

TÁC DỤNG ỨC CHẾ ACETYLCHOLINESTERASE CỦA CÁC ALKALOID PHÂN LẬP TỪ CỎ CÂY BÌNH VÔI (*Stephania sinica* Diels)

Phạm Thị Tuyết Lan, Phạm Quốc Tuấn, Nguyễn Quốc Tuấn,
Hà Quang Lợi, Hà Thanh Hòa, Nguyễn Đức Hùng
*Trung tâm Nghiên cứu và Chuyển giao Công nghệ Dược
– Trường Cao đẳng Y Dược Phú Thọ*

Ngày nhận: 26/4/2019; **Ngày sửa chữa:** 04/7/2019; **Ngày duyệt đăng:** 11/7/2019

TÓM TẮT

Một số thành phần chính có hoạt tính ức chế acetylcholinesterase (AChE) từ cỏ loài *Stephania sinica* Diels đã được phân lập và tinh chế trong công trình này. Sử dụng phương pháp xác định cấu trúc bằng phổ khối (MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR), bốn hợp chất tinh khiết là liriodenin (1), sinomenin (2), palmatin (3), dehydrocorydalmin (4) đã được xác định. Các hợp chất này được thử tác dụng ức chế AChE. Ở nồng độ 100 µg/ml, hoạt độ ức chế AChE của 1 ($30,0 \pm 3,2\%$), 2 ($35,0 \pm 2,7\%$) ở mức trung bình, trong khi hoạt độ ức chế của 3 và 4 khá mạnh ($92,1 \pm 3,6\%$ và $90,2 \pm 3,1\%$) so với chất đối chứng dương galanthamin ($94,7 \pm 2,9\%$). Ngoài ra, nghiên cứu này cũng công bố hợp chất 4 lần đầu tiên được chiết xuất và phân lập từ loài *Stephania sinica*.

Từ khóa: Bình vôi, *Stephania sinica*, alkaloid, hoạt tính ức chế, acetylcholinesterase

1. Đặt vấn đề

Alzheimer là bệnh thoái hóa thần kinh tiến triển không phục hồi, chiếm tới 50–60% các trường hợp mất trí nhớ. Việc phát sinh bệnh Alzheimer có liên quan đến sự thiếu hụt chất dẫn truyền thần kinh acetylcholin (ACh) trong não tới gần 90% [1]. Acetylcholinesterase (AChE) là một enzym xúc tác cho phản ứng chuyển hóa, thủy phân ACh. Do vậy, việc ức chế AChE sẽ duy trì nồng độ và thời gian hoạt động của ACh tại các khe synap, từ đó duy trì khả năng ghi nhớ và học tập [1]. Các thuốc điều trị bệnh Alzheimer hiện nay chủ yếu là các chất ức chế AChE. Trong những năm gần

đây, nghiên cứu sàng lọc các hợp chất thiên nhiên theo hướng ức chế AChE được nhiều nhà khoa học tiếp cận [2].

Ở Việt Nam, chi *Stephania* Lour. (họ Menispermaceae) có khoảng 20 loài, thường mọc hoang ở núi đá vôi, núi đất, đồng bằng và ven biển [3]. Theo kết quả nghiên cứu sàng lọc về tác dụng ức chế AChE *in vitro* của 38 mẫu dược liệu được lựa chọn từ bài thuốc an thần, ích trí cho thấy dịch chiết methanol toàn phần của một số loài thuộc chi *Stephania* có hoạt tính ức chế AChE mạnh [4]. Trong bài báo này, chúng tôi công bố kết quả nghiên cứu, phân lập được bốn alkaloid từ các phân đoạn alkaloid có hoạt

tính ức chế AChE của loài *S. sinica* gồm liriodenin (1), sinomenin (2), palmatin (3), dehydrocorydalmin (4).

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Mẫu nghiên cứu là gốc thân phình thành củ của cây Bình vôi (*Stephania sinica* Diels, họ Menispermaceae) được thu hái ở Vườn Quốc gia Phong Nha – Kẻ Bàng, tỉnh Quảng Bình. Mẫu thu được có hoa, quả và được giám định tên khoa học bởi Nguyễn Chiêu – Viện Dược liệu. Mẫu tiêu bản được lưu tại Phòng Tiêu bản, Bộ môn Thực vật, Trường Đại học Dược Hà Nội.

