

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



ĐOÀN THỊ HƯỜNG

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC
VÀ MỘT SỐ TÁC DỤNG THEO HƯỚNG
ĐIỀU TRỊ BỆNH ALZHEIMER CỦA
LOÀI THẠCH TÙNG ĐUÔI NGỰA
(*HUPERZIA PHLEGMARIA* (L.) ROTHM.)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

HÀ NỘI – 2021

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

VIỆN DƯỢC LIỆU



ĐOÀN THỊ HƯỜNG

**NGHIÊN CỨU THÀNH PHẦN HÓA HỌC
VÀ MỘT SỐ TÁC DỤNG THEO HƯỚNG
ĐIỀU TRỊ BỆNH ALZHEIMER CỦA
LOÀI THẠCH TÙNG ĐUÔI NGỰA
(*HUPERZIA PHLEGMARIA* (L.) ROTHM.)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

CHUYÊN NGÀNH: DƯỢC LIỆU - DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN
MÃ SỐ: 9720206

Người hướng dẫn khoa học:

- 1. GS. TS. Nguyễn Thị Hoài**
- 2. GS. TS. Phạm Thanh Kỳ**

HÀ NỘI – 2021

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi dưới sự hướng dẫn khoa học của GS. TS Nguyễn Thị Hoài và GS. TS Phạm Thanh Kỳ.

Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác.

Tác giả

Đoàn Thị Hương

LỜI CẢM ƠN

Trong quá trình nghiên cứu và hoàn thành luận án, tôi đã nhận được sự giúp đỡ vô cùng quý báu của các thầy cô giáo, các nhà khoa học thuộc nhiều lĩnh vực cùng đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới **GS. TS. Phạm Thanh Kỳ** và **GS. TS. Nguyễn Thị Hoài**, những người Thầy, Cô đã trực tiếp hướng dẫn, hết lòng chỉ bảo tận tình và động viên tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu khoa học.

Trong quá trình thực hiện luận án, tôi đã luôn nhận được sự giúp đỡ của các cơ quan, đơn vị và cá nhân. Tôi xin chân thành cảm ơn Ban lãnh đạo, các Khoa, Phòng và các đồng nghiệp tại Viện Dược liệu; Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế; Trường Đại học Dược Hà Nội; Khoa Sinh lý, Sinh lý bệnh - Học viện Quân Y, Viện Hóa học, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ, tạo điều kiện để giúp tôi trong suốt quá trình thực hiện nghiên cứu.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành tới PGS. TS. Lê Văn Quân - Học viện Quân y, PGS. TS. Phạm Thị Nguyệt Hằng - Viện Dược liệu, TS. Hồ Việt Đức - Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế, TS. Nguyễn Thị Hà - Viện Dược liệu đã có những đóng góp quý báu giúp tôi trong quá trình nghiên cứu thực nghiệm và hoàn thiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn lãnh đạo Cục, lãnh đạo Phòng và các đồng nghiệp tại Cục Y tế - Bộ Công an, nơi tôi công tác, đã động viên tinh thần và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận án này.

Cuối cùng xin cảm ơn sâu sắc tới những người thân yêu trong gia đình; cảm ơn những bạn bè thân thiết đã dành cho tôi những tình cảm, sự động viên, giúp đỡ trong suốt thời gian qua.

Xin trân trọng cảm ơn tất cả những giúp đỡ quý báu này!

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	iii
LỜI CẢM ƠN	iv
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC BẢNG	ix
DANH MỤC HÌNH	xii
ĐẶT VẤN ĐỀ.....	1
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	3
1.1. VỊ TRÍ PHÂN LOẠI, ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT VÀ PHÂN BỐ CỦA CHI <i>HUPERZIA</i> BERNH.....	3
1.1.1. Vị trí phân loại	3
1.1.2. Đặc điểm thực vật.....	3
1.1.3. Sinh thái và phân bố.....	6
1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CHI <i>HUPERZIA</i> BERNH.	9
1.2.1. Nhóm hợp chất alcaloid	9
1.2.2. Nhóm hợp chất terpenoid	18
1.2.3. Các nhóm hợp chất khác	21
1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CHI <i>HUPERZIA</i> BERNH.	21
1.3.1. Tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase.....	22
1.3.2. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh	23
1.3.3. Tác dụng chống oxi hóa	24
1.3.4. Tác dụng chống viêm.....	25
1.3.5. Tác dụng gây độc tế bào.....	27
1.3.6. Tác dụng ức chế monoamin oxidase (MAO).....	28
1.3.7. Tác dụng kháng khuẩn	28
1.3.8. Tác dụng trên bệnh tâm thần phân liệt.....	28
1.3.9. Tác dụng trên chứng nhược cơ	29
1.3.10. Tác dụng chống co giật.....	29
1.4. ĐỘC TÍNH CỦA CÁC LOÀI THUỘC CHI <i>HUPERZIA</i> BERNH.....	30

1.5. CÔNG DỤNG TRONG Y HỌC CỔ TRUYỀN CỦA CÁC LOÀI THUỘC CHI <i>HUPERZIA</i> BERNH.	30
1.6. TỔNG QUAN CÁC NGHIÊN CỨU VỀ CÂY THẠCH TÙNG ĐUÔI NGỰA (<i>HUPERZIA PHLEGMARIA</i> (L.) ROTHM.)	33
1.6.1. Các nghiên cứu về thành phần hóa học.....	33
1.6.2. Công dụng, độc tính và tác dụng sinh học	35
1.7. TỔNG QUAN MỘT SỐ THUỐC ĐIỀU TRỊ BỆNH ALZHEIMER	36
1.7.1. Các thuốc ức chế AChE	36
1.7.2. Thuốc đối kháng thụ thể NMDA.....	37
CHƯƠNG 2: NGUYÊN VẬT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	38
2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	38
2.1.1. Nguyên liệu.....	38
2.1.2. Hóa chất.....	38
2.1.3. Động vật thực nghiệm	39
2.1.4. Trang thiết bị, dụng cụ.....	39
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	40
2.2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu.....	40
2.2.2. Phương pháp nghiên cứu thực vật.....	41
2.2.3. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học.....	42
2.2.4. Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng sinh học.....	43
2.3. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH, XỬ LÝ SỐ LIỆU	52
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU	54
3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THỰC VẬT	54
3.1.1. Đặc điểm hình thái cây Thạch tùng đuôi ngựa.....	54
3.1.2. Kết quả giám định tên khoa học	55
3.1.3. Cấu tạo giải phẫu.....	56
3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC	58
3.2.1. Kết quả định tính các nhóm hợp chất bằng phản ứng hóa học	58
3.2.2. Kết quả sàng lọc tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase <i>in vitro</i>	59

3.2.3. Chiết xuất và phân lập các hợp chất.....	60
3.2.4. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được	68
3.3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC.	100
3.3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp.....	100
3.3.2. Kết quả nghiên cứu về tác dụng sinh học.....	101
CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN.....	112
4.1. VỀ ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT LOÀI <i>HUPERZIA PHLEGMARIA</i> (L.)	
ROTHM.....	112
4.2. VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC LOÀI <i>HUPERZIA PHLEGMARIA</i> (L.)	
ROTHM.....	115
4.2.1. Về kết quả định tính	116
4.2.2. Về kết quả phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất	116
4.3. VỀ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC LOÀI <i>HUPERZIA</i>	
<i>PHLEGMARIA</i> (L.) ROTHM.	124
4.3.1. Về độc tính cấp.....	124
4.3.2. Về tác dụng sinh học.....	125
4.4. VỀ MỐI LIÊN QUAN GIỮA THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG	
SINH HỌC	135
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	138
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ	
TÀI LIỆU THAM KHẢO	
DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC CỦA LUẬN ÁN	

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

^{13}C -NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
^1H -NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
AChE	Acetylcholinesterase enzyme	Enzym acetylcholinesterase
ACN	Acetonitrile	
ACTI	Acetylthiocholine iodide	
ALT	alanine aminotransferase	
AST	Alanin Amino Transferase	
ATP	Adenosine-5'-triphosphate	
CAT	Catalase	
CC	Column Chromatography	Sắc ký cột
CD	Circular Dichroism Spectroscopy	Phổ nhị sắc tròn
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác hai chiều ^1H - ^1H
COX-2	Cyclooxygenase -2	
CTPT		Công thức phân tử
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	Phổ DEPT
DMSO	Dimethyl sulfoxide	
DPPH	2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl	
DTNB	5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid	
ED ₅₀	Effective Dose 50 %	Liều có hiệu quả 50%
EDTA	Ethylene Diamine Tetracetic Acid	
EtOAc	Ethyl acetate	
GSH-Px	Glutathion peroxidase	
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HPLC-DAD	High Performance Liquid Chromatography-Diod array detector	Hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao sử dụng đầu dò DAD
HR-ESI-MS	High-Resolution Electron Spray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối phân giải cao ion hóa phun mù điện tử
HRP	Horseradish peroxidase	
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50%	Nồng độ ức chế 50%
IR	Infrared Spectroscopy	Phổ hồng ngoại
LD ₅₀	Lethal dose 50%	Liều gây chết 50%
MAO	Monoamin oxidase	

MDA	Malondialdehyde	
MeOH	Methanol	
NF- κ B	Nuclear factor kappa B	Yếu tố nhân kappa B
NMDAR	N-methyl-D-Aspartate Receptor	Thụ thể N-methyl-D-Aspartat
NMR	Nuclear Magnetic Resonance spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân
NO	Nitric oxide	
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ NOESY
OD	Optical Density	Mật độ quang
SOD	Superoxide dismutase	
SRB	Sulforhodamine B	
T1, T2, T3		Mẫu thử với liều 50, 100, 150 mg/kg
TCA	Trichloroacetic Acide	
TLC	Thin layer chromatography	Sắc ký lớp mỏng
TLTK		Tài liệu tham khảo
TT		Thuốc thử
UV	Ultraviolet Spectroscopy	Phổ tử ngoại

DANH MỤC CÁC BẢNG

Số bảng	Tên bảng	Trang
Bảng 1.1	Đặc điểm sinh thái và vùng phân bố các loài thuộc chi <i>Huperzia</i> Bernh. ở Việt Nam	7
Bảng 1.2	Các alkaloid lớp lycopodin phân lập từ chi <i>Huperzia</i> Bernh.	11
Bảng 1.3	Các alkaloid lớp lycodin phân lập từ chi <i>Huperzia</i> Bernh.	14
Bảng 1.4	Các alkaloid lớp fawcettimin phân lập từ chi <i>Huperzia</i> Bernh.	15
Bảng 1.5	Các alkaloid khác phân lập từ chi <i>Huperzia</i> Bernh.	17
Bảng 1.6	Các triterpenoid phân lập được từ chi <i>Huperzia</i> Bernh.	19
Bảng 1.7	Tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase của cao chiết một số loài trong chi <i>Huperzia</i> Bernh.	22
Bảng 1.8	Công dụng trong y học cổ truyền Trung Quốc của các loài thuộc chi <i>Huperzia</i> Bernh.	31
Bảng 3.1	Kết quả định tính các nhóm chất bằng phản ứng hóa học	58
Bảng 3.2	Hoạt tính ức chế AChE của các mẫu cao chiết	60
Bảng 3.3	Số liệu phổ NMR của hợp chất HP1 và hợp chất tham khảo	69
Bảng 3.4	Số liệu phổ NMR của hợp chất HP11A	70
Bảng 3.5	Số liệu phổ NMR của hợp chất HP11B	73
Bảng 3.6	Số liệu phổ NMR của hợp chất HP12 và hợp chất tham khảo	77
Bảng 3.7	Số liệu phổ NMR của hợp chất HP13 và hợp chất tham khảo	78
Bảng 3.8	Số liệu phổ NMR của hợp chất HPA	80
Bảng 3.9	Số liệu phổ NMR của hợp chất HPB	83
Bảng 3.10	Số liệu phổ NMR của hợp chất HPH	85
Bảng 3.11	Số liệu phổ NMR của hợp chất HPD và hợp chất tham khảo	88
Bảng 3.12	Số liệu phổ NMR của hợp chất HPI và hợp chất tham khảo	90
Bảng 3.13	Số liệu phổ NMR của hợp chất HPJ và hợp chất tham khảo	92
Bảng 3.14	Số liệu phổ NMR của hợp chất HPP và hợp chất tham khảo	95
Bảng 3.15	Số liệu phổ NMR của hợp chất HP10A và hợp chất tham khảo	97
Bảng 3.16	Số liệu phổ NMR của hợp chất HP10B và hợp chất tham khảo	98

Số bảng	Tên bảng	Trang
Bảng 3.17	Số liệu phổ NMR của hợp chất HP10D và hợp chất tham khảo	99
Bảng 3.18	Số chuột chết sau 72 giờ uống cao chiết ở các liều khác nhau	100
Bảng 3.19	Hoạt tính ức chế AChE <i>in vitro</i> của các hợp chất tinh khiết	101
Bảng 3.20	Kết quả đánh giá hành vi trong thử nghiệm mê lộ chữ Y	102
Bảng 3.21	Thời gian khám phá đồ vật ở pha luyện tập	103
Bảng 3.22	Tỷ lệ phần trăm thời gian khám phá đồ vật ở pha kiểm tra	104
Bảng 3.23	Thời gian tiềm từ ngày 1 đến ngày 7	104
Bảng 3.24	Quãng đường chuột bơi đến bến đỗ	106
Bảng 3.25	Thời gian bơi ở góc phân tư đặt bến đỗ trước đó ở ngày thứ 8	107
Bảng 3.26	Hoạt tính của AChE ở hồi hải mã	108
Bảng 3.27	Nồng độ MDA huyết tương	109
Bảng 3.28	Nồng độ SOD huyết tương	110
Bảng 3.29	Nồng độ GSH-Px huyết tương	110
Bảng 4.1	Đánh giá mức độ ức chế AChE dựa vào các khoảng giá trị IC ₅₀	126

DANH MỤC CÁC HÌNH

Số hình	Tên hình	Trang
Hình 1.1	Cấu trúc hóa học khung của lớp lycopodin alcaloid	10
Hình 1.2	Cấu trúc hóa học khung của lớp lycodin alcaloid	13
Hình 1.3	Cấu trúc hóa học khung của alcaloid lớp fawcettimin	15
Hình 1.4	Cấu trúc hóa học khung các alcaloid khác	17
Hình 2.1	Sơ đồ thiết kế nghiên cứu	41
Hình 2.2	Sơ đồ quy trình thực hiện các thử nghiệm hành vi	47
Hình 3.1	Ảnh chụp cây Thạch tùng đuôi ngựa tại thực địa	54
Hình 3.2	Đặc điểm hình thái của loài Thạch tùng đuôi ngựa thu hái tại tỉnh Quảng Trị, Việt Nam	55
Hình 3.3	Đặc điểm vi phẫu lá cây	56
Hình 3.4	Đặc điểm vi phẫu thân cây cắt ngang	57
Hình 3.5	Đặc điểm bột thân và lá	58
Hình 3.6	Sơ đồ chiết xuất thân và lá cây Thạch tùng đuôi ngựa	61
Hình 3.7	Sơ đồ phân lập các hợp chất từ căn alcaloid	63
Hình 3.8	Sơ đồ phân lập các hợp chất từ căn HE1	65
Hình 3.9	Sơ đồ phân lập các hợp chất từ căn HE2	66
Hình 3.10	Sơ đồ phân lập các hợp chất từ căn HE3	67
Hình 3.11	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC, COSY chính của hợp chất HP1	68
Hình 3.12	Cấu trúc hóa học của hợp chất HP11A và HP11B	72
Hình 3.13	Tương tác HMBC và COSY chính của hợp chất HP11A	73
Hình 3.14	Tương tác NOESY chính của hợp chất HP11A	73
Hình 3.15	Tương tác NOESY chính của hợp chất HP11B	75
Hình 3.16	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HP12	76
Hình 3.17	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HP13	78
Hình 3.18	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HPA	81
Hình 3.19	Tương tác NOESY chính của hợp chất HPA	81

Số hình	Tên hình	Trang
Hình 3.20	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HPB	84
Hình 3.21	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HPH	86
Hình 3.22	Tương tác NOESY chính của hợp chất HPH	86
Hình 3.23	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HPD	89
Hình 3.24	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HPI	91
Hình 3.25	Cấu trúc hóa học của hợp chất HPJ	92
Hình 3.26	Cấu trúc hóa học của hợp chất HPP	94
Hình 3.27	Tương tác HMBC chính của hợp chất HPP	96
Hình 3.28	Tương tác NOESY chính của hợp chất HPP	96
Hình 3.29	Cấu trúc hóa học của hợp chất HP10A	97
Hình 3.30	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HP10B	98
Hình 3.31	Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính của hợp chất HP10D	100
Hình 4.1	Cấu trúc hóa học của 15 hợp chất phân lập được từ cây Thạch tùng đuôi ngựa	117
Hình 4.2	Giả thiết quá trình sinh tổng hợp huperphlegmin A-B	120
Hình 4.3	Hình 4.3. Cấu trúc hóa học của huperzin A và AChE	136

ĐẶT VẤN ĐỀ

Nằm trong vành đai khí hậu nhiệt đới gió mùa nóng ẩm và có diện tích rừng, đồi núi rộng, Việt Nam là một trong những trung tâm đa dạng sinh học với khoảng 12.000 loài thực vật có mạch. Trong đó, số lượng loài thực vật dùng làm thuốc khoảng 5.117 [16]. Đây là nguồn tài nguyên vô cùng quý báu để nghiên cứu, sàng lọc các hợp chất tự nhiên có tác dụng trị bệnh, nhằm định hướng phát triển các sản phẩm thuốc phục vụ sức khỏe con người. Tuy nhiên, đến nay vẫn còn rất nhiều cây thuốc chưa được nghiên cứu đầy đủ về thực vật, thành phần hóa học cũng như chưa có bằng chứng khoa học về các tác dụng sinh học để minh chứng cho công dụng của chúng.

Cây Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.) thuộc chi *Huperzia* Bernh., họ Thông đất (Lycopodiaceae), sống biểu sinh ở nhiều vùng núi thấp và trung bình [9]. Theo Y học cổ truyền, toàn cây có vị nhạt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt chỉ thống, thông kinh trừ thấp [4]. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy thành phần hóa học chính của loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. bao gồm các hợp chất alkaloid và terpenoid [205]. Trong đó, một số alkaloid phân lập từ loài này và các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. được chứng minh là có tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase tốt, trong đó có huperzin A là hợp chất được phân lập đầu tiên từ loài *Huperzia serrata* đã được ứng dụng trong điều trị bệnh Alzheimer [205], một căn bệnh đang khan hiếm thuốc và gây tốn kém nhiều chi phí điều trị, đặc biệt ở các nước đang phát triển [43].

Tại Việt Nam, theo Phạm Hoàng Hộ (1999) [9] và Võ Văn Chi (2012) [4], nước ta có 11 loài thuộc chi *Huperzia* Bernh., cho tới nay mới có một số công bố về loài Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.) và loài Thạch tùng thân gập (*Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis.), chưa có công bố nào về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học của loài Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.).

Từ thực tế trên, nhằm tạo cơ sở khoa học cho việc khai thác và sử dụng hiệu quả nguồn dược liệu sẵn có trong nước theo hướng điều trị bệnh Alzheimer, luận án tiến

hành thực hiện đề tài: “**Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng theo hướng điều trị bệnh Alzheimer của loài Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.**”

Mục tiêu 1. Phân lập và xác định cấu trúc hóa học của một số hợp chất từ loài Thạch tùng đuôi ngựa.

Mục tiêu 2. Đánh giá độc tính cấp và một số tác dụng theo hướng điều trị bệnh Alzheimer của cao chiết toàn phần, cao chiết phân đoạn và các hợp chất phân lập được.

Để đáp ứng được các mục tiêu nêu trên, luận án tiến hành thực hiện 3 nội dung sau:

1. Về thực vật:

- Mô tả đặc điểm hình thái, giám định tên khoa học mẫu nghiên cứu
- Xác định đặc điểm vi học của loài nghiên cứu góp phần tiêu chuẩn hóa dược liệu

2. Về thành phần hóa học:

- Định tính các nhóm chất trong dược liệu bằng phản ứng hóa học
- Chiết xuất và phân lập khoảng 15 hợp chất theo định hướng tác dụng sinh học
- Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất đã phân lập được

3. Về độc tính và tác dụng sinh học:

- Xác định độc tính cấp
- Đánh giá tác dụng ức chế enzyme acetylcholinesterase *in vitro*
- Đánh giá tác dụng cải thiện hành vi nhận thức và trí nhớ, tác dụng ức chế enzyme acetylcholinesterase *in vivo* trên mô hình gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin.
- Đánh giá tác dụng chống lão suy trên mô hình gây lão suy bởi D-galactose.

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

1.1. VỊ TRÍ PHÂN LOẠI, ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT VÀ PHÂN BỐ CỦA CHI *HUPERZIA* BERNH.

1.1.1. Vị trí phân loại

Sự phân nhóm đối với họ Lycopodiaceae và chi *Huperzia* Bernh. cho đến nay vẫn chưa hoàn toàn thống nhất. Trước đây, tất cả các loài được xếp trong chi lớn và đa hình là *Lycopodium* L. chỉ trừ một ngoại lệ là loài *Phylloglossum drummondii* Kunze [121]. Tuy nhiên, xu hướng trong những năm gần đây, dựa trên các kết quả nghiên cứu về phát sinh loài, đặc điểm hình thái và phân tử đã xác định chi *Lycopodium* L. hẹp hơn và phân chia thành nhiều chi nhỏ với quan điểm khác nhau [124].

Theo hệ thống phân loại thực vật của Øllgaard (1987), là hệ thống phân loại được chấp nhận rộng rãi nhất trên thế giới [23], [121], [137], [140], chi *Huperzia* Bernh. có vị trí phân loại như sau:

Giới Thực vật (Plantae)

Ngành Thông đất (Lycopodiophyta),

Lớp Thông đất (Lycopodiopsida),

Bộ Thông đất (Lycopodiales)

Họ Thông đất (Lycopodiaceae)

Chi *Huperzia* Bernh.

Ở Việt Nam, theo tác giả Phạm Hoàng Hộ (1999) [9], họ Thông đất phân bố ở Việt Nam có 3 chi gồm: *Lycopodiella* Holub., *Lycopodium* L. và *Huperzia* Bernh.

1.1.2. Đặc điểm thực vật

1.1.2.1. Đặc điểm chung của chi *Huperzia* Bernh.

Cây thảo mọc trên mặt đất, trên đá hoặc sống biểu sinh trên các cây gỗ lớn trong rừng rậm. Rễ thường đâm xuyên qua lớp vỏ thân cây, lớp mùn trên đất, đá, cành non tập hợp lại thành chùm, chia nhánh lưỡng phân đều hoặc không đều nhau, mọc thẳng đứng hay buông thõng. Giao giữa thân và cành thường có xuất hiện các hành con sinh dưỡng, đây là đặc điểm đặc trưng của một số loài trong chi này. Trên cành có đính nhiều

lá đơn phân và lưỡng phân, các lá này có thể xếp chồng nhau hoặc không, đôi khi có mang các bào tử hoặc tất cả các lá chụm lại thành hình hoa thị (*Huperzia drummondii*). Lá bào tử thường rất giống với lá dinh dưỡng hoặc nhỏ hơn và có màu sắc riêng, thường không có chùy rõ ràng. Lá thẳng hoặc có hình mác, mỏng, nguyên vẹn hoặc có răng ở mép lá. Túi bào tử dạng hình thận hoặc tròn, mọc đơn lẻ ở nách lá bào tử, khi vỡ nứt ra thành 2 mảnh. Bào tử có rãnh nhỏ dạng lõm về phía trung tâm [97], [141], [186], [219].

1.1.2.2. Đặc điểm của các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. ở Việt Nam

Theo Phạm Hoàng Hộ (1999) [9] và Võ Văn Chi (2012) [4], chi *Huperzia* Bernh. ở nước ta có 11 loài.

a) *Huperzia cancellata* (Spring) Trevis (Tên đồng nghĩa: *Phlegmariurus cancellatus* (Spring) Ching, *Phlegmariurus cancellatus* var. *minor* Ching, *Urostachys cancellatus* (Spring) Herter ex Nessel)

Cây thảo phụ sinh, thân thông, dài đến 40 cm, 2-4 lần lưỡng phân đều; thân to 2mm, được lá nằm phủ. Lá mập, nhọn, dài 3-4 mm, rộng 0,75 mm. Chùy ở chót nhánh, hẹp hơn phần không thụ, lá bào tử dài khoảng 1,5 mm. Bào tử nang tròn nở thành hai mảnh bằng nhau [9].

b) *Huperzia carinata* (Poir.) Trevis (Tên đồng nghĩa: *Lycopodium carinatum* (Desv. ex Poir.) Trevis., *Phlegmariurus carinatus* (Desv. ex Poir.) Ching, *Urostachys carinatus* (Desv. ex Poir.) Herter ex Nessel)

Cây thảo phụ sinh. Thân có rãnh, treo thông, dài 35-50 cm, phân nhánh lưỡng thân 1-4 lần. Lá nguyên xếp xoắn ốc, không cuống, hình dùi, nhọn, dài, hướng lên trên. Bông nằm ở ngọn cành, không phân nhánh, các lá bào tử giống với lá thường, nhưng ngắn hơn và rộng hơn. Túi bào tử hình thận, nở thành hai mảnh bằng nhau [4], [9].

c) *Huperzia chinense* (Christ.) Ching (Tên đồng nghĩa: *Lycopodium chinense* (Christ.) Ching)

Cây thảo mọc trên đất, thành bụi nhỏ, cao 10-15 cm, 1-2 lần lưỡng phân, thân to 1-1,5 mm, hình trụ, lá hẹp, mọc vòng, dài 4-7 mm, rộng 1 mm, nhọn, mép uốn xuống, gắn đứng vào thân. Túi bào tử ở nách lá gần ngọn, hình thận, nở thành hai mảnh bằng nhau [4], [9].

d) *Huperzia fordii* (Baker) R.D. Dixit (*Huperzia fordii* (Baker) Holub)

Cây thảo phụ sinh có thân dài 30-40 cm, lưỡng phân, rộng 2-3 mm, lá dài 7-10 mm, rộng đến 4 mm, mép uốn xuống, không có răng, gắn thẳng vào thân. Bông lá bào tử ở đầu nhánh, hẹp, dài, túi bào tử rộng 1,7 mm, cao 1,2 mm. Loài này rất giống loài *Huperzia serrata* về dạng cây, kích thước và sinh thái, chỉ khác ở mép lá không có răng [4], [16].

e) *Huperzia hamiltonii* (Spring) Trevis (Tên đồng nghĩa: *Lycopodium hamiltonii* (Spring) Trevis., *Phlegmariurus hamiltonii* var. *petiolatus* (C.B. Clarke) Ching)

Cây thảo phụ sinh, thân đứng hay thông, dài đến 50 cm, chia nhánh lưỡng phân, to cỡ 1,5 mm. Lá trải ra, dài 6-15 mm, rộng 3-5 mm, bóng. Phần sinh sản ở nửa trên của thân với lá bào tử giống lá thường nhưng hơi nhỏ hơn, túi bào tử hình thận, nở thành 2 mảnh bằng nhau [4], [9].

f) *Huperzia obovalifolia* (Bon.) (Tên đồng nghĩa: *Lycopodium obovalifolium* (Bon.))

Cây thảo phụ sinh có thân thông dài 20-30 cm, 2-3 lần lưỡng phân. Lá xoắn ốc, hình xoan dài 1 cm, thường nằm vào thân, gân giữa rõ. Chùy dài 15 cm, 1-2 lần lưỡng phân. Bào tử diệp nhỏ, tròn, nở thành hai mảnh như nhau [9].

g) *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. (Tên đồng nghĩa: *Lycopodium phlegmaria* (L.) Rothm., *Phlegmariurus phlegmaria* (L.) Holub, *Phlegmariurus phlegmaria* (L.) U. Sen & T. Sen)

Cây thảo phụ sinh có thân thông, dài từ 30-100 cm, 1-4 lần lưỡng phân, to 3 mm. Lá xoan tam giác, rộng nhất ở gốc, dài 6-13 mm gắn thẳng vào thân. Chùy ở ngọn nhánh, dài có khi đến 16 cm, lá bào tử nhỏ dài cỡ 1 mm, cùng kích thước với túi bào tử. Túi bào tử nở thành hai mảnh như nhau [4], [9].

h) *Huperzia salvinoides* (Herter.) Alston

Cây thảo phụ sinh có thân lưỡng phân đều, to 1 mm. Lá nhỏ, gắn theo 4 hàng, hình xoan dài 1 mm, dày, cứng, gần như không cuống, chia đôi ở ngọn nhánh, hẹp với lá bào tử nhỏ, nang bào tử tròn, tự mở hai mảnh bằng nhau [9].

i) *Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. (*Lycopodium serratum* (Thunb.) Trevis., *Huperzia serrata* f. *intermedia* (Nakai) Ching, *Huperzia serrata* f. *longipetiolata* (Spring) Ching)

Cây thảo mọc ở đất, thân đứng cao 15-40 cm, đơn hay lưỡng phân 1-2 lần, đường kính khoảng 2 mm, hình trụ. Lá hình bầu dục, mũi mác, dài 15 mm, rộng 3 mm, tương đối mỏng, gân giữa rõ, mép có răng. Túi bào tử ở nách lá giống lá thường, túi bào tử hình thận, màu vàng tươi [4], [9].

k) *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis. (Tên đồng nghĩa: *Lycopodium squarrosus* (Forst.) Trevis., *Phlegmariurus squarrosus* (G. Forst.) Á. Löve & D. Löve, *Urostachys squarrosus* (G. Forst.) Herter)

Cây thảo phụ sinh, thân thông, dài 30-70 cm, 1-2 lần lưỡng phân, to 4-5 mm. Lá hẹp, nhọn, thường đứng, bì nguyên. Chùy dài có ở chót nhánh, lá bào tử không khác lá thường, chỉ hơi nhỏ hơn, bào tử nang hình thận, nở thành hai mảnh không bằng nhau [4], [16].

l) *Huperzia subdisticha* Mak.

Cây thảo phụ sinh có thân dài 30-40 cm, lưỡng phân, rộng 2-3 mm. Lá dài 7-10 mm, rộng đến 4 mm, bì lá uốn xuống, gắn thẳng vào góc thân. Chùy ở đầu nhánh, hẹp, dài, bào tử nang rộng 1,7 mm, cao 1,2 mm [9].

1.1.3. Sinh thái và phân bố

Chi *Huperzia* Bernh. có khoảng hơn 400 loài phân bố rộng khắp trên thế giới từ vùng nhiệt đới đến Bắc Cực và cận Nam Cực [186]. Chủ yếu là các loài sống biểu sinh, được tìm thấy trong rừng núi thường xanh nhiệt đới của châu Mỹ, vùng núi cao ở Bắc Cực và vùng núi nhiệt đới ẩm ướt ở Đông Nam Á và một số vùng ở Châu Á. Một số lượng lớn các loài cũng được tìm thấy trong thảm thực vật Paramo thuộc dãy núi Andes [88], [142], [197], [198].

Việt Nam có 11 loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. phân bố hẹp ở độ cao trên 1500 m [4], [9]. Gần đây, một nghiên cứu đã tiến hành điều tra hiện trạng phân bố và đặc điểm hình thái của loài Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.). Theo kết quả điều tra của Trần Mạnh Đạt (2019), loài thạch tùng răng cưa phân bố chủ yếu ở vùng ven khe

súi, sườn núi với độ dốc < 300, độ tàn che 70 - 80%, thuộc đai cao địa hình 1.400 – 1.500 m so với mặt nước biển ở các khu vực chân động Pa Thiên, núi Voi Mẹp (xã Hướng Sơn) và núi La Rường (xã Hướng Linh) của tỉnh Quảng Trị [8]. Đặc điểm sinh thái và vùng phân bố các loài này được trình bày ở Bảng 1.1.

