

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN NGỌC CHƯƠNG

**NGHIÊN CỨU TIÊU CHUẨN HÓA HỢP CHẤT
KHÁNG ACETYLCHOLINESTERASE
CỦA MỘT SỐ LOÀI TRONG HỌ THẠCH TÙNG**

Chuyên ngành: Kiểm nghiệm thuốc và độc chất

Mã số: 62720410

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

**NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: PGS TS TRẦN CÔNG LUẬN
TS TRẦN MẠNH HÙNG**

TP. HỒ CHÍ MINH, năm 2020

Công trình được hoàn thành tại:

Người hướng dẫn khoa học:

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng đánh giá luận án cấp trường họp tại:

vào hồigiờ.....ngày.....tháng.....năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp Thành phố Hồ Chí Minh

GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Đặt vấn đề

Bệnh Alzheimer là một chứng suy giảm trí nhớ phổ biến nhất, ảnh hưởng nghiêm trọng đến cuộc sống của người lớn tuổi. Huperzin A được chiết xuất từ cây Thạch tùng răng (*Huperzia serrata*) có khả năng ức chế enzym acetylcholinesterase, một enzym quan trọng trong quá trình gây ra bệnh mất trí nhớ. Ở Trung Quốc, cùng với *Huperzia serrata*, các thực vật khác thuộc họ Lycopodiaceae có thể chứa hợp chất huperzin A như là *Huperzia crispata* (Ching) Ching, *Huperzia miyoshiana* (Makino) Ching và một số loài khác. Trong khi đó ở Việt Nam, một số cây thuộc họ Lycopodiaceae cũng có thể là nguồn thực vật cung cấp các hợp chất tự nhiên theo hướng tác dụng sinh học cải thiện trí nhớ như *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis (Râu rồng), *Lycopodiella cernua* (L.) Pic.Serm. (Thạch tùng nghiên) và nhiều loài khác. Thực tế hiện nay chưa có những đánh giá chi tiết và hoàn chỉnh về tác động ức chế enzym acetylcholinesterase và hàm lượng các thành phần *Lycopodium* alcaloid trong những loài thực vật có thể chứa các hợp chất thuộc dạng này.

Với những lý do trên, đề tài: **“Nghiên cứu tiêu chuẩn hóa hợp chất kháng acetylcholinesterase của một số loài trong họ Thạch tùng”** được thực hiện với những mục tiêu sau:

1. Nghiên cứu so sánh đặc điểm thực vật học của một số loài thuộc họ Thạch tùng.
2. Thử nghiệm *in vitro* sàng lọc tác dụng kháng acetylcholinesterase của cao chiết một số loài Thạch tùng.
3. Phân lập một số hợp chất tự nhiên trong cây Râu rồng (*Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis.), Thạch tùng nghiên (*Lycopodiella cernua* (L.) Pic.Serm.) và đánh giá tác dụng kháng acetylcholinesterase của các chất phân lập được.
4. Thiết lập chất chuẩn hợp chất kháng enzym acetylcholinesterase phân lập được.
5. Xây dựng phương pháp định lượng hợp chất có tác dụng kháng enzym

acetylcholinesterase trong các loài Thạch tùng bằng phương pháp điện di mao quản và HPLC.

6. Thử nghiệm *in vivo* tác dụng cải thiện trí nhớ của cao chiết alcaloid từ loài Thạch tùng nghiên cứu trữ lượng lớn và tiềm năng.

2. Tính cấp thiết của đề tài

Việc tìm kiếm dược liệu và hợp chất tự nhiên mới cho điều trị bệnh Alzheimer là rất cần thiết. Huperzin A được chiết xuất từ cây Thạch tùng răng (*Huperzia serrata*) đã được công nhận là một loại thuốc điều trị mất trí nhớ hiệu quả ở Trung Quốc và hiện nay đã được cục quản lý thuốc và thực phẩm Mỹ (FDA) công nhận là 1 loại thực phẩm chức năng cho các bệnh nhân bị Alzheimer. Nước ta có nguồn tài nguyên thực vật phong phú. Trong đó, các loài thuộc họ Thạch tùng rất tiềm năng để ứng dụng làm thuốc điều trị chứng suy giảm trí nhớ. Do đó, đánh giá chi tiết về hàm lượng huperzin A và tác dụng sinh học theo hướng cải thiện trí nhớ của 10 loài trong họ Thạch tùng sẽ góp phần chứng minh giá trị ứng dụng của dược liệu Việt Nam. Đồng thời, sự phát hiện các hợp chất tự nhiên mới với tác dụng sinh học tương tự sẽ là những đóng góp quan trọng cho khoa học và làm phong phú thêm dữ liệu phổ học về cấu trúc hợp chất thiên nhiên.

3. Những đóng góp mới của luận án

3.1. Thực vật học

Nghiên cứu thực vật học đã làm sáng tỏ các đặc điểm phân bố, sinh thái, hình thái, vi phẫu rễ, thân, lá của 10 loài Thạch tùng. Các đặc điểm thực vật học đặc trưng được trình bày qua các bảng so sánh chi tiết cùng với bộ hình ảnh về cấu tạo vi học sẽ là những dữ liệu quan trọng góp phần cho việc tìm kiếm thu thập mẫu và định danh một số loài trong họ Thạch tùng. Những loài thuộc chi *Huperzia* tiềm năng về hoạt chất huperzin A sẽ có những đặc điểm thực vật học đặc trưng khác với những loài thuộc chi *Lycopodium* và chi *Lycopodiella*. Sự phát hiện thêm loài mới chưa được mô tả ở Việt Nam đó là *Huperzia tetrasticha* (Kunze) Holub và đề xuất tên thông thường là

Thạch tùng vương, đã góp phần làm phong phú thêm các loài Thạch tùng ở Việt Nam.

3.2. Thử nghiệm sàng lọc tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase

Thử nghiệm sàng lọc tác dụng kháng acetylcholinesterase *in vitro* bằng phương pháp Ellman đối với 10 loài trong họ Thạch tùng đã cho thấy có tác dụng sinh học ức chế enzym phân hủy acetylcholin với IC_{50} từ 12,11 – 55,24 $\mu\text{g/ml}$. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng những loài dược liệu này rất có tiềm năng sử dụng cho bệnh nhân suy giảm trí nhớ. Các loài thuộc chi *Huperzia* có tác dụng sinh học mạnh hơn các loài thuộc chi *Lycopodium* và *Lycopodiella*.

3.3. Phân lập hợp chất tự nhiên

Lần đầu tiên, hai hợp chất tự nhiên mới với tác dụng sinh học kháng acetylcholinesterase *in vitro* là lycosquarosin A, $IC_{50} = 54,3 \mu\text{g/ml}$ được phân lập từ cây Râu rồng và lycocernuasid A, $IC_{50} = 8,51 \mu\text{g/ml}$ được phân lập từ cây Thạch tùng nghiên. Với hoạt tính ức chế AChE tiềm năng, hai hợp chất này sẽ có thể là những nguồn chất hóa học mới chống lại bệnh Alzheimer. Các kết quả nghiên cứu của hai hợp chất mới đã được công bố lần đầu tiên trên tạp chí ISI là *Molecules 2014* và *Chemical-Biological Interactions 2015*.

3.4. Thiết lập chất đối chiếu

Quy trình phân lập và thiết lập chất đối chiếu huperzin A từ loài Râu rồng (*Huperzia squarrosa*) được thực hiện, đáp ứng được nhu cầu cần thiết trong kiểm tra chất lượng dược liệu thuộc họ Thạch tùng.

3.5. Phương pháp định lượng huperzin A trong dược liệu

Lần đầu tiên phương pháp điện di mao quản vùng (CZE-DAD) được áp dụng để phân tích huperzin A trong cây Thạch tùng răng. Quy trình định lượng huperzin A trong cây Thạch tùng răng được xây dựng và thẩm định là một đóng góp mới trong lĩnh vực phân tích kiểm nghiệm. Phương pháp HPLC/PDA cũng được xây dựng, thẩm định và ứng dụng để định lượng huperzin A trong 10 loài thuộc họ Thạch tùng.

3.6. Thử nghiệm *in vivo*

Cao chiết alcaloid Thạch tùng nghiên cứu có tác dụng tăng cường nhận thức trên chuột đã bị gây suy giảm trí nhớ bằng scopolamin trong thử nghiệm *in vivo* qua 2 mô hình Né tránh thụ động và Mê cung bơi. Những kết quả này cho thấy rằng loài Thạch tùng nghiên cứu nguồn gốc ở Việt Nam có hoạt tính chống cholinesterase, có thể hữu ích trong điều trị suy giảm nhận thức và đã được công bố trên tạp chí ISI (*Neuroscience Letters* 2014).

