

Tổng hợp và thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số dẫn chất isatin

Cao Thị Cẩm Nhung*, Đàm Thị Hằng
Trường Đại học Y Dược – Đại học Huế

Summary

In this study, a series of isatin aldazine derivatives (**2a-d**) was synthesized by the condensation of 3-hydrazoneindolin-2-on (**1**) with substituted aromatic aldehydes. Their structural identification was based on 2D-NMR and MS data. The *in vitro* cytotoxic activities of all synthesized compounds against human colon adenocarcinoma cells (HT-29) were evaluated by the SRB assay. The result showed that all compounds exhibited no activity against the tested cell lines.

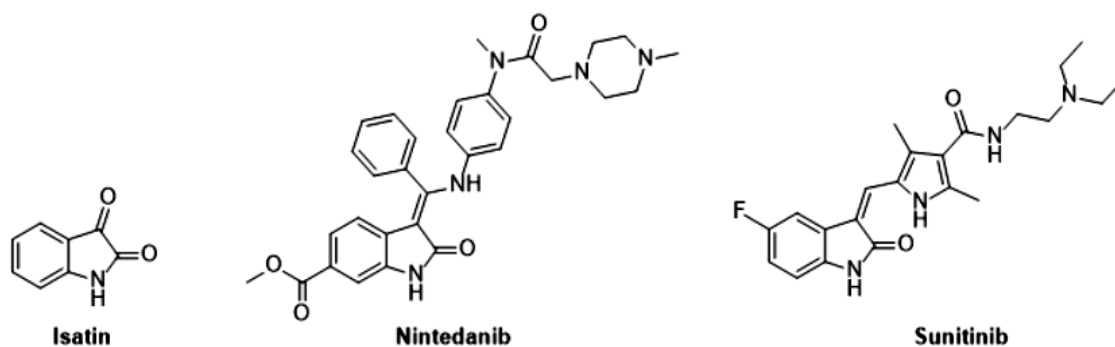
Keywords: Isatin derivatives, synthesis, cytotoxic activity, human colon adenocarcinoma cells, HT-29.

Đặt vấn đề

Việc nghiên cứu phát triển và tìm ra thuốc mới trong điều trị ung thư ngày càng trở nên cấp thiết khi số người mắc mới và tử vong vì ung thư ngày càng gia tăng. Isatin (1*H*-indol-2,3-dion) và dẫn chất của nó là dãy chất hữu cơ được quan tâm nghiên cứu gần đây với nhiều tác dụng sinh học đa dạng như kháng ung thư, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng lao, chống viêm, chống oxy hóa...^[1,2]. Trong hoạt tính chống ung thư,

một số dẫn chất của isatin là các thuốc điều trị ung thư hiệu quả trên lâm sàng như sunitinib (SutentTM)^[3], nintedanib (Vargatef®)^[4].

Trong nghiên cứu này, chúng tôi tổng hợp và thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư của một số dẫn chất isatin aldazin để tạo sự phong phú về mặt cấu trúc và đánh giá sơ bộ hoạt tính kháng ung thư, đồng thời góp phần tìm hiểu mối liên quan cấu trúc - tác dụng của nhóm dẫn chất này.



Hình 1. Cấu trúc của isatin và một số thuốc điều trị ung thư mang khung isatin

Chịu trách nhiệm: Cao Thị Cẩm Nhung

Email: cnhung.farmacista@gmail.com

Ngày nhận: 23/9/2020

Ngày phản biện: 25/12/2020

Ngày duyệt bài: 28/12/2020

Nguyên liệu, thiết bị và phương pháp nghiên cứu

Nguyên liệu và thiết bị

Các hóa chất dùng trong tổng hợp được đặt mua từ các nhà cung cấp Aldrich, Merk

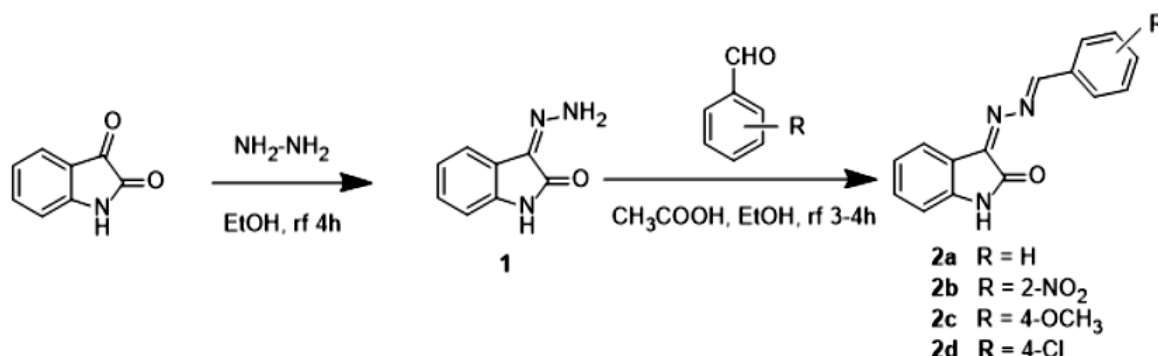
và được sử dụng trực tiếp, không tinh chế. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) được ghi trên máy Bruker AC-500 MHz tại Viện Hóa học – Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, phổ khối lượng (MS) được đo trên máy LTQ Orbitrap XLTM với kỹ thuật

ion hóa phun mù điện tử (ESI).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp tổng hợp