Bảng 1.1. Đặc điểm sinh thái và vùng phân bố các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. ở Việt Nam

TT	Tên khoa học	Tên Việt Nam	Sinh thái	Vùng phân bố	TLTK
1	<i>Huperzia cancellata</i> (Spring) Trevis	Thạch tùng bời, Thông đất bời	Ưa ẩm và bóng, mọc bám trên cây gỗ trong rừng rậm thường xanh	Rất hẹp, chỉ mới thu được mẫu ở một số vùng núi thấp ở Lào Cai, còn gặp ở Nam Trung Quốc.	[10]
2	<i>Huperzia carinata</i> (Poir.) Trevis	Thạch tùng lá dùi, Thạch tùng sóng	Ưa ẩm và bóng, mọc bám chủ yếu trên cây gỗ trong rừng rậm thường xanh, ở độ cao 100-900 m.	Khá rộng, ở Hà Nội, Quảng Trị, Đà Nẵng, Lâm Đồng, Khánh Hòa, Ninh Thuận. Cây cũng có ở Ấn Độ, Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản và nhiều nước nhiệt đới châu Á đến Malaica và các nước châu Đại Dương.	[4], [10]
3	<i>Huperzia chinense</i> (Christ.) Ching	Thạch tùng nhiều bông, Thông đất tàu.	Trung sinh và ưa nơi có ít ánh sáng, mọc trên đất có nhiều mùn ở ven rừng rậm thường xanh, ở độ cao 1500-1800 m.	Rất hẹp, chỉ có ở súi Vàng vùng núi Đà Lạt, cũng gặp ở Trung Quốc.	[4], [10]
4	<i>Huperzia hamiltonii</i> (Spring) Trevis	Thạch tùng Hamilton	Ưa ẩm và bóng, sống bám chủ yếu trên cây gỗ, đôi khi trên các tảng đá ẩm có nhiều rêu và mùn	Rộng, từ Lào Cai, Hà Giang, Vĩnh Phúc, Hà Nội đến Lâm Đồng và Khánh Hòa. Cây còn phân bố ở Ấn Độ, Trung Quốc, Đài Loan, Nhật Bản và Campuchia.	[4], [10]

TT	Tên khoa học	Tên Việt Nam	Sinh thái	Vùng phân bố	TLTK
			trong rừng rậm thường xanh, ở độ cao 700-1500 m		
5	<i>Huperzia fordii</i> (Baker) R.D. Dixit	Thạch tùng Ford, Thông đất pho	Ưa ẩm, bóng, sống bám trên vỏ cây hay đá ẩm, giàu mùn trong rừng rậm thường xanh trên núi ở độ cao 1000-1200 m.	Rất hẹp, chỉ gặp ở một vùng núi thấp của Hà Nội, còn gặp ở Ấn Độ, Trung Quốc, Nhật Bản, Đài Loan.	[4], [10]
6	<i>Huperzia obovalifolia</i> (Bon.)	Thạch tùng xoan ngược	Phụ sinh	Vùng núi cao Quảng trị, Khánh Hòa, Đà Lạt.	[9]
7	<i>Huperzia phlegmaria</i> (L.) Rothm.	Thạch tùng đuôi ngựa, Thông đất râu, Râu cây, Mã vĩ sam	Gặp ở độ cao 700-2000 m. Ưa ẩm và bóng, thường sống bám trên cây gỗ hay các tảng đá ẩm có nhiều rêu và mùn trong rừng rậm thường xanh.	Rộng, ở nhiều vùng núi thấp và trung bình ở Trung Bộ vào tới Đà Nẵng, Kiên Giang, Kon Tum, Gia Lai, Đắk Lắk, Lâm Đồng, Khánh Hòa, Ninh Thuận, Đồng Nai. Còn gặp nhiều ở các nước thuộc xứ hệ thực vật cổ nhiệt đới, Nam Nhật Bản và Đài Loan.	[4], [9], [10]
8	<i>Huperzia salvinoides</i> (Herter.) Alston	Thạch tùng bèo, Thông đất bèo	Phụ sinh	Phân bố hẹp, ở một số vùng núi thấp, đôi khi cả núi trung bình ở Hòa Bình, Hà Tĩnh, Lâm Đồng, Khánh Hòa. Còn gặp ở một số nước nhiệt đới thuộc miền hệ thực vật Ấn Độ - Mã Lai, Nhật Bản và Đài Loan.	[9], [10]
9	<i>Huperzia serrata</i>	Thạch tùng răng, Thông đất	Thường mọc thành đám nhỏ trên đất	Rất rộng, gặp ở nhiều vùng núi thấp, đôi khi cả núi trung bình từ	[4], [9], [10]

TT	Tên khoa học	Tên Việt Nam	Sinh thái	Vùng phân bố	TLTK
	(Thunb.) Trevis.	răng, Chân sói	hay góc cây có nhiều rêu trong rừng rậm thường xanh, ở độ cao 300-1800 m.	Lào Cai, Cao Bằng, Hà Nội, Hòa Bình, Hà Tĩnh, Kon Tum, Lâm Đồng, Ninh Thuận. Còn gặp phổ biến ở Châu Á, Xakhlin, Nam Nhật Bản, Triều Tiên, Nepal, Úc.	
10	<i>Huperzia squarrosa</i> (Forst.) Trevis.	Rêu rông, Thạch tùng vảy, Thạch tùng thân gập, Thông đất nhám.	Cây ưa ẩm, bóng, thường sống trên cây gỗ, các tảng đá ẩm có nhiều rêu mùn trong rừng rậm thường xanh, rừng mây mù, ở độ cao 800-1800 m.	Khá hẹp ở một số vùng núi thấp, có khi cả núi trung bình ở Cao Bằng, Thanh Hóa, Lâm Đồng và Khánh Hòa. Còn gặp ở Lào, Campuchia cũng như nhiều nước thuộc xứ hệ thực vật cổ nhiệt đới, Đài Loan, Đông Himalaya.	[4], [9], [10], [16]
11	<i>Huperzia subdisticha</i> Mak.	Thạch tùng song đỉnh	Phụ sinh	Vĩnh Phúc	[9]

1.2. THÀNH PHẦN HÓA HỌC CỦA CHI *HUPERZIA* BERNH.

Chi *Huperzia* Bernh. là chi lớn nhất trong họ Lycopodiaceae do đó có khá nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học của chi này đã được thực hiện. Những hợp chất phân lập được có cấu trúc hóa học đa dạng, nằm trong các nhóm chính: alcaloid, triterpenoid, flavonoid, glycosid và tanin. Trong đó, alcaloid và triterpenoid có cấu trúc serratan là thành phần hóa học chiếm ưu thế trong các loài thuộc chi này [36], [116], [205].

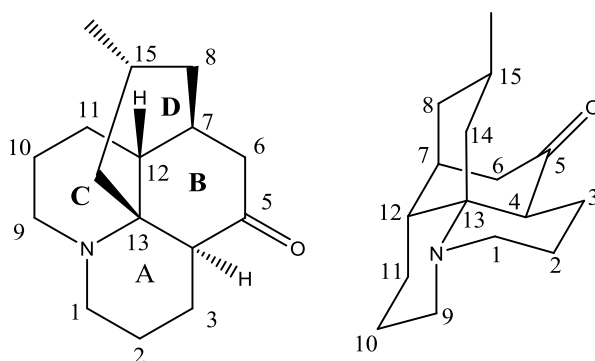
1.2.1. Nhóm hợp chất alcaloid

Những alcaloid phân lập được từ chi *Huperzia* Bernh. thường chứa một bộ khung gồm 16 carbon, đôi khi nhiều hơn như 32 carbon (trường hợp dimer hóa) hoặc ít hơn 16 carbon (do sự phân tách các liên kết). Cấu trúc phân tử của chúng thuộc về các khung quinolizin, pyridin hoặc α -pyridon với hệ thống vòng đặc biệt, công thức phân tử thường là $C_{16}N$ hoặc $C_{16}N_2$ với 3 hoặc 4 vòng, Ayer W.A (1994) đã chia các lycopodium alcaloid thành bốn lớp cấu trúc: lớp lycopodin, lớp lycodin, lớp fawcettimin và các

alcaoid khác [24]. Hệ thống đánh số carbon cho các alcaloid đã được dựa trên giả thuyết di truyền học của Conroy năm 1960. Trong giả thuyết này các alcaloid được tạo thành từ hai đơn vị 2-propylpiperidin. Cầu nối giữa C-4 và C-13 tạo thành bộ khung lycodan. Trong hầu hết các hợp chất thuộc lớp này, vòng A bị oxy hóa tạo thành vòng pyridin hoặc vòng pyridon. Sự chuyển dịch C-1 từ N_{α} sang N_{β} tạo thành khung lycopodin. Cuối cùng, sự chuyển dịch liên kết giữa C-4 với C-13 sang C-4 với C-12 tạo thành bộ khung fawcettimin [115]. Ngoài ra, một số alcaloid với bộ khung mới cũng được phân lập từ các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. trong các công bố gần đây [115], [205].

1.2.1.1. Lớp lycopodin

Đây là lớp có số lượng lớn nhất và phân bố rộng rãi nhất trong số các lycopodium alcaloid đã biết. Lycopodin alcaloid **1-55** (Bảng 1.2.) đã được phân lập từ các loài *H. serrata*, *H. selago*, *H. miyoshiana*, *H. chinense*, *H. saururus*, *H. lucidulum*, *H. phlegmaria*, *H. sieboldii*, *H. yunnanensis*, *H. fargesii*, *H. carinata*, *H. squarrosa*, *H. tetrasticha* và *H. goebelii*. Lớp này được đặc trưng bởi bốn vòng sáu cạnh liên kết với nhau, vòng A và C tạo thành hệ thống vòng quinolizidin, liên kết C = C có thể tồn tại ở vị trí C-11 và C-8. Các vị trí C-5, C-6, C-8, C-10 và C-12 thường bị oxy hóa thành nhóm carbonyl và hydroxyl hoặc bị este hóa bởi acid acetic và acid dihydroferulic; nhóm carbonyl trong vòng B thường ở vị trí C-5, tuy nhiên nó có thể được tìm thấy tại C-6, chẳng hạn như trong huperzin E (**14**), F (**15**) và O (**17**) đã được phân lập từ *H. serrata* [115]. Ngoài ra, nguyên tử nitơ có thể bị oxy hóa thành *N*-oxid, như trong lycopodin *N*-oxid và 15 α -methyl lycopodin-5 β , 6 β -diol *N*-oxid [205].



Hình 1.1. Cấu trúc hóa học khung của alcaloid lớp lycopodin

Bảng 1.2. Các alkaloid lớp lycopodin phân lập từ chi *Huperzia* Bernh.

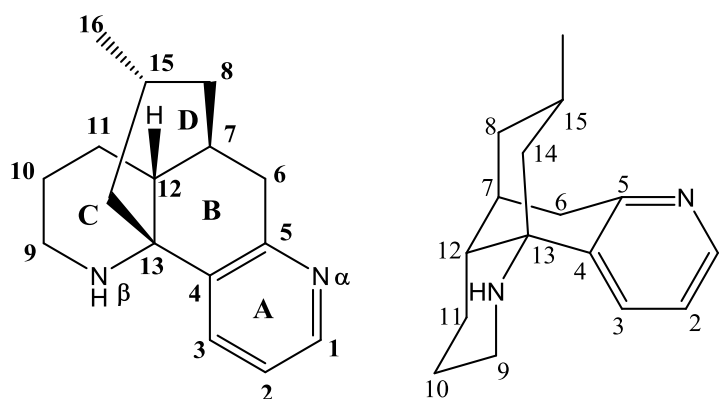
STT	Tên hợp chất	Loài	TLTK
1.	Acrifolin [$\Delta^{11,12}$,8-oxo-dihydrolycopodin (5β -OH)]	<i>H. selago</i>	[150]
2.	Anhydrodihydrolycopodin	<i>H. saururus</i> <i>H. phlegmaria</i>	[161]
3.	Annotinin	<i>H. selago</i>	[116]
4.	Clavolonin (8β -hydroxylycopodin)	<i>H. miyoshiana</i>	[181]
		<i>H. saururus</i>	[30]
		<i>H. serrata</i>	[161]
		<i>H. sieboldii</i>	[161]
5.	Deacetylfawcettiin	<i>H. serrata</i>	[161]
6.	Dihydrolycopodin (5α -OH)	<i>H. saururus</i>	[161]
7.	4,6 α -Dihydroxylycopodin [(6 α ,15 <i>R</i>)-4,6-dihydroxy-15-methyllycopodan-5-on]	<i>H. saururus</i>	[176]
8.	4 α ,6 α -Dihydroxyserratidin	<i>H. saururus</i>	[171]
9.	12-Epilycodolin (isolycodolin hoặc pseudoselagin)	<i>H. miyoshiana</i>	[181]
		<i>H. lucidulum</i>	[25], [161]
		<i>H. selago</i>	[130]
10.	12-Epilycodolin N-oxid	<i>H. serrata</i>	[176]
11.	Fawcettiin (β -lofolin, 5β -O-acetyl- 8β -hydroxydihydro-lycopodin)	<i>H. saururus</i>	[30], [161]
12.	Flabelliformin (4 α -hydroxylycopodin)	<i>H. miyoshiana</i>	[181]
		<i>H. lucidulum</i>	[25], [161]
13.	Gnidioidin	<i>H. phlegmaria</i>	[161]
14.	Huperzin E	<i>H. serrata</i>	[190]
15.	Huperzin F	<i>H. serrata</i>	[190]
16.	Huperzin G	<i>H. serrata</i>	[189]
17.	Huperzin O	<i>H. serrata</i>	[189]
18.	6 α -Hydroxylycopodin	<i>H. serrata</i>	[213]
		<i>H. lucidulum</i>	[26]
19.	7-Hydroxylycopodin [(15 <i>S</i>)-7-hydroxy-15-methyllycopodan-5-on]	<i>H. serrata</i>	[176]
20.	4 α -Hydroxyserratidin	<i>H. serrata</i>	[173]
21.	6 α -Hydroxyserratidin	<i>H. serrata</i>	[173]
22.	Lucidiolin ($\Delta^{11,12}$ - 5β ,6 α -	<i>H. serrata</i>	[166], [221]

	dihydroxydihydro-lycopodin)	<i>H. lucidulum</i>	[25]
23.	Lycoclavin (5 β -O-acetyl-6 α -hydroxy-dihydrolycopodin)	<i>H. serrata</i>	[116]
24.	Lycodolin	<i>H. miyoshiana</i>	[181]
		<i>H. serrata</i>	[86], [116], [128], [166], [213]
		<i>H. lucidulum</i>	[25]
		<i>H. saururus</i>	[161]
		<i>H. selago</i>	[150]
25.	Lyconesidin C	<i>H. chinense</i>	[69]
26.	Lycopodin	<i>H. miyoshiana</i>	[181]
		<i>H. serrata</i>	[86], [166], [213]
		<i>H. lucidulum</i>	[25]
		<i>H. saururus</i>	[161]
		<i>H. selago</i>	[150]
27.	Lycoposerramin G	<i>H. serrata</i>	[166]
28.	Lycoposerramin H	<i>H. serrata</i> , <i>H. yunnanensis</i>	[166], [205]
29.	Lycoposerramin I	<i>H. serrata</i>	[166]
30.	Lycoposerramin K	<i>H. serrata</i>	[166]
31.	Lycoposerramin L	<i>H. serrata</i>	[166]
32.	Lycoposerramin M	<i>H. serrata</i>	[166]
33.	Lycoposerramin N	<i>H. serrata</i>	[166]
34.	Lycoposerramin O	<i>H. serrata</i>	[166]
35.	Miyoshianine A (=lycoposerramin F)	<i>H. miyoshiana</i>	[181]
		<i>H. serrata</i>	[166]
36.	Miyoshianin B (=lycoposerramin J)	<i>H. miyoshiana</i>	[181]
		<i>H. serrata</i>	[166]
37.	Sauroxin (7,8-dihydroxylycopodin)	<i>H. saururus</i>	[144]
38.	Selagolin	<i>H. selago</i>	[162]
39.	Serratezomin C (6 α ,12 β -dihydrolycopodin)	<i>H. serrata</i>	[128]
40.	Serratidin (7 α -hydroxyanhydrolycodolin)	<i>H. serrata</i>	[86], [166], [171]
		<i>H. selago</i>	[162]
41.	8 β -Acetoxy-12 β -Hydroxyepidihydrolycopodin	<i>H. squarrosa</i>	[205]
42.	15 α -Methyllycopodan-5 β ,6 β -diol	<i>H. yunnanensis</i>	[205]

43.	Malycorin C	<i>H. phlegmaria</i>	[205]
44.	Lycopodin <i>N</i> -oxid	<i>H. fargesii</i>	[205]
45.	15 α -methyllycopodan-5 β ,6 β -Diol <i>N</i> -oxid	<i>H. yunnanensis</i>	[205]
46.	Malycorin B	<i>H. carinata</i> <i>H. phlegmaria</i>	[205]
47.	Lycopodatin C	<i>H. carinata</i>	[205]
48.	8,15-Dehydrolycopodin	<i>H. fargesii</i>	[205]
49.	Lycotetrastin A	<i>H. tetrasticha</i>	[72]
50.	Lycobelin A	<i>H. goebelii</i>	[73]
51.	Lycobelin B	<i>H. goebelii</i>	[73]
52.	Lycobelin C	<i>H. goebelii</i>	[73]
53.	Huperminon A	<i>H. phlegmaria</i>	[74]
54.	Hupermin A	<i>H. phlegmaria</i>	[75]
55.	<i>N</i> -demethyl-sauroxin	<i>H. saururus</i>	[122]

1.2.1.2. Lớp lycodin

Các hợp chất từ **56-81** (Bảng 1.3.) là lycodin alkaloid phân lập từ các loài *H. serrata*, *H. selago*, *H. saururus*, *H. chinense*, *H. phlegmaria*, *H. lucidulum*, *H. carinata*, *H. fordii*, *H. squarrosa*, *H. fargesii* và *H. henryi*. Lớp này cũng có bốn vòng, trong đó vòng B, C, D tương tự như lycopodin alkaloid, riêng vòng A có biến đổi tạo thành vòng pyridin hoặc pyridon [115]. Huperzin A (**59**), huperzinin (**64**) là những sản phẩm của việc tách liên kết N/C-9 và loại bỏ C-9, cho một khung C₁₅N₂ với ba vòng. Carinatin A (**77**) có cấu trúc đặc biệt, trong đó liên kết C-4 đã bị phá vỡ, C-4 liên kết với C-12 tạo thành một hệ thống vòng 5/6/6/6 mới [205].



Hình 1.2. Cấu trúc hóa học khung của alkaloid lớp lycodin

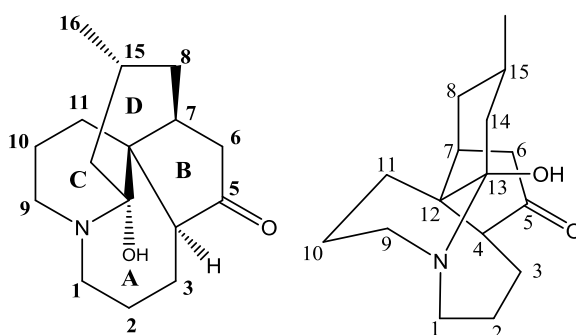
Bảng 1.3. Các alkaloid lớp lycodin phân lập từ chi *Huperzia* Bernh.

STT	Tên hợp chất	Loài	TLTK
56.	Des- <i>N</i> -methyl- β -obscurin	<i>H. serrata</i>	[213]
57.	<i>N,N</i> -Dimethylhuperzin A	<i>H. serrata</i>	[82]
58.	Himeradin A	<i>H. chinense</i>	[129]
59.	Huperzin A	<i>H. serrata</i>	[110]
		<i>H. selago</i>	[27], [162]
		<i>H. phlegmaria</i>	[205]
		<i>H. squarrosa</i>	[39]
60.	Huperzin B	<i>H. serrata</i>	[110]
		<i>H. squarrosa</i>	[39]
61.	Huperzin C	<i>H. serrata</i>	[109]
62.	Huperzin D	<i>H. serrata</i>	[109]
63.	Huperzin U (2,3-dihydro-12-hydroxyhuperzin B)	<i>H. serrata</i>	[172]
64.	Huperzinin	<i>H. serrata</i>	[116]
		<i>H. squarrosa</i>	[39]
65.	6 β -Hydroxyhuperzin A	<i>H. serrata</i>	[116]
		<i>H. selago</i>	[27]
66.	Lycodin	<i>H. serrata</i>	[86], [161], [213]
		<i>H. lucidulum</i>	[161]
		<i>H. phlegmaria</i>	[116]
67.	<i>N</i> -Methyl-huperzin B	<i>H. serrata</i>	[161]
68.	α -Obscurin (2,3-dihydro- β -obscurin)	<i>H. selago</i>	[150]
69.	β -Obscurin	<i>H. selago</i>	[150]
70.	Sauroxin (12- <i>epi</i> - α -obscurin)	<i>H. serrata</i>	[161]
71.	1-methyllycodin	<i>H. serrata</i>	[111]
72.	8 α -hydroxy-15,16-dehydro-des- <i>N</i> -methyl- α -obscurin	<i>H. serrata</i>	[111]
73.	<i>N</i> -methyl-16-hydroxyhuperzin B	<i>H. serrata</i>	[111]
74.	<i>N</i> -methylhuperzin A	<i>H. serrata</i>	[111]
75.	Fordimin	<i>H. fordii</i>	[205]
76.	Isofordin	<i>H. fordii</i>	[205]
77.	Carinatin A	<i>H. carinata</i>	[53]
78.	16-hydroxylycodin	<i>H. henryi</i>	[211]
79.	11 β -Acetoxyl- <i>N</i> -methylhuperzin B	<i>H. squarrosa</i>	[205]
80.	<i>N</i> -Methylhuperzin B	<i>H. fargesii</i>	[205]
81.	Huperserin E	<i>H. serrata</i>	[87]

1.2.1.3. Lớp fawcettimin

Các alkaloid **82-147** (Bảng 1.4) thuộc về lớp fawcettimin, được coi là sản phẩm của sự di chuyển liên kết C-4/C-13 thành liên kết C-4/C-12 từ các tiền chất là lớp

lycopodin, C-13 thường bị oxy hóa để tạo nhóm hydroxyl hoặc tạo thành liên kết C = C với C-14 [115], [205].



Hình 1.3. Cấu trúc hóa học khung của alkaloid lớp fawcettimin

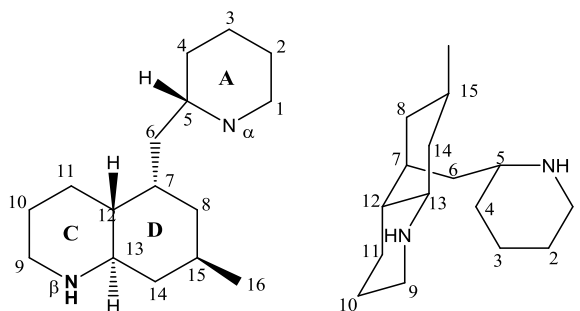
Bảng 1.4. Các alkaloid lớp fawcettimin phân lập từ chi *Huperzia* Bernh.

STT	Tên hợp chất	Loài	TLTK
82.	8-Deoxy-13-dehydro-serratinin	<i>H. serrata</i> <i>H. phlegmaria</i>	[161]
83.	8-Deoxyserratinin	<i>H. serrata</i>	[86], [161]
84.	7 α ,11 α -Dihydroxy-phlegmariurin B	<i>H. serrata</i>	[173]
85.	Fawcettimin	<i>H. serrata</i>	[171]
86.	Fawcettidin	<i>H. squarrosa</i> <i>H. phlegmaria</i>	[205]
87.	Huperserratinin	<i>H. serrata</i>	[225]
88.	Huperzin H	<i>H. serrata</i>	[116]
89.	Huperzin I	<i>H. serrata</i>	[58]
90.	Huperzin P	<i>H. serrata</i>	[170]
91.	Huperzin Q	<i>H. serrata</i>	[171]
92.	Huperzin R	<i>H. serrata</i>	[168]
93.	Huperzin S	<i>H. serrata</i>	[170]
94.	Huperzin T	<i>H. serrata</i>	[172]
95.	Huperzin W	<i>H. serrata</i>	[116]
96.	7-Hydroperoxy-phlegmariurin B	<i>H. serrata</i>	[174]
97.	11 α -Hydroperoxy-phlegmariurin B	<i>H. serrata</i>	[174]
98.	2 α -Hydroxyphlegmariurin B	<i>H. serrata</i>	[169]
99.	7 α -Hydroxyphlegmariurin B	<i>H. serrata</i>	[175]
100.	8 α -Hydroxyphlegmariurin B	<i>H. serrata</i>	[173]
101.	8 β -Hydroxyphlegmariurin B	<i>H. serrata</i>	[214]
102.	11 α -Hydroxyphlegmariurin B	<i>H. serrata</i>	[175]
103.	Lycoflexin	<i>H. serrata</i>	[86], [165]
104.	Lyconesidin A	<i>H. chinense</i>	[69]
105.	Lyconesidin B	<i>H. chinense</i>	[69]
106.	Lycophlegmarin	<i>H. phlegmaria</i>	[161]
107.	Lycoposerramin A	<i>H. serrata</i>	[164]

108.	Lycoposerramin B	<i>H. serrata</i>	[89]
109.	Lycoposerramin C	<i>H. serrata</i>	[165]
110.	Lycoposerramin D	<i>H. serrata</i>	[165]
111.	Lycoposerramin E	<i>H. serrata</i> <i>H. phlegmaria</i>	[165] [195]
112.	Lycoposerramin P	<i>H. serrata</i>	[165]
113.	Lycoposerramin Q	<i>H. serrata</i>	[165]
114.	Lycoposerramin S	<i>H. serrata</i>	[165]
115.	Lycoposerramin U	<i>H. serrata</i>	[165]
116.	Lycothunin ($\Delta^{11,12}$ -fawcettimin)	<i>H. serrata</i>	[161]
117.	Macleanin	<i>H. serrata</i>	[24]
118.	Neohuperzinin	<i>H. serrata</i>	[212]
119.	2-Oxophlegmariurin B	<i>H. serrata</i>	[169]
120.	11-Oxophlegmariurin B	<i>H. serrata</i>	[169]
121.	N-Oxyhuperzin Q	<i>H. serrata</i>	[175]
122.	Phlegmariurin A	<i>H. serrata</i>	[165], [173]
123.	Phlegmariurin B	<i>H. serrata</i>	[213]
124.	Serratanidin (8 α -hydroxy serratin)	<i>H. serrata</i>	[86], [161]
125.	Serratezomin A	<i>H. serrata</i>	[128]
126.	Serratezomin B (serratinine <i>N</i> -oxid)	<i>H. serrata</i>	[128]
127.	Serratin	<i>H. serrata</i>	[116]
128.	Serratinidin (5 α -NHAc,8 α -OH-fawcettidin)	<i>H. serrata</i>	[116], [161]
129.	Serratinin	<i>H. serrata</i>	[116]
130.	1-epi-malycorin A	<i>H. henryi</i>	[211]
131.	1-epi-17 <i>S</i> -hydroxymalycorin A	<i>H. henryi</i>	[211]
132.	6 α -hydroxyphlegmariurin A	<i>H. henryi</i>	[211]
133.	2 <i>S</i> ,4 <i>R</i> -dihydroxyfawcettimin	<i>H. henryi</i>	[211]
134.	8 β -Acetoxylfawcettimin	<i>H. squarrosa</i>	[205]
135.	Lycojapodin A	<i>H. squarrosa</i>	[205]
136.	8 α -Hydroxylycojapodin A	<i>H. squarrosa</i>	[205]
137.	Acetyllycoposerramin U	<i>H. squarrosa</i>	[205]
138.	8 β -Acetyllycoposerramin U	<i>H. squarrosa</i>	[205]
139.	<i>N</i> -Oxide-lycoflexin	<i>H. carinata</i>	[53]
140.	Carinatin B	<i>H. carinata</i>	[53]
141.	Malycorin A	<i>P. phlegmaria</i>	[205]
142.	Huperserin A	<i>H. serrata</i>	[87]
143.	Huperserin B	<i>H. serrata</i>	[87]
144.	Huperserin C	<i>H. serrata</i>	[87]
145.	Huperserin D	<i>H. serrata</i>	[87]
146.	Lycosquarosin A	<i>H. squarrosa</i>	[39]
147.	Acetyluposerratinin	<i>H. squarrosa</i>	[39]

1.2.1.4. Các alcaloid khác

Đây là lớp gồm các alcaloid không thuộc 3 lớp trên, đại diện cho nhóm này là phlegmarin. Trong cấu trúc của các alcaloid này, C-4 không liên kết với C-12, C-13 và thường chỉ có 3 vòng trừ huperzin V (**154**), lucidin A (**156**), oxolucidin A (**161**), lucidin B (**157**), oxolucidin B (**162**) là có cấu trúc khung $C_{27}N_3$ với 6 vòng [115].



Hình 1.4. Cấu trúc hóa học khung các alcaloid khác

Bảng 1.5. Các alcaloid khác phân lập từ chi *Huperzia* Bernh.

STT	Tên hợp chất	Loài	TLTK
148.	Cernuin (deoxylycocernuin)	<i>H. chinense</i>	[116]
149.	Dihydrolucidulin (5 α -OH)	<i>H. lucidulum</i>	[161]
150.	Dihydrolycolucin (14,15,16, 17-tetrahydrolucidin B)	<i>H. lucidulum</i>	[161]
151.	Huperzin J	<i>H. serrata</i>	[57]
152.	Huperzin K	<i>H. serrata</i>	[57]
153.	Huperzin L	<i>H. serrata</i>	[57]
154.	Huperzin V	<i>H. serrata</i>	[116]
155.	Huperzinin	<i>H. serrata</i>	[116]
156.	Lucidin A	<i>H. lucidulum</i>	[116]
157.	Lucidin B (serratanin A)	<i>H. lucidulum, H. serrata</i>	[116]
158.	Lucidulin	<i>H. lucidulum</i>	[161]
159.	Lucidulinon (9-ketolucidulin)	<i>H. lucidulum</i>	[116]
160.	Lycolucin (10,11,14,15,16, 17-hexadehydro-lucidin B)	<i>H. lucidulum</i>	[161]
161.	Oxolucidin A	<i>H. lucidulum</i>	[116]
162.	Oxolucidin B (serratanin B, 14 β -hydroxy-lucidin B)	<i>H. serrata</i>	[161]
163.	Phlegmariurin N	<i>H. serrata</i>	[116]
164.	Senepodin A	<i>H. chinense</i>	[116]
165.	Senepodin B	<i>H. chinense</i>	[70]
166.	Senepodin C	<i>H. chinense</i>	[70]
167.	Senepodin D	<i>H. chinense</i>	[70]

168.	Senepodin E	<i>H. chinense</i>	[70]
169.	Senepodin G	<i>H. chinense</i>	[130]
170.	Senepodin H	<i>H. chinense</i>	[130]
171.	$\Delta^{13,N}$, N_{α} -methylphlegmarin- N_{β} -oxid	<i>H. phlegmaria</i>	[195]

Ngoài các alcaloid kể trên, cho tới nay có một số alcaloid khung mới đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. Cụ thể, hai alcaloid phân lập từ loài *H. cunninghamioides* là: hupercumin A (**172**) có công thức phân tử $C_{38}N_4$ với 2 vòng octahydroquinolin, 1 vòng decahydroquinolin và 1 vòng piperidin; hupercumin B (**173**) công thức phân tử $C_{27}N_3$, cấu trúc khung tương tự hupercumin A với sự vắng mặt của 1 vòng decahydroquinolin [76], 4 β -hydroxynankakurin B (**174**) phân lập từ loài *H. phlegmaria* [195].

1.2.2. Nhóm hợp chất terpenoid

Những nghiên cứu về các phân đoạn khác ngoài alcaloid (“non alkaloid”) cho thấy thành phần triterpenoid có cấu trúc serraten chiếm ưu thế trong các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh., ngoài ra cũng phân lập được một số diterpenoid [158], [181].

1.2.2.1. Triterpenoid

Serraten là một nhóm hợp chất thuộc khung triterpenoid có 5 vòng với 7 nhóm methyl gắn với carbon bậc 3 và vòng carbon 7 cạnh (thay vì 8 nhóm methyl và vòng C 6 cạnh trong cấu trúc của các triterpenoid khác), thường xuất hiện liên kết đôi giữa C-14 và C-15. Ngoài ra, vị trí C-3 và C-21 thường bị oxy hóa thành nhóm hydroxyl hoặc bị ester hóa bởi acid acetic và cinnamic. Đôi khi, C-24, C-29, C-30 cũng có thể bị oxy hóa thành các nhóm hydroxyl và C-24 có thể bị oxy hóa hơn nữa để tạo acid cacboxylic. Bên cạnh đó, liên kết C = C tại C-14 có thể bị hydrat hóa thành nhóm hydroxyl. Nhóm hợp chất này được tìm thấy đầu tiên ở các loài dương xỉ và cây lá kim (họ thông) [199], [205].