4. BỐ CỤC LUẬN ÁN

Luận án gồm 132 trang: Mở đầu 2 trang, tổng quan tài liệu 24 trang, nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu 24 trang, kết quả nghiên cứu 55 trang, bàn luận 24 trang, kết luận và đề nghị 4 trang. Luận án có 37 bảng, 57 hình, 3 biểu đồ, 5 sơ đồ, 152 tài liệu tham khảo gồm 6 tài liệu tiếng Việt và 148 tài liệu tiếng Anh, 93 phụ lục thể hiện các kết quả thực nghiệm.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. TỔNG QUAN VỀ THỰC VẬT HỌC

1.1.1. Tổng quan về họ Lycopodiaceae

1.1.1.1. Vị trí phân loại

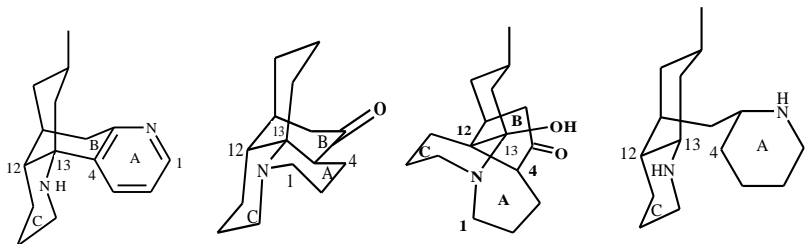
Họ Thạch tùng hay còn được gọi là họ Thông đất (Lycopodiaceae) bao gồm hơn 400 loài cỏ thực vật có mạch, tồn tại từ cuối kỷ Silur cách đây khoảng 400 triệu năm, phân bố rộng rãi khắp nơi trên thế giới. Các loài trong họ Thông đất thuộc thân thảo đa niên, sinh sản bằng bào tử, phân bố ở nhiều nước châu Á và vùng Trung Mỹ, được phát hiện ở trong các khu rừng nhiệt đới ẩm ướt. Ở Việt Nam, phát hiện được 3 chi là *Lycopodium* L., *Lycopodiella* Holub, *Huperzia* Bernh và có khoảng 16 loài, phân bố ở những vùng núi cao trên 1000 m thuộc các tỉnh Lâm Đồng, Kon Tum, Quảng Nam, Lào Cai, Cao Bằng.

1.2. TỔNG QUAN VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC

Các nhóm hoạt chất được phát hiện nhiều nhất từ các loài thuộc họ Thạch tùng chủ yếu bao gồm nhóm *Lycopodium* alcaloid, terpenoid,

flavonoid và các acid phenolic.

Các *Lycopodium* alkaloid này thường có khung cấu trúc 16 carbon, 32 carbon, một số ít công thức hóa học có ít hơn 16 carbon và được chia thành 4 nhóm là lycopodin, lycodin, fawcettimin và nhóm có cấu trúc khác tương tự như phlegmarin.



Lycodin

Lycopodin

Fawcettimin

Phlegmarin

Hình 1.1. Cấu trúc của bốn nhóm *Lycopodium* alkaloid

Huperzin A là *Lycopodium* alkaloid loại lycodin với vòng C mở và mất 1 nguyên tử carbon. Có hơn 200 loại *Lycopodium* alkaloid đã được báo cáo, tuy nhiên chúng hoặc là không có hoạt tính kháng acetylcholinesterase hoặc có nhưng kém hơn huperzin A. Huperzin A tồn tại trong nhiều loài cây khác nhau nhưng người dân vẫn tìm kiếm khai thác cây Thạch tùng răng (*Huperzia serrata*) vì lợi ích của nó mang lại là rất lớn do đó có thể dẫn đến cạn kiệt nguồn tài nguyên này.

1.3. CÁC PHƯƠNG CHIẾT XUẤT, PHÂN LẬP VÀ PHÁP PHÂN TÍCH HUPERZIN A

1.3.1. Phương pháp chiết xuất, phân lập huperzin A

Để chiết xuất và phân lập huperzin A, đa số kỹ thuật chiết xuất từ cỏ điển đến hiện đại đã được sử dụng. Đầu tiên, các phương pháp chiết xuất thường quy để thu alkaloid toàn phần được đều được sử dụng. Bột dược liệu được chiết ngâm lạnh, ngâm kiệt hoặc chiết hồi lưu với MeOH, EtOH hoặc với EtOH - acid để thu alkaloid toàn phần dạng muối, sau đó tiến hành kiềm hóa và chiết phân bố với ether, *n*-hexan, cloroform, dicloromethan, và cô

dưới áp suất giảm. Một số trường hợp làm ẩm dược liệu với kiềm (NH_4OH) và chiết trực tiếp bằng dung môi hữu cơ để thu alkaloid toàn phần dạng base. Sau khi thu được các alkaloid toàn phần, nhiều phương pháp đã được áp dụng cho việc phân lập huperzin A và các hợp chất khác trong đó phương pháp sắc ký được sử dụng phổ biến với các loại pha tĩnh khác nhau như: silica gel pha thuận, sephadex LH-20, sử dụng nhựa resin hấp phụ, trao đổi ion, silica gel pha đảo với các hệ dung môi rửa giải khác nhau từ phân cực trung bình đến phân cực mạnh. Ngoài ra, các thiết bị máy móc được sử dụng hỗ trợ tích cực cho việc tách chất như máy sắc ký lỏng điều chế, máy sắc ký phân bố ly tâm.

1.3.2. Phương pháp định lượng huperzin A

Những nghiên cứu về định lượng huperzin A trong dược liệu, các tác giả đều sử dụng phương pháp HPLC để định lượng các alkaloid. Mẫu thử được chiết xuất theo các nguyên tắc chung về chiết xuất alkaloid là chiết bằng MeOH, chiết bằng nước acid, chiết bằng cồn acid, kiềm hóa bột dược liệu kết hợp với chiết bằng cloroform. Quy trình định lượng đảm bảo các yêu cầu về độ nhạy, tính đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng. Tuy nhiên, chưa thấy có tài liệu công bố ứng dụng phương pháp điện di mao quản trong xác định hàm lượng huperzin A trong dược liệu thuộc họ Lycopodiaceae. Dựa vào cấu trúc hóa học, huperzin A là hợp chất alkaloid có nhóm amin tự do ($-\text{NH}_2$) và nhóm chức amid ($\text{O}=\text{C}-\text{NH}$). Do đó phân tử huperzin A sẽ được ion hóa trong môi trường acid phù hợp. Vì vậy, hoàn toàn có thể áp dụng phương pháp điện di mao quản để định lượng hợp chất huperzin A.

1.4. THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU

Việc thiết lập chất đối chiếu thứ cấp thường được tiến hành do nhu cầu thực tế, khi nguồn chất đối chiếu sơ cấp không đủ cung cấp cho nhu cầu sử dụng trong công tác nghiên cứu và đảm bảo chất lượng thuốc. Giá trị ấn định của chất đối chiếu thứ cấp thông thường được xử lý thống kê từ kết quả đánh giá liên phòng PTN tham gia thiết lập chất đối chiếu. Một chất đối chiếu thứ cấp của khu vực hay quốc gia có thể được coi là chất chuẩn gốc để thiết

lập chất chuẩn PTN.

1.5. TỔNG QUAN VỀ PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ACETYLCHOLINESTERASE

Phương pháp quang phổ UV - Vis

Đây là phương pháp cơ bản và phổ biến nhất hiện nay được Ellman công bố năm 1961. Phương pháp này có nhiều ưu điểm là đơn giản, nhanh, chính xác, chi phí tương đối thấp, thích hợp cho phân tích tự động, thực hiện trên số lượng mẫu thử lớn. Áp dụng thử hoạt tính cũng như khả năng ức chế enzym AChE.

1.6. CÁC MÔ HÌNH THỬ NGHIỆM HÀNH VI

Mô hình mê cung bơi

Đây là một thử nghiệm đánh giá hoạt động của trí nhớ dài hạn. Thử nghiệm được tiến hành huấn luyện 4 ngày đầu, ngày thứ 5 - thử nghiệm thăm dò khả năng học và nhớ của chuột sau thời gian huấn luyện; ngày 6 - thử nghiệm đánh giá trí nhớ hoạt động của chuột khi thay đổi vị trí của chân đế.

