

# BÁN TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC DỤNG ỨC CHẾ ENZYM ACETYLCHOLINESTERASE CỦA MỘT SỐ DẪN XUẤT CỦA BAICALEIN

Trần Thế Huân\*, Đoàn Đình Ngọc, Trần Thái Sơn

Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế, 06 Ngô Quyền, Huế, Việt Nam

\* Tác giả liên hệ Trần Thế Huân <tthuan@hueuni.edu.vn>  
(Ngày nhận bài: 21-05-2020; Ngày chấp nhận đăng: 27-05-2020)

**Tóm tắt.** Từ baicalein, một flavonoid tiềm năng trong hướng nghiên cứu thuốc ức chế enzym acetylcholinesterase để điều trị bệnh Alzheimer, sáu dẫn xuất đã được bán tổng hợp thông qua các phản ứng ester hóa và aminoalkyl hóa. Thử nghiệm hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* của các dẫn xuất này bằng phương pháp Ellman cho thấy một số dẫn xuất có sự cải thiện về hoạt tính. Trong đó, dẫn xuất acetyl hóa có hoạt tính cao nhất với giá trị  $IC_{50}$  là 51,64  $\mu$ M.

**Từ khóa:** baicalein, bán tổng hợp, acetylcholinesterase, chất ức chế

## Semi-synthesis and evaluation of anti-acetylcholinesterase activity of some baicalein derivatives

Tran The Huan\*, Doan Dinh Ngoc, Tran Thai Son

University of Medicine and Pharmacy, Hue University, 6 Ngo Quyen St., Hue, Vietnam

\* Correspondence to Tran The Huan <tthuan@hueuni.edu.vn>  
(Received: 21 May 2020; Accepted: 27 May 2020)

**Abstract.** Baicalein is a potential flavonoid for acetylcholinesterase inhibitor research to treat Alzheimer's disease. Six baicalein derivatives have been semi-synthesized via esterification and amino alkylation reactions. The *in vitro* acetylcholinesterase inhibitory activity of these derivatives was evaluated with the Ellman method, and certain improvement in the activity of some derivatives is observed. The acetylated derivative shows the highest activity with an  $IC_{50}$  value of 51.64  $\mu$ M.

**Keywords:** baicalein, semi-synthesis, acetylcholinesterase, inhibitor

### 1 Đặt vấn đề

Bệnh Alzheimer là một bệnh thoái hóa thần kinh tiến triển gây ra các vấn đề về trí nhớ, suy nghĩ

và hành vi. Các triệu chứng thường phát triển chậm và trở nên nghiêm trọng hơn theo thời gian, ảnh hưởng đến cuộc sống và công việc hàng ngày. Nguyên nhân chủ yếu gây bệnh Alzheimer là sự

thiếu hụt các nơ ron thần kinh cholinergic ở một số vùng của não liên quan đến trí nhớ và nhận thức. Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng tình trạng mất trí nhớ và mất khả năng nhận thức này liên quan đến việc thiếu hụt chất dẫn truyền thần kinh acetylcholin ở não. Từ đó, người ta đã tìm ra các biện pháp để nâng cao lượng chất dẫn truyền này, trong đó có phương pháp ức chế enzym acetylcholinesterase (AChE).

Hiện tại, chỉ có bốn loại thuốc được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Hoa Kỳ chấp nhận trong điều trị bệnh Alzheimer bao gồm ba loại tác động ức chế enzym AChE (donepezil, rivastigmin và galantamin) và một loại tác động ức chế thụ thể của glutamat (memantin) [1, 2]. Trong đó, galantamin là một alkaloid được chiết xuất từ thiên nhiên còn rivastigmin là một dẫn xuất bán tổng hợp từ physostigmin – cũng một alkaloid chiết xuất từ thiên nhiên. Hai loại thuốc còn lại có nguồn gốc tổng hợp toàn phần [3].

