



Tạp chí Khoa học và Kinh tế Phát triển
Trường Đại học Nam Cần Thơ

Website: jsde.nctu.edu.vn



Phân lập Alkaloid trong tâm Sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) bằng phương pháp sắc ký lỏng bán điều chế

Huỳnh Phương Thảo¹, Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ^{2*}

¹Trường Đại học Nam Cần Thơ

²Trường Đại học Y Dược Cần Thơ

*Người chịu trách nhiệm bài viết: Đỗ Châu Minh Vĩnh Thọ (email: dcmvtho@ctump.edu.vn)

Ngày nhận bài: 10/12/2023

Ngày phân biên: 10/1/2024

Ngày duyệt đăng: 25/1/2024

Title: Isolation of alkaloids in lotus heart (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) by semi-preparative liquid chromatography

Keywords: alkaloid, plumula nelumbinis, semi-preparative liquid chromatography

Từ khóa: alkaloid, sắc ký lỏng bán điều chế, tâm sen

ABSTRACT

This study aimed to isolate biologically active alkaloids in *Plumula Nelumbinis*, using semi-preparative liquid chromatography. Before being sent to the semi-preparative liquid chromatography system, the concentrated extract was cleaner by the distribution shaking method and using vacuum liquid chromatography (VLC) to separate into simple segments. The result was the isolation of two alkaloids, EN-9 and EN-10, with purity determined on the HPLC-PDA system to be over 95%. Spectroscopic methods as UV, IR, MS, and NMR were used to determine the structure of isolated alkaloids. The results determined that EN-9 is armepavine and EN-10 is nor-armepavine. Thus, from 2 kg of *Plumula Nelumbinis* powder, the study successfully isolated two biologically active alkaloids, armepavine (17.6 mg) and nor-armepavine (13.8 mg), with a purity of over 95%, meeting the requirements for standard substances originating from medicinal herbs.

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu là phân lập các alkaloid có tác dụng sinh học trong tâm Sen bằng phương pháp sắc ký lỏng bán điều chế. Dịch chiết đậm đặc tâm Sen trước khi được đưa lên hệ thống sắc ký lỏng bán điều chế sẽ được loại tạp bằng phương pháp lắc phân bố và tách thành các phân đoạn đơn giản hơn bằng kỹ thuật sắc ký cột áp suất giảm (VLC). Kết quả phân lập được hai alkaloid là EN-9, EN-10 với độ tinh khiết được xác định trên hệ thống HPLC-PDA là trên 95%. Các phương pháp phổ học gồm

UV, IR, MS, NMR được sử dụng để xác định cấu trúc các alkaloid phân lập được. Kết quả xác định được EN-9 là armepavin và EN-10 là nor-armepavin. Như vậy từ 2 kg bột tâm Sen, nghiên cứu đã phân lập thành công hai alkaloid có tác dụng sinh học là armepavin (17,6 mg) và nor-armepavin (13,8 mg) với độ tinh khiết trên 95%, đáp ứng yêu cầu cho chất đối chiếu có nguồn gốc từ dược liệu.

1. GIỚI THIỆU

Sen (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) là một loài thực vật có nhiều công dụng quý giá, vừa làm thực phẩm, vừa có tác dụng làm thuốc. Các bộ phận khác nhau của sen đã được dùng trong các bài thuốc cổ truyền để chữa sốt, viêm, mất ngủ, rối loạn thần kinh, động kinh, tăng huyết áp, bệnh tim mạch, béo phì và tăng lipid máu [1]. Trong các bộ phận của sen, tâm Sen đã có lịch sử y học hơn 400 năm, được sử dụng rộng rãi để bảo vệ tim mạch, an thần, và cầm máu trong y học cổ truyền [2],[3]. Nhiều nghiên cứu chỉ ra trong tâm Sen có nhiều thành phần có hoạt tính sinh học, trong đó thành phần alkaloid rất được chú ý do có hàm lượng ưu thế và có nhiều tác dụng sinh học giá trị như tác dụng chống oxy hóa, chống viêm, điều hòa miễn dịch, kháng vi-rút, bảo vệ gan, bảo vệ tim mạch và hạ đường huyết [4],[5]. Nghiên cứu gần đây chỉ ra alkaloid từ tâm Sen có khả năng chống lại căn bệnh ung thư một cách hiệu quả [6],[7]. Các alkaloid trong tâm Sen có các khung chính như bisbenzylisoquinolin, benzylisoquinolin, aporphin và tetrahydroisoquinolin [8]. Trên thế giới có nhiều nghiên cứu phân lập alkaloid trong tâm Sen với nhiều kỹ thuật từ cổ điển đến hiện đại như sắc ký cột, sắc ký ngược dòng tốc độ cao, ...[9],[10] hoặc dùng đến sự hỗ trợ của vi sóng [11]. Tuy nhiên phương pháp sắc ký lỏng bán điều chế vẫn chưa được dùng rộng rãi dù đây là một phương pháp phân lập tốt và có thể