2.2. Hóa chất, dung môi, thuốc thử

Sắc ký cột (CC): silica gel pha thuận (70–230 mesh–Merck). Sắc ký lớp mỏng (TLC): bản mỏng tráng sẵn pha thuận silica gel 60 F_{254S} (Merck). Dung môi: methanol (MeOH), chloroform (CHCl₃), aceton, ethylacetat (Trung Quốc), đạt tiêu chuẩn phân tích công nghiệp. Các thuốc thử alkaloid: Dragendorff, Bouchardat, Mayer, acid picric và các hóa chất khác đạt tiêu chuẩn ĐDVN IV.

Acetylcholinesterase (AChE), acetylthiocholin iodid (ATCI), thuốc thử Ellman: acid 5,5'-dithio-(2-nitrobenzoic) (DTNB) do hãng Sigma cung cấp. Galanthamin của hãng Jansen-Cilag SpA.

2.3. Máy móc, thiết bị

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy Bruker Avance 500 MHz (Đức), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; phổ khối lượng (MS) được đo trên máy Agilent 1100 LC/MSD Trap SL, máy Hewlett 5989-MS; Phổ UV-Vis được đo trên máy UV-Vis Spectrophotometer Cary 1E, Viện Dược liệu.

2.4. Chiết xuất alkaloid toàn phần và các phân đoạn alkaloid

Lấy 200,0 g bột dược liệu (độ ẩm 8,34%), thấm ẩm bằng NH₄OH 6 N trong 2 giờ, chiết trong bình soxhlet dung tích 1000 ml với CHCl₃ mỗi lần 500 ml x 10 giờ, đến kiệt alkaloid (thử bằng thuốc thử Mayer). Dịch chiết thu được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đến thể tích 250 ml. Lắc 5 lần x 50 ml HCl 0,1 N. Gộp dịch chiết acid, kiềm hóa bằng NH₄OH 10% (pH= 9–10). Chiết dịch acid đã kiềm hóa với CHCl₃ 5 lần x 50 ml, gộp dịch chiết, loại bỏ nước bằng Na₂SO₄ khan, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 10,52 g căn alkaloid toàn phần. Căn alkaloid toàn phần (4,03 g) được tách bằng CC pha thường, chất nhồi cột là silica gel, rửa giải gradient với hệ dung môi CHCl₃:MeOH (100:1, 90:10, 80:20, 70:30, 40:60, 50:50, 40:60), thu được 5 phân đoạn SS1 (448 mg), SS2 (456 mg), SS3 (565 mg), SS4 (240 mg), SS5 (376 mg).

2.5. Thử tác dụng ức chế AChE

Thử tác dụng ức chế AChE bằng phương pháp đo quang dựa trên nguyên tắc của Ellman (1961) [5]: Cơ chất acetylthiocholin iodid bị thủy phân tạo thành thiocholin và acid acetic do xúc tác của enzym AChE. Phản ứng giữa thiocholin và thuốc thử Ellman tạo thành acid 5-thio-2-nitrobenzoic (RS⁻) có màu vàng. Sau phản ứng tạo màu, ủ dịch trong 15 phút (ở nhiệt độ < 25 °C). Đo độ hấp thụ đồng thời 4 mẫu: 2 mẫu trắng có và không có enzym, 2 mẫu thử có và không có enzym, cùng một thời điểm, ở bước sóng 420 nm. Với mỗi mẫu đo, tiến hành 3 lần, hoạt độ ức chế AChE là kết quả trung bình của 3 phép đo. Chất đối chứng dương là galanthamin.

- Mẫu thử, chất đối chứng dương được pha trong MeOH được nồng độ 100 µg/ml.

- AChE, ATCI, DTNB được pha trong đệm phosphat (pH=7,6) nồng độ theo thứ tự 0,25 U/ml, 0,5 mM và 0,5 mM.

Hoạt độ ức chế AChE (%) được tính theo công thức:

$$\text{Hoạt độ ức chế (\%)} = \frac{(\text{Tr1} - \text{Tr2}) - (\text{Th1} - \text{Th2})}{(\text{Tr1} - \text{Tr2})} \times 100$$

Trong đó:

- Tr1, Tr2: mẫu trắng có, không có enzym;
- Th1, Th2: mẫu thử có, không có enzym.

