

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO BỘ Y TẾ
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH



HOÀNG XUÂN HUYỀN TRANG

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HOÁ HỌC
HƯỚNG TÁC DỤNG ỨC CHẾ
ACETYLCHOLINESTERASE CỦA LOÀI
HIPPEASTRUM RETICULATUM (L'HÉR.) HERB.
Ở VIỆT NAM**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ Y/DƯỢC HỌC

TP. Hồ Chí Minh, năm 2024

Công trình được hoàn thành tại:

Đại học Y Dược Thành phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Nguyễn Thị Hoài

Phản biện 1:

Phản biện 2

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường họp tại

vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp
- Thư viện Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh

1. Giới thiệu luận án

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Alzheimer là bệnh lý phổ biến nhất trong các hội chứng sa sút trí tuệ. Theo số liệu thống kê năm 2019 của World Alzheimer Report, có 50 triệu người mắc sa sút trí tuệ trên toàn thế giới, trong đó 60-80% trường hợp mắc bệnh Alzheimer. Mặc dù đây là căn bệnh có mức độ phổ biến cao nhưng cho đến nay, chỉ có 6 thuốc được FDA chấp thuận sử dụng trong điều trị Alzheimer. Do đó, nghiên cứu và phát triển thuốc điều trị bệnh Alzheimer là nhu cầu cấp thiết hiện nay. Theo đánh giá của các nhà khoa học, các alkaloid thực vật từ họ Amaryllidaceae (nơi cung cấp galantamin) là nguồn nguyên liệu tiềm năng cho việc phát hiện các tác nhân cho nghiên cứu phát triển thuốc Alzheimer. *Hippeastrum* là một chi lớn trong họ Amaryllidaceae. Theo Thực vật chí Việt Nam, chi *Hippeastrum* ở Việt Nam có 2 loài là *Hippeastrum equestre* và *Hippeastrum reticulatum*. Kết quả sàng lọc cho thấy loài *Hippeastrum reticulatum* có tác dụng ức chế acetylcholinesterase tốt hơn với giá trị IC_{50} là $39,85 \pm 0,94 \mu\text{g/ml}$. Bên cạnh đó, số lượng nghiên cứu về thành phần hoá học và tác dụng sinh học của loài này vẫn còn khá hạn chế. Từ những lý do trên, chúng tôi đề xuất đề tài: **“Nghiên cứu thành phần hoá học hướng tác dụng ức chế acetylcholinesterase của loài *Hippeastrum reticulatum* (L’Hér.) Herb. ở Việt Nam”**.

b. Mục tiêu nghiên cứu:

Mục tiêu 1. Nghiên cứu thành phần hoá học của loài *Hippeastrum reticulatum* theo định hướng hoạt tính ức chế acetylcholinesterase.

Mục tiêu 2. Xây dựng quy trình định lượng hợp chất có trong loài *Hippeastrum reticulatum*.

Mục tiêu 3. Xác định độc tính cấp và đánh giá tác dụng sinh học của

các cao toàn phần, cao phân đoạn và các hợp chất phân lập được theo hướng điều trị bệnh Alzheimer.

c. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

- Đối tượng nghiên cứu: loài *Hippeastrum reticulatum*.

- Phương pháp nghiên cứu:

+ Nghiên cứu thực vật: mô tả đặc điểm hình thái, giám định tên khoa học, mô tả các đặc điểm vi học bằng kính hiển vi quang học.

+ Nghiên cứu thành phần hoá học:

Định tính các nhóm chất trong dược liệu bằng phản ứng hoá học đặc trưng.

Chiết xuất bằng phương pháp ngâm ở nhiệt độ phòng, chiết phân đoạn. Phân lập các hợp chất tinh khiết bằng phương pháp sắc ký cột, kiểm soát quá trình phân lập bằng sắc ký lớp mỏng.

Xác định cấu trúc bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ khối kết hợp đối chiếu với tài liệu tham khảo.

+ Xây dựng quy trình định lượng:

Xác định độ tinh khiết của chất đối chiếu bằng phương pháp chuẩn hoá diện tích.

Xác định các điều kiện chiết xuất, điều kiện sắc ký.

Thẩm định quy trình định lượng đã xây dựng theo hướng dẫn của AOAC.

Ứng dụng quy trình định lượng để xác định hàm lượng hợp chất có trong dược liệu.

+ Nghiên cứu hoạt tính sinh học:

Xác định độc tính cấp bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon.

Xác định hoạt tính ức chế acetylcholinesterase *in vitro* bằng phương pháp của Ellman.

Đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ và nhận thức *in vivo* bằng các mô

hình: mê cung chữ Y, mê lộ nước Morris và nhận diện đồ vật.

Đánh giá tác dụng chống lão suy *in vivo* dựa vào việc định lượng các enzym liên quan đến hoạt tính chống lão suy là MDA, GSH-Px và SOD trên chuột gây lão suy bằng D-galactose.

d. Những đóng góp mới của nghiên cứu về mặt lý luận và thực tiễn

- **Về thực vật:** lần đầu tiên cung cấp thông tin về các đặc điểm vi học của loài *Hippeastrum reticulatum*, góp phần nhận biết và tiêu chuẩn hoá dược liệu.

- **Về hoá học:** Từ thân hành của *Hippeastrum reticulatum* đã phân lập và xác định cấu trúc hoá học của **13 hợp chất** bao gồm: **10 alkaloid** (*trans*-dihydronarciclasin, *N*-chloromethyl narcissidinium, narciprimin, narciclasin-4-*O*- β -D-xylopyranosid, 2-methoxy pancracin, *N*-methyltyramin, 3 β ,11 α -dihydroxy-1,2-dehydrocrinan, brunsvigin, pancracin, 8-*O*-demethylmaritidin; **1 acid amin** (cycasinden) và **2 flavonoid** (2,3-*cis*-guibourtinidol, 8-methylkaempferol). Trong đó, **12 hợp chất** lần đầu tiên được phân lập từ loài *Hippeastrum reticulatum*; **11 hợp chất** lần đầu tiên được phân lập từ chi *Hippeastrum*.

- **Về xây dựng quy trình định lượng:**

+ Lần đầu tiên đã khảo sát các yếu tố liên quan đến quy trình chiết xuất và đã xác định được một số điều kiện chiết xuất là: chiết siêu âm, dung môi chiết là methanol 70%, tỷ lệ dược liệu/dung môi 100 ml/2 g dược liệu, thời gian chiết 30 phút, nhiệt độ chiết 60 °C, số lần chiết 2 lần.

+ Lần đầu tiên phương pháp định lượng 2-methoxy pancracin trong thân hành của loài *Hippeastrum reticulatum* bằng HPLC đã được xây dựng và thẩm định đạt các tiêu chuẩn về độ tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ đúng, độ tuyến tính với $R^2=0,9997$ trong

khoảng tuyến tính 0,25-100 $\mu\text{g/ml}$, LOD 0,08 $\mu\text{g/ml}$ và LOQ 0,31 $\mu\text{g/ml}$.

+ Lần đầu tiên công bố hàm lượng 2-methoxy pancracin trong thân hành và cao toàn phần của loài *Hippeastrum reticulatum* thu hái ở Việt Nam tương ứng là $0,0823 \pm 0,0003\%$ và $0,1619 \pm 0,0016\%$.

- Về độc tính cấp và tác dụng sinh học:

+ Đã xác định được liều LD_{50} của cao phân đoạn alcaloid của loài *Hippeastrum reticulatum* bằng đường uống trên chuột nhắt trắng là 90,2 mg/kg (khoảng tin cậy 95% của LD_{50} là 76,12 mg/kg – 106,89 mg/kg), tương ứng 7,9 g dược liệu khô/kg thể trọng chuột.

+ Về tác dụng ức chế AChE *in vitro*

Cao toàn phần, cao phân đoạn ethyl acetat và cao phân đoạn alcaloid có tác dụng ức chế AChE với giá trị IC_{50} tương ứng là $98,71 \pm 1,75$, $181,69 \pm 2,84$ và $39,85 \pm 0,94$ $\mu\text{g/ml}$.

