

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

BỘ Y TẾ

HUỲNH NGUYỄN HOÀI PHƯƠNG

**TỔNG HỢP VÀ THỬ HOẠT TÍNH KHÁNG NẤM, KHÁNG
KHUẨN *IN VITRO* VÀ *IN SILICO* CỦA CÁC DẪN CHẤT
MANG NHÓM MORPHOLIN**

Ngành: HOÁ DƯỢC

Mã số: 62720403

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. Hồ Chí Minh - 2023

Công trình được hoàn thành tại:

Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Trương Phương

2. GS.TS. Thái Khắc Minh

Phản biện 1: GS.TS. Trần Thành Đạo

Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

Phản biện 2: PGS.TS. Hoàng Thị Kim Dung

Viện công nghệ Hoá học TP. Hồ Chí Minh

Phản biện 3: PGS.TS. Dương Xuân Chử

Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường

họp tại

vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam

1. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

a. Đặt vấn đề và mục tiêu nghiên cứu

Morpholin là một trong những dị vòng quan trọng trong nghiên cứu Hoá Dược. Nghiên cứu SAR hay QSAR trên các chất có chứa dị vòng morpholin cho thấy trong rất nhiều trường hợp vòng morpholin cho thấy nhiều đặc tính có lợi cho việc tạo nên hoạt tính sinh học của các phân tử mang nó. Morpholin với bản chất là một amin bậc 2 nên có thể tham gia vào một số phản ứng như phản ứng thế ái nhân, phản ứng Mannich, phản ứng amid hoá, ... Theo những nghiên cứu gần đây, một số base Mannich chứa morpholin, các dẫn chất morpholinoacetamid, dẫn chất imidazol-4,5-dicarboxamid, hay dẫn chất chalcon,... đều có tác dụng sinh học rất phong phú. Các hợp chất này đều thuận lợi cho việc phát triển các hợp chất mới chứa dị vòng morpholin với mong muốn tìm ra những chất mới có hoạt tính sinh học tốt.

Hiện nay, vấn đề kháng khuẩn, kháng nấm, tuy là một chủ đề đã được nghiên cứu từ rất lâu nhưng luôn là đề tài thu hút nhiều sự chú ý. Nhiều chủng vi khuẩn đa kháng đã xuất hiện và gây nhiều khó khăn trong việc điều trị bệnh nhiễm khuẩn. Do vậy, việc nghiên cứu tìm ra kháng sinh mới vẫn luôn được nhiều nhà nghiên cứu quan tâm.

Đề tài “ Tổng hợp và thử hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm *in vitro* và *in silico* của các dẫn chất mang nhóm morpholin” được tiến hành với các mục tiêu cụ thể như sau:

1. Tổng hợp các dẫn chất morpholinoacetamid

2. Tổng hợp các dẫn chất base Mannich chứa morpholin
3. Tổng hợp các dẫn chất imidazol-4,5-dicarboxamid chứa morpholin
4. Tổng hợp các dẫn chất morpholinoalkoxychalcon với dây nối alkoxy trên cả vòng A và vòng B
5. Tinh khiết hoá, kiểm tra cấu trúc dẫn chất tổng hợp bằng các phương pháp phổ như IR, MS, NMR.
6. Thử hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm *in vitro* và *in silico* của các dẫn chất tổng hợp.

b. Tính cấp thiết của đề tài

Việc nghiên cứu tìm kiếm thuốc mới luôn là nhu cầu thường trực trong việc điều trị và kiểm soát các bệnh nhiễm khuẩn do việc đề kháng kháng sinh ngày càng gia tăng. Do vậy việc nghiên cứu tổng hợp, tìm kiếm các hợp chất mới, bổ sung vào ngân hàng dẫn chất tổng hợp đồng thời sàng lọc các hoạt tính sinh học, ở đây là hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm là nghiên cứu có ý nghĩa khoa học, cấp thiết.

c. Những đóng góp mới của luận án

- Tổng hợp được 18 dẫn chất morpholinoacetamid mới.
- Tổng hợp được 3 dẫn chất base Mannich chứa morpholin trong đó có 2 dẫn chất mới.
- Tổng hợp được 20 dẫn chất imidazol-4,5-dicarboxamid chứa morpholin mới.

- Tổng hợp được 18 dẫn chất morpholinoalkoxychalcon với chiều dài các dây nối khác nhau trên cả vòng A và vòng B, trong đó có 17 dẫn chất mới.
- Xây dựng được 1 uy trình tổng hợp morpholinoalkoxychalcon với dây nối trên vòng B mới.
- Sàng lọc được một số hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm trung bình.
- Xây dựng được 10 mô hình docking phân tử trên các đích tác động thường gặp nhất của vi khuẩn (5) và vi nấm (5), đánh giá mô hình và sử dụng các mô hình này cho việc nghiên cứu *in silico*.

d. Bố cục của luận án: Luận án gồm 142 trang với bố cục như sau: đặt vấn đề (2 trang), tổng quan tài liệu (30 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (18 trang), kết quả (77 trang), bản luận (13 trang), kết luận (1 trang), đề nghị (1 trang), sử dụng 82 tài liệu tham khảo.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1. Morpholin trong các hợp chất tự nhiên và tổng hợp

- Các dẫn chất morpholin xuất hiện rộng rãi trong cấu trúc của thuốc giảm đau, thuốc kháng viêm, thuốc kháng ung thư, thuốc trầm cảm, ức chế HIV-protease, kháng viêm, kháng virus.
- Một số các chất tự nhiên có chứa cấu trúc morpholin có thể kể đến như: polygonafolin – dẫn chất phenoxypropylen có tác dụng trên leshmania, acotartarin A và C có tác dụng kích thích thèm ăn, chelonin A và C có hoạt tính kháng viêm và kháng

khuẩn, *syn*-3-isopropyl-6-(4-methoxybenzyl)-4-methyl-morpholin-2,5-dion có hoạt tính kháng ung thư, monanchocidin A có hoạt tính kháng khối u.