Hiện nay, hướng nghiên cứu tổng hợp dẫn xuất với chất khởi nguồn có nguồn gốc từ thiên nhiên đang là một hướng đi tiềm năng [4]. Baicalein là một flavonoid được phân lập từ rễ của cây hoàng cầm (*Scutellaria baicalensis*) và *Scutellaria lateriflora* thuộc họ Lamiaceae [5]. Nhiều công trình nghiên cứu đã chứng minh baicalein có đặc tính bảo vệ thần kinh rất tốt trên *in vitro* và *in vivo* theo nhiều cơ chế khác nhau [6-8]. Do đó, tiến hành biến đổi cấu trúc của baicalein nhằm cải thiện hoạt tính

ức chế enzym acetylcholinesterase trong hướng nghiên cứu thuốc điều trị bệnh Alzheimer.

## 2 Đối tượng và phương pháp

### 2.1 Đối tượng

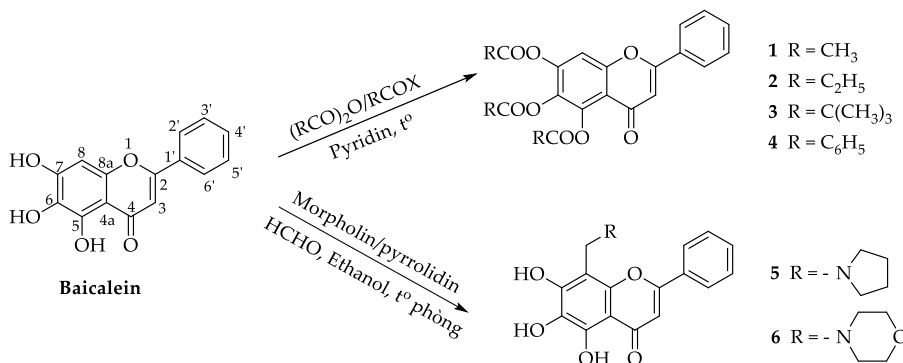
Nguyên liệu: Baicalein (Trung Quốc); anhydrid acetic, anhydrid propionic, pyvaloyl clorid và benzoyl clorid (Merck); pyrrolidin và morpholin (Acros); acetylcholinesterase, acetylthiocholin iodid và 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic (Sigma-Aldrich).

Thiết bị: Sắc ký lớp mỏng triển khai trên bản mỏng sắc ký silica gel 60 F<sub>254</sub> (Merck), nhiệt độ nóng chảy đo trên máy Stuart, phổ UV ghi trên máy UV-Vis Jasco V-730, phổ hồng ngoại ghi trên máy IRPrestige-21, phổ cộng hưởng từ hạt nhân ghi trên máy Bruker (phổ <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR với tần số tương ứng 500 MHz và 125 MHz), thử hoạt tính sinh học trên máy Elisa Labomed EMR-500.

### 2.2 Phương pháp

#### Phương pháp bán tổng hợp

Từ nguyên liệu baicalein, tiến hành phản ứng bán tổng hợp là ester hóa và aminoalkyl hóa theo Sơ đồ 1 [9]. Sản phẩm tổng hợp được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại trong dung môi thích hợp. Xác định các thông số vật lý của các dẫn xuất và xác định cấu trúc bằng phổ UV, IR, <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR.



Sơ đồ 1. Quy trình bán tổng hợp tạo các dẫn xuất của baicalein

### Thử hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase

Hoạt tính ức chế AChE của nguyên liệu và các dẫn xuất của baicalein được xác định bằng phương pháp Ellman [10]. Thử nghiệm được thực hiện trên máy Elisa 96 giếng, sử dụng AChE với chất đối chứng là galantamin. Hỗn hợp phản ứng gồm dung dịch đệm phosphat 0,1 M (pH 8), cơ chất acetylthiocholin iodid 2,4 mM; mẫu thử được pha trong DMSO ở các nồng độ khác nhau, dung dịch AChE 0,25 IU/mL (pha trong đệm phosphat); mẫu trắng là mẫu thay dung dịch enzym bằng đệm phosphat. Hỗn hợp phản ứng được ủ trong 15 phút ở 25 °C, sau đó thêm dung dịch thuốc thử 5,5-dithio-bis-2-nitrobenzoic. Hỗn hợp được ủ tiếp 24 phút ở 25 °C, sau đó đo độ hấp thụ quang ở bước sóng 405 nm. Mẫu đối chứng được thực hiện tương tự mẫu thử; thay dung dịch mẫu thử bằng DMSO ở nồng độ tương ứng.