5/13 chất phân lập được có tác dụng ức chế AChE *in vitro* ở các mức độ khác nhau. Trong đó, các hợp chất 8-*O*-demethylmaritidin, 2-methoxy pancracin, narciprimin, 3β , 11α -dihydroxy-1,2-dehydrocrinan và *N*-chloromethylnarcissidin thể hiện hoạt tính với giá trị IC_{50} lần lượt là $57,77 \pm 1,24$, $106,37 \pm 6,11$, $107,31 \pm 2,45$, $161,68 \pm 7,46$, $264,86 \pm 0,23$ μM .

+ Về tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình chuột gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin: cao phân đoạn alcaloid của loài *Hippeastrum reticulatum* thể hiện tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình mê lộ chữ Y ở liều 15 mg/kg, trên mô hình nhận diện đồ vật, mô hình mê lộ nước Morris và tác dụng ức chế AChE *ex vivo* với liều 10 mg/kg và 15 mg/kg.

+ Về tác dụng chống lão suy: cao phân đoạn alcaloid liều 5 mg/kg, 10 mg/kg và 15 mg/kg có tác dụng làm giảm nồng độ MDA huyết tương;

liều 10 mg/kg và 15 mg/kg có tác dụng làm tăng nồng độ SOD và GSH-Px trên mô hình chuột gây lão suy bằng D-galactose.

e. Bố cục của luận án

Luận án có 149 trang, gồm 4 chương, 50 bảng, 63 hình, 185 tài liệu tham khảo và 13 phụ lục. Các phần chính trong luận án: Đặt vấn đề (2 trang), tổng quan (31 trang), đối tượng và phương pháp nghiên cứu (21 trang), kết quả nghiên cứu (65 trang), bàn luận (27 trang), kết luận và kiến nghị (3 trang).

2. Tổng quan tài liệu

Luận án đã tổng hợp và trình bày một cách hệ thống các kết quả nghiên cứu từ trước đến nay về thực vật, thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của chi *Hippeastrum* và loài *Hippeastrum reticulatum*.

3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

3.1. Đối tượng nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu là loài Lan huệ mạng (*Hippeastrum reticulatum* (L'Hér.) Herb.). Mẫu được thu hái tại thành phố Huế, tỉnh Thừa Thiên Huế (N16°44'30"; E107°23'48") trong tháng 8-9/2018.

3.2. Phương pháp nghiên cứu

3.2.1. Nghiên cứu thực vật

Mô tả đặc điểm hình thái, giám định tên khoa học, mô tả các đặc điểm vi học bằng kính hiển vi quang học.

3.2.2. Nghiên cứu thành phần hoá học

Định tính các nhóm chất trong dược liệu bằng phản ứng hoá học đặc trưng.

Chiết xuất bằng phương pháp ngâm ở nhiệt độ phòng, chiết phân đoạn. Phân lập các hợp chất tinh khiết bằng phương pháp sắc ký cột, kiểm soát quá trình phân lập bằng sắc ký lớp mỏng.

Xác định cấu trúc bằng phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ khối kết hợp

đôi chiếu với tài liệu tham khảo.

3.2.3. Xây dựng quy trình định lượng

- Xác định độ tinh khiết của chất đối chiếu bằng phương pháp chuẩn hoá diện tích.
- Xác định các điều kiện chiết xuất, điều kiện sắc ký.
- Thẩm định quy trình định lượng đã xây dựng theo hướng dẫn của AOAC.
- Ứng dụng quy trình định lượng để xác định hàm lượng hợp chất có trong dược liệu.

3.2.4. Nghiên cứu hoạt tính sinh học

- Xác định độc tính cấp bằng phương pháp Litchfield – Wilcoxon.
- Xác định hoạt tính ức chế acetylcholinesterase *in vitro* bằng phương pháp của Ellman.
- Đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ và nhận thức *in vivo* bằng các mô hình: mê cung chữ Y, mê lộ nước Morris và nhận diện đồ vật.
- Đánh giá tác dụng chống lão suy *in vivo* dựa vào việc định lượng các enzym liên quan đến hoạt tính chống lão suy là MDA, GSH-Px và SOD trên chuột gây lão suy bằng D-galactose.

4. Kết quả

4.1. Kết quả nghiên cứu về thực vật

4.1.1. Đặc điểm hình thái

Cây cỏ, cao 40-60 cm, thân hành dạng củ. Lá đơn, mọc đối, không có cuống, hình muống, không gợn sóng, phiến dày, dài 20-30 cm, rộng 2-5 cm. Mép lá nguyên, chóp lá nhọn, mặt dưới màu xanh nhạt, mặt trên màu xanh đậm, gân lá song song, gân giữa nổi rõ ở mặt trên lá. Cụm hoa dạng tán, cán hoa dài 40-60 cm mọc ra từ thân hành, rỗng, cán hoa có 2 mo, dài 3-6 cm và 6 lá bắc con rời nhau, trên cụm hoa có từ 4-6 hoa. Hoa lớn, hình kèn, màu hồng nhạt, lưỡng tính, đối xứng 2

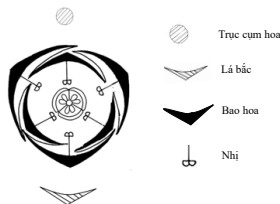
bên, cuống hoa dài 3-5 cm. Bao hoa gồm 6 phiến màu hồng nhạt, có mạng màu hồng đậm, dài 5-8 cm, rộng 3-5 cm, dính ở dưới tạo thành hình ống dài 2-4 cm, có vảy ở xung quanh. Bộ nhị gồm 6 nhị, đều, rời, không thò, chỉ nhị cong, màu trắng, dính lưng. Bộ nhụy gồm 3 lá noãn dính nhau tạo thành bầu dưới, 3 ô, mỗi ô có 2 dây noãn, dính noãn trung trụ, noãn đảo, vòi nhụy và núm nhụy màu trắng, núm nhụy chẻ thành 3 thùy.

4.1.2. Hoa thức, hoa đồ

Từ việc phân tích hoa của cây *Hippeastrum reticulatum*, đặc điểm hoa được mô tả qua hoa thức và hoa đồ như sau:

Hoa thức: $\uparrow \overline{\text{P}}_{(3+3)} \text{A}_{3+3} \overline{\text{G}}_{(3)}$

Trong đó: - P: Bao hoa - A: Bộ nhị - G: Nhụy hoa



Hình 4.1. Hoa đồ loài *Hippeastrum reticulatum*

4.1.3. Kết quả giám định tên khoa học

Đã giám định loài nghiên cứu là Lan huệ mạng, tên khoa học là *Hippeastrum reticulatum* (L'Hér.) Herb. thuộc họ Amaryllidaceae, đồng danh: *Hippeastrum reticulatum* var. *striatifolium* (Herb.).

4.1.4. Đặc điểm giải phẫu

4.1.4.1. Đặc điểm giải phẫu lá

Vì phẫu phiến lá và gân lá không có đặc điểm khác biệt. Phân gân lá có vi phẫu dạng hình cung, lõm ở mặt dưới. Quan sát dưới kính hiển vi từ ngoài vào trong, phần gân lá có các đặc điểm sau: Lớp cutin nằm ngoài cùng có ở cả mặt trên và mặt dưới lá. Biểu bì trên và dưới gồm

một hàng tế bào hình chữ nhật xếp liên tục, đều đặn mang nhiều lỗ khí. Mô mềm cấu tạo bởi những tế bào hình đa giác, thành mỏng, rải rác trong mô mềm có các tinh thể calci oxalat hình kim và có khoảng gian bào giữa các tế bào. Có nhiều bó libe-gỗ nằm giữa gân lá, vuông góc với biểu bì, bó to nhất nằm giữa gân lá, càng về phía phiến lá các bó libe-gỗ càng nhỏ hơn. Mạch gỗ gồm 3 - 5 tế bào xếp liền nhau thành một dãy. Libe có dạng chữ V, dài, nhỏ, hẹp. Bó libe-gỗ được bao quanh bởi 2 - 3 lớp mô mềm, hình tròn, xếp sát nhau.