- Nhiều phương pháp tổng hợp dẫn chất morpholin đã được báo cáo.

2. Dẫn chất morpholinoacetamid

- Phản ứng tổng hợp được thực hiện qua 2 giai đoạn: tổng hợp dẫn chất 2-cloroacetamid và tổng hợp dẫn chất morpholinoacetamid.

- Một số hoạt tính sinh học của nhóm hợp chất này: kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế IMPDH (Inosin monophosphat dehydrogenase), kháng viêm, ...

3. Dẫn chất base Mannich chứa morpholin

- Phản ứng Mannich được thực hiện giữa một keton hay aldehyd với amin bậc 1 hay 2 và 1 aldehyd/keton không thể bị enolat hoá.

- Phản ứng được phát triển theo một số hướng: không sử dụng xúc tác, sử dụng xúc tác kim loại hay prolin cho hiệu suất cao, phản ứng Mannich với aldehyd có thể bị enolat hoá để tạo thành hợp chất γ -amino carbonyl, ...

- Một số hoạt tính sinh học của các base Mannich chứa morpholin: kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế AChE, BChE, glutathion *S*-transferase (GST), ...

4. Dẫn chất imidazol-4,5-dicarboxamid

- Quy trình tổng hợp imidazol-4,5-dicarboxamid bất đối xứng đã được phát triển bởi Wyznycia và Perchellet nhưng còn một số điểm cần cải tiến để có thể áp dụng dễ dàng hơn trong phòng thí nghiệm.

- Một số hoạt tính sinh học của các dẫn chất imidazol-4,5-dicarboxamid: ức chế HIV-1 protease, ức chế sự gắn kết của glycoprotein E2 của virus viêm gan C trên receptor CD81 trên bề mặt tế bào người, ức chế tăng sinh dòng tế bào ung thư HL-60, ức chế FASN (Fatty Acid Synthase),...

5. Dẫn chất chalcon chứa morpholin

- Chalcon có thể được tổng hợp bằng rất nhiều phương pháp khác nhau, trong đó phương pháp được sử dụng phổ biến là phản ứng ngưng tụ Claisen-Schmidt.

- Phương pháp tổng hợp dẫn chất morpholinoalkoxychalcon:

(1) Tổng hợp dẫn chất chalcon rồi gắn thêm cấu trúc morpholin.

(2) Tổng hợp các dẫn chất acetophenon hay aldehyd có chứa cấu trúc morpholin rồi tổng hợp dẫn chất chalcon.

- Hoạt tính sinh học của một số hợp chất chalcon chứa morpholin: kháng khuẩn, kháng nấm, ức chế MAO, AChE, ức chế tế bào Vero,...

6. Docking phân tử

- Docking phân tử là kỹ thuật tạo mô hình để dự đoán cách thức để một protein tương tác với phối tử để có thể tạo thành một phức hợp có khả năng tăng cường hay ức chế chức năng sinh

học của protein. Mục đích của docking phân tử là nhằm xác định cấu dạng của các phối tử trong vị trí liên kết với protein và dự đoán ái lực của nó với protein.

- Một số phần mềm docking có thể kể đến hiện nay như Gold, FlexX, Dock, Auto Dock Vina, Glide, ... với thuật toán sử dụng khác nhau. Tùy vào độ tin cậy, chức năng, mô hình cần nghiên cứu và điều kiện nghiên cứu mà lựa chọn phần mềm docking cho phù hợp.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Tổng hợp hoá học các nhóm dẫn chất

- Các nhóm dẫn chất được nghiên cứu: morpholinoacetamid (18 dẫn chất), base Mannich chứa morpholin (3 dẫn chất), imidazol-4,5-dicarboxamid chứa morpholin (20 dẫn chất), morpholinoalkoxychalcon với dây nối có chiều dài khác nhau trên vòng A và vòng B (18 dẫn chất).

- Các phản ứng hoá học sử dụng để tổng hợp: phản ứng thế ái nhân, phản ứng oxi hoá khử, phản ứng dimer hoá, phản ứng Mannich, phản ứng Claisen-Schmidt,...

- Các phương pháp phổ sử dụng để xác định cấu trúc: điểm chảy, phổ hồng ngoại (IR), phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), khối phổ (MS).

2.2. Thử hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn *in vitro*

Các hợp chất tổng hợp được thử hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm bằng phương pháp khuếch tán trên thạch trên các chủng vi khuẩn, vi nấm sau:

Bảng : Vi khuẩn và vi nấm sử dụng trong thử nghiệm hoạt tính

Vi khuẩn	Vi nấm
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404
<i>Streptococcus faecalis</i> ATCC 29212	
<i>Staphylococcus aureus</i> nhạy cảm methicillin (MSSA) ATCC 29213	
<i>Staphylococcus aureus</i> đề kháng methicilin (MRSA) ATCC 43300	

2.3. Đánh giá hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn *in silico*

Mô hình docking phân tử được xây dựng trên các đích tác động sau:

Trên vi khuẩn (*S. aureus*): ADN gyrase (mã: 5CDQ, ligand đồng kết tinh: moxifloxacin); Topoisomerase IV (mã: 6FM4, ligand đồng kết tinh: levofloxacin); PBP2a (mã: 3ZG0, ligand đồng kết tinh: ceftarolin), Ribosom 30S (mã: 7BGD và 1HNW, ligand đồng kết tinh: tetracyclin); Ribosom 50S (mã: 6WQQ, ligand đồng kết tinh: radezolid).