Serratenediol là một triterpenoid có cấu trúc serraten tiêu biểu với vòng 7 carbon và 7 nhóm methyl được phân lập đầu tiên từ loài Thạch tùng răng cưa (*H. serrata*) vào năm 1964 [224]. Các nghiên cứu tiếp theo đã phát hiện ra nhiều triterpenoid trong các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh., đặc biệt từ loài *H. serrata* [222], [224].

Bảng 1.6. Các triterpenoid phân lập được từ chi *Huperzia* Bernh.

STT	Tên hợp chất	Loài	TLTK
175.	Serratenediol	<i>H. squarrosa</i>	[205]
		<i>H. yunnanensis</i>	[205]
		<i>H. phlegmaria</i>	[85]
176.	Serratenediol-3-acetat	<i>H. squarrosa</i>	[205]
		<i>H. yunnanensis</i>	[205]
		<i>H. phlegmaria</i>	[85]
177.	21 β -hydroxyserrat-14-en-3 α -ol	<i>H. squarrosa</i>	[205]
		<i>H. phlegmaria</i>	[158]
178.	21 β -Hydroxy-serrat-14-en-3 α -yl acetat	<i>H. phlegmaria</i>	[199]
179.	21 β -Hydroxyserrat-14-en-3 β -ol	<i>H. phlegmaria</i>	[158]
		<i>H. serrata</i>	[223]
180.	21 α -Hydroxyserrat-14-en-3 β -ol	<i>H. phlegmaria</i>	[158]
181.	21 α -Hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat	<i>H. phlegmaria</i>	[158]
182.	Phlegmanol A	<i>H. squarrosa</i>	[205]
		<i>H. phlegmaria</i>	[205]
183.	21 α -Hydroxyserrat-14-en-3 β -yl propanedioic acid monoester	<i>H. squarrosa</i>	[205]
		<i>H. serrata</i>	[223]
184.	Phlegmanol C	<i>H. phlegmaria</i>	[85]
185.	Phlegmanol B	<i>H. phlegmaria</i>	[85]
186.	Hydroxyserratanon	<i>H. phlegmaria</i>	[85]
187.	Serratriol	<i>H. phlegmaria</i>	[85]
		<i>H. yunnanensis</i>	[205]
188.	Serrat-14-en-3 β ,21 α ,24-triol	<i>H. squarrosa</i>	[205]
189.	Lycophlegmariol A	<i>H. phlegmaria</i>	[199]
190.	Lycophlegmariol C	<i>H. phlegmaria</i>	[199]
191.	(3 α ,21 α)-Serrat-14-en-3,21,24,29-tetraol (= lycocryptol)	<i>H. squarrosa</i>	[205]
		<i>H. yunnanensis</i>	[205]
192.	Phlegmanol E	<i>H. phlegmaria</i>	[85]
193.	Lycophlegmariol B	<i>H. phlegmaria</i>	[199]
194.	(3 α ,21 β)-Serrat-14-en-3,21,24,29-tetraol	<i>H. squarrosa</i>	[205]
195.	(3 α ,21 β)-Serrat-14-en-3,21,24,30-tetraol	<i>H. squarrosa</i>	[205]
196.	Phlegmaric acid	<i>H. phlegmaria</i>	[85]
197.	3 α ,21 α -dihydroxyserrat-14-en-24-oic acid	<i>H. squarrosa</i>	[205]
198.	(3 α ,14 α ,15 α ,21 α)-3,14,15,21,29-Pentahydroxyserrat-24-oic acid	<i>H. squarrosa</i>	[205]
199.	Tohogenol	<i>H. phlegmaria</i>	[85]
		<i>H. miyoshiana</i>	[182]

200.	Phlegmanol D	<i>H. phlegmaria</i>	[85]
201.	Lycophlegmarin	<i>H. phlegmaria</i>	[158]
202.	Lycophlegmariol D	<i>H. phlegmaria</i>	[199]
203.	α -Onocerin	<i>H. phlegmaria</i>	[205]
204.	14 β ,15 β - epoxyserratan-3 β ,21 β ,29-triol	<i>H. serrata</i>	[222]
205.	14 β ,15 β -Epoxy-3 β -hydroxyserratan-21 α -ol	<i>H. serrata</i>	[223]
206.	14 β ,15 β -epoxy-3 β -hydroxyserratan-21 α -ol-3 β -O-acetat	<i>H. serrata</i>	[223]
207.	14 β ,15 β -epoxy-3 β -hydroxyserratan-21 β -ol	<i>H. serrata</i>	[223]
208.	21 α -hydroxy-serrat-14-en-3 β -yl dihydrocoumarat	<i>H. serrata</i>	[224]
209.	21 α -hydroxy-serrat-14-en-3 β -yl p-dihydrocaffeat	<i>H. serrata</i>	[224]
210.	21 α -hydroxyserrat-14-en-3 α -yl propanedioic acid monoester	<i>H. serrata</i>	[224]
211.	3 α ,21 α -dihydroxy-serrat-14-en-24-oic acid	<i>H. serrata</i>	[224]
212.	16-oxo-3 α ,21 β -dihydroxy-serrat-14-en-24-al	<i>H. serrata</i>	[224]
213.	16-oxo-3 α ,21 β -dihydroxy-serrat-14-en-24-oic acid	<i>H. serrata</i>	[224]
214.	16-oxo-21 β -hydroxyserrat-14-en-3 α -yl acetat	<i>H. serrata</i>	[224]
215.	3 α ,21 β -dihydroxyserrat-14-en-16-on	<i>H. serrata</i>	[224]
216.	16-oxo-3 α -hydroxyserrat-14-en-21 β -ol	<i>H. serrata</i>	[36]
217.	16-oxo-diepiserratenediol	<i>H. serrata</i>	[36]
218.	16-oxoserratetriol	<i>H. serrata</i>	[36]
219.	21-epi-serratenediol	<i>H. serrata</i>	[126]
220.	21-episerratenediol-3- acetat	<i>H. serrata</i>	[126]
221.	3-O-acetyltohogenol	<i>H. miyoshiana</i>	[182]
222.	3 α ,21 β -dihydroxy-serrat-14-en-24,29-diol	<i>H. serrata</i>	[36]
223.	3 α ,21 β -dihydroxy-serrat-14-en-24-ol	<i>H. serrata</i>	[36]
		<i>H. miyoshiana</i>	[182]
224.	3 β ,21 α -Dihydroxy-serrat-14-en-24-ol	<i>H. serrata</i>	[36]
225.	3 β ,21 β -Dihydroxy-serrat-14-en-24-ol	<i>H. serrata</i>	[36]
		<i>H. miyoshiana</i>	[182]
226.	3 β ,14 β ,21 α ,24-Serratetetrol	<i>H. serrata</i>	[36]
227.	3 β ,21 β -Dihydroxy-serrat-14-en-29-ol	<i>H. serrata</i>	[36]
		<i>H. miyoshiana</i>	[182]

228.	3 β -Hydroxy-serrat-14-en-21-on	<i>H. serrata</i>	[36]
229.	Lycoclavanol	<i>H. serrata</i>	[36]
230.	Miyoshianol A	<i>H. miyoshiana</i>	[182]
231.	Miyoshianol B	<i>H. miyoshiana</i>	[182]
232.	Miyoshianol C	<i>H. miyoshiana</i>	[182]
233.	Serrat-14-en-3 β ,21 β ,29-triol	<i>H. serrata</i>	[222]
234.	Serrat-14-en-3 α ,21 β ,24,29-tetraol	<i>H. serrata</i>	[222]
235.	Serrat-14-en-3 β ,21 α ,24-triol	<i>H. serrata</i>	[222]
236.	Serrat-14-en-3 β ,21 β ,24-triol	<i>H. serrata</i>	[222]
237.	Serrat-14-en-3 β ,21 α -diyl-acetat	<i>H. miyoshiana</i>	[181]
238.	Serratenediol-21-acetat	<i>H. serrata</i>	[224]

1.2.2.2. Diterpenoid

Cho đến nay, một số diterpenoid được phân lập từ các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. bao gồm: Margocilin (**239**) được phân lập từ loài *H. phlegmaria* [205], (15R)-12, 16-epoxy-11, 14-dihydroxy-8, 11, 13-abietatrien-7-on (**240**) và acid 3 β -hydroxysandaracopimaric (**241**) được phân lập từ loài *H. serrata* [206].

1.2.3. Các nhóm hợp chất khác

Ngoài các hợp chất alkaloid và terpenoid đã được nghiên cứu rộng rãi, các hợp chất tự nhiên khác như flavonoid, glycosid, đường khử, tanin,...[114], [123] cũng đã được chứng minh là tồn tại trong các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. Nghiên cứu của Yang Y.B. và cộng sự (2008) đã chứng minh sự có mặt của một flavon 5,5'-dihydroxy-20,40-dimethoxyflavon-7-O- β -D-(6''-O-Z-p-couma-royl)- glucopyranosid (**242**) trong loài *H.serrata* [207].

Cấu trúc hóa học của các hợp chất từ **1-242** phân lập từ chi *Huperzia* Bernh. được trình bày ở Phụ lục 02.

1.3. TÁC DỤNG SINH HỌC CỦA CHI *HUPERZIA* BERNH.

Các nghiên cứu dược lý *in vitro* và *in vivo* cho thấy các alkaloid phân lập từ các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. có hiệu quả trong điều trị các bệnh liên quan đến hệ tim mạch, thần kinh-cơ hoặc có liên quan đến hoạt tính enzym cholinesterase. Những alkaloid này cũng được chứng minh là có tác động tích cực đến khả năng học tập và trí nhớ [115]. Trong số các alkaloid này thì huperzin A là hợp chất có tác dụng nổi trội và

được nghiên cứu nhiều nhất. Ngoài alcaloid, một số hợp chất terpenoid phân lập từ các loài thuộc chi này đã được chứng minh có tác dụng gây độc tế bào [205].

1.3.1. Tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase

Trong các alcaloid phân lập được từ các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. thì lycopodin có hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase (AChE) tốt hơn trong khi các alcaloid khác yếu hoặc không có tác dụng. Các hợp chất có hoạt tính ức chế AChE đáng chú ý tồn tại trong các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. bao gồm huperzin A, huperzin B, *N*-methylhuperzin B, sieboldine A và huperzinin, trong đó huperzin A có hoạt tính mạnh nhất và được nghiên cứu nhiều nhất [94], [108], [115], [116], [205]. Huperzin A được coi là một chất ức chế acetylcholinesterase mạnh, thuận nghịch và có tính chọn lọc (tác dụng ức chế butylcholinesterase yếu). So với các loại thuốc tổng hợp như tacrin, donepezil, rivastigmin và galantamin, huperzin A và chất bán tổng hợp của nó là ZT-1 có tác dụng ức chế acetylcholinesterase tốt hơn, thời gian tác dụng dài, sinh khả dụng đường uống cao hơn và ít độc hại hơn. Tác dụng ức chế acetylcholinesterase (IC₅₀) của huperzin A so với các chất khác được xếp theo thứ tự: donepezil > huperzin A > tacrin > physostigmin > galantamin > rivastigmin [116], [143], [218].

Ngoài các nghiên cứu về tác dụng ức chế AChE của các chất tinh khiết, các kết quả nghiên cứu về tác dụng ức chế AChE của cao chiết các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. cũng đã được công bố. Kết quả của các nghiên cứu cho thấy nhiều loài có tác dụng ức chế AChE tốt đã xác định giá trị IC₅₀, được trình bày ở Bảng 1.7.

Bảng 1.7. Tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase của cao chiết một số loài trong chi *Huperzia* Bernh.

STT	Tên loài	Cao chiết	Giá trị IC ₅₀ (µg/ml)	TLTK
1	<i>H. brevifolia</i>	Alcaloid	39,6 ± 14,7	[22]
2	<i>H. compacta</i>	Alcaloid	62,4 ± 16,6	
3	<i>H. tetragona</i>	Alcaloid	0,9 ± 0,1	
4	<i>H. acerosa</i>	Alcaloid	5,5 ± 0,9	[95]
5	<i>H. heterocarpon</i>	Alcaloid	25,6 ± 2,7	
6	<i>H. quadrifariata</i>	Alcaloid	2,0 ± 0,3	
7	<i>H. reflexa</i>	Alcaloid	0,11 ± 0,05	

STT	Tên loài	Cao chiết	Giá trị IC ₅₀ (µg/ml)	TLTK
8	<i>H. cuernaquvacensis</i>	Methanol	5,32 ± 0,8	[60]
		Alcaloid	0,74 ± 0,05	
9	<i>H. dichotoma</i>	Methanol	14,11 ± 2,1	
		Alcaloid	0,64 ± 0,09	
10	<i>H. linifolia</i>	Methanol	158,37 ± 8,7	
		Alcaloid	4,2 ± 1,24	
11	<i>H. saururus</i>	Alcaloid	0,58	[145]
12	<i>H. squarosa</i>	Ethyl acetat	23,44 ± 3,14	[184]
		Butanol	50,11 ± 2,45	
		Ethanol	112,20 ± 7,51	
		<i>n</i> -hexan	257,03 ± 4,32	

Từ kết quả của các nghiên cứu trên cho thấy, cao chiết alcaloid toàn phần của các loài thuộc chi này có tác dụng ức chế AChE tốt hơn cao chiết methanol hoặc ethanol. Nghiên cứu của Garcia và cộng sự (2017) cho thấy, mặc dù hai loài *H. cuernaquvacensis* và loài *H. linifolia* không có huperzin A nhưng cao chiết alcaloid của các loài này vẫn cho tác dụng ức chế AChE tốt (tương ứng là $0,74 \pm 0,05$ và $4,2 \pm 1,24$ µg/ml). Điều này chứng tỏ các hợp chất khác ngoài huperzin A cũng là nguồn các chất ức chế AChE tiềm năng [60].

1.3.2. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh

Đã có nhiều nghiên cứu về ảnh hưởng trên bộ nhớ và khả năng bảo vệ tế bào thần kinh của huperzin A. Theo đó, huperzin A giúp cải thiện trí nhớ trên chuột thí nghiệm bị suy giảm nhận thức [112]. Nó làm giảm sự chết các tế bào thần kinh gây ra bởi độc tính của glutamat [159], cải thiện trí nhớ, bảo vệ tế bào thần kinh vỏ não chống lại sự chết tế bào theo chương trình (apoptosis) gây ra bởi các mảng amyloid 25-53 và chống lại tác động gây độc tế bào bởi các gốc tự do [17], [146], làm yếu sự suy giảm nhận thức và chấn thương sau khi bị thiếu oxy, thiếu máu cục bộ trên não ở chuột [192]. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của huperzin A thông qua tác dụng hoạt hóa thụ thể nicotinic của hệ cholinergic. Thông qua thụ thể này, huperzin A hoạt hóa yếu tố NF-κB, do đó làm giảm quá trình tổng hợp NO, enzym cyclooxygenase-2, thúc đẩy khả năng sống sót của dòng tế bào ung thư thần kinh đệm ở chuột. Cũng trên cơ chế này, huperzin A làm

giảm quá trình phá hủy mạch thần kinh cho stress oxy hóa và rối loạn chức năng mạch máu não, do đó cải thiện chức năng mạch não ở chuột sau khi dùng liều 0,1 mg/kg trong 8 tuần liên tục [41]. Ngoài ra tác dụng đối kháng của huperzin A trên thụ thể *N*-methyl-D-aspartat và dòng kali có thể đóng góp tốt cho tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh [193].

Odorcyk F.K.và cộng sự (2017) đã tiến hành nghiên cứu tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh của cao chiết alcaloid loài *H. quadrifariata*. Kết quả cho thấy sử dụng cao chiết alcaloid của loài này với liều 10 mg/kg trên chuột sơ sinh có thể ngăn chặn nguy cơ gây ra suy giảm nhận thức do thiếu máu não cục bộ, phân tích mô học cho thấy việc làm giảm tổn thương mô ở hồi hải mã do làm giảm sự chết tế bào và số lượng tế bào T thâm nhập [136].

1.3.3. Tác dụng chống oxy hóa

Tổn thương oxy hóa bởi gốc tự do là một trong những nguyên nhân trong cơ chế bệnh sinh của các bệnh thoái hóa thần kinh như Alzheimer hay Parkinson [32]. Các nhà khoa học cho rằng chất chống oxy hóa hoạt động như một tác nhân diệt gốc tự do, bảo vệ não chống lại tác hại của các gốc tự do này. Nhiều nghiên cứu đã chứng minh liên quan giữa nguy cơ thoái hóa thần kinh và tình trạng chống oxy hóa, gợi ý tầm quan trọng của chất chống oxy hóa trong quá trình ngăn ngừa các tác nhân gây bệnh [40].

Huperzin A được chứng minh có tác dụng chống oxy hóa dựa trên cơ chế làm tăng hoạt độ của các enzym superoxid dismutase (SOD), catalase (CAT) và glutathion peroxidase (GSH-Px), đồng thời làm giảm nồng độ malondialdehyd (MDA) từ đó làm tăng khả năng sống sót của tế bào u ưa crôm ở chuột khỏi tác nhân oxy hóa hydrogen peroxid và các mảng peptid β -amyloid [201], [202]. Gao X. và cộng sự (2009) đã tiến hành nghiên cứu ảnh hưởng của huperzin A đối với ty thể não chuột bị cô lập. Kết quả cho thấy, ngoài việc ức chế các mảng peptid β -amyloid (tác nhân làm giảm hô hấp ty thể, giảm tổng hợp adenosine 5'-triphosphate (ATP), giảm hoạt động enzym và khả năng vận chuyển màng tế bào) ở nồng độ 40 μ M, huperzin A (0,01 hoặc 0,1 μ M) có hiệu quả ngăn ngừa phòng ti thể do các mảng peptid gây ra và sự gia tăng các phản ứng oxy hóa [59].

Kết quả nghiên cứu của Czapski G.A và cộng sự (2014) cho thấy một số phân đoạn alcaloid được phân lập từ loài *Huperzia selago* có tác dụng hiệu quả trong việc bảo

vệ các đại phân tử khỏi chấn thương do stress oxy hóa thể hiện qua chỉ số bắt gốc tự do trực tiếp (DPPH) lên tới 59% ở nồng độ 25 $\mu\text{g/ml}$. Các phân đoạn alkaloid này cũng được chứng minh có tác dụng chống lại sự oxy hóa lipid và quá trình oxy hóa protein trong mô não chuột đồng, làm giảm 20% và 76% tổn thương do sắt/ascorbat gây ra. Bằng phương pháp định tính sử dụng sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC-DAD) và phương pháp phổ khối phân giải cao (HR-ESI-MS), nghiên cứu này cho thấy, các phân đoạn alkaloid có tác dụng chống oxy hóa có chứa lycodin, lycoposerramin G và 8 β -hydroxylycoposerramin K, trong khi các phân đoạn khác không chứa các hợp chất này, điều này gợi ý các hợp chất nêu trên có thể là tác nhân chống oxy hóa. Nghiên cứu này cũng chỉ ra rằng, tác dụng chống oxy hóa của huperzin A không do tác dụng bắt gốc tự do trực tiếp, mà có thể theo một cơ chế khác [40]. Bùi Thanh Tùng và cộng sự (2017) nghiên cứu tác dụng chống oxy hóa của các phân đoạn chiết loài *H. squarrosa* bằng phương pháp định lượng DPPH, kết quả cho thấy phân đoạn ethylacetat cho tác dụng chống oxy hóa mạnh nhất với giá trị IC_{50} là $9,35 \pm 1,68 \mu\text{g/ml}$, các phân đoạn ethanol, *n*-hexan, butanol cho tác dụng chống oxy hóa yếu hơn với các giá trị IC_{50} tương ứng lần lượt là $26,91 \pm 1,27 \mu\text{g/ml}$, $83,70 \pm 1,12 \mu\text{g/ml}$ và $16,21 \pm 1,47 \mu\text{g/ml}$. Phân đoạn ethylacetat được tiếp tục nghiên cứu khả năng chống oxy hóa trên *in vivo*, kết quả cho thấy phân đoạn này có tác dụng làm giảm nồng độ MDA, làm tăng hoạt độ của các enzym chống oxy hóa (SOD và GSH-Px) trong não chuột [184].

1.3.4. Tác dụng chống viêm

Stress oxy hóa là nguyên nhân chính dẫn đến quá trình viêm mạn tính được gọi là “viêm lão hóa”. Đây là tình trạng viêm nhẹ xảy ra trong suốt quá trình lão hóa và có liên quan đến tuổi tác. Trên thực tế, các chất ức chế AChE được chứng minh là tăng cường dẫn truyền cholinergic và hoạt động như tác nhân chống viêm trong những trường hợp này [19].

Wang và Tang (2007) đã thử tác dụng chống viêm *in vitro* của huperzin A trên mô hình thiếu máu cục bộ dựa trên sự thiếu hụt oxy-glucose ở tế bào u thần kinh đệm của chuột. Kết quả cho thấy, với liều 1 $\mu\text{g/L}$, huperzin A có tác dụng ức chế việc kích hoạt sự chuyển dịch của yếu tố thần kinh NF- κB , làm giảm cảm ứng của enzym tổng

xúc tác quá trình tổng hợp nitric oxid, cyclooxygenase -2 (COX-2) và sự biểu hiện quá mức của nitric oxid. Từ đó thúc đẩy sự sống sót của tế bào u thần kinh đệm bị thiếu hụt oxy-glucose [196]. Tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh, chống lại tổn thương do thiếu máu não của huperzin A thông qua con đường chống viêm cholinergic trong đó thụ thể nicotinic $\alpha 7$ đóng vai trò thiết yếu [191], [194]. Huperzin A ức chế yếu tố gây hoại tử khối u TNF- α và quá trình phosphoryl hóa bởi c-Jun N-terminal và protein hoạt hóa mitogen p38. Do vậy, huperzin A được sử dụng để giảm viêm cho các trường hợp viêm kéo dài trong viêm chất trắng, làm giảm tổn thương và ức chế viêm sau thiếu máu não cục bộ [194]. Huperzin A thể hiện tác dụng chống viêm thông qua các thụ thể nicotinic, làm giảm giải phóng các cytokine, như IL-1 β và TNF- α , và kích hoạt NF- κ B, cung cấp khả năng chống viêm và bảo vệ tế bào khỏi stress oxy hóa [41].

Sử dụng đồng thời huperzin A (0,1 mg/kg, tiêm dưới da) và D-galactose (300 mg/kg, tiêm dưới da) trên chuột trong 8 tuần không chỉ làm giảm đáng kể sự suy yếu chức năng gan, giảm sự tạo thành các loại oxy phản ứng (reactive oxygen species-ROS) và sự tổn thương oxy hóa, mà còn ức chế quá trình lão hóa do viêm thông qua ức chế sự lão hóa ở gan, ức chế AChE, thoái hóa I κ B α , yếu tố κ B p65 và đáp ứng viêm. Hơn nữa, có sự giảm mức độ biểu hiện của tín hiệu tiền viêm (acid ribonucleic) và yếu tố hoại tử khối u α , interleukin-1 β và interleukin-6 và sự gia tăng nồng độ của cytokin interleukin-10. Như vậy, tác dụng bảo vệ của huperzin A là do ức chế AChE và việc kích hoạt con đường chống viêm cholinergic [151].

Một nghiên cứu khác tiến hành điều trị chuột Sprague-Dawley với huperzin A tiêm phúc mạc liều 0,1 mg/kg/ngày trong 3 ngày đã chứng minh là có lợi trong mô hình viêm đại tràng bằng acid acetic trên chuột thông qua ức chế giải phóng phản ứng chất chuyển hóa oxy và cytokin tiền viêm. Trong nghiên cứu này, huperzin A làm giảm mức độ tổn thương đại tràng, tăng nồng độ MDA đại tràng, hoạt động của enzym myrloperoxidase và yếu tố NF- κ B, giảm nồng độ interleukin-1b trong huyết thanh do viêm đại tràng [93].

1.3.5. Tác dụng gây độc tế bào

Theo nghiên cứu của Wittayalai S. và cộng sự (2012), lycophlegmariol B, D và 21 β -Hydroxy-serrat-14-en-3 α -yl acetat được phân lập từ loài *Huperzia phlegmaria* có tác dụng gây độc các dòng tế bào ung thư tử cung (HuCCA-1), ung thư phổi (A-549), ung thư gan (HepG2) và bệnh bạch cầu lympho cấp tính (MOLT-3). Phương pháp định lượng xác định giá trị nồng độ ức chế IC₅₀ cho thấy, 21 β -Hydroxy-serrat-14-en-3 α -yl acetat có tác dụng gây độc tế bào HuCCA-1 và HepG2 với nồng độ IC₅₀ tương ứng là 2,62 μ M và 2,42 μ M, nhưng không có tác dụng trên dòng tế bào A-549. Lycophlegmariol B chỉ có tác dụng ức chế sự phát triển của tế bào MOLT-3, lycophlegmariol D có tác dụng ức chế nhẹ dòng tế bào HuCCA-1, A549 và không có tác dụng trên dòng tế bào HepG2. Nồng độ ức chế dòng tế bào MOLT-3 của 21 β -Hydroxy-serrat-14-en-3 α -yl acetat, lycophlegmariol D và lycophlegmariol B lần lượt là 2,9 μ M, 3,0 μ M và 14,7 μ M. Như vậy, tác dụng gây độc tế bào của 21 β -Hydroxy-serrat-14-en-3 α -yl acetat và lycophlegmariol D mạnh gấp 5 lần lycophlegmariol B [199]. Theo Shi H. và cộng sự (2005), lycophlegmarin phân lập từ *Huperzia phlegmaria* đã được chứng minh có tác dụng ức chế *in vitro* sự phát triển của tế bào gan người (BEL-7402), tuy nhiên hợp chất này không có tác dụng gây độc trên các dòng tế bào bệnh bạch cầu (HL-60) và tế bào ung thư phổi người (A-549) [158], [205]. Ngoài các hợp chất terpenoid thể hiện tác dụng gây độc tế bào, hợp chất hupermin A, một lycopodium alkaloid được phân lập từ loài *Huperzia phlegmaria*, có tác dụng ức chế nhẹ sự phát triển của các tế bào HL-60 với IC₅₀ = 39 μ M [75].

Ham Y.M. và cộng sự (2012) đã nghiên cứu tác dụng gây độc tế bào của cao chiết ethanol loài *H. serrata* trên một số dòng tế bào ung thư. Kết quả cho thấy, ở nồng độ 100 μ g/mL, cao chiết ethanol ức chế các dòng tế bào ở các mức độ khác nhau: SK-Hep1 (75,7%), HT-29 (71,7%), A549 (53,8%) và đặc biệt có tác dụng ức chế dòng tế bào HL-60 (89,2%) với trị số phần trăm ức chế phụ thuộc nồng độ, giá trị IC₅₀ được xác định là 29,0 μ g/mL. Để tiếp tục đánh giá tác dụng gây độc trên dòng tế bào HL-60, các phân đoạn chiết với các dung môi khác nhau được tiến hành, cho kết quả là phân đoạn methylen clorid có tác dụng ức chế mạnh nhất với giá trị phần trăm ức chế ở nồng độ 25 μ g/ml là 70,9%. Hai triterpenoid được phân lập từ phân đoạn này là 21-epi-

serratenediol và serratenediol ức chế sự phát triển của dòng tế bào ung thư HL-60 tốt với giá trị IC_{50} tương ứng là 15,9 và 12,9 μ M. Đặc biệt, hợp chất serratenediol không gây ức chế sự phát triển của các tế bào thường ở nồng độ kiểm tra. Cơ chế gây độc tế bào ung thư dòng HL-60 của serratenediol được chứng minh là do tham gia vào quá trình chết tự nhiên của tế bào (quá trình apoptosis) [65].

1.3.6. Tác dụng ức chế monoamin oxidase (MAO)

Armijos C. và cộng sự (2016) đã tiến hành nghiên cứu tác dụng ức chế MAO-A của một số loài thuộc chi *Huperzia* Bernh., kết quả nghiên cứu cho thấy cao chiết alkaloid nồng độ 10 μ g/ml của một số loài được nghiên cứu có tác dụng ức chế MAO-A đáng kể: *H. brevifolia* (62%), *H. columnaris* (83%), *H. compacta* (83%), *H. crassa* (84%), *H. espinosana* (75%) và *H. tetragona* (81%) [22].

1.3.7. Tác dụng kháng khuẩn

Nghiên cứu gần đây của các nhà khoa học Ấn Độ cho thấy cao chiết methanol của các loài *H. phyllantha*, *H. hamiltonii*, *H. squarrosa*, *H. nilgirica*, *H. macrostachys*, *H. vernicosa*, *H. ceylanica*, *H. seratta* cho hiệu quả kháng khuẩn tốt với các chủng vi khuẩn *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Bacillus cereus* [123].

1.3.8. Tác dụng trên bệnh tâm thần phân liệt

Cùng với các nghiên cứu về tác dụng của huperzin A trên suy giảm nhận thức ở bệnh nhân Alzheimer, ảnh hưởng của huperzin A trên rối loạn trí nhớ ở bệnh nhân tâm thần phân liệt cũng đã được nghiên cứu bởi một số tác giả. Trong tất cả các nghiên cứu, chức năng bộ nhớ của bệnh nhân được cải thiện đáng kể sau khi được điều trị bằng huperzin A [116]. Tiềm năng của huperzin A trong điều trị bệnh nhân tâm thần phân liệt không đáp ứng với điều trị được tiến hành trong một nghiên cứu lâm sàng nhỏ (n = 19). Nghiên cứu này đã chứng minh tác dụng có lợi của huperzin A trong điều trị nhận thức và các triệu chứng của tâm thần phân liệt trong 12 tuần. Ngoài ra, một thử nghiệm lâm sàng giai đoạn II để đánh giá tác dụng của huperzin A trong cải thiện nhận thức của bệnh nhân tâm thần phân liệt đã được thực hiện tại Mỹ, tuy nhiên chưa có kết quả nào được công bố [19].

1.3.9. Tác dụng trên chứng nhược cơ

Nhiều tài liệu đề cập rằng huperzin A có tác dụng cải thiện các triệu chứng bệnh nhược cơ, một trường hợp hiếm gặp nhưng nghiêm trọng trong bệnh thần kinh-cơ tự miễn [90], [115], [148]. Tuy nhiên, chỉ tìm thấy một nghiên cứu chứng tỏ huperzin A có tác dụng trong điều trị nhược cơ. Trong nghiên cứu này, huperzin A tiêm bắp với liều 0,4 mg/ngày trong 10 ngày được so sánh với nhóm chứng điều trị bằng neostigmin tiêm bắp 0,5 mg/ngày. Kết quả nghiên cứu cho thấy huperzin A thể hiện thời gian tác dụng trung bình (7 giờ) dài hơn so với neostigmin (4 giờ) [90], [148].

1.3.10. Tác dụng chống co giật

Tác dụng chống co giật của huperzin A được ghi nhận trong một số nghiên cứu gần đây làm cho hợp chất này có tiềm năng trở thành thuốc chống động kinh. Dùng huperzin A đường uống với liều 1mg/kg trên chuột nhắt chủng Swis-Webster cho thấy huperzin A có tác dụng bảo vệ động vật chống lại tác nhân pentylenetetrazole gây ra co giật, hiệu quả chống co giật đạt cao nhất (bảo vệ 62,5%) sau 1 giờ dùng thuốc. Tuy nhiên, huperzin A không có hiệu quả trong trường hợp co giật do điện giật trên loài động vật này [19], [156]. Một nghiên cứu khác trên mô hình sử dụng dòng điện tần số 6Hz cho kết quả liều có hiệu quả 50% (ED₅₀) của huperzin A khi tiêm màng bụng là 0,28; 0,34 và 0,78 mg/kg tương ứng với các dòng điện có cường độ 22; 32 và 44 mA. Dữ liệu này cho thấy lợi thế có thể có của huperzin A so với các loại thuốc chống co giật trên thị trường như phenytoin, carbamazepin, lamotrigin và topiramate vì các thuốc này có hiệu quả hạn chế trong mô hình 6Hz ở liều không có độc tính trên hành vi [19]. Hơn nữa, Schneider và cộng sự (2009) tiến hành nghiên cứu việc sử dụng huperzin A để điều trị động kinh trên chó, kết quả cho thấy sử dụng đơn độc hoạt chất này trong 6 tháng có tác dụng cải thiện đáng kể triệu chứng co giật ở cả tần số và cường độ. Từ kết quả này, các tác giả đưa ra khuyến cáo huperzin A có thể là một thuốc thay thế cho thuốc chống co giật thông thường, đặc biệt trong các cơn động kinh khu trú lành tính. Tuy nhiên để xác định tốt hơn các loại động kinh có thể kiểm soát bằng huperzin A, cần có thêm các thử nghiệm lâm sàng để đánh giá khả năng dung nạp và hiệu quả của thuốc trên bệnh nhân động kinh [156].

