

Tối ưu hóa tổng hợp với hỗ trợ vi sóng và nghiên cứu docking một số dẫn chất 1,3,5-triazin trong ứng chế DHFR

Phạm Cảnh Em^{1,2}, Lê Thị Tường Vi³, Nguyễn Thị Thanh Vân¹
Lê Thị Bích Ngọc¹, Nguyễn Thị Kim Ngân¹, Trương Ngọc Tuyền^{1*}

¹Khoa Dược - Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

²Khoa Dược - Đại học Quốc tế Hồng Bàng

³Khoa Dược - Bệnh viện Nhi đồng Thành phố

Summary

Replacement of chloride ions in cyanuric chloride give several variants of 1,3,5-triazine derivatives which were investigated as biologically active small molecules. Response surface methodology (RSM) approach was used for optimization of the process parameters and identifying the optimal conditions for microwave-assisted synthesis of 1,3,5-triazine derivatives bearing substituted aniline moiety. The structures were confirmed by IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and MS spectra. Molecular docking studies (in silico) were conducted on compounds to recognize the hypothetical binding motif of the title compounds within the active site of DHFR enzyme.

Keywords: 1,3,5-triazine, anticancer, molecular docking.

Đặt vấn đề

Ức chế dihydrofolat reductase (DHFR) từ lâu đã được xác định là mục tiêu quan trọng để phát triển các tác nhân hóa trị liệu kháng khuẩn, kháng ký sinh trùng cũng như kháng ung thư. Sự ức chế enzym DHFR dẫn đến sự giảm folat nội bào cần thiết cho phản ứng chuyển một carbon, do đó rất quan trọng cho quá trình sinh tổng hợp thymidylat, nucleotid purin, methionin và nhiều hợp chất khác cần thiết cho RNA, DNA và sinh tổng hợp protein. Ngoài ra, enzym này có ái lực liên kết cao và có tính chọn lọc đối với các đồng cơ chất do đó khó bị thay thế bởi chất nền tự nhiên. Chính vì thế, DHFR là mục tiêu lý tưởng cho thiết kế thuốc hợp lý và hiệu quả [1, 2].

Nhân triazin đã thu hút sự chú ý của nhiều nhà nghiên cứu về tiềm năng điều trị cũng như hoạt tính sinh học đa dạng. Ví dụ, các dẫn chất 1,3,5-triazin (s-triazin) có tác dụng kháng độc mạnh, kháng sốt rét, kháng virus, kháng ung thư, kháng khuẩn kháng nấm và kháng lao [3, 6].

Hexamethylmelamin (Altretamin) là dẫn xuất 1,3,5-triazin được sử dụng trong lâm sàng với mục đích trị liệu là kháng ung thư phổi, buồng trứng và ung thư vú. Dẫn chất 1,3,5-triazin có chứa nhóm amin khác nhau tại vị trí 2, 4 hoặc 6 được biết đến như là thuốc kháng ung thư (hình 1). Các quy trình khác nhau sẽ được sử dụng để tổng hợp các dẫn chất mono-, di- hoặc tri- thế của 1,3,5-triazin. Hợp chất quan trọng nhất để tổng hợp các dẫn chất 1,3,5-triazin là cyanuric clorid. Khả năng phản ứng của các nguyên tử Cl với tác nhân ái nhân (nucleophile) được kiểm soát bởi nhiệt độ [7, 8].

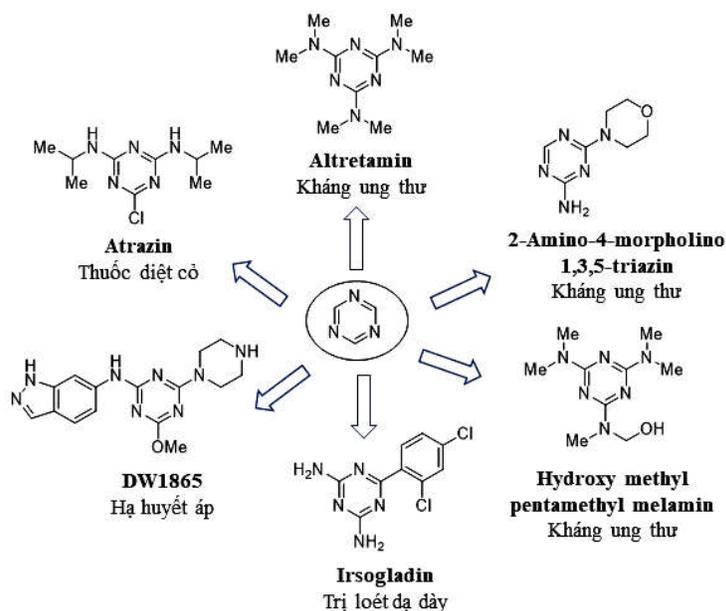
Chịu trách nhiệm: Trương Ngọc Tuyền

Email: truongtuyen@ump.edu.vn

Ngày nhận: 27/01/2021

Ngày phản biện: 10/3/2021

Ngày duyệt bài: 23/4/2021



Hình 1. Hoạt tính sinh học của một số dẫn chất 1,3,5-triazin

Đặc biệt ở Việt Nam chưa có nghiên cứu phát triển dẫn chất 1,3,5-triazin nhằm mục tiêu điều trị bệnh nói chung và điều trị ung thư nói riêng. Mục đích của nghiên cứu này là tối ưu hóa tổng hợp với sự hỗ trợ của vi sóng và nghiên cứu docking một số dẫn chất 1,3,5-triazin để hiểu rõ khả năng tương tác thụ thể - thuốc.