Trên vi nấm (*C. albicans*): Sterol 14a-demethylase (mã: 5TZ1, ligand đồng kết tinh: VT1161); Dihydrofolate reductase (mã: 1IA4, ligand đồng kết tinh: GW2021); Exo-beta-(1,3)glucanase (mã: 1EQC, ligand đồng kết tinh: castanospermin); *N*-myristoyltransferase (mã: 1IYL, ligand đồng kết tinh: (1-methyl-1*H*-imidazol-2-yl)-(3-methyl-4-benzofuran-2-yl)-methanon); Serine-Threonine phosphatase (mã: 5JPF, ligand đồng kết tinh: Mycrocystin).

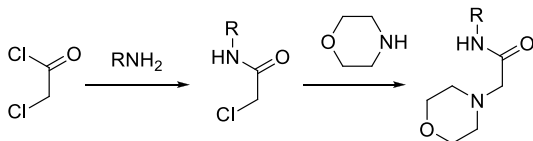
- Đặc tính dược động học và độc tính (ADMET) được đánh giá bằng cách sử dụng phần mềm ADMETlab2.0.

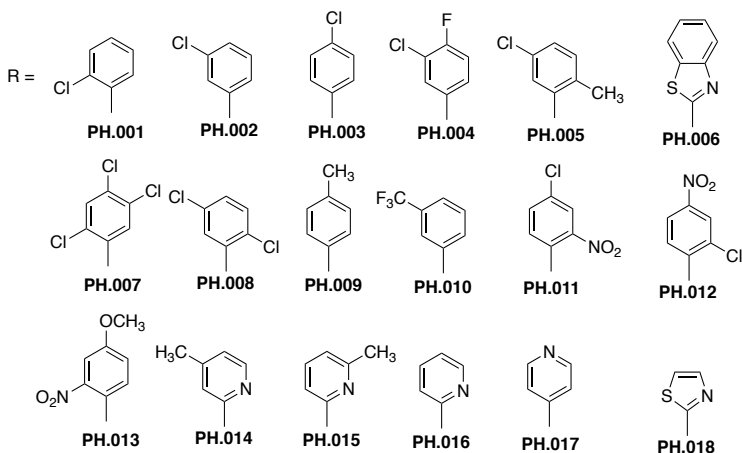
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Tổng hợp hoá học các nhóm dẫn chất

3.1.1. Nhóm dẫn chất morpholinoacetamid

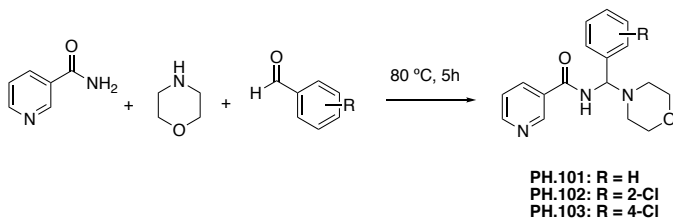
18 dẫn chất trong nhóm này được tổng hợp theo sơ đồ:





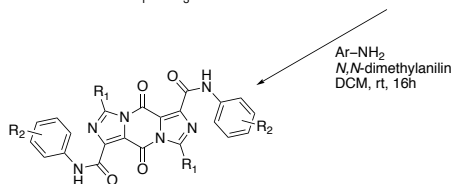
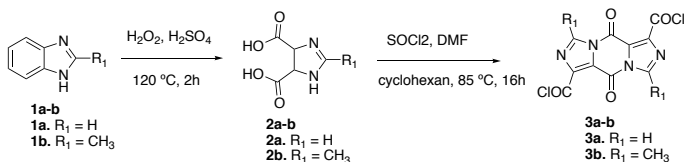
3.1.2. Nhóm dẫn chất base Mannich chứa morpholin

3 base Mannich chứa morpholin được tổng hợp theo sơ đồ:



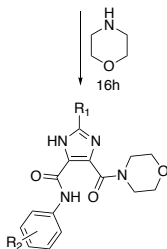
3.1.3. Nhóm dẫn chất imidazol-4,5-dicarboxamid

20 hợp chất tổng hợp được thực hiện theo quy trình sau:



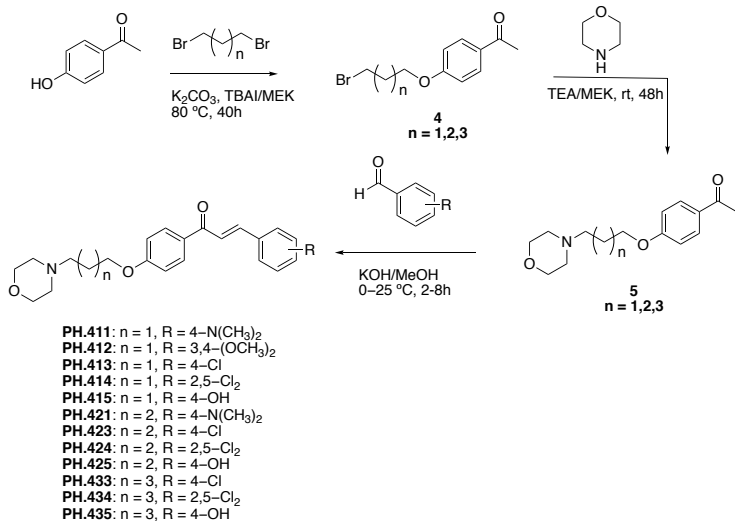
- 201.** R₁ = H, R₂ = 2-Cl
202. R₁ = H, R₂ = 3-Cl
203. R₁ = H, R₂ = 2,5-Cl₂
204. R₁ = H, R₂ = 2,4,5-Cl₃
205. R₁ = H, R₂ = 4-Cl
206. R₁ = H, R₂ = 3,4-Cl₂
207. R₁ = H, R₂ = 4-OCH₃, 2-NO₂