Phần trăm ức chế AChE (I%) được tính theo công thức sau:

$$I\% = [(\Delta A_0 - \Delta A) / \Delta A_0] \times 100$$

trong đó  $\Delta A_0$  và  $\Delta A$  lần lượt là chênh lệch độ hấp thụ quang của dung dịch mẫu đối chứng và mẫu thử so với mẫu trắng.

Xây dựng phương trình hồi quy tuyến tính thể hiện mối tương quan giữa log nồng độ chất thử nghiệm ( $\mu\text{M}$ ) và phần trăm ức chế AChE; từ đó tính được giá trị  $\text{IC}_{50}$  của các dẫn xuất.

## 3 Kết quả

### 3.1 Kết quả bán tổng hợp

Thực hiện phản ứng bán tổng hợp theo quy trình được trình bày ở Sơ đồ 1 thu được sáu dẫn xuất (1–6).

Hợp chất 1: 5,6,7-triacetoxyflavon

Cân baicalein (1 g, 3,6 mmol) cho vào bình cầu hai cổ, thêm pyridin (15 mL) vào khuấy cho tan hoàn toàn. Nhỏ từ từ anhydrid acetic (2,7 mL, 28,3 mmol) bằng phễu nhỏ giọt. Tiếp tục đun hỗn hợp

phản ứng ở 70–80 °C. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi thích hợp. Khi phản ứng kết thúc, rót hỗn hợp phản ứng vào cốc chứa nước đá lạnh, khuấy đều. Sản phẩm không tan sẽ lắng xuống, lọc qua phễu chân không, sấy khô thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách kết tinh lại nhiều lần trong hệ dung môi dichlometan/ metanol (1:2, v/v), thu được sản phẩm tinh khiết. Hiệu suất: 58,29%. Bột kết tinh màu trắng. **Nhiệt độ nóng chảy:** 196–197 °C. **UV** ( $\lambda_{\text{max}}$ , nm, MeOH): 256, 294. **IR** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3065 ( $\nu_{\text{C-H sp}^2}$ ), 2936 ( $\nu_{\text{C-H sp}^3}$ ), 1784 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1645 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1452 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1175 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ).  **$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,08 (dd,  $J_1 = 1,5$  Hz,  $J_2 = 8,5$  Hz, 2H,  $\text{H}_{2',6'}$ ), 7,83 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 7,62–7,57 (m, 3H,  $\text{H}_{3',4',5'}$ ), 6,94 (s, 1H,  $\text{H}_3$ ), 2,37 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 2,37 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 2,3 (s, 3H,  $-\text{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  175,3 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{ceton}}$ ), 167,8 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$ ), 167,5 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$ ), 167,4 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$ ), 162,0, 153,6, 146,7, 141,2, 132,6, 132,0, 130,4, 129,1, 126,4, 115,1, 111,1, 107,5, 20,4 ( $-\text{CH}_3$ ), 20,3 ( $-\text{CH}_3$ ), 19,7 ( $-\text{CH}_3$ ).