tự động hóa. Đối với việc phân lập một lượng chất tinh khiết (vài chục miligam đến vài gam) thì sắc ký lỏng bán điều chế là một kỹ thuật tiện lợi và hiệu quả. Kỹ thuật này dựa trên cơ sở sắc ký phân tích được mở rộng bởi sự gia tăng kích thước cột, mở rộng kích thước hạt nhồi cột và hệ thống. Một sự khác biệt cơ bản giữa sắc ký lỏng phân tích (HPLC) và bán điều chế (semi-preparative HPLC) là ở mục tiêu. Trong khi HPLC phân tích chủ yếu quan tâm đến định tính và định lượng một hợp chất thì ngược lại, sắc ký lỏng bán điều chế lại chú trọng vào việc phân lập hợp chất tinh khiết. Kích thước hạt pha tĩnh trong cột sắc ký lỏng bán điều chế thường lớn hơn cột phân tích, tốc độ rửa giải các chất thường diễn ra nhanh hơn. Vì lý do đó, áp suất cần thiết để bơm hoạt động sẽ thấp hơn trong hệ thống phân tích thông thường nên có thể mở rộng tốc độ dòng lên đến 10 ml/phút và áp suất bơm có thể lên đến vài trăm bar, lúc này lượng mẫu rửa giải có thể lên đến vài trăm μg . Cột trong HPLC bán điều chế có đường kính trong và kích thước hạt pha tĩnh lớn hơn, điều này làm gia tăng công suất cột. Tùy lượng mẫu cần tách mà sử dụng kích thước cột khác nhau. Cột thường được sử dụng trong kỹ thuật sắc ký lỏng bán điều chế là cột (25 cm x 10 mm, 10 μm), với tốc độ dòng khoảng 2-5 ml/phút có thể rửa giải lượng mẫu lên đến 500 μg . Độ tan của mẫu trong pha động cũng ảnh hưởng đến số lượng mẫu được tiêm. Nếu thể tích tiêm quá lớn sẽ

làm giảm hiệu quả phân tách và độ lặp lại kém. Mặt khác, nếu mẫu quá đậm đặc có thể tạo tủa trên bề mặt cột. Vì vậy nồng độ mẫu phân tích cần được lựa chọn phù hợp trước khi bắt đầu quá trình phân tách sắc ký. Mục tiêu của nghiên cứu này là dùng hệ thống sắc ký lỏng bán điều chế để phân lập các alkaloid có tác dụng sinh học trong tâm Sen với độ tinh khiết cao đạt tiêu chuẩn của chất đối chiếu từ được liệu.

2. PHƯƠNG TIỆN VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Đối tượng

Tâm Sen được thu hái tại thị trấn Mỹ Thọ, huyện Cao Lãnh, tỉnh Đồng Tháp. Đối tượng nghiên cứu được định danh bằng cách so sánh và mô tả hình thái thực vật với các thông tin trên các tài liệu tham khảo thực vật học chuyên ngành. Tâm Sen được phơi khô trong mát, loại tạp cơ học lẫn vào, được xay ra thành bột, với cỡ hạt lọt qua lỗ rây 2 mm và bảo quản trong điều kiện phù hợp.

2.2 Hóa chất, trang thiết bị

Dung môi, hóa chất để phân lập đạt tiêu chuẩn được dùng: cloroform, petro ether, aceton, ethyl acetat, methanol của hãng Chemsol; acid tartric, acid sulfuric của hãng Xilong.

Dung môi cho HPLC đạt tiêu chuẩn phân tích HPLC: acetonitril, methanol, acid formic, acid acetic băng, triethylamin của hãng Merck.

Thiết bị: Hệ thống HPLC Dionex Ultimate 3000, hệ thống HPLC Hitachi Elite L 2000, bể siêu âm Sonorex RK – 1028H, máy cô quay chân không Ika RV 05, cân phân tích 5 số ABT 220-5DM.

