

# BÁN TỔNG HỢP VÀ ĐÁNH GIÁ TÁC ĐỘNG ỨC CHẾ ENZYM ACETYLCHOLINESTERASE CỦA MỘT SỐ DẪN CHẤT HESPERETIN

Trần Thế Huân<sup>1</sup>, Trần Thành Đạo<sup>2</sup>

(1) Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế

(2) Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

## Tóm tắt

**Đặt vấn đề:** Ức chế enzym acetylcholinesterase là một trong những hướng nghiên cứu triển vọng trong điều trị bệnh Alzheimer. Hesperetin là một dẫn chất flavonoid tiềm năng trong hướng đi này. **Mục tiêu:** Bán tổng hợp một số dẫn chất của hesperetin và khảo sát tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro*. **Đối tượng và phương pháp nghiên cứu:** Bán tổng hợp tạo các dẫn chất ester và ether của hesperetin. Thử nghiệm hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* dựa theo phương pháp Ellman. **Kết quả:** Thủy phân hesperidin thu được hesperetin, từ hesperetin tiến hành các phản ứng bán tổng hợp thu được hai dẫn chất ester, hai dẫn chất ether. Kết quả thử hoạt tính cho thấy một số dẫn chất thu được thể hiện hoạt tính tốt hơn so với nguyên liệu hesperetin ban đầu. Trong đó, dẫn chất 1 có hoạt tính tốt nhất với giá trị  $IC_{50}$  là 43,50 $\mu$ M. **Kết luận:** Bán tổng hợp được bốn dẫn chất của hesperetin và khảo sát được hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase của chúng, một số dẫn chất có sự cải thiện về hoạt tính.

**Từ khóa:** Hesperetin, bán tổng hợp, ức chế, enzym, acetylcholinesterase

## Abstract

# SEMI-SYNTHESIS AND EVALUATION OF HESPERETIN DERIVATIVES AS ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORS

Tran The Huan<sup>1</sup>, Tran Thanh Dao<sup>2</sup>

(1) Faculty of Pharmacy, Hue University of Medicine and Pharmacy

(2) Faculty of Pharmacy, Ho Chi Minh city University of Medicine and Pharmacy

**Background:** Inhibition of acetylcholinesterase are regarded as one of promising approach to treat Alzheimer's disease. Hesperetin is a potential flavonoid for further development in this direction. **Objectives:** Semi-synthesized and assayed for hesperetin derivatives's acetylcholinesterase inhibitory activity *in vitro*. **Materials and methods:** Ester and ether derivatives of hesperetin were semi-synthesized. The semi-synthesis compounds were tested for acetylcholinesterase inhibitory activity *in vitro* according to the Ellman's method. **Results:** Hesperetin is obtained by hydrolysing hesperidin. Then, two ester and two ether derivatives were semi-synthesized from hesperetin. The results showed that some of the semi-synthesis hesperetin derivatives displayed stronger acetylcholinesterase inhibitory activity than hesperetin. Among them, derivative 1 has the best activity with an  $IC_{50}$  value of 43.50  $\mu$ M. **Conclusions:** Four hesperetin derivatives were semi-synthesized and investigated their acetylcholinesterase inhibitory activity, some of which showed improvement in activity.

**Key words:** Hesperetin, semi-synthesis, inhibit, enzyme, acetylcholinesterase

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Alzheimer là bệnh lý rối loạn suy thoái thần kinh tiến triển, đặc trưng bởi sự suy giảm về trí nhớ và nhận thức thường xảy ra ở người cao tuổi. Theo Tổ chức Y tế Thế giới, Alzheimer là nguyên nhân chủ yếu gây ra tình trạng sa sút trí tuệ, 60-70% trường hợp có vấn đề về trí nhớ có liên quan đến bệnh lý này. Tỷ lệ mắc bệnh và tử vong ngày càng gia tăng trên toàn thế giới, dự đoán có khoảng 80 triệu người

mắc bệnh vào năm 2040 [8]. Đồng thời, chi phí điều trị cũng đặt áp lực lớn lên toàn xã hội [1].