Các dẫn chất isatin được tổng hợp qua hai giai đoạn:



Hình 2. Sơ đồ quy trình tổng hợp các dẫn chất hydrazone mang khung isatin

Giai đoạn 1: Tổng hợp 3-hydrazoneindolin-2-on (**1**) từ isatin và hydrazin

Đun hồi lưu ở nhiệt độ 60°C hỗn hợp gồm isatin (10 mmol) và hydrazin (30 mmol), theo dõi phản ứng bằng **SKLM** pha động n-hexan : ethyl acetat = 2:1, thời gian phản ứng khoảng 4 giờ. Làm lạnh, lọc thu tủa. Rửa và tinh chế tủa bằng ethanol lạnh, sấy trong điều kiện chân không, nhiệt độ 60°C.

Giai đoạn 2: Tổng hợp các dẫn chất isatin aldazin (**2a-d**) từ 3-hydrazoneindolin-2-on (**1**) và các dẫn chất benzaldehyd

Phân tán 3-hydrazoneindolin-2-on (**1**) (1 mmol) vào 5 ml ethanol, thêm tiếp dẫn chất của benzaldehyd (2 mmol) vào bình phản ứng, thêm một giọt acid acetic đặc, đun hồi lưu ở nhiệt độ 60°C trong khoảng 3 - 4 giờ. Lọc rửa tủa bằng ethanol lạnh, sấy khô. Kết tinh lại trong ethanol hoặc sử dụng sắc ký cột để tinh chế sản phẩm.

Phương pháp thử tác dụng gây độc tế bào ung thư

Thử hoạt tính kháng tế bào ung thư (thử độc tính tế bào) *in vitro* của các chất tổng hợp được thực hiện trên dòng tế bào ung thư ruột kết người (HT-29) tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam theo phương pháp của Monks (1991) [5].

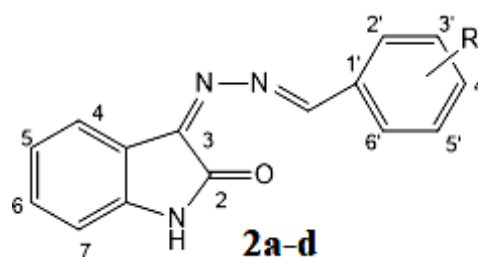
Kết quả và bàn luận

Tổng hợp hóa học

3-hydrazoneindolin-2-on (**1**) được tổng hợp từ phản ứng ngưng tụ giữa isatin với hydrazin. Phản ứng xảy ra theo cơ chế cộng hợp ái nhân, bản chất hydrazin là một tác nhân ái nhân mạnh nên trong trường hợp này phản ứng xảy ra trong môi trường trung tính, dung môi sử dụng là ethanol. Nhiệt độ dùng cho phản ứng là 60°C, nhiệt độ quá cao (> 100°C) sẽ gây phân hủy hydrazin. Hiệu suất phản ứng đạt 88%.

Phản ứng tổng hợp các dẫn chất isatin aldazin (**2a-d**) được thực hiện trong dung môi ethanol, nhiệt độ 60°C. Phản ứng cộng hợp ái nhân loại nước, sử dụng acid acetic làm xúc tác do môi trường H⁺ thuận lợi cho tác nhân nucleophil tấn công vào nhóm -CHO của nhân thơm. Hiệu suất phản ứng từ 70-85%.

Dữ liệu về tính chất và phổ của các dẫn chất isatin aldazin:



3-((benzyliden)hydrazono)indolin-2-on (2a)

Chất rắn, màu nâu vàng, không tan trong nước, tan trong aceton và DMF. Hiệu suất: 82% (204,18 mg). T_{nc}° : 203,3 – 205,0°C. **MS (ESI)** m/z 249,8 [M+H]⁺. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 6,92 (d; 1H; J = 7,5 Hz; H4), δ 7,04 (td; 1H; J₁ = 7 Hz, J₂ = 1 Hz; H5), δ 7,40 (td; 1H; J₁ = 6,5 Hz, J₂ = 1,5 Hz; H6), δ 7,56-7,60 (m; 3H; H3', H4', H5'), δ 7,91 (d; 1H; J = 7 Hz; H7), δ 7,98 (dd; 2H; J₁ = 5,5 Hz, J₂ = 2,5 Hz; H2', H6'); δ 8,60 (s; 1H; N=CH); δ 10,86 (s; 1H; NH). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆): δ 110,88; 116,38; 122,40; 128,76; 128,81; 129,22; 132,09; 133,40; 133,76; 145,02; 150,29; 160,05; 164,47 (C=O).