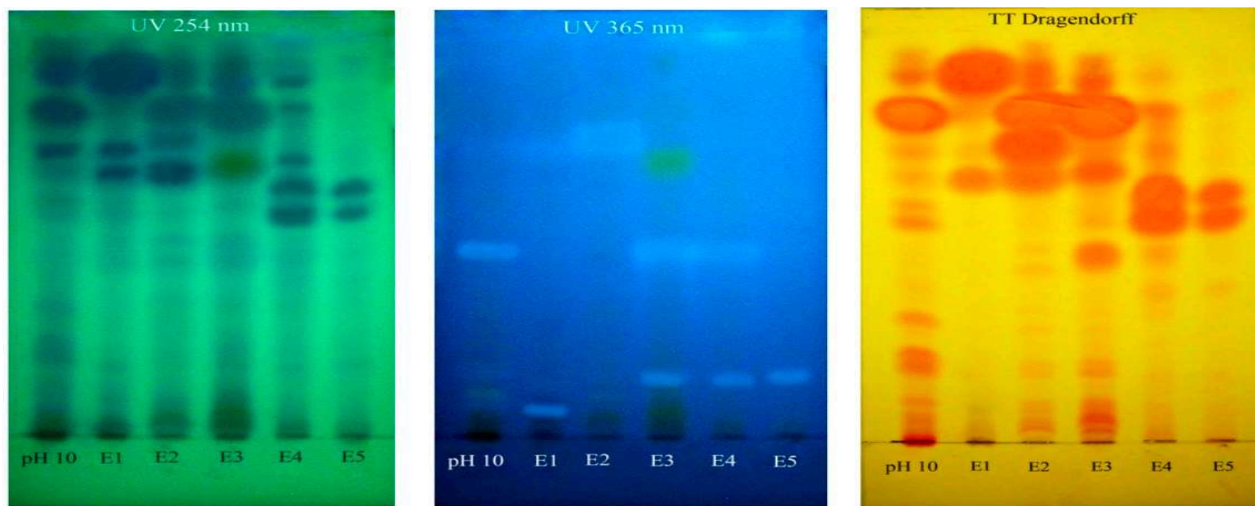
2.3 Phương pháp

Bột tâm Sen khô (2 kg) được làm ẩm, chiết ngâm kiệt với cồn 70% có chứa acid tartric 0,5% và được cô áp suất giảm thành dịch chiết đậm đặc (1,5 lít). Dịch này được pha loãng với H₂SO₄ 2% để yên 24 giờ, lọc bỏ tủa. Dịch nước acid được lắ phân bố với eter dầu để loại tạp. Dịch chiết được kiềm hóa với NH₄OH đến pH 10, sau đó chiết với cloroform để thu phân đoạn pH 10. Phân đoạn này tiếp tục được hòa tan trong H₂SO₄ 2%, để lắng tủa ở nhiệt độ 5°C trong 48 h. Phần dịch nước acid được lắ phân bố với cloroform đến khi lớp cloroform không màu. Kiềm hóa lớp nước acid lên pH 10 bằng NH₄OH 25%, chiết với cloroform thu lại phân đoạn pH 10 đã được loại tạp (1,5 g). Triển khai phân đoạn pH 10 trên cột sắc ký pha thuận (silicagel 60) có hỗ trợ áp suất (VLC), rửa giải với hỗn hợp dung môi cloroform – methanol 90:10 với tỷ lệ methanol tăng dần, thu được 5 phân đoạn ký hiệu E1 đến E5. Phân đoạn E5 được đưa lên hệ thống sắc ký lỏng bán điều chế để thu được hai alkaloid tinh khiết. Độ tinh khiết của các alkaloid được xác định bằng phương pháp HPLC-PDA. Cấu trúc các alkaloid phân lập được xác định bởi phổ UV, IR, MS, NMR.

3. KẾT QUẢ

3.1 Tách các phân đoạn trên cột VLC

Phân đoạn pH 10 sau khi qua cột VLC thu được 5 phân đoạn ký hiệu từ E1 đến E5. Kết quả sắc ký lớp mỏng 5 phân đoạn VLC được trình bày trong hình 1. Phân đoạn E5 có 2 alkaloid chính với hàm lượng ưu thế, các tạp ở đèn UV 254 nm mờ và ít tạp ở đèn UV 365 nm nên sẽ được chọn cho bước xử lý tiếp theo.



Hình 1. Sắc ký lớp mỏng các phân đoạn VLC với hệ dung môi CHCl₃-MeOH-NH₄OH (90:10:5)

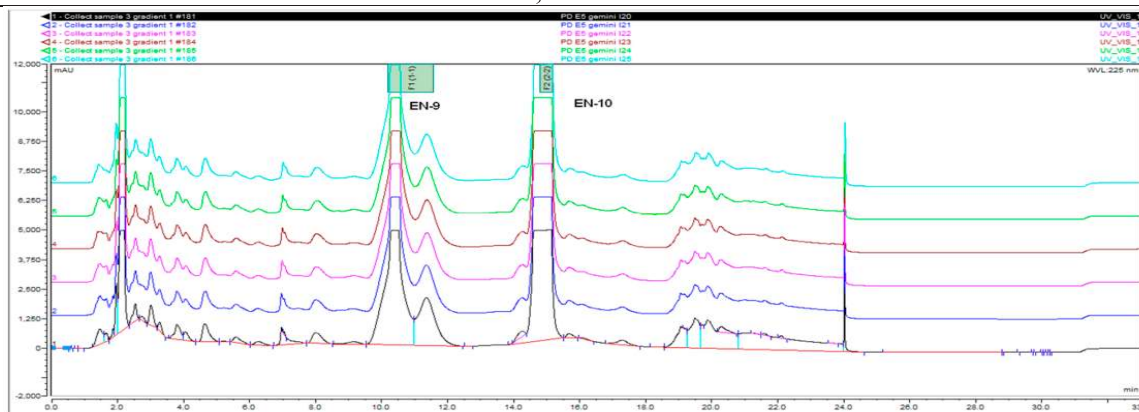
3.2 Phân lập alkaloid trên hệ thống sắc ký lỏng bán điều chế

Phân đoạn E5 được đưa vào hệ thống sắc ký lỏng bán điều chế để thu 2 alkaloid tinh khiết là EN-9 (17,6 mg) và EN-10 (13,8 mg). Điều kiện

sắc ký tối ưu cho quá trình phân lập 2 alkaloid trong phân đoạn E5 được thể hiện trong Bảng 1. Sắc ký đồ 6 lần tiêm mẫu thu hứng 2 alkaloid (EN-9 và EN-10) được thể hiện trong Hình 2.