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu và thiết bị

Các hóa chất và dung môi sử dụng có nguồn gốc từ Hãng Merck (Đức), AKSci (Mỹ), Acros (Bỉ), Xilong (Trung Quốc) và Chemsol (Việt Nam) được sử dụng trực tiếp không qua tinh chế. Sắc ký lớp mỏng (TLC) sử dụng bản nhôm silica gel 60 F₂₅₄ trắng sẵn có độ dày 0,2 mm

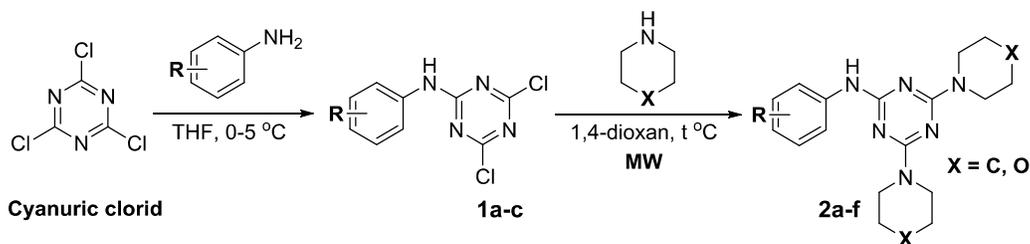
(Hãng Merck). Sắc ký cột sử dụng silica gel cỡ hạt 0,040 - 0,063 mm (Hãng Merck). Chiếu xạ vi sóng thực hiện trên máy CEM Discover.

Phổ IR đo trên máy Shimadzu IRAffinity. Các phổ ¹H-NMR và ¹³C-NMR được đo trên máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Avance 500 NMR Spetrometer tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học Việt Nam. Phổ khối lượng (MS) được đo trên máy LC-MS Shimadzu.

Phương pháp nghiên cứu

Vi sóng và sơ đồ tổng hợp

Vi sóng (MW) là sóng điện từ có bước sóng dài hơn tia hồng ngoại nhưng ngắn hơn sóng radio. Phản ứng với hỗ trợ của vi sóng và siêu âm xảy ra rất nhanh, thông thường chỉ vài phút do nhiệt độ cao, tăng nhanh và đồng nhất đồng thời có sự tác động kết hợp của áp suất nếu tiến hành trong hệ kín.



Sơ đồ 1. Sơ đồ tổng hợp các dẫn chất 1,3,5-triazin

Nghiên cứu sử dụng phương pháp tổng hợp với sự hỗ trợ của vi sóng ở chế độ điều chỉnh năng lượng (fixed-power). Năng lượng được cung cấp tối đa 300 W và tốc độ khuấy cao. Phương pháp vi sóng đã góp phần đáng kể trong tăng hiệu suất tổng hợp và rút ngắn thời gian phản ứng (sơ đồ 1).

Quy trình tổng hợp mono - thể của 1,3,5-triazin (1)

Cyanuric clorid (10 mmol) được hòa tan vào THF khan (40 mL) ở 0 - 5 °C, dẫn chất anilin (10 mmol) và K₂CO₃ (10 mmol) được thêm vào từ từ và khuấy trong khoảng thời gian 2 - 4 giờ đến khi hết nguyên liệu (kiểm tra bằng TLC). Tinh chế sản phẩm 1 bằng phương pháp sắc ký cột.

Quy trình tổng hợp tri - thể của 1,3,5-triazin (2)

Cho hỗn hợp gồm hợp chất 1 (3 mmol), amin (tỷ lệ mol amin/hợp chất 1 là 2,57) và K₂CO₃ (6 mmol) và 1,4-dioxan (10 mL) vào ống vi sóng. Tiến hành chiếu xạ vi sóng trong thời gian 17,64 phút, ở nhiệt độ 107,44 °C với năng lượng 300 W và tốc độ khuấy cao. Chiết hỗn hợp phản ứng bằng ethyl acetat, làm khan với Na₂SO₄, gạn và cô đuổi dung môi. Tinh chế sản phẩm 2 bằng phương pháp sắc ký cột.

Phương pháp xác định cấu trúc các dẫn chất 1,3,5-triazin gồm: Quang phổ hồng ngoại IR, khối phổ MS và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR (¹H-NMR và ¹³C-NMR).

Tối ưu hóa điều kiện tổng hợp 1,3,5-triazin (2)

Để tối ưu tổng hợp, mô hình CCRD với 3 nhân tố và 5 mức được sử dụng trong nghiên cứu này. Các biến độc lập bao gồm tỷ lệ mol amin/hợp chất 1, nhiệt độ, thời gian và biến phụ thuộc là hiệu suất phản ứng (H%) (bảng 1). Số thí nghiệm N = 2^k + 2k + 6 (N = 20 với k = 3). Trong đó, k là số biến số độc lập và 2k là số thí nghiệm bổ sung tại điểm sao. Khoảng cách từ tâm đến điểm sao α = 2^{k/4} (α = 1,6818 với k = 3). Tất cả các nghiên cứu được thực hiện ở năm mức (- α, - 1, 0, + 1, + α). Như vậy, trong nghiên cứu này 20 thí nghiệm sẽ được thực hiện với 2³ số thí nghiệm của quy hoạch toàn phần, 6 thí nghiệm lặp lại tại tâm để đánh giá sai số và 6 thí nghiệm bổ sung tại điểm sao nằm cách vị trí tâm thực nghiệm một khoảng ± α.

Miền khảo sát trong nghiên cứu như sau: Tỷ lệ mol amin/hợp chất 1 (1,66 - 3,34), nhiệt độ phản ứng (66,36 - 133,64°C) và thời gian phản ứng (6,59 - 23,41 phút).

Mô hình thống kê biểu diễn sự phụ thuộc của hiệu suất phản ứng vào các nhân tố được mã hóa là một phương trình đa thức bậc hai được thiết kế bởi phần mềm Design Expert 11 (Stat-Ease Inc., USA). Phương trình có dạng như sau:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

Y: Hiệu suất phản ứng (%).

b₀: Hệ số hồi quy bậc 0.

X_i: Nhân tố độc lập thứ i ảnh hưởng đến hàm mục tiêu Y.

b_i: Hệ số hồi quy bậc 1 mô tả ảnh hưởng của nhân tố X_i với Y.

b_{ii}: Hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng của yếu tố X_i với Y.

b_{ij}: Hệ số hồi quy tương tác mô tả ảnh hưởng đồng thời X_i và X_j với Y.