Hợp chất 2: 5,6,7-tripropionyloxyflavon

Thực hiện quy trình tổng hợp tương tự hợp chất 1, sử dụng anhydrid propionic (4,4 mL, 33,5 mmol) thay cho anhydrid acetic, tinh chế bằng cách kết tinh lại nhiều lần trong acetone. Hiệu suất: 74,91%. Dạng bột kết tinh màu trắng. **Nhiệt độ nóng chảy:** 167–168 °C. **UV** ( $\lambda_{\text{max}}$ , nm, MeOH): 256, 295. **IR** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3063 ( $\nu_{\text{C-H sp}^2}$ ), 2984 ( $\nu_{\text{C-H sp}^3}$ ), 2943 ( $\nu_{\text{C-H sp}^3}$ ), 1782 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1643 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1454 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1111 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ).  **$^1\text{H-NMR}$**  (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8,08 (dd,  $J_1 = 1,5$  Hz,  $J_2 = 8,5$  Hz, 2H,  $\text{H}_{2',6'}$ ), 7,83 (s, 1H,  $\text{H}_8$ ), 7,62–7,57 (m, 3H,  $\text{H}_{3',4',5'}$ ), 6,93 (s, 1H,  $\text{H}_3$ ), 2,68 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ), 2,67 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ), 2,66 (q,  $J = 7,5$  Hz, 2H,  $-\text{CH}_2-$ ), 1,18 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1,16 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H,  $-\text{CH}_3$ ), 1,16 (t,  $J = 7,5$  Hz, 3H,  $-\text{CH}_3$ ).  **$^{13}\text{C-NMR}$**  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  175,3 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{ceton}}$ ), 171,0 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$ ), 170,8 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$ ), 170,7 ( $\text{C}=\text{O}_{\text{ester}}$ ), 162,0, 153,6, 146,8, 141,2, 132,5, 132,0, 130,4, 129,1, 126,3, 115,1, 111,0, 107,5, 26,7 ( $-\text{CH}_2-$ ), 26,6 ( $-\text{CH}_2-$ ), 26,2 ( $-\text{CH}_2-$ ), 9,0 ( $-\text{CH}_3$ ), 8,7 ( $-\text{CH}_3$ ), 8,6 ( $-\text{CH}_3$ ).

## Hợp chất 3: 5,6,7-tripivaloyloxyflavon

Thực hiện quy trình tổng hợp tương tự hợp chất 1, sử dụng pivaloyl clorid (2,1 mL, 16,8 mmol) thay cho anhydrid acetic, tinh chế bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi dichlometan/acetone (1:2, v/v). Hiệu suất: 82,99%. Dạng bột kết tinh màu trắng. **Nhiệt độ nóng chảy:** 234–235 °C. **UV** ( $\lambda_{\max}$ , nm, MeOH): 254, 296. **IR** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3063 ( $\nu_{\text{C-H sp}^2}$ ), 2970 ( $\nu_{\text{C-H sp}^3}$ ), 2872 ( $\nu_{\text{C-H sp}^3}$ ), 1762 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1649 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1452 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1107 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8,07 (dd,  $J_1 = 1,5$  Hz,  $J_2 = 8,5$  Hz, 2H, H<sub>2',6'</sub>), 7,77 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 7,62–7,57 (m, 3H, H<sub>3',4',5'</sub>), 6,88 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 1,39 (s, 9H, 3x, –CH<sub>3</sub>), 1,36 (s, 9H, –CH<sub>3</sub>), 1,35 (s, 9H, –CH<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  174,8 (C=O<sub>ceton</sub>), 174,4 (C=O<sub>ester</sub>), 174,3 (C=O<sub>ester</sub>), 173,8 (C=O<sub>ester</sub>), 161,6, 153,2, 146,9, 141,5, 132,3, 131,5, 130,2, 128,6, 126,0, 114,7, 110,1, 107,2, 38,6, 38,3, 26,7 (–CH<sub>3</sub>), 26,6 (–CH<sub>3</sub>), 26,3 (–CH<sub>3</sub>).