4.1.4.2. Đặc điểm giải phẫu thân hành

Vì phẫu cắt ngang vảy hành hình vòng cung, quan sát dưới kính hiển vi từ ngoài vào trong có các đặc điểm: Biểu bì ngoài gồm những tế bào hình chữ nhật xếp đều đặn. Mô mềm là những tế bào hình tròn hoặc đa giác xếp lộn xộn. Rải rác trong mô mềm có các bó libe-gỗ gồm libe ở trên và gỗ ở dưới. Gỗ gồm 3-5 mạch nhỏ không đều, mạch nhỏ ở trên, mạch to ở dưới. Libe dạng vệt dài, tế bào hình đa giác, không đều, vách méo mó, sắp xếp lộn xộn. Trong mô mềm có nhiều hạt tinh bột. Lớp biểu bì trong gồm những tế bào hình chữ nhật, mỏng hơn biểu bì ngoài.

4.1.4.3. Đặc điểm giải phẫu rễ

Mặt cắt ngang rễ dạng hình tròn, quan sát dưới kính hiển vi từ ngoài vào trong có các đặc điểm sau: Biểu bì gồm một lớp tế bào xếp sát nhau và mang nhiều lông hút đơn bào. Ngoại bì gồm 1 - 2 lớp tế bào có hình đa giác. Mô mềm vỏ gồm nhiều lớp tế bào hình tròn hoặc hình đa giác, giữa các tế bào có các khoảng gian bào, nằm trong lớp mô mềm vỏ có tinh thể calci oxalat hình kim. Nội bì gồm 1 lớp tế bào, có đai Caspari rõ rệt. Trụ bì gồm 1 lớp tế bào, thành mỏng. Có từ 10 - 12 bó gỗ và libe nằm xen kẽ nhau. Mô mềm ruột là các tế bào hình đa giác, xếp sát nhau.

4.1.4.4. Đặc điểm bột lá

Bột lá có màu xanh, mùi thơm nhẹ. Quan sát dưới kính hiển vi có các đặc điểm sau: mảnh biểu bì và lớp cutin ở ngoài cùng, mảnh mô mềm, mảnh biểu bì gồm những tế bào hình chữ nhật và mang lỗ khí, lỗ khí, tinh thể calci oxalat hình kim, bó sợi, mảnh mạch.

4.1.4.5. Đặc điểm bột thân hành

Bột thân hành có màu trắng xám, không mùi. Quan sát dưới kính hiển vi có các đặc điểm sau: Mảnh biểu bì là những tế bào hình chữ nhật. Mảnh mô mềm là những tế bào hình tròn hoặc đa giác, có thành mỏng, thường chứa nhiều tinh bột. Tinh thể calci oxalat hình kim. Hạt tinh bột nhiều hình dạng và kích thước, hình tròn, hình thận có rốn ở giữa và tinh bột ở dạng tinh bột đơn. Mảnh mạch xoắn.

4.1.4.6. Đặc điểm bột rễ

Bột rễ có màu nâu, không mùi. Quan sát dưới kính hiển vi có các đặc điểm như sau: Mảnh biểu bì là những tế bào hình chữ nhật, bó sợi, mảnh mô mềm gồm những tế bào có hình đa giác, tinh thể calci oxalat hình kim, lông hút đơn bào và nhiều lông hút bị đứt gãy, mảnh mạch.

4.2. Kết quả nghiên cứu về thành phần hoá học

4.2.1. Kết quả định tính các nhóm chất bằng phản ứng hoá học

Qua các phản ứng định tính hoá học đặc trưng đã sơ bộ xác định trong thân hành của cây *Hippeastrum reticulatum* có flavonoid, alcaloid, chất béo, acid hữu cơ, đường khử và acid amin.

4.2.2. Quy trình chiết xuất cao toàn phần và cao phân đoạn

Phần thân hành của loài *Hippeastrum reticulatum* được rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở nhiệt độ 55°C, xay thành bột thô và tiến hành chiết xuất. Khối lượng dược liệu khô đem chiết xuất là 12,5 kg (hàm ẩm 3,81%). Dùng methanol để làm ẩm toàn bộ lượng dược liệu trong bình chiết, đậy kín và để yên trong 2 giờ để bột dược liệu thấm ẩm và trương nở

hoàn toàn. Tiến hành ngâm chiết bằng cách thêm methanol ngập và cách bề mặt dược liệu khoảng 10 cm. Quá trình chiết xuất được tiến hành ở nhiệt độ phòng với 3 đợt chiết (50 lít x 3 lần), mỗi đợt ngâm trong 72 giờ. Gộp các dịch chiết, cất thu hồi dung môi với áp suất giảm ở nhiệt độ 55°C thu được 2,1 kg cao toàn phần (ký hiệu HRM, hàm ẩm 8,7%). Hiệu suất chiết 16,8%. 10 g cao toàn phần được giữ lại để đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro*.

Phần còn lại được phân tán trong 2 lít nước cất sau đó đưa lên cột Diaion HP-20. Cho 10 lít nước đi qua cột để loại các thành phần tan trong nước, sau đó rửa giải các hợp chất bằng 2 lít methanol thu được dịch methanol. Dịch methanol thu được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao methanol. Cao methanol được acid hóa bằng acid HCl 2% đến pH 2 rồi chiết với ethyl acetat (1 lít x 3 lần). Phần ethyl acetat được cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 60 g cao phân đoạn ethyl acetat (ký hiệu HRE, hàm ẩm 7,9%). Phần dịch acid còn lại được kiềm hóa bằng NH₄OH đến pH 10 rồi chiết với CH₂Cl₂ (1 L x 3 lần). Dịch CH₂Cl₂ cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 30 g cao phân đoạn alcaloid (ký hiệu HRC, hàm ẩm 6,7%). Phần cặn còn lại được chiết tiếp bằng *n*-butanol (1 L x 3 lần) thu được 32 g cao phân đoạn *n*-butanol (ký hiệu HRB, hàm ẩm 7,5%). Phần nước còn lại cuối cùng được bốc hơi dung môi cho đến khô thu được 25 g cao phân đoạn còn lại (ký hiệu HRW, hàm ẩm 8,1%).

4.2.3. Kết quả sàng lọc tác dụng ức chế acetylcholinesterase *in vitro*

Kết quả cho thấy cao toàn phần, cao phân đoạn ethyl acetat và cao alcaloid thể hiện hoạt tính ức chế AChE với giá trị IC₅₀ lần lượt là $98,71 \pm 1,75$, $181,69 \pm 2,84$ và $39,85 \pm 0,94$ µg/ml.

4.2.4. Kết quả phân lập các hợp chất

Quá trình phân lập dựa trên sự định hướng hoạt tính ức chế AChE của các phân đoạn. Từ kết quả sàng lọc cho thấy phân đoạn alcaloid thể hiện hoạt tính ức chế AChE tốt nhất, tiếp đó là phân đoạn ethyl acetat do đó các phân đoạn này được lựa chọn để nghiên cứu thành phần hoá học. Quá trình phân lập thu được 13 hợp chất.

4.2.5. Xác định cấu trúc của các hợp chất

Dựa vào khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều, hai chiều (NMR) và đối chiếu với các tài liệu tham khảo, đã xác định được cấu trúc của 13 hợp chất.