2.6. Phương pháp xử lý số liệu

Các kết quả nghiên cứu hoạt tính sinh học được tiến hành thực nghiệm ít nhất ba lần và xử lý thống kê bằng phần mềm GraphPad Prism 7.

3. Kết quả nghiên cứu

3.1. Sàng lọc các phân đoạn chứa alkaloid cho phân lập

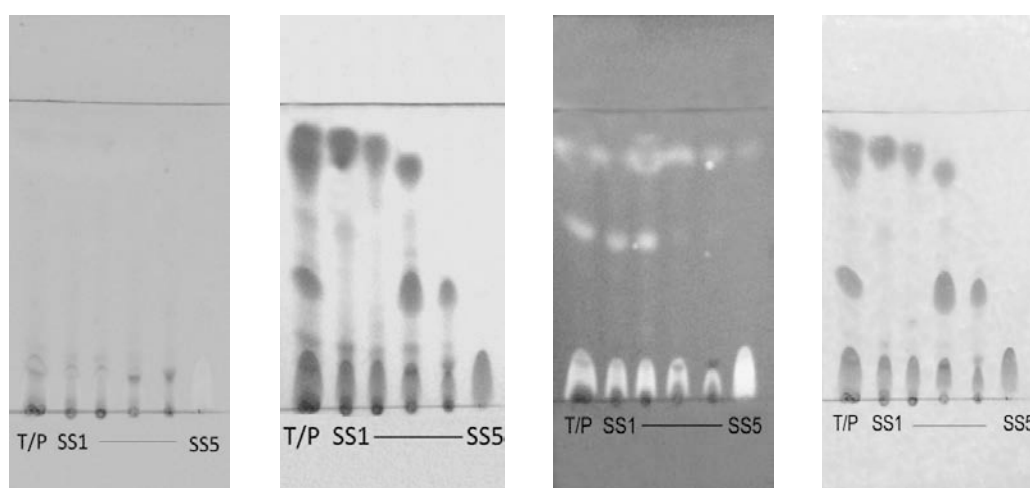
Để phân lập những hoạt chất có tác dụng ức chế mạnh AChE, năm phân đoạn SS1 → SS5 được tiến hành thử tác dụng ức chế AChE. Kết quả cho thấy hoạt độ ức chế

AChE lần lượt là 48,9%; 63,3%; 66,3%; 61,5% và 64,2% ở nồng độ 100 µg/ml. Phân đoạn SS2, SS3, SS5 có hoạt độ ức chế AChE cao hơn 2 phân đoạn còn lại. Tuy nhiên, kiểm tra các phân đoạn bằng TLC được triển khai với hệ dung môi CHCl₃ : MeOH : NH₄OH [9:1:0,1] thấy rằng phân đoạn SS1 và SS2 có thành phần giống nhau. Trong khi SS3 có chứa 2 vết thành phần chính ở cả SS2 và SS4 (Hình 1). Do vậy, không tiến hành phân lập phân đoạn SS1, SS2 và SS4.

3.2. Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được

Phân đoạn SS3 (565 mg) được tách bằng cột pha thường, chất nhồi cột silica gel với hệ dung môi rửa giải CHCl₃:MeOH (20:1 - 12:2) thu được chất màu vàng nâu 1 (15 mg) và bột vô định hình màu trắng xám 2 (21 mg).

Phân đoạn SS5 (376 mg) được tách bằng cột pha thường, chất nhồi cột silica gel rửa giải gradient với hệ dung môi CHCl₃ : MeOH : NH₄OH (20:1:0,5 → 10:4:0,1) thu được tinh thể màu vàng cam 3 (20 mg) và bột vô định hình màu vàng 4 (3 mg).