Nguyên nhân chủ yếu gây bệnh Alzheimer là do thiếu hụt các nơ ron thần kinh cholinergic ở một số vùng của não liên quan đến trí nhớ và nhận thức. Alzheimer cũng biểu hiện bởi sự hiện diện của các mảng amyloid và đám rối thần kinh ở não bộ [10].

Một số nghiên cứu đã chứng minh rằng tình

Địa chỉ liên hệ: Trần Thế Huân, email: huan.pharma@gmail.com

Ngày nhận bài: 30/6/2018, Ngày đồng ý đăng: 7/7/2018; Ngày xuất bản: 20/8/2018

trạng mất trí nhớ và mất khả năng nhận thức này liên quan đến việc thiếu hụt chất dẫn truyền thần kinh acetylcholine ở não [2].

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) [6]. Quá trình ức chế enzym AChE không những nâng cao sự dẫn truyền thần kinh cholinergic mà còn làm giảm sự hình thành các mảng beta amyloid trong bệnh lý Alzheimer [9].

Flavonoid là nhóm hợp chất tự nhiên, đã được chứng minh là có nhiều tác dụng sinh học tốt như kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa, chống béo phì,...[11], [7].

Đặc biệt, nhóm hợp chất này cũng thể hiện được hoạt tính ức chế enzym AChE tốt [12]. Đồng thời, do có nguồn gốc tự nhiên, flavonoid cũng đã được chứng minh là khá an toàn khi sử dụng trên cơ thể người.

Do đó, từ hesperetin - một flavonoid đầy tiềm năng trong hướng ức chế enzym AChE - tiến hành nghiên cứu bán tổng hợp một số dẫn chất từ hesperetin nhằm mục đích cải thiện hoạt tính, tìm ra các dẫn chất có tác dụng tốt hơn trong hướng nghiên cứu thuốc điều trị bệnh Alzheimer [3].

## 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Nguyên liệu và thiết bị

*Nguyên liệu:* Hesperidin (Aladdin), các hóa chất và dung môi sử dụng bán tổng hợp được cung cấp từ các công ty hóa chất Merck, Acros, Sigma-Aldrich, Trung Quốc và sử dụng không qua tinh chế.

*Thiết bị:* bản mỏng tráng sẵn silicagel GF<sub>254</sub> của Merck, máy đo điểm chảy Stuart, máy đo quang phổ tử ngoại UV-Vis Jasco V-630, máy đo khối phổ Shimadzu, máy đo phổ hồng ngoại FTIR-Equinox 55 de Bruker, máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân Bruker (phổ <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR với tần số tương ứng 500MHz và 125MHz).

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### *Phương pháp bán tổng hợp*

Từ nguyên liệu hesperidin, tiến hành thủy phân tạo dẫn chất hesperetin rồi thực hiện phản ứng bán tổng hợp là ester hóa, ether hóa theo Sơ đồ 1 [5]. Sản phẩm tổng hợp được tinh chế bằng phương pháp kết tinh lại trong dung môi thích hợp hoặc bằng sắc ký cột. Các dẫn chất được xác định các thông số vật lý và xác định cấu trúc bằng phổ MS, IR, <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR.