Bảng 1. Điều kiện sắc ký lỏng bán điều chế thu alkaloid tinh khiết từ phân đoạn E5

Các yếu tố		Các thông số	
Pha tĩnh		Cột Gemini C18 (5 μm, 4,6 x 150 mm)	
Thể tích tiêm mẫu, nồng độ mẫu		30 μ - 2000 ppm	
Nhiệt độ cột		30°C	
Bước sóng phát hiện (nm)		225, 272, 284, 320	
Tốc độ dòng pha động		1 ml/phút	
Chương trình pha động	Thời gian (phút)	%Acetonitril	%Triethylamin 0,1%
	0 – 11	40	60
	11,1 – 16	55	45
	16,1 – 21	100	0
	21,1 – 33	40	60



Hình 2. Sắc ký đồ 6 lần tiêm mẫu thu hứng EN-9 và EN-10

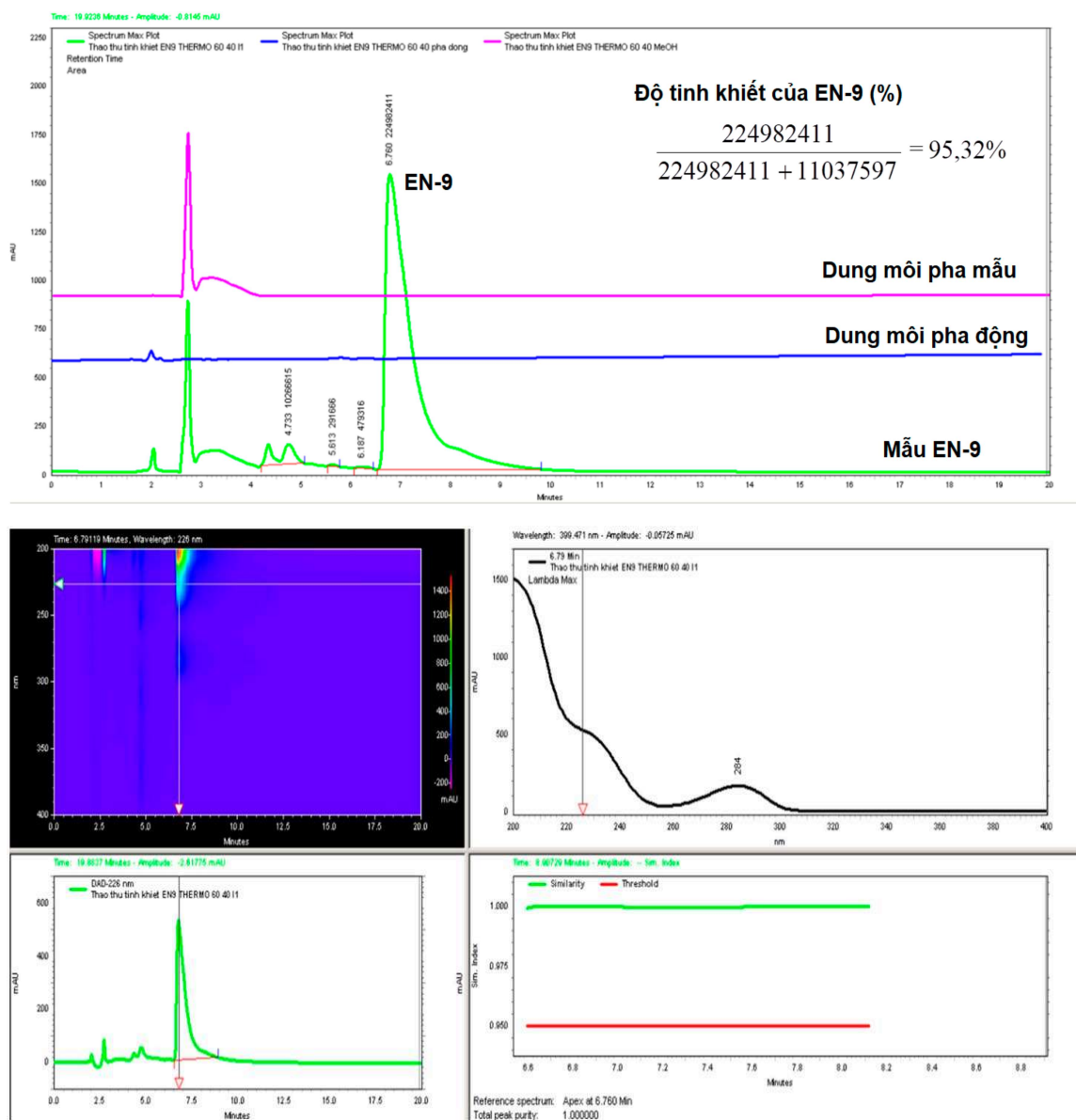
3.3 Xác định độ tinh khiết các alkaloid đã phân lập trên hệ thống HPLC-PDA