Hình 1: Sắc ký đồ của 5 phân đoạn SS1→SS5

Từ trái qua: Ánh sáng thường, UV 254nm, UV 360nm; TT Dragendorff

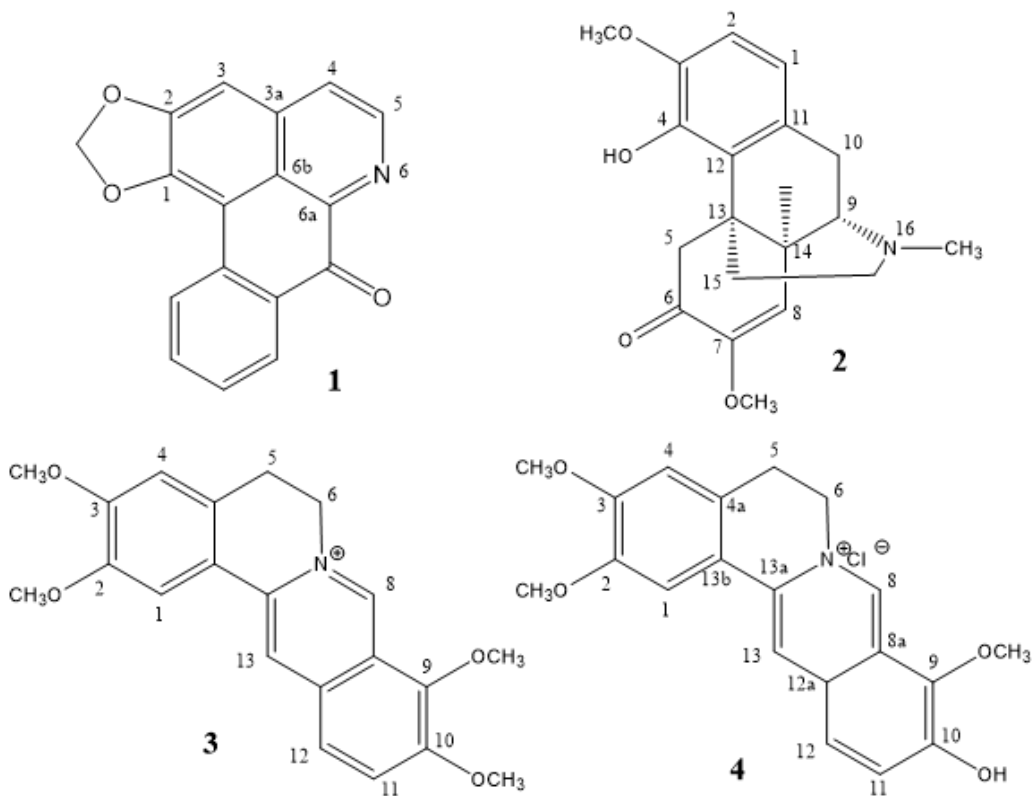
Hợp chất 1

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ (ppm): 7,18 (1H, s, H-3), 7,76 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-4), 8,87 (1H, d, $J = 5,5$ Hz, H-5); 8,58 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-8), 7,57 (1H, dt, $J = 1,0$; 7,5 Hz, H-9), 7,73 (1H, dt, $J = 1,5$; 8,0 Hz, H-10), 8,66 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-11), 6,38, (2H, s, $-\text{OCH}_2\text{O}-$).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ_c : 147,8 (C-1), 151,7 (C-2), 103,2 (C-3), 135,6 (C-3a), 124,1 (C-4), 144,7 (C-5), 123,6 (C-6a), 182,5 (C-7), 132,8 (C-7a), 128,5 (C-8), 128,7 (C-9), 133,9 (C-10), 127,5 (C-11), 145,5 (C-11b), 102,3 ($-\text{OCH}_2\text{O}-$).

Hợp chất 1 thu được dạng bột màu vàng nâu. Phổ khối ESI-MS xuất hiện pic ion m/z 276,0 $[\text{M}+\text{H}]^+$ tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{17}\text{H}_9\text{NO}_3$ ($M = 275,06$). Phổ ^1H NMR xuất hiện các tín hiệu tại δ_{H} 8,87

(1H, d, $J = 6,5$, 3,5 Hz, H-5) và δ_{H} 7,76 (d, $J = 5,5$ Hz, H-4) đặc trưng cho các proton nhân thơm của khung aporphin. Bốn tín hiệu tại δ_{H} 8,66 (1H, dd, $J = 8,0$ Hz, H-11) và 7,73 (1H, dt, $J = 1,5$; 8,0 Hz, H-10); 7,57 (1H, dt, $J = 1,0$; 7,5 Hz, H-9) và 8,58 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-8) tương tác với nhau tạo thành các cặp tương tác *ortho-ortho* và *ortho-para*. Ngoài ra, tín hiệu singlet tại 6,38 (s) đặc trưng cho nhóm methylenedioxy ($\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$). Phổ ^{13}C NMR xuất hiện các tín hiệu tại δ_c 182,5 (C-7) và 102,3 ($\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$) đặc trưng cho nhóm $\text{C}=\text{O}$ và nhóm $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$. Các tín hiệu carbon còn lại đặc trưng cho khung aporphin. Phổ ^{13}C NMR kết hợp phổ DEPT cho thấy 1 có 17 nguyên tử carbon, trong đó có 9 carbon bậc bốn, 7 nhóm methin (CH) và 1 nhóm methylen (CH_2). So sánh các dữ liệu phổ của