Thử nghiệm tránh né thụ động

Chuột bẩm sinh luôn có xu hướng hướng về bóng tối, vì vậy để tránh kích thích gây sợ hãi thì nó phải ngăn xu hướng này. Chuột nào không có khả năng ghi nhớ thì sẽ bước qua ranh giới sớm hơn chuột có khả năng ghi nhớ. Thử nghiệm này được đánh giá thông số: thời gian chuột băng qua vạch giới hạn và phần trăm số chuột trong mỗi lô thí nghiệm băng qua vạch giới hạn trong thời gian quy định.

Chương 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2. NGUYÊN LIỆU NGHIÊN CỨU

Các loài trong họ Thạch tùng được thu hái tại rừng vùng cao Tây Nguyên thuộc 2 tỉnh Lâm Đồng, Kon Tum, là những mẫu cây tươi có đủ bộ phận rễ, thân, lá. Mẫu được lưu giữ tại Bộ môn Tài nguyên - Dược liệu, Trung tâm Sâm và dược liệu Tp.HCM.

Bảng 2.1. Nguyên liệu nghiên cứu

Tên Việt Nam	Tên khoa học	Nơi thu hái	Số lưu mẫu
Chi <i>Huperzia</i>			
Râu rồng	<i>Huperzia squarrosa</i> (Forst.) Trevis.	Lâm Đồng	TT01
Thạch tùng đuôi ngựa	<i>Huperzia phlegmaria</i> (L.) Roth	Lâm Đồng	TT02
Thạch tùng sóng	<i>Huperzia carinata</i> (Poir.) Trevis	Lâm Đồng	TT03
Thạch tùng Ford	<i>Huperzia fordii</i> (Baker) R. D. Dixit	Lâm Đồng	TT04
Thạch tùng vuông	<i>Huperzia tetrasticha</i> (Kune) Holub.	Lâm Đồng	TT05
Thạch tùng răng	<i>Huperzia serrata</i> (Thunb.) Trevis.	Lâm Đồng	TT06
Chi <i>Lycopodium</i>			
Thạch tùng dẹp	<i>Lycopodium complanatum</i> L.	Lâm Đồng	TT07
Thạch tùng lá dùi	<i>Lycopodium clavatum</i> L.	Lâm Đồng	TT08
Thạch tùng dương	<i>Lycopodium casuarinoide</i> L.	Kon Tum	TT09
Chi <i>Lycopodiella</i>			
Thạch tùng nghiên	<i>Lycopodiellacernua</i> (L.) Pic.Serm.	Kon Tum	TT10

2.7. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Nghiên cứu thực vật học: Phân tích đặc điểm hình thái cơ quan sinh trưởng và sinh sản. Giải phẫu các cơ quan rễ, thân, lá để quan sát đặc điểm tế bào dưới kính hiển vi và chụp hình ảnh. So sánh các đặc điểm hình thái và vi phẫu thực vật để xác định các đặc điểm đặc trưng phân biệt một số loài trong họ Thạch tùng.

Nghiên cứu sàng lọc tác dụng *in vitro* kháng enzyme AChE: Thử nghiệm bằng phương pháp Ellman đối với mẫu cao chiết methanol thu được của 10 loài Thạch tùng. So sánh tác dụng kháng AChE của các loài trong họ Thạch tùng. Từ kết quả sàng lọc, chọn 2 đối tượng được liệu để nghiên cứu phân lập hợp chất tự nhiên.

Nghiên cứu hóa học: Chiết xuất và phân lập các hợp chất tự nhiên trong Cây Râu rồng (*Huperzia squarrosa*) và Thạch tùng nghiên (*Lycopodiella cernua*) bằng các kỹ thuật sắc ký. Xác định cấu trúc các chất phân lập bằng phương pháp phổ học và đánh giá tác dụng kháng AChE của

chất tinh khiết phân lập được bằng phương pháp Ellman.

Thiết lập chất đối chiếu: Hợp chất tự nhiên được lựa chọn để thiết lập chất đối chiếu phải là những chất đại diện, chiếm hàm lượng lớn trong cây, có tác dụng kháng enzym acetylcholinesterase mạnh cũng như có quy trình phân lập ổn định, khối lượng phân lập được nhiều (> 500 mg) với độ tinh khiết sắc ký cao (> 95 %) để thiết lập chất đối chiếu (CĐC). Các bước thực hiện dựa theo hướng dẫn của các tài liệu do ASEAN ban hành về quy trình thiết lập CĐC. Các bước tiến hành cụ thể như sau: Xây dựng bộ dữ liệu nhận dạng CĐC, xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết, xây dựng các chỉ tiêu đánh giá nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu, thiết lập CĐC.

Xây dựng quy trình định lượng huperzin A trong cây Thạch tùng răng bằng phương pháp điện di mao quản vùng

Cơ sở để lựa chọn điều kiện kỹ thuật điện di ban đầu dựa vào tính chất hóa học của huperzin A. Với bản chất là một alcaloid có tính kiềm yếu, huperzin A có khả năng phân ly thành ion mang điện tích trong môi trường có pH acid thích hợp. Dưới ảnh hưởng của điện trường tạo bởi điện áp cao thế từ 10 - 30 kV đặt vào 2 đầu mao quản, các chất mang điện tích khác nhau sẽ di chuyển khác nhau trong cột mao quản. Do đó, để phân tích huperzin A trong hỗn hợp alcaloid của cây Thạch tùng răng, kỹ thuật điện di mao quản vùng (CZE) được lựa chọn áp dụng. Quy trình được thực hiện trên máy điện di mao quản CE 7100 Agilent, cột silica gel nung chảy đường kính trong 50 μm , chiều dài 56 cm, chiều dài hiệu quả 50 cm, dung dịch đệm amoni acetat 40 mM, pH 6,5, nhiệt độ cột là 30 $^{\circ}\text{C}$, điện thế 15 kV, bom mầu 150 mbar \times 10 giây, bộ phận phát hiện là đầu dò DAD đặt ở bước sóng 310 nm, thời gian điện di 45 phút. Khảo sát các thông số điện di ảnh hưởng đến hiệu năng tách của huperzin A trong mẫu thử và lựa chọn điều kiện điện di phù hợp. Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống và thẩm định quy trình định lượng huperzin A trong Thạch tùng răng bằng phương pháp điện di mao quản theo hướng dẫn của ICH.

Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng huperzin A trong cây Rêu rồng bằng phương pháp HPLC/PDA

Cơ sở lựa chọn điều kiện kỹ thuật HPLC ban đầu dựa vào các công trình nghiên cứu đã công bố trước đây. Các tác giả đều sử dụng nhiều loại cột C18 cùng với nhiều hệ dung môi khác nhau như MeOH - nước acid phosphoric 0,1 % hay MeOH : dung dịch đệm amoni acetat (40:60). Do đó, điều kiện kỹ thuật HPLC ban đầu được lựa chọn thực hiện trên máy HPLC Merck – Hitach L2000, cột sắc ký LiChrospher RP 18e (250 mm × 4 mm, 5 µm), đầu dò PDA với bước sóng phát hiện được đặt tại 232 nm, thể tích tiêm mẫu 10 µl, tốc độ dòng: 1 ml/phút và nhiệt độ cột: 25 °C. Dung môi pha động là hỗn hợp MeOH - nước acid phosphoric 0,1 % (18:82). Tiến hành thực hiện các khảo sát các thông số ảnh hưởng đến hiệu năng tách và chọn điều kiện sắc ký phù hợp. Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống và thẩm định quy trình định lượng theo hướng dẫn của ICH.

Dựa vào kết quả thẩm định của 2 phương pháp định lượng, chọn 1 phương pháp định lượng thích hợp để xác định hàm lượng huperzin A trong 10 loài Thạch tùng.

Nghiên cứu *in vivo*: Áp dụng 2 mô hình mê cung bơi và né tránh thụ động đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ trên chuột đái cao chiết alcaloid của loài Thạch tùng nghiên cứu có tiềm năng và trữ lượng lớn.

Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. THỰC VẬT HỌC

Các đặc điểm phân bố, sinh thái, hình thái và vi học của 10 loài Thạch tùng được mô tả chi tiết bằng các bảng số liệu so sánh và hình ảnh cụ thể giúp phân biệt các chi loài trong họ. Các kết quả nghiên cứu thực vật học góp phần định danh chính xác 10 loài Thạch tùng nghiên cứu.