1.4. ĐỘC TÍNH CỦA CÁC LOÀI THUỘC CHI *HUPERZIA* BERNH.

Kết quả các nghiên cứu về độc tính của hợp chất huperzin A ở nhiều loài động vật như chuột, thỏ và chó cho thấy huperzin A gây ít tác dụng phụ trên hệ cholinergic hơn các chất ức chế AChE khác như physostigmin và tacrin [81], [218]. Liều LD₅₀ của huperzin A trên chuột là 4,6 mg đối với đường uống, 3 mg đối với tiêm dưới da, 1,8 mg đối với tiêm màng bụng và 0,63 mg đối với tiêm tĩnh mạch. Nhằm xác định ảnh hưởng của huperzin A lên sự thay đổi thể tích gan, enzym gan và cấu trúc mô gan, nghiên cứu của Ma X.C và cộng sự (2003) sử dụng liều đơn huperzin A trên chuột. Độc tính tế bào của thuốc được đánh giá bằng việc xác định hàm lượng enzym lactat dehydrogenase trong và ngoài tế bào gan. Kết quả nghiên cứu cho thấy, giống như tacrin, huperzin A làm tăng thể tích gan và enzym gan (AST và ALT). Tuy nhiên, không giống với tacrin, huperzin A không làm thay đổi cấu trúc mô học của gan [118]. Nghiên cứu mô bệnh học của tác giả Zangara và cộng sự (2003) cũng cho thấy không có sự thay đổi ở gan, thận, tim, phổi hay não của động vật sau khi sử dụng huperzin A liều 0,6 mg/kg tiêm bắp ở chó và 1,5 mg/kg đường uống ở chuột trong 180 ngày. Không xuất hiện biến đổi gen và quái thai với liều 0,019 đến 0,38 mg/kg tiêm màng bụng ở chuột hay 0,02 đến 0,2 mg/kg tiêm bắp ở thỏ [218]. Ngoài huperzin A, một số hợp chất khác được phân lập từ các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. cũng được nghiên cứu độc tính cấp. Theo kết quả nghiên cứu của Henry M.L. và cộng sự (1945), liều LD₅₀ của lycopodin, obscurin, annotinin đường tiêm tĩnh mạch trên chuột đã được xác định lần lượt là 27,58 ± 1,16; 99,17 ± 11,29 và 114,6 ± 2,94 mg/kg [68].

Nguyễn Duy Tài và cộng sự (2013) đã nghiên cứu và xác định được LD₅₀ của cao chiết ethanol của hai loài Thạch tùng răng cưa (*H. serrata*) và Thạch tùng râu rồng (*H. squarrosa*) đường uống trên chuột tương ứng lần lượt là 5,33 g/kg và 1,71 g/kg [14].

1.5. CÔNG DỤNG TRONG Y HỌC CỔ TRUYỀN CỦA CÁC LOÀI THUỘC CHI *HUPERZIA* BERNH.

Các loài trong chi *Huperzia* Bernh. phân bố ở nhiều nơi trên thế giới, đặc biệt là ở các nước nhiệt đới và cận nhiệt đới với nhiều công dụng khác nhau đã được công bố.

Tại Trung Quốc, các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. đã có lịch sử sử dụng lâu dài trong dân gian để điều trị một số bệnh nhiễm trùng, căng thẳng, sung, tâm thần phân liệt, nhược cơ, ngộ độc phốt pho hữu cơ [119], công dụng cụ thể của các loài được liệt kê trong Bảng 1.8.

Bảng 1.8. Công dụng trong y học cổ truyền Trung Quốc của các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh.

TT	Tên loài	Công dụng trong y học cổ truyền Trung Quốc	TLTK
1.	<i>Huperzia cancellata</i> (Spring) Ching	Toàn cây dùng điều trị sốt thấp khớp.	[119]
2.	<i>Huperzia carinata</i> (Desv.) Ching	Toàn cây được dùng để chữa sốt thấp khớp, điều trị đau khớp, thắt lưng, chân, tay, chấn thương, giải độc khi bị sung.	[119]
3.	<i>Huperzia chinense</i> (Herter ex Nessel) Ching	Được dùng để trị đau khớp xương, phong thấp tê liệt, còn bào tử của nó thì được dùng chữa lở ngoài da.	[4]
4.	<i>Huperzia crispata</i> (Ching) Ching	Toàn cây được sử dụng điều trị lao phổi.	[119]
5.	<i>Huperzia delavayi</i> (Christ et Herter) Ching	Toàn cây được dùng làm thuốc giảm sung đau do rắn cắn.	[119]
6.	<i>Huperzia fargesii</i> (Herter) Ching	Toàn cây dùng điều trị sốt thấp khớp.	[119]
7.	<i>Huperzia fordii</i> (Baker) R.D. Dixit	Được dùng toàn cây để trị phong thấp, viêm khớp xương, đòn ngã tổn thương và viêm cột sống phì đại, hạ sốt, giải độc.	[4] [119]
8.	<i>Huperzia guangdongensis</i> (Ching) Holub	Toàn cây dùng điều trị sốt thấp khớp.	[119]
9.	<i>Huperzia hamiltonii</i> (Spring.) Trevis.	Được dùng trị sốt cao, đau đầu, ho, ỉa chảy, thũng độc, đòn ngã tổn thương và rắn cắn	[119]
10.	<i>Huperzia henryii</i> (Bak.) Holub	Toàn cây được dùng hạ sốt, giải độc, giảm đau tay chân, đau khớp, đau do ngã.	[119]
11.	<i>Huperzia herterana</i> (Kumm.) Sen et Sen	Toàn cây được dùng làm thuốc giảm sung đau do rắn cắn.	[119]

TT	Tên loài	Công dụng trong y học cổ truyền Trung Quốc	TLTK
12.	<i>Huperzia mingcheensis</i> (Ching) Holub	Toàn cây được sử dụng hạ sốt, giải độc, giảm đau tay chân, đau khớp, đau do ngã.	[119]
13.	<i>Huperzia miyoshiana</i> (Makino) Ching	Toàn cây được dùng làm thuốc điều trị nhiễm trùng, căng thẳng, sưng đau.	[119]
14.	<i>Huperzia phlegmaria</i> (L.) Rothm.	Được dùng làm thuốc trị đau họng, thủy thũng, đòn ngã tổn thương.	[9]
15.	<i>Huperzia quasipolytrichoides</i> (Hayata) Ching	Toàn cây được dùng làm thuốc chữa đòn ngã tổn thương, chấn thương gân và chảy máu	[119]
16.	<i>Huperzia selago</i> (L.) Bernh. ex Schrank et Mart.	Toàn cây được dùng làm thuốc chữa đòn ngã tổn thương, chấn thương gân và chảy máu.	[119]
17.	<i>Huperzia serrata</i> (Thunb.) Trevis.	Được sử dụng rộng rãi cho các bệnh có ảnh hưởng đến tim mạch hoặc hệ thống thần kinh cơ, hoặc các hoạt động có liên quan đến cholinesterase bao gồm sốt, bầm máu, căng thẳng, tiểu tiện ra máu và tâm thần phân liệt; cũng được sử dụng như một chất chống viêm và là một thuốc dự phòng giải độc trong ngộ độc phospho hữu cơ.	[19], [87], [218]
18.	<i>Huperzia suthchueniana</i> (Herter) Ching	Toàn cây dùng để trị bỏng, giải độc trong các trường hợp sung, côn trùng cắn.	[119]
19.	<i>Huperzia yunnanensis</i> Ching	Toàn cây dùng điều trị sốt thấp khớp.	[119]
20.	<i>Huperzia cryptomerianus</i> (Maxim.) Dixit	Toàn cây được sử dụng hạ sốt, giải độc, giảm đau tay chân, đau khớp, đau do ngã.	[119]

Tại Ấn Độ, *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis. còn được trộn với mật ong làm thuốc bổ cho phụ nữ ngoài 40 tuổi, hoặc trộn với tam thất cùng tỷ lệ để tăng cường sinh lý, hoặc bột của cây phơi khô được dùng làm thực phẩm bổ sung có tác dụng tăng cường trí nhớ, điều trị chứng mất ngủ [216]. Tại Nepal, *Huperzia squarrosa* (Forst.) được sử dụng để giã đắp trị đau lưng [15]. Ở Argentina, loài *Huperzia saururus* (Lam.) Trevis. được sử dụng trong y học cổ truyền để tăng cường trí nhớ [145]. Ở Ecuador, Peru và

một số nước Nam Mỹ, các loài *Huperzia* (spp.) được sử dụng đơn độc hoặc phối hợp với các dược liệu khác trong dân gian chữa các bệnh liên quan đến gan, thận, sốt cao, viêm nhiễm và cảm lạnh [22].

Tại Việt Nam, một số loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. đã được sử dụng theo kinh nghiệm dân gian làm thuốc. Cụ thể, Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis. chữa đòn ngã tổn thương, các vết thâm tím và sưng đau, nôn ra máu, đái ra máu, trĩ chảy máu, mụn nhọt [15]. Rêu rồng (*Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis) được sử dụng toàn cây trong điều trị ngoại thương xuất huyết, đòn ngã tổn thương [9]. Bào tử loài *Huperzia carinata* (Desv.) Trevis được dùng làm thuốc gây khô chữa hăm kẽ ở da trẻ em và các bệnh ngoài da khác. Cây có thể dùng giã với rượu đắp chữa mụn nhọt ở cằm, ngoài ra cũng có thể được dùng như các loài Thạch tùng trị đòn ngã tổn thương và ngoại thương xuất huyết [4]. Hiện nay, có hai loài được sử dụng trong bài thuốc và đã được phát triển thành sản phẩm thực phẩm chức năng lưu hành trên thị trường là sản phẩm Hộ trí vương (thành phần: Cao Thạch tùng răng cưa 65 mg, Cao Đinh lăng 60 mg, Cao Natto 50 mg, L-Carnitin fumarat 50 mg, Cao Thiên ma 10 mg, Sulbutiamin 2 mg, Boron 1 mg) và Lohha trí não (thành phần: Cao Thạch tùng thân gập 125 mg, 125 mg, Cao Bạch Phục Linh 115 mg, Cao Câu Kỷ Tử 100 mg, Cao Trạch Tả 75 mg, Cao Hoài Sơn 75 mg, Cao Sơn Thù 60 mg, Cao Lá Dâu 50 mg).

1.6. TỔNG QUAN CÁC NGHIÊN CỨU VỀ CÂY THẠCH TÙNG ĐUÔI NGỰA (*HUPERZIA PHLEGMARIA* (L.) ROTHM.)

1.6.1. Các nghiên cứu về thành phần hóa học

Theo các tài liệu thu thập được, kể từ năm 1971 đến năm 2016 có 9 công trình công bố về thành phần hóa học của loài *Huperzia phlegmaria*, đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học 39 hợp chất trong đó có 16 alkaloid và 23 hợp chất terpenoid. Các nghiên cứu về loài này được tiến hành chủ yếu bởi các nhà khoa học Nhật Bản và Trung Quốc.

Trong số 16 alkaloid phân lập được từ loài *Huperzia phlegmaria* có:

- Các alkaloid thuộc lớp lycopodin: Anhydrodihydrolycopodin, Gnidioidin [161], Malycorin B và Malycorin C [205]. Năm 2013 và 2014, Hirasawa và cộng sự phân lập được Huperminon A và Hupermin A thuộc lớp này [74], [75].

- Các alkaloid thuộc lớp lycodin: lycodin và huperzin A [116], [205];

- Các alkaloid thuộc lớp fawcettimin: Năm 1982, nhóm nghiên cứu của nhà khoa học Nhật Bản đã tiến hành chiết xuất và phân lập được 4 hợp chất alkaloid lớp fawcettimin từ loài *Huperzia phlegmaria* thu hái tại Nhật Bản, bao gồm: lycoflexin, fawcettidin, lycophlegmarin và 8-deoxy-13-dehydro-serratinin [84]. Năm 2008, Hirasawa và cộng sự cũng tiếp tục phân lập được 3 alkaloid trong đó có 1 alkaloid lớp fawcettimin là malycorin A [71]. Tiếp đó, năm 2015, Wang Z.F. và cộng sự phân lập được lycoposerramin E cũng là một lycopodium alkaloid thuộc lớp này [195].

- Năm 2015, Wang Z.F. và cộng sự phân lập được 2 alkaloid mới với cấu trúc khung khác 3 lớp trên từ loài *Huperzia phlegmaria* là $\Delta^{13,N}$, N_α -methylphlegmarin- N_β -oxid và 4β -hydroxynankakurin B [195].

Bên cạnh các hợp chất alkaloid, nhiều nghiên cứu trên các phân đoạn không phải alkaloid cho thấy triterpenoid có cấu trúc serraten là nhóm hợp chất chiếm ưu thế thứ hai được phân lập từ loài *Huperzia phlegmaria*.

Năm 1971, từ loài *Huperzia phlegmaria* thu hái tại Ceylon (Sri Lanka), các nhà khoa học Nhật Bản đã phân lập được 11 triterpenoid nhóm serratenediol bao gồm: Serratenediol, serratenediol 3-acetat, serratriol, hydroxyserratenon, tohogenol, Phlegmanol A-E (182, 184, 185, 192, 200) và acid phlegmaric [85]. Các hợp chất triterpenoid: Serratenediol, serratenediol 3-acetat, serratriol, hydroxyserratenon, tohogenol lần đầu tiên được phân lập từ loài *Huperzia serrata* trước đó [199], [205]. Trong khi đó, các hợp chất Phlegmanol A-E được phân lập lần đầu tiên từ loài *Huperzia phlegmaria* [85].

Shi và cộng sự (2005) phân lập và xác định cấu trúc của một triterpenoid mới là lycophlegmarin và 4 hợp chất triterpenoid khác bao gồm 21α -Hydroxyserrat-14-en- 3β -ol, 21α -Hydroxyserrat-14-en- 3β -yl acetat, 21β -Hydroxyserrat-14-en- 3α -ol và 21β -

Hydroxyserrat-14-en-3 β -ol từ phân đoạn ethylacetat của cao chiết phần trên mặt đất loài *Huperzia phlegmaria* thu hái ở Trung Quốc [158].

Đến năm 2012, từ phân đoạn diethyl ete của cao chiết loài *Huperzia phlegmaria*, nhóm nhà khoa học Thái Lan đã phân lập được 9 triterpenoid bao gồm: lycophlegmarin, 21 α -Hydroxyserrat-14-en-3 β -ol, 21 α -Hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat, 21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl dihydrocoumarat, 21 α -hydroxy-serrat-14-en-3 β -yl p-dihydrocaffeat, Lycophlegmariol A-D [199].

Ngoài các triterpenoid kể trên, năm 2012, Wittayalai S. và cộng sự đã phân lập được 1 abietan diterpenoid là margocilin. Hợp chất này đã được phân lập từ loài *Azadirachta indica* trước đó, tuy nhiên, đây là lần đầu tiên phân lập được từ loài *Huperzia phlegmaria* cũng như từ chi *Huperzia* Bernh. [199].

Tại Việt Nam, đến năm 2019, Đặng Kim Thu và cộng sự đã công bố phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 2 alcaloid từ loài Thạch tùng đuôi ngựa thu hái tại Tam Đảo (Vĩnh Phúc) là 12-epilycodolin *N*-oxid và fawcettidin [178]. Trong đó hợp chất fawcettidin đã được chúng tôi công bố ở Tạp chí Dược liệu, Số 2, Tập 23 năm 2018.

1.6.2. Công dụng, độc tính và tác dụng sinh học

Loài *Huperzia phlegmaria* được sử dụng trong y học cổ truyền của một số nước như Trung Quốc, Ấn Độ, Việt Nam và một số nước Đông Á. Ở Trung Quốc, toàn cây được ngâm với rượu dùng làm thuốc trị đau họng, thủy thũng, đòn ngã tổn thương, sốt thấp khớp [4], [119]. Ngoài ra, theo một số tác giả, loài *Huperzia phlegmaria* còn được sử dụng trong dân gian điều trị các bệnh viêm khớp dạng thấp, mê đay, mụn nhọt [158], [194]. Tại Việt Nam, theo tác giả Võ Văn Chi (2012), Thạch tùng đuôi ngựa được dùng toàn cây (*Herba Huperziae phlegmariae*) có vị nhạt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt chỉ thống, thông kinh trừ thấp [4]. Hiện nay, chưa tìm thấy thêm tài liệu nào ghi nhận về việc sử dụng loài này trong dân gian để chữa bệnh.

Cho đến nay, chưa tìm thấy công bố nào về độc tính và tác dụng sinh học của loài *Huperzia phlegmaria* trên thế giới cũng như tại Việt Nam. Tuy nhiên, có khá nhiều nghiên cứu về độc tính và tác dụng sinh học của các hợp chất được chứng minh là tồn

tại trong loài *Huperzia phlegmaria* như huperzin A, huperminon A, hupermin A, lycophlegmariol B, lycophlegmariol D, 21 β -Hydroxy-serrat-14-en-3 α -yl acetat, lycophlegmarin và serratenediol. Các nghiên cứu này được trình bày trong phân tổng quan về chi *Huperzia* Bernh. ở mục 1.3. và 1.4.

1.7. TỔNG QUAN MỘT SỐ THUỐC ĐIỀU TRỊ BỆNH ALZHEIMER

Hiện nay, chỉ có 5 loại thuốc đã được Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Dược phẩm Hoa Kỳ (FDA) chấp thuận giúp cải thiện triệu chứng bệnh Alzheimer bao gồm: 4 thuốc là chất ức chế enzym acetylcholinesterase và một thuốc là chất đối kháng thụ thể N-methyl Daspartat (NMDA) [149].

1.7.1. Các thuốc ức chế AChE

Cho đến nay, các chất ức chế AChE vẫn là một liệu pháp tốt nhất được sử dụng trong điều trị Alzheimer [49].

Thế hệ đầu tiên của các chất ức chế AChE là tacrin (Cognex), một dẫn xuất aminoacridin. Tacrin là một chất ức chế thuận nghịch AChE, được FDA phê chuẩn lưu hành vào năm 1993 như là một loại thuốc đầu tiên trong điều trị bệnh Alzheimer. Sau đó, tacrin đã được báo cáo gây độc cho gan và làm suy yếu hệ thống tim mạch [49], nên đã được ngừng sử dụng ở Mỹ vào năm 2013 do lo ngại về an toàn độc tính toàn thân [132].

Thế hệ thứ hai bao gồm donepezil, rivastigmin, và galantamin. Donepezil (Aricept) là một chất ức chế AChE có thể thuận nghịch và không cạnh tranh. Hiện nay, nó là thuốc thường xuyên được sử dụng trong giai đoạn trung bình của bệnh Alzheimer. Bệnh nhân dùng donepezil ít bị kích thích hơn, tâm trạng tốt hơn, ít bị trầm cảm hơn và không gây độc cho gan [49]. Rivastigmin (Ekselon) là dẫn xuất của carbamat, một chất ức chế gần như không thể thuận nghịch. Rivastigmine được FDA phê chuẩn lưu hành vào năm 2000. Rivastigmin không gây ra tác dụng phụ đáng kể, không gây độc cho gan. Thuốc làm giảm đáng kể tâm trạng rối loạn, cải thiện chức năng nhận thức và khả năng để thực hiện các hoạt động hàng ngày [49]. Galantamin (Reminyl) Galantamin là một alkaloid được phân lập từ các loài *Galanthus* spp., được FDA phê chuẩn lưu hành vào năm 2001 [20]. Galantamin là một chất ức chế cạnh tranh, chọn lọc và có thể thuận nghịch đối với AChE.

Ngoài làm tăng acetylcholin, galantamin còn làm tăng mức độ của axit glutamic và acid gamma-amino butyric trong hệ thống thần kinh trung ương. Sử dụng galantamin cải thiện chức năng nhận thức và sự suy giảm các hoạt động hàng ngày [49].

Trong các hoạt chất nêu trên, các thuốc hóa tổng hợp đã được báo cáo là có tác dụng phụ bao gồm rối loạn tiêu hóa và các vấn đề gắn liền với sinh khả dụng [132]. Do đó, việc tìm kiếm chất ức chế AChE tốt hơn từ tài nguyên thiên nhiên vẫn đang là mối quan tâm của các nhà khoa học [18], [179].

1.7.2. Thuốc đối kháng thụ thể NMDA

Memantin là một chất đối kháng thụ thể NMDA không cạnh tranh đã được FDA phê chuẩn để điều trị bệnh Alzheimer vào năm 2003. Memantin được kê cho bệnh nhân Alzheimer dùng thuốc kháng cholinergic không hiệu quả. Có một số dữ liệu cho thấy việc kết hợp các thuốc ức chế AChE và memantin có thể có lợi hơn so với dùng liệu pháp riêng lẻ. Một số thuốc đối kháng thụ thể NMDA đã được tìm thấy có hiệu quả trong Alzheimer từ trung bình đến nặng như neramexan, ifenprodil [149].

Như vậy, hiện nay trên thế giới mới có một số nghiên cứu về thành phần hóa học của loài *Huperzia phlegmaria*. Tại Việt Nam, cho đến khi luận án tiến sĩ được thực hiện (năm 2016), chưa có công bố nào về thành phần hóa học và tác dụng sinh học của loài Thạch tùng đuôi ngựa. Vì vậy, đề tài :“**Nghiên cứu thành phần hóa học và một số tác dụng theo hướng điều trị bệnh Alzheimer của loài Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.**” là cần thiết. Kết quả nghiên cứu của đề tài sẽ cung cấp những tư liệu về thành phần hóa học của chi *Huperzia* Bernh. nói chung và loài *Huperzia phlegmaria* thu hái ở Việt Nam nói riêng; đồng thời cũng góp phần xác định độc tính cấp và tác dụng sinh học theo hướng ức chế enzym acetylcholinesterase của loài *Huperzia phlegmaria* thu hái ở Việt Nam.

CHƯƠNG 2: NGUYÊN VẬT LIỆU, ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu

Nguyên liệu nghiên cứu là thân và lá của cây Thạch tùng đuôi ngựa thu hái tại xã Hướng Sơn, huyện Hướng Hóa, tỉnh Quảng Trị (Tọa độ: 16°47'37.0"N 106°43'44.0"E) vào tháng 5 năm 2016. Tên khoa học được xác định bởi Tiến sĩ Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam là *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. (Phiếu giám định ngày 04/8/2016 của Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam - Phụ lục 1). Mẫu tiêu bản có đủ cơ quan sinh dưỡng (thân, lá, rễ) và cơ quan sinh sản (bào tử) được lưu trữ tại Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược - Đại học Huế với số hiệu mẫu là HP01 và tại Phòng Tiêu bản của Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu với số hiệu là DL-020120.

Cây Thạch tùng đuôi ngựa tươi được sử dụng để nghiên cứu đặc điểm thực vật (đặc điểm hình thái và vi học). Nguyên liệu được thu hái, rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở 50-60°C, xay thành bột thô và bảo quản ở nơi khô thoáng để tiến hành các nghiên cứu về thành phần hóa học, độc tính cấp và tác dụng sinh học.

2.1.2. Hóa chất

- Các hóa chất và thuốc thử đạt tiêu chuẩn phân tích theo quy định của Dược điển Việt Nam V (methanol, ethanol, *n*-butanol, ethylacetat, cloroform, *n*-hexan, DMSO, acetylthiocholin iodid (ACTI), 5,5'-dithiobis-nitrobenzoic acid (DTNB), hydrochloric acid (HCl), kali dihydrophosphat (KH₂PO₄), natri hydroxid (NaOH), natri bicarbonat (NaHCO₃)...). Các dung môi đạt tiêu chuẩn sử dụng cho máy HPLC: methanol, nước cất 2 lần, acetonitril được mua từ hãng Merck – Đức.

- Enzym acetylcholinesterase (AChE): Được cung cấp bởi hãng Sigma-Adrich (Mã sản phẩm: C3389-500UN, số lô: SLBV 7012; hoạt độ: 245 unit/mg).

- Các chất chuẩn được dùng trong các nghiên cứu tác dụng sinh học:

+ Galantamin, donepezil, vitamin E, scopolamin chuẩn được cung cấp bởi hãng Sigma-Adrich (Mã sản phẩm lần lượt là: Y0001279; D6821; 58-95-7 và S1013).

+ D-galactose: được mua từ hãng Mym Biological Technology (Mã sản phẩm: 0625). Bộ kit định lượng các enzym liên quan đến hoạt tính chống lão suy: malondialdehyd (MDA), glutathion peroxidase (GSH-Px), superoxid dismutase (SOD) và các hóa chất đi kèm theo bộ kit của hãng Melsin Medical Co., Limited (Trung Quốc).

2.1.3. Động vật thực nghiệm

- Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino* trưởng thành (trọng lượng từ 20-25g) được sử dụng trong nghiên cứu này do Học viện Quân y cung cấp. Chuột được nuôi trong phòng thoáng mát với chế độ sáng/tối là 12 giờ, không hạn chế về thức ăn và nước uống.

- Mọi qui trình thí nghiệm tuân thủ chặt chẽ theo hướng dẫn chăm sóc và sử dụng động vật trong phòng thí nghiệm của Học viện Quân y.

2.1.4. Trang thiết bị, dụng cụ

2.1.4.1. Trang thiết bị, dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu thực vật, hóa học

- Kính lúp soi nổi: Krussoptroni (Đức).

- Máy ảnh kỹ thuật số Canon (Nhật Bản).

- Dụng cụ cắt vi phẫu cầm tay.

- Sắc ký bản mỏng (TLC) được thực hiện trên bản mỏng trắng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1.05715) và RP-18 F254s (Merck).

- Sắc ký cột được tiến hành với chất hấp phụ là silica gel pha thường (60 N, spherical, 40-50 μ m, Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Nhật Bản), silica gel pha đảo RP-18 (Fuji Silysia Chemical Ltd, Kasugai, Aichi, Nhật Bản) và sắc ký lọc qua gel Sephadex LH-20 (Dowex® 50WX2-100, Sigma-Aldrich, Hoa Kỳ).

- Sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế (*p*-HPLC) được triển khai trên hệ thống máy Agilent Technologies 1260 Infinity II, serial DEAEW01659 (Agilent Technologies, Mỹ), cột Zorbax SB-C18 (cỡ hạt 5 μ m; 9,4 \times 250 mm), đầu dò DAD, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế.

- Điểm nóng chảy được đo trên máy Buchi B-545. Phổ hồng ngoại (IR) được đo trên máy FT-IR Prestige spectrometer (Shimadzu, Japan). Phổ tử ngoại (UV) được đo trên máy UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu, Japan) tại Khoa Hóa, Trường Đại học Sư phạm Huế.

- Góc quay cực ($[\alpha]_D$) được đo trên máy JASCO DIP-1000 KUY polarimeter (Kích thước cell 1dm). Phổ nhĩ sắc tròn (CD) được đo trên máy Jasco J-805 spectropolarimeter (Jasco, Tokyo, Japan) tại Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ khối phân giải cao (HR-ESI-MS) được đo trên máy micrOTOF-Q 10187 (Bruker, Massachusetts, USA) tại Khoa Hóa, Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia và Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT) và hai chiều (HSQC, HMBC, COSY, NOESY) được đo trên máy Bruker AM500 FT-NMR Spectrometer (với TMS là chất chuẩn nội) tại Viện Hoá học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam và máy Varian 400Hz wide-bore NMR Spectrometer, Nhật Bản.

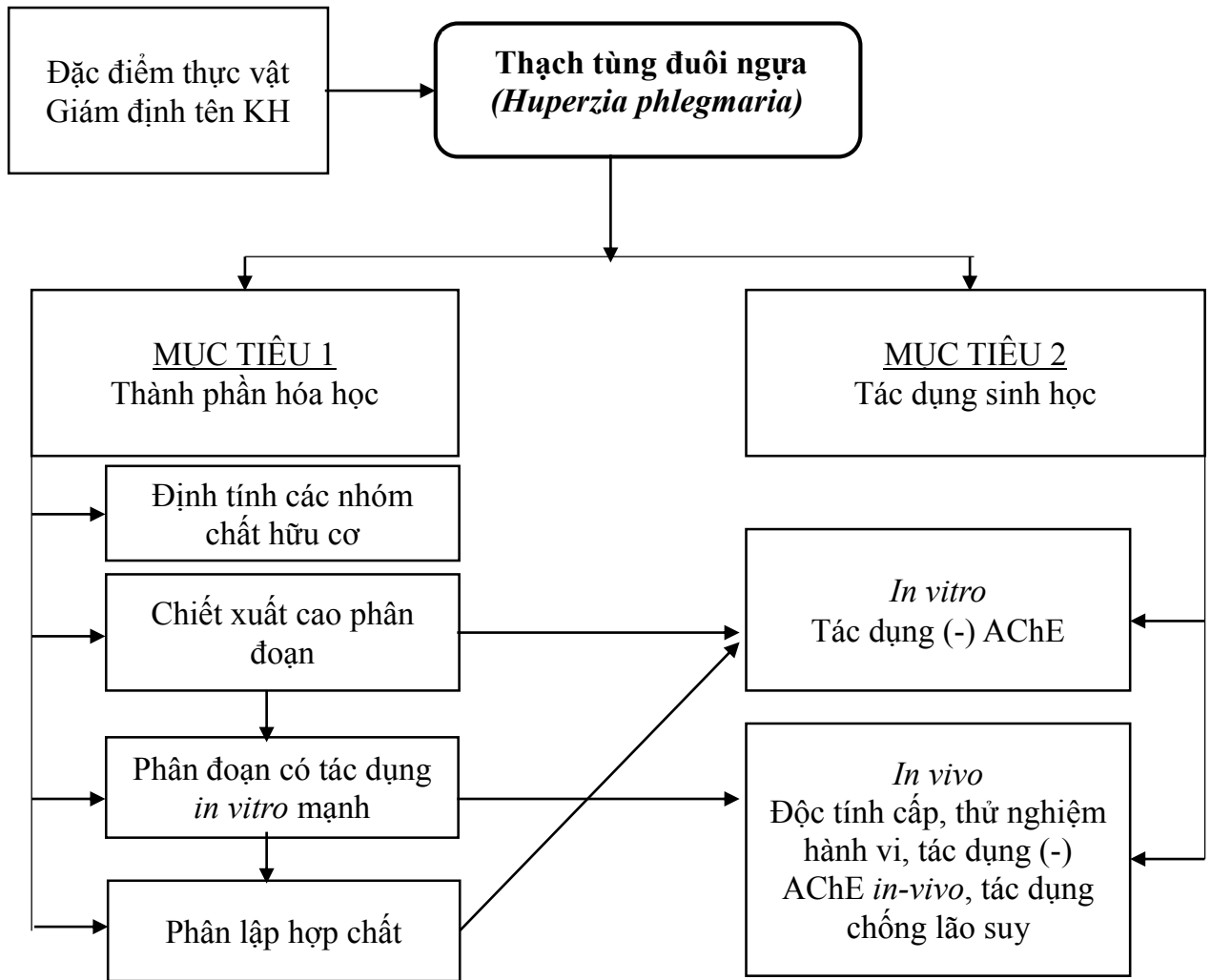
2.1.4.2. Trang thiết bị, dụng cụ sử dụng trong nghiên cứu tác dụng sinh học

- Máy đo quang ELISA Micropate Reader EMR 500 (Hoa Kỳ).
- Bể siêu âm ELMASONIC S100H (Đức), đĩa 96 giếng (Đức).
- Cân phân tích HR – 250AZ (Hàn Quốc) độ chính xác 0,1 mg.
- Micropipette (RAININ – Nhật) và Multi Channel Pipette (CAPP – Đức).
- Mê lộ nước Morris, mê lộ chữ Y, các đồ vật A1, A2, B.
- Phần mềm phân tích kết quả ANY maze (Stoelting-USA), camera nối với máy tính.
- Dụng cụ: cốc có mỏ, bình nón, ống nghiệm, bình định mức nhiều thể tích, đĩa 96 giếng, pipete, effendorf, giấy thấm,...