Hình 2. Cấu trúc hóa học của các hợp chất 1-4

hợp chất **1** với liriodenin trong tài liệu [6] thấy phù hợp, dẫn đến kết luận hợp chất **1** là liriodenin (Hình 2).

Hợp chất 2

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ (ppm): 6,62 (1H, d, $J = 8,0$, H-1), 6,52 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-2), 2,46 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-5a), 4,32 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-5b), 5,46 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-8), 3,18 (1H, dd, $J = 4,0; 8,0$ Hz, H-9), 2,72 (2H, dd, $J = 5,0; 18,0$ Hz, H-10), 3,02 (1H, s, H-14), 1,91 (2H, m, H-15), 2,55 (2H, ddd, $J = 1,5; 4,5; 9,0$ Hz, H-16), 3,82 (3H, s, 3-OCH₃), 3,50 (3H, s, 7-OCH₃), 2,46 (3H, s, -N-CH₃).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ_{C} : 118,4 (C-1), 109,2 (C-2), 145,2 (C-3), 144,5 (C-4), 49,0 (C-5), 193,7 (C-6), 152,6 (C-7), 115,3 (C-8), 56,5 (C-9), 24,5 (C-10), 130,2 (C-11), 122,4 (C-12), 40,3 (C-13), 45,7 (C-14), 36,2 (C-15), 47,4 (C-16), 56,3 (3-OCH₃), 54,6 (7-OCH₃), 42,6 (N-CH₃).

Hợp chất **2** phân lập được dạng bột vô định hình, màu trắng xám. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion tại m/z : 328,0 $[\text{M-H}]^-$ tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{NO}_4$ ($M = 329,16$). Phổ ^1H NMR xuất hiện tín hiệu proton doublet của vòng thơm tại δ_{H} : 6,63 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-1) và 6,53 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-2). Các proton của nhóm methoxy được xác định bởi các tín hiệu singlet tại 3,82 (3H, s, 3-OCH₃) và 3,50 (3H, s, 7-OCH₃). Ngoài ra, trên phổ proton xuất hiện tín hiệu của proton nhóm methyl gắn với nguyên tử nitơ tại 2,43 ppm. Các tín hiệu đó cũng được thể hiện trên phổ ^{13}C -NMR tại δ_{C} : 56,3 (3-OCH₃); 54,6 (7-OCH₃) và 42,6 (N-CH₃). Trên phổ ^{13}C NMR cho thấy sự có mặt của vòng thơm được xác định bởi sáu tín hiệu carbon olefin có độ chuyển dịch hóa học 118,4 (C-1); 109,2 (C-2); 145,2 (C-3); 144,5

(C-4); 130,2 (C-11) và 122,4 (C-12). Ngoài ra, còn có các tín hiệu của một carbon methylen nối với nguyên tử nitơ tại δ_{C} 42,6, một nhóm CH cũng nối với nguyên tử nitrogen tại 56,7 ppm; hai nhóm CH khác được xác định tại 45,7 (C-14) và 115,3 (C-8) ppm; ba nhóm methylen còn lại được xác định tại 49,0 (C-5); 24,5 (C-10) và 36,2 (C-15) ppm. Phổ ^{13}C -NMR kết hợp với phổ DEPT cho thấy **2** có 19 nguyên tử carbon, trong đó có bảy carbon bậc 4 (C), năm nhóm CH, bốn nhóm CH₂ và ba nhóm CH₃. Từ những dữ liệu phổ cho thấy hợp chất **2** có các tín hiệu đặc trưng của khung morphinan. Kết hợp so sánh dữ liệu phổ của sinomenin [7] thấy phù hợp, do vậy khẳng định hợp chất **2** là sinomenin (Hình 2).

