từ phương pháp kết tinh trong hỗn hợp nước - MeOH. Sự cải thiện về tính tan này dẫn đến sự cải thiện về khả năng khuếch tán trong môi trường MHA kết hợp với tính thân dầu được điều chỉnh làm cho các dẫn chất 2-isoxazolin khuếch tán tốt qua màng tế bào và một số chất đã cho tác động ức chế sự phát triển của MSSA. Dựa trên các kết quả MIC, nhóm thế methoxy trên các vòng thơm của các dẫn chất 2-isoxazolin được xem là có lợi cho khả năng kháng tụ cầu vàng.

KẾT LUẬN

Đề tài đã tổng hợp được 5 dẫn chất 2-pyrazolin (2a-2e) và 5 dẫn chất 2-isoxazolin (3a-3e). Hoạt tính kháng tụ cầu vàng của các dẫn chất 2-isoxazolin tốt hơn 2-pyrazolin có thể liên quan một phần đến sự khác biệt về tính tan trong nước và tính thân dầu giữa 2 nhóm dẫn chất. Ngoài ra, kết quả MIC thu được của một số dẫn chất 2-isoxazolin gợi ý cho sự liên quan của nhóm thế methoxy đến hoạt tính kháng tụ cầu vàng của các dẫn chất này.

Lời cám ơn

Nghiên cứu này được thực hiện dưới sự tài trợ của Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh dành cho đề tài nghiên cứu khoa học cấp cơ sở năm 2020-2021 (theo hợp đồng số 221/2020/HĐ/ĐHYD).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. WHO (2017). Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. URL: https://www.who.int/medicines/publications/global-priority-list-antibiotic-resistant-bacteria/en/ (access on 10/12/2020)
2. Nguyễn Đức Tài, Lê Tuấn Anh, Huỳnh Thị Ngọc Phương (2018).Tổng hợp và thử hoạt tính kháng khuẩn của một số dẫn chất 2-pyrazolin. *Dược Học,* 58(6):30-35,41.
3. Safaei-Ghomi J, Bamoniri AH, Soltanian-Telkabadi M (2006). A modified and convenient method for the preparation of *N*-phenylpyrazoline derivatives. *Chem Heterocycl Compd,* 42:892–896.
4. Palaska E, Erol D, Demirdamar R (1996). Synthesis and antidepressant activities of some 1, 3, 5-triphenyl-2-pyrazolines. *Eur J Med Chem,* 31(1):43-47.
5. Deshpande S, Nagrale S, Patil M, et al (2015). Novel 3, 4-methylenedioxybenzene scaffold incorporated 1, 3, 5-trisubstituted-2-pyrazolines: Synthesis, characterization and evaluation for chemotherapeutic activity. *Indian J Pharm Sci,* 77(1):24.
6. Virtual Computational Chemistry Laboratory. URL: http://www.vcclab.org/lab/alogps (access on 30/11/2020).
7. Mohammed S, Vishwakarma RA, Bharate SB (2015). Metal-free DBU promoted regioselective synthesis of isoxazoles and isoxazolines. *RSC Advances,* 5(5):3470-3473.
8. Han L, Zhang B, Xiang C, et al (2014). One-pot synthesis of isoxazolines from aldehydes catalyzed by iodobenzene. *Synthesis,* 46(04):503-509.

Ngày nhận bài báo: *15/12/2020*
Ngày phản biện nhận xét bài báo: *06/01/2021*
Ngày bài báo được đăng: *20/04/2021*