Bảng 1. Xác định phạm vi và mức biến đổi của các nhân tố

Biến thực	Biến mã hóa	Đơn vị	Mức nghiên cứu				
			- 1,68	- 1	0	+ 1	+ 1,68
Tỷ lệ mol amin/hợp chất 1	X ₁		1,66	2	2,5	3	3,34
Nhiệt độ phản ứng	X ₂	°C	66,36	80	100	120	133,64
Thời gian phản ứng	X ₃	phút	6,59	10	15	20	23,41

Các hệ số hồi quy bậc 0, bậc hai và tương tác của mô hình đa thức bậc hai được xử lý

bằng phần mềm Design Expert 11. Chất lượng của mô hình đa thức thể hiện qua hệ số xác

định R^2 và phân tích ANOVA. Ý nghĩa của hệ số hồi quy được xác định qua kiểm định t và ý nghĩa thống kê được xác định qua kiểm định F.

Nghiên cứu docking phân tử

Để dự đoán tương tác của các dẫn chất tổng hợp trên các đích tác động tiềm năng, nghiên cứu docking được thực hiện bằng phần mềm Autodock Vina. Cấu trúc 3D của DHFR (PDB id: 3ghw) được tải từ ngân hàng dữ liệu protein (www.rcsb.org). Trước khi thực hiện docking, thụ thể protein được chuẩn bị bằng cách kết hợp tất cả hydrogen không phân cực và loại bỏ nước kết tinh bằng cách sử dụng giao diện đồ họa Autodock. Thông số "grid box" của DHFR (3ghw) là: kích thước (x: 26, y: 30, z: 30) và trung tâm (x: -4,556, y: 22,028, z: 6,528).

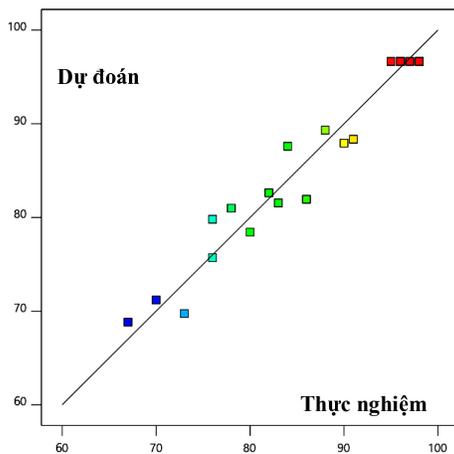
Kết quả và bàn luận

Kết quả tối ưu hóa tổng hợp

Bài toán tối ưu được lập dựa trên phương trình hồi quy xác định bằng phương pháp quy hoạch thực nghiệm là hàm mô tả sự phụ thuộc của hiệu suất phản ứng (Y_1) vào các nhân tố tỷ lệ mol amin/hợp chất 1 (X_1), nhiệt độ phản ứng (X_2) và thời gian phản ứng (X_3). Điều kiện ràng buộc là giới hạn của vùng nghiên cứu. Phần mềm Design Expert 11 được sử dụng để phân tích, xây dựng phương trình hồi quy và giải bài toán tối ưu.

Mô hình toán học mô tả mối quan hệ giữa hiệu suất tổng hợp với các biến mã hóa như sau:

$$Y = 99,66 + 2,06 \times X_1 + 2,19 \times X_2 + 5,31 \times X_3 - 0,25 \times X_1 \times X_2 - 2,50 \times X_1 \times X_3 + 1,25 \times X_2 \times X_3 - 6,18 \times X_1^2 - 4,24 \times X_2^2 - 6,36 \times X_3^2$$



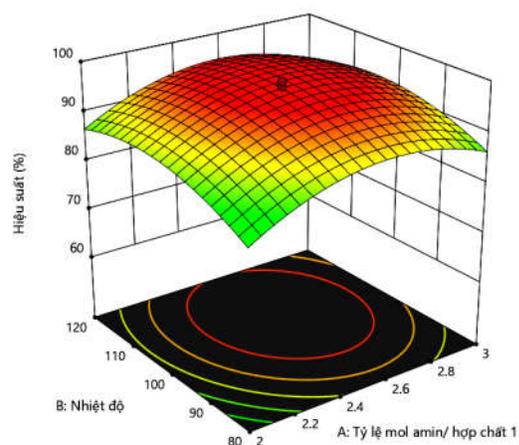
1a

Bảng 2. Ma trận kế hoạch và kết quả thực nghiệm

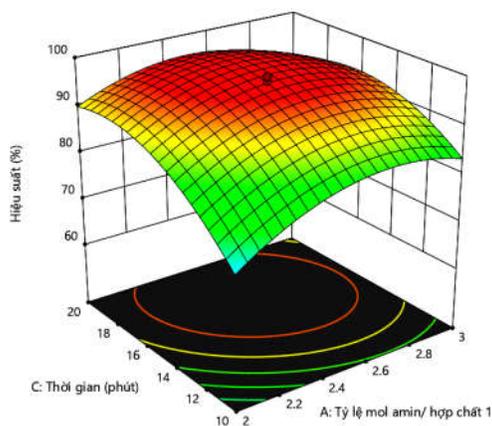
STT	Giá trị thực			Hàm mục tiêu	
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2
1	1,66	100	15	76,0	75,7
2	3,34	100	15	82,0	82,7
3	3	120	10	76,0	79,8
4	2	80	10	67,0	68,8
5	2,5	100	15	95,0	96,7
6	2	120	10	70,0	71,2
7	2,5	100	15	96,0	96,7
8	3	120	20	90,0	87,9
9	3	80	20	83,0	81,6
10	2,5	100	15	97,0	96,7
11	2	80	20	86,0	81,9
12	2,5	100	15	96,0	96,7
13	2,5	66,36	15	78,0	81,0
14	2,5	100	15	98,0	96,7
15	3	80	10	80,0	78,4
16	2,5	100	15	98,0	96,7
17	2,5	100	23,41	84,0	87,6
18	2	120	20	88,0	89,3
19	2,5	100	6,59	73,0	69,7
20	2,5	133,63	15	91,0	88,3

Y_1 : Hiệu suất thực nghiệm,

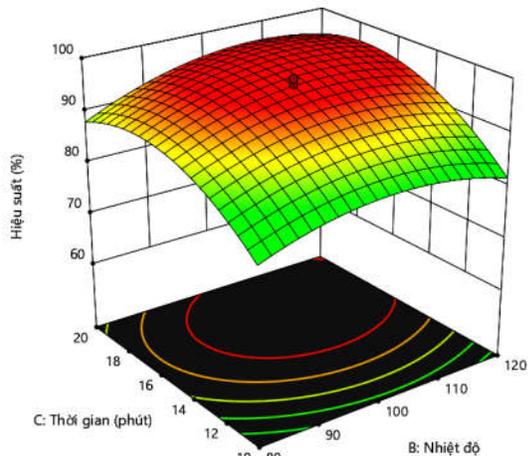
Y_2 : Hiệu suất dự đoán.