3.2. SÀNG LỌC TÁC DỤNG ỨC CHẾ ENZYM AChE

Bột dược liệu của 10 loài Thạch tùng được tiến hành chiết siêu âm với methanol. Thử nghiệm *in vitro* cho thấy dịch chiết các loài Thạch tùng

này đều có tác dụng kháng AChE với giá trị IC_{50} nằm trong khoảng từ 12,11 - 55,24 $\mu\text{g/ml}$.

Bảng 3.1. Kết quả tác động ức chế AChE của mẫu thử nghiệm

Tên khoa học	Tên Việt Nam	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Huperzia squarrosa</i>	Râu rồng	15,61 \pm 0,90
<i>Hupezia phlegmaria</i>	Thạch tùng đuôi ngựa	24,62 \pm 2,33
<i>Huperzia carinata</i>	Thạch tùng sóng	14,39 \pm 0,53
<i>Huperzia fordii</i>	Thạch tùng ford	26,19 \pm 0,70
<i>Huperzia tetrasticha</i>	Thạch tùng vuông	16,59 \pm 1,43
<i>Huperzia serrata</i>	Thạch tùng răng	12,11 \pm 0,74
<i>Lycopodium complanatum</i>	Thạch tùng dẹp	55,24 \pm 9,55
<i>Lycopodium clavatum</i>	Thạch tùng dùi	51,75 \pm 1,17
<i>Lycopodium casuarinoides</i>	Thạch tùng dương	36,56 \pm 4,29
<i>Lycopodiella cernua</i>	Thạch tùng nghiên	45,91 \pm 4,83

3.3. NGHIÊN CỨU HÓA HỌC

Kết quả phân tích sơ bộ thành phần hóa thực vật của cây Râu rồng và Thạch tùng nghiên có các nhóm hợp chất triterpenoid, alcaloid, flavonoid, các chất khử và các acid hữu cơ. Quy trình chiết xuất và phân lập được khảo sát kết hợp phương pháp ngâm kiệt bằng methanol và sắc ký phân bố Diaion HP 20.

Chiết xuất và phân lập các hợp chất tự nhiên từ cây Râu rồng thu được bốn hợp chất tinh khiết là huperzin A, lycosquarosin A, acetylposerratinin và huperzinin. Trong đó, lycosquarosin A là hợp chất tự nhiên mới, có tác dụng kháng AChE và được công bố trên tạp chí ISI (Molecules 2014).

Chiết xuất và phân lập các hợp chất từ cây Thạch tùng nghiên thu được 2 hợp chất là lycocernuin và cernuasid A. Trong đó, cernuasid A là hợp chất tự nhiên mới, có tác dụng kháng AChE và được công bố trên tạp chí ISI (Chemical-Biological Interactions 2015).

Biện luận cấu trúc hợp chất 1 (Huperzin A)

Hợp chất 1 (26 mg) ở dạng tinh thể hình kim ngắn, không màu, điểm chảy 228 °C. Năng suất quay cực $[\alpha]_D -151 \pm 3^\circ$, (0,5 %, methanol), trên SKLM cho vết phát quang dưới đèn UV 365 nm và tắt quang dưới đèn UV

254 nm và cho màu cam với TT Dragendorff. Phổ IR có các đỉnh hấp thụ đặc trưng của nhóm chức lactam ở 3178; 1651 cm^{-1} và nhóm carbonyl ở 1612 và 1548 cm^{-1} . Phổ UV của hợp chất 1 có 2 đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 312 nm và 230,5 nm.

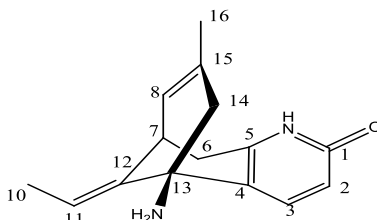
Phổ HRMS cho mũi ion phân tử giả m/z 243,1528 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết: $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O} + \text{H}]^+ = 243,1504$), tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ ($M = 242,1426$) và độ bất bão hòa $\omega = 8$.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ Phổ $^1\text{H NMR}$ cho các mũi cộng hưởng với sự hiện diện của 2 proton metin H-2 (δ 6,42; 1H; d; 9,5 Hz) và H-3 (δ 7,90; 1H; d; 9,5 Hz); sự hiện diện của proton nhóm metylen H-6a (δ 2,89; dd; 17/6,5 Hz) và H-6b (2,75; dd; 17/1,5 Hz) ghép spin với proton metin H-7 (δ 3,61; 1H; brs), sự hiện diện của các proton trên vòng mở: 3 proton metin H-7, H-8 (5,41; d; 4,5 Hz) và H-11 (5,48; q; 7,0 Hz), 1 proton metylen H-14 (2,12; d) và 2 proton metyl H-10 (1,68; d; 7,0 Hz); H-16 (1,55; s) và tín hiệu của 1 nhóm $-\text{NH}$ (13,20; brs). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và Dept-NMR có các tín hiệu sau: 02 nhóm $-\text{CH}_3$ (δ c 12,3 và 22,6 ppm), 02 nhóm $-\text{CH}_2-$ (δ c 35,2 và 49,2 ppm), 05 nhóm $>\text{CH}-$ (δ c 117,0; 140,2; 32,9; 124,3; 111,2 ppm), 06 nhóm C bậc 4 (δ c 165,4; 122,7; 143,2; 142,6; 54,3; 134,1 ppm). Trong đó có các tín hiệu đặc trưng của bốn carbon olefin bậc ba [δ c 117,0 (C-2), δ c 140,2 (C-3), δ c 124,3 (C-8), δ c 111,2 (C-11)], bốn carbon olefin bậc bốn [δ c 122,7 (C-4), δ c 143,2 (C-5), δ c 142,6 (C-12), δ c 134,1 (C-15)], một carbon carbonyl [δ c 165,4, C-1], hai carbon bậc một [δ c 12,3 (C-10), δ c 22,6 (C-16)], hai carbon bậc hai [δ c 35,2 (C-6), δ c 49,2 (C-14)], một carbon bậc ba [δ c 32,9 (C-7)] và một carbon bậc bốn [δ c 54,3 (C-13)].

Từ dữ liệu phổ IR và $^{13}\text{C-NMR}$ với sự hiện diện của carbon carbonyl ($\text{C}=\text{O}$) ở vùng trường δ c 165,4 ppm [C-1] và hai carbon olefin bậc ba [δ c 117,0 (C-2), δ c 140,2 (C-3)], hai carbon olefin bậc bốn [δ c 122,7 (C-4), δ c 143,2 (C-5)] cho thấy sự phù hợp của vòng pyridon trong cấu trúc của hợp chất 1. Do đó, hợp chất 1 thuộc nhóm hợp chất có khung cấu trúc lycodin alkaloid.

Phổ COSY cho các tín hiệu tương tác giữa H-2 (δ H 6,42 ppm) tương tác với H-3 (δ H 7,89 ppm); H-6a (δ H 2,87) tương tác với H-6b (δ H 2,71); H-6a, H-6b tương tác với H-7 (δ H 3,61); H-7 tương tác với H-8 (δ H 5,41), với H-11 (δ H 5,49), với H-10 (δ H 1,68).

Phổ HMBC cho thấy các tín hiệu tương tác proton và carbon như sau: H-2 tương tác với C-4; H-3 tương tác với C-1, C-5 và C-13; H-6a tương tác với C-4, C-5, C-7 và C-8, H-6b tương tác với C-4, C-5, C-7, C-8 và C-12; H-7 tương tác với C-5, C-6, C-8, C-11, C-12, C-13 và C-14; H-8 tương tác với C-7, C-12, C-13, C-14 và C-16; H-10 tương tác với C-11 và C-12; H-11 tương tác với C-7, C-8, C-10 và C-13; H-14 tương tác với C-4, C-8, C-12, C-13 và C-15; H-16 tương tác với C-8, C-14, và C-15. So sánh với tài liệu tham khảo [64] [79], tập hợp các dữ liệu của chất 1 trùng khớp với dữ liệu đã công bố của huperzin A.



Hình 3.7. Công thức cấu tạo của huperzin A

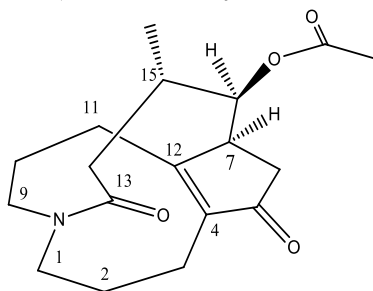
Biện luận cấu trúc hợp chất mới

Khảo sát cấu trúc hợp chất 2 (Lycosquarosin A): Hợp chất 2 (16,3 mg) thu được dưới dạng bột vô định hình, màu trắng, điểm chảy 258 °C, trên SKLM cho vết phát quang dưới đèn UV 365 nm, vết tắt quang dưới đèn UV 254 nm và cho màu cam với TT Dragendorff.