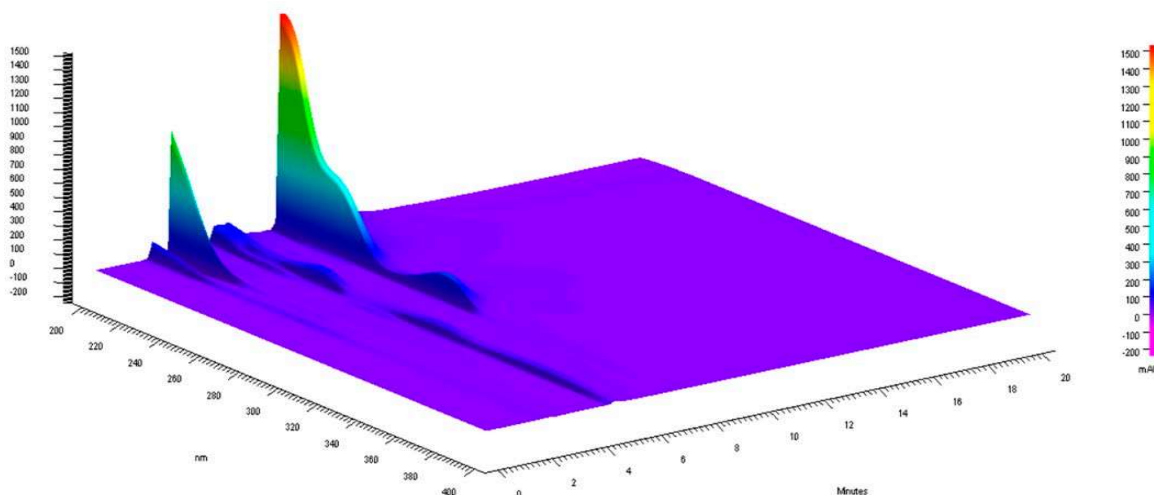
Độ tinh khiết của 2 alkaloid được xác định trên HPLC-PDA lần lượt là 95,32% (EN-9) và 96,50%

(EN10). Điều kiện sắc ký xác định độ tinh khiết của EN-9 và EN-10 được thể hiện trong bảng 2. Sắc ký đồ, sự tinh khiết của peak sắc ký và phổ 3D của EN-9 được thể hiện trong Hình 3.

Bảng 2. Điều kiện sắc ký kiểm tra độ tinh khiết các alkaloid

Các yếu tố	Các thông số
Pha tĩnh	Cột Acclaim Polar Advatange C16 (5 μm, 4,6 x 250 mm)
Pha động	Acetonitril – Triethylamin 0,1% pH 9 (60:40)
Thể tích tiêm mẫu, nồng độ mẫu	20 μl - 1000 ppm
Nhiệt độ cột	25°C
Bước sóng phát hiện (nm)	225, 272, 284, 320
Tốc độ dòng pha động	1 ml/phút





Hình 3. Kết quả kiểm tra độ tinh khiết của peak và đánh giá % tinh khiết của EN-9

3.4 Xác định cấu trúc của các alkaloid đã phân lập bằng các phương pháp phổ học

3.4.1 Xác định cấu trúc EN-9

Bột màu nâu nhạt, tan tốt trong CHCl_3 và MeOH. Phát quang màu xanh dương sáng dưới UV 365 nm, tắt quang mờ dưới UV 254 nm. Phổ UV-Vis trong MeOH: λ_{max} (nm) ở 283, 225, 209 nm.

Phổ ESI-MS (ES^+): $m/z = 314,26 [\text{M} + \text{H}]^+$ và $m/z = 283,30 [\text{M} - \text{OCH}_3]^+$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{N}$), với độ bất bão hòa là 9. Dữ liệu phổ ^{13}C và ^1H NMR của EN-9 được trình bày trong Bảng 3, biện giải các phổ NMR 1D và 2D của EN-9 có thể kết luận EN-9 là arnepavin.

Bảng 3. Dữ liệu phổ ^{13}C và ^1H của EN-9 trong dung môi CDCl_3

TT	Vị trí C	DEPT	δ_c ppm	δ_H ppm
1	C-1	CH	64,96	3,71 (1H, <i>dd</i> , 5,5 Hz; 2,5 Hz)
2	C-3	CH_2	46,46	2,81 (1H, <i>m</i>); 3,23 (1H, <i>m</i>)
3	C-4	CH_2	25,00	2,62 (1H, <i>m</i>); 2,88 (1H, <i>m</i>)
4	C-4a	C	129,01	
5	C-5	CH	111,28	6,56 (1H, <i>s</i>)
6	C-6	C	146,37	
7	C-7	C	147,37	
8	C-8	CH	111,21	6,03 (1H, <i>s</i>)
9	C-8a	C	125,61	
10	C-8	CH	111,21	6,03 (1H, <i>s</i>)
11	C-9	CH_2	40,40	2,75(1H, <i>dd</i> , 8 Hz; 6 Hz); 3,12 (1H, <i>dd</i> , 5,5 Hz; 8 Hz)
12	C-1'	C	131,39	
13	C-2'; C-6'	CH	130,79	6,92 (2H, <i>d</i> , 8,5 Hz)
14	C-3'; C-5'	CH	115,22	6,66 (2H, <i>d</i> , 8,5 Hz)
15	C-6-OCH ₃	CH_3	55,78	3,83 (1H, <i>s</i>)
16	C-7-OCH ₃	CH_3	55,55	3,57 (1H, <i>s</i>)
17	N-CH ₃	CH_3	42,34	2,52 (1H, <i>m</i>)

3.4.2 Xác định cấu trúc EN10

Tinh thể hình kim, màu trắng, tan tốt trong CHCl₃, kết tinh trong hỗn hợp DCM-EtOAc. Lúc đầu không phát quang dưới UV 365 nm, nhưng sau khi tiếp xúc với không khí trong vài phút sẽ phân hủy thành chất phát quang màu xanh dương sáng dưới UV 365 nm. Phản ứng hiện màu với thuốc thử Dragendorff xuất hiện chậm.