1b



1c



1d

Hình 2. Kết quả so sánh hiệu suất (thực nghiệm - dự đoán) và ảnh hưởng của các cặp yếu tố đến hiệu suất

Bảng 3. Kết quả phân tích phương sai cho mô hình đa thức bậc hai

Nguồn biến thiên	Tổng bình phương	Bậc tự do	Trung bình bình phương	F	p
Mô hình	1743,53	9	193,73	20,68	< 0,0001
Phần dư	93,67	10	9,37		
Sai số mô hình	86,34	5	17,27	11,77	0,0085
Sai số ngẫu nhiên	7,33	5	1,47		
Tổng số	1837,2	19			

$$CV\% = 3,59; R^2 = 0,9490$$

Hệ số tương quan ($r = 0,97$) cao cho thấy có thể sử dụng mô hình để tiên đoán thực nghiệm và ngược lại. Điều này cho thấy phương trình hồi quy đã mô tả chính xác các số liệu thực nghiệm. Kết quả so sánh hiệu suất thu được từ thực nghiệm với giá trị dự đoán dựa trên mô hình thể hiện ở hình 1a.

Giá trị p liên quan đến kiểm định F của mô hình thể hiện ở bảng 3 có giá trị nhỏ hơn 0,05 ($p < 0,0001$) cho thấy độ tương thích của phương trình hồi quy với thực nghiệm, từ đó chứng minh độ tin cậy thống kê. Hệ số xác định

R^2 cho biết 94,49% sự biến đổi của hiệu suất tổng hợp là do ảnh hưởng của các biến độc lập như tỷ lệ mol amin/hợp chất 1, nhiệt độ và thời gian phản ứng, chỉ có 5,51% sự thay đổi là do các yếu tố không xác định gây ra (sai số ngẫu nhiên). Bên cạnh đó, hệ số biến thiên CV% thấp chứng tỏ rằng các thí nghiệm được thực hiện chính xác và độ lặp lại cao. Kết quả ảnh hưởng của các cặp yếu tố đến hiệu suất thể hiện ở hình 2 (b-d). Điều kiện tối ưu cho phản ứng tổng hợp tri-thể 1,3,5-triazin thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Điều kiện tối ưu tổng hợp tri-thể của 1,3,5-triazin (2)

Yếu tố	Giá trị tối ưu	Y dự đoán	Y thực nghiệm
Tỷ lệ mol amin/hợp chất 1	2,57		
Nhiệt độ phản ứng	107,44	98,13	97,56
Thời gian phản ứng	17,64		

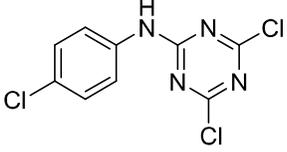
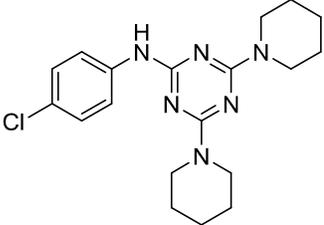
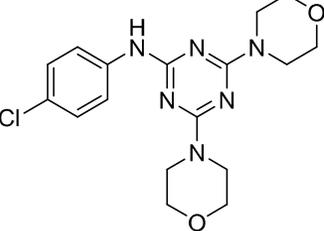
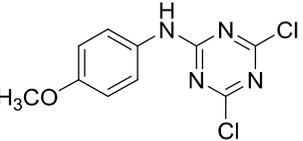
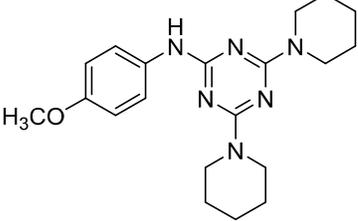
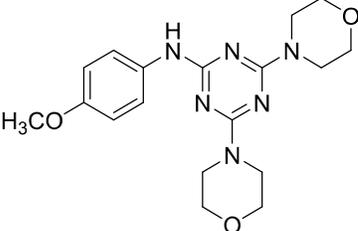
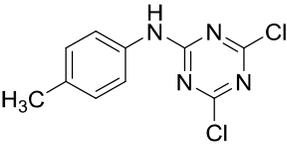
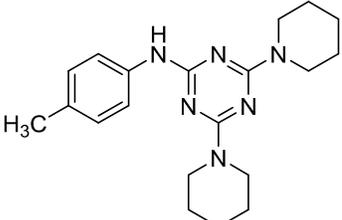
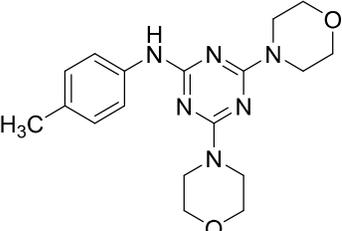
Y: Hiệu suất

Kết quả tổng hợp

Hiệu suất phản ứng tổng hợp các dẫn chất 1,3,5-triazin được tổng kết trong bảng 5.

Các dẫn chất được tổng hợp với hiệu suất cao (95-98%) với thời gian phản ứng 2-4 giờ (tổng hợp 1) và 17,6 phút (tổng hợp 2).