#### *Phương pháp thử hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase*

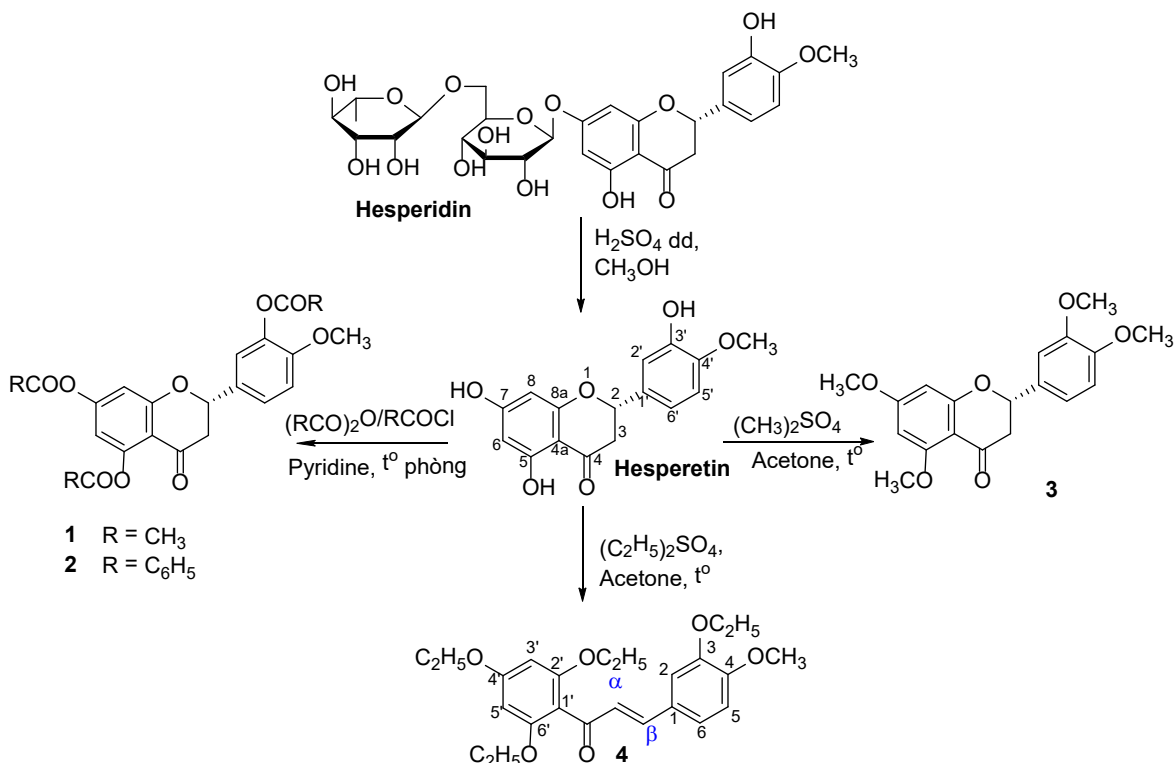
Hoạt tính ức chế enzym AChE của nguyên liệu và các dẫn chất của hesperetin được xác định bằng phương pháp Ellman [4]. Thử nghiệm được thực hiện trên máy Elisa 96 giếng, sử dụng enzym AChE (Sigma-Aldrich) với chất đối chứng là galantamine. Hỗn hợp phản ứng gồm: dung dịch đệm phosphat 0,1 M (pH 8), cơ chất acetylthiocholin iodid (ATCI) 2,4 mM, mẫu thử được pha trong methanol ở các nồng độ khác nhau, dung dịch enzym 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 acid (DTNB). Hỗn hợp được ủ tiếp 24 phút ở nhiệt độ 25°C, sau đó đo độ hấp thụ ở bước sóng 405 nm. Mẫu chứng được thực hiện tương tự mẫu thử, thay dung dịch mẫu thử bằng methanol.

Phần trăm ức chế enzym 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 của dung dịch mẫu 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 ( $\mu$ M) và phần trăm ức chế enzym AChE, từ đó tính được giá trị IC<sub>50</sub> của các dẫn chất.



Sơ đồ 1. Quy trình bán tổng hợp tạo các dẫn chất của hesperetin

### 3. KẾT QUẢ

#### 3.1. Kết quả tổng hợp

Thực hiện phản ứng thủy phân hesperidin và bán tổng hợp theo quy trình được trình bày ở Sơ đồ 1 thu được hesperetin và bốn dẫn chất (1-4) của hesperetin.

