

NGHIÊN CỨU TỔNG HỢP VÀ XÁC ĐỊNH CẤU TRÚC VINIFERIFURAN

Đỗ Thị Thu Hằng^{1}, Đào Bùi Linh Chi¹,
Trương Quang Định¹, Trần Lê Uyên¹, Võ Đức Duy²*

1. Khoa Dược, Đại học Y dược Cần Thơ

2. Trường Đại học Uppsala, Thụy Điển

**Email: dothuhang0509@gmail.com*

TÓM TẮT

Đặt vấn đề: Viniferifuran là hợp chất chuyển hóa thứ cấp thuộc nhóm hợp chất dimer của stilben polyphenol, có chứa vòng benzofuran trong cấu trúc. Hợp chất này được công bố có các tác dụng sinh học đa dạng như chống oxy hóa, kháng viêm, kháng ung thư, bảo vệ tế bào tổn thương bởi sự chiếu xạ. **Mục tiêu nghiên cứu:** Trong nghiên cứu này, nhóm nghiên cứu tiến hành tổng hợp viniferifuran từ monomer resveratrol ở quy mô phòng thí nghiệm. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Viniferifuran được tổng hợp qua 4 giai đoạn phản ứng: Từ resveratrol thực hiện phản ứng biomimetic, xúc tác $FeCl_3$ tạo thành hỗn hợp sản phẩm; Tiến hành tinh chế bằng sắc ký cột cố định thu được hỗn hợp viniferin; Acetyl hóa hỗn hợp này và tiếp tục cho phản ứng thom hóa với 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) chuyển vòng dihydrobenzofuran thành vòng benzofuran; Sau đó, kiềm hóa sản phẩm sẽ thu được viniferifuran tinh khiết; Sản phẩm sau khi tổng hợp được tiến hành xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ hiện đại MS và NMR. **Kết quả:** Qua các giai đoạn phản ứng và tinh chế, nhóm nghiên cứu đã tổng hợp thành công viniferifuran từ resveratrol. Nghiên cứu đã mô tả quy trình thực hiện, điều kiện của từng giai đoạn phản ứng đồng thời kết quả và biện giải phổ đồ cấu trúc. **Kết luận:** Nghiên cứu đã xây dựng thành công quy trình tổng hợp viniferifuran quy mô phòng thí nghiệm theo điều kiện thực nghiệm cụ thể tại trường Đại học Y dược Cần Thơ. Kết quả nghiên cứu có tiềm năng được áp dụng trong các nghiên cứu tổng hợp hóa dược, phục vụ việc nghiên cứu tổng hợp các hợp chất tiềm năng mới có hoạt tính sinh học cao.

Từ khóa: viniferifuran, polyphenol, resveratrol, hợp chất thiên nhiên, tổng hợp hữu cơ, các phương pháp quang phổ phân tích, NMR.

ABSTRACT

STUDY ON SYNTHESIS AT LABORATORY SCALE AND STRUCTURE DETERMINATION OF VINIFERIFURAN

Do Thi Thu Hang^{1,*}, Dao Bui Linh Chi¹,Truong Quang Dinh¹, Tran Le Uyen¹, Vo Duc Duy²

1. Can Tho University of Medicine and Pharmacy, Vietnam

2. Department of Chemistry, Uppsala University, Sweden

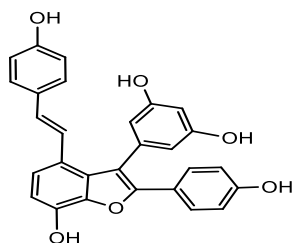
Background: Viniferifuran is a secondary metabolite belonging to the dimer group of stilben polyphenols, containing benzofuran rings in the structure. This compound was reported to possess high and diverse biological effects such as antioxidant, anti-inflammatory, anti-cancer, protecting cells from radiation damage. **Objectives:** In this study, we synthesized viniferifuran from monomer resveratrol at laboratory scale. **Materials and methods:** Viniferifuran was synthesized through four stages: From resveratrol, biomimetic reaction was done with using FeCl₃ catalyst to form a mixture; Through purifying by using classical column chromatography, we obtained a viniferin mixture; Next, we acetylated this mixture and continued doing aromatic reaction with 2,3-Dichloro-5,6-dicyano-1,4-benzoquinone (DDQ) to convert dihydrobenzofuran to benzofuran; After that, alkalization of the product would yield pure viniferifuran; The product after synthesis was conducted to identify the structure by modern spectral method NMR. **Results:** After reaction and refining steps, we were successful to obtain viniferifuran from resveratrol. The study described the implementation process, the conditions of each reaction phase and interpreted the structural spectrum. **Conclusion:** We built successfully the synthesis process of viniferifuran at laboratory scale, based on specific experimental conditions at Can Tho University of Medicine and Pharmacy laboratory. The research results have the potential to be applied in the synthesis of pharmaceutical chemistry, serving the synthesis of new potential bioactive compounds.