Bảng 5. Hiệu suất tổng hợp dẫn chất 1,3,5-triazin với sự hỗ trợ vi sóng

Sản phẩm	H%	Sản phẩm	H%*
1a 	95	2a 	97
		2b 	98
1b 	96	2c 	98
		2d 	98
1c 	95	2e 	97
		2f 	97

*: Hiệu suất tổng hợp với sự hỗ trợ vi sóng tại điều kiện tối ưu

Tổng hợp 1,3,5-triazin (1a-c và 2a-f)

4,6-dicloro-N-(4-clorophenyl)-1,3,5-triazin-2-amin (1a): Tinh thể trắng, hiệu suất 95%, mp: 146-148 °C. **IR** (ν cm^{-1}): 3254 (NH), 1383 (C=N), 2978 (ArCH), 806 (C-N, s-triazin), 791 (Ar-Cl). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 10,91 (1H, s, NH); 7,60 (2H, d, J = 9 Hz, H-Ar); 7,42 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-Ar). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 163,8; 154,1; 136,0; 135,9; 128,9; 128,8; 128,4; 123,1; 122,9. **LC-MS** (m/z) [$M+H$]⁺ tính toán C₉H₆Cl₃N₄ 274,9653, tìm thấy 274,9405.

4,6-dicloro-N-(4-methoxyphenyl)-1,3,5-triazin-2-amin (1b): Tinh thể trắng, hiệu suất 96%, mp: 150-151 °C. **IR** (ν cm^{-1}): 3247 (NH), 1389 (C=N), 2985 (ArCH), 802 (C-N, s-triazin), 790 (Ar-Cl). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 10,97 (1H, s, NH); 7,46 (1H, d, J = 9,0 Hz, H-Ar); 7,39 (1H, d, J = 9,0 Hz, H-Ar); 6,95 (2H, d, J = 9,0 Hz, H-Ar); 3,10 (3H, s, -OCH₃). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 157,8; 153,7; 127,8; 125,3; 123,6; 114,6; 114,2; 55,5. **LC-MS** (m/z) [$M-H$]⁻ tính toán C₁₀H₇Cl₂N₄O 269,0002, tìm thấy 268,9938.

4,6-dicloro-N-(p-tolyl)-1,3,5-triazin-2-amin (1c): Tinh thể trắng, hiệu suất 95%, mp: 122-124 °C. **IR** (ν cm^{-1}): 3248 (NH), 1392 (C=N), 2981 (ArCH), 805 (C-N, s-triazin), 794 (Ar-Cl). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 11,03 (1H, s, NH); 7,46 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-Ar); 7,17 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-Ar); 2,27 (3H, s, -CH₃). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 163,8; 153,8; 135,9; 135,2; 130,4; 128,8; 121,8; 121,6; 20,6. **LC-MS** (m/z) [$M-H$]⁻ tính toán C₁₀H₇Cl₂N₄ 253,0053, tìm thấy 253,0039.

N-(4-clorophenyl)-4,6-di(piperidin-1-yl)-1,3,5-triazin-2-amin (2a): Tinh thể trắng, hiệu suất 97%, mp: 180-181 °C. **IR** (ν cm^{-1}): 3255 (NH), 1389 (C=N), 2991 (ArCH), 808 (C-N, s-triazin), 797 (Ar-Cl). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 8,96 (1H, s, NH); 7,67 - 7,72 (2H, m, H-Ar); 7,27 (1H, d, J = 8,5 Hz, H-Ar); 7,07 (1H, t, J = 8,5 Hz, H-Ar); 3,69 (8H, t, J = 4,5 Hz, -CH₂-); 1,59 (4H, t, J = 4,5 Hz, -CH₂-); 1,48 (8H, s, -CH₂-). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm):

164,39; 164,35; 164,01; 163,99; 157,8; 155,9; 139,6; 136,96; 136,94; 128,0; 124,6; 120,8; 120,7; 120,6; 114,7; 114,5; 43,5; 25,3; 24,3. **LC-MS** (m/z) [$M+H$]⁺ tính toán C₁₉H₂₆ClN₆ 373,1902, tìm thấy 373,1898.

N-(4-clorophenyl)-4,6-dimorpholino-1,3,5-triazin-2-amin (2b): Tinh thể trắng, hiệu suất 98%, mp: 192-193 °C. **IR** (ν cm^{-1}): 3258 (NH), 1389 (C=N), 2994 (ArCH), 802 (C-N, s-triazin), 793 (Ar-Cl). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 8,82 (1H, s, NH); 7,65 (2H, d, J = 9,0 Hz, H-Ar); 7,01 (2H, d, J = 9,0 Hz, H-Ar); 3,70 (8H, t, J = 5,5 Hz, -CH₂-); 3,63 (8H, t, J = 5,0 Hz, -CH₂-). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆, ppm): 164,7; 163,8; 158,0; 156,1; 136,3; 121,2; 121,1; 114,4; 114,2; 65,6; 43,2. **LC-MS** (m/z) [$M+H$]⁺ tính toán C₁₇H₂₂ClN₆O₂ 377,1487, tìm thấy 377,1477.

N-(4-methoxyphenyl)-4,6-di(piperidin-1-yl)-1,3,5-triazin-2-amin (2c): Tinh thể trắng, hiệu suất 98%, mp: 185-186 °C. **IR** (ν cm^{-1}): 3249 (NH), 1396 (C=N), 2997 (ArCH), 801 (C-N, s-triazin), 790 (Ar-Cl). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 8,72 (1H, s, NH); 7,57 (2H, d, J = 9,0 Hz, H-Ar); 6,83 (2H, d, J = 9,0 Hz, H-Ar); 3,70 (3H, s, -OCH₃); 3,68 (8H, t, J = 5,0 Hz, -CH₂-); 1,59 (4H, t, J = 4,5 Hz, -CH₂-); 1,48 (8H, d, J = 3,5 Hz, -CH₂-). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 164,5; 164,0; 154,0; 133,8; 120,8; 113,5; 55,1; 43,5; 25,4; 24,4. **LC-MS** (m/z) [$M+H$]⁺ tính toán C₂₀H₂₉N₆O 369,2397, tìm thấy 369,2299.