#### Thủy phân tạo hesperetin

Cân khoảng 9 g hesperidin cho vào bình cầu 3 cổ dung tích 500 ml. Thêm vào 250 ml methanol và 9 ml xúc tác H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc. Hỗn hợp được khuấy từ và đun hồi lưu, theo dõi phản ứng bằng hệ dung môi CHCl<sub>3</sub> - MeOH (10:1). Khi phản ứng kết thúc, trung hòa dung dịch thu được đến pH 6 - 7 bằng dung dịch NaOH 10%. Sau đó, cô quay dịch thu được để loại bớt dung môi (methanol) đến khi còn khoảng 100 ml. Dịch này được cho vào bình chiết, chiết với khoảng 300 ml ethyl acetate (3 lần x 100 ml). Dịch chiết ethyl acetate thu được được rửa với nước cất 3 lần (100 ml/lần). Tiếp tục làm khan dịch chiết ethyl acetate này bằng Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, cô quay dưới áp suất giảm thu được sản phẩm hesperetin thô. Hòa tan sản phẩm thô trong một lượng tối thiểu acetone, thêm vào dung dịch khoảng 200 ml nước cất và 3 ml acid acetic, khuấy đều. Sau đó, làm lạnh dung dịch thu được, hesperetin sẽ kết tủa, lọc lấy sản phẩm sấy khô. Hiệu suất: 43,36%. Bột kết tinh

màu trắng. Nhiệt độ nóng chảy: 223 – 224 °C. UV ( $\lambda_{\text{max}}$  nm, MeOH): 288. MS [M-H]<sup>-</sup>: 301 (M = 302). IR (v cm<sup>-1</sup>, KBr) 3501,03 (v<sub>O-H</sub>), 3037,77 (v<sub>C-H</sub> nhân thơm), 2958,69 (v<sub>CH<sub>3</sub></sub>), 1638,80 (v<sub>C=O</sub>), 1581,85 (v<sub>C=C</sub> nhân thơm), 1507,17 (v<sub>C=C</sub> nhân thơm), 1174,81 (v<sub>C-O</sub>). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 12,12 (s, 1H, -OH<sub>5</sub>), 10,77 (s, 1H, -OH<sub>7</sub>), 9,08 (s, 1H, -OH<sub>3</sub>), 6,93 (d, J = 8 Hz, 1H, H<sub>5'</sub>), 6,92 (d, J = 2 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 6,87 (dd, J<sub>1</sub> = 8 Hz, J<sub>2</sub> = 2 Hz, 1H, H<sub>6'</sub>), 5,89 (d, J = 2 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 5,88 (d, J = 2 Hz, 1H, H<sub>6</sub>), 5,43 (dd, J<sub>1</sub> = 12 Hz, J<sub>2</sub> = 3 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3,77 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3,19 (dd, J<sub>1</sub> = 17 Hz, J<sub>2</sub> = 12 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 2,71 (dd, J<sub>1</sub> = 17 Hz, J<sub>2</sub> = 3 Hz, 1H, H<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 196,1, 166,6, 163,4, 162,7, 147,8, 146,4, 131,1, 117,6, 114,0, 111,9, 101,7, 95,7, 94,9, 78,1, 55,6, 42,0.

#### (1) 3',5,7-triacetoxy-4'-methoxyflavanone

Cân 1 g hesperetin cho vào bình cầu hai cổ, thêm 15 ml pyridine vào khuấy cho tan hoàn toàn. Nhỏ từ từ 1,6 ml anhydrid acetic bằng phễu nhỏ giọt. Tiếp tục khuấy hỗn hợp phản ứng ở nhiệt độ phòng. Theo dõi phản ứng bằng sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi thích hợp. Khi phản ứng kết thúc, hòa loãng hỗn hợp phản ứng bằng nước cất lạnh rồi cho ra cốc có mỡ, sản phẩm không tan sẽ lắng xuống, lọc qua phễu lọc chân không, sấy khô thu được sản phẩm thô. Sản phẩm thô được kết tinh lại nhiều lần