- 301.** R₁ = CH₃, R₂ = 2-Cl
302. R₁ = CH₃, R₂ = 3-Cl
303. R₁ = CH₃, R₂ = 2,5-Cl₂
304. R₁ = CH₃, R₂ = 2,4,5-Cl₃
305. R₁ = CH₃, R₂ = 4-Cl
306. R₁ = CH₃, R₂ = 3,4-Cl₂
307. R₁ = CH₃, R₂ = 4-OCH₃, 2-NO₂
308. R₁ = CH₃, R₂ = 2-Cl, 4-NO₂
309. R₁ = CH₃, R₂ = 4-Cl, 2-NO₂
310. R₁ = CH₃, R₂ = 3-CF₃
311. R₁ = CH₃, R₂ = H
312. R₁ = CH₃, R₂ = 5-Cl, 2-CH₃
313. R₁ = CH₃, R₂ = 3-Cl, 4-F

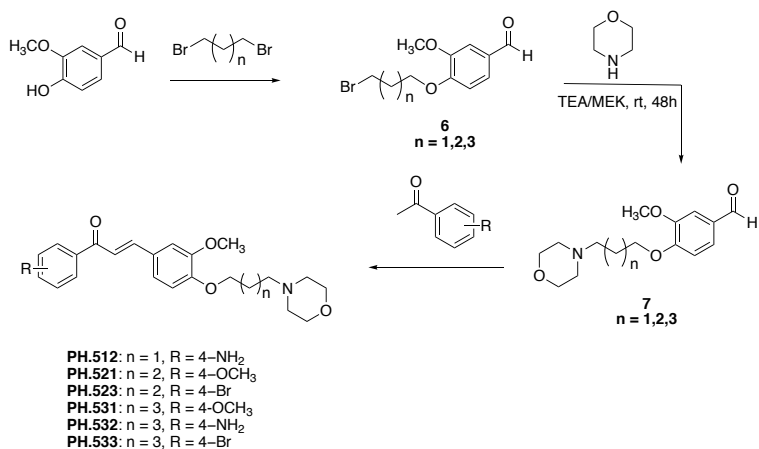


3.1.4. Nhóm dẫn chất morpholinoalkoxychalcon

12 dẫn chất chalcon mang nhóm morpholin trên vòng A



6 dẫn chất chalcon mang nhóm morpholin trên vòng B



3.2. Kết quả hoạt tính kháng nấm, kháng khuẩn *in vitro*

Các hợp chất được tổng hợp sau khi tinh khiết hoá và xác nhận cấu trúc bằng các phương pháp phổ sẽ được định tính hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm trên các chủng vi khuẩn, vi nấm thử nghiệm. Các hợp chất cho kết quả dương tính sẽ được tiếp tục thử nghiệm để tính toán giá trị MIC.

Kết quả định tính cho thấy hầu hết các hợp chất không có hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm. Các hợp chất cho hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm yếu hầu hết là các chalcon với dây nối alkoxy trên cả vòng A và vòng B.

Kết quả MIC được trình bày trong bảng sau

Bảng: Kết quả MIC (mM) của các chất dương tính trên vi khuẩn

Mã hợp chất	<i>S. faecalis</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA
PH.521	0,60	1,20	1,20
PH.523	2,26	1,13	1,13
PH.435	2,50	2,50	2,50

Bảng: Kết quả MIC (mM) của các chất dương tính trên vi nấm

Mã hợp chất	<i>A. niger</i>	<i>C. albicans</i>
PH.423	3,01	3,01
PH.433	2,39	2,39

PH.435	2,50	2,50
PH.532	2,33	2,33
PH.521	2,41	2,41
PH.531	2,26	2,26
PH.523	2,26	2,26
PH.533	2,04	2,04

3.3. Kết quả khảo sát cơ chế tác dụng *in silico* của các chất có tác dụng tiềm năng

Mô hình docking phân tử

Xác định vị trí khoang gắn kết và tái gắn kết ligand đồng kết tinh

Đích tác động	Mã PDB	Ligand đồng kết tinh	RMSD redocking (Å)
Vi khuẩn			
ADN gyrase (Topoisomerase II) (MRSA)	5CDQ	Moxifloxacin	0,66
Topoisomerase IV (<i>S.pneumoniae</i>)	6FM4	Levofloxacin	1,02

PBP2a allosteric (MRSA)	3ZG0	Ceftarolin	2,18
Ribosom 30S* (MRSA dựa trên sự giống hàng với <i>Thermus thermophilus</i>)	7BGD và 1HNW*	Tetracyclin	0,55
Ribosome 50S (MRSA)	6WQQ	Radezolid	1,47
Vi nấm			
Sterol 14a- demethylase	5TZ1	VT1161	1,70
Dihydrofolat reductase	1IA4	GW2021 (chứa morpholin)	0,61
Exo-beta-(1,3)- glucanase	1EQC	Castanospermin	0,33
<i>N</i> -myristoyl- transferase	1IYL	(1-methyl-1 <i>H</i> - imidazol-2-yl)- (3-methyl-4- benzofuran-2-	0,88

		yl)-methanon	
Serin-Threonin phosphatase	5JPF	Microcystin	1,60

Hầu hết các mô hình đều có giá trị RMSD nhỏ hơn 2Å, cho thấy các mô hình đều có sự tái lập tốt các cấu trúc từ thực nghiệm và có đủ độ tin cậy, phù hợp với nghiên cứu