Phổ IR của chất 2 có các đỉnh hấp thụ: 3397, 1685, 1630, 1452 cm^{-1} , do đó chất 2 có dao động của các nhóm chức O-H, C=O, C-O, C-C. Phổ UV của hợp chất 2 có đỉnh hấp thụ cực đại ở bước sóng 255 nm.

Phổ HRMS của hợp chất 2 cho mũi ion phân tử giả m/z 320,1868 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (tính toán lý thuyết: $[\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_4 + \text{H}]^+ = 320,1885$), tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{NO}_4$ ($M = 319,1807$). Phổ ^1H , ^{13}C và Dept

cho biết hợp chất 2 có 1 nhóm methyl δC 22,9 (C-16), 2 nhóm N-CH₂ δC 50,9 (C-1 và C-9), 6 nhóm methylen ở vùng trường cao δC 18,4 (C-2), 22,1 (C-3), 37,4 (C-6), 25,1 (C10), 30,3 (C-11), 32,7 (C-14), 1 nhóm oxymethin δC 79,7 (C-8), 2 nhóm methin δC 45,0 (C-7) và 29,6 (C-15), cùng với 4 carbon bậc 4 δC 205,7 (C-5), 173,1 (C-13), 169,8 (C-12), 142,7 (C-4). Hơn nữa, tín hiệu của 1 carbon δC 169,7 (C-17) và 1 nhóm methyl δC 20,9 (C-18) chỉ ra đây là tín hiệu của nhóm acetoxy. Phổ ¹H-NMR cho tín hiệu proton methyl của nhóm acetoxy tại δH 2,19 (3H, s, H-18), nhóm methyl thứ 2 có δH 1,08 (3H, d, J = 6,3 Hz, H-16) và 1 proton của nhóm oxymethin δH 5,06 (1H, brd, J = 5,0 Hz, H-8). So sánh dữ liệu phổ ¹H-NMR, ¹³C-NMR với các tài liệu tham khảo cho thấy hợp chất 2 có thể chứa khung phlegmariurin B với vòng 5 carbon >C12=C4-C5(C=O)-C6-C7. Việc biện luận cấu trúc hợp chất 2 được tiếp tục bằng cách khai thác các thông tin trên phổ COSY, HMBC, HSQC. Phân tích phổ ¹H-¹H COSY và HSQC cho thấy sự hiện diện của 3 chuỗi carbon H-1/H-2/H-3, H-6/H-7/H-8/H-15/H-14 và H-9/H-10/H-11. Trên phổ HMBC xuất hiện tương tác xa giữa proton của nhóm oxymethin (H-8) và carbon carbonyl δC 169,7 (C-17) cho thấy nhóm acetoxy được gắn vào C-8.



Hình 3.9. Công thức cấu tạo của hợp chất 2 (lycosquarosin A)

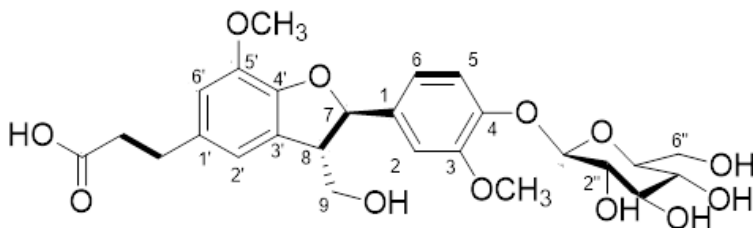
Tương tác giữa H-16 và H-7 chứng tỏ nhóm methyl ở C-15 theo hướng α , điều này tương tự như các phlegmariurin alkaloid trong họ Thạch tùng. Mặt khác, định hướng β của nhóm acetoxy ở C-8 được khẳng định từ tương tác trên phổ NOESY giữa H-7/H-16 và H-8. Từ các dữ liệu trên, hợp chất 2

được khẳng định là một dẫn xuất 8 β -acetoxy của phlegmariurin B lần đầu tiên phân lập được từ cây Râu rồng. Cấu trúc hóa học này được kiểm tra trên SciFinder ngày 15 - 2 - 2014 cho biết đây là hợp chất tự nhiên mới và được đề nghị đặt tên là lycosquarosin A. Công bố quốc tế của hợp chất mới đã được thực hiện trên tạp chí ISI (*Molecules* 2014).

Khảo sát cấu trúc của hợp chất 6 (Lycocernuasid A): Hợp chất 6 (12,3 mg) thu được dưới dạng bột vô định hình màu trắng. Phổ HR-FAB-MS cho mũi ion phân tử giả m/z z 559,1794 $[M + Na]^+$ (Tính toán lý thuyết: $[C_{26}H_{32}O_{12} + Na]^+ = 559,1791$), tương ứng với công thức phân tử $C_{18}H_{27}NO_4$ ($M = 536,1894$). Phổ IR cho tín hiệu của nhóm hydroxyl (3379 cm^{-1}), nhóm carboxylic acid (1638 cm^{-1}) và tín hiệu của vòng thơm ($1600, 1515\text{ cm}^{-1}$).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất 6 cho thấy có một vòng thơm thế ở vị trí 1, 3, 4 với tín hiệu của proton tại $\delta_{\text{H}} 7,06$ (1H, br s, H-2), $\delta_{\text{H}} 7,17$ (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5) và $\delta_{\text{H}} 6,96$ (1H, br dd, $J = 8,0$ Hz, H-6) cùng một vòng thơm thế ở vị trí 1, 3, 4, 5 với tín hiệu của proton tại $\delta_{\text{H}} 6,80$ (1H, br s, H-2') và $\delta_{\text{H}} 6,76$ (1H, br s, H-6'). Các tín hiệu proton cho thấy hợp chất 6 có nhóm chức propanoic tại $\delta_{\text{H}} 2,84$ (2H, t, $J = 7,6$ Hz, H-7'), $\delta_{\text{H}} 2,53$ (2H, t, $J = 7,6$ Hz, H-8'), một nhóm oxymethin tại $\delta_{\text{H}} 5,55$ (1H, d, $J = 6,0$ Hz, H-7), một nhóm methin tại $\delta_{\text{H}} 3,51$ (1H, m, H-8), 2 nhóm oxymethylen tại $\delta_{\text{H}} 3,88$ (1H, m, H-9a) và $\delta_{\text{H}} 3,78$ (1H, m, H-9b), 2 nhóm methoxyl tại $\delta_{\text{H}} 3,85$ và $\delta_{\text{H}} 3,88$ (3H, s). Ngoài ra còn có tín hiệu của nhóm glycosyl tại $\delta_{\text{H}} 4,89$ (1H, d, $J = 7,6$, H-1''). Dữ liệu phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và phổ DEPT cho thấy hợp chất 6 có 26 carbon bao gồm 12 carbon thuộc 2 vòng thơm, 1 nhóm oxymetyl tại $\delta_{\text{C}} 88,4$ ppm (C-7), 1 nhóm methin tại $\delta_{\text{C}} 55,5$ ppm (C-8), 2 nhóm methylen tại $\delta_{\text{C}} 32,3$ (C-7') và $38,1$ ppm (C-8'), 1 nhóm oxymethylen tại $\delta_{\text{C}} 65,2$ ppm (C-9), 2 nhóm methoxy tại $\delta_{\text{C}} 56,7$ (3-OCH₃) và $56,8$ (6'-OCH₃) cùng với 6 carbon của đường. Các dữ liệu phổ cho thấy hợp chất 6 có khung cấu trúc dihydrobenzofuran neolignan glycosid. Thủy phân hợp chất 6 bằng acid HCl 1N trong methanol thu được D-(+)-glucose, bằng cách đối chiếu với mẫu

chuẩn cho thấy 2 chất tương đồng trên SKLM.. Dữ liệu phổ COSY xác định vị trí của các nhóm bằng các tương tác giữa proton oxymethin tại δ_H 5,55 (H-7) và proton tại δ_H 3,51 (H-8), proton của nhóm methylen tại δ_H 2,84 (H-7') và proton tại δ_H 2,53 (H-8'). Phổ HMBC xuất hiện các tương tác xa giữa H-2/H-6 và C-7, và H-7'/H-8' và C-1' và C-9'. Vị trí của 2 nhóm methoxy được xác định tại C-3 và C-6' nhờ vào các tương tác HMBC giữa proton tại δ_H 3,85 và δ_H 3,88 tương ứng với δ_C 150,9 và δ_C 145,2. Tương tác trên phổ HMBC của H-1'' (δ_H 4,89) và C-4 (147,5) cho thấy nhóm glucopyranosyl liên kết với oxy tại C-4 và hằng số liên kết $J = 7,6$ Hz xác định kiểu liên kết là β -glucosid. $J_{H-7/H-8} = 6,0$ Hz cho thấy hai H-7 và H-8 ở vị trí trans, ngoài ra dữ liệu trên phổ NOESY xuất hiện tương tác giữa H-7 và H-9 cũng bổ sung cho nhận định này.