trong hỗn hợp dung môi methanol-acetone (1:1) thu được sản phẩm tinh. Hiệu suất: 82,13%. Bột kết tinh màu trắng. Nhiệt độ nóng chảy: 139 – 144 °C. UV ( $\lambda_{\max}$  nm, MeOH): 262; 315. MS [M+Na]<sup>+</sup>: 451 (M = 428). IR ( $\nu$  cm<sup>-1</sup>, KBr) 2937,40 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 2845,60 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 1771,72 ( $\nu_{\text{C=O ester}}$ ), 1619,31 ( $\nu_{\text{C=C nhân thơm}}$ ), 1517,46 ( $\nu_{\text{C=C nhân thơm}}$ ), 1193,38 ( $\nu_{\text{C-O ester}}$ ), 1023,39 ( $\nu_{\text{C-O ester}}$ ). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7,41 (dd,  $J_1 = 8,5$  Hz,  $J_2 = 2$  Hz, 1H, H<sub>6'</sub>), 7,30 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, H<sub>2'</sub>), 7,18 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H, H<sub>5'</sub>), 6,88 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, H<sub>8'</sub>), 6,69 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, H<sub>6'</sub>), 5,63 (dd,  $J_1 = 13$  Hz,  $J_2 = 3$  Hz, 1H, H<sub>2'</sub>), 3,79 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3,27 (dd,  $J_1 = 16,5$  Hz,  $J_2 = 13$  Hz, 1H, H<sub>3'</sub>), 2,71 (dd,  $J_1 = 16,5$  Hz,  $J_2 = 3$  Hz, 1H, H<sub>3'</sub>), 2,30 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO-), 2,27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO-), 2,26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>CO-). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  189,1, 168,5, 168,4, 168,2, 162,6, 155,6, 151,1, 150,6, 139,1, 130,6, 125,6, 121,5, 112,7, 111,4, 110,7, 109,1, 78,2, 55,9, 43,6, 20,8, 20,7, 20,3.

### (2) 3',5,7-tribenzoyloxy-4'-methoxyflavanone

Thực hiện quy trình tổng hợp tương tự như dẫn chất 1, sử dụng 1,9 ml benzoyl clorid thay cho anhydrid acetic. Hiệu suất: 73,24%. Bột màu trắng. Nhiệt độ nóng chảy: 120 – 122 °C. UV ( $\lambda_{\max}$  nm, MeOH): 316. MS [M+Na]<sup>+</sup>: 637 (M = 614). IR ( $\nu$  cm<sup>-1</sup>, KBr) 3066,14 ( $\nu_{\text{C-H nhân thơm}}$ ), 2928,43 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 2840,73 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 1743,43 ( $\nu_{\text{C=O ester}}$ ), 1615,47 ( $\nu_{\text{C=C nhân thơm}}$ ), 1515,03 ( $\nu_{\text{C=C nhân thơm}}$ ), 1251,80 ( $\nu_{\text{C-O ester}}$ ), 1061,10 ( $\nu_{\text{C-O ester}}$ ). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8,14 – 7,60 (m, 15H, 3x -C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 7,5 (m, 2H, H<sub>2'&6'</sub>), 7,25 (d,  $J = 9$  Hz, 1H, H<sub>5'</sub>), 7,17 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, H<sub>8'</sub>), 7,05 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, H<sub>6'</sub>), 5,73 (d,  $J = 13$  Hz, 1H, H<sub>2'</sub>), 3,80 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3,36 (dd,  $J_1 = 16,5$  Hz,  $J_2 = 14$  Hz, 1H, H<sub>3'</sub>), 2,75 (dd,  $J_1 = 16,5$  Hz,  $J_2 = 3$  Hz, 1H, H<sub>3'</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  189,0, 164,1, 163, 163,6, 162,7, 155,7, 151,2, 150,8, 139,2, 134,3 - 133,8 (C<sub>phenyl</sub>), 130,7, 129,9 - 128,2 (C<sub>phenyl</sub>), 125,9, 121,6, 112,8, 111,7, 111,1, 109,7, 78,2, 56,0, 43,7.