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

Luận án được thiết kế nghiên cứu theo sơ đồ Hình 2.1.



Hình 2.1. Sơ đồ thiết kế nghiên cứu

2.2.2. Phương pháp nghiên cứu thực vật

2.2.2.1. Phân tích, mô tả hình thái thực vật

- Quan sát, mô tả đặc điểm hình thái của mẫu nghiên cứu tại thực địa theo phương pháp ghi tại các tài liệu [2], [3]. Chụp ảnh, thu hái và làm tiêu bản mẫu khô.

- Phân tích bào tử trên kính lúp soi nổi và chụp ảnh bằng máy ảnh kỹ thuật số.

2.2.2.2. Giám định tên khoa học

Giám định tên khoa học bằng phương pháp so sánh đặc điểm hình thái, đặc điểm bào tử, đối chiếu với các tài liệu và khóa phân loại thực vật [4], [9], [10], [217], [219], đồng thời so sánh với các tiêu bản lưu giữ tại Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật,

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cùng với sự giúp đỡ của các chuyên gia phân loại thực vật.

2.2.2.3. Nghiên cứu đặc điểm vi học

Làm vi phẫu lá và thân theo phương pháp cắt ngang, cắt dọc, nhuộm kép [1], [12]. Quan sát cấu tạo giải phẫu và đặc điểm bột dược liệu dưới kính hiển vi, mô tả và chụp ảnh bằng máy ảnh kỹ thuật số.

2.2.3. Phương pháp nghiên cứu thành phần hóa học

2.2.3.1. Phương pháp định tính các nhóm hợp chất bằng phản ứng hóa học

Định tính các nhóm chất hữu cơ chính trong dịch chiết methanol toàn phần theo các tài liệu [1], [13].

2.2.3.2. Phương pháp chiết xuất, phân lập, tinh chế các hợp chất

Mẫu nghiên cứu thu hái tại huyện Hướng Hóa, tỉnh Quảng Trị được rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở 50-60°C, sau đó xay thành bột thô, được chiết xuất bằng các phương pháp khác nhau lấy cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn để đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro*. Kết quả thu được là cơ sở để tiến hành chiết xuất, phân lập các hợp chất, cụ thể như sau: Tiến hành chiết theo phương pháp chiết acid thu được cao chiết alcaloid toàn phần (ký hiệu HC). Ngoài ra, phần cặn còn lại sau khi chiết alcaloid toàn phần được chiết bằng etylacetat thu được cao ethylacetat (ký hiệu HE).

Phân lập các hợp chất từ phân đoạn HC và phân đoạn HE bằng sắc ký cột và hệ thống sắc ký lỏng hiệu năng cao điều chế. Các phân đoạn trong quá trình phân lập được theo dõi bằng sắc ký lớp mỏng.

2.2.3.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất

Cấu trúc hóa học của các hợp chất được xác định dựa vào các hằng số vật lý (điểm chảy, góc quay cực $[\alpha]_D$) các dữ kiện phổ như phổ hồng ngoại (IR), phổ tử ngoại (UV), phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT) và hai chiều (HMBC, HSQC, COSY, NOESY), phổ nhị sắc tròn (CD) và so sánh với các dữ liệu phổ đã công bố trong tài liệu tham khảo.

2.2.4. Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp và tác dụng sinh học

Từ kết quả sàng lọc đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* của cao chiết toàn phần, cao chiết phân đoạn. Cao chiết có tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* mạnh nhất được tiếp tục tiến hành nghiên cứu độc tính cấp trên động vật thực nghiệm để xác định liều LD₅₀ và các nghiên cứu tác dụng sinh học *in vivo*.

2.2.4.1. Chuẩn bị mẫu thử

a) Mẫu thử để sàng lọc tác dụng ức chế enzym AChE *in vitro*:

- Chiết cao toàn phần: cho khoảng 50 g dược liệu đã xay thô vào bình nón, thêm 300 ml methanol tuyệt đối vừa đủ ngập dược liệu. Siêu âm trong thời gian 3 giờ ở nhiệt độ phòng sau đó lọc thu lấy dịch chiết, chiết 2 lần, gộp dịch chiết rồi đem cô chân không đến kiệt dung môi thu được cao toàn phần (3,0 g).

- Chiết các cao phân đoạn với các dung môi có độ phân cực tăng dần: Cao toàn phần (3,0 g) được phân tán vào 30 ml nước cất rồi tiến hành chiết phân đoạn lần lượt với *n*-hexan, chloroform và ethyl acetat. Với mỗi loại dung môi được chiết lặp lại 3 lần, mỗi lần 30 ml. Sau khi lắc xong, để yên cho phân lớp hoàn toàn, gạn riêng lớp dung môi rồi tiến hành cất thu hồi dung môi đến kiệt dưới áp suất giảm, thu được các cao tương ứng với mỗi phân đoạn là *n*-hexan (0,51 g), chloroform (0,72 g), ethyl acetat (0,90 g) và cao chiết nước còn lại (0,57 g).

- Chiết cao alcaloid: Cao methanol toàn phần (3,0 g) được phân tán vào acid tartaric 3%, siêu âm 10 phút và lọc để tách riêng phần cặn. Dịch lọc acid được điều chỉnh đến pH 10 với dung dịch bão hòa Na₂CO₃, sau đó lắc với dichloromethan (CH₂Cl₂) 3 lần, gộp dịch chiết dichloromethan, loại bỏ hoàn toàn dung môi dưới áp suất giảm thu được cao chiết alcaloid toàn phần (0,36 g).

b) Mẫu thử độc tính cấp và nghiên cứu tác dụng sinh học *in vivo*:

Lấy 1,5 kg thân và lá cây Thạch tùng đuôi ngựa khô (tương đương với 6 kg dược liệu tươi) cho vào bình chiết, đổ methanol ngập dược liệu (khoảng 6 lít), ngâm ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ, sau đó rút lấy dịch chiết, chiết 3 lần, gộp dịch chiết và cô quay dưới áp suất giảm để loại bỏ dung môi thu được cao chiết methanol toàn phần (75 g). Phân tán cao methanol toàn phần trong dung dịch acid tartaric 3% (điều chỉnh để đạt pH 1-2), gạn

lấy dịch lọc. Dịch lọc sau đó được lắc với ethylacetat (để loại tạp), sau đó được kiềm hóa bằng dung dịch Na_2CO_3 bão hòa (điều chỉnh để đạt pH 10). Dung dịch sau khi kiềm hóa được lắc với dichloromethan 3 lần, gộp dịch chiết dichloromethan, cô quay dưới áp suất giảm thu được cao chiết alcaloid toàn phần (8 g). Lặp lại quy trình chiết 3 lần, thu được 24 g cao chiết alcaloid toàn phần (độ ẩm 8,2%).

2.2.4.2. Phương pháp nghiên cứu độc tính cấp

Nghiên cứu độc tính cấp và xác định liều LD_{50} trên chuột nhắt trắng bằng đường uống theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon [107].

- Phương pháp dò liều: Cho 2 chuột nhắt đầu tiên uống cao chiết nồng độ 0,5 g/mL với liều 0,2 ml/20 g cân nặng chuột, 1 lần trong 24 giờ. Theo dõi trong 72 giờ, nếu cả hai chuột chết, pha loãng dần và cho các cặp 2 chuột khác uống cho đến khi xác định được liều dùng chỉ gây chết 1 trong 2 chuột trong vòng 72 giờ [6].

- Phương pháp đánh giá độc tính cấp: Sau khi xác định được liều của cao chiết chỉ gây chết 1 trong 2 chuột. Từ liều này pha thành 5 liều (2 liều cao hơn và 2 liều thấp hơn) với bước nhảy liều nằm trong khoảng 30% nồng độ của cao chiết. Chuột được chia làm 5 lô uống cao chiết tương ứng với 5 liều đã được xác định, mỗi lô 10 con. Theo dõi tình trạng chung và số chuột chết trong vòng 72 giờ. Lập bảng xác định tỷ lệ chuột chết ở các liều và từ đó xác định LD_{50} của cao chiết được liệu theo phương pháp Litchfield – Wilcoxon. Đánh giá thể trạng chuột trong quá trình thử nghiệm. Nghiên cứu độc tính cấp được tiến hành tại Khoa Sinh lý học, Học viện Quân y.

2.2.4.3. Đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro*

Hoạt tính ức chế AChE *in vitro* được đánh giá theo phương pháp Ellman và cộng sự (1961) [48] dựa trên nguyên tắc: Cơ chất acetylthiocholin iodid (ATCI) bị thủy phân nhờ xúc tác của AChE tạo thành thiocholin và acid acetic. Thiocholin phản ứng với thuốc thử Ellman (5,5'-dithio-bis-nitrobenzoic – DTNB) tạo thành hợp chất acid 5-thio-2-nitrobenzoic có màu vàng. Lượng hợp chất màu tạo thành tỷ lệ thuận với hoạt độ của AChE. Dựa vào xác định độ hấp thụ (cường độ màu) của mẫu thử ở bước sóng 405 nm để đánh giá hoạt tính của AChE.

Cách tiến hành như sau: Thêm lần lượt các dung dịch gồm 140 μL dung dịch đệm phosphat pH 8,0, 20 μL dung môi DMSO 10% hoặc mẫu thử và 20 μL dung dịch enzyme (0,25 IU/mL) vào từng giếng của đĩa 96 giếng. Hỗn hợp các dung dịch này được trộn đều và ủ ở 25°C trong 15 phút. Sau đó, 10 μL dung dịch thuốc thử (2,4 mM) và 10 μL dung dịch cơ chất (2,4 mM) lần lượt được thêm vào hỗn hợp và trộn đều. Tiếp tục ủ hỗn hợp trong 15 phút ở 25°C và đo độ hấp thụ ở bước sóng 405 nm. Mỗi thử nghiệm làm lặp lại 3 lần, mỗi lần trên 3 giếng.

Chi tiêu đánh giá:

Phần trăm hoạt tính AChE bị ức chế bởi mẫu thử (I) được tính theo công thức:

$$I (\%) = 100 - \frac{\Delta A_{\text{th}}}{\Delta A_{\text{ch}}} \times 100$$

Trong đó:

I: Phần trăm hoạt tính AChE bị ức chế

ΔA_{th} là hiệu độ hấp thụ của mẫu thử và mẫu trắng của mẫu thử

ΔA_{ch} là hiệu độ hấp thụ của mẫu đối chứng và mẫu trắng của mẫu đối chứng.

Giá trị IC_{50} được xác định từ phương trình hồi quy tuyến tính giữa phần trăm ức chế enzyme AChE và nồng độ của mẫu thử: Các mẫu thử được sàng lọc hoạt tính ở nồng độ 100 $\mu\text{g/ml}$, sau đó tiếp tục pha ở 5 nồng độ khác nhau, xác định phần trăm ức chế của mỗi nồng độ. Xây dựng đường hồi quy tuyến tính thể hiện mối tương quan giữa log nồng độ mẫu thử và phần trăm ức chế AChE bằng phần mềm Excel 2007.

$$I (\%) = \text{algC} + b$$

Giá trị IC_{50} được xác định từ phương trình hồi quy tuyến tính giữa phần trăm ức chế (I%) và logC. Để có cơ sở đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của mẫu nghiên cứu, galantamin được sử dụng làm chất đối chứng dương. Nghiên cứu được thực hiện tại Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế.

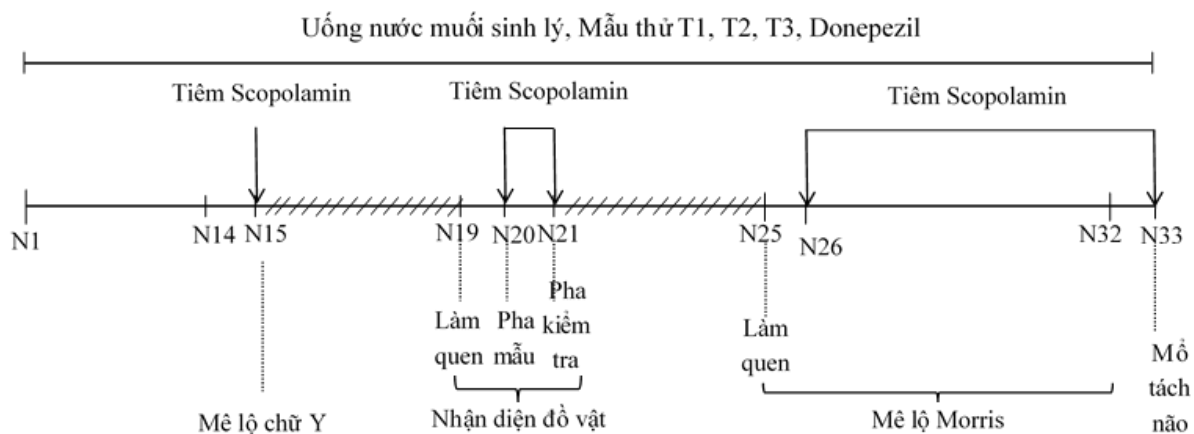
2.2.4.4. Đánh giá tác dụng cải thiện hành vi nhận thức và trí nhớ

a) Phân lô nghiên cứu và bố trí thí nghiệm

Chuột nhắt trắng chủng *Swiss albino* được chia ngẫu nhiên thành 6 nhóm nghiên cứu, mỗi nhóm 10 con, cụ thể:

1. Nhóm chứng sinh lý: uống nước muối sinh lý liều 0,01 ml/g thể trọng
2. Nhóm chứng bệnh lý: tiêm scopolamin liều 1,5 mg/kg (0,01 ml/g thể trọng)
3. Nhóm uống mẫu thử liều 50 mg/kg: uống cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa với liều 50 mg/kg (Ký hiệu: T1, tương ứng với pha nồng độ 5 mg/ml, thể tích cho chuột uống 0,01 ml/g thể trọng).
4. Nhóm uống mẫu thử liều 100 mg/kg: uống cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa với liều 100 mg/kg (Ký hiệu: T2, tương ứng với pha nồng độ 10 mg/ml, thể tích cho chuột uống 0,01 ml/g thể trọng).
5. Nhóm uống mẫu thử liều 150 mg/kg: uống cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa với liều 150 mg/kg (Ký hiệu: T3, tương ứng với pha nồng độ 15 mg/ml, thể tích cho chuột uống 0,01 ml/g thể trọng)
6. Nhóm chứng dương: uống donepezil 5 mg/kg, thể tích cho chuột uống 0,01 ml/g thể trọng.

Các nhóm chuột được tiến hành theo quy trình thí nghiệm như sau: 14 ngày trước khi tiến hành thử nghiệm hành vi, các nhóm chuột được cho uống nước muối sinh lý (nhóm chứng sinh lý và nhóm chứng bệnh lý), cao alcaloid thạch tùng đuôi ngựa với liều 50, 100 và 150 mg/kg (tương ứng với nhóm T1, T2, T3), donepezil 5 mg/kg (nhóm chứng dương). Trong các ngày thử nghiệm hành vi, các nhóm chuột tương ứng được uống nước muối sinh lý, cao chiết alcaloid thạch tùng đuôi ngựa hoặc donepezil tương tự như ngày 14. Sau 30 phút nhóm chứng sinh lý được tiêm nước muối sinh lý với liều 0,01 ml/g thể trọng, các nhóm còn lại được tiêm scopolamin 1,5 mg/kg, tiếp đó 30 phút tiến hành thử nghiệm hành vi. Các thử nghiệm hành vi được tiến hành cách nhau 4 ngày. Quy trình thí nghiệm được tóm tắt như Hình 2.2. Nghiên cứu tiến hành tại Khoa Sinh lý học, Học viện Quân Y.



Hình 2.2. Sơ đồ quy trình thực hiện các thử nghiệm hành vi

b) Đánh giá trên thử nghiệm mê lộ chữ Y

Mô hình thử nghiệm mê lộ chữ Y được thực hiện theo phương pháp được mô tả bởi Wolf A. và cộng sự (2016) [200]. Mê lộ hình chữ Y được làm bằng gỗ và sơn đen, gồm 3 cánh (A, B, C) với góc bằng nhau giữa các cánh. Mỗi cánh có chiều dài 35 cm, rộng 5 cm và thành cao 10 cm. Mục đích của thí nghiệm này nhằm đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc ngắn hạn (working memory), một trong những chức năng của hồi hải mã [125], [200] của cao chiết alcaloid toàn phần của loài Thạch tùng đuôi ngựa trên động vật thực nghiệm.

Trong thí nghiệm này, chuột được đặt ở một cánh bất kỳ của mê lộ và được vận động và khám phá trong cả ba cánh của mê lộ hình chữ Y với thời gian 10 phút. Mọi hành vi của con vật được ghi lại và phân tích bằng phần mềm ANY maze (Stoelting, Hoa Kỳ). Các cánh của mê lộ được làm sạch bằng ethanol 70% giữa các lần thực hiện thử nghiệm để loại bỏ mùi và chất thải của chuột.

Chỉ tiêu đánh giá:

- Vận động luân phiên được xác định dựa vào số lần thành công đi vào 3 cánh khác nhau liên tiếp (ví dụ ABC, CAB, BCA). Giá trị phần trăm vận động luân phiên cao được coi là một trí nhớ làm việc tốt, vì điều này chỉ ra rằng chuột đã nhớ lại những cánh tay nó đã truy cập. Việc đi vào các cánh được xác định khi chuột đặt cả 4 chân vào giới hạn phạm vi của các cánh. Phần trăm vận động luân phiên của chuột được xác định theo công thức [96], [200]:

$$\text{Tỷ lệ vận động luân phiên (\%)} = \frac{\text{Số vận động luân phiên}}{\text{Tổng số lần vào các cánh} - 2} \times 100$$

- Tổng số lần vào các cánh được sử dụng là một chỉ số về hoạt động vận động của chuột.

c) Đánh giá trên thử nghiệm nhận diện đồ vật

Mô hình nhận diện đồ vật lần đầu tiên được thử nghiệm bởi Ennaceur và Delacour (1988), dựa trên sự khám phá khác nhau giữa các đồ vật quen thuộc và đồ vật mới [50]. Thử nghiệm được thực hiện trong môi trường mở (là hộp vuông thành cao kích thước 45 x 45 x 50 cm). Các bước tiến hành như sau:

- Đầu tiên, chuột được cho vào môi trường mở không chứa đồ vật và được tự do khám phá trong vòng 5 phút.

- Pha luyện tập: 24 giờ sau khi chuột làm quen với môi trường, chuột được cho thực hiện thử nghiệm trong pha luyện tập. Ở pha này, chuột được đặt trong môi trường mở với 2 đồ vật giống hệt nhau A1 và A2 được đặt đối xứng nhau và cách thành của môi trường mở khoảng 10 cm. Chuột được tự do khám phá trong vòng 5 phút.

- Pha kiểm tra: được tiến hành sau khi chuột kết thúc pha luyện tập 24 giờ. Ở pha này, một trong hai đồ vật được thay bằng đồ vật mới. Con vật được tự do khám phá trong môi trường mở với đồ vật cũ A (vật A1 hoặc A2) và đồ vật mới (vật B) trong vòng 5 phút.

Tất cả đồ vật có cùng kết cấu và kích thước nhưng khác nhau về hình dạng. Sau mỗi lần tập, tất cả đối tượng được lau bằng ethanol 70% để loại bỏ mùi và chất thải. Thời gian khám phá được xác định là thời gian chuột chạm vào đồ vật bằng mũi và/hoặc bằng hai chân trước. Thời gian khám phá của chuột đối với từng đồ vật được ghi và phân tích bằng phần mềm ANY maze (Stoelting, Hoa Kỳ).

Chỉ tiêu đánh giá:

Tỷ lệ thời gian khám phá của chuột đối với từng đồ vật ở pha luyện tập và pha kiểm tra được tính theo công thức:

$$\text{Tỷ lệ thời gian khám phá vật A hoặc B (\%)} = \frac{\text{Thời gian khám phá vật A hoặc B (s)}}{\text{Tổng thời gian khám phá vật A và B (s)}} \times 100$$

d) Đánh giá trên thử nghiệm mê lộ nước Morris

Thử nghiệm mê lộ nước Morris được thực hiện theo phương pháp của Morris có sửa đổi [106]. Mê lộ là một thùng tròn màu đen (đường kính 80 cm và chiều cao 35 cm) với bề mặt bên trong được sơn đen. Thùng được đổ đầy nước và được cho bột thuốc tím (KMnO_4) không độc để làm tối màu nước, nhiệt độ nước thay đổi trong khoảng $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Bể nước được chia thành 4 góc phần tư phân bằng nhau. Một cái bển đảo nhỏ trong suốt (đường kính 4 cm và chiều cao 18 cm) được đặt ở trung tâm của một trong 4 góc phần tư của thùng nước và ngập dưới bề mặt nước 1 cm để không nhìn thấy. Thùng nước được đặt trong phòng thí nghiệm yên tĩnh với các mốc được đặt xung quanh chậu nước cho con vật có thể định hướng. Vị trí của bển đảo và các mốc xung quanh không thay đổi trong toàn bộ thí nghiệm. Quỹ đường của mỗi chuột bơi từ vị trí bắt đầu đến vị trí của bển đảo được ghi lại bằng máy quay và được phân tích bằng phần mềm ANY maze (Stoelting, Hoa Kỳ).

Thí nghiệm được tiến hành như sau:

+ Ngày đầu tiên (Ngày 0): Trước thí nghiệm, chuột được cho bơi 60 giây trong bể không được đặt bển đảo để làm quen môi trường.

+ Bảy ngày liên tiếp sau đó (Ngày 1 đến ngày 7): Cho mỗi chuột thực hiện 4 lần tập hàng ngày, thời gian giữa các lần tập là khoảng 2 phút. Trong mỗi lần tập, chuột được đặt vào nước, mặt hướng về thành bể ở một trong bốn góc phần tư của bể nước. Chuột được cho bơi mỗi lần tối đa là 1 phút. Nếu sau 1 phút chuột không đứng được trên bển đảo thì bắt chuột đặt lên bển đảo trong vòng 10 giây. Nếu chuột đứng lên được trên bển đảo, thì cho chuột duy trì ở vị trí đó khoảng 10 giây để ghi nhớ vị trí an toàn, sau đó chuột được nhắc ra để tiếp tục lần tập tiếp theo. Thời gian và khoảng cách chuột bơi từ điểm bắt đầu đến bển đảo được xác định.

+ Ngày thứ tám, chuột được thực hiện thử nghiệm mà trong bể không được đặt bển đảo. Thời gian chuột bơi trong góc phần tư đặt bển đảo trước đó được xác định.

Chỉ tiêu đánh giá:

+ Thời gian tiềm né tránh (giây) là giá trị trung bình của thời gian chuột bơi đến bến đỗ từ 4 xuất phát điểm khác nhau. Nếu sau 60 giây chuột không tìm được bến đỗ thì tính thời gian tiềm né là 60 giây.

+ Quãng đường chuột bơi tới đích (m) là giá trị trung bình của khoảng cách chuột bơi từ 4 điểm bắt đầu đến vị trí đặt bến đỗ.

+ Thời gian chuột bơi trong góc phần tư đặt bến đỗ trước đó ở ngày thứ 8 (giây) là thời gian chuột bơi ở góc phần tư đặt bến đỗ trước đó từ điểm xuất phát trong bể bơi.

2.2.4.5. Đánh giá hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase in vivo

Sau khi hoàn thành thử nghiệm hành vi, tất cả chuột được tiến hành cắt đầu, bóc tách hồi hải mã (hippocampus), cân trọng lượng vùng não này, thêm 10 lần thể tích dung dịch đệm phosphat có bổ sung 1% triton, nghiền đồng nhất. Ly tâm 15.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Hút lấy dịch nổi và sử dụng như nguồn enzym trong phương pháp định lượng của Ellman và cộng sự (1961) [48].

- Chuẩn bị trộn hỗn hợp vào trong đĩa 96 giếng: Thêm lần lượt từng dung dịch gồm 160 μ l dung dịch đệm phosphat pH = 8 và 50 μ l dung dịch enzym vào từng giếng của đĩa 96 giếng. Hỗn hợp các dung dịch này được trộn đều và ủ ở 25°C trong 15 phút. Sau đó, thêm lần lượt 20 μ l dung dịch thuốc thử DTNB 10 mM và 20 μ l dung dịch cơ chất acetylthiocholin iodid 30 mM vào hỗn hợp và trộn đều. Tiếp tục ủ hỗn hợp trong 15 phút ở 25°C. Lắc đều bằng máy lắc, đo ngay ở bước sóng 412 nm. Mỗi não chuột được tiến hành lặp lại 3 lần, mỗi lần trên 3 giếng.

- Chỉ tiêu đánh giá: Hoạt độ của enzym acetylcholinesterase (mmol/mg/phút) được tính toán dựa trên độ hấp thụ ở bước sóng 412 nm theo công thức của Ellman [91]:

Hoạt độ AChE (mmol/mg/min) = $[\Delta OD \times mM \times V_{p.ứ} (ml)] / [Phút \times 13,6 \times V_{mẫu} (ml) \times \text{trọng lượng mô não (mg)}]$.

Nghiên cứu tiến hành tại Khoa Sinh lý học, Học viện Quân Y và Khoa Dược lý sinh hóa, Viện Dược liệu.

2.2.4.6. Đánh giá hoạt tính chống lão suy

a) Phân lô nghiên cứu

Chuột được chia ngẫu nhiên thành 6 nhóm, mỗi nhóm 10 con như sau:

- Nhóm chứng sinh lý: tiêm dưới da nước muối sinh lý (liều 0,01 ml/g thể trọng) trong 4 tuần, sau đó uống nước muối sinh lý trong 4 tuần tiếp theo.

- Nhóm chứng bệnh lý: Tiêm dưới da D-galactose 100 mg/kg liên tục trong 4 tuần, sau đó uống nước muối sinh lý trong 4 tuần tiếp theo.

- Nhóm dùng mẫu thử: Tiêm dưới da D-galactose 100 mg/kg liên tục trong 4 tuần, sau đó uống cao chiết alcaloid toàn phần của loài Thạch tùng đuôi ngựa liều 50 mg/kg (T1), 100 mg/kg (T2) và 150 mg/kg (T3) trong 4 tuần tiếp theo.

- Nhóm chứng dương: Tiêm dưới da D-galactose 100 mg/kg liên tục trong 4 tuần, sau đó uống Vitamin E liều 50 mg/kg trong 4 tuần tiếp theo.

b) Xác định nồng độ các enzym liên quan đến hoạt tính chống lão suy

Tiến hành nghiên cứu tác dụng chống lão suy của mẫu thử trên chuột gây lão suy bằng mô hình sử dụng D-galactose [77], [209].

Sau 4 tuần uống mẫu nghiên cứu, tiến hành lấy máu chuột từ hốc mắt, chống đông bằng EDTA. Máu sau khi lấy được ly tâm với tốc độ 3000 vòng/phút x 10 phút. Thu huyết tương vào ống nghiệm và bảo quản trong tủ lạnh - 80°C cho đến khi sử dụng.

Phương pháp định lượng nồng độ các enzym được tiến hành như sau:

* Nguyên lý:

Xét nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết với enzym (ELISA) cho phép định lượng nồng độ MDA, GSH-Px, SOD của chuột trong huyết tương, huyết thanh và các chất lỏng sinh học khác trên *in vitro*.

Bộ kit sử dụng là kit ELISA kiểu Sandwich, trong đó kháng thể tinh sạch MDA, GSH-PX, SOD của chuột gắn phủ lên bề mặt các giếng của từng kit riêng rẽ tạo lớp kháng thể pha rắn. Sau đó cho mẫu chứa các chất cần định lượng vào các giếng, tiếp theo cho kháng thể đặc hiệu với các chất cần định lượng có gắn các enzym phản ứng tạo màu (Horseradish peroxidase – HRP) tạo thành phức hợp “kháng thể - kháng nguyên -

kháng thể gắn enzym”. Sau khi rửa sạch những thành phần không gắn đặc hiệu, cho chất nền có phản ứng hóa học với enzym gắn với kháng thể vào trong giếng, chất nền sẽ chuyển thành màu xanh dưới xúc tác của enzym HRP, độ đậm màu sắc sẽ tương ứng với lượng chất có trong mẫu cần định lượng. Kết thúc phản ứng bằng cách cho thêm một lượng acid sulfuric vừa đủ, dung dịch trong giếng sẽ chuyển màu và tiến hành đo mật độ quang (OD – Optical Density) ở các bước sóng 532 nm (MDA), 415 nm (GSH-Px) và 450 nm (SOD). Nồng độ chất quan tâm có trong các mẫu thử sau đó được xác định bằng cách so sánh OD của mẫu thử với đường chuẩn.

** Chuẩn bị mẫu:*

Mẫu máu chuột được cho vào ống chống đông bằng EDTA. Li tâm với tốc độ 3000 vòng/phút trong 10 phút, tiến hành tách lấy huyết tương. Thực hiện thí nghiệm ngay sau đó hoặc lưu mẫu ở nhiệt độ - 20°C hoặc hơn trong trường hợp chưa thực hiện. Nếu lưu mẫu phải tiến hành li tâm lại mẫu thu dịch nổi sau khi tiến hành rã đông rồi thực hiện thí nghiệm theo các bước sau:

** Các bước tiến hành:*

Các bước tiến hành được tuân theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

** Tính kết quả:*

Vẽ đường chuẩn với trục hoành là nồng độ chuẩn, trục tung là giá trị độ hấp thụ ở bước sóng 532 nm, 415 nm và 450 nm của chất chuẩn MDA, GSH-Px và SOD tương ứng. Từ đó quy ra nồng độ các chất cần quan tâm tương ứng theo giá trị OD của các mẫu cần xác định dựa vào đường cong chuẩn sau đó nhân với hệ số pha loãng của mẫu để ra nồng độ cuối cùng. Nghiên cứu tiến hành tại Khoa Sinh lý học, Học viện Quân Y.

2.3. PHƯƠNG PHÁP PHÂN TÍCH, XỬ LÝ SỐ LIỆU

Các số liệu thu thập được xử lý bằng phương pháp thống kê y sinh học, sử dụng phần mềm SPSS 22.0 và phần mềm Excel 2007.

Số liệu hành vi trong thử nghiệm mê lộ hình chữ Y, thời gian chuột bơi trong vùng bên đố ở ngày thứ 8 trong thử nghiệm mê lộ nước Morris, hoạt độ của enzym AChE, nồng độ các enzym trong đánh giá hoạt động lão suy được phân tích bằng phương pháp so sánh phương sai một nhân tố (One-way ANOVA), sử dụng kiểm định Tukey

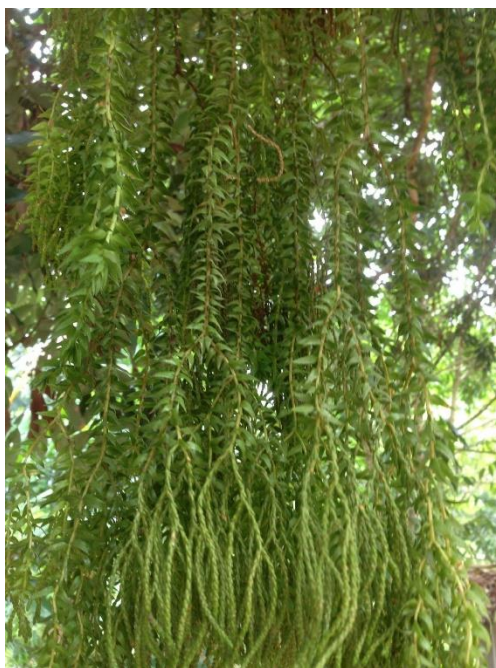
cho phân tích sâu (Post-Hoc) khi so sánh từng nhóm nghiên cứu; Số liệu về thời gian tiềm và quãng đường bơi đến bên đảo trong thử nghiệm mê lộ nước Morris được phân tích bằng phương pháp so sánh phương sai hai nhân tố có lặp (Repeated Two-way ANOVA); Số liệu hành vi về thời gian khám phá trong pha luyện tập và pha kiểm tra trong thử nghiệm nhận thức đồ vật được phân tích bằng phương pháp so sánh cặp (paired-sample t-test).