Hợp chất 3

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ (ppm): 7,65 (1H, s, H-1), 7,03 (1H, s, H-4), 3,33 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H-5), 4,93 (2H, t, $J = 6,5$ Hz, H-6), 9,71 (1H, s, H-8), 8,12 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-11); 8,03 (1H, d, $J = 9,0$ Hz, H-12), 8,78 (1H, s, H-13), 4,03 (3H, s, 2-OCH₃), 4,14 (3H, s, 3-OCH₃), 4,25 (3H, s, 9-OCH₃), 3,98 (3H, s, 10-OCH₃).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ_{C} : 110,8 (C-1), 151,4 (C-2), 151,7 (C-3), 112,8 (C-4), 130,4 (C-4a), 27,7 (C-5), 56,6 (C-6), 146,1 (C-8), 121,1 (C-8a), 154,4 (C-9), 145,7 (C-10), 124,2 (C-11), 128,3 (C-12), 135,3 (C-12a), 120,4 (C-13), 139,7 (C-13a), 123,2 (C-13b), 57,3 (2-OCH₃), 57,6 (3-OCH₃), 62,4 (9-OCH₃), 57,1 (10-OCH₃).

Hợp chất **3** phân lập được dạng tinh thể hình kim màu vàng cam. Phổ ESI-MS xuất hiện pic ion m/z : 351,10 $[\text{M-H}]^-$ tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{NO}_4$ ($M = 352,41$). Phân tích phổ ^1H NMR cho thấy hợp chất

3 có một khung isoquinolin với hai tín hiệu proton nhân thơm doublet tại δ_{H} 8,03 (d, $J=9,0$ Hz, H-12) và 8,12 (d, $J=9,0$ Hz, H-11), hai proton này được xác nhận vị trí *ortho* thông qua hằng số ghép cặp (J), và hai olefin proton singlet tại δ_{H} 8,78 (s, 1H, H-13) và 9,71 (s, 1H, H-8). Ngoài ra, còn quan sát thấy xuất hiện 2 proton singlet tại δ_{H} 7,65 và 7,03 của một vòng thơm, gợi ý vòng thơm bị thế ở bốn vị trí cộng hưởng. Cùng với các proton triplet ở tại δ_{H} 4,95 (t, $J=6,5$ Hz, 2H) và 3,33 (t, $J=6,5$ Hz, 2H) xác nhận sự có mặt của proton H-5 và H-6 ở vòng B. Từ những phân tích dữ liệu phổ ^1H NMR cho thấy hợp chất **3** có cấu trúc protoberberin, một khung chính của các alkaloid ở chi *Stephania* [8]. Trong cấu trúc của **3** còn có nhóm những methoxy cũng được xác định bởi các tín hiệu singlet tại δ_{H} 3,98 (3H), 4,03 (3H), 4,14 (3H), 4,25 (3H). Phổ ^{13}C NMR và DEPT chỉ ra sự có mặt của 21 nguyên tử carbon, trong đó có 6 nhóm CH, 2 nhóm CH_2 , 4 nhóm CH_3 , 9 carbon bậc bốn. So sánh các dữ liệu phổ của **3** với palmatin trong tài liệu [8], thấy phù hợp, do vậy hợp chất **3** xác định là palmatin (Hình 2).

Hợp chất 4

^1H NMR (CDCl_3 , 500 MHz): δ (ppm): 6,86 (1H, s, H-1), 7,72 (1H, s, H-4), 3,12 (2H, m, H-5), 4,93 (2H, m, H-6), 9,83 (1H, s, H-8), 8,22 (1H, d, $J=9,0$ Hz, H-11); 8,00 (1H, d, $J=9,5$ Hz, H-12), 8,97 (1H, s, H-13), 4,04 (3H, s, 2-OCH₃), 3,96 (3H, s, 3-OCH₃), 4,11 (3H, s, 9-OCH₃).

^{13}C NMR (CDCl_3 , 125 MHz) δ_{C} : 114,7 (C-1), 150,2 (C-2), 150,3 (C-3), 109,4 (C-4), 128,6 (C-4a), 25,6 (C-5), 55,2 (C-6), 145,4 (C-8), 121,4 (C-8a), 147,7 (C-9), 143,5 (C-10), 126,6 (C-11), 123,1 (C-12), 133,1 (C-12a), 119,2

(C-13), 138,4 (C-13a), 117,4 (C-13b), 57,2 (2-OCH₃), 56,4 (3-OCH₃), 61,7 (9-OCH₃).