### (3) 3',4',5,7-tetramethoxyflavanone

Cân 1 g hesperetin cho vào bình cầu hai cổ, thêm khoảng 100 ml acetone khan vào và khuấy đến khi tan hoàn toàn. Cho tiếp 6 g xúc tác K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> vào, khuấy đều. Cho 1,6 ml dimethyl sulfate vào từ từ bằng phễu nhỏ giọt. Tiếp tục đun hồi lưu hỗn hợp phản ứng, theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng bằng hệ dung môi thích hợp. Khi phản ứng kết thúc, lọc bỏ

phần rắn không tan thu được dung dịch, cô dung dịch dưới áp suất giảm thu được sản phẩm rắn thô. Sản phẩm thô được tinh chế bằng kết tinh nhiều lần trong methanol, thu được sản phẩm tinh. Hiệu suất: 37,14%. Bột kết tinh màu trắng. Nhiệt độ nóng chảy: 162 – 164 °C. UV ( $\lambda_{\max}$  nm, MeOH): 228; 283. MS [M+Na]<sup>+</sup>: 367 (M = 344). IR ( $\nu$  cm<sup>-1</sup>, KBr) 2935,08 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 2904,03 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 2837,37 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 1616,27 ( $\nu_{\text{C=C nhân thơm}}$ ), 1513,91 ( $\nu_{\text{C=C nhân thơm}}$ ), 1106,93 ( $\nu_{\text{C-O ether}}$ ). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7,12 (d,  $J = 2$  Hz, 1H, H<sub>2'</sub>), 7,02 (dd,  $J_1 = 8$  Hz,  $J_2 = 2$  Hz, 1H, H<sub>6'</sub>), 6,96 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, H<sub>5'</sub>), 6,22 (s, 1H, H<sub>8'</sub>), 6,20 (s, 1H, H<sub>6'</sub>), 5,43 (dd,  $J_1 = 13$  Hz,  $J_2 = 2,5$  Hz, 1H, H<sub>2'</sub>), 3,80 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3,78 (s, 6H, 2x-OCH<sub>3</sub>), 3,76 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 3,10 (dd,  $J_1 = 16,5$  Hz,  $J_2 = 13$  Hz, 1H, H<sub>3'</sub>), 2,59 (dd,  $J_1 = 16,5$  Hz,  $J_2 = 2,5$  Hz, 1H, H<sub>3'</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  187,8, 165,3, 164,3, 161,7, 148,9, 148,7, 131,2, 119,0, 111,5, 110,4, 105,3, 93,6, 92,8, 78,3, 55,7, 55,6, 55,5 (2C), 44,7.

### (4) (E)-2',3,4',6'-tetraethoxy-4-methoxychalcone

Thực hiện quy trình tổng hợp tương tự như dẫn chất 3, sử dụng 2,1 ml diethyl sulfate thay cho dimethyl sulfate, 8 g K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Hiệu suất: 30,21%. Bột kết tinh màu vàng. Nhiệt độ nóng chảy: 70 – 72 °C. UV ( $\lambda_{\max}$  nm, MeOH): 342. MS [M+H]<sup>+</sup>: 415 (M = 414). IR ( $\nu$  cm<sup>-1</sup>, KBr) 2980,40 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 2933,01 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 2893,97 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 1597,05 ( $\nu_{\text{C=C nhân thơm}}$ ), 1512,48 ( $\nu_{\text{C=C nhân thơm}}$ ), 1121,81 ( $\nu_{\text{C-O ether}}$ ). <sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  7,27 (s, 1H, H<sub>2'</sub>), 7,14 (d,  $J = 16$  Hz, 1H, H<sub>6'</sub>), 7,13 (d,  $J = 16$  Hz, 1H, H<sub>6'</sub>), 6,95 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, H<sub>5'</sub>), 6,91 (d,  $J = 8$  Hz, 1H, H<sub>6'</sub>), 6,26 (s, 2H, H<sub>3' & 5'</sub>), 4,06 (m, 4H, 2 x -CH<sub>2</sub>-), 3,99 (q,  $J = 7$  Hz, 4H, 2 x -CH<sub>2</sub>-), 3,79 (s, 3H, -OCH<sub>3</sub>), 1,33 (m, 6H, 2x-CH<sub>3</sub>), 1,16 (q,  $J = 7$  Hz, 6H, 2x-CH<sub>3</sub>). <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  193,0, 160,8, 157,2, 151,0, 148,1, 143,6, 127,2, 127,0, 122,6, 112,0, 111,6, 111,4, 92,3, 63,7, 63,7, 63,2 (2C), 55,4, 14,5, 14,5, 14,4 (2C).