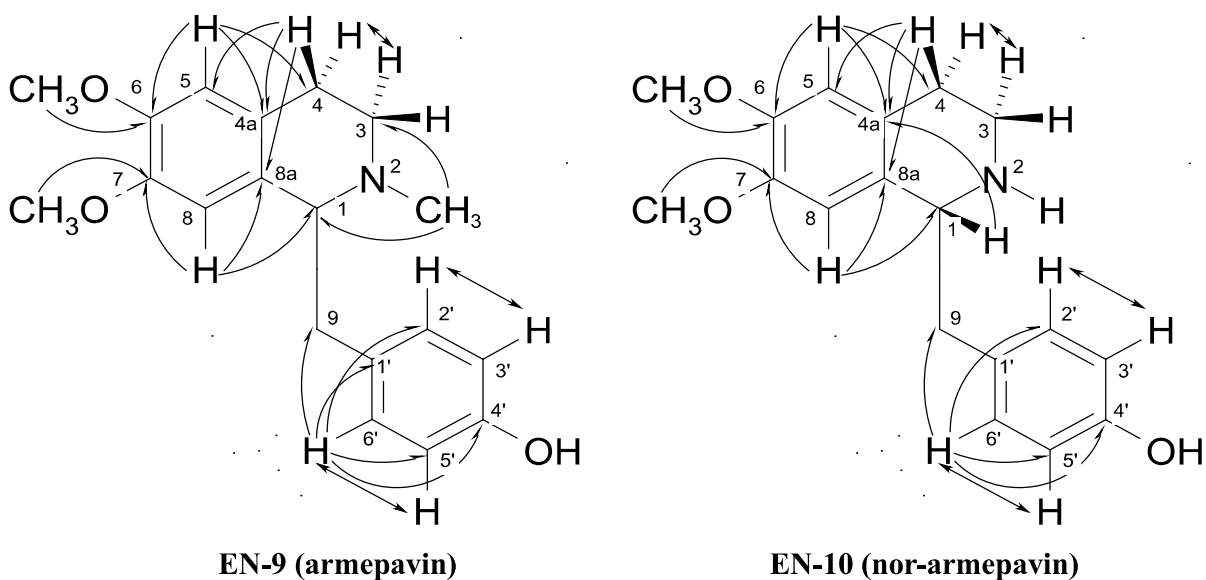
Phổ UV-Vis trong MeOH: λ_{max} (nm) ở 285, 227, 210 nm

Phổ ESI-MS (ES⁺): m/z = 300,26 [M +H]⁺ và m/z = 332,22 [M+Na]⁺ (C₁₈H₂₁O₃N), với độ bất bão hòa là 9.

Dữ liệu phổ ¹³C và ¹H NMR của EN-10 được trình bày trong Bảng 4, biện giải các phổ 1D và 2D NMR của EN-10 có thể kết luận EN-10 là nor-armepavin.

Bảng 4. Dữ liệu phổ ¹³C và ¹H của EN-10 trong dung môi CDCl₃

TT	Vị trí C	DEPT	δ _c ppm	δ _H ppm
1	C-1	CH	56,66	4,15 (1H, <i>dd</i> , 4,5 Hz; 9,5 Hz)
2	C-3	CH ₂	40,22	2,95 (1H, <i>m</i>); 3,24 (1H, <i>m</i>)
3	C-4	CH ₂	29,05	2,76 (2H, <i>t</i> , 5,75 Hz)
4	C-4a	C	129,83	
5	C-4a	C	129,83	
6	C-5	CH	111,86	6,59 (1H, <i>s</i>)
7	C-6	C	147,24	
8	C-7	C	147,66	
9	C-8	CH	109,64	6,67 (1H, <i>s</i>)
10	C-8a	C	126,97	
11	C-9	CH ₂	41,54	2,86 (1H, <i>m</i>) 3,14 (1H, <i>dd</i> , 4,5 Hz; 9,5 Hz)
12	C-1'	C	129,42	
13	C-2', C-6'	CH	130,36	7,02 (2H, <i>d</i> , 8Hz)
14	C-3', C-5'	CH	115,88	6,64 (2H, <i>d</i> , 8Hz)
15	C-6-OCH ₃	CH ₃	56,04	3,86 (3H, <i>s</i>)
16	C-7-OCH ₃	CH ₃	55,87	3,84 (3H, <i>s</i>)