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THỰC VẬT

3.1.1. Đặc điểm hình thái cây Thạch tùng đuôi ngựa

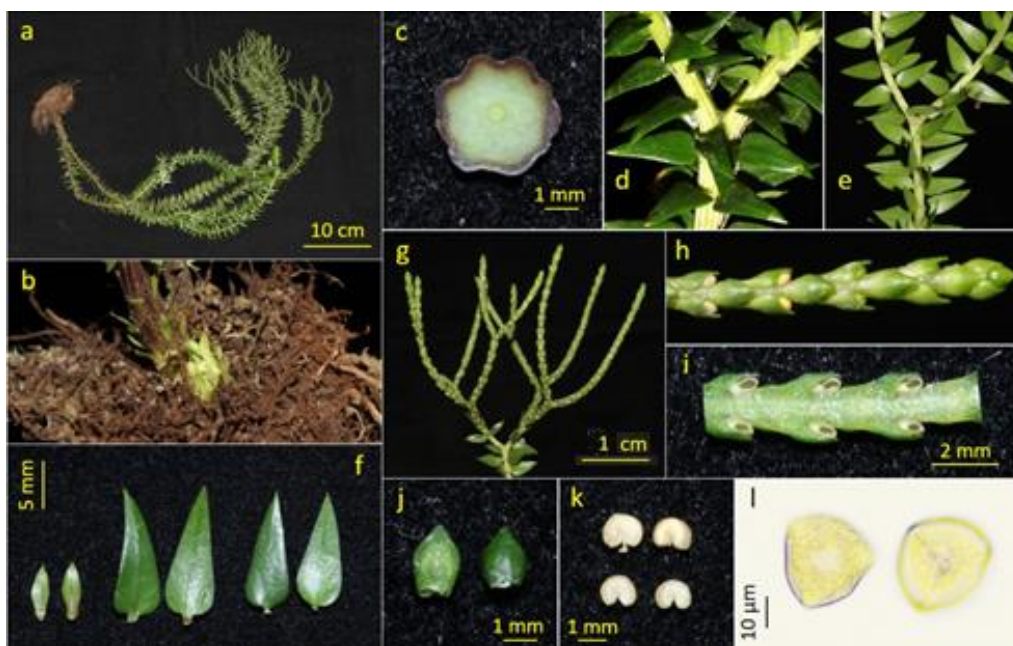
Dạng sống: Cây cỏ, phụ sinh, mọc thành bụi, rủ xuống, dài khoảng 30 – 100 cm, cành phân chia theo kiểu lưỡng phân 4 – 6 lần, dài 30 – 50 cm (Hình 3.1).



Hình 3.1. Ảnh cây Thạch tùng đuôi ngựa do nghiên cứu sinh chụp tại xã Hương Sơn, huyện Hương Hóa, tỉnh Quảng Trị

Thân chính có đường kính ở gốc khoảng 5 mm, có cạnh rõ chạy dọc thân, màu tím nâu ở phần gốc, xanh ở phần thân trên. Các lá ở phần gốc nhỏ, hình elip hẹp, kích thước khoảng 5 x 2 mm, có gân chính rõ, mép lá nguyên, đỉnh nhọn; các lá ở phần trên hình trứng hoặc tam giác, kích thước khoảng 8 x 5 mm, dạng thịt, có gân chính rõ, mép lá nguyên, đỉnh lá nhọn, gốc lá tròn; cuống lá ngắn khoảng 0,5 – 0,6 mm, bị vặn xoắn 90⁰ ở những lá gần trên đỉnh làm cho các lá này nhìn như xếp dọc ở thân. Bông lá bào tử ở đỉnh cành, lưỡng phân 2 – 4 lần, hình trụ, đường kính 2 mm, dài 4 – 8 cm. Lá bào tử sắp xếp đối chéo chữ thập, hình trứng hoặc tam giác, kích thước khoảng 2 x 1,4 mm, mép nguyên, đỉnh nhọn. Túi bào tử màu vàng nhạt, hình thận, có chân, nứt dọc chia ra

hai mảnh bằng nhau. Hạt bào tử hình khối tam giác lồi ba cạnh, kích thước khoảng 30 μm (Hình 3.2).



Hình 3.2. Đặc điểm hình thái của loài Thạch tùng đuôi ngựa thu hái tại tỉnh Quảng Trị, Việt Nam

a. Cả cây; b. Gốc mang lá dạng vảy; c. Mặt cắt thân; d. Lá ở phần thân dưới; e. Lá ở phần thân trên; f. Lá (2 lá ngoài cùng ở gốc thân); g - h. Bông lá bào tử; i. Bông lá bào tử cắt dọc; j. Lá bào tử (mặt trong và ngoài); k. Túi bào tử; l. Hạt bào tử nhìn từ mặt lưng và mặt bụng.

3.1.2. Kết quả giám định tên khoa học

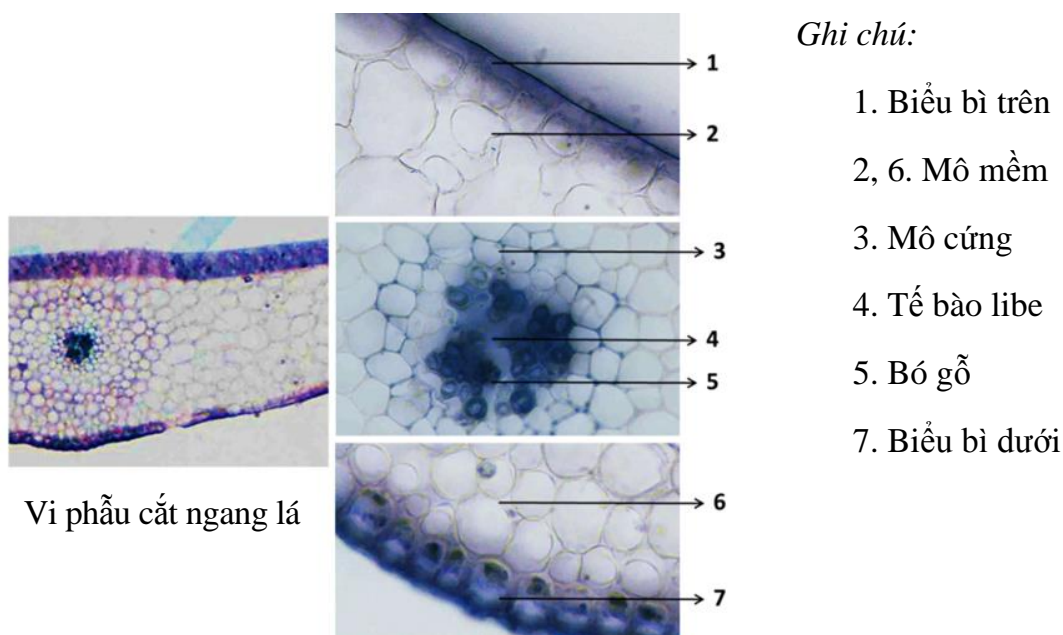
Sau khi quan sát, phân tích các đặc điểm hình thái của mẫu cây nghiên cứu, đối chiếu với các tài liệu, khóa phân loại và mẫu tiêu bản lưu ở Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, tiến sĩ Nguyễn Thế Cường đã giám định tên khoa học của cây Thạch tùng đuôi ngựa là *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. thuộc họ Lycopodiaceae, tên đồng nghĩa: *Phlegmatium phlegmaria* (L.) Holub, *Lepidotis phlegmaria* (L.) P.Beauv., *Urostachys phlegmaria* (L.) Herter ex Nessel, *Lycopodium phlegmaria* L. (Phiếu giám định ngày 04/8/2016 của Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam - Phụ lục 1). Mẫu tiêu bản có đủ cơ quan sinh dưỡng (thân, lá, rễ) và cơ quan sinh sản (bào tử) được lưu

trữ tại Khoa Dược, Trường Đại học Y Dược - Đại học Huế với số hiệu mẫu là HP01 và tại Phòng Tiêu bản của Khoa Tài nguyên Dược liệu - Viện Dược liệu với số hiệu là DL-020120.

3.1.3. Cấu tạo giải phẫu

3.1.3.1. Cấu tạo vi phẫu lá

Mặt cắt ngang lá cây có hình dải, hơi lõm ở mặt dưới. Quan sát dưới kính hiển vi vật kính 40 cho thấy cấu tạo gồm biểu bì trên (1) và biểu bì dưới (7), cấu tạo bởi một lớp tế bào hình tròn xếp đều đặn nhau, phủ lớp cutin dày ở phía ngoài. Mô mềm (2, 6) gồm các tế bào hình đa giác, kích thước lớn, xếp lộn xộn, để hở các khoảng gian bào lớn. Mô cứng (3), gồm các tế bào xếp thành vòng tròn kín ở giữa vi phẫu. Bó libe gỗ ở bên trong mô cứng, bó gỗ (5) gồm các mạch gỗ nhỏ kích thước đều nhau xen kẽ với các tế bào libe (4) có kích thước rất nhỏ (Hình 3.3).



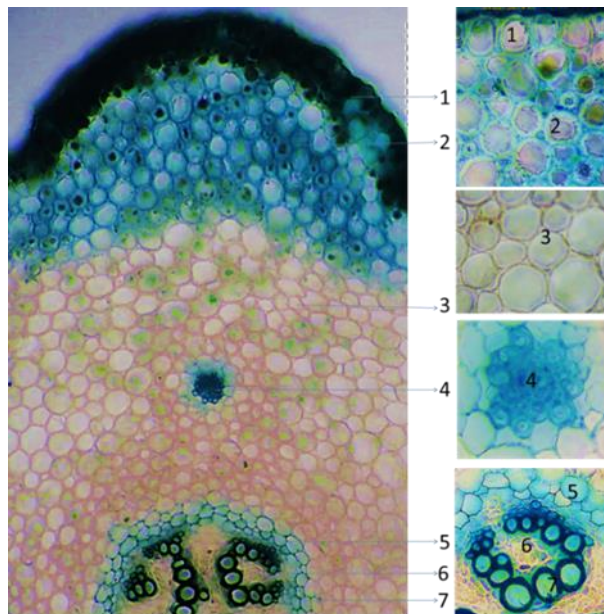
Vi phẫu cắt ngang lá

Hình 3.3. Đặc điểm vi phẫu lá cây

3.1.3.2. Cấu tạo vi phẫu thân

Mặt cắt ngang qua thân cây có tiết diện hình uốn lượn. Quan sát dưới kính hiển vi vật kính 40 cho thấy cấu tạo từ ngoài vào trong gồm có: Biểu bì (1), gồm các tế bào hình tròn xếp đều đặn nhau, màng ngoài phủ lớp cutin màu xanh đậm. Mô cứng (2), gồm 5-8 lớp tế bào có vách rất dày bất màu xanh đậm, tập trung ở một vài khúc lượn

của vi phẫu. Mô mềm vỏ (3), gồm các tế bào hình tròn xếp xen kẽ nhau để hở các khoảng gian bào. Mô cứng (4) gồm các tế bào có vách rất dày tập trung thành đám xếp rải rác trong mô mềm vỏ và xếp thành vòng tròn khép kín (5). Bó libe (6), gồm các tế bào có kích thước rất nhỏ, hình thù đa dạng. Bó gỗ (7), gồm các mạch gỗ lớn ở phía trong nhỏ ở phía ngoài, xếp thành hình tam giác xung quanh bó libe (Hình 3.4).



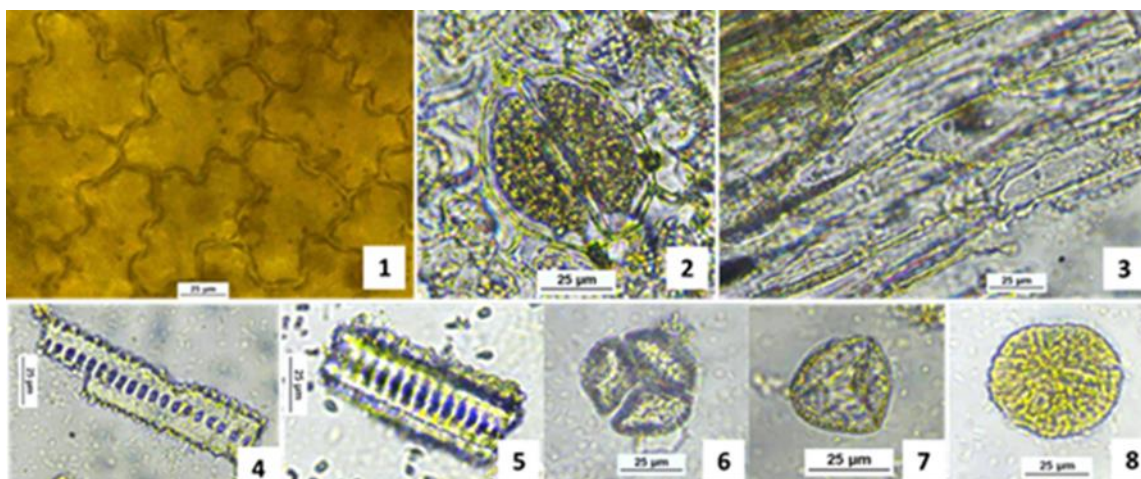
Ghi chú:

1. Biểu bì
- 2, 4, 5. Mô cứng
3. Mô mềm vỏ
6. Bó libe
7. Bó gỗ

Hình 3.4. Đặc điểm vi phẫu cắt ngang thân cây

3.1.3.3. Đặc điểm bột thân và lá

Bột màu xanh lục nhạt. Soi trên kính hiển vi vật kính 40 cho thấy các đặc điểm sau: Mảnh biểu bì dưới (1) gồm các tế bào hình nhiều cạnh xếp sát nhau. Mảnh biểu bì mang lỗ khí (2). Mảnh mô mềm (3) gồm các tế bào dài, thành tế bào mỏng. Mảnh mạch vòng (4) và mảnh mạch hình thang (5). Các bào tử phân thành ba nhánh hình tam giác lồi ba cạnh (6,7,8) (Hình 3.5).



Ghi chú: 1. Mảnh biểu bì dưới; 2. Mảnh biểu bì có chứa lỗ khí; 3. Mảnh mô mềm; 4. Mảnh mạch vòng; 5. Mảnh mạch thang; 6,7,8. Bào tử

Hình 3.5. Đặc điểm bột thân và lá

3.2. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC

3.2.1. Kết quả định tính các nhóm hợp chất bằng phản ứng hóa học

Kết quả định tính các nhóm chất chính trong dịch chiết methanol của thân và lá cây Thạch tùng đuôi ngựa được trình bày ở Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Kết quả định tính các nhóm chất bằng phản ứng hóa học

TT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
1	Glycosid tim	Phản ứng Liebermann-Burchard	-	Không có
		Phản ứng Baljet	-	
		Phản ứng Legal	-	
		Phản ứng Keller-Kiliani	-	
2	Flavonoid	Phản ứng Cyanidin	+	Có
		Phản ứng với dung dịch NaOH 10%	+	
		Phản ứng với hơi amoniac	+	
		Phản ứng với dung dịch FeCl ₃ 5%	++	
3	Saponin	Hiện tượng tạo bọt	+	Có
		Phản ứng Salkowski	+++	
		Phản ứng Liebermann-Burchard	+++	
4	Coumarin	Phản ứng đóng mở vòng lacton	++	Có
		Phản ứng Diazo hóa	+	

TT	Nhóm chất	Phản ứng định tính	Kết quả	Kết luận
		Phản ứng chuyển đồng phân cis sang đồng phân trans dưới tác dụng của tia tử ngoại	+	
5	Tanin	Phản ứng với dung dịch FeCl ₃ 5%	++	Có
		Phản ứng với chì acetat	+	
		Phản ứng với dung dịch gelatin 1%	+	
6	Anthranoid	Phản ứng Borntraeger	-	Không có
		Thử nghiệm vi thăng hoa	-	
7	Alcaloid	Phản ứng với TT Mayer	++	Có
		Phản ứng với TT Bouchard	+++	
		Phản ứng với TT Dragendorff	+++	
8	Chất béo	Vết mờ trên giấy lọc	+++	Có
9	Steroid	Phản ứng Liebermann	+	Có
10	Carotenoid	Thuốc thử H ₂ SO ₄ đậm đặc	+	Có
11	Acid hữu cơ	Phản ứng với Na ₂ CO ₃	-	Không có
12	Đường khử	Thuốc thử Felling A,B	++	Có
13	Acid amin	Thuốc thử Ninhydrin 0,1%	+	Có
14	Polysaccharid	Thuốc thử Lugol	+	Có

Ghi chú: (-) âm tính, (+) dương tính, (++) dương tính rõ, (+++) dương tính rất rõ

Kết quả ở Bảng 3.1 cho thấy các nhóm hợp chất có trong loài Thạch tùng đuôi ngựa gồm: Flavonoid, saponin, coumarin, tanin, alcaloid, chất béo, steroid, carotenoid, đường khử, acid amin và polysaccharid.

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

Cao chiết toàn phần và các cao chiết phân đoạn từ loài Thạch tùng đuôi ngựa được chuẩn bị mẫu thử ở mục 2.2.3.1 và đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* theo phương pháp ghi ở mục 2.2.3.3. Kết quả được trình bày ở Bảng 3.2.

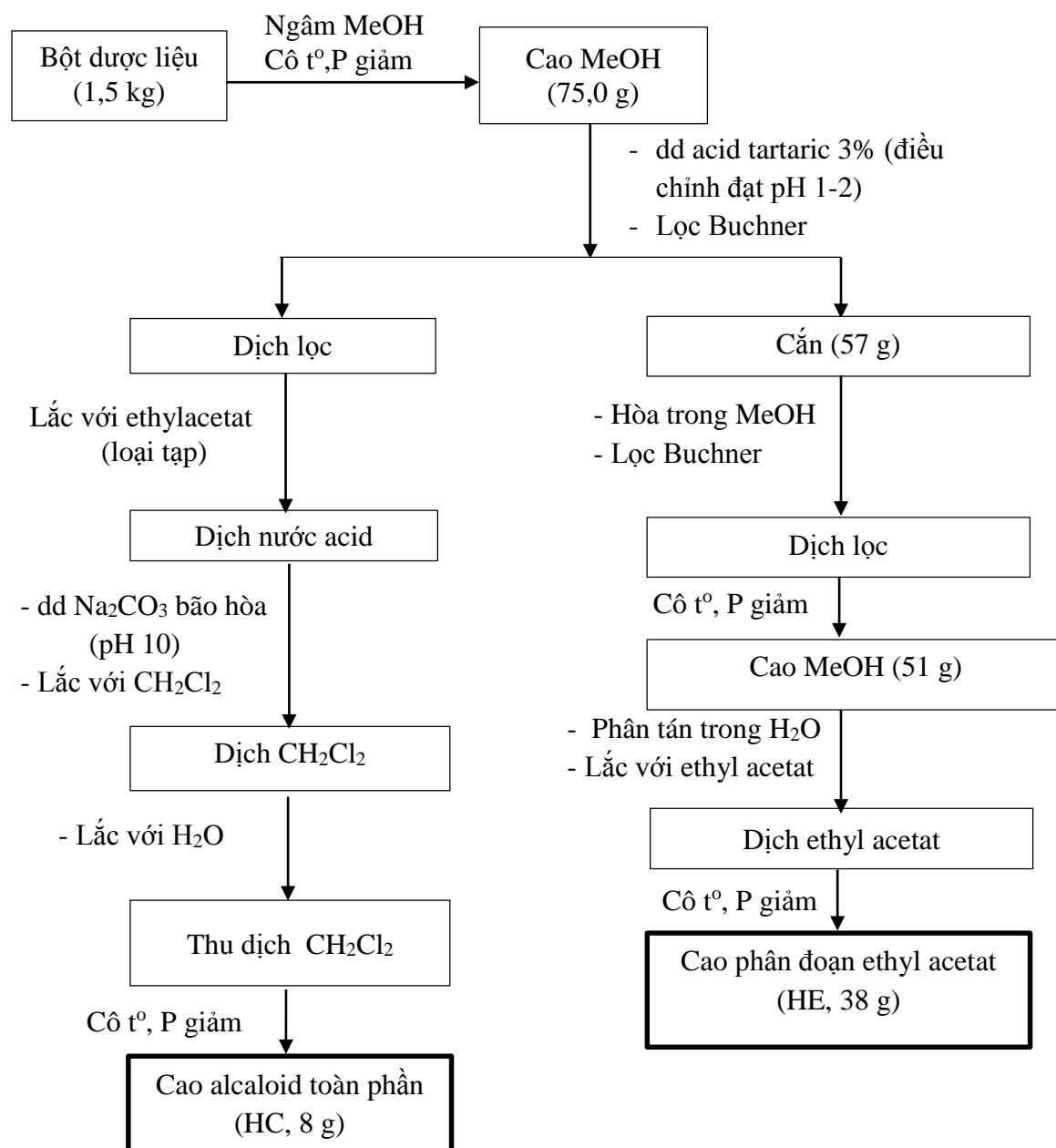
Bảng 3.2. Hoạt tính ức chế AChE của các mẫu cao chiết

Mẫu nghiên cứu	IC ₅₀ ± SD (µg/ml)
Cao chiết MeOH	97,44 ± 2,33
Cao chiết <i>n</i> -hexan	>1000
Cao chiết dicloromethan	433,07 ± 7,16
Cao chiết ethyl acetat	>1000
Cao chiết nước	49,81 ± 0,80
Cao chiết alcaloid	1,54 ± 0,10
Galantamin (Chứng dương)	0,33 ± 0,01

Từ Bảng 3.2 cho thấy, các mẫu cao phân đoạn chiết bằng phương pháp thường quy với các dung môi có độ phân cực tăng dần cho hoạt tính ức chế AChE với giá trị IC₅₀ từ 49,81 ± 0,80 đến 433,07 ± 7,16 µg/ml hoặc không có hoạt tính. Mẫu cao chiết alcaloid toàn phần có hoạt tính mạnh nhất với giá trị IC₅₀ 1,54 ± 0,10 µg/ml, chỉ yếu hơn hoạt tính của chất đối chứng dương galantamin 4,67 lần trong cùng điều kiện thử nghiệm. Do đó, quy trình chiết xuất được lựa chọn là phương pháp chiết xuất alcaloid để nghiên cứu thành phần hóa học của loài Thạch tùng đuôi ngựa. Phân đoạn alcaloid được lựa chọn để tiến hành nghiên cứu độc tính cấp và các nghiên cứu tác dụng sinh học *in vivo*.

3.2.3. Chiết xuất và phân lập các hợp chất

Thân và lá của cây Thạch tùng đuôi ngựa được rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở 50°C (1,5 kg) sau đó tán thành bột thô, chiết bằng MeOH (3 lần, mỗi lần 5,0 L) ở nhiệt độ phòng. Gộp dịch chiết và tiến hành cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được 75g cao toàn phần. Cao toàn phần được hòa tan bằng acid tartaric 3% (1,0 L), lọc, thu được dịch lọc (phân đoạn alcaloid) và phần cặn (57g) (Hình 3.6).



Hình 3.6. Sơ đồ chiết xuất thân và lá cây Thạch tùng đuôi ngựa

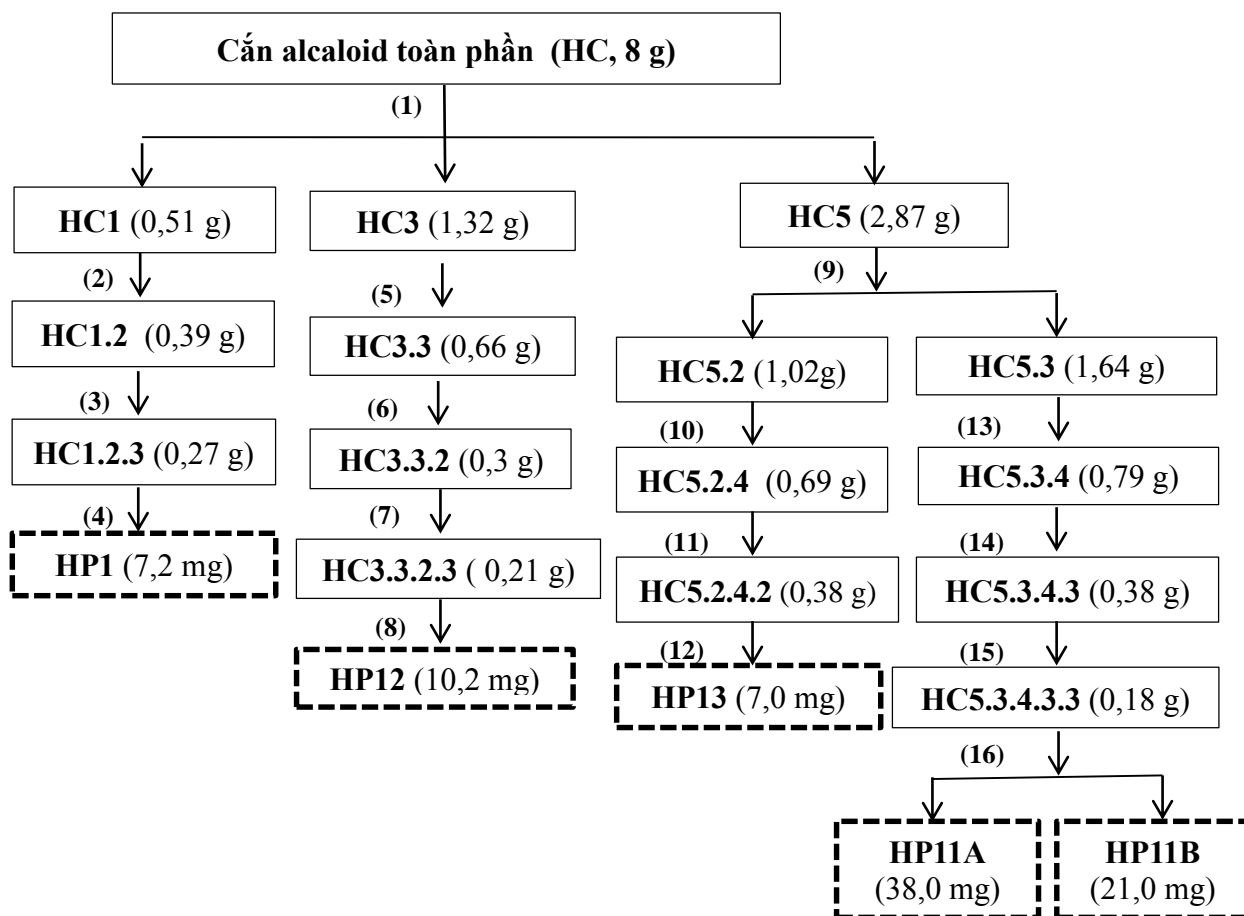
a) Phân lập các hợp chất từ cao phân đoạn alcaloid (HC)

Dịch lọc acid lắc với ethyl acetat để loại tạp, sau đó được điều chỉnh đến pH 10 với dung dịch bão hòa Na_2CO_3 , tiếp tục lắc với dichloromethan (CH_2Cl_2), gộp dịch chiết dichloromethan, lắc với nước để loại bỏ kiềm dư, sau đó loại bỏ dung môi dưới áp suất giảm thu được cắn alcaloid toàn phần (HC, 8 g). Cắn HC được đưa lên cột sắc ký pha thường với hệ dung môi CH_2Cl_2 -MeOH (40:1 \rightarrow 10:1, v/v) thu được 6 phân đoạn (HC1-HC6) (Hình 3.7).

+ Phân đoạn HC1 (0,51 g) được đưa lên cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH (4:1, v/v) thu được 5 phân đoạn (HC1.1-HC1.5). Phân đoạn HC1.2 (0,39 g) được tiến hành qua cột sắc ký pha đảo RP-18 với hệ dung môi Aceton-MeOH-H₂O (1:1:0,1, v/v), sau đó tiếp tục cho qua cột Sephadex LH-20 với dung môi MeOH thu được hợp chất **HP1** (7,2 mg).

+ Phân đoạn HC3 (1,32 g) được đưa lên cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH (9:1, v/v) thu được 4 phân đoạn (HC3.1-HC3.4). Phân đoạn HC3.3 (0,66 g) được phân lập trên cột sắc ký pha đảo với hệ dung môi ACN-Aceton-H₂O (5:5:1, v/v) thu được 6 phân đoạn (HC3.3.1-HC3.3.6). Tiếp tục triển khai phân đoạn HC3.3.2 (0,30 g) trên cột Sephadex LH-20 với dung môi MeOH thu được 4 phân đoạn (HC3.3.2.1-HC3.3.2.4). Phân đoạn HC3.3.2.3 (0,21 g) được tinh chế trên hệ thống HPLC điều chế (cột Zorbax SB-C18 9,4 x 250 mm, 5 μm) với pha động là hệ dung môi MeOH-H₂O (45:55, v/v) trong 12 phút, sau đó tăng dần tỉ lệ MeOH lên đến 100% trong 30 phút tiếp theo, tốc độ dòng 2 ml/phút, thu được hợp chất **HP12** (10,2 mg) tương ứng với pic có thời gian lưu là 17,32 phút trên sắc ký đồ.

+ Phân đoạn HC5 (2,87 g) được triển khai trên cột sắc ký Sephadex LH-20 với dung môi là MeOH thu được 5 phân đoạn (HC5.1-HC5.5). Phân đoạn HC5.2 (1,02 g) được triển khai trên sắc ký cột pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂-aceton-MeOH (8:1:0,5, v/v) thu được 4 phân đoạn (HC5.2.1-HC5.2.4). Phân đoạn HC5.2.4 (0,69 g) được đưa lên cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi MeOH-H₂O (3:1, v/v) thu được 3 phân đoạn (HC5.2.4.1-HC5.2.4.3). Tiếp tục tinh chế phân đoạn HC5.2.4.2 (0,38 g) trên hệ thống HPLC điều chế với pha động là hệ dung môi MeOH-H₂O-ACN (4:5:1, v/v) trong 30 phút, tốc độ dòng 2 ml/phút, thu được hợp chất **HP13** (7 mg) tương ứng với pic có thời gian lưu là 14,46 phút trên sắc ký đồ.