## Hợp chất 4: 5,6,7-tribenzoyloxyflavon

Thực hiện quy trình tổng hợp tương tự hợp chất 1, sử dụng benzoyl clorid (1,8 mL, 15,3 mmol) thay cho anhydrid acetic, tinh chế bằng cách kết tinh lại trong hệ dung môi methanol/acetone (1:1, v/v). Hiệu suất: 74,97%. Dạng bột kết tinh màu trắng. **Nhiệt độ nóng chảy:** 227–228 °C. **UV** ( $\lambda_{\max}$ , nm, MeOH): 232, 296. **IR** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3065 ( $\nu_{\text{C-H sp}^2}$ ), 1751 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1649 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1454 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1099 ( $\nu_{\text{C-O}}$ ). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8,15 (s, 1H, H<sub>8</sub>), 8,10 (dd,  $J_1 = 1,5$  Hz,  $J_2 = 8,5$  Hz, 2H, H<sub>Bz</sub>), 8,02 (dd,  $J_1 = 1$  Hz,  $J_2 = 8,5$  Hz, 2H, H<sub>Bz</sub>), 8,00 (dd,  $J_1 = 1,5$  Hz,  $J_2 = 8,5$  Hz, 2H, H<sub>Bz</sub>), 7,93 (dd,  $J_1 = 1$  Hz,  $J_2 = 8,5$  Hz, 2H, H<sub>Bz</sub>), 7,70–7,66 (m, 2H, H<sub>Bz</sub>), 7,64–7,57 (m, 4H, H<sub>Bz</sub>), 7,53 (t,  $J = 8$  Hz, 2H, H<sub>Bz</sub>), 7,48 (t,  $J = 8$  Hz, 2H, H<sub>Bz</sub>), 7,42 (t,  $J = 8$  Hz, 2H, H<sub>Bz</sub>), 6,95 (s, 1H, H<sub>3</sub>). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  175,2 (C=O<sub>ceton</sub>), 163,2 (C=O<sub>ester</sub>), 162,8 (C=O<sub>ester</sub>), 162,7 (C=O<sub>ester</sub>), 162,1, 153,8, 146,8, 141,4, 134,6, 134,1, 132,8, 132,0, 130,4, 129,8, 129,6, 129,0, 128,8, 128,2, 127,2, 126,7, 126,4, 115,5, 111,7, 107,7.

Hợp chất 5: 5,6,7-trihydroxy-8-(pyrrolidin-1-ylmethyl)flavon

Cân baicalein (1 g, 3,6 mmol) cho vào cốc có mở, thêm ethanol (250 mL), khuấy đều đến khi nguyên liệu tan hết. Lọc dưới áp suất giảm để loại bỏ các tạp chất không tan. Dịch lọc được cho vào trong một bình cầu 2 cổ. Cho hỗn hợp gồm HCHO 37% (0,8 mL, 8,1 mmol) và pyrrolidin (0,7 mL, 8,4 mmol) vào phễu nhỏ giọt, nhỏ từ từ vào bình phản ứng. Hỗn hợp được khuấy đều đến khi xuất hiện tủa. Sau khi phản ứng kết thúc, lọc lấy tủa dưới áp suất giảm, sấy khô thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng cách hòa tan trong ethanol nóng, sử dụng NaOH 1% điều chỉnh lên pH 9, lọc loại tạp không tan rồi điều chỉnh về lại pH trung tính bằng HCl 1%, sau đó làm lạnh cho sản phẩm kết tinh thu được sản phẩm tinh khiết. Hiệu suất: 78,30%. Dạng bột màu vàng. **Nhiệt độ nóng chảy:** 214–215 °C. **UV** ( $\lambda_{\max}$ , nm, MeOH): 217, 264, 360. **IR** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3362 ( $\nu_{\text{O-H}}$ ), 3067 ( $\nu_{\text{C-H sp}^2}$ ), 2978 ( $\nu_{\text{C-H sp}^3}$ ), 2930 ( $\nu_{\text{C-H sp}^3}$ ), 1678 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1602 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1490 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12,54 (s, 1H, OH), 8,04 (dd,  $J_1 = 2$  Hz,  $J_2 = 8$  Hz, 2H, H<sub>2',6'</sub>), 7,58–7,55 (m, 3H, H<sub>3',4',5'</sub>), 6,79 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 4,34 (s, 2H, –CH<sub>2</sub>–), 3,09 (t,  $J = 7$  Hz, 4H, –NCH<sub>2</sub>–), 1,90 (t,  $J = 7$  Hz, 4H, –NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–). **<sup>13</sup>C-NMR** (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  180,4 (C=O<sub>ceton</sub>), 162,9, 160,6, 149,4, 143,2, 131,5, 131,2, 130,1, 129,0, 126,0, 104,4, 100,6, 96,7, 52,7 (–NCH<sub>2</sub>–), 49,4 (–NCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>–), 22,9 (–CH<sub>2</sub>–).