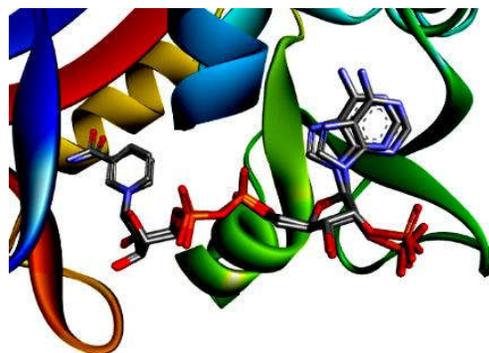
N-(4-methoxyphenyl)-4,6-dimorpholino-1,3,5-triazin-2-amin (2d): Tinh thể trắng, hiệu suất 98%, mp: 191-193 °C. **IR** (ν cm^{-1}): 3252 (NH), 1392 (C=N), 2995 (ArCH), 809 (C-N, s-triazin), 799 (Ar-Cl). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 8,90 (1H, s, NH); 7,55 (2H, d, J = 9,0 Hz, H-Ar); 6,84 (2H, d, J = 9,0 Hz, H-Ar); 3,70 (3H, s, -OCH₃); 3,68 (8H, t, J = 5,0 Hz, -CH₂-); 3,61 (8H, t, J = 4,5 Hz, -CH₂-). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 164,7; 163,9; 154,2; 133,3; 121,1; 113,6; 66,3; 66,0; 55,1; 43,3. **LC-MS** (m/z) [$M+H$]⁺ tính toán C₁₈H₂₅N₆O₃ 373,1983, tìm thấy 373,1981.

4,6-di (piperidin-1-yl) -N- (p-tolyl) -1,3,5-triazin-2-amin (**2e**): Tinh thể trắng, hiệu suất 97%, mp: 179-180 °C. **IR** (ν cm^{-1}): 3258 (NH), 1384 (C=N), 2989 (ArCH), 802 (C-N, s-triazin), 795 (Ar-Cl). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 8,48 (1H, s, NH); 7,55 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-Ar); 7,04 (1H, d, J = 8,0 Hz, H-Ar); 3,70 (8H, t, J = 5,5 Hz, -CH₂-); 2,24 (3H, s, -CH₃); 1,63 (4H, t, J = 5,5 Hz, -CH₂-); 1,49-153 (8H, m, -CH₂-). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 164,4; 163,9; 137,7; 129,6; 128,2; 119,3; 43,3; 24,9; 24,0; 19,8. **LC-MS** (m/z) [M+H]⁺ tính toán C₂₀H₂₉N₆ 353,2448, tìm thấy 353,2369.

4,6-dimorpholino-N- (p-tolyl) -1,3,5-triazin-2-amin (**2f**): Tinh thể trắng, hiệu suất 97%, mp: 187-188 °C **IR** (ν cm^{-1}): 3256 (NH), 1394 (C=N), 2991 (ArCH), 807 (C-N, s-triazin), 793 (Ar-Cl). **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 8,95 (1H, s, NH); 7,53 (2H, d, J = 8,5 Hz, H-Ar); 7,05 (2H, d, J = 8,0 Hz, H-Ar); 3,69 (8H, t, J = 5,0 Hz, -CH₂-); 3,61 (8H, t, J = 4,5 Hz, -CH₂-); 2,23 (3H, s, -CH₃). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO- d_6 , δ ppm): 164,7; 163,9; 137,6; 130,2; 128,7; 119,7; 66,3; 66,0; 43,3; 20,3. **LC-MS** (m/z) [M+H]⁺ tính toán C₁₈H₂₅N₆O₂ 357,2304, tìm thấy 357,2304.

Kết quả docking phân tử

Nghiên cứu *in silico* thực hiện trên receptor kháng ung thư (DHFR) bằng Autodock vina. Kết quả pre-docking của ligand đồng kết tinh cho thấy phương pháp tương thích tốt (hình 2). Kết quả docking tương tác giữa receptor - ligand thể hiện trong bảng 6 và hình 3.



Hình 3. Kết quả pre-docking của ligand

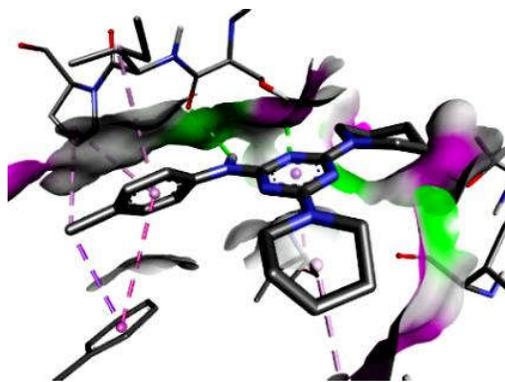
Bảng 6. Kết quả docking *in silico* của các dẫn chất tổng hợp trên DHFR

Ligand	Ái lực (kcal/mol)	Loại liên kết	Vị trí liên kết
1a	-8,0	Liên kết hydrogen (2,16 Å)	N (triazin) - ALA9
		Tương tác kỵ nước	π - π (PHE34); alkyl (ILE7, ALA9, VAL8, ILE16, LEU22, ILE60, LEU67); π -alkyl (PHE34, ALA9, ILE60)
1b	-7,4	Liên kết hydrogen (2,32 Å)	N (triazin) - ALA9
		Tương tác kỵ nước	π - π (PHE34); alkyl (ILE7, ALA9, VAL8, ILE16, LEU22, ILE60, LEU67); π -alkyl (PHE34, ALA9, ILE60)
1c	-7,9	Liên kết hydrogen (2,36 Å)	N (triazin) - ALA9
		Tương tác kỵ nước	π - π (PHE34); alkyl (ILE7, ALA9, VAL8, ILE16, LEU22, ILE60, LEU67); π -alkyl (PHE34, ALA9, ILE60)
2a	-10,1	Liên kết hydrogen (2,11 Å)	N (triazin) - SER59
		Liên kết hydrogen (2,88 Å)	SER59 - NH
		Tương tác kỵ nước	π - σ (LEU22, PHE31); π - π (PHE31); alkyl (ALA9, PRO61); π -alkyl (ILE60, PRO61)
2b	-9,9	Liên kết hydrogen (2,26 Å)	O (morphin) - ALA9
		Liên kết hydrogen (2,16 Å)	N (triazin) - SER59
		Liên kết carbon hydrogen (3,78 Å)	C (morphin) - ILE16