Hình 3.17. Công thức cấu tạo của hợp chất 6 (lycocernuasid A)

Từ các dữ kiện trên, hợp chất 6 được xác định là (7R,8S)-7,8-dihydro-8-hydroxymethyl-7-(3-methoxyphenyl-4-O- β -D-glucopyranosid)-1'-benzofuranpropanoic acid. Cấu trúc hóa học này được kiểm tra trên SciFinder ngày 10 - 12 - 2014 cho biết đây là hợp chất tự nhiên mới và được đề nghị tên gọi là lycocernuasid A. Công bố quốc tế của hợp chất mới đã được thực hiện trên tạp chí ISI (*Chemical-Biological Interactions* 2015). Vào năm 2017, nhóm tác giả Trung Quốc đã trích dẫn và sử dụng tên lycocernuasid B - D cho công trình nghiên cứu trên cùng cây Thạch tùng nghiên, công bố trên tạp chí Fitoterapia.

Bảng 3.15. Kết quả tác động ức chế AChE của các hợp chất phân lập được

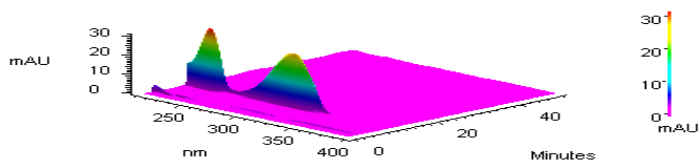
Hợp chất	IC ₅₀ (µg/ml)
Huperzin A	0,021 ± 0,005
Lycosquarosin A	54,3 ± 0,56
Acetylposerratinin	15,2 ± 0,64
Huperzinin	30,62 ± 0,33
Lycocernuin	246,12 ± 8,87
Lycocernuasid A	8,51 ± 0,39

Quy trình phân lập huperzin A làm chất đối chiếu từ cây Râu rồng

Quy trình phân lập huperzin A được tiến hành với 12,5 kg bột dược liệu Râu rồng và sử dụng huperzin A đã phân lập được ban đầu làm chất định tính điểm chỉ trên SKLM. Kết quả thu được 851 mg hợp chất M23 và được chứng minh cấu trúc hóa học bằng các phương pháp vật lý, hóa học và phổ nghiệm NMR. Các dữ liệu hoàn toàn trùng khớp với các dữ liệu đã công bố của huperzin A.

3.4. THIẾT LẬP CHẤT ĐỐI CHIẾU

Huperzin A là hợp chất có tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase mạnh và khối lượng phân lập 851 mg được sử dụng làm nguyên liệu để thiết lập chất đối. Xây dựng bộ tiêu chuẩn đánh giá CDC: phổ UV, IR, HRMS, NMR, xây dựng quy trình xác định độ tinh khiết, xây dựng bảng chỉ tiêu đánh giá nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu và thiết lập CDC. Kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm cho thấy độ tinh khiết của huperzin A là 99,13 % tính trên chế phẩm nguyên trạng với độ không đảm bảo đo là 0,336 và độ lệch 0,063, các lọ chuẩn được bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8 °C, tránh ánh sáng.

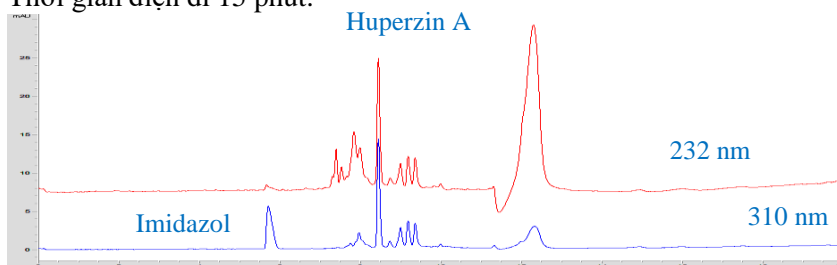


Hình 3.3. Sắc ký đồ 3 chiều của huperzin A

3.5. XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG HUPERZIN A TRONG DƯỢC LIỆU BẰNG PHƯƠNG PHÁP CZE VÀ HPLC

3.5.1. Xây dựng quy trình định lượng huperzin trong cây Thạch tùng rừng bằng phương pháp CZE

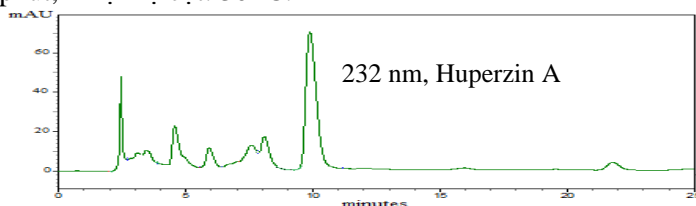
Từ các kết quả khảo sát, điều kiện điện di phù hợp được chọn như sau: Máy điện di mao quản CE 7100 Agilent. Cột silicagel nung chảy đường kính trong 50 μm , chiều dài 56 cm, chiều dài hiệu quả 50 cm. Dung dịch đệm: amoni acetat 60 mM, pH 6.0. Nhiệt độ cột là 25 $^{\circ}\text{C}$. Điện thế 15 kV. Tiêm mẫu 50 mbar \times 10 giây. Đầu dò DAD, bước sóng phát hiện đặt ở 310 nm. Thời gian điện di 15 phút.



Hình 3.29. Điện di đồ mẫu thử *Huperzia serrata*

3.5.2. Xây dựng quy trình định lượng huperzin a trong cây râu rồng bằng phương pháp phương pháp HPLC/PDA

Từ các kết quả khảo sát, điều kiện sắc ký phù hợp như sau: Máy sắc ký lỏng: Merck Hitachi L2000. Cột sắc ký LiChrospher RP 18e (250 mm \times 4 mm, 5 μm). Dung môi pha động MeOH - acid phosphoric 0,1 %, tỉ lệ (18 : 82). Chương trình rửa giải đẳng dòng. Thể tích tiêm mẫu: 10 μl , tốc độ dòng: 1 ml/phút. Đầu dò: PDA, bước sóng phát hiện đặt ở 232 nm. Thời gian phân tích 30 phút, nhiệt độ cột: 30 $^{\circ}\text{C}$.



Hình 3.41. Sắc ký đồ của mẫu thử *Huperzia serrata*

3.5.3. Ứng dụng quy trình định lượng huperzin A trong 10 loài Thạch tùng

Sau khi xây dựng và thẩm định 2 quy trình định lượng huperzin A trong dược liệu, việc lựa chọn 1 quy trình để áp dụng xác định hàm lượng huperxin A trong 10 loài Thạch tùng nghiên cứu sẽ dựa vào kết quả thẩm định của 2 phương pháp đã thực hiện. Đối với phương pháp CZE/DAD, cho đến thời điểm hiện tại trong nước và trên thế giới chưa có tác giả nào xây dựng quy trình định lượng huperzin A trong dược liệu Thạch tùng răng cũng như trong các loài khác thuộc họ Thạch tùng. Kết quả của luận án về xây dựng phương pháp CZE/DAD là một đóng góp mới, làm phong phú thêm kỹ thuật áp dụng trong lĩnh vực nghiên cứu phương pháp định lượng huperzin A trong Thạch tùng răng. Tuy nhiên, kết quả thẩm định quy trình cũng đã cho thấy độ lặp của phương pháp CZE kém hơn nhiều so với phương pháp HPLC, giá trị RSD lần lượt là 12,78 % và 4,46 %. Vì vậy, quy trình định lượng huperzin A bằng phương pháp HPLC/PDA được ưu tiên chọn lựa để ứng dụng vào thực tiễn xác định hàm lượng huperzin A trong các loài Thạch tùng nghiên cứu.