4.2.5.1. Hợp chất 1: *trans*-dihydronarciclasin

trans-Dihydronarciclasin (**1**): Bột không màu; **HR-ESI-MS** m/z 310,0914 $[M+H]^+$; **1H -NMR** (DMSO- d_6 , 500 MHz): δ_H 2,10 (1H, m, H-1), 1,64 (1H, m, H-1), 3,73 (m, H-2), 3,88 (1H, d, $J = 3,0$ Hz, H-3), 3,73 (m, H-4), 3,33 (1H, m, H-4a), 6,04 (2H, m, H-9), 6,49 (1H, s, H-11), 2,86 (1H, dt, $J = 3,5, 12,5$ Hz, H-11b), 13,02 (1H, s, Ar-OH), 7,54 (1H, s, NH); **^{13}C -NMR** (DMSO- d_6 , 125 MHz): δ_C 28,1 (C-1), 71,6 (C-2), 69,5 (C-3), 68,4 (C-4), 55,1 (C-4a), 169,7 (C-6), 106,8 (C-6a), 145,4 (C-7), 131,8 (C-7a), 101,8 (C-9), 152,1 (C-10a), 96,5 (C-11), 138,4 (C-11a), 33,8 (C-11b).

4.2.5.2. Hợp chất 2: *N*-chloromethyl narcissidinium

N-Chloromethylnarcissidinium (**2**): Bột không màu; **HR-ESI-MS** m/z 382,1401 $[M+H]^+$; **1H -NMR** (CD₃OD, 500 MHz): δ_H 4,92 (1H, s, H-1), 3,77 (1H, t, $J = 2,5$ Hz, H-2), 4,73 (1H, s, H-3), 5,96 (1H, s, H-4), 4,62 (1H, m, H-5), 4,96 (1H, d, $J = 14,0$ Hz, H-5), 4,70 (1H, d, $J = 14,0$ Hz, H-7), 4,99 (1H, d, $J = 14,0$ Hz, H-7), 7,15 (1H, s, H-8), 7,19 (1H, s, H-11), 3,32 (H-11b), 4,59 (H-11c), 3,52 (3H, s, 2-OMe), 3,89 (3H, s, 9-OMe), 3,93 (3H, s, 10-OMe), 5,03 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, CH₂Cl),

5,12 (1H, d, $J = 10,0$ Hz, CH₂Cl); **¹³C-NMR** (CD₃OD, 125 MHz): δ_c 68,9 (C-1), 82,4 (C-2), 69,0 (C-3), 139,2 (C-3a), 120,0 (C-4), 71,4 (C-5), 62,3 (C-7), 121,8 (C-7a), 113,5 (C-8), 150,1 (C-9), 152,5 (C-10), 110,1 (C-11), 42,8 (C-11b), 77,9 (C-11c), 58,6 (2-OMe), 56,8 (9-OMe), 56,8 (10-OMe), 70,4 (CH₂Cl).

4.2.5.3. Hợp chất 3: narciprimin

Narciprimin (**3**): Bột không màu; **HR-ESI-MS** m/z 272,0545 [M+H]⁺; **¹H-NMR** (DMSO-*d*₆, 500 MHz) δ_H 7,72 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-1), 7,10 (1H, dd, $J = 8,5, 7,5$ Hz, H-2), 6,95 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-3), 6,20 (2H, s, H-9), 7,54 (1H, s, H-11), 13,7 (1H, brs, 7-OH); **¹³C-NMR** (DMSO-*d*₆, 125 MHz) δ_c 113,5 (C-1), 123,1 (C-2), 113,8 (C-3), 144,3 (C-4), 123,8 (C-4a), 164,9 (C-6), 107,1 (C-6a), 144,8 (C-7), 131,9 (C-7a), 102,3 (C-9), 153,6 (C-10a), 93,7 (C-11), 132,3 (C-11a), 119,8 (C-11b).

4.2.5.4. Hợp chất 4: Narciclasin-4-*O*- β -D-xylopyranosid

Narciclasin-4-*O*- β -D-xylopyranosid (**4**): Tinh thể hình kim không màu, **¹H-NMR** (CD₃OD, 500 MHz): δ_H 6,22 (1H, t, $J = 4,0, 6,5$ Hz, H-1), 4,30 (1H, m, H-2), 4,07 (1H, m, H-3), 4,02 (1H, m, H-4), 4,43 (1H, m, H-4), 6,79 (1H, s, H-10), 4,41 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-1'), 3,33 (1H, m, H-2'), 3,39 (1H, m, H-3'), 3,61 (1H, m, H-4'), 4,05 (1H, m, H-5'), 6,06 (2H, brs, OCH₂O); **¹³C-NMR** (CD₃OD, 125 MHz) δ_c 123,8 (C-1), 70,3 (C-2), 72,0 (C-3), 79,6 (C-4), 52,1 (C-4a), 170,5 (C-6), 107,0 (C-6a), 146,0 (C-7), 135,9 (C-8), 154,5 (C-9), 97,3 (C-10), 132,1 (C-10a), 133,3 (C-10b), 104,0 (C-1'), 74,8 (C-2'), 77,7 (C-3'), 71,1 (C-4'), 67,3 (C-5'), 103,8 (OCH₂O).

4.2.5.5. Hợp chất 5: 2-methoxy pancracin

2-methoxy pancracin (**5**): Bột không màu; **HR-ESI-MS** m/z 302,1376 [M+H]⁺; **¹H-NMR** (CD₃OD, 500 MHz): δ_H 5,60 (1H, brs, H-1), 3,48 (H-2), 4,06 (1H, brs, H-3), 2,13 (1H, m, H-4), 1,46 (1H, dt, $J = 3,0,$

12,0 Hz, H-4), 3,45 (H-4a), 4,32 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-6), 3,83 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-6), 6,54 (1H, s, H-7), 6,61 (1H, s, H-10), 3,38 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-11), 3,07 (1H, d, $J = 11,0$ Hz, H-12), 3,03 (d, $J = 2,0$, 11,0 Hz, H-12), 5,88 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, OCH₂O), 5,86 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, OCH₂O), 3,44 (3H, s, OCH₃). ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) δ_C 114,2 (C-1), 80,2 (C-2), 69,0 (C-3), 32,7 (C-4), 59,5 (C-4a), 61,4 (C-6), 125,1 (C-6a), 107,8 (C-7), 148,3 (C-8), 147,6 (C-9), 108,3 (C-10), 133,5 (C-10a), 46,7 (C-11), 154,6 (C-11a), 56,1 (C-12), 102,1 (OCH₂O), 57,7 (OCH₃).

4.2.5.6. Hợp chất 6: *N*-methyltyramin

N-Methyltyramin (6): Bột không màu; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ_H 3,21 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-1), 2,90 (2H, t, $J = 7,5$ Hz, H-2), 7,11 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-4 & H-8), 6,79 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5 & H-7), 2,72 (1H, s, N-CH₃).

4.2.5.7. Hợp chất 7: 3 β ,11 α -dihydroxy-1,2-dehydrocrinan

3 β ,11 α -Dihydroxy-1,2-dehydrocrinan (7): Bột không màu; HR-ESI-MS m/z 188,1222 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ_H 6,39 (1H, d, $J = 10,5$ Hz, H-1), 6,32 (1H, d, $J = 10,5$ Hz, H-2), 4,38 (H-3), 2,57 (1H, ddd, $J = 4,5, 13,0, 13,0$ Hz, H-4), 2,13 (1H, dd, $J = 5,0, 13,0$ Hz, H-4), 4,04 (1H, m, H-4a), 4,87 (H-6), 4,38 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-6), 6,74 (1H, s, H-7), 7,09 (1H, s, H-10), 4,19 (1H, m, H-11), 4,01 (1H, dd, $J = 7,0, 13,5$ Hz, H-12), 3,72 (1H, dd, $J = 2,0, 13,5$, H-12), 6,01 (2H, s, OCH₂O); ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ_C 124,8 (C-1), 133,9 (C-2), 63,2 (C-3), 30,9 (C-4), 66,0 (C-4a), 59,2 (C-6), 120,1 (C-6a), 108,1 (C-7), 149,1 (C-8), 149,8 (C-9), 105,0 (C-10), 133,8 (C-10a), 51,8 (C-10b), 78,5 (C-11), 62,3 (C-12), 103,1 (OCH₂O).