Keywords: viniferifuran, polyphenol, resveratrol, natural compounds, organic chemosynthesis, spectral analysis methods, MS, NMR.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong vài thập kỷ gần đây, các stilbenoid và các dẫn chất được xem là các hợp chất tiềm năng thu hút nhiều sự quan tâm của các nhà khoa học. Sự phát triển của các phương pháp tổng hợp đã tạo ra nhiều dẫn chất có hoạt tính sinh học như resveratrol, viniferifuran, dehydroampelopsin B, piceatannol hybrid, anigopreissin A..., trong đó viniferifuran (Hình 1) là hợp chất thuộc nhóm các hợp chất dimer của resveratrol có chứa vòng benzofuran trong cấu trúc [5]. Các hợp chất stilben polyphenol nói chung là các hợp chất chuyển hóa thứ cấp thường được tìm thấy nhiều trong cây ăn trái, đặc biệt là nho. Các hợp chất này được biết đến với nhiều giá trị trong y dược bởi các hoạt tính sinh học như chống oxy hóa, kháng viêm, kháng ung thư... Năm 2006, Yi-tang Li đã nghiên cứu tác dụng chống viêm của viniferifuran trên phản ứng giống như hen gây ra bởi chất dị ứng ở chuột nhạy cảm [9]. Năm 2014, Renping Liu đã nghiên cứu và chỉ ra rằng viniferifuran và một số dẫn chất của resveratrol có tác dụng ức chế tyrosin kinase trong tế bào mast, nó được chứng minh là chất ức chế cạnh tranh ATP với Ysk kinase dẫn đến có tác dụng kháng viêm [3]. Đến năm 2016, Youngeun Jung và cộng sự đã nghiên cứu và cho thấy viniferifuran có tác dụng chống tế bào ung thư [4]. Năm 2018, trong nghiên cứu của Zhu W và các cộng sự, viniferifuran được sử dụng như một chất ức chế α -glucosidase mạnh, và có thể được thử nghiệm thêm để kiểm soát glucose sau bữa ăn [10]. Thêm vào đó, Luce M. Mattio và cộng sự (2019) đã nghiên cứu về tác dụng kháng khuẩn các dẫn chất của resveratrol. Trong đó viniferifuran được xác

định là có nồng độ ức chế tối thiểu MIC là 4-16 $\mu\text{g/mL}$, kháng được 5 loài vi khuẩn gram dương bao gồm *L. monocytogenes* Scott A, *S. aureus*, *E. faecium*, *E. faecalis*, *B. Cereus* [6]. Ngoài các tác dụng sinh học trên thì viniferifuran đã được nghiên cứu là một chất chống oxy hóa mạnh hơn resveratrol theo Yaxuan Shang và cộng sự (2019), khả năng chống oxy hóa của viniferifuran được nghiên cứu dựa vào năng lượng bắt giữ gốc tự do của các nhóm hydroxyl phenol [1]. Tất cả các kết quả trên hứa hẹn viniferifuran mang lại nhiều tác dụng sinh học quan trọng và cấp thiết. Từ đó, nhu cầu sử dụng và thương mại hóa hợp chất này tăng lên nhanh chóng, trong khi hàm lượng của nó trong tự nhiên rất thấp. Từ 500 g – 1 kg bột nho khô sau khi phân lập chỉ thu được vài mg viniferifuran tinh khiết, hiệu suất phân lập từ tự nhiên khoảng 1/1000000 [2]. Vì vậy, nghiên cứu sản xuất từ nguồn thay thế, ổn định, chủ động và hàm lượng cao là rất cần thiết. Cấu trúc của viniferifuran lần đầu tiên được xác định dựa trên cơ sở phân tích phổ NMR bởi Niwa và đồng nghiệp vào năm 1999 [2]. Các dimer resveratrol được bắt đầu tổng hợp bởi Snyder và các đồng nghiệp vào năm 2007, sau đó một số lượng lớn các phương pháp tổng hợp các stilbenoid được thực hiện trong nghiên cứu khác nhau [7]. Và gần đây, Duy D. Vo, Mikael Elofsson (2016) đã tổng hợp thành công viniferifuran với con đường ngắn hơn với hiệu suất thu được là 13% [8]. Ở Việt Nam, hiện nay do điều kiện thực hiện hóa tổng hợp còn hạn chế nên chưa có nghiên cứu về phương pháp tổng hợp viniferifuran cũng như các hợp chất stilbenoid. Xuất phát từ lý do trên mà chúng tôi chọn đề tài “Nghiên cứu tổng hợp và xác định cấu trúc viniferifuran” với mục đích nghiên cứu quy trình tổng hợp viniferifuran từ resveratrol trong điều kiện thực nghiệm quy mô phòng thí nghiệm tại Việt Nam.