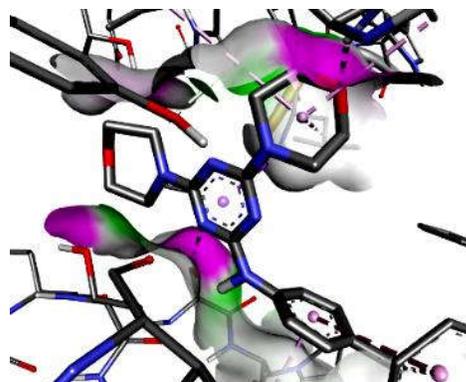
		Tương tác kỵ nước	π - σ (LEU22); π - π (PHE34); alkyl (ALA9, ILE16, LEU22); π -alkyl (PHE34, ILE60)
2c	-9,6	Liên kết hydrogen (2,27 Å)	N (triazin) - SER59
		Liên kết hydrogen (2,51 Å)	SER59 - NH
		Liên kết hydrogen (2,32 Å)	SER59 - NH
		Liên kết carbon hydrogen (3,59 Å)	C (piperidin) - ILE16
		Liên kết carbon hydrogen (3,50 Å)	C (piperidin) - ASP21
		Tương tác kỵ nước	π - σ (LEU22, PHE31); π - π (PHE31); π -alkyl (PHE34, ILE60, PRO61)
2d	-9,1	Liên kết hydrogen (2,21 Å)	N (triazin) - SER59
		Liên kết carbon hydrogen (3,69 Å)	O (morphin) - GLY17
		Liên kết carbon hydrogen (3,31 Å)	C (morphin) - ILE16
		Tương tác kỵ nước	π - σ (LEU22, PHE31); π - π (PHE31); π -alkyl (ILE60, PRO61)
2e	-10,4	Liên kết hydrogen (2,20 Å)	N (triazin) - SER59
		Liên kết hydrogen (2,32 Å)	SER59 - NH
		Liên kết carbon hydrogen (3,53 Å)	C (piperidin) - VAL115
		Liên kết carbon hydrogen (3,33 Å)	C (piperidin) - TYR121
		Tương tác kỵ nước	π - σ (LEU22, PHE31); π - π (PHE31); alkyl (ILE16, PRO61); π -alkyl (PHE34, ILE60, PRO61)
2f	-10,2	Liên kết hydrogen (2,00 Å)	N (triazin) - SER59
		Liên kết hydrogen (2,13 Å)	O (morphin) - THR146
		Liên kết carbon hydrogen (3,31 Å)	O (morphin) - GLY17
		Liên kết carbon hydrogen (3,62 Å)	C (morphin) - ALA9
		Liên kết carbon hydrogen (3,47 Å)	C (morphin) - TYR121
		Tương tác kỵ nước	π - σ (LEU22, PHE31); π - π (PHE31); alkyl (ALA9, ILE16, LEU22, PRO61); π -alkyl (ILE60, PRO61)

Các dẫn chất 1,3,5-triazin đều tạo được liên kết hydrogen với receptor DHFR, trong đó dẫn chất **2c** và **2f** có nhiều liên kết hydrogen nhất. Dẫn chất **2a** (-10,1 kcal/mol), **2b** (-9,9 kcal/mol), **2e** (-10,4 kcal/mol) và **2f** (-10,2 kcal/mol) cho ái lực tốt nhất với receptor. Các dẫn chất mono-thể 1,3,5-triazin tạo liên kết hydrogen với ALA9

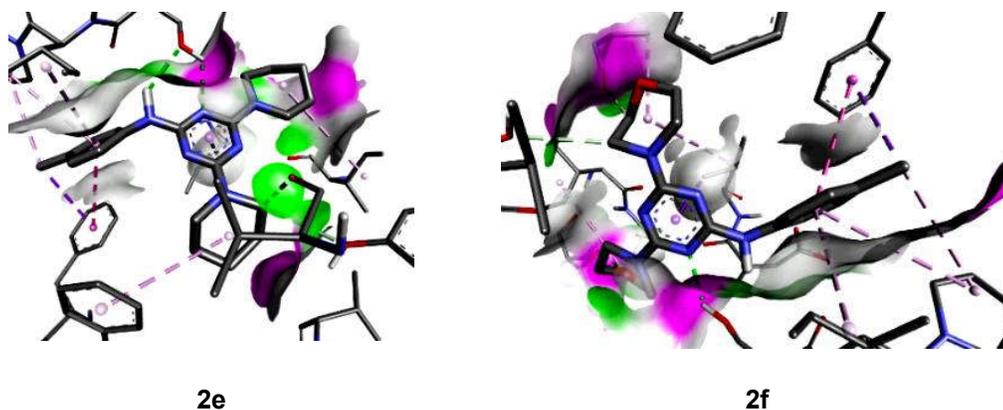
nhưng các dẫn chất tri- thể 1,3,5-triazin tạo liên kết hydrogen chủ yếu với SER59 và tạo nhiều liên kết hydrogen hơn. Điều này cho thấy sự gắn nhóm thể piperidin-1-yl và morpholino vào nhân 1,3,5-triazin làm tăng đáng kể ái lực với receptor DHFR.



2a



2b



Hình 4. Mô hình 3D về sự tương tác trên receptor DHFR.

Kết luận

Một số dẫn chất tri- thể 1,3,5-triazin được tổng hợp thành công với sự hỗ trợ vi sóng. Những yếu tố ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp dẫn chất tri- thể 1,3,5-triazin như tỷ lệ mol, nhiệt độ và thời gian phản ứng đã được phân tích thống kê theo mô hình tâm phức hợp (CCRD) và phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM). Hiệu suất tối ưu đạt được 97 - 98% tương ứng với các điều kiện sau: tỷ lệ mol amin/hợp chất **1** (2,57), nhiệt độ (107,44°C) và thời gian phản ứng (17,64 phút). Nghiên cứu *in silico* cho thấy dẫn chất tri- thể 1,3,5-triazin có ái lực tốt với receptor DHFR. Nghiên cứu này sẽ tiếp tục được thực hiện để tổng hợp thêm các dẫn chất 1,3,5-triazin và thử hoạt tính độc tế bào trên HepG2 và MCF7.