3 - ((2-nitrobenzyliden)hydrazono) indolin-2-on (2b)

Chất rắn, màu vàng, không tan trong nước, tan trong aceton và DMF. Hiệu suất: 73% (214,09 mg). T_{nc}° : 255,0 - 257,5 °C. **MS (ESI)** m/z 292,8 [M+H]⁺. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 6,92 (d; 1H; J = 8 Hz; H4), δ 7,03 (td; 1H; J₁ = 7, Hz, J₂ = 1 Hz ; H5), δ 7,44 (td; 1H; J₁ = 6,5 Hz, J₂ = 1 Hz; H6), δ 7,77 (d; 1H; J = 7 Hz; H7), δ 7,84 (td; 1H; J₁ = 6,5 Hz, J₂ = 1,5 Hz; H4'), δ 7,96 (t; 1H; J = 7; H5'), δ 8,18 (dd; 1H; J₁ = 7 Hz, J₂ = 1 Hz; H6'), δ 8,25 (dd; 1H; J₁ = 6,5 Hz, J₂ = 1,5 Hz; H3'), δ 8,79 (s; 1H; N=CH), δ 10,89 (s; 1H; NH). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆): δ 110,93; 115,99; 122,35; 124,81; 127,51; 128,64; 129,49; 132,26; 134,02; 134,11; 145,28; 148,84; 150,02; 155,06; 164,13 (C=O).

3-((4-methoxybenzyliden)hydrazono) indolin-2-on (2c)

Chất rắn, màu nâu, không tan trong nước, tan trong aceton, DMF. Hiệu suất: 70% (195,5 mg). T_{nc}° : 241,0 - 242,3 °C. **MS (ESI)** m/z 279,9 [M+H]⁺. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 3,86 (s; 3H; OCH₃), δ 6,91 (d; 1H; J = 8 Hz; H4); δ 7,04 (td; 1H; J₁ = 7 Hz, J₂ = 1 Hz; H5); δ 7,14 (dt; 2H; J₁ = 5 Hz, J₂ = 2 Hz; H3', H5'), δ 7,39 (td; 1H; J₁ = 7 Hz, J₂ = 1 Hz; H6), δ 7,96 (dt; 2H; J₁ = 5 Hz, J₂ = 3 Hz; H2', H6'), δ 8,04 (d; 1H; J = 7 Hz; H7), δ 8,62 (s; 1H; N=CH), δ 10,80 (s; 1H; NH). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆): δ 55,49 (-OCH₃); 110,68; 114,73; 116,59; 122,23; 126,03; 128,79; 130,95; 133,39; 144,79; 150,62; 161,77; 162,58; 164,67 (C=O).

3-((4-clorobenzyliden)hydrazono)indolin-2-on (2d)

Chất rắn màu vàng, không tan trong nước, tan trong aceton, DMF. Hiệu suất: 85% (241,15 mg). T_{nc}° : 262,0 - 264,6°C. **MS (ESI)** m/z 279,9 [M+H]⁺. **¹H-NMR** (500 MHz, DMSO-d₆, ppm): δ 6,93 (d; 1H; J = 7,5 Hz; H4); δ 7,05 (td; 1H; J₁ = 7 Hz, J₂ = 1 Hz; H5); δ 7,43 (td; 1H; J₁ = 6,5 Hz, J₂ = 1,5 Hz; H6), δ 7,66 (dt; 2H; J₁ = 5 Hz, J₂ = 2,5 Hz; H3', H5'), δ 7,88 (dd; 1H; J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 0,5 Hz; H7), δ 8,01 (dt; 2H; J₁ = 5 Hz, J₂ = 2,5 Hz; H2', H6'), δ 8,61 (s; 1H; N=CH), δ 10,87 (s; 1H; NH). **¹³C-NMR** (125 MHz, DMSO-d₆): δ 110,92; 116,29; 122,42; 128,78; 129,36; 130,43; 132,27; 133,87; 136,70; 145,09; 150,30; 158,78; 164,41 (C=O).

Thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Trước hết, các dẫn chất được tiến hành đánh giá mức độ ức chế sự phát triển của tế bào ung thư ruột kết người HT-29 ở các nồng độ khác nhau. Kết quả thu được trình bày ở bảng 1.