Kết quả sàng lọc qua mô hình docking phân tử

Tất cả các chất tổng hợp được tiến hành dock vào khoang gắn kết của 10 đích tác động trên. Kết quả cho thấy 100% các chất đều được dock thành công vào 10 khoang gắn kết với điểm số docking đều âm, điểm số docking âm nhất khoảng -10 kcal/mol. Trên 10 đích tác động, nhóm hợp chất cho điểm số docking âm nhất là dẫn chất imidazol-4,5-dicarboxamid và dẫn chất morpholinoalkoxychalcon với dây nối trên vòng A.

Kết quả sàng lọc dược động học – độc tính

Các chất tổng hợp được sàng lọc qua mô hình dược động học – độc tính (ADMET) qua phần mềm ADMETlab2.0.

Yêu cầu về ngưỡng rủi ro	Thoả	Không thoả
Khả năng tan trong nước (logS, -4 – 0,5)	30	29
Tính chất phân bố dầu/nước (logP, 0 – 3)	38	21

Hấp thu qua ruột (HIA<0,7)	58	1
Độc tính gây ung thư (Carcinogenicity <0,7)	34	25
Luật 5-Lipinski	58	1

3.4. Bàn luận

Bàn luận về phân tổng hợp hoá học

- Phản ứng tổng hợp dẫn chất morpholinoacetamid cho hiệu suất tương đối cao (70-95%) trong thời gian ngắn (2-3 giờ).

- Phản ứng tổng hợp các dẫn chất *N*-(morpholino-(phenyl)methyl)nicotinamid được theo dõi theo thời gian và được thực hiện ở các nhiệt độ khác nhau. Theo kết quả nghiên cứu, nhiệt độ 80 °C và phản ứng tiến hành trong 5 giờ sẽ cho sản phẩm với quy trình tinh chế cũng như hiệu suất tối ưu. Với mong muốn mở rộng các hợp chất tổng hợp, một số hợp chất có H linh động được sử dụng để thay thế cho nicotinamid như: acetophenon, acetanilid, 4-hydroxyphenylacetamid, isoniazid; phản ứng sử dụng các base khác nhau hay sử dụng thêm xúc tác là các acid Lewis. Tuy nhiên, phản ứng Mannich với các hợp chất này không xảy ra hay tạo thành chủ yếu là muối iminium giữa dẫn chất aldehyd và morpholin.

- Phản ứng oxy hóa cắt mạch benzimidazol và 2-methylbenzimidazol với tác nhân oxy hóa là hydrogen peroxid 30% cho hiệu suất khá cao (79,5-80,1%). Tỷ lệ giữa benzimidazol và 2-methylbenzimidazol và hydrogen peroxid

30% được chọn là 1:18. Phản ứng anilid hóa dẫn chất pyrazindion diacid diclorid cho hiệu suất cao. Tính kém tan của nguyên liệu pyrazindion diacid diclorid cũng như sản phẩm gây trở ngại lớn trong quá trình theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng. Do đó thời gian phản ứng chúng tôi tham khảo nghiên cứu của Perchellet, đối với dẫn chất anilin là 2-cloroanilin, 3-cloroanilin, anilin, 5-cloro-2-methylanilin phản ứng được thực hiện trong 3 giờ. Còn đối với dẫn chất anilin là còn lại phản ứng được thực hiện trong 16 giờ.

Phản ứng mở vòng pyrazindion sử dụng tác nhân morpholin cho hiệu suất tương đối thấp (14,0-56,5%). Đối với các dẫn chất có phổ $^1\text{H-NMR}$ được đo trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ peak có độ dịch chuyển hóa học cao nhất là H của nhóm NH trong dị vòng imidazol, còn đối với các dẫn chất có phổ $^1\text{H-NMR}$ được đo trong dung môi CDCl_3 peak có độ dịch chuyển hóa học cao nhất là H của NH trong liên kết amid. Dẫn chất **PH.301-305**, **PH.308**, **PH.310**, **PH.312**, **PH.313** trong dung môi CDCl_3 đều có nguyên tử H của NH amid đang ở trạng thái tham gia tạo liên kết hydro nội phân tử. Đối với các dẫn chất còn lại phổ $^1\text{H-NMR}$ được đo trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ thì peak H của NH amid được tách thành hai peak, trong đó peak có độ dịch chuyển cao hơn thể hiện cho nguyên tử H đang ở trạng thái liên kết hydro nội phân tử. Sau khi tham khảo nghiên cứu, cho thấy rằng liên kết hydro nội phân tử trong các cấu trúc **PH.201-207**, **PH.301-313** được hình thành bởi H của NH amid với dẫn chất anilin với nguyên tử O trong liên kết amid với morpholin. Đối với dẫn chất **PH.201** phổ $^1\text{H-NMR}$ trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ ghi nhận sự tách peak H của NH amid tỉ lệ giữa các peak là 6:4. Hiện tượng đồng phân của dẫn chất **PH.201** được ghi nhận