Hợp chất 6: 5,6,7-trihydroxy-8-(morpholin-1-ylmethyl)flavon

Thực hiện quy trình tổng hợp tương tự hợp chất 5, sử dụng morpholin (0,7 mL, 8,1 mmol) thay cho pyrrolidin. Hiệu suất: 58%. Dạng bột màu vàng. **Nhiệt độ nóng chảy:** 200–201 °C. **UV** ( $\lambda_{\max}$ , nm, MeOH): 216, 277, 327. **IR** ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ , KBr) 3362 ( $\nu_{\text{O-H}}$ ), 3084 ( $\nu_{\text{C-H sp}^2}$ ), 2967 ( $\nu_{\text{C-H sp}^3}$ ), 2864 ( $\nu_{\text{C-H sp}^3}$ ), 1672 ( $\nu_{\text{C=O}}$ ), 1614 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ), 1448 ( $\nu_{\text{C=C}}$ ). **<sup>1</sup>H-NMR** (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  12,72 (s, 1H, OH), 8,08 (dd,  $J_1 = 2$  Hz,  $J_2 = 8$  Hz, 2H, H<sub>2',6'</sub>), 7,60–7,59 (m, 3H, H<sub>3',4',5'</sub>), 6,94 (s, 1H, H<sub>3</sub>), 3,95 (s, 2H, –CH<sub>2</sub>–), 3,61 (t,  $J = 4,5$  Hz, 4H, –OCH<sub>2</sub>–), 2,60 (t,  $J = 4,5$  Hz, 4H, –NCH<sub>2</sub>–).

$^{13}\text{C-NMR}$  (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  182,2 (C=O<sub>ceton</sub>), 162,5, 154,2, 148,0, 146,0, 131,8, 131,1, 129,1, 128,9, 126,2, 104,4, 103,6, 100,2, 66,0 (–OCH<sub>2</sub>–), 52,5 (NCH<sub>2</sub>–), 51,5 (–CH<sub>2</sub>–).

### 3.2 Hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase

Tám hợp chất bao gồm baicalein, các dẫn xuất bán tổng hợp và chất đối chứng galantamin được thử nghiệm hoạt tính ức chế AChE. Giá trị IC<sub>50</sub> tương ứng được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Hoạt tính ức chế AChE của các dẫn xuất

Stt	Dẫn xuất	IC <sub>50</sub> (μM)
1	Baicalein	74,14
2	1	51,64
3	2	66,24
4	3	100,25
5	4	131,35
6	5	246,22
7	6	265,09
8	Galantamin	1,31

## 4 Thảo luận

### 4.1 Về tổng hợp hóa học

Phản ứng ester hóa xảy ra theo cơ chế phản ứng thế ái nhân lưỡng phân tử. Trong môi trường kiềm (pyridin), baicalein chuyển thành dạng anion phenolat có tính nucleophin cao hơn, đóng vai trò là nhóm thế giàu điện tử. Tác nhân phản ứng ester hóa là anhydrid acetic, anhydrid propionic, pivaloyl clorid và benzoyl clorid đóng vai trò là trung tâm bị thế. Đối với các tác nhân anhydrid, phản ứng được tiến hành ở nhiệt độ cao nhằm tăng tốc độ và hiệu suất. Đối với các tác nhân là acid halid, phản ứng diễn ra nhanh chóng và hiệu suất cao ngay ở nhiệt độ thường. Pyridin là một kiềm yếu, vừa là chất xúc tác phản ứng vừa đóng vai trò

là dung môi hòa tan nguyên liệu và sản phẩm tạo thành.