Hình 4. Cấu trúc hóa học của EN-9, EN-10 và các tương tác 2D-NMR

4. THẢO LUẬN

Do trong thành phần hóa học của tâm Sen rất đa dạng, trong đó lipid, sáp, chất nhầy, nhựa chiếm tỉ trọng khá lớn nên việc lắc phân bố lỏng- lỏng gặp nhiều khó khăn vì tạo quá nhiều nhũ khi thu alkaloid toàn phần dạng base cũng như có quá nhiều tạp màu lẫn trong cao toàn phần này. Đó cũng là lý do tại sao hầu hết các nghiên cứu trước đây về chiết xuất phân lập tâm Sen người ta hay cho cao cồn toàn phần đi qua các màng nhựa chọn lọc resin nhằm loại tạp màu cũng như phần lipid kém phân cực trước khi lắc chiết để hạn chế nhũ cũng như thu alkaloid toàn phần sạch hơn trước khi tiến hành các phương pháp khác để phân lập alkaloid. Tuy nhiên, tại Việt Nam việc tìm mua các màng nhựa chọn lọc resin gặp khó khăn do không đúng chủng loại hoặc quá đắt tiền nên nhóm nghiên cứu lựa chọn phương pháp lắc phân bố loại tạp kém phân cực với PE, CHCl₃ ở môi trường pH 1-2. Sau đó, phương pháp sắc ký cột chân không pha thuận đã được sử dụng nhằm tách phân đoạn toàn phần alkaloid ban đầu

thành những phân đoạn alkaloid có độ phân cực khác nhau đáp ứng nhu cầu phân lập cũng như loại bớt tạp màu và tạp kém phân cực.

Trong tâm Sen các alkaloid có pKa thay đổi trong khoảng 7-8 nên hệ pha động có pH từ 8,0-9,0 sẽ giúp hầu hết các alkaloid trong tâm Sen chuyển về dạng base và phân bố tốt hơn vào trong pha động. Mẫu từ dược liệu nói chung thường chứa rất nhiều thành có độ phân cực khác nhau, có thể trải dài từ kém phân cực đến rất phân cực. Do đó, kỹ thuật rửa giải gradient luôn được lựa chọn vì sự thay đổi tỉ lệ dung môi, tốc độ dòng theo thời gian sẽ giúp các chất dễ tách nhau hơn và cũng góp phần rút ngắn thời gian phân tích. Kiểm tra độ tinh khiết peak của alkaloid EN-9, EN-10 đã phân lập bằng cách so sánh sự tương đồng phổ UV của những điểm bất kỳ trên peak so với phổ trung bình lấy từ 3 điểm (01 điểm tại đỉnh peak, 01 điểm bên trái đi lên và 01 điểm bên phải đi xuống của đường cong peak) với ngưỡng tương đồng 990 và ngưỡng nhiễu là 5% cho thấy các peak alkaloid này đều đạt độ tinh khiết peak nghĩa là peak này chỉ là

một peak tinh khiết của một chất ở điều kiện sắc ký tối ưu. Để tính % độ tinh khiết của chất phân tích, phương pháp quy về 100% diện tích đỉnh được sử dụng. Phương pháp được thiết lập trên hệ thống máy ở chế độ nhìn trên toàn thang sóng và lấy đỉnh lớn nhất (chế độ Max plot). Tất cả alkaloid phân lập được đều cho độ tinh khiết trên 95%, đáp ứng yêu cầu về độ tinh khiết của chất chuẩn từ dược liệu.

Trong trường hợp chỉ cần phân lập một lượng nhỏ chất tinh khiết (vài µg đến vài mg), thay vì dùng cột HPLC điều chế kích thước lớn với giá thành cao, có thể dùng cột HPLC phân tích sẵn có với kích thước cột nhỏ hơn và có thể thu được chất cần thiết bằng cách tiêm lặp lại mẫu thử nhiều lần. Điều này được thực hiện trên cơ sở độ lặp lại cao của hệ thống HPLC. Ngoài ra, kỹ thuật lặp lại còn được áp dụng trong HPLC điều chế khi muốn thu một lượng lớn chất điều chế. Để gia tăng năng lực điều chế, tiết kiệm thời gian và chi phí, nhóm nghiên cứu đã áp dụng kỹ thuật cột quá tải, nghĩa là cho qua cột lượng mẫu cao hơn năng lực cột. Trong trường hợp này, kỹ thuật cắt tâm được áp dụng để tránh nhiễm các thành phần tạp có hàm lượng thấp ở vùng phía

trước và phía sau peak sắc ký. Ngoài ra, kỹ thuật quá tải cột cũng hữu hiệu trong việc tách điều chế các chất có hàm lượng nhỏ trong hỗn hợp. Kết quả là nhóm nghiên cứu đã phân lập thành công armepavin và nor-armepavin, là hai alkaloid đã được chứng minh có tác dụng sinh học trong tâm Sen [12],[13],[14],[15].