Hình 1: Công thức cấu tạo viniferifuran

II. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

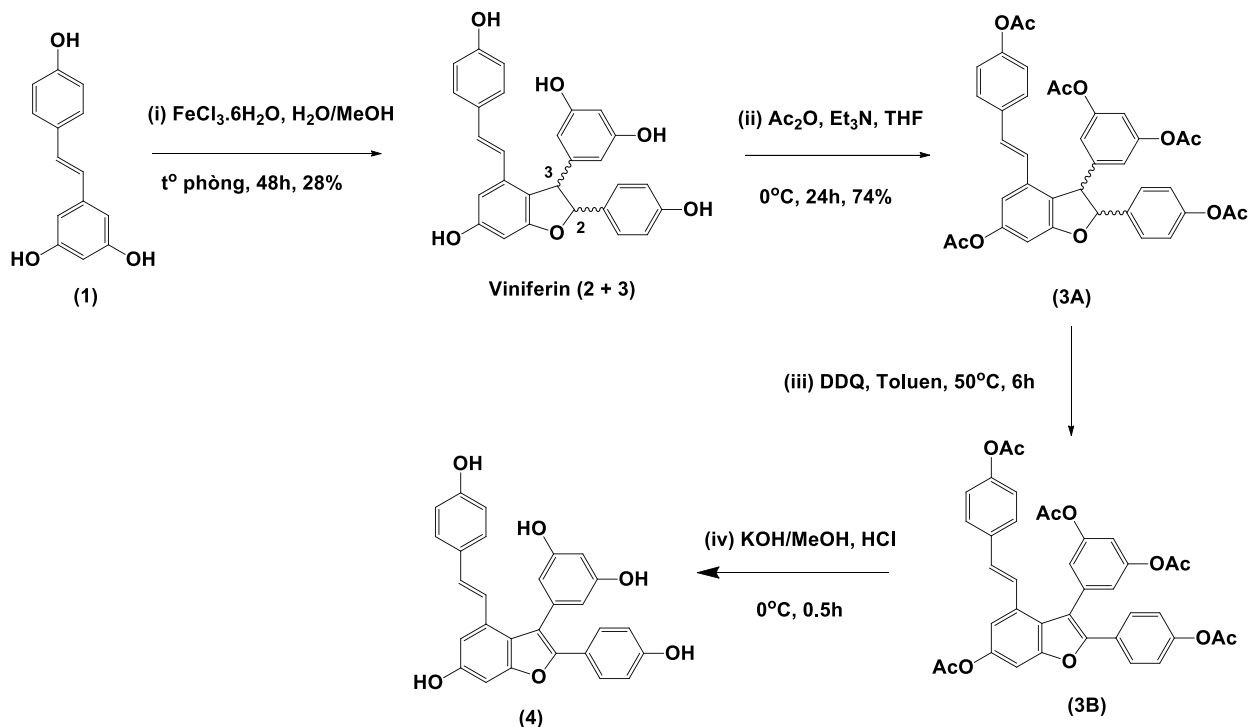
Hợp chất viniferifuran.