trên phổ $^1\text{H-NMR}$ trong dung môi CDCl_3 với tỉ lệ giữa hai đồng phân là 9:1. Trong đó, đồng phân chiếm tỉ lệ cao hơn chính là khi H của NH amid đang ở trạng thái tạo liên kết hydro nội phân tử do peak có độ dịch chuyển hóa học cao nhất trên phổ $^1\text{H-NMR}$. Đối với dẫn chất **PH.202**, **PH.203** trên phổ $^1\text{H-NMR}$ trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ ghi nhận sự tách peak H của NH amid với tỉ lệ giữa hai peak là 6:4. Đối với dẫn chất **PH.204** trên phổ $^1\text{H-NMR}$ trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ ghi nhận sự tách peak H của NH amid và peak H của NH trên vòng imidazol tỉ lệ giữa các peak là 6:4. Đối với dẫn chất **PH.205** trên phổ $^1\text{H-NMR}$ trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ ghi nhận sự tách peak H của NH amid và peak H của NH trên vòng imidazol tỉ lệ giữa các peak là 7:3. Đối với dẫn chất **PH.206** trên phổ $^1\text{H-NMR}$ trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ ghi nhận sự tách peak H của NH amid tỉ lệ giữa các peak là 5,5:4,5. Đối với dẫn chất **PH.207** trên phổ $^1\text{H-NMR}$ trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ ghi nhận sự tách peak H của NH amid tỉ lệ giữa các peak là 3:7. Đối với dẫn chất **PH.306** trên phổ $^1\text{H-NMR}$ trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ ghi nhận sự tách peak H của NH amid tỉ lệ giữa các peak là xấp xỉ 7:3. Đối với dẫn chất **PH.307** trên phổ $^1\text{H-NMR}$ trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ ghi nhận hiện tượng đồng phân với tỉ lệ giữa hai đồng phân là 4:6. Đối với dẫn chất **PH.309** trên phổ $^1\text{H-NMR}$ trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ ghi nhận hiện tượng đồng phân với tỉ lệ giữa hai đồng phân là 2,5:7,5. Đối với dẫn chất **PH.311** trên phổ $^1\text{H-NMR}$ trong dung môi $\text{DMSO-}d_6$ ghi nhận hiện tượng đồng phân với tỉ lệ giữa hai đồng phân là 8:2.

- Các dẫn chất morpholinoalkoxychalcon đều được tổng hợp thành công, sử dụng các phản ứng đã biết. Trong khi các dẫn chất morpholinoalkoxychalcon với dây nối trên vòng A

khá bền và đơn giản hơn trong quá trình tinh chế, các chalcon thu được với dây nối trên vòng B có chung đặc điểm là rất dễ phân huỷ khi có dung môi (ở dạng dung dịch) và/hoặc có ánh sáng nhưng khi ở dạng rắn thì khá bền kể cả khi có ánh sáng. Quy trình tổng hợp các dẫn chất với dây nhánh trên cả vòng A và vòng B đều cho thấy sự hiệu quả trong việc tổng hợp hàng loạt các dẫn chất chỉ bằng việc thay thế các nhóm thế mong muốn trên phần còn lại (không gắn sẵn dây nhánh), rút ngắn được rất nhiều bước tổng hợp.

Bàn luận về về kết quả in silico so với kết quả in vitro

- So với kết quả docking phân tử trên 10 đích tác động thì nhóm dẫn chất morpholinoacetamid là nhóm hợp chất cho điểm số docking âm, cho thấy có sự gắn kết vào đích tác động nhưng giá trị không quá thấp để có thể dự đoán hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm đáng kể. Như vậy, kết quả *in vitro* hoàn toàn phù hợp với kết quả *in silico* đối với nhóm hợp chất này. Tuy nhiên, trong kết quả chi tiết đánh giá ADMET, nhóm hợp chất này là nhóm cho kết quả tốt. Điều này cho thấy nhóm hợp chất morpholinoacetamid là nhóm hợp chất có tiềm năng trong việc sử dụng làm thuốc, tuy nhiên cần sàng lọc thêm các thử nghiệm sinh học để tìm ra những hoạt tính thích hợp.

- Kết quả *in silico* của nhóm hợp chất base Mannich này trên 10 đích tác động kháng khuẩn, kháng nấm cũng phù hợp với kết quả *in vitro*. Kết quả docking cho thấy 3 chất đều cho điểm số docking âm, cho thấy sự gắn kết vào đích tác động nhưng điểm số không quá thấp để có thể dự đoán hoạt tính sinh học đáng kể. Nhóm hợp chất này cũng là nhóm cho kết quả đánh giá

ADMET tốt nên có thể cân nhắc để có thể thực hiện sàng lọc các hoạt tính khác của nhóm hợp chất này.

- Kết quả docking cho thấy trên nhiều đích tác động, nhóm hợp chất imidazol-4,5-dicarboxamid chứa morpholin cho điểm số docking âm nhất trong tổng số các chất khảo sát. Trên vi khuẩn, cụ thể là trên topoisomerase IV hay trên ribosom 50S, hầu hết các chất của nhóm này cho điểm số docking âm. Điều này chứng tỏ nhóm hợp chất này cho gắn kết tốt vào các đích tác động tương ứng. Tuy nhiên, khi phân tích kỹ hơn vào tương tác ligand – protein, có thể thấy rằng nhóm hợp chất imidazol-4,5-dicarboxamid tạo liên kết với các vị trí quan trọng trên đích tác động nhưng không tạo được liên kết chelat với ion Mg^{2+} , cần thiết cho hoạt tính kháng khuẩn của nhóm hợp chất tác động trên topoisomerase IV. Trên ribosom 50S, nhóm dẫn chất này cũng tạo được các liên kết quan trọng tương tự như ligand đồng kết tinh. Trên vi nấm, nhóm dẫn chất này đều cho điểm số docking khá tốt trên tổng số 4/5 đích tác động khảo sát, trừ serin/threonin phosphatase. Điều này chứng tỏ nhóm hợp chất cho gắn kết tốt trên các đích tác động tương ứng. Phân tích tương tác ligand – protein cũng cho thấy các chất tiềm năng nhất cũng tạo được liên kết với vị trí quan trọng tương tự như ligand đồng kết tinh. Như vậy, kết quả *in vitro* không hoàn toàn trùng khớp với kết quả *in silico*. Điều này có thể được lý giải bởi một số các khả năng sau đây:

(1) Nhóm dẫn chất này không có khả năng tạo liên kết chelat với Mg^{2+} , cần thiết cho hoạt tính kháng khuẩn nên mặc dù điểm số docking thấp nhưng hoạt tính *in vitro* không có. Điều này là phù hợp với kết quả.

(2) Đánh giá ADMET cho thấy giá trị logS của nhóm này đều cho kết quả < -4 (giá trị tối ưu là từ -4 đến $0,5$). Như vậy khả năng tan trong nước của nhóm này không tốt. Điều này có thể ảnh hưởng đến khả năng khuếch tán các chất thử nghiệm qua thạch trong thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm. Điều này cũng có thể ảnh hưởng đến các kết quả khảo sát.

- Trong các dẫn chất morpholinoalkoxychalcon, chỉ có hợp chất **PH.435**, **PH.521** và **PH.523** thể hiện hoạt tính trên 3 chủng vi khuẩn *Staphylococcus aureus* nhạy cảm với methicillin (MSSA) và đề kháng methicillin (MRSA), *Streptococcus faecalis*, với giá trị MIC dao động từ $0,6 - 2,5$ mM. Tuy nhiên hoạt tính này khá yếu so với chưng dương. Từ những kết quả này có thể thấy rằng đường như dây nối butoxy (4C) tốt hơn propoxy (3C) và hexyloxy (6C) cũng như nhóm thế *p*-bromo trên vòng A tốt hơn các nhóm thế *p*-methoxy hay *p*-amino trong việc tăng cường hoạt tính kháng khuẩn của các dẫn chất lai hoá giữa chalcon và morpholin bằng dây nối alkoxy. Tuy nhiên, số lượng các dẫn chất được thử nghiệm là quá ít để khẳng định chắc chắn về kết luận này. Các dẫn xuất morpholinoalkoxychalcon hầu hết đều thể hiện hoạt tính kháng nấm trung bình với 2 chủng vi nấm *Aspergillus niger* và *Candida albicans*. Cụ thể các chất cho hoạt tính kháng nấm bao gồm **PH.423**, **PH.433**, **PH.435**, **PH.532**, **PH.531**, **PH.523** và **PH.533** với giá trị MIC từ $2-3$ mM. Từ kết quả này có thể sơ bộ kết luận rằng dây nối butoxy (4C) và hexyloxy (6C) tốt hơn propoxy (3C) trong việc giúp cải thiện khả năng kháng nấm của dẫn chất morpholinoalkoxychalcon. Đối chiếu với kết quả docking trên 5 đích tác động của vi nấm, kết quả điểm số docking trên đích tác động *exo-beta*-(1,3)-glucanase là phù hợp

nhất với kết quả *in vitro*. Điểm số docking của các chất này dao động trong khoảng từ -8,9--9,5 kcal/mol cho thấy sự gắn kết tốt trên đích tác động. Tuy nhiên, một loạt các dẫn chất morpholinopropyloxychalcon với dây nối trên vòng A cũng có điểm số docking thấp tương tự như các dẫn chất có hoạt tính (-9,5 kcal/mol) nhưng tác dụng này không thể hiện trên thử nghiệm *in vitro*. Do đó, cơ chế tác động của nhóm hợp chất này có thể cần phải được nghiên cứu thêm.

CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN

Đề tài đã tổng hợp được 59 hợp chất thuộc các nhóm như sau:

- 18 hợp chất nhóm morpholinoacetamid
- 3 hợp chất nhóm base Mannich chứa morpholin
- 20 hợp chất nhóm imidazol-4,5-dicarboxamid chứa morpholin
- 18 hợp chất morpholinoalkoxychalcon với dây nối alkoxy trên cả vòng A và vòng B.

Theo kết quả tra cứu trên Sci-finder 12/2022, trong số 59 chất này có 2 chất đã được báo cáo là chất **PH.101** và **PH.411**, 57 chất còn lại là chất mới, góp phần bổ sung vào ngân hàng các chất tổng hợp.

Kết quả thử hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm cho thấy các nhóm hợp chất morpholinoacetamid, nhóm base Mannich và nhóm imidazol-4,5-dicarboxamid không cho hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm. Nhóm hợp chất chalcon có 3 chất cho hoạt tính kháng khuẩn trung bình trên *S. faecalis*, *S. aureus* và MRSA là **PH.521**, **PH.523** và **PH.435** với MIC từ 0,6-2,5 mM.

Nhóm hợp chất chalcon cũng có 8 chất cho hoạt tính kháng nấm trung bình trên *A. niger* và *C. albicans* là **PH.423**, **PH.433**, **PH.435**, **PH.532**, **PH.531**, **PH.523** và **PH.533** với giá trị MIC từ 2-3 mM.