5. KẾT LUẬN

Phương pháp sắc ký lỏng bán điều chế là một phương pháp phân tích hiện đại, cho phép phân lập nhanh chóng một lượng nhỏ các chất tinh khiết từ dược liệu. Sen là một dược liệu quý với nhiều bộ phận được sử dụng làm thuốc từ lâu. Thành phần alkaloid trong tâm Sen đã được chứng minh có nhiều tác dụng sinh học quan trọng như an thần, chống viêm, kháng virút, điều hòa miễn dịch... Bằng phương pháp sắc ký lỏng bán điều chế, từ 2 kg nguyên liệu tâm Sen, nhóm nghiên cứu đã phân lập và xác định cấu trúc 2 alkaloid có tác dụng sinh học là armepavin (17,6 mg) và nor-armepavin (13,8 mg). Độ tinh khiết các alkaloid phân lập là trên 95%, đáp ứng yêu cầu làm chất đối chiếu trong định lượng hóa học cho các sản phẩm có nguồn gốc từ tự nhiên như cây Sen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Bishayee, A., Patel, P. A., Sharma, P., Thoutireddy, S., & Das, N. (2022). Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) and Its Bioactive Phytocompounds: A Tribute to Cancer Prevention and Intervention. *Cancers (Basel)*, vol. 14, no. 3, Jan 21 2022. DOI: 10.3390/cancers14030529.
- [2] Jiang, Y-Z., Chen, Y-Z., Mo, F., Liu, M., Huang, Q., & Liu, S. (2019). Pharmacological mechanism of traditional sedative effect of alkaloids in *Nelumbinis Plumula* based on network pharmacology. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, vol. 44, no. 19, pp. 4225-4233, 2019/10// 2019. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190603.403.
- [3] Chen, S. (2021). *Plumula Nelumbinis*: A review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology, pharmacokinetics and safety. *J Ethnopharmacol*, vol. 266, p. 113429, Feb 10 2021, doi: 10.1016/j.jep.2020.113429.
- [4] Marthandam Asokan, S., Mariappan, R., Muthusamy, S., & Velmurugan, B. K. (2018). Pharmacological benefits of

- neferine - A comprehensive review. *Life Sci*, vol. 199, pp. 60-70, Apr 15 2018. DOI: 10.1016/j.lfs.2018.02.032.
- [5] Shang, X. F. (2020). Biologically active isoquinoline alkaloids covering 2014-2018. *Med Res Rev*, vol. 40, no. 6, pp. 2212-2289, Nov 2020. DOI: 10.1002/med.21703.
- [6] Chang, M. (2022). Liensinine Inhibits Cell Growth and Blocks Autophagic Flux in Nonsmall-Cell Lung Cancer. *J Oncol*, vol. 2022, p. 1533779, 2022. DOI: 10.1155/2022/1533779.
- [7] Hu, P. (2022). Nelumbo nucifera Gaertn: An updated review of the antitumor activity and mechanisms of alkaloids. *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, vol. 5, p. 100167, 2022/12/01/ 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.prmcm.2022.100167>
- [8] Tian, W. (2018). Chemical composition of alkaloids of Plumula nelumbinis and their antioxidant activity from different habitats in China. *Industrial Crops and Products*, vol. 125, pp. 537-548, 2018. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.09.045.
- [9] Cao, X., Lin, X., Wu, C., Zhang, M., & Wang, M. (2022). Green Extraction-Assisted Pseudo-Targeted Profile of Alkaloids in Lotus Seed Epicarp Based on UPLC-QTOF MS with IDA. *Foods*, vol. 11, no. 7, Apr 6 2022. DOI: 10.3390/foods11071056.
- [10] Jiang, Y., Liu, R., Liu, M., Yi, L., & Liu, S. (2018). An integrated strategy to rapidly characterize non-targeted benzyloisoquinoline alkaloids from Plumula nelumbinis ethanol extract using UHPLC/Q-orbitrap HRMS. *International Journal of Mass Spectrometry*, vol. 432, pp. 26-35, 2018. DOI: 10.1016/j.ijms.2018.06.002.
- [11] Xiong, W., Chen, X., Lv, G., Hu, D., Zhao, J., & Li, S. (2016). Optimization of microwave-assisted extraction of bioactive alkaloids from lotus plumule using response surface methodology. *J Pharm Anal*, vol. 6, no. 6, pp. 382-388, Dec 2016. DOI: 10.1016/j.jpha.2016.05.007.
- [12] Chen, J. (2013). Aporphine Alkaloids: A Kind of Alkaloids' Extract Source, Chemical Constitution and Pharmacological Actions in Different Botany. *Asian Journal of Chemistry*, vol. 25, no. 18, pp. 10015-10027, 2013. DOI: 10.14233/ajchem.2013.15890.
- [13] Morikawa, T. (2016). Quantitative Determination of Alkaloids in Lotus Flower (Flower Buds of Nelumbo nucifera) and Their Melanogenesis Inhibitory Activity. *Molecules*, vol. 21, no. 7, Jul 19 2016, doi: 10.3390/molecules21070930.
- [14] Morikawa, T., Okugawa, S., Manse, Y., Muraoka, O., Yoshikawa, M., & Ninomiya, K. (2019). Quantitative Determination of Principal Aporphine and Benzyloisoquinoline Alkaloids Due to Blooming State in Lotus Flower (Flower Buds of Nelumbo nucifera) and Their Hyaluronidase Inhibitory Activity. *Natural Product Communications*, vol. 14, no. 6, 2019. DOI: 10.1177/1934578x19857834.
- [15] Weng, T. C., Shen, C. C., Chiu, Y. T., Lin, Y. L., Kuo, C. D., & Huang, Y. T. (2009). Inhibitory effects of arnepavine against hepatic fibrosis in rats. *J Biomed Sci*, vol. 16, no. 1, p. 78, Sep 2 2009. DOI: 10.1186/1423-0127-16-78.