Bảng 1. Hiệu quả ức chế sự phát triển tế bào ung thư HT-29 của các chất thử nghiệm

Chất thử nghiệm	2a (R = H)	2b (R = 2-NO ₂)	2c (R = 4-OCH ₃)	2d (R = 4-Cl)	ĐC
100	84,29	89,67	64,11	57,78	95,62
20	31,84	40,85	43,99	28,76	75,28
4	20,42	21,21	18,79	23,83	49,82
0,8	13,47	11,78	12,43	15,21	25,03

Ghi chú: ĐC: Ellipticin được sử dụng làm chất đối chứng dương.

Từ giá trị % ức chế sự phát triển của tế bào ung thư ở các nồng độ thử nghiệm, kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào ung thư HT-29 của các dẫn chất isatin được thể hiện qua giá trị IC_{50} ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất **2a-d**

Hợp chất	IC_{50} (μM)
2a (R = H)	177,6 \pm 18,53
2b (R = 2-NO ₂)	103,11 \pm 7,48
2c (R = 4-OCH ₃)	142,4 \pm 16,43
2d (R = 4-Cl)	259,17 \pm 19,9
ĐC (<i>Ellipticin</i>)	1,72 \pm 0,12

Kết quả cho thấy trong 4 dẫn chất tổng hợp được, dẫn chất **2b** có hoạt tính gây độc tế bào ung thư mạnh nhất trên dòng tế bào ung thư thử nghiệm HT-29 với giá trị $IC_{50} = 103,11 \pm 7,48 \mu M$. Khi so sánh ảnh hưởng của hai nhóm thế khác nhau -Cl (nhóm hút điện tử) và -OCH₃ (nhóm đẩy điện tử) được thế ở cùng vị trí 4' trên vòng phenyl đến hoạt tính gây độc trên dòng tế bào ung thư thử nghiệm, nhận thấy việc thay thế R bằng nhóm -Cl làm giảm rõ rệt tác dụng gây độc tế bào, trong khi đó nhóm -OCH₃ lại làm tăng tác dụng so với khi không có nhóm thế trên vòng phenyl. Từ 4 kết quả cũng nhận thấy rằng, khi thêm nhóm hút điện tử ở vị trí 2' (**2b**) thì hoạt tính gây độc tế bào ung thư mạnh hơn so với khi thế ở vị trí 4' (**2d**) hoặc khi không có nhóm thế (**2a**). Vì vậy, bước đầu có thể sơ bộ kết luận với khung cấu trúc này, việc thay nhóm R bằng nhóm hút điện tử ở vị trí 2' hoặc bằng nhóm đẩy điện tử ở vị trí 4' làm tăng tác dụng độc tính tế bào của các chất tổng hợp.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, 4 dẫn chất isatin aldazin đã được tổng hợp và khẳng định cấu trúc bằng các phương pháp phổ **MS**, **¹H-NMR**, **¹³C-NMR**. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư ruột kết người (HT-29) cho thấy

cả 4 chất đều không thể hiện hoạt tính trên dòng tế bào ung thư thử nghiệm với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng 103 - 259 μM . Tuy nhiên, những kết quả trên đây cũng góp phần bổ sung thêm nguồn các hợp chất tổng hợp và có thể được sử dụng trong những nghiên cứu tiếp theo với hy vọng tìm ra cấu trúc có hoạt tính gây độc tế bào ung thư tốt hơn hoặc sàng lọc các hoạt tính sinh học khác.

Đề tài được hoàn thành nhờ một phần kinh phí từ Đề tài Trường Đại học Y Dược – Đại học Huế - mã số 16/19.

Tài liệu tham khảo

1. Bhanupriya Bhrigua, Devender Pathaka, Nadeem Siddiquib, M. Shamsheer Alamb et al. (2010), "Search for biological active isatins: A short review", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 2 (4), pp. 229-235.
2. Farhan A. Khan, Aneela Maalik (2015), "Advances in pharmacology of isatin and its derivatives", *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14 (10), pp. 1937-1942.
3. Robert J. Motzer, Thomas E. Hutson, Piotr Tomczak et al. (2007), "Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma", *The New England Journal Medicine*, 356, pp. 115-124.
4. Wagdy M. Eldehna, Reem I. Al-wabli, Maha S. Almutairi et al. (2018), "Synthesis and biological evaluation of certain hydrazonoindolin-2-one derivatives as new potent anti-proliferative agents", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31 (1), pp. 867-878.
5. Alley M. C., Scudiero D. A., Monks A., Hursey M. L., Czerwinski M. J., Fine D. L., Abbott B. J., Mayo J. G., Shoemaker R. H., Boyd M. R. (1988), "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay", *Cancer Research*, 48 (3), pp. 589-601.