2.2. Dung môi, điều kiện thực hiện

Các hóa chất, nguyên liệu sử dụng có nguồn gốc từ Acros, Merck; loại dùng cho tổng hợp và phân tích. Sắc ký lớp mỏng thực hiện trên bản mỏng silica gel 60_{F254} Merck, hiện vết dưới đèn UV 254 nm, UV 365 nm và thuốc thử vanilin sulfuric (VS). Phổ khối MS được ghi bằng máy LC-ESI/MS Shimadzu 2020 tại Viện kiểm nghiệm Thuốc thành phố Hồ Chí Minh. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi bằng máy Bruker AC-500 MHz tại Phòng thí nghiệm Hoá Dược, Trường Đại học khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia Hà Nội với TMS làm chất chuẩn nội, độ dịch chuyển hóa học (δ) tính theo ppm.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu thực nghiệm tổng hợp hóa học (Sơ đồ 1). Từ chất ban đầu resveratrol (1), sử dụng chất xúc tác FeCl_3 , thực hiện phản ứng dimer hóa tạo thành hỗn hợp các sản phẩm. Sau khi tinh chế bằng sắc ký cột có thể thu được hỗn hợp ϵ -viniferin (2) và ω -viniferin (3). Acetyl hóa hỗn hợp (2 + 3), tiếp tục cho phản ứng thơm hóa với DDQ sẽ chuyển vòng dihydrobenzofuran thành vòng benzofuran. Sau đó kiềm hóa sản phẩm trung gian sẽ thu được viniferifuran (4) tinh khiết. Các sản phẩm thu được từ các giai đoạn phản ứng được sơ bộ kiểm tra độ tinh khiết bằng sắc ký lớp mỏng. Sau khi tổng hợp được (4), tiến hành xác định và biện giải cấu trúc của (4) bằng phương pháp phổ khối (MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR).



III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Quy trình tổng hợp

Quy trình tổng hợp từ resveratrol qua 4 bước phản ứng và tinh chế qua từng giai đoạn bằng sắc ký cột, thực hiện sắc ký lớp mỏng sau từng giai đoạn với hệ dung môi hexan – ethyl acetat – formic acid (1 : 1 : 2 giọt), phát hiện vết bằng UV 254 nm và UV 365 nm, thuốc thử VS.

Giai đoạn (i): Tổng hợp viniferin (2 + 3)

Cho 3,09 g resveratrol (1) vào hỗn hợp MeOH-H₂O (1/1, v/v, 100 mL) trong bình cầu tại nhiệt độ phòng, sau đó thêm 3,72 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong 48 giờ. Cô quay hỗn hợp thu được lắc với 75 mL ethyl acetat (EtOAc). Hỗn hợp sau khi lắc được làm khô H₂O bằng Na_2SO_4 và cô cạn bằng máy cô quay. Sắc ký cột (heptan:aceton = 2:1) cho hỗn hợp viniferin (2 + 3) dưới dạng chất rắn màu vàng có khối lượng là 0,86 g. Hiệu suất thu được là 28%.

Giai đoạn (ii): Tổng hợp (E)-5-(6-acetoxy-2-(4-acetoxyphenyl)-4-(4-acetoxystyryl)-2,3-dihydrobenzofuran-3-yl)-1,3-phenylene diacetate (3A)

Cho hỗn hợp 0,43 g (2 + 3) vào 50 mL tetrahydrofuran (THF) ở 0 °C, sau đó thêm 1,2 mL anhydrid acetic (Ac₂O) và 1 mL triethylamine (Et₃N). Hỗn hợp được khuấy qua đêm ở nhiệt độ phòng. Dung môi đã bay hơi và hỗn hợp được tinh chế bằng sắc ký cột, sử dụng dung môi heptan:EtOAc = 3:2 thu được 0,35 g sản phẩm (3A) dưới dạng chất rắn màu trắng. Hiệu suất thu được là 74%.

Giai đoạn (iii): Tổng hợp (E)-5-(6-acetoxy-2-(4-acetoxyphenyl)-4-(4-acetoxystyryl) benzofuran-3-yl)-1, 3-phenylene diacetate (3B)

Tiếp theo, lấy 0,1 g sản phẩm acetyl hóa thu được cho vào 27 mL toluen ở nhiệt độ phòng, thêm 0,5 g DDQ. Hỗn hợp được khuấy hồi lưu ở 50 °C trong 6 giờ. Sau khi làm nguội, hỗn hợp được lọc qua giấy lọc và cô quay dưới áp suất giảm. Hỗn hợp được tinh chế qua sắc ký cột (heptan:EtOAc = 4:1) cho sản phẩm (3B) là dạng chất rắn màu trắng.

Giai đoạn (iv): Tổng hợp viniferifuran (4)

Cho sản phẩm thu được từ giai đoạn (iii) vào vừa đủ MeOH ở 0°C, thêm 0,1 g KOH. Hỗn hợp được khuấy ở 0°C trong 30 phút và sau đó được axit hóa bằng HCl 1N đến pH = 1. Pha loãng hỗn hợp với 25 mL EtOAc, rửa bằng 10 mL H₂O và 50 mL nước muối bão hòa (brine). Pha hữu cơ được làm khô bằng Na₂SO₄ và cô cạn dưới áp suất giảm. Sắc ký cột (DCM:MeOH= 9:1) cho 0,01 g sản phẩm (4) dưới dạng chất rắn màu nâu vàng. Hiệu suất 14,7% cho cả bước (iii) và (iv).