KH	Pha tĩnh	Pha động
(1)	Silica gel	Gradient CH ₂ Cl ₂ -MeOH (40:1 → 10:1, v/v)
(2)	Sephadex LH-20	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (4:1, v/v)
(3)	YMC RP-18	Aceton-MeOH-H ₂ O (1:1:0,1, v/v)
(4)	Sephadex LH-20	MeOH
(5)	Sephadex LH-20	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1, v/v)
(6)	YMC RP-18	ACN-Aceton-H ₂ O (5:5:1, v/v)
(7)	Sephadex LH-20	MeOH
(8)	HPLC	MeOH-H ₂ O (45:55, v/v) trong 12 phút, 100% MeOH trong 30 phút tiếp theo
(9)	Sephadex LH-20	MeOH
(10)	Silica gel	CH ₂ Cl ₂ -aceton-MeOH (8:1:0,5, v/v)
(11)	Sephadex LH-20	MeOH-H ₂ O (3:1, v/v)
(12)	HPLC	MeOH-H ₂ O-ACN (4:5:1, v/v) trong 30 phút
(13)	YMC RP-18	Aceton-MeOH-H ₂ O (1:3:1, v/v)
(14)	Silica gel	CH ₂ Cl ₂ -ACN-ethylamin (10:1:0,1, v/v)
(15)	Sephadex LH-20	MeOH-H ₂ O (4:1, v/v)
(16)	HPLC	MeOH-H ₂ O (60:40, v/v)

Hình 3.7. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao alcaloid

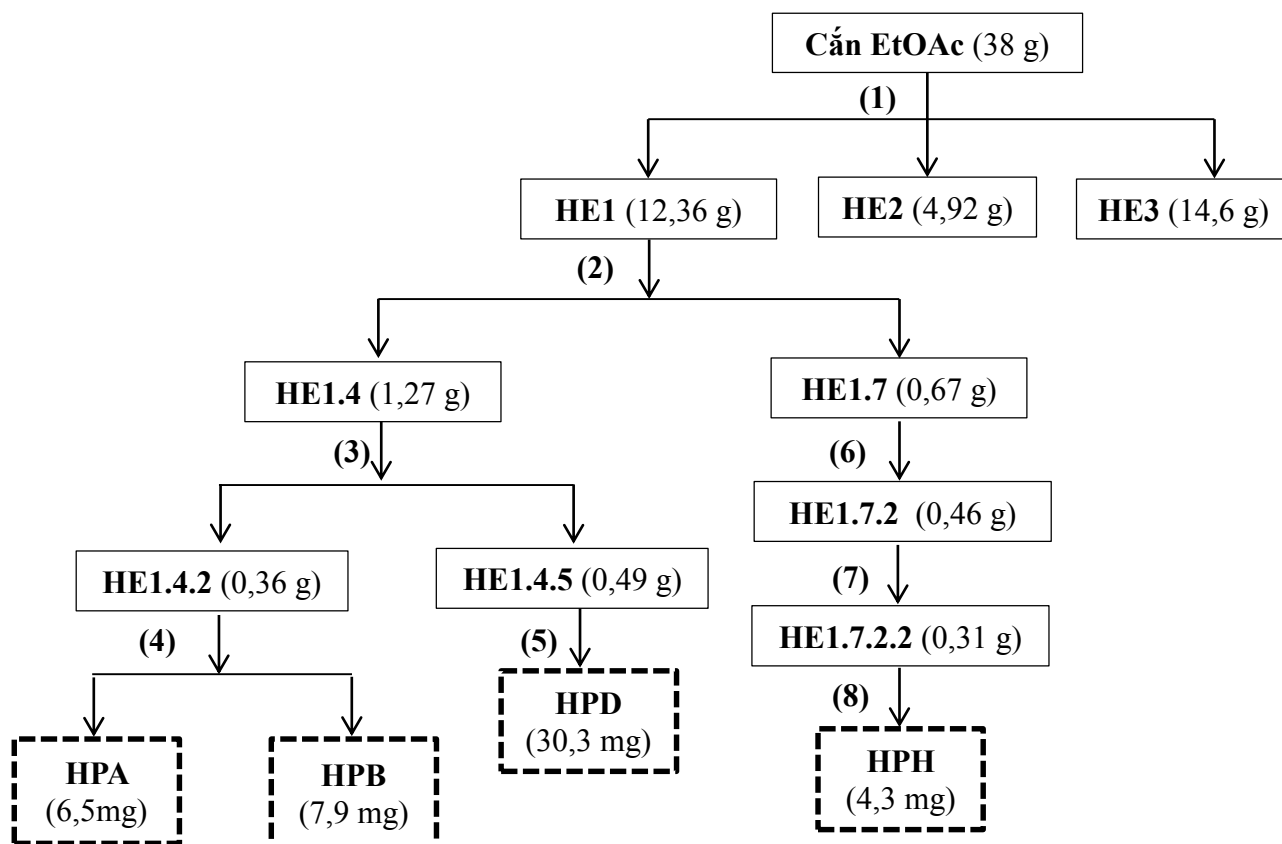
+ Phân đoạn HC5.3 (1,64 g) được đưa trên cột sắc ký pha đảo YMC RP-18 với hệ dung môi khai triển là aceton-MeOH-H₂O (1:3:1, v/v) thu được 7 phân đoạn (HC5.3.1-HC5.3.7). Phân đoạn HC5.3.4 (0,79 g) được tiếp tục triển khai trên cột sắc ký pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂-ACN-ethylamin (10:1:0,1, v/v) thu được 5 phân đoạn (HC5.3.4.1-HC5.3.4.5). Phân đoạn HC5.3.4.3 (0,38 g) được đưa lên cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi MeOH-H₂O (4:1, v/v) thu được HC5.3.4.3.3 (0,18 g), sau đó được tinh chế bằng hệ thống HPLC điều chế với pha động là hệ dung môi MeOH-H₂O (60:40, v/v), tốc độ dòng 2 ml/phút, thu được 2 hợp chất tinh khiết là **HP11A** (38,0 mg) và **HP11B** (21,0 mg) tương ứng với các pic có thời gian lưu lần lượt là 19,94 và 22,51 phút trên sắc ký đồ.

b) Phân lập các hợp chất từ cao ethyl acetat (HE)

Phần cấn (57g) được rửa với nước cất đến khi trung hòa, sau đó hòa tan cấn trong methanol, lọc lấy dịch lọc methanol, thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cấn (51 g). Phân tán cấn trong nước rồi lắc với ethylacetat 3 lần thu được dịch EtOAc, cô quay thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao EtOAc (HE, 38,0 g). Cấn HE được đưa lên cột sắc ký pha thường với hệ dung môi CH₂Cl₂-MeOH (100:0 → 0:100, v/v) thu được 3 phân đoạn HE1(12,36 g), HE2 (4,92 g) và HE3 (14,60 g).

+ Phân đoạn **HE1** (12,36 g) được đưa lên cột sắc ký pha thường với hệ dung môi *n*-hexan-aceton (20:1,v/v) thu được 8 phân đoạn (HE1.1-HE1.8). Phân đoạn HE1.4 (1,27 g) được tiến hành trên cột sắc ký pha đảo YMC RP-18 với hệ dung môi MeOH-aceton-H₂O (1:2:0,2, v/v) thu được 5 phân đoạn (HE1.4.1 - HE1.4.5). Phân đoạn HE1.4.2 (0,36 g) tiếp tục được đưa lên cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi khai triển CH₂Cl₂ - MeOH (4:1, v/v) thu được hợp chất **HPA** (6,5 mg) và hợp chất **HPB** (7,9 mg). Phân đoạn HE1.4.5 (0,49 g) được triển khai trên cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi CH₂Cl₂ - MeOH (9:1, v/v) thu được hợp chất **HPD** (30,3 mg). Phân đoạn HE1.7 (0,67 g) được đưa lên cột Sephadex LH-20 dùng dung môi rửa giải là MeOH thu được 3 phân đoạn (HE1.7.1-HE1.7.3). Phân đoạn HE1.7.2 (0,46 g) được triển khai trên cột sắc ký pha đảo YMC RP-18 với hệ dung môi rửa giải MeOH-aceton-H₂O (10:5:1, v/v), sau đó

được tiếp tục qua cột Sephadex LH-20 dùng hệ dung môi MeOH-H₂O (4:1, v/v) thu được hợp chất **HPH** (4,3 mg) (Hình 3.8)

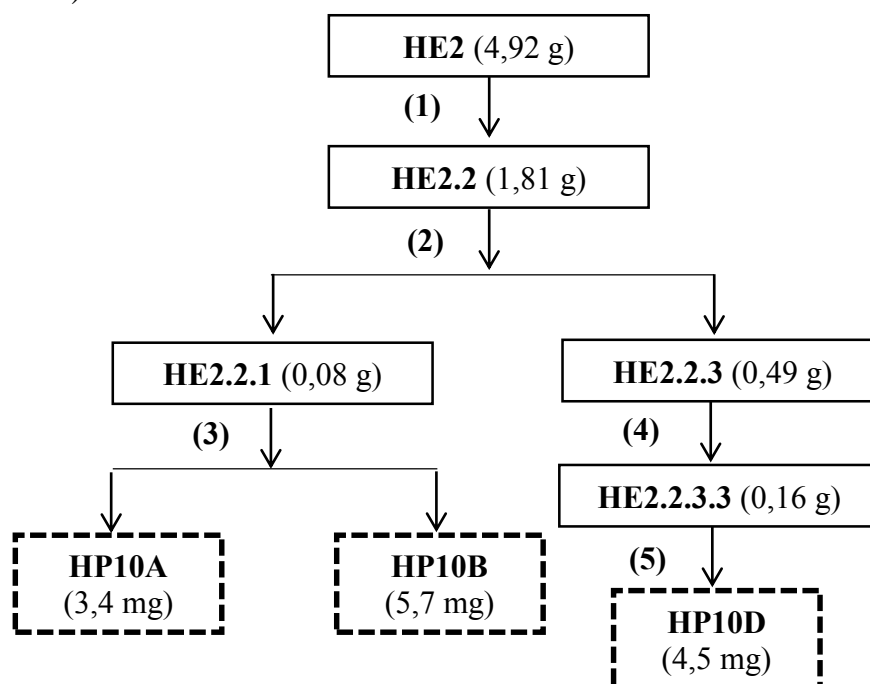


KH	Pha tĩnh	Pha động
(1)	Silica gel	Gradient CH ₂ Cl ₂ -MeOH (100:0 → 0:100, v/v)
(2)	Silica gel	<i>n</i> -hexan-aceton (20:1, v/v)
(3)	YMC RP-18	MeOH-aceton-H ₂ O (1:2:0,2, v/v)
(4)	Sephadex LH-20	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (4:1, v/v)
(5)	Sephadex LH-20	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1, v/v)
(6)	Sephadex LH-20	MeOH
(7)	YMC RP-18	MeOH-aceton-H ₂ O (10:5:1, v/v)
(8)	Sephadex LH-20	MeOH-H ₂ O (4:1, v/v)

Hình 3.8. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao phân đoạn **HE1**

+ Phân đoạn **HE2** (4,92 g) được đưa lên cột Sephadex LH-20 dùng hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂-MeOH (9:1, v/v) thu được 5 phân đoạn (HE2.1-HE2.5). Phân đoạn HE2.2 (1,81 g) được triển khai trên cột sắc ký pha đảo với hệ dung môi ACN-aceton-H₂O (5:5:1, v/v) thu được 4 phân đoạn (HE2.2.1-HE2.2.4). Phân đoạn HE2.2.1 (80 mg)

được đưa lên máy HPLC điều chế với pha động là hệ dung môi MeOH-H₂O (45%:55%, v/v trong 15 phút, tốc độ dòng 2 ml/phút, detector DAD) thu được hợp chất **HP10A** (3,4 mg) và hợp chất **HP10B** (5,7 mg) tương ứng với 2 pic có thời gian lưu lần lượt là 6,075 phút và 9,766 phút trên sắc ký đồ. Phân đoạn HE2.2.3 (0,49 g) được phân lập trên cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi rửa giải MeOH-H₂O (3:1, v/v) thu được 4 phân đoạn (HE2.2.3.1-HE2.2.3.4). Phân đoạn HE2.2.3.3 (0,16 g) được tinh chế trên cột sắc ký pha đảo dùng hệ dung môi aceton-MeOH-H₂O (1:1:1, v/v) thu được hợp chất **HP10D** (4,5 mg) (Hình 3.9).

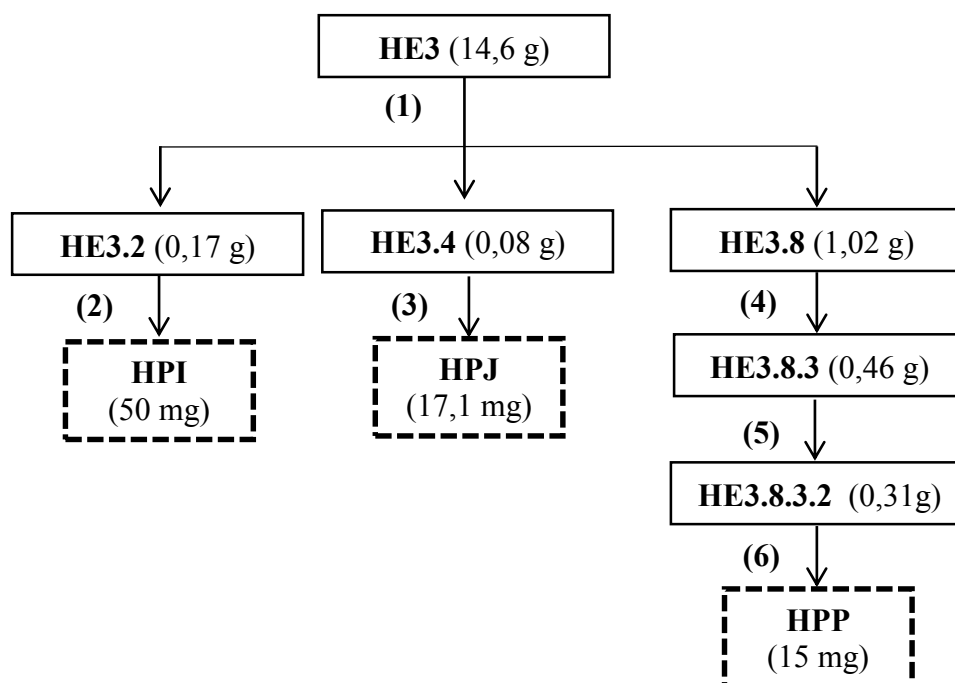


KH	Pha tĩnh	Pha động
(1)	Sephadex LH-20	CH ₂ Cl ₂ -MeOH (9:1, v/v)
(2)	YMC RP-18	ACN-aceton-H ₂ O (5:5:1, v/v)
(3)	HPLC	MeOH-H ₂ O (45%:55%, v/v trong 15 phút)
(4)	Sephadex LH-20	MeOH-H ₂ O (3:1, v/v)
(5)	YMC RP-18	aceton-MeOH-H ₂ O (1:1:1, v/v)

Hình 3.9. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao phân đoạn HE2

+ Phân đoạn **HE3** (14,6g) được đưa lên cột sắc ký pha thường với hệ dung môi rửa giải CH₂Cl₂-aceton (60:40 → 1:1, v/v) thu được 12 phân đoạn (HE3.1-HE3.12). Phân đoạn HE3.2 (0,17 g) dạng tinh thể, được lọc rửa với MeOH thu được hợp chất **HPI** (50,0 mg). Tương tự, phân đoạn HE3.4 (0,08 g) dạng tinh thể được lọc rửa nhiều lần với

MeOH thu được hợp chất **HPJ** (17,1 mg). Phân đoạn HE3.8 (1,02 g) được đưa lên cột Sephadex LH-20 với hệ dung môi CH₂Cl₂:MeOH (1:1, v/v) thu được 5 phân đoạn (HE3.8.1-HE3.8.5). Phân đoạn HE3.8.3 (0,46 g) được triển khai trên cột sắc ký pha đảo YMC RP-18 với hệ dung môi MeOH:H₂O (5:1, v/v) thu được 4 phân đoạn (HE3.8.3.1-HE3.8.3.4). Phân đoạn HE3.8.3.2 (0,31 g) được đưa vào tách trên hệ thống HPLC điều chế (cột Zorbax SB-C18 9,4 x 250 mm, 5 μm) với pha động là hệ dung môi MeOH-H₂O (90:10, v/v) trong 20 phút, sau đó tăng dần tỉ lệ MeOH lên đến 100% trong 20 phút tiếp theo, tốc độ dòng 1,5 ml/phút, detector DAD thu được hợp chất **HPP** (15 mg) tương ứng với pic thời gian lưu là 25,51 phút trên sắc ký đồ (Hình 3.10).



KH	Pha tĩnh	Pha động
(1)	Silica gel	Gradient CH ₂ Cl ₂ -acetone (60:40 → 1:1, v/v)
(2)	Lọc rửa tinh thể	
(3)	Lọc rửa tinh thể	
(4)	Sephadex LH 20	CH ₂ Cl ₂ :MeOH (1:1, v/v)
(5)	YMC RP-18	MeOH:H ₂ O (5:1, v/v)
(6)	HPLC	MeOH-H ₂ O (90:10, v/v) trong 20 phút, sau đó tăng dần tỉ lệ MeOH lên đến 100% trong 20 phút tiếp theo

Hình 3.10. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao phân đoạn HE3

3.2.4. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được

3.2.4.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ cao alcaloid

Từ cao alcaloid toàn phần đã phân lập được 5 alcaloid, ký hiệu: HP1, HP11A (Chất mới), HP11B (Chất mới), HP12 và HP13.

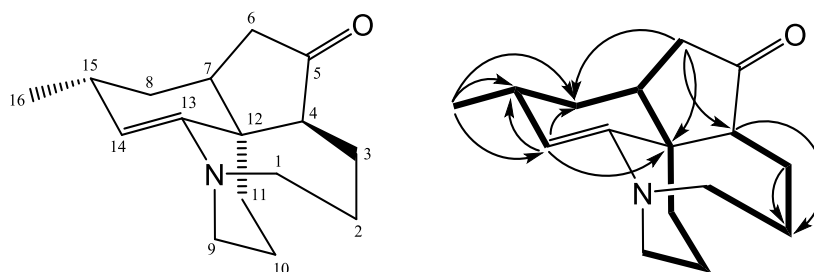
*) **Hợp chất HP1: Fawcettidin**

Hợp chất HP1 thu được dưới dạng bột màu trắng.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ chỉ ra các tín hiệu đặc trưng của 1 proton olefin tại δ_{H} 5,74 (d, $J = 5,2$ Hz); 1 nhóm methyl bậc hai tại δ_{H} 1,08 (d, $J = 6,8$ Hz).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HMQC chỉ ra 16 tín hiệu carbon bao gồm 1 nhóm methyl, 8 nhóm methylen, 4 nhóm methin và 3 carbon không liên kết với hydro. Trong đó, sự hiện diện 1 nhóm carbonyl được ghi nhận tại δ_{C} 220,5 (C-5), liên kết đôi 3 lần thế tại δ_{C} 146,7 (C-13); 128,7 (C-14). Các dữ liệu phổ trên gợi ý hợp chất HP1 là một lycopodium alcaloid loại C_{16}N [101], [115].

Các tương tác COSY H-1 (δ_{H} 2,94; 3,12)/H-2 (δ_{H} 1,33; 1,80)/H-3 (δ_{H} 1,80; 2,23)/H-4 (δ_{H} 2,22); H-6 (δ_{H} 1,99; 2,03)/H-7 (δ_{H} 2,20)/H-8 (δ_{H} 1,22; 1,41)/H-15 (δ_{H} 2,34)/H-14 (δ_{H} 5,74); H-9 (δ_{H} 3,03)/H-10 (δ_{H} 1,60; 2,00)/H-8 (δ_{H} 1,22; 1,41)/H-11 (δ_{H} 1,60; 2,10) cho phép xây dựng hệ thống 4 vòng ngưng tụ. Tương tác HMBC giữa H-16 (δ_{H} 1,08) và C-8 (δ_{C} 35,1)/C-15 (δ_{C} 29,1)/C-14 (δ_{C} 128,7) cùng tương tác COSY H-15/H-16 khẳng định nhóm methyl bậc hai tại C-15 và nối đôi Δ^{14} . Số liệu phổ của hợp chất HP1 được trình bày ở Bảng 3.3. Từ các lập luận trên, kết hợp với việc so sánh với số liệu phổ của hợp chất tham khảo ở tài liệu [101], hợp chất số HP1 được xác định là **fawcettidin**, có CTPT là $\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}$.



Hình 3.11. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→), COSY (---) chính của hợp chất HP1

Bảng 3.3. Số liệu phổ NMR của hợp chất HP1 và hợp chất tham khảo

Vị trí C/H	$\delta_C^{\#}$ [101]	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J (Hz))
1	60,5	61,5	2,94 m; 3,12 m
2	29,0	29,9	1,33 m; 1,80*
3	30,9	31,6	1,80*; 2,23*
4	56,2	56,9	2,22*
5	218,7	220,5	-
6	44,2	44,9	1,99*; 2,03*
7	37,3	38,4	2,20*
8	34,1	35,1	1,22 m; 1,41 m
9	52,2	53,1	3,03*
10	23,5	24,3	1,60*; 2,00*
11	39,0	39,9	1,60*; 2,10*
12	46,1	47,3	-
13	145,3	146,7	-
14	127,8	128,7	5,74 d (5,2)
15	27,8	29,1	2,34 m
16	20,9	21,0	1,08 d (6,8)

^a Đo trong CD₃OD, ^b100 MHz, ^c 400 MHz
[#] δ_C của fawcettidin đo trong CDCl₃ [101]

***) Hợp chất HP11A và HP11B (Chất mới): Huperphlegmin A, B**

Hợp chất HP11A thu được dưới dạng dầu màu vàng, góc quay cực riêng $[\alpha]^{22}_D = -65$ (c 0,01, MeOH). Phổ IR cho thấy các đỉnh hấp thụ ở 3439 và 1701 cm⁻¹ tương ứng với các nhóm chức hydroxyl và carbonyl. Phổ UV cho thấy sự có mặt của vòng thơm ở λ_{max} 347 nm. Phổ HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 397,2122 [M+H]⁺ tương ứng với công thức phân tử C₂₃H₂₉O₄N₂ (tính theo lý thuyết là 397,2127), do đó, công thức phân tử của hợp chất HP11A là C₂₃H₂₈O₄N₂, kết hợp với dữ liệu phổ NMR gợi ý rằng hợp chất HP11A có 11 vị trí không bão hòa.

Phổ ¹H-NMR (Bảng 3.4) chỉ ra tín hiệu đặc trưng của proton của nhóm methin olefin [δ_H 7,09 (d, $J = 1,5$ Hz, H-1')], hai nhóm methin thuộc dị vòng [δ_H 6,88 (d, $J = 3,5$ Hz, H-3'), 6,52 (d, $J = 3,5$ Hz, H-4')], một nhóm oxymethylen [δ_H 4,60 (2H, s, H-6')], một nhóm *N*-methyl [δ_H 2,51 (3H, s, H-17)], một nhóm methyl bậc 2 [δ_H 1,24 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-16)], cùng với 5 nhóm methin và 5 nhóm methylen.

Phổ ^{13}C -NMR (Bảng 3.3) và HSQC của hợp chất HP11A chỉ ra 23 tín hiệu carbon bao gồm 2 carbon của nhóm carbonyl [δ_{C} 213,8 (C-14), 210,5 (C-5)], 2 carbon sp^2 bậc 4 mang oxy [δ_{C} 160,1 (C-5'), 152,2 (C-2')], một carbon sp^2 bậc 4 [δ_{C} 138,9 (C-6)], một carbon sp^2 nhóm methin [δ_{C} 120,9 (C-1')], hai carbon sp^2 nhóm methin thuộc dị vòng [δ_{C} 120,5 (C-3'), 111,5 (C-4')], hai carbon sp^3 bậc 4 [δ_{C} 81,6 (C-13), 63,6 (C-12)], 5 carbon sp^3 nhóm methin [δ_{C} 66,2 (C-9), 64,7 (C-3), 61,3 (C-4), 46,9 (C-7), 43,5 (C-15)], 1 carbon mang oxy của nhóm methylen [δ_{C} 57,6 (C-6')], 1 carbon của nhóm *N*-methyl [δ_{C} 47,0 (C-17)], 5 carbon của nhóm methylen [δ_{C} 46,5 (C-1), 37,1 (C-2), 36,7 (C-11), 34,7 (C-8), 20,5 (C-10)], 1 carbon của nhóm methyl (δ_{C} 18,6 (C-1)), tín hiệu proton của 5 nhóm methylen [δ_{H} 3,16 (dt, $J = 12,5; 3,5$ Hz, H-1a), 2,56 (tín hiệu chập, H-1b), 2,27 (2H, m, H-8), 2,19 (m, H-10a), 1,79 (m, H-10b), 2,09 (m, H-11a), 1,58 (dt, $J = 13,0, 10,5$ Hz, H-11b), 1,99 (m, H-2a), 1,70 (m, H-2b)] và 5 nhóm methin [δ_{H} 4,26 (dd, $J = 9,5; 6,5$ Hz, H-9), 3,67 (q, $J = 3,0$ Hz, H-3), 3,44 (dt, $J = 9,0, 2,0$ Hz, H-7), 2,59 (d, $J = 3,5$ Hz, H-4), 2,40 (m, H-15)].

Bảng 3.4. Số liệu phổ NMR của hợp chất HP11A

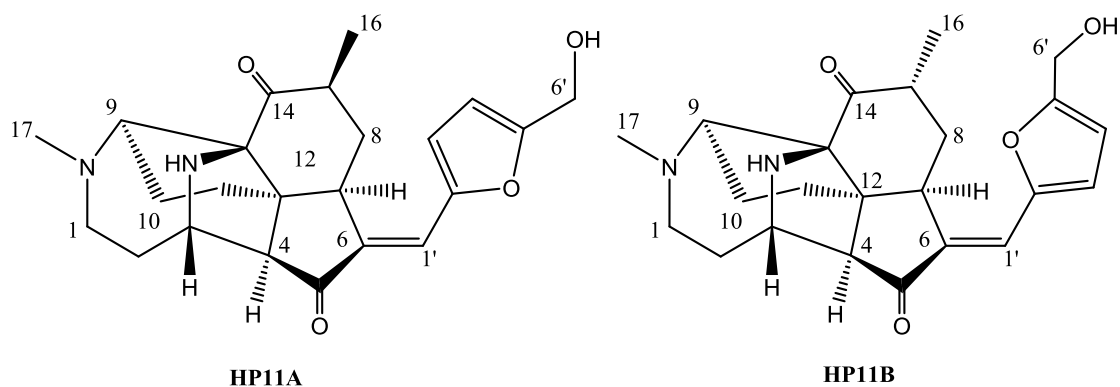
Vị trí C/H	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,c}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,b}}$	HMBC (H \rightarrow C)	COSY (H \rightarrow H)	NOESY (H \rightarrow H)
1	46,5	2,56* ; 3,16 dt (12,5; 3,5)	C-2, C-9, C-17	H-2	H-2, H-3, H-10
2	37,1	1,70 m; 1,99 m		H-1, H-3	H-1, H-2
3	64,7	3,67 q (3,0)	C-1, C-13	H-2, H-4	H-1, H-2, H-4, H-8
4	61,3	2,59 d (3,5)	C-3, C-5, C-6, C-7, C-12	H-3	H-3, H-10, H-11
5	210,5	-			
6	138,9	-			
7	46,9	3,44 dt (2,0; 9,0)	C-1', C-4, C-6, C-5, C-8, C-12	H-8	H-3', H-8, H-11, H-15
8	34,7	2,27 m	C-6, C-7, C-12, C-14, C-15, C-16	H-7, H-15	H-3', H-3
9	66,2	4,26 dd (9,5; 6,5)	C-1, C-12, C-13, C-14, C-17	H-10	H-10, H-17
10	20,5	1,79 m; 2,19 m	C-9, C-11, C-12, C-13	H-9, H-11	H-4, H-9, H-11, H-17
11	36,7	1,58 td (13,0, 10,5); 2,09 m	C-4, C-9, C-10, C-12, C-13	H-10	H-4, H-7

Vị trí C/H	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$	HMBC (H→C)	COSY (H→H)	NOESY (H→H)
12	63,6	-			
13	81,6	-			
14	213,8	-			
15	43,5	2,40 m	C-7, C-8, C-14, C-16	H-8, H-16	H-7, H-16
16	18,6	1,24 d (7,0)	C-8, C-14, C-15	H-15	H-8, H-15
17	47,0	2,51 s	C-1, C-9		H-9, H-10
1'	120,9	7,09 d (1,5)	C-2', C-3', C-5, C-6, C-7		
2'	152,2	-			
3'	120,5	6,88 d (3,5)	C-1', C-2', C-4', C-5'	H-4'	H-7, H-8, H-4'
4'	111,5	6,52 d (3,5)	C-2', C-3', C-5'	H-3'	H-3', H-6'
5'	160,1	-			
6'	57,6	4,60 s	C-4', C-5'		H-4'
<i>^a Do trong CD₃OD, ^b 500 MHz, ^c 125MHz</i>					

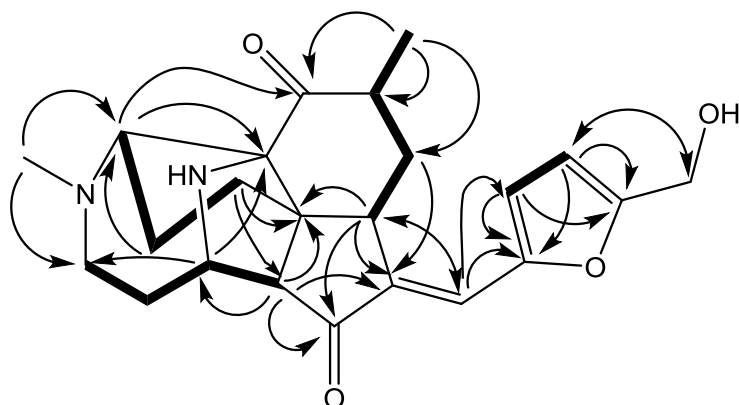
Trên phổ COSY xuất hiện các tương tác H-1a/H-2b, H-1b/H-2a, H-2b/H-3/H-4, H-7/H₂-8/H-15/H₃-16, H-9/H-10a/H-11a, H-10b/H-11b và H-3'/H-4' (Hình 3.14). Các tương tác HMBC giữa H-3' với C-1'/C-2'/C-4'/C-5', H-4' với C-2'/C-3'/C-5' và H₂-6' với C-4'/C-5' (Hình 3.14) gợi ý sự xuất hiện của hợp phần dihydrofuran thể tại vị trí 2 và 5 với nhóm olefin và hydroxymethylen trong cấu trúc của hợp chất HP11A. Sự xuất hiện vòng 16-methyl-Bicyclo [4.3.0] nonan bao gồm C-7 - C-16 được xác định thông qua các tương tác HMBC giữa H-9 với C-13/C-14, H-11a với C-12/C-13, H-7 với C-12 và H₃-16 với C-8/C-14/C-15. Ngoài ra, các tương tác HMBC giữa H-4 với C-5/C-6/C-12, H-7 với C-5/C-6, H₂-8 với C-6 và H-1' với C-5/C-6/C-7/C-2'/C-3' cho thấy không chỉ cấu trúc vòng cyclopentanon gồm C-4, C-5, C-6, C-7 và C-12, mà còn cho thấy có liên quan giữa vòng này với hợp phần 6-hydroxymethylen dihydrofuran thông qua liên kết đôi Δ^6 tại C-1'. Tương tác COSY giữa H-9/H-10/H-11 và các tương tác HMBC giữa H-10 với C-9; H-9 với C-13 và H-11 với C-12 gợi ý sự hiện diện vòng cyclopentan thuộc vòng bicyclo [4.3.0] nonan. Ngoài ra, các tương tác COSY giữa H-1a/H₂-2/H-3/H-4 và H-1b/H-2a và các tương tác HMBC của H-17 với C-1/C-9 và H-4 với C-3 chỉ ra rằng nguyên tử nitơ gắn nhóm methyl liên kết với C-9 của vòng cyclopentan và C-3 liên kết với C-4 của vòng cyclopentanon. Điều này gợi ý sự có mặt của vòng N-

methylazonan được hình thành bởi liên kết giữa nguyên tử nitơ, C-1–C-4 và C-9–C-12. Trên cơ sở công thức phân tử và các dữ liệu phổ NMR nêu trên, cho phép xác định nguyên tử nitơ là nhóm amin bậc 2 và một vòng nữa cần được thiết lập để đạt trạng thái bão hòa. Do đó, hợp phần amin gắn với C-3 và C-13, điều này được xác định bằng tương tác HMBC giữa H-3 với C-13 và vòng pyrrolidin với nhóm amin bậc 2, C-3, C-4, C-12 và C-13 hình thành cấu trúc của hợp chất HP11A.