Bảng 3.24. Kết quả xác định hàm lượng huperzin A của 10 loài trong họ Thạch tùng

Tên khoa học	Tên Việt Nam	Độ ẩm (%)	Hàm lượng (%) huperzin A trong dược liệu
<i>Huperzia squarrosa</i>	Râu rồng	6,75	0,0266
<i>Hupezia phlegmaria</i>	Thạch tùng đuôi ngựa	9,18	0,0048
<i>Huperzia carinata</i>	Thạch tùng sừng	9,36	0,0208
<i>Huperzia fordii</i>	Thạch tùng ford	10,25	0,0047
<i>Huperzia tetrasticha</i>	Thạch tùng vuông	10,44	0,0156
<i>Huperzia serrata</i>	Thạch tùng răng	8,29	0,0181
<i>Lycopodium complanatum</i>	Thạch tùng dẹp	8,94	< LOD
<i>Lycopodium clavatum</i>	Thạch tùng dùi	8,36	< LOD
<i>Lycopodium casuarinoides</i>	Thạch tùng dương	6,22	< LOD
<i>Lycopodiella cernua</i>	Thạch tùng nghiên	8,16	< LOD

3.6. NGHIÊN CỨU *IN VIVO* TÁC DỤNG CẢI THIỆN TRÍ NHỚ CỦA THẠCH TÙNG NGHIÊN

3.6.1. Thử nghiệm tránh né thụ động

Kết quả trong giai đoạn thử nghiệm sự ghi nhớ, thời gian bước qua ngăn tối của thiết bị đối với lô chứng sinh lý là 220 ± 10 giây. Trong khi đó, những con chuột được gây bệnh bằng scopolamin của lô bệnh lý thì thời gian ở trong khoang sáng chỉ 20 ± 3 giây trước khi chuyển vào ngăn tối. Do đó, thời gian của lô bệnh lý ngắn hơn đáng kể so với lô chứng sinh lý. Khi chuột được sử dụng scopolamin cộng với tacrin, thời gian ở trong khoang sáng lớn hơn đáng kể so với những con chuột được chỉ dùng scopolamin (160 ± 12 giây so với 22 ± 3 giây). Việc giảm thời gian gây ra bởi scopolamin đã được đảo ngược đáng kể bằng cao Thạch tùng nghiên ở liều 20 và 50 mg/kg ($P < 0,05$) lần lượt là 148 ± 15 và 167 ± 21 giây. Ở liều 10 mg/kg, cao Thạch tùng nghiên không cho thấy hiệu quả rõ rệt so với lô bệnh lý (28 ± 5 giây so với 22 ± 3 giây). Tuy nhiên, ở liều cao nhất 100 mg/kg, thời gian giảm đáng kể so với liều 50 mg/kg ($P < 0,05$) lần lượt là 115 ± 14 và 167 ± 21 giây. Do đó, liều 50 mg/kg cao Thạch tùng nghiên dùng đường uống có tác dụng cải thiện trí nhớ mạnh nhất trong các liều thử nghiệm trên chuột.

3.6.2. Thử nghiệm Mê cung bơi

Nhóm chứng sinh lý đã nhanh chóng biết được vị trí chân đế. Nhóm được sử dụng scopolamin thể hiện sự chậm trễ trong việc tìm tới chân đế trong suốt quá trình thực nghiệm so với nhóm chứng ($P < 0,001$). Cao Thạch tùng nghiên (50 mg/kg) làm giảm đáng kể tác dụng của scopolamin về độ trễ cũng như tacrine ($P < 0,05$). Đúng ngày trong thử nghiệm thăm dò, quan sát và ghi nhận thời gian bơi trong góc phần tư có chân đế. Đối với nhóm được sử dụng scopolamin, thời gian bơi ngắn hơn đáng kể so với nhóm đối chứng ($P < 0,05$). Ngoài ra, thời gian bơi ngắn hơn trong góc phần tư do scopolamin gây ra đã bị đảo ngược đáng kể bởi cao Thạch tùng nghiên hoặc tacrin ($P < 0,05$).

Những kết quả này cho thấy rằng loài Thạch tùng nghiên nguồn gốc ở Việt Nam có thể hữu ích trong điều trị suy giảm nhận thức.

Chương 4. BÀN LUẬN

Phân tích so sánh đặc điểm hình thái và vi phẫu rễ, thân, lá của các loài thuộc 3 chi trong họ Thạch tùng là cơ sở giúp phân biệt các chi và loài. Kết quả nghiên cứu giúp cho công việc định danh và góp phần cho công tác kiểm nghiệm dược liệu cũng như xây dựng các chỉ tiêu chất lượng cho ĐDVN trong lần xuất bản sắp tới.

Nghiên cứu sàng lọc đánh giá hoạt tính ức chế AChE đối với 10 mẫu cao chiết methanol toàn phần của các loài Thạch tùng bằng phương pháp Ellman. Phương pháp này đã được sử dụng phổ biến trong nghiên cứu cao chiết từ dược liệu cũng như các hoạt chất tinh khiết phân lập được nhằm mục tiêu khảo sát khả năng ức chế AChE để từ đó định hướng cho những nghiên cứu chuyên sâu hơn về hóa học và dược lý. Ở Việt Nam, kết quả của luận án đã sàng lọc tác dụng kháng AChE của 10 loài Thạch tùng thu hái ở Tây Nguyên. Các loài Thạch tùng nghiên cứu đều có tác dụng kháng AChE *in vitro* với nồng độ ức chế khác nhau giữa các loài. Với điều kiện tự nhiên thích hợp và truyền thống sử dụng thuốc Y học cổ truyền của nước ta, các loài trong họ Thạch tùng sẽ là nguồn dược liệu quan trọng góp phần điều trị cho bệnh nhân Alzheimer.

Lycosquarosin A và lycocernuasid A là hai hợp chất mới lần đầu tiên được phân lập trong tự nhiên, có tác dụng kháng AChE, góp phần làm phong phú thêm thư viện hợp chất thiên nhiên của thế giới, có thể có tiềm năng trong ứng dụng làm thuốc chữa bệnh suy giảm trí nhớ và có thể làm cơ sở để cho các nghiên cứu bán tổng hợp và tổng hợp hóa học tiếp theo tạo ra các thuốc mới theo hướng ức chế AChE.

Thiết lập chất đối chiếu huperzin A là một yêu cầu cần thiết để phục vụ cho công tác đánh giá hàm lượng của nó trong một số loài thuộc họ Thạch tùng. Một số loài Thạch tùng trên thế giới đã được công bố hoạt tính sinh học về tác dụng cải thiện trí nhớ. Nhiều hợp chất tự nhiên trong một số loài thuộc họ cổ thực vật này cũng đã được phân lập và đánh giá tác dụng kháng AChE. Trong đó, huperzin A là hợp chất có tác dụng sinh học mạnh và là hợp chất chính trong một số loài Thạch tùng.

Lần đầu tiên, kết quả nghiên cứu đã đóng góp thêm phương pháp CZE-DAD để xây dựng và thẩm định quy trình định lượng huperzin A trong cây Thạch tùng rừng. Phương pháp HPLC-PDA được nghiên cứu xây dựng và áp dụng để đánh giá trữ lượng huperzin A của 10 loài Thạch tùng ở trong nước. Với những ưu điểm ưu điểm của phương pháp CZE-DAD về thiết bị và kỹ thuật vận hành đơn giản, hiệu năng tách tốt và thời gian phân tích nhanh, thể tích tiêm mẫu và dung môi sử dụng ít, phương pháp điện di mao quản cũng có thể là sự lựa chọn để phân tích huperzin A trong dược liệu. Tuy nhiên, qua so sánh kết quả thẩm định của hai phương pháp, kỹ thuật HPLC-PDA đã cho thấy hiệu quả hơn về độ lặp lại của quy trình định lượng. Do đó, phương pháp HPLC được ưu tiên áp dụng để xác định hàm lượng huperzin A trong các loài Thạch tùng nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu *in vivo* đã chứng minh rằng cao chiết alcaloid của cây Thạch tùng nghiên cứu có tác dụng tăng cường nhận thức trên chuột nhắt trắng đã được gây bệnh bằng scopolamin. Trong thử nghiệm *in vitro*, cao chiết Thạch tùng nghiên cứu có tác dụng ức chế enzym AChE. Do đó, tác dụng tăng cường nhận thức của loài Thạch tùng nghiên cứu ở Việt Nam có thể là do kết quả của sự tác động ức chế enzym AChE. Cùng với ưu điểm về phân bố sinh thái rộng và có trữ lượng lớn trong tự nhiên, Thạch tùng nghiên cứu là loài rất có tiềm năng khai thác và ứng dụng như là một vị thuốc YHCT trong điều trị bệnh Alzheimer.