Kết quả mô hình docking phân tử, đề tài đã tiến hành xây dựng được 10 mô hình docking phân tử gồm 5 mô hình trên vi khuẩn và 5 mô hình trên vi nấm dựa trên những đích tác động kháng khuẩn, kháng nấm phổ biến nhất. Tất cả các mô hình này đều được đánh giá và kết quả cho thấy 9/10 mô hình có giá trị RMSD nhỏ hơn 2Å và 1 mô hình có giá trị RMSD trong khoảng 2-3Å. Điều này cho thấy có sự tái lập tốt cấu trúc thử nghiệm và có giá trị trong việc sử dụng để nghiên cứu. Sau khi xây dựng mô hình, các hợp chất tổng hợp được tiến hành dock vào mô hình và đánh giá các tương tác ligand – protein, đánh giá ADMET nhằm mục đích góp phần giải thích cơ chế tác động kháng khuẩn, kháng nấm của nhóm hợp chất có hoạt tính. Kết quả phân tích cho thấy trên vi khuẩn, đích tác động topoisomerase IV và trên vi nấm đích tác động exo-beta-(1,3)-glucanase là phù hợp nhất với các kết quả thực nghiệm hiện tại. Tuy nhiên, để xác định chính xác hơn cơ chế tác động của nhóm hợp chất này, cần các nghiên cứu sâu hơn.

CHƯƠNG 5. ĐỀ NGHỊ

Các nhóm hợp chất morpholinoacetamid, nhóm base Mannich hay nhóm imidazol-4,5-dicarboxamid không cho hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm trên các chủng vi khuẩn, vi nấm thử nghiệm nhưng theo các tài liệu đã công bố, những khung cấu trúc như vậy có khả năng cho một số hoạt tính khác như hoạt tính chống virus sốt xuất huyết, hoạt tính độc tế bào. Kết quả

docking trên một số đích tác động của virus SARS-CoV2 cũng cho thấy một số dẫn chất nhóm imidazol-4,5-dicarboxamid cho kết quả docking âm với giá trị khoảng -7 - -6 kJ/mol. Do vậy, nhóm dẫn chất imidazol-4,5-dicarboxamid cũng là nhóm dẫn chất tiềm năng trong việc ức chế virus SARS-CoV-2. Đánh giá ADMET cho thấy nhóm dẫn chất imidazol-4,5-dicarboxamid là nhóm có hoạt tính độc tế bào, nhất là trên tế bào gan nên đây cũng là hoạt tính sinh học tiềm năng của nhóm hợp chất này.

Đối với nhóm chất chalcon, nhiều báo cáo cho thấy rằng nhóm này có tiềm năng trong việc ức chế một số enzym như lipase, glucosidase nên đây cũng là những đích tác động khác mà nhóm hợp chất này có thể hướng đến. Kết quả thử sơ bộ trên virus Dengue cho thấy có nhiều hợp chất morpholinoalkoxychalcon với dây nối trên vòng B có khả năng ức chế hơn 99,9% sự phát triển của virus Dengue và cùng trong thử nghiệm này, đồng thời thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của tế bào nên có thể tìm hiểu thêm hoạt tính độc tế bào của nhóm hợp chất này.

Ngoài ra, nhóm hợp chất imidazol-4,5-dicarboxamid cũng cho kết quả tốt khi tiến hành thử nghiệm trên enzym protease chính của SARS-CoV-2. Khi tiến hành thử *in vitro*, có một chất thuộc nhóm này cho kết quả ức chế enzym Mpro với giá trị IC₅₀ khoảng 8 μ M.

Mặc dù không có hoạt tính kháng khuẩn tốt nhưng khi thử trên mô hình ức chế bơm ngược Acrb-TolC, một dẫn chất imidazol-4,5-dicarboxamid cho hoạt tính ức chế bơm tương đương với chất đối chứng.

**DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ
LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN**

1. **Huỳnh Nguyễn Hoài Phương**, Nguyễn Tấn Quang, Trương Phương, Võ Thị Cẩm Vân (2020), " Tổng hợp và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của các dẫn chất morpholinoacetamid", *Tạp chí Y Dược học*, số 10, tháng 12, trang 35 – 40.

2. **Huỳnh Nguyễn Hoài Phương**, Đinh Thị Thu Thảo, Nguyễn Thanh Trúc, Trương Phương, Võ Thị Cẩm Vân (2021), " Tổng hợp và đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của các dẫn chất N-(morpholino(phenyl)methyl)-nicotaniamid", *Tạp chí Y học TP. Hồ Chí Minh*, tập 25, số 2, trang 27-31.

III. CÁCH IN TÓM TẮT LUẬN ÁN

Tiến hành theo các bước sau:

1. Bước 1 định dạng văn bản:

+ Cỡ chữ 11, cách dòng exactly 17pt, font chữ: Times New Roman.

+ Vào page setup

- Chọn **paper** → **custom size** → **width**: 14 cm; **height**: 20 cm.

- Chọn **margins** chọn tất cả **trên**:2cm; **dưới**: 2cm; **phải**: 2cm; **trái**: 2cm.

- Chọn **orientation** → **portrait**

2. Bước 2 soạn thảo văn bản theo yêu cầu của tóm tắt luận án trong đủ 24 trang.

3. Bước 3 in văn bản theo trình tự sau:

+ Chọn **Print** → **printer property** → chọn **paper size** là A4 và **output size** là A4

+ Đầu tiên in cặp trang (24,1): vào **print** → **page**: nhập 24,1; **pages per sheet**: 2 pages

+ Sau khi in cặp trang (24,1) sẽ lật tờ giấy lại (không quay đầu) in cặp trang (2,23) theo trình tự như trên.

+ Tiếp tục lập lại quy trình trên theo cặp như sau:

(24,1) và (2,23); (22,3) và (4,21); (20,5) và (6,19); (18,7) và (8,17); (16,9) và (10,15); (14,11) và

(12,13).