Đề tài được tài trợ bởi Nhà tài trợ thuộc Tập đoàn Vingroup và hỗ trợ bởi chương trình học bổng đào tạo thạc sĩ, tiến sĩ trong nước của Quỹ Đổi mới sáng tạo Vingroup (VINIF), Viện Nghiên cứu Dữ liệu lớn (VinBigdata), mã số VINIF.2020.ThS.42.

Tài liệu tham khảo

1. Anderson A. C., Wright D. L. (2014), "Antifolate agents: A patent review (2010-2013)", *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 24 (6), pp. 687 - 697.
2. Sunduru N. et al. (2010), "Discovery of new 1,3,5-triazine scaffolds with potent activity against mycobacterium tuberculosis H37RV", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45 (8), pp. 3335 - 3345.

3. Sathiakumar N. et al. (2011), "A review of epidemiologic studies of triazine herbicides and cancer", *Critical Reviews in Toxicology*, 41, pp. 1-34.

4. Patel R. V. et al. (2012), "Antimicrobial, anti-TB, anticancer and anti-hiv evaluation of new s-triazine-based heterocycles", *Future Medicinal Chemistry*, 4 (9), pp. 1053-1065.

5. Maarouf A. R. et al. (2012), "Synthesis and antiviral activity of benzimidazolyl and triazolyl-1,3,5-triazines", *Medicinal Chemistry Research*, 21, pp. 703-710.

6. Khan F. G., Yadav M. V. and Sagar A. D. (2014), "Synthesis, characterization, and antimicrobial evaluation of novel trichalcones containing core s-triazine moiety", *Medicinal Chemistry Research*, 23 (5), pp. 2633-2638.

7. Sączewski F. et al. (2006), "Synthesis, structure and anticancer activity of novel 2,4-diamino-1,3,5-triazine derivatives", *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41 (2), pp. 219-225.

8. Blotny G. (2006), "Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis", *Tetrahedron*, 62, pp. 9507-9522.

Nghiên cứu thủy phân chọn lọc lập thể (*RS*)-1-(4-(2-amino-2-oxoethyl)phenoxy)-3- cloropropan-2-yl acetat bằng enzym lipase ứng dụng trong tổng hợp (*S*)-(-)-atenolol

Phạm Ngọc Tuấn Anh^{1*}, Đinh Hữu Thành²

Vũ Thanh Thảo³, Trần Cát Đông³

¹Khoa Dược, Trường Đại học Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh

²Công ty Cổ phần Dược phẩm Bến Tre

³Khoa Dược, Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Summary

The present study describes an efficient lipase-catalyzed enantioselective kinetic resolution of (*RS*)-1-(4-(2-amino-2-oxoethyl)phenoxy)-3-chloropropane-2-yl acetate. Various reaction parameters (lipase, (*RS*)-ester/lipase ratio, reaction time, reaction medium) were optimized in order to achieve good enantioselectivity. The enantiopure (*R*)-ester acetate was obtained in 70% yield by using the lipase from *Pseudomonas fluorescens* with the (*RS*)-ester/lipase ratio = 2,85/10 (w/w) in phosphate buffer pH 7.0 at 37 °C for 2.5 hours. The (*R*)-enantiomer intermediate was then used for (*S*)-(-)-atenolol synthesis.

Keywords: (*S*)-(-)-atenolol, lipase, *Pseudomonas fluorescens*, atenolol, β -blocker.

Đặt vấn đề

Atenolol thuộc nhóm thuốc chẹn beta được sử dụng phổ biến trong điều trị các bệnh tim mạch như cao huyết áp, đau thắt ngực, nhồi máu cơ tim cấp. Với một trung tâm carbon bất đối, atenolol có hai đồng phân quang học nhưng chỉ đồng phân (*S*)-(-)-atenolol mới có tác dụng ức chế thụ thể β_1 . Nghiên cứu đã chứng minh việc sử dụng đơn trị liệu (*S*)-(-)-atenolol cho tác dụng chọn lọc trên tim giúp tránh được tác dụng phụ gây ra của đồng phân (*R*)-(+)-atenolol [1]. Trong nghiên cứu này, (*RS*)-1-(4-(2-amino-2-oxoethyl)phenoxy)-3-cloropropan-2-yl acetat, một chất trung gian quan trọng trong quy trình tổng hợp (*S*)-(-)-atenolol, được nghiên cứu thủy phân ester hướng chọn lọc lập thể bằng enzym lipase nhằm ứng dụng trong tổng hợp (*S*)-(-)-atenolol trong điều kiện Việt Nam.

Nguyên liệu và phương pháp

Nguyên liệu

Các nguyên liệu sử dụng trong nghiên cứu được mua từ các hãng hóa chất như Acros Organics (Geel, Bỉ), TCI Chemicals (Tokyo, Nhật) và Merck (Darmstadt, Đức).

Thiết bị

Nhiệt độ nóng chảy được đo trên máy đo điểm chảy Gallenkamp (Sanyo, Anh). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ¹H-NMR được đo trên máy Bruker Avance 500 MHz (Bruker, Mỹ). Phổ khối đo trên máy Shimadzu LCMS-IT-TOF (Shimadzu, Nhật Bản).

Phương pháp nghiên cứu

Hỗn hợp racemic (*RS*)-1-(4-(2-amino-2-oxoethyl)phenoxy)-3-cloropropan-2-yl acetat ((*RS*)-ester) được nghiên cứu thủy phân chọn lọc lập thể bằng enzym lipase để ứng dụng trong tổng hợp (*S*)-(-)-atenolol theo sơ đồ 1 [2, 3]. Các lipase sử dụng trong nghiên cứu từ *Candida rugosa* (code L1754, Merck), *Candida antarctica* (code L4777, Merck), *Pseudomonas fluorescens* (code 534730, Merck).

Chịu trách nhiệm: Phạm Ngọc Tuấn Anh

Email: pnt.anh81@hutech.edu.vn

Ngày nhận: 01/3/2021

Ngày phản biện: 24/3/2021

Ngày duyệt bài: 23/4/2021