4.2.5.8. Hợp chất 8: brunsvigin

Brunsvigin (**8**): Bột không màu; **HR-ESI-MS** m/z 188,1233 $[M+H]^+$; **1H -NMR** (CD_3OD , 500 MHz): δ_H 5,78 (1H, brs, H-1), 3,96 (1H, dd, $J = 1,5, 1,5$ Hz, H-2), 4,04 (1H, brs, H-3), 2,39 (1H, td, $J = 4,5, 12,0$ Hz, H-4), 1,82 (1H, dt, $J = 2,5, 12,0$ Hz, H-4), 4,14 (1H, dd, $J = 3,5, 12,0$ Hz, H-4a), 4,78 (H-6), 4,47 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-6), 6,72 (1H, s, H-7), 6,82 (1H, s, H-10), 3,92 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-11), 3,69 (1H, d, $J = 10,5$ Hz, H-12), 3,57 (1H, dd, $J = 2,0, 10,5$ Hz, H-12), 5,99 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, OCH_2O), 5,97 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, OCH_2O); **^{13}C -NMR** (CD_3OD , 125 MHz): δ_C 120,2 (C-1), 69,1 (C-2), 70,7 (C-3), 28,7 (C-4), 62,9 (C-4a), 58,8 (C-6), 119,5 (C-6a), 108,0 (C-7), 148,0 (C-8), 147,0 (C-9), 108,7 (C-10), 130,3 (C-10a), 45,3 (C-11), 144,0 (C-11a), 56,2 (C-12), 103,0 (OCH_2O).

4.2.5.9. Hợp chất 9: pancracin

Pancracin (**9**): Bột không màu; **HR-ESI-MS** m/z 288,1225 $[M+H]^+$; **1H -NMR** (CD_3OD , 500 MHz): δ_H 5,56 (1H, dd, $J = 3,0, 3,5$ Hz, H-1), 3,89 (1H, m, H-2), 3,97 (1H, brs, H-3), 2,13 (1H, m, H-4), 1,61 (1H, ddd, $J = 12,5, 12,5, 3,0$ Hz, H-4), 3,55 (1H, m, H-4a), 4,36 (1H, d, $J = 16,5$ Hz, H-6), 3,89 (1H, d, $J = 16,5$ Hz, H-6), 6,63 (1H, s, H-7), 6,56 (1H, s, H-10), 3,43 (1H, s, H-11), 3,12 (1H, s, H-12), 5,89 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, OCH_2O), 5,87 (1H, d, $J = 1,0$ Hz, OCH_2O). **^{13}C -NMR** (CD_3OD , 125 MHz): δ_C 116,7 (C-1), 70,1 (C-2), 72,4 (C-3), 31,4 (C-4), 59,7 (C-4a), 61,2 (C-6), 124,6 (C-6a), 107,8 (C-7), 148,4 (C-8), 147,8 (C-9), 108,3 (C-10), 133,3 (C-10a), 46,6 (C-11), 152,8 (C-11a), 56,2 (C-12), 102,2 (OCH_2O).

4.2.5.10. Hợp chất 10: 8-*O*-demethylmaritidin

8-*O*-demethylmaritidin (**10**): Bột không màu; **HR-ESI-MS** m/z 274,1425 $[M+H]^+$; **1H -NMR** (CD_3OD , 500 MHz): δ_H 6,73 (1H, d, $J =$

10,0 Hz, H-1), 5,95 (1H, ddd, $J = 1,0, 5,5, 10,0$ Hz, H-2), 4,30 (1H, m, H-3), 1,93 (1H, m, H-4), 1,81 (1H, ddd, $J = 4,0, 13,0, 13,0$ Hz, H-4), 3,44 (1H, dd, $J = 4,0, 13,0$ Hz, H-4a), 4,37 (1H, d, $J = 16,5$ Hz, H-6), 3,82 (1H, $J = 16,5$ Hz, H-6), 6,53 (1H, s, H-7), 6,96 (1H, s, H-10), 2,00 (1H, m, H-11), 2,19 (1H, m, H-11), 3,36 (1H, m, H-12), 2,95 (1H, m, H-12), 3,86 (3H, s, OCH₃). ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ_C 132,5 (C-1), 128,4 (C-2), 64,5 (C-3), 33,5 (C-4), 64,2 (C-4a), 62,4 (C-6), 125,7 (C-6a), 114,7 (C-7), 146,2 (C-8), 147,7 (C-9), 107,5 (C-10), 137,4 (C-10a), 45,4 (C-10b), 44,9 (C-11), 53,9 (C-12), 56,7 (OCH₃).

4.2.5.11. Hợp chất 11: Cycasinden

Cycasinden (**11**): Bột không màu; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ_H 3,59 (1H, dd, $J = 5,0, 10,0$ Hz, H-2), 2,81 (1H, dd, $J = 10,0, 16,0$ Hz, H-3), 3,13 (1H, dd, $J = 5,0, 16,0$ Hz, H-3), 4,22 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-1'), 4,16 (1H, d, $J = 15,5$ Hz, H-1'), 7,44 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-4'), 7,07 (1H, t, $J = 7,07$ Hz, H-5'), 6,99 (1H, t, $J = 7,5$ Hz, H-6'), 7,32 (1H, d, $J = 7,5$ Hz, H-7'). ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ_C 169,4 (C-1), 56,6 (C-2), 22,9 (C-3), 40,5 (C-1'), 106,7 (C-2'), 127,9 (C-3'), 117,7 (C-4'), 121,2 (C-5'), 118,7 (C-6'), 111,1 (C-7'), 126,2 (C-8'), 136,2 (C-9').

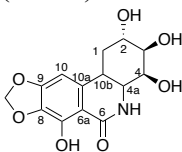
4.2.5.12. Hợp chất 12: 2,3-*cis*-guibourtinidol

2,3-*cis*-guibourtinidol (**12**): Bột màu nâu; HR-ESI-MS m/z 259,0965 [M+H]⁺; ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ_H 4,96 (1H, brs, H-2), 4,20 (1H, m, H-3), 3,16 (1H, dd, $J = 4,5, 16,5$ Hz, H-4) 2,75 (1H, dd, $J = 3,0, 16,5$ Hz, H-4), 6,90 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-5), 6,38 (1H, dd, $J = 2,5, 8,0$ Hz, H-6), 6,36 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, H-8), 7,33 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-2'/H-6'), 6,81 (2H, $J = 8,5$ Hz, H-3'/H-5'). ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz): δ_C 80,1 (C-2), 67,4 (C-3), 34,1 (C-4), 131,7 (C-5), 109,6 (C-6),

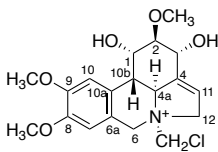
157,7 (C-7), 104,2 (C-8), 156,7 (C-9), 111,8 (C-10), 131,5 (C-1'),
128,6 (C-2'/C-6'), 115,8 (C-3'/C-5'), 157,9 (C-4').

4.2.5.13. Hợp chất 13: 8-methylkaempferol

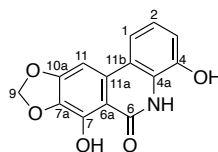
8-methylkaempferol (**13**): Bột màu vàng; $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD , 500 MHz): δ_{H} 6,27 (1H, s, H-6), 8,16 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-2'/H-6'), 6,95 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-3'/H-5'), 2,29 (3H, s, 8- CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD_3OD , 125 MHz): δ_{C} 149,7 (C-2), 144,5 (C-3), 188,4 (C-4), 160,5 (C-5), 98,7 (C-6), 162,0 (C-7), 103,3 (C-8), 155,7 (C-9), 104,6 (C-10), 126,1 (C-1'), 130,6 (C-2'/C-6'), 116,4 (C-3'/C-5'), 159,9 (C-4'), 7,6 (8- CH_3).