Hợp chất **4** thu được dưới dạng bột vô định hình màu vàng. Phổ ESI-MS xuất hiện các pic ion tại m/z : 436,1 $[\text{M}+\text{Na}+\text{K}]^+$ và pic ion phân tử tại m/z : 438,1 $[\text{M}+2+\text{Na}+\text{K}]^+$ được cho là do sự có mặt của đồng vị ^{37}Cl điều này có thể kết luận sự có mặt của một nguyên tử Cl trong công thức phân tử hợp chất **4**. Trên phổ ACPI-MS xuất hiện pic ion tại m/z 391,3 $[\text{M}+\text{H}+\text{CH}_4]^+$ tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{NO}_4\text{Cl}\cdot\text{H}_2\text{O}$ ($M=374,84$). So sánh phổ NMR của **4** và **3** nhận thấy có sự tương đồng. Tuy nhiên, hợp chất **4** chỉ có ba nhóm -OCH₃ so với bốn nhóm -OCH₃ của hợp chất **3**. Từ những dữ liệu trên kết hợp so sánh với dehydrocorydalmin trong tài liệu [9] có thể khẳng định hợp chất **4** là dehydrocorydalmin (Hình 2). Hợp chất **4** lần đầu tiên phân lập được từ loài *S. sinica*.

3.3. Tác dụng ức chế AChE các alkaloid phân lập được

Thử tác dụng ức chế AChE của bốn alkaloid phân lập được (**1-4**), và chất đối chứng dương là galanthamin ở nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, kết quả thể hiện ở Bảng 1.

Ở nồng độ 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ cho thấy rằng các hợp chất **1**, **2** có hoạt độ ức chế AChE yếu, lần lượt là $30,0 \pm 3,2$ và $35,0 \pm 2,7\%$; các hợp chất **3**, **4** có tác dụng ức chế AChE mạnh lần lượt $92,1 \pm 3,6\%$ và $90,2 \pm 3,1\%$. Chất đối chứng dương galanthamin có tác dụng ức chế AChE là $94,7 \pm 2,9\%$ ở cùng nồng độ.

4. Bàn luận

Nghiên cứu định hướng sinh học ức chế AChE của các phân đoạn alkaloid từ *S. sinica* để tìm ra những phân đoạn có hoạt độ ức chế AChE mạnh, từ đó phân lập và nhận dạng các chất hướng ức chế AChE. Bốn alkaloid

BẢNG 1: Hoạt độ ức chế AChE (%) ở nồng độ 100 µg/ml của các hợp chất 1-4

STT	Hợp chất	Hoạt độ ức chế (%) (M ± SD)
1	Liriodenin (1)	30,0 ± 3,2
2	Sinomenin (2)	35,0 ± 2,7
3	Palmatin (3)	92,1 ± 3,6
4	Dehydrocorydalmin (4)	90,2 ± 3,1
5	Galanthamin	94,7 ± 2,9

phân lập được liriodenin (1), sinomenin (2), palmatin (3), dehydrocorydalmin (4) tuy không phải là những alkaloid mới nhưng nghiên cứu cũng góp phần nhằm củng cố và xây dựng cơ sở dữ liệu các chất có hoạt tính ức chế AChE từ loài *S. sinica* cũng như chi *Stephania* Lour. Ở nồng độ 100 µg/ml, hoạt độ ức chế AChE của 1 (30,0 ± 3,2%), 2 (35,0 ± 2,7%) ở mức trung bình, hoạt độ ức chế của 3, 4 khá mạnh lần lượt là 92,1 ± 3,6%, 90,2 ± 3,1% so với chất đối chứng dương galanthamin (94,7 ± 2,9%). Kết quả này khá phù hợp với nghiên cứu của Đỗ Quyên và cộng sự khi nghiên cứu hoạt tính ức chế AChE của các alkaloid phân lập được từ loài *S. dielsiana* và *S. sinica* [10-11].