### 3.2. Hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase

Hoạt tính ức chế enzym AchE được xác định bằng phương pháp đo quang. Sáu dẫn chất bao gồm nguyên liệu, các dẫn chất tổng hợp cùng với chất đối chứng galantamine được thử nghiệm hoạt tính ức chế enzym AchE. Giá trị IC<sub>50</sub> tương ứng được trình bày ở Bảng 1.

**Bảng 1.** Hoạt tính ức chế enzym AchE của các dẫn chất

Stt	Dẫn chất	IC <sub>50</sub> (μM)
1	Hesperidin	153,16
2	Hesperetin	130,73
3	<b>1</b>	43,50
4	<b>2</b>	423,12
5	<b>3</b>	166,76
6	<b>4</b>	98,26
7	Galantamine	1,15

#### 4. BÀN LUẬN

##### 4.1. Về tổng hợp hóa học

Phản ứng thủy phân hesperidin để tạo nguyên liệu hesperetin cho quá trình bán tổng hợp xảy ra trong môi trường methanol với xúc tác là acid H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc. Quá trình cắt đứt liên kết glycosid xảy ra khá chậm. Sau khi thủy phân xong, dung dịch sản phẩm thu được cần đưa về pH 6-7 với mục đích trung hòa acid H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> vì giai đoạn tinh chế sau đó sử dụng ethyl acetate, môi trường acid sẽ ảnh hưởng đến quá trình tinh chế. Sản phẩm thô thu được vẫn còn chứa nhiều tạp chất nên phải tinh chế nhiều lần bằng cách kết tinh lại, do đó hiệu suất thu được hesperetin không cao.

Trong phản ứng tạo dẫn chất ester, hesperetin tác dụng với tác nhân anhydrid acetic hay benzyol clorid trong môi trường pyridine. Đây là các tác nhân acyl hóa mạnh, phản ứng ester hóa xảy ra dễ dàng trên tất cả các nhóm -OH phenol. Pyridine là dung môi có khả năng hòa tan tốt nguyên liệu và sản phẩm tạo thành. Đồng thời, trong phản ứng này, pyridine cũng đóng vai trò là chất xúc tác.

Đối với phản ứng ether hóa, nguyên liệu được phản ứng với tác nhân ether hóa là dimethyl sulfate và diethyl sulfate với xúc tác là K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Tùy vào điều kiện phản ứng thu được các dẫn chất khác nhau. Đối với tác nhân dimethyl sulfate, đây là một tác nhân ether hóa mạnh, trong điều kiện xúc tác K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, sản phẩm tạo ra nhanh, thế vào tất cả các vị trí -OH của hesperetin và dễ dàng tinh chế. Tuy nhiên, đối với diethyl sulfate là tác nhân ether hóa yếu hơn, phải tăng tỉ lệ xúc tác K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> đồng thời kéo dài thời gian phản ứng. Kết quả là ngoài việc ether hóa các nhóm -OH phenol, phản ứng cũng cắt đứt liên kết C-O mở vòng của hesperetin, thu được dẫn chất 4 là một dẫn chất chalcone. Giá trị hằng số ghép của 2 proton của liên kết đôi (-C<sub>α</sub>H=C<sub>β</sub>H-) là 16 Hz, do đó hợp chất

chalcone tổng hợp được này có cấu hình E.