KẾT LUẬN

Các đặc điểm phân bố sinh thái, hình thái, vi phẫu rễ, thân, lá của 10 loài thạch tùng được thực hiện trong luận án sẽ là bộ dữ liệu tham khảo góp phần cho định danh các loài thuộc họ Thạch tùng.

Trong 10 loài Thạch tùng nghiên cứu đều có tác dụng sinh học kháng AChE *in vitro*. Mức độ tác dụng sinh học khác nhau giữa các chi trong họ và giữa các loài trong cùng chi. Các loài thuộc chi *Huperzia* có chứa huperzin A thì tác dụng kháng AChE mạnh hơn các loài không có chứa huperzin A thuộc chi *Lycopodium* và *Lycopodiella*. Sự khan hiếm nguồn nguyên liệu các

loài thuộc chi *Huperzia* có thể sẽ được thay thế bằng các loài thuộc chi *Lycopodium* và *Lycopodiella*.

Thành phần hóa học chính trong 2 loài *Huperzia squarrosa* và *Lycopodiella cernua* là các nhóm hợp chất alkaloid, triterpenoid, flavonoid, các chất khử và các acid hữu cơ. Trong sáu hợp chất tinh khiết phân lập được đều có tác dụng sinh học kháng AChE *in vitro*. Các hợp chất phân lập bao gồm huperzin A, lycosquarosin A, acetylposerratinin, huperzinin, lycocernuin và lycocernuasid A. Trong đó, lycosquarosin A và lycocernuasid A là 2 hợp chất mới có tác dụng sinh học kháng AChE *in vitro*. Cả hai hợp chất này lần đầu tiên được phân lập trong tự nhiên và chứng minh cấu trúc bằng các phương pháp vật lý, hóa học và phổ nghiệm NMR. Kết quả nghiên cứu này là những đóng góp mới có giá trị khoa học và được công bố trên hai tạp chí ISI (*Molecules* 2014 và *Chemical-Biological Interactions* 2015). Cùng với tác dụng sinh học kháng AchE, hai hợp chất mới lycosquarosin A và lycocernuasid A sẽ là những hợp chất tự nhiên có tiềm năng cho nghiên cứu và sử dụng làm thuốc chữa bệnh suy giảm trí nhớ.

Chất đối chiếu huperzin A được xây dựng với bộ dữ liệu chuẩn bao gồm điểm chảy, năng suất quay cực, phổ UV, IR, MS, NMR. Bảng tiêu chuẩn đánh giá huperzin A được đề xuất xây dựng làm cơ sở để kiểm tra chất lượng chất đối chiếu. Chất đối chiếu Huperzin A được ứng dụng trong xây dựng quy trình định lượng hợp chất này trong dược liệu bằng 2 phương pháp điện di mao quản và HPLC.

Lần đầu tiên kỹ thuật CZE-DAD đã được ứng dụng để xây dựng quy trình định lượng huperzin A trong cây Thạch tùng răng. Kết quả nghiên cứu đã cung cấp thêm trong lĩnh vực phân tích kiểm nghiệm một phương pháp điện di mao quản vùng để phân tích huperzin A trong loài Thạch tùng răng. Quy trình định lượng huperzin A trong loài Râu rồng bằng phương pháp HPLC/PDA có tính chọn lọc và độ chính xác cao, thích hợp để ứng dụng rộng rãi đối với việc xác định trữ lượng huperzin A trong các loài trong họ Thạch tùng.

Thử nghiệm *in vivo* được thực hiện trên mô hình né tránh thụ động,

mô hình mê cung nước đối với cao chiết alcaloid của Thạch tùng nghiên. Kết quả nghiên cứu là một minh chứng khoa học về tác dụng cải thiện trí nhớ của Thạch tùng nghiên trên chuột đã được gây bệnh bằng scopolamin. Phương pháp nghiên cứu này cho kết quả nhanh, chính xác và có thể được ứng dụng để đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ của các dược liệu khác. Kết quả thử nghiệm *in vivo* đã chứng minh Thạch tùng nghiên ở Việt Nam có tác dụng cải thiện trí nhớ trên chuột và được công bố trên tạp chí *ISI Neuroscience Letters* (2014).

KIẾN NGHỊ

Các kết quả đạt được nêu trong luận án là cơ sở khoa học để thực hiện các hướng nghiên cứu tiếp theo với dược liệu họ Thạch tùng cũng như áp dụng các kết quả nghiên cứu này trong thực tiễn.

- Tiếp tục điều tra nguồn dược liệu Thạch tùng ở Việt nam, xây dựng bộ dược liệu chuẩn bổ sung cho các tài liệu khoa học công bố trước đây về họ Thạch tùng có ở Việt Nam

- Đánh giá trữ lượng của chi *Lycopodiella* và nghiên cứu khả năng tái sinh của loài *Lycopodiella cernua* để có thể sử dụng làm nguồn dược liệu cải thiện trí nhớ.

- Nghiên cứu nuôi trồng loài Râu rồng để sản xuất huperzin A thay thế cho Thạch tùng rừng ngày càng cạn kiệt trong tự nhiên.

- Tiếp tục nghiên cứu phân lập các hợp chất tự nhiên trong một số loài Thạch tùng.

- Xây dựng chuyên luận dược liệu một số loài Thạch tùng cho Dược điển Việt Nam trong lần xuất bản tới.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH LIÊN QUAN

1. Nguyen Ngoc Chuong, Tran Manh Hung, Tran Cong Luan, Byung Sun Min (2013), “Huperzine A from *Huperzia serrata* (thunb.) trevis., (lycopodiaceae)”, *Proceeding of the eighth Indochina Conference on Pharmaceutical Sciences*, Ho Chi Minh city, Vietnam, December 4-5, 2013, 884-888.
2. Nguyen Ngoc Chuong, Bui Huu Trung, Tran Cong Luan, Tran Manh Hung, Nguyen Hai Dang, Nguyen Tien Dat (2014), “Anti-amnesic effect of alkaloids fraction from *Lycopodiella cernua* (L.) pic. serm. on scopolamine-induced memory impairment in mice”. *Neuroscience Letters* 575, pp. 42–46.
3. Nguyễn Duy Tài, Nguyễn Ngọc Chương, Nguyễn Thị Sơn, Trần Công Luận (2014), “Nghiên cứu tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ của các cao chiết còn từ hai loài thạch tùng thuộc họ Lycopodiaceae trên chuột nhắt trắng”. *Tạp chí Y học TpHCM*, 18(1), tr. 243-248.
4. Nguyen Ngoc Chuong, Tran Cong Luan (2014), “Isolation of huperzine A from *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis., Lycopodiaceae”, *Journal of Medicinal Materials - Hanoi (Tạp chí Dược Liệu)*, 19(1), tr. 22-26.
5. Nguyen Ngoc Chuong, Nguyen Thi Thu Huong, Tran Manh Hung, Tran Cong Luan (2014), “Anti-Cholinesterase Activity of *Lycopodium* Alkaloids from Vietnamese *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis”. *Molecules*, 19(11), pp. 19172-19179.
6. Tran Manh Hung, Joo Sang Lee, Nguyen Ngoc Chuong, Jeong Ah Kim, Sang Ho Oh, Mi Hee Woo, Jae Su Choi, Byung Sun Min (2015), “Kinetics and molecular docking studies of cholinesterase inhibitors derived from water layer of *Lycopodiella cernua* (L.) Pic. Serm”. *Chemico-Biological Interactions*, 240, pp. 74-82.
7. Nguyễn Ngọc Chương, Trần Mạnh Hùng, Trần Thị Kim Dung, Trần Công Luận (2016), “Thiết lập chất chuẩn và định lượng huperzin A trong một số loài họ thạch tùng ở Việt Nam” *Tạp chí khoa học và công nghệ Việt Nam*, 54(2C), tr 417-424.
8. Phan Trọng Đạt, Lý Minh Huy, Nguyễn Ngọc Chương, Trương Ngọc Tuyền (2018), “Bán tổng hợp và thử hoạt tính ức chế acetylcholinesterase của một số dẫn chất của huperzinin”, *Tạp chí Dược học*, 58(2), tr 55-59”.