5. Kết luận

Từ củ của cây Bình vôi (*Stephania sinica*), phân lập được bốn alkaloid: liriodenin (1), sinomenin (2), palmatin (3), dehydrocorydalmin (4). Trong đó, hợp chất 4 lần đầu tiên phân lập được từ loài này. Bốn hợp chất được thử tác dụng ức chế AChE, kết quả ở nồng độ 100 µg/ml, hoạt độ ức chế của các hợp chất 1-4 lần lượt là 30,0 ± 3,2%, 35,0 ± 2,7%, 92,1 ± 3,6%, 90,2 ± 3,1%.

Tài liệu tham khảo

[1] Terry A.V., Buccafusco J.J. The cholinergic hypothesis of age and Alzheimer's disease-related cognitive deficits: recent challenges and

their implications for novel drug development, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003; 306(3): 821-827.

- [2] Orhan I., Sener B. Acetylcholinesterase inhibitors from natural resources, *FABAD J. Pharm. Sci.* 2003; 28: 51-58.
- [3] Nguyễn Tiến Bàn. *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*. Hà Nội: NXB Nông nghiệp. 2003. 140-152.
- [4] Đỗ Quyên, Trần Thị Diệu Hương, Nguyễn Hồng Khánh. Nghiên cứu sàng lọc dược liệu có tác dụng ức chế enzyme acetylcholinesterase. *Tạp chí nghiên cứu dược và thông tin thuốc*. 2011; 4: 137-139.
- [5] George L. E., Courtney k. D., Andres V., Robert M., Featherstone. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity, *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7(2): 88-95.
- [6] Pang S. Q., Wang G. Q., Huang B. K., et al. Isoquinoline alkaloids from *Broussonetia papyrifera* fruits", *Chem. Nat. Compd.*, 2007; 43(1): 100-102.
- [7] Min Y. D., Choi S. U., Lee K. R. Aporphine alkaloids and their reversal activity of multidrug resistance (MDR) from the stems and rhizomes of *Sinomenium acutum*, *Arch. Pharm. Res.* 2006; 29(8): 627-632.
- [8] José Maria B. F., Emidio Vasconcelos L. D-Cu. Alkaloids of the Menispermaceae, *The Alkaloid: Chemistry and Biology*. 2000; 9: 157-187.
- [9] Singh S., Singh T. D., Singh V. P., et al. Quaternary alkaloids of *Argemone mexicana*, *Pharm. Biol.* 2010; 48 (2): 158-160.
- [10] Đỗ Quyên, Đỗ Thị Hà. Phân lập và xác định cấu trúc hợp chất alkaloid ức chế acetylcholinesterase của loài *Stephania dielsiana* Y.C. Wu. bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng sử dụng chất hiện màu sinh học. *Tạp chí Dược liệu*. 2015; 20(2): 100-106.

[11] Đỗ Quyên, Nguyễn Thị Hải Linh. Chiết xuất và phân lập alkaloid trong phân đoạn có tác dụng

ức chế acetylcholinesterase của loài *Stephania sinica* Diels. *Tạp chí Dược học*. 2015; 55: 31-35.

ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY OF ALKALOIDS ISOLATED FROM THE TUBER OF *Stephania sinica* Diels

Pham Thi Tuyet Lan, Pham Quoc Tuan, Nguyen Quoc Tuan,
Ha Quang Loi, Ha Thanh Hoa, Nguyen Duc Hung
*Center for Drug Research and Technology Transfer,
Phu Tho College of Medicine and Pharmacy*

ABSTRACT

Some major compounds inhibiting acetylcholinesterase (AChE) were isolated and purified from the tuber of *Stephania sinica* Diels in this work. Using methods of structural analysis as mass spectrometry (MS) and nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), four pure compounds including liriode-nine (1), sinomenine (2), palmatine (3), and dehydrocorydalmine (4) were identified. These compounds were tested for AChE inhibitory activity. At the concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$, AChE inhibitory activity of 1 ($30.0 \pm 3.2\%$) and 2 ($35.0 \pm 2.7\%$) were moderate, while the inhibitory activity of 3 and 4 were quite strong ($92.1 \pm 3.6\%$ and $90.2 \pm 3.1\%$, respectively) compared to positive control galanthamin ($94.7 \pm 2.9\%$). In addition, this study also presents the extraction and isolation of compound 4 for the first time from *Stephania sinica*.

Keywords: *Stephania sinica*, alkaloid, inhibitory activity, acetylcholinesterase