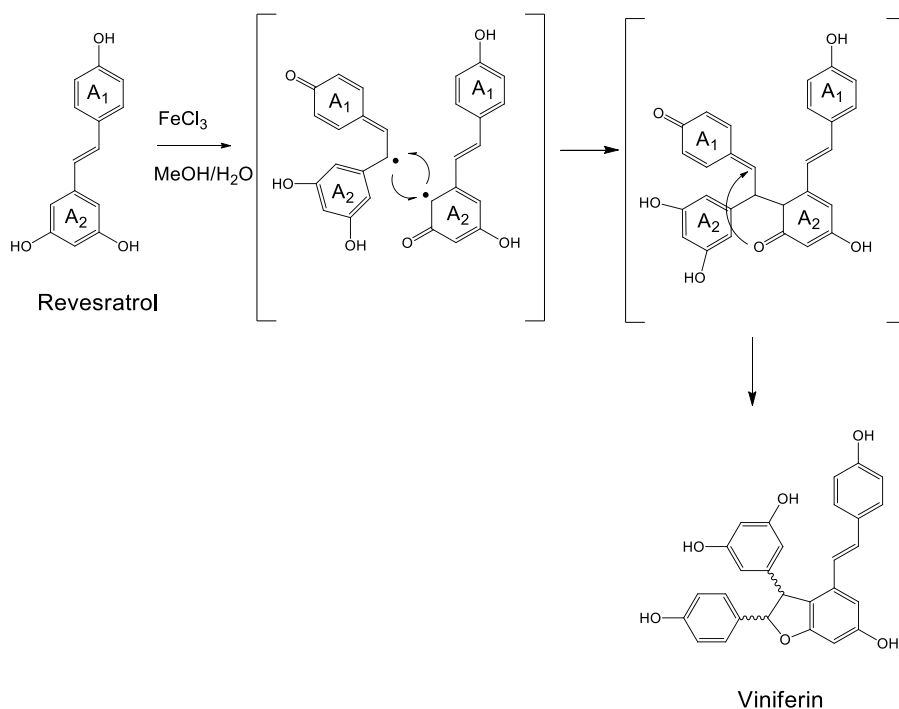
3.2 Xác định cấu trúc viniferifuran bằng MS, NMR

¹H NMR (500MHz, CD₃OD) δ (ppm): 7.45 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 7.02 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 7.01 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 6.96 (s, 1H), 6.89 (s, 1H), 6.83 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 6.72 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.68 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H), 6.50 (t, *J* = 2.2 Hz, 1H), 6.43 (d, *J* = 2.2 Hz, 2H). MS (ESI, [M-H]⁻, m/z): tính toán: 453,13; tìm thấy: 453,13. Dữ liệu được so sánh với báo cáo của Duy D. Vo, Mikael Elofsson (2016) cho thấy chất tổng hợp được là viniferifuran.

IV. BÀN LUẬN

Phương pháp biomimetic thường sử dụng phản ứng dimer oxy hóa của các monostilbenoid bằng enzym hoặc kim loại. Trong bước (i), chúng tôi sử dụng tác nhân là FeCl₃ để dimer hóa resveratrol thành hỗn hợp dimer viniferin, FeCl₃ với vai trò là chất oxy hóa định hướng cho hình thành sản phẩm chứa vòng dihydrobenzofuran (viniferin), giảm các sản phẩm phụ tạo thành trong phản ứng dimer hóa (Sơ đồ 2). Để thu được vòng benzofuran sau phản ứng acetyl hóa hỗn hợp viniferin, phải sử dụng tác nhân khử mạnh để thực hiện phản ứng dehydro hóa tại vòng dihydrobenzofuran. DDQ được xem là một chất oxy hóa mạnh, có thể dehydro tại vị trí mong muốn này. Việc tối ưu hóa quy trình tổng hợp phụ thuộc vào nhiều yếu tố. Việc tinh chế các hỗn hợp sản phẩm cũng là một trong những yếu tố quan trọng ảnh hưởng đến hiệu suất tổng hợp. Dựa trên điều kiện thực nghiệm, nghiên cứu đã sử dụng phương pháp sắc ký cột cô điển tách hỗn hợp sau các phản ứng. Kết quả cho thấy tinh chế bằng sắc ký cột cô điển với tỷ lệ dung môi thực hiện trong nghiên cứu tương đối hiệu quả. Tuy nhiên, quá trình tinh chế hỗn hợp các sản phẩm phải trải qua nhiều lần sắc ký cột với thời gian lưu cột của các chất kéo dài ảnh hưởng tương đối lớn đến hiệu suất thu được. Để cải thiện vấn đề này, sắc ký cột nhanh là một gợi ý tiềm năng (Duy D. Vo, Mikael Elofsson (2016)). Từ kết quả phổ khối MS và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR cho thấy sản phẩm có cấu trúc như dự kiến, tuy nhiên sản phẩm cần được tiếp tục tinh chế