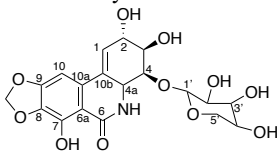
1. *trans*-dihydronarciclasin



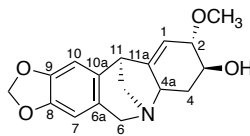
2. *N*-chloromethylnarcissidin



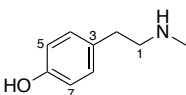
3. Narciprimin



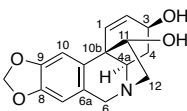
4. Narciclasin-4-*O*- β -D-xylopyranosid



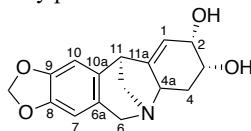
5. 2-methoxy pancracin



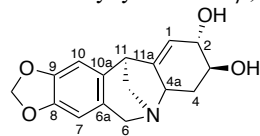
6. *N*-methyltyramin



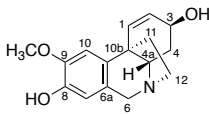
7. 3 β ,11 α -dihydroxy-1,2-dehydrocrinan



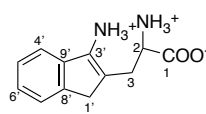
8. Brunsvigin



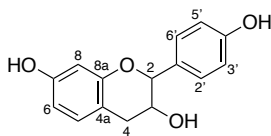
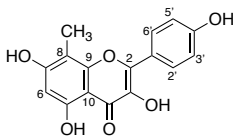
9. Pancracin



10. 8-*O*-demethylmaritidin



11. Cycasinden

12. 2,3-*cis*-guibourtinidol

13. 8-methylkaempferol

Hình 4.2. Cấu trúc hoá học của các hợp chất phân lập được từ loài *Hippeastrum reticulatum*

4.3. Xây dựng quy trình định lượng 2-methoxy pancracin trong thân hành cây *Hippeastrum reticulatum* bằng HPLC

4.3.1. Khảo sát độ tinh khiết của 2-methoxy pancracin phân lập được

Độ tinh khiết của mẫu đối chiếu 2-methoxy pancracin được xác định là $99,96 \pm 0,07\%$.

4.3.2. Xây dựng quy trình định lượng

- Quy trình chuẩn bị mẫu: Cân 2 g bột dược liệu cho vào bình nón có nút mài 100 ml. Chiết với 100 ml methanol 70% bằng phương pháp chiết siêu âm trong thời gian 30 phút ở nhiệt độ 60 °C. Chiết 2 lần, gộp 2 dịch chiết, lọc qua bông và bốc hơi dung môi cho đến cạn. Hoà tan cặn hoàn toàn bằng 30 ml methanol, cho vào bình định mức 50 ml. Thêm dung môi cho đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm trước khi phân tích.

- Quy trình định lượng 2-methoxypancracin trong cao chiết thân hành *Hippeastrum reticulatum* bằng HPLC được thực hiện trên các điều kiện sau:

+ Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao Agilent 1260 Infinity II (St. Clara, USA) được trang bị bơm trộn 4 kênh G771B, bộ phận tiêm mẫu tự động G7129A và detector DAD G7115A.

+ Cột sắc ký: InertSustain C18 (4,6 x 250 mm, cỡ hạt 5 µm) với cột bảo vệ InertSustain C18 (cỡ hạt 5 µm).

+ Pha động: acetonitril : methylamin 0,01% (35:65, v/v).

- + Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút.
- + Bước sóng phát hiện: 207 nm.
- + Thể tích tiêm: 5 μ l.

4.3.2.1. Thẩm định quy trình định lượng

Quy trình định lượng đã được thẩm định và đạt yêu cầu theo hướng dẫn của AOAC bao gồm các chỉ tiêu: tính tương thích hệ thống, tính đặc hiệu, độ lặp lại, độ đúng, độ tuyến tính với $R^2=0,9997$ trong khoảng tuyến tính 0,25-100 μ g/ml, xác định được LOD (0,08 μ g/ml) và LOQ (0,31 μ g/ml).

4.3.2.2. Ứng dụng quy trình định lượng 2-methoxy pancracin trong các mẫu thân hành cây *Hippeastrum reticulatum*

Hàm lượng của 2-methoxy pancracin trong bột thân hành và cao toàn phần của *Hippeastrum reticulatum* tương ứng là $0,0823 \pm 0,0003\%$ và $0,1619 \pm 0,0016\%$.

4.4. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp

Xác định được liều LD₅₀ của cao phân đoạn alcaloid của *Hippeastrum reticulatum* đường uống trên chuột nhắt trắng là 90,2 mg/kg (khoảng tin cậy 95% của LD₅₀ là 76,12 mg/kg – 106,89 mg/kg), tương đương 7,9 g dược liệu khô/kg thể trọng chuột.

4.5. Kết quả nghiên cứu về tác dụng sinh học

4.5.1. Tác dụng ức chế AChE *in vitro*

5/13 chất phân lập được có tác dụng ức chế AChE *in vitro* ở các mức độ khác nhau. Trong đó, các hợp chất 8-*O*-demethylmaritidin (**10**), 2-methoxy pancracin (**5**), narciprimin (**3**), 3 β , 11 α -dihydroxy-1,2-dehydrocrinan (**7**) và *N*-chloromethylnarcissidin (**2**) thể hiện hoạt tính với giá trị IC₅₀ lần lượt là $57,77 \pm 1,24$, $106,37 \pm 6,11$, $107,31 \pm 2,45$, $161,68 \pm 7,46$, $264,86 \pm 0,23$ μ M.

4.5.2. Tác dụng cải thiện trí nhớ và nhận thức

4.5.2.1. Kết quả thử nghiệm mê lộ chữ Y

Bảng 4.1. Kết quả đánh giá tác dụng của cao phân đoạn alcaloid của loài *Hippeastrum reticulatum* trên thử nghiệm mê lộ chữ Y

Nhóm nghiên cứu	Số lần đi vào các cánh ($\bar{X} \pm SD$)	Phần trăm vận động luân phiên ($\bar{X} \pm SD$)
Chứng sinh lý	27,30 $\pm$ 7,48	81,84 $\pm$ 12,41
Chứng bệnh lý	31,10 $\pm$ 23,80	63,58 $\pm$ 12,59 ^{##}
HRC5	35,40 $\pm$ 16,41	63,87 $\pm$ 24,98
HRC10	28,80 $\pm$ 13,30	69,66 $\pm$ 13,41
HRC15	27,40 $\pm$ 15,06	84,01 $\pm$ 11,46 ^{**}
Chứng dương	22,60 $\pm$ 11,73	80,32 $\pm$ 9,87 [*]

^{##} $p < 0,01$ so với nhóm chứng sinh lý; $^*p < 0,05$; $^{**}p < 0,01$ so với nhóm chứng bệnh lý

Nhóm sử dụng cao phân đoạn alcaloid của loài *Hippeastrum reticulatum* liều 15 mg/kg có tỷ lệ phần trăm vận động luân phiên tăng là 20,43% so với nhóm chứng bệnh lý ($p < 0,01$).

4.5.2.2. Kết quả thử nghiệm nhận diện đồ vật

Bảng 4.2. Tỷ lệ thời gian khám phá các đồ vật ở pha kiểm tra

Nhóm	Tỷ lệ % thời gian khám phá (%)	
	Vật cũ	Vật mới
Chứng sinh lý	41,43 $\pm$ 10,85	58,57 $\pm$ 10,85 [*]
Chứng bệnh lý	54,87 $\pm$ 24,15	45,13 $\pm$ 24,15
HRC5	51,23 $\pm$ 22,71	48,76 $\pm$ 22,71
HRC10	49,77 $\pm$ 7,27	50,23 $\pm$ 7,27
HRC15	37,18 $\pm$ 14,24	62,81 $\pm$ 14,24 ^{**}
Chứng dương	29,76 $\pm$ 24,91	70,24 $\pm$ 24,91 ^{***}

$^*p < 0,05$, $^{**}p < 0,01$; $^{***}p < 0,001$ giữa tỷ lệ thời gian khám phá đồ vật cũ so với đồ vật mới.

Ở nhóm sử dụng cao phân đoạn alcaloid của *Hippeastrum reticulatum* liều 15 mg/kg, thời gian khám phá đồ vật mới tăng 25,63% so với đồ vật cũ ($p < 0,01$).

4.5.2.3. Kết quả thử nghiệm mê lộ nước Morris

Bảng 4.3. Thời gian tiềm tụt từ ngày 1 đến ngày 6.