Phản ứng aminoalkyl hóa được thực hiện theo cơ chế phản ứng Mannich. Dẫn xuất tạo thành vừa có tính acid do có các nhóm –OH phenol, vừa có tính base do gắn thêm nhóm nitơ bậc 3. Do đó, dẫn xuất này có tính lưỡng tính và phân cực. Chính vì vậy, sản phẩm thế tạo thành ít tan trong dung môi phản ứng (ethanol) và tủa trong bình phản ứng. Đồng thời, vì bản chất lưỡng tính và phân cực, không thể triển khai loại dẫn xuất này trên sắc ký lớp mỏng pha thường lẫn pha đảo, khó xác định độ tinh khiết bằng phương pháp này. Trong quá trình tinh chế cần điều chỉnh pH của dung dịch hòa tan sản phẩm thô lên 9 để cho sản phẩm hòa tan hết (tạo muối với các nhóm –OH phenol). Sau đó, lọc loại các tạp chất không tan và điều chỉnh lại về pH trung tính để sản phẩm kết tinh trở lại nhằm đảm bảo thu được sản phẩm tinh khiết. Sản phẩm thế tỉ lệ 1:1 giữa hỗn hợp tác nhân (HCHO và morpholin/pyrrolidin) với nguyên liệu baicalein ưu tiên thế hydro ở vị trí C<sub>8</sub> trên vòng A vì mật độ điện tử ở vị trí này lớn nhất.

Cấu trúc các dẫn xuất bán tổng hợp được xác định thông qua các phổ UV, IR,  $^1\text{H-NMR}$  và  $^{13}\text{C-NMR}$ . Các dẫn xuất đều có các peak hấp thụ đặc trưng của flavonoid trong vùng bước sóng 310–390, 225–260 và 203–215 nm trên phổ UV. Phổ IR cũng cho các peak đặc trưng ở vùng nhóm chức. Phổ  $^1\text{H-NMR}$  của các dẫn xuất được xác định và biện giải phù hợp với cấu trúc, kết hợp đối chiếu với phổ chuẩn của baicalein đã được công bố [11]. Trên phổ  $^1\text{H-NMR}$  của các dẫn xuất ester, hai vị trí H<sub>3</sub> và H<sub>8</sub> cho các peak đơn (s) đặc trưng trên phổ đồ ở vùng từ 7,8 đến 6,8. Ảnh hưởng của các nhóm thế ester hút điện tử làm cho mật độ điện tử tại vị trí C<sub>8</sub> giảm, do đó H<sub>8</sub> trở nên linh động hơn và có độ dịch chuyển xa hơn so với H<sub>3</sub> trên phổ đồ. Còn đối với các dẫn xuất aminoalkyl, do đã thế ở vị trí C<sub>8</sub> nên trên phổ đồ chỉ còn xuất hiện một peak đơn (s) của H<sub>3</sub> ở  $\delta$  6,79 (dẫn xuất 5) hay  $\delta$  6,94 (dẫn xuất 6). Ở dẫn xuất aminoalkyl 6, các proton của các

nhóm OCH<sub>2</sub> hay NCH<sub>2</sub> gắn vào carbon liên kết với nguyên tử có độ âm điện cao. Nguyên tử này hút đôi điện tử về phía nó làm giảm sự chắn của từ trường bên ngoài áp đặt lên proton khảo sát. Vì vậy, proton của nhóm OCH<sub>2</sub> liên kết với nguyên tử có độ âm điện cao hơn nằm ở vùng từ trường thấp hơn tại  $\delta$  3,61 (t, J = 4,5 Hz) so với proton của nhóm NCH<sub>2</sub> tại  $\delta$  2,60 (t, J = 4,5 Hz). Phổ <sup>13</sup>C-NMR cũng cho đầy đủ số lượng carbon và các tín hiệu carbon đặc trưng.