và tổng hợp với lượng lớn hơn để có thể tiến hành thử hoạt tính sinh học trong tương lai gần.



Sơ đồ 2: Cơ chế phản ứng đóng vòng tạo hỗn hợp viniferin

Các nghiên cứu về quy trình tổng hợp các dẫn xuất của resveratrol, đặc biệt là viniferifuran trên thế giới còn hạn chế. Kết quả nghiên cứu này cung cấp dữ liệu cơ sở cho các nghiên cứu tiếp theo.

V. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tổng hợp thành công viniferifuran từ resveratrol qua 4 bước với hiệu suất 2,3% trong điều kiện và quy mô phòng thí nghiệm. Sản phẩm cuối cùng thu được được xác định bằng đo phổ MS, NMR. Các dữ liệu phổ của sản phẩm đều trùng khớp với cấu trúc chuẩn. Kết quả tổng hợp được viniferifuran có ý nghĩa trong tổng hợp các hợp chất mang hoạt tính sinh học cao tiềm năng và trong việc nghiên cứu thiết lập mối quan hệ cấu trúc-tác dụng của các stilbenoid và các chất tương tự.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen K., SHANG Y., Zhou H., Li X.Z., & Zhou J. (2019), Theoretical Studies on the Antioxidant Activity of Viniferifuran. *New Journal of Chemistry*, 43, pp 15736–15742.
2. J. Ito, Y. Takaya, Y. Oshima and M. Niwa (1999), New Oligostilbenes Having a Benzofuran from *Vitis vinifera* 'Kyohou'. *Tetrahedron*, 55, pp 2529-2544.
3. Jiang M., Li R., Chen Y., Zheng Q., Fan S., & Liu P. (2014), A Combined Experimental and Computational Study of Vam 3, a Derivative of Resveratrol, and Syk Interaction. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), pp 17188–17203.
4. Jung Y., Singh D. K., & Kim I. (2016) , Symmetry-based approach to oligostilbenoids: Rapid entry to viniferifuran, shoreaphenol, malibatol A, and diptoindonesin G. *Beilstein Journal of Organic Chemistry*, 12, pp 2689–2693.

5. Krzyzanowski, A., Saleeb, M., & Elofsson, M. (2018), Synthesis of Indole-, Benzo[b]thiophene-, and Benzo[b]selenophene-Based Analogues of the Resveratrol Dimers Viniferifuran and (\pm)-Dehydroampelopsin B. *Organic Letters*, 20(21), pp 6650-6654.
6. Mattio, L.M., Dallavalle, S., Musso, L. *et al.* (2019), Antimicrobial activity of resveratrol-derived monomers and dimers against foodborne pathogens. *Scientific Reports*, 9(1).
7. Snyder, S.A., Zografos, A.L. and Lin (2007), Total synthesis of resveratrol-based natural products: A chemoselective solution. *Angewandte Chemie International Edition*, 46, pp 8186-8191.
8. Vo, D. D., & Elofsson, M. (2016), Total Synthesis of Viniferifuran, Resveratrol-Piceatannol Hybrid, Anigopreissin A and Analogues - Investigation of Demethylation Strategies. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 358(24), pp 4085–4092.
9. Yi-tang Li, Chun-suo Yao, Jin-ye Bai, Mao Lin, Gui-fang Cheng (2006), Anti-inflammatory effect of amurensin H on asthma-like reaction induced by allergen in sensitized mice. *Acta Pharmacologica Sinica*, 27, pp 735–740.
10. Zhu W, Sun S, Yang F, Zhou K. (2018), UHPLC/MS Identifying Potent α -glucosidase Inhibitors of Grape Pomace via Enzyme Immobilized Method. *Journal of Food Science*, 83(4), pp 1131-1139.

(Ngày nhận bài: 03/08/2020 - Ngày duyệt đăng: 07/09/2020)