Nhóm	Thời gian (giây)					
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6
Chứng sinh lý	34,45 ± 8,30	33,16 ± 10,98	34,76 ± 14,69	22,62 ± 11,47	23,89 ± 11,31	17,05 ± 9,79*
Chứng bệnh lý	34,99 ± 12,33	28,77 ± 11,93	35,55 ± 11,73	27,80 ± 10,37	28,22 ± 10,51	26,05 ± 7,95
HRC5	34,10 ± 9,55	25,56 ± 8,67	27,10 ± 8,99	23,33 ± 13,18	29,15 ± 14,52	24,32 ± 5,99
HRC10	38,89 ± 12,35	28,86 ± 15,31	33,26 ± 10,22	29,84 ± 16,35	25,66 ± 13,01	20,60 ± 10,36**
HRC15	35,39 ± 7,33	31,01 ± 8,59	21,63 ± 11,35	22,72 ± 15,42	21,52 ± 11,23	19,49 ± 10,53*
Chứng dương	36,49 ± 8,26	32,06 ± 17,43	30,52 ± 14,32	26,25 ± 9,11	21,59 ± 9,14	20,16 ± 5,12*

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ so với ngày 1 trong cùng một nhóm nghiên cứu.

Bảng 4.4. Quảng đường chuột bơi đến bến đỗ từ ngày 1 đến ngày 6.

Nhóm	Quảng đường bơi (cm)					
	Ngày 1	Ngày 2	Ngày 3	Ngày 4	Ngày 5	Ngày 6
Chứng sinh lý	17,30 ± 5,68	18,14 ± 6,29	12,92 ± 5,87	12,08 ± 5,16	11,90 ± 7,49	9,26 ± 4,32*
Chứng bệnh lý	22,63 ± 8,80	23,75 ± 9,40	24,46 ± 7,64	25,58 ± 7,89	21,01 ± 11,66	21,43 ± 10,24
HRC5	22,13 ± 5,46	20,01 ± 7,61	21,63 ± 6,20	16,97 ± 6,38	15,37 ± 8,23	18,10 ± 7,65
HRC10	21,58 ± 8,37	23,99 ± 7,07	23,76 ± 7,68	21,10 ± 8,06	16,89 ± 6,41	10,84 ± 6,89**
HRC15	21,49 ± 6,15	27,02 ± 5,85	23,56 ± 8,15	17,13 ± 8,54	16,94 ± 8,25	12,16 ± 4,61**
Chứng dương	20,43 ± 8,69	22,44 ± 6,92	17,18 ± 5,02	14,70 ± 6,53	14,98 ± 6,16	11,22 ± 2,59*

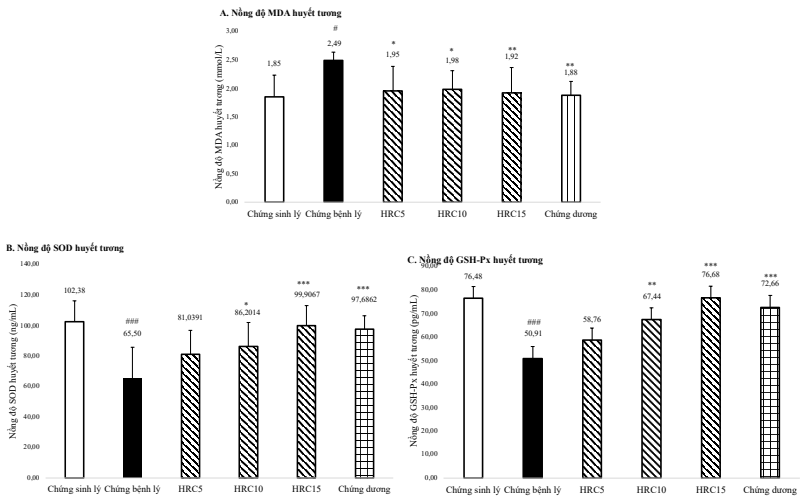
* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ so với ngày 1 trong cùng một nhóm nghiên cứu.

Nhóm sử dụng cao phân đoạn alcaloid liều 10 và 15 mg/kg có thời gian tiềm ở ngày thứ 6 giảm so với ngày thứ 1 lần lượt là 47,0 và 44,9% ($p < 0,01$ và $p < 0,05$) và quãng đường bơi đến bến đỗ ngày thứ 6 giảm so với ngày thứ 1 lần lượt là 49,76 và 43,4% ($p < 0,01$ và $p < 0,01$). Sử dụng cao phân đoạn alcaloid, thời gian chuột bơi trong góc phần tư đặt bến đỗ trước đó ở ngày thứ 7 tăng dần và sự tăng có ý nghĩa thống kê ở nhóm sử dụng cao phân đoạn alcaloid với liều 15 mg/kg, cụ thể là tăng 67,28% so với nhóm chứng bệnh lý ($p < 0,05$).

4.5.2.4. Tác dụng ức chế hoạt động AChE *ex vivo*

Ở các nhóm chuột sử dụng cao phân đoạn alcaloid của *Hippeastrum reticulatum* liều 10 và 15 mg/kg, hoạt độ AChE trong mô não chuột giảm lần lượt là 51,8 và 60,3% so với nhóm chứng bệnh lý ($p<0,001$ và $p<0,001$).

4.5.3. Tác dụng chống lão suy



Hình 4.2. Nồng độ (A) MDA, (B) SOD), (C) GSH-Px huyết tương.
[#] $p<0,01$; ^{###} $p<0,001$ so với nhóm chứng sinh lý; ^{*} $p<0,05$; ^{**} $p<0,01$; ^{***} $p<0,001$ so với nhóm chứng bệnh lý.

Ở các nhóm sử dụng cao phân đoạn alcaloid liều 5, 10 và 15 mg/kg, nồng độ MDA huyết tương giảm 21,6, 20,4 và 23,2% so với nhóm chứng bệnh lý ($p<0,05$, $p<0,05$ và $p<0,01$).

Khi sử dụng cao phân đoạn alcaloid liều 10 và 15 mg/kg, nồng độ SOD huyết tương tăng lần lượt 31,6 và 52,5% ($p<0,05$ và $p<0,001$) và nồng độ GSH-Px tăng 50,6 và 42,7% ($p<0,01$ và $p<0,001$) so với nhóm chứng bệnh lý.

5. Bàn luận

Đã có một số ý kiến bàn luận về giá trị khoa học và ý nghĩa về kết quả của Luận án.

6. Kết luận và kiến nghị

6.1. Kết luận

6.1.1. Về đặc điểm thực vật loài *Hippeastrum reticulatum* (L'Hér.) Herb.

- Đã mô tả chi tiết kèm theo ảnh chụp đặc điểm thực vật của loài nghiên cứu và giám định tên khoa học là *Hippeastrum reticulatum* (L'Hér.) Herb., họ Amaryllidaceae.

- Đã mô tả đặc điểm vi phẫu và đặc điểm bột của lá, thân và rễ của loài *Hippeastrum reticulatum*, góp phần tiêu chuẩn hoá dược liệu.

6.1.2. Về thành phần hoá học của loài *Hippeastrum reticulatum* (L'Hér.) Herb.

- Đã xác định các nhóm hợp chất có trong loài *Hippeastrum reticulatum* gồm: flavonoid, alkaloid, chất béo, đường khử và acid amin.

- Từ thân hành của *Hippeastrum reticulatum* đã phân lập và xác định cấu trúc hoá học của **13 hợp chất** bao gồm: **10 alkaloid** (*trans*-dihydronarciclasin, *N*-chloromethyl narcissidinium, narciprimin, narciclasin-4-*O*- β -D-xylopyranosid, 2-methoxy pancracin, *N*-methyltyramin, 3 β ,11 α -dihydroxy-1,2-dehydrocrinan, brunsvigin, pancracin, 8-*O*-demethylmaritidin; **1 acid amin** (cycasinden) và **2 flavonoid** (2,3-*cis*-guibourtinidol, 8-methylkaempferol).