#### 4.2 Về hoạt tính sinh học

Hoạt tính ức chế AChE của tất cả dẫn xuất bao gồm baicalein, các dẫn xuất bán tổng hợp và đối chứng galantamin được xác định. Hai dẫn xuất bán tổng hợp có hoạt tính cao hơn baicalein là dẫn xuất **1** và **2**. Dẫn xuất **1** là chất có hoạt tính cao nhất với IC<sub>50</sub> 51,64  $\mu$ M (so với baicalein có IC<sub>50</sub> 74,14  $\mu$ M). Các kết quả này góp phần định hướng cho các nghiên cứu tiếp theo về cải thiện hoạt tính của các dẫn xuất thiên nhiên định hướng làm thuốc.

Xét về liên quan giữa cấu trúc – tác dụng, các nhóm chức ester thay thế cho nhóm hydroxyl của baicalein giúp cải thiện hoạt tính ức chế AChE. Thế nhóm aminoalkyl vào vị trí C<sub>8</sub> của vòng A của baicalein làm giảm hoạt tính ức chế enzym. Sự cộng kênh trong cấu trúc và kéo dài mạch carbon cũng ảnh hưởng đến tác dụng ức chế AChE. Điều đó được thể hiện qua giá trị IC<sub>50</sub> của các dẫn xuất ester, aminoalkyl tăng dần theo độ dài mạch carbon cũng như mức độ cộng kênh trong cấu trúc.

### 5 Kết luận

Từ baicalein, sáu dẫn xuất đã được bán tổng hợp thông qua các phản ứng ester hóa và aminoalkyl hóa. Các thông số lý hóa và cấu trúc của các dẫn xuất được xác định. Một số dẫn xuất thu được có sự cải thiện về hoạt tính so với nguyên liệu baicalein ban đầu. Trong đó, dẫn xuất **1** (acetyl hóa) có hoạt tính cao nhất với giá trị IC<sub>50</sub> là 51,64  $\mu$ M.

### Thông tin tài trợ

Công trình được thực hiện với sự tài trợ kinh phí của Đại học Huế (Mã số đề tài: DHH 2019-04-102).

### Tài liệu tham khảo

1. Dos Santos Picanco LC, Ozela PF, de Fatima de Brito Brito M, Pinheiro AA, Padilha EC, Braga FS, et al. Alzheimer's Disease: A Review from the Pathophysiology to Diagnosis, New Perspectives for Pharmacological Treatment. *Current medicinal chemistry*. 2018;25(26):3141-59.
2. Alzheimer's Association. Medications For Memory. Available at: <https://www.alz.org/alzheimers-dementia/treatments/medications-for-memory> [Accessed 26 May 2020]
3. Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP, Cavallaro V. Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy. *Current neuropharmacology*. 2013;11(4):388-413.
4. Hoan DQ. Synthesis and biological activity evaluation of some derivatives synthesized from curcumin and curcumin analog. *Hue University Journal of Science: Natural Science*. 2017;126(1B):127-33.
5. Kim JK, Kim YS, Kim Y, et al. Comparative analysis of flavonoids and polar metabolites from hairy roots of *Scutellaria baicalensis* and *Scutellaria lateriflora*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014;30(3):887-892.
6. Han J, Ji Y, Youn K. Baicalein as a Potential Inhibitor against BACE1 and AChE: Mechanistic Comprehension through *In Vitro* and Computational Approaches. 2019;11(11).
7. Sowndhararajan K, Deepa P, Kim M, Park SJ, Kim S. Baicalein as a potent neuroprotective agent: A review. *Biomedicine & pharmacotherapy*. 2017;95:1021-32.
8. Zhang S-Q, Obregon D, Ehrhart J, Deng J, Tian J, Hou H, et al. Baicalein reduces  $\beta$ -amyloid and promotes nonamyloidogenic amyloid precursor protein processing in an Alzheimer's disease transgenic mouse model. *Journal of Neuroscience Research*. 2013;91(9):1239-46.

9. Francis AC. Organic Chemistry. 10th ed. New York: McGraw-Hill Education; 2016.
10. Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*. 1961;7:88-95.
11. Wu JY, Chung KT, Liu YW, Lu FJ, Tsai RS, Chen CH, et al. Synthesis and biological evaluation of novel C(6) modified baicalein derivatives as antioxidative agents. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(8):2838-45.