##### 4.2. Về hoạt tính sinh học

Tất cả sáu dẫn chất bao gồm cả nguyên liệu và các dẫn chất bán tổng hợp được tiến hành thử nghiệm hoạt tính ức chế enzym AchE. Kết quả thử nghiệm cho thấy, hoạt tính ức chế enzym AchE của hesperetin được cải thiện khi tạo thành các dẫn chất bán tổng hợp. Trong đó, hai dẫn chất (1, 4) thể hiện hoạt tính tốt hơn với giá trị IC<sub>50</sub> thấp hơn hesperetin (IC<sub>50</sub> = 130,73 μM). Hợp chất 1 là hợp chất có hoạt tính tốt nhất với giá trị IC<sub>50</sub> là 43,50 μM.

Trong mối liên quan cấu trúc tác dụng, hesperetin có hoạt tính tốt hơn dạng glycosid của hợp chất này là hesperidin. Hợp chất 1 và 2 đều là các dẫn xuất ester của hesperetin, trong đó hợp chất 1 có hoạt tính tốt hơn nhiều so với hợp chất 2. Từ đó có thể thấy rằng, đối với các hợp chất có cấu trúc ít cồng kềnh hơn thì hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase mạnh hơn.

#### 5. KẾT LUẬN

Từ hesperidin, nghiên cứu đã tiến hành thủy phân thành hesperetin và bán tổng hợp được bốn dẫn chất thông qua các phản ứng ester hóa, ether hóa. Các dẫn chất bán tổng hợp được xác định các thông số lý hóa và cấu trúc bằng các loại phổ MS, IR, <sup>1</sup>H-NMR và <sup>13</sup>C-NMR. Toàn bộ các dẫn chất được thử hoạt tính ức chế enzym AchE *in vitro* bằng phương pháp đo quang. Kết quả cho thấy, một số dẫn chất thu được có sự cải thiện về hoạt tính so với nguyên liệu hesperetin ban đầu. Trong đó, dẫn chất 1 là dẫn chất acetyl hóa, có hoạt tính tốt nhất với giá trị IC<sub>50</sub> là 43,50 μM.

*Lời cảm ơn:* Chúng tôi trân trọng cảm ơn sự tài trợ của Trường Đại học Y Dược Huế cho đề tài mã số 97/17 để thực hiện nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Alzheimer's Association (2016), "Alzheimer's disease facts and figures", *Alzheimers Dement*, 12(4), pp. 459-509.
2. Bane T.J., Cole C. (2015), "Prevention of Alzheimer disease: The roles of nutrition and primary care", *The Nurse Practitioner*, 40(5), pp. 30-35.
3. Bo Li, Ai-Ling Huang, Yi-Long Zhang, Zeng Li, Hai-Wen Ding, Cheng Huang, Xiao-Ming Meng and Jun Li (2017), "Design, Synthesis and Evaluation of Hesperetin Derivatives as Potential Multifunctional Anti-Alzheimer Agents", *Molecules*, 22(7), pp. 1067-1082.
4. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V. Jr., Feather-Stone R.M. (1961), "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochemical Pharmacology*, 7, pp. 88-95.
5. Francis A. Carey. (2016), *Organic Chemistry*, McGraw-Hill, New York, America.
6. Ladner CJ, Lee JM (1998), "Pharmacological drug treatment of Alzheimer disease: The cholinergic hypothesis revisited", *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 57, pp. 719-731.
7. Mendel Friedman (2014), "Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Properties of Wines and Winery Byproducts in Relation to Their Flavonoid Content", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(26), pp. 6025-6067.
8. M. C. Morris (2012), "The role of nutrition in Alzheimer's disease: epidemiological evidence", *European Journal of Neurology*, 16(Suppl 1), pp. 1-7.
9. Rees T, Hammond PI, Soreq H, Younkin S, Brimijoin S (2003), "Acetylcholinesterase promotes beta-amyloid plaques in cerebral cortex", *Neurobiol Aging*, 24, pp. 777-787.
10. Selkoe DJ (2001), "Alzheimer's disease: genes, proteins and therapy", *Physical Review*, 2001;81:741-766.
11. Shashank Kumar and Abhay K. Pandey (2013), "Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview", *The Scientific World Journal*, 2013, pp. 1-15.
12. Uriarte-Pueyo I., Calvo MI (2011), "Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors", *Current Medicinal Chemistry*, 18(34):5289-5302.