- Trong đó, 11 hợp chất bao gồm *trans*-dihydronarciclasin (**1**), *N*-chloromethylnarcissidin (**2**), narciprimin (**3**), narciclasin-4-*O*- β -D-xylopyranosid (**4**), 2-methoxy pancracin (**5**), *N*-methyltyramin (**6**), 3 β ,11 α -dihydroxy-1,2-dehydrocrinan (**7**), brunsvigin (**8**), cycasinden (**11**), 2,3-*cis*-guibourtinidol (**12**), 8-methylkaempferol (**13**) lần đầu tiên phân lập từ chi *Hippeastrum*.

- 12 hợp chất *trans*-dihydronarciclasin (1), *N*-chloromethylnarcissidin (2), narciprimin (3), narciclasin-4-*O*- β -D-xylopyranosid (4), 2-methoxy pancracin (5), *N*-methyltyramin (6), 3 β ,11 α -dihydroxy-1,2-dehydrocrinan (7), brunsvigin (8), pancracin (9), cycasinden (11), 2,3-*cis*-guibourtinidol (12), 8-methylkaempferol (13) lần đầu tiên phân lập từ loài *Hippeastrum reticulatum*.

6.1.3. Về xây dựng quy trình định lượng 2-methoxy pancracin bằng HPLC

- Đã khảo sát các yếu tố liên quan đến quy trình chiết xuất và đã xác định được một số điều kiện chiết xuất là: chiết siêu âm, dung môi chiết là methanol 70%, tỷ lệ dược liệu/dung môi 100 ml/2 g dược liệu, thời gian chiết 30 phút, nhiệt độ chiết 60°C, số lần chiết 2 lần.

- Lần đầu tiên phương pháp định lượng 2-methoxy pancracin trong thân hành của loài *Hippeastrum reticulatum* bằng HPLC đã được xây dựng và đánh giá đạt các tiêu chuẩn về độ tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, độ lặp lại, độ đúng, độ tuyến tính với $R^2=0,9997$ trong khoảng tuyến tính 0,25-100 $\mu\text{g/ml}$, LOD 0,08 $\mu\text{g/ml}$ và LOQ 0,31 $\mu\text{g/ml}$.

- Hàm lượng 2-methoxy pancracin trong thân hành và cao toàn phần của loài *Hippeastrum reticulatum* thu hái ở Việt Nam tương ứng là $0,0823 \pm 0,0003\%$ và $0,1619 \pm 0,0016\%$.

6.1.4. Về độc tính cấp và tác dụng sinh học loài *Hippeastrum reticulatum* (L'Hér.) Herb.

- Đã xác định được liều LD_{50} của cao phân đoạn alkaloid của loài *Hippeastrum reticulatum* bằng đường uống trên chuột nhắt trắng là 90,2 mg/kg (khoảng tin cậy 95% của LD_{50} là 76,12 mg/kg – 106,89 mg/kg), tương đương 7,9 g dược liệu khô/ kg thể trọng chuột.

- Về tác dụng ức chế AChE *in vitro*

+ Cao toàn phần methanol, cao phân đoạn ethyl acetat và cao phân đoạn alcaloid có tác dụng ức chế AChE với giá trị IC_{50} tương ứng là $98,71 \pm 1,75$, $181,69 \pm 2,84$ và $39,85 \pm 0,94$ $\mu\text{g/ml}$.

+ 5/13 chất phân lập được có tác dụng ức chế AChE *in vitro* ở các mức độ khác nhau. Trong đó, các hợp chất 8-*O*-demethylmaritidin (**10**), 2-methoxy pancracin (**5**), narciprimin (**3**), 3β , 11α -dihydroxy-1,2-dehydrocrinan (**7**) và *N*-chloromethylnarcissidin (**2**) thể hiện hoạt tính với giá trị IC_{50} lần lượt là $57,77 \pm 1,24$, $106,37 \pm 6,11$, $107,31 \pm 2,45$, $161,68 \pm 7,46$, $264,86 \pm 0,23$ μM .

- Về tác dụng cải thiện trí nhớ trên mô hình chuột gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin: cao phân đoạn alcaloid của loài *Hippeastrum reticulatum* thể hiện tác dụng cải thiện trí nhớ không gian ngắn hạn trên mô hình mê lộ chữ Y ở liều 15 mg/kg, cải thiện trí nhớ nhận thức trên mô hình nhận diện đồ vật, cải thiện trí nhớ không gian dài hạn trên mô hình mê lộ nước Morris và tác dụng ức chế AChE *ex vivo* với liều 10 mg/kg và 15 mg/kg.

- Về tác dụng chống lão suy: cao phân đoạn alcaloid liều 5 mg/kg, 10 mg/kg và 15 mg/kg có tác dụng làm giảm nồng độ MDA huyết tương; liều 10 mg/kg và 15 mg/kg có tác dụng làm tăng nồng độ SOD và GSH-Px trên mô hình gây lão suy bằng D-galactose ở chuột thí nghiệm.

6.2. Kiến nghị

Kết quả nghiên cứu nêu trong luận án là cơ sở khoa học để thực hiện các hướng nghiên cứu tiếp theo cũng như áp dụng các kết quả nghiên cứu này trong thực tiễn đối với dược liệu *Hippeastrum reticulatum*

- Tối ưu hoá quy trình chiết xuất cao phân đoạn alcaloid.

- Tiêu chuẩn hoá cao phân đoạn alcaloid.

- Tiếp tục nghiên cứu các tác dụng sinh học của cây *Hippeastrum reticulatum* trên các đích tác dụng khác trong điều trị bệnh Alzheimer như: bảo vệ tế bào thần kinh khỏi tổn thương bởi protein β -amyloid, tác dụng chống viêm.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Hoàng Xuân Huyền Trang**, Hồ Việt Đức, Đỗ Thị Bích Ngọc, Nguyễn Thị Hoài. Phân lập, xác định cấu trúc và đánh giá hoạt tính ức chế AChE của các hợp chất từ loài *Hippeastrum reticulatum* (L'Hér.) Herb. *Tạp chí Dược học*. 2019; 518; 74-78.
2. **Hoàng Xuân Huyền Trang**, Võ Quốc Hùng, Đoàn Quốc Tuấn, Lê Tuấn Anh, Nguyễn Thị Hoài. Nghiên cứu đặc điểm thực vật của cây Lan huệ mạng (*Hippeastrum reticulatum* (L'Hér.) Herb. *Tạp chí Dược học*. 2020; 527; 54-58.
3. **Trang Huyền Xuân Hoàng**, Duc Viet Ho, Hoai Thi Nguyen. Alkaloids isolated from *Hippeastrum reticulatum* (L'Hér.) Herb. and their AChE inhibitory activities. *Journal of Medicine and Pharmacy*. 2020; 10(7), 7-11.
4. **Trang Huyền Xuân Hoàng**, Duc Viet Ho, Kiem Van Phan, Quan Van Le, Ain Raal and Hoai Thi Nguyen. Effects of *Hippeastrum reticulatum* on memory, spatial learning and object recognition in a scopolamine-induced animal model of Alzheimer's disease. *Pharmaceutical Biology*. 2020; 58:1, 1098-1104, DOI: 10.1080/13880209.2020.1841810.
5. **Trang Huyền Xuân Hoàng**, Tien Huu Nguyen, Phung Thanh Huong, Ain Raal and Hoai Thi Nguyen. Quantitative determination of 2-methoxypancracine in *Hippeastrum reticulatum* bulbs by HPLC-DAD. *Pharmaceutical Chemistry Journal*. 2022; 56(4), 487-492, DOI: 10.1007/s11094-022-02666-3.
6. **Trang Huyền Xuân Hoàng**, Quan Van Le, Hoai Thi Nguyen, Phung Thanh Huong. *In vivo* anti-acetylcholinesterase, antioxidant activities and acute toxicity of the alkaloid fraction from *Hippeastrum reticulatum*. *The Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*; 2024, 48(3), Article 3, DOI: 10.56808/3027-7922.2969.