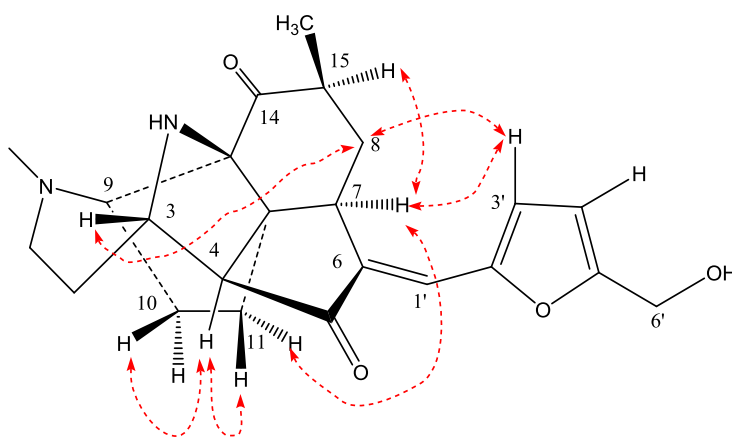
Các tương quan cấu trúc không gian của hợp chất HP11A được giải thích thông qua dữ liệu phổ NOESY (Hình 3.14). Các tương tác NOESY giữa H-7/H₂-8 với H-3', của H-1' (δ_H 7,06)/H-3' (δ_H 6,85), chỉ ra cấu hình *E* tại vị trí nối đôi Δ^6 . Các tín hiệu tương tác giữa H-4/H-10b, H-4/H-11a và H-7/H-11b trên phổ NOESY gợi ý định hướng α giữa H-4 và H-7, giữa C-10 và C-11. Ngược lại, các tương tác NOESY giữa H-3/H-8a và sự vắng mặt của các tương tác giữa H-3/H₂-10 và H-3/H₂-11 chỉ ra rằng H-3 và C-8 trong nhóm methylen định hướng β . Hơn nữa, phổ NOESY của HP11A thấy xuất hiện tương tác giữa H-15 và H-7, mà H-7 ở vị trí α , do đó, H-15 cũng ở vị trí α , C-16 định hướng β . Một số tương tác NOESY quan trọng khác do sự gần gũi về mặt không gian của các nguyên tử cũng được phát hiện như H-1/H-2/H-3, H-1/H-10, H-7/H-8, H-10/H-11, H-9/H₃-17, H-3'/H-4'/H₂-6'. Như vậy, từ các lập luận trên cho phép đề nghị cấu trúc của hợp chất HP11A như Hình 3.12, với cấu hình tương đối là 3*S**,4*R**,6*E*,7*R**,9*R**,12*S**,13*S**,15*S**. Hợp chất HP11A là hợp chất mới được đặt tên là **huperphlegmin A**.



Hình 3.12. Cấu trúc hóa học của hợp chất HP11A và HP11B



Hình 3.13. Tương tác HMBC (→) và COSY (→) của hợp chất HP11A



Hình 3.14. Tương tác NOESY chính của hợp chất HP11A

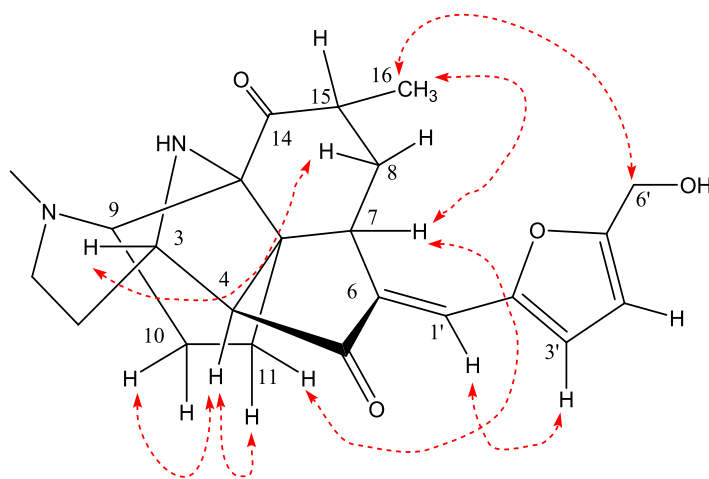
Hợp chất HP11B thu được dưới dạng dầu màu vàng, góc quay cực riêng $[\alpha]^{22}_D = -162$ (c 0,01, MeOH). Phổ IR của hợp chất HP11B có hai cực đại hấp thụ tại 3402 và 1699 cm^{-1} , tương ứng với nhóm hydroxyl và carbonyl trong cấu trúc phân tử. Phổ UV cho thấy sự xuất hiện của vòng thơm ở λ_{max} 349 nm, tương tự như hợp chất HP11A. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất HP11B cho kết quả giống như hợp chất HP11A với công thức phân tử là $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{N}_2$.

Bảng 3.5. Số liệu phổ NMR của hợp chất HP11B

Vị trí C/H	$\delta_{\text{C}^{\text{a,c}}}$	$\delta_{\text{H}^{\text{a,b}}}$	HMBC (H→C)	COSY (H→H)	NOESY (H→H)
1	46,6	2,60*; 3,18 dt (12,5; 3,0)	C-2, C-9, C-17	H-2	H-2, H-10
2	37,0	1,71 m; 2,00 m		H-1, H-3	H-1, H-3
3	64,8	3,76 q (3,0)	C-1, C-13	H-2, H-4	H-2, H-8

Vị trí C/H	$\delta_C^{a,c}$	$\delta_H^{a,b}$	HMBC (H→C)	COSY (H→H)	NOESY (H→H)
4	61,1	2,57 d (3,0)	C-3, C-5, C-6, C-7, C-11		H-10, H-11
5	210,3	-			
6	139,3	-			
7	43,5	3,51 ddd (12,0; 5,5; 1,5)	C-1', C-4, C-5, C-6, C-8, C-12	H-8	H-8, H-11, H-16
8	34,6	2,00*; 2,80 m	C-7, C-12, C-14, C-15, C-16	H-7, H-15	H-3, H-7
9	65,8	4,35 dd (9,5; 6,0)	C-1, C-10, C-13, C-14, C-17	H-10	H-17
10	20,7	1,79 m; 2,20 m	C-9, C-11, C-13	H-9, H-11	H-1, H-4, H-11
11	36,4	1,49 td (13,5; 10,5); 2.07 m	C-4, C-10, C-12, C-13	H-10	H-4, H-7, H-10
12	65,7	-			
13	81,8	-			
14	215,4	-	C-14		
15	40,0	2,77 m	C-8, C-14, C-16	H-8, H-16	
16	16,5	1,32 d (7,5)	C-8, C-14, C-15		H-6'
17	47,1	2,52 s	C-1, C-9		H-9
1'	120,4	7,06 d (1,5)	C-5, C-2', C-6, C-7, C-8		H-3'
2'	152,3	-			
3'	120,6	6,85 d (3,5)	C-1', C-2', C-4', C-5'	H-4'	H-1', H-4'
4'	111,5	6,52 d (3,5)	C-3', C-2', C-5'	H-3'	H-6'
5'	160,1	-			
6'	57,7	4,60 s	C-4', C-5'		H-4', H-16
<i>^a Do trong CD₃OD, ^b500 MHz, ^c125MHz</i>					

Các dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của hợp chất HP11B tại Bảng 3.5 khá tương đồng với hợp chất HP11A, ngoại trừ nhóm methin ở vị trí C-7 (δ_H 3,51, δ_C 43,5), nhóm carbonyl tại C-14 (δ_C 215,4), nhóm methin tại C-15 (δ_H 2,77, δ_C 40,0) và nhóm methyl tại C-16 (δ_H 1,32, δ_C 16,5). Tuy nhiên, dữ liệu phổ 2D-NMR chỉ ra hợp chất HP11B có cấu trúc hai chiều tương tự như hợp chất HP11A, cho phép giả thiết hợp chất HP11B là một đồng phân lập thể của hợp chất HP11A.



Hình 3.15. Tương tác NOESY chính của hợp chất HP11B

Để làm sáng tỏ giả thuyết này, cấu hình tương đối của HP11B được xác định thông qua số liệu phổ NOESY (Hình 3.15). Đáng chú ý là trái ngược với dữ liệu phổ NOESY của HP11A, H-7 (δ_H 3,51) tương tác với H₃-16 (δ_H 1,32), nhưng không tương tác với H-15 (δ_H 2,77), ngoài ra tương tác của H-1' (δ_H 7,06)/H-3' (δ_H 6,85), chỉ ra cấu hình *E* tại vị trí nối đôi Δ^6 . Điều này gợi ý hợp chất HP11B là một đồng phân 15-epimer của hợp chất HP11A. Đề nghị này cũng được chứng minh bởi sự khác biệt đáng kể các giá trị chuyển dịch hóa học của C-7 giữa hai hợp chất này do hiệu ứng che chắn của nhóm methyl C-16 lên vị trí C-7. Ngoài ra, không có tương tác H₂-8/H-3' quan sát thấy trong phổ NOESY của HP11A, thay vào đó, xuất hiện mối tương quan của H-1' (δ_H 7,06)/H-3' (δ_H 6,85) trên phổ NOESY của HP11B. Ngoài ra, phổ NOESY chỉ ra tương tác giữa H₃-16 và H-6' (δ_H 4,60), điều này không xuất hiện ở hợp chất HP11A. Bằng chứng này cho thấy nguyên tử oxy trong vòng furan của hợp chất HP11B hướng về phía C-8. Từ các lập luận trên, cấu trúc của hợp chất HP11B được xác định như Hình 3.13, với cấu hình tương đối là 3*S**,4*R**,6*E*,7*R**,9*R**,12*S**,13*S**,15*R**. Hợp chất này cũng là hợp chất mới và được đặt tên là **hyperphlegmin B**.

***) Hợp chất HP12: Phlegmariurin B**

Hợp chất HP12 thu được dưới dạng dầu màu vàng nâu.

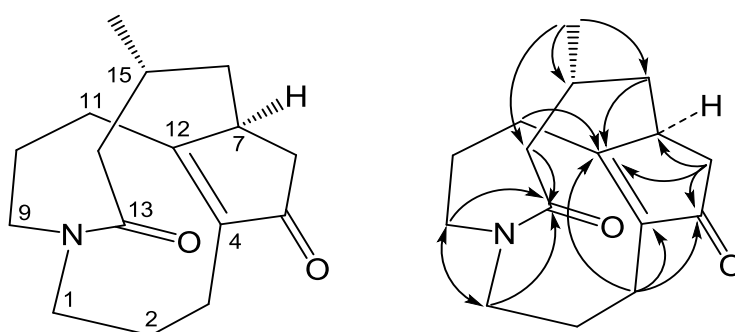
Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 262,1800 ($[M+H]^+$) tương ứng với công thức phân tử là C₁₆H₂₄NO₂ (tính theo lý thuyết là 262,1729), do đó, công thức phân tử của hợp chất HP12 là C₁₆H₂₃NO₂.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của HP12 chỉ ra tín hiệu đặc trưng của 1 nhóm methyl doublet tại $\delta_{\text{H}} 1,10$ (d, $J = 7,0$ Hz).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ và HSQC chỉ ra 16 tín hiệu carbon bao gồm 1 nhóm methyl ($\delta_{\text{C}} 26,7$), 9 nhóm methylen ($\delta_{\text{C}} 20,8; 23,0; 26,4; 29,8; 39,5; 41,4; 41,4; 51,9; 52,1$), 2 nhóm methin ($\delta_{\text{C}} 28,3; 42,7$) và 4 carbon không liên kết với hydro ($\delta_{\text{C}} 142,3; 176,3; 177,2; 210,8$) (Bảng 3.6). Trong đó, sự hiện diện 1 nhóm carbonyl tại $\delta_{\text{C}} 210,8$ và 2 nhóm methylen liên kết *N* tại $\delta_{\text{C}} 51,9, 52,1$ cũng được ghi nhận.

Tương tác HMBC giữa H-6 ($\delta_{\text{H}} 2,17; 2,40$) với C-5 ($\delta_{\text{C}} 210,8$)/C-7 ($\delta_{\text{C}} 42,7$)/C-8 ($\delta_{\text{C}} 41,4$)/C-12 ($\delta_{\text{C}} 177,2$) xác nhận sự có mặt của vòng cyclopentenon thế 2,3,4 trong cấu trúc của HP12. Các tương tác HMBC từ H-1 ($\delta_{\text{H}} 3,04; 3,95$)/H-9 ($\delta_{\text{H}} 3,03; 4,02$) đến C-13 ($\delta_{\text{C}} 176,3$) cho phép định vị nhóm amid tại C-13. Ngoài ra, vị trí của nhóm methyl bậc hai tại C-15 được thiết lập qua tương tác giữa H₃-16 ($\delta_{\text{H}} 1,10$) và C-8 ($\delta_{\text{C}} 41,4$)/C-14 ($\delta_{\text{C}} 41,4$)/C-15 ($\delta_{\text{C}} 28,3$). Tương tự, các tương tác HMBC giữa H-3 ($\delta_{\text{H}} 2,50; 2,59$) và C-4 ($\delta_{\text{C}} 142,3$)/C-5/C-12, giữa H-8 ($\delta_{\text{H}} 1,81; 2,08$) và C-6 ($\delta_{\text{C}} 39,5$)/C-7 ($\delta_{\text{C}} 42,7$)/C-12, giữa H-11 ($\delta_{\text{H}} 1,94; 2,80$) và C-4/C-12 cho phép kết nối C-3, C-8, C-11 vào các vị trí C-4, C-7, C-12 tương ứng của vòng cyclopentenon.

Từ các lập luận trên kết hợp so sánh với số liệu phổ của chất phlegmariurin B ở tài liệu tham khảo [169], hợp chất HP12 được xác định là **phlegmariurin B**.



Hình 3.16. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính (→) của hợp chất HP12

Bảng 3.6. Số liệu phổ NMR của hợp chất HP12 và hợp chất tham khảo

Vị trí C/H	$\delta_C^{\#}$ [169]	$\delta_C^{a,b}$	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J (Hz))
1	51,1	51,9	3,04 ddd (12,5; 12,0; 4,5); 3,95 ddd (12,0; 5,0; 2,0)
2	19,7	20,8	2,33 m; 1,42 m
3	23,4	23,0	2,59 dt (13,0; 2,0); 2,50 m
4	141,7	142,3	-
5	207,6	210,8	-
6	38,9	39,5	2,40 dd (15,5; 7,0); 2,17 dd (15,5; 1,5)
7	41,2	42,7	2,88 m
8	41,0	41,4	2,08 m; 1,81*
9	50,98	52,1	4,02 m; 3,03 m
10	25,8	26,4	2,80*
11	28,9	29,8	2,80*; 1,94 m
12	171,7	177,2	-
13	173,3	176,3	-
14	40,8	41,4	2,66 dd (9,5; 3,5); 1,81*
15	27,1	28,3	2,00 m
16	26,6	26,7	1,10 d (7,0)

*^a trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz.
 $\delta_C^{\#}$ của phlegmariurin B đo trong CDCl₃ [169], *tín hiệu chồng chập*

***) Hợp chất HP13: Huperzin A**

Hợp chất HP13 thu được dưới dạng dầu màu vàng.

Phổ ¹H-NMR của hợp chất HP13 chỉ ra các tín hiệu đặc trưng của 1 nhóm methyl tại δ_H 1,48 (s); 1 nhóm methyl tại δ_H 1,61 (d, $J = 7,0$ Hz) và 4 proton olefin tại δ_H 5,39 (brd, $J = 4,5$ Hz), 5,49 (q, $J = 7,0$ Hz), 6,13 (d, $J = 9,5$ Hz) và 7,79 (d, $J = 9,5$ Hz).

Phổ ¹³C-NMR của HP13 cho thấy phân tử có 15 carbon. Phổ HSQC cho phép nhận biết 15 carbon này có 2 nhóm methyl, 2 nhóm methylen, 5 nhóm methin và 6 carbon không liên kết với hydro. Tín hiệu carbon đặc trưng của 4 liên kết đôi (δ_C 110,7; 116,9; 122,0; 124,5; 133,6; 139,7; 142,0; 142,3), 1 nhóm amid (δ_C 162,7) cũng được ghi nhận.

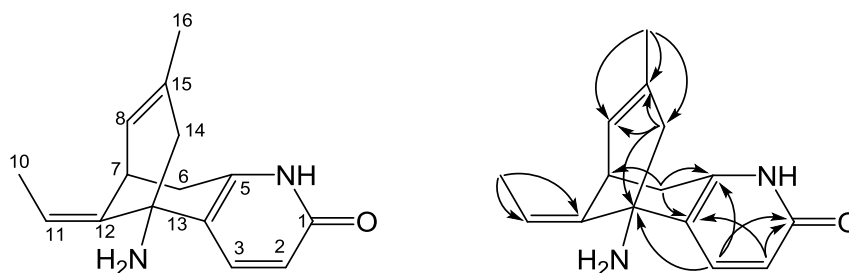
Tương tác HMBC giữa H-2 (δ_H 6,13) với C-1 (δ_C 162,7)/C-4 (δ_C 122,0); giữa H-3 (δ_H 7,79) với C-1/C-5 (δ_C 142,3) cho phép thiết lập cấu trúc vòng δ -lactam không bão hòa. Các tương tác HMBC giữa H₃-10 (δ_H 1,61) với C-11 (δ_C 110,7)/C-12 (δ_C 142,0); giữa H₃-

16 (δ_H 1,48) với C-8 (δ_C 124,5)/C-14 (δ_C 48,8)/C-15 (δ_C 133,6) giúp định vị các liên kết đôi còn lại tại $\Delta^{8,11}$. Cấu trúc vòng bicyclo [3.3.1] nonan được thiết lập qua các tương tác HMBC giữa H-6 với C-4/C-5/C-7/C-8; giữa H-7 với C-8/C-12/C-13/C-15; giữa H-14 với C-4/C-8/C-12/C-13/C-15. Ngoài ra, sự ngưng tụ của vòng này với δ -lactam tại C-4/C-5 được xác nhận qua tương tác HMBC từ H-6 (δ_H 2,47; 2,60) đến C-4/C-5, từ H-3 đến C-13 (δ_C 53,7). Các phân tích trên kết hợp với việc so sánh với hợp chất tham khảo ở tài liệu [221] cho phép kết luận hợp chất HP13 là **huperzin A**, có CTPT là $C_{15}H_{18}N_2O$.

Bảng 3.7. Số liệu phổ NMR của hợp chất HP13 và hợp chất tham khảo

Vị trí C/H	$\delta_C^{\#}$ [221]	$\delta_C^{a, b}$	$\delta_H^{a, c}$ (mult., J (Hz))
1	165,4	162,7	-
2	116,9	116,9	6,13 d (9,5)
3	140,2	139,7	7,79 d (9,5)
4	122,8	122,0	-
5	143,1	142,3	-
6	35,2	34,9	2,60 dd (17,0, 5,0); 2,47*
7	32,8	32,3	3,52 m
8	124,2	124,5	5,39 brs (4,5)
9	-	-	-
10	12,3	12,1	1,61 d (7,0)
11	111,2	110,7	5,49 q (7,0)
12	142,4	142,0	-
13	54,3	53,7	-
14	49,1	48,8	2,06 d (17,0); 1,97 d (17,0)
15	134,0	133,6	-
16	22,6	22,4	1,48 s

^a trong DMSO, ^b125 MHz, ^c500 MHz, *tín hiệu chập
 $\delta_C^{\#}$ của huperzin A đo trong $CDCl_3$ [221]



Hình 3.17. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC chính (→) của hợp chất HP13

3.2.4.2. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được từ căn ethylacetat

Từ căn phân đoạn ethylacetat (HE) phân lập được 10 hợp chất, ký hiệu: HPA (Chất mới), HPB, HPH (Chất mới), HPD, HPI, HPJ, HPP, HP10A, HP10B và HP10D.

*) Hợp chất HPA (Chất mới): *Huperphlegmarin A*

Hợp chất HPA thu được dưới dạng bột màu vàng nhạt. Phổ UV (MeOH) cho các đỉnh hấp thụ cực đại tại λ_{\max} 299, 355 nm gợi ý sự có mặt của hệ vòng thơm liên hợp trong phân tử. Phổ HR-ESI-MS của hợp chất này cho pic ion giả phân tử tại m/z 345,1697 [M-H]⁻ tương ứng với công thức phân tử là C₂₀H₂₅O₅ (tính theo lý thuyết là 345,1702). Kết hợp với dữ kiện phổ ¹³C-NMR, DEPT, công thức phân tử của HPA được xác định là C₂₀H₂₆O₅.

Phổ ¹H-NMR cho thấy sự có mặt của 3 nhóm methyl bậc ba tại δ_{H} 1,23, 1,24, 1,53; 1 nhóm methyl bậc hai tại δ_{H} 1,36 (d, $J = 6,5$ Hz). Ngoài ra, còn xuất hiện tín hiệu của 1 proton nhóm methin mang oxy tại δ_{H} 4,59 (d, $J = 13,5$ Hz) và 2 proton của nhóm methylen liên kết với oxy tại δ_{H} 4,27 (d, $J = 9,0; 6,5$ Hz) và 4,80.

Phổ ¹³C-NMR, DEPT và HSQC của HPA xuất hiện tín hiệu của 20 carbon, bao gồm 4 nhóm methyl, 4 nhóm methylen, 3 nhóm methin và 9 carbon không mang hydro, trong đó có 1 carbon carbonyl tại δ_{C} 205,5 (C-7), 1 carbon của nhóm oxymethylen tại δ_{C} 81,7 (C-16) và 1 carbon của nhóm oxymethin tại δ_{C} 73,4 (C-6). Các dữ kiện trên gợi ý hợp chất HPA là một abietan diterpenoid.

Các tương tác HMBC giữa H-18 (δ_{H} 1,23)/H-19 (δ_{H} 1,24) và C-3 (δ_{C} 43,8)/C-4 (δ_{C} 35,0)/C-5 (δ_{C} 56,2) cho phép xác định vị trí nhóm *gem*-dimethyl tại C-4. Tương tự, tương tác HMBC từ H-20 (δ_{H} 1,53) đến C-1 (δ_{C} 38,1)/C-5/C-9 (δ_{C} 141,7)/C-10 (δ_{C} 42,9) khẳng định nhóm methyl bậc ba còn lại tại C-10. Nhóm methyl bậc hai (C-17) tại C-15 được xác định qua các tương tác HMBC giữa H-17 (δ_{H} 1,36) và C-13 (δ_{C} 117,3)/C-15 (δ_{C} 36,4)/C-16 (δ_{C} 81,7). Ngoài ra, tương tác giữa H-16 (δ_{H} 4,27, 4,80) và C-12 (δ_{C} 159,2) chứng tỏ C-16 liên kết với C-12 qua cầu oxy gợi ý sự có mặt của 1,2,3-trisubstituted dihydrofuran. Tương tác HMBC giữa H-5 (δ_{H} 1,79)/H-6 (δ_{H} 4,59) và C-7 (δ_{C} 205,5) khẳng định vị trí của nhóm carbonyl tại C-7. Các lập luận

trên cho phép xác định cấu trúc của hợp chất HPA là 12,16-epoxy-6,11,14-trihydroxy-8,11,13-abietatrien-7-on.

Phổ CD của hợp chất HPA cho thấy hiệu ứng cotton (-) tại 237 nm và 255 nm, cotton (+) tại 218 nm và 312 nm, tương tự như hợp chất cyrtophyllon B [133], [180]. Hằng số tương tác lớn giữa H-5 và H-6 ($J_{5,6} = 13,5$ Hz) khẳng định vị trí *trans*-diaxial giữa chúng và định hướng α của nhóm 6-OH [204]. Điều này được khẳng định qua tương tác giữa H-5/H-6 và H-6 với H-19/H-20 cũng như việc không quan sát thấy tương tác H-5/H-20 trên phổ NOESY. Ngoài ra, dựa vào quy tắc CD keton cho nhóm C=O [104], liên kết n- π^* được chia làm 8 phần bởi các mặt phẳng được tạo bởi các trục X, Y, Z. Xét mặt phẳng chứa liên kết C=O, khi chiếu các nhóm thế CH₃-20 và H-5, OH-6 ở các vị trí tương ứng như sau: Nhóm thế CH₃-20 ở vị trí β do đó sẽ nằm phía bên phải phía dưới, cho hiệu ứng cotton (-) và có cấu hình *S*, với H-5 ở vị trí α -axial do đó nằm ở phía bên trái phía trên, có hiệu ứng cotton (-) và có cấu hình *S*, tương tự sử dụng quy tắc này đối với nhóm thế OH-6 ở vị trí α -axial, do đó sẽ nằm ở phía bên trái phía dưới, cho hiệu ứng cotton (+) và có cấu hình *R*. Tương tự, hằng số tương tác giữa H-15 và H-16a ($J_{15,16} = J_{aa} = 9,0$ Hz) cho thấy vị trí *trans*-diaxial giữa H-15 và H-16a. Do đó, CH₃-17 ở vị trí *axial* so với H-15 và định hướng α của CH₃-17. Thêm vào đó, trên phổ NOESY còn thấy sự xuất hiện tương tác giữa H-18 (1,23 s) với H-5 (1,79; d (13,5)), H-6 (4,59 d (13,5)) với H-20 (1,53 s), do đó được vị trí tương đối của H-5, H-18 và H-20 như Hình 3.19.

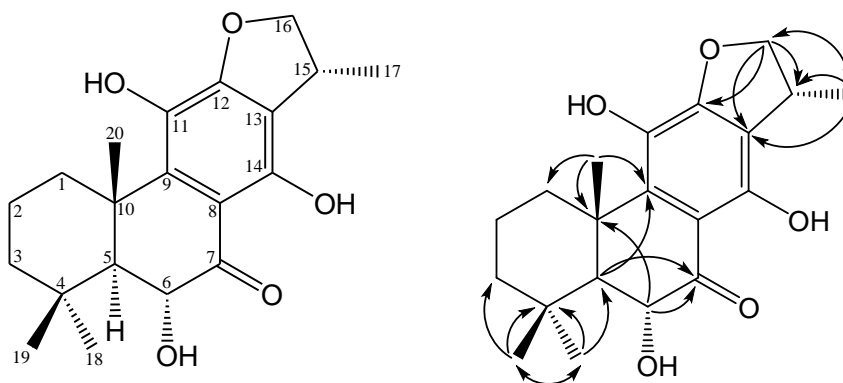
Như vậy, từ các lập luận trên, cấu trúc hóa học của hợp chất HPA được thiết lập là (5*S*,6*R*,10*S*,15*R*)-12,16-epoxy-6 α ,11,14-trihydroxy-8,11,13-abietatrien-7-on, được đặt tên là **huperphlegmarin A**.

Bảng 3.8. Số liệu phổ NMR của hợp chất HPA

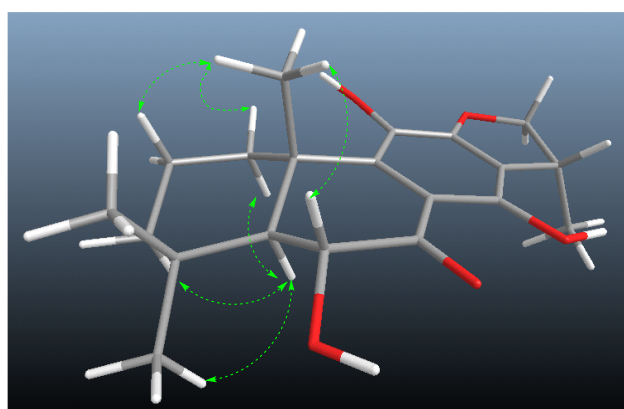
Vị trí C/H	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J (Hz))
1	38,1	CH ₂	1,37* (H α); 3,40* (H β)
2	20,0	CH ₂	1,54* (H α); 1,75 m (H β)
3	43,8	CH ₂	1,33* (H β); 1,51* (H α)
4	35,0	C	-
5	56,2	CH	1,79 d (13,5)

Vị trí C/H	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J (Hz))
6	73,4	CH	4,59 d (13,5)
7	205,5	C	-
8	109,2	C	-
9	141,7	C	-
10	42,9	C	-
11	133,5	C	-
12	159,2	C	-
13	117,3	C	-
14	156,0	C	-
15	36,4	CH	3,68 m
16	81,7	CH ₂	4,27 dd (9,0; 6,0); 4,80*
17	18,9	CH ₃	1,36 d (6,5)
18	36,6	CH ₃	1,23 s
19	23,0	CH ₃	1,24 s
20	19,5	CH ₃	1,53 s

^a Đo trong DMSO, ^b125 MHz, ^c500 MHz, *tín hiệu chồng chập



Hình 3.18. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC chính (\rightarrow) của HPA



Hình 3.19. Tương tác NOESY chính của hợp chất HPA

***) Hợp chất HPB: Lycoxanthol**

Hợp chất HPB thu được dưới dạng bột màu vàng nhạt.

Phổ UV (MeOH) cho các đỉnh hấp thụ cực đại tại λ_{\max} 295, 335, 381 nm gợi ý sự có mặt của hệ liên hợp trong phân tử. Phổ khối HR-ESI-MS của HPB cho pic ion giả phân tử tại m/z 345,1697 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{20}H_{25}O_5$ (tính theo lý thuyết là 345,1702). Do đó, công thức phân tử của hợp chất HPB là $C_{20}H_{24}O_5$.

Phổ 1H -NMR xuất hiện các tín hiệu proton đặc trưng của 1 nhóm oxymethylen tại δ_H 4,28 và 4,80; 3 nhóm methyl bậc ba tại δ_H 1,45; 1,48; 1,68 và 1 nhóm methyl bậc hai tại δ_H 1,38 (d, $J = 7,0$ Hz).

Phổ ^{13}C -NMR, DEPT và HSQC của hợp chất HPB cho thấy tín hiệu của 20 carbon, gồm 4 nhóm methyl, 4 nhóm methylen, 1 nhóm methin và 11 carbon không liên kết với hydro; trong đó có 1 carbon carbonyl tại δ_C 185 (C-7), 1 carbon của nhóm oxymethylen tại δ_C 81,5 (C-16). Các dữ kiện trên gợi ý HPB là một abietan diterpenoid.

Các tương tác HMBC giữa H-18 (δ_H 1,45)/H-19 (δ_H 1,48) và C-3 (δ_C 37,4)/C-4 (δ_C 37,5)/C-5 (δ_C 144,9) cho phép định vị nhóm *gem*-dimethyl tại C-4 và liên kết bội tại C-5. Tương tự, tương tác HMBC từ H-20 (δ_H 1,68) đến C-1 (δ_C 30,8)/C-5 (δ_C 144,9)/C-9 (δ_C 142,0)/C-10 (δ_C 43,2) khẳng định nhóm methyl bậc ba còn lại tại C-10. Nhóm methyl bậc hai (C-17) tại C-15 được xác định qua các tương tác HMBC giữa H-17 (δ_H 1,38) và C-13 (δ_C 117,1)/C-15 (δ_C 36,5)/C-16 (δ_C 81,5). Ngoài ra, tương tác giữa H-16 (δ_H 4,28, 4,80) và C-12 (δ_C 157,5) chứng tỏ C-16 liên kết với C-12 qua cầu oxy, tạo thành vòng tetrahydrofuran thế 1,2,3. Các lập luận trên cho phép xác định cấu trúc của hợp chất HPB là 12,16-epoxy-6,11,14-trihydroxy-5,8,11,13-abietatetraen-7-on.

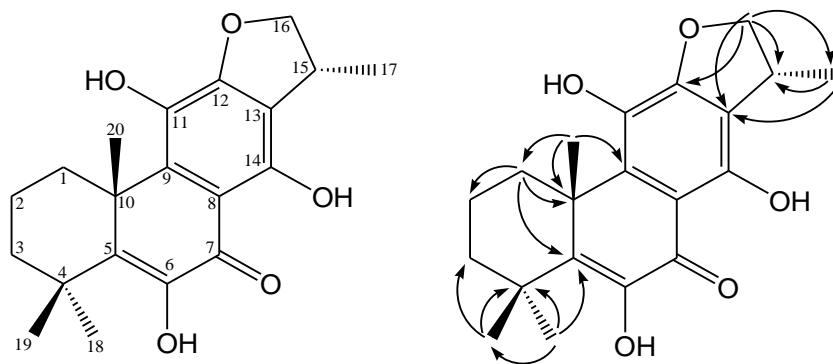
Phổ CD của hợp chất HPB có hiệu ứng cotton (-) tại bước sóng 305 nm, dựa vào quy tắc CD keton đối với hợp chất HPB, nhóm CH_3 -20 ở vị trí bên trái phía trên (góc phần tư thứ nhất) và có hiệu ứng cotton (-), vì vậy cấu hình tuyệt đối tại vị trí C-10 là S

tương tự coleon C [152], mandaron A [51], (10*S*)-12, 16-epoxy-17 (15→16)-abeo-3,5,8,12,15-abietapentaen-2,7,11,14-tetraen [203], 16 (*S*), 12,16-epoxy-11,14-dihydroxy-6-methoxy-17(15-16)-abeo-abieta-5,8,11,13-tetraen-7-trihydroxy-abieta-8,11,13 trien-7-on [174]. Tương tự như đối với hợp chất HPA, hằng số tương tác giữa H-15 và H-16a ($J_{15,16} = J_{aa} = 9,0$ Hz) cho thấy vị trí *trans*-diaxial giữa H-15 và H-16a, hằng số tương tác của CH₃-17 (1,36; d ($J = 7$ Hz)), vì vậy CH₃-17 ở vị trí *axial* so với H-15 và định hướng α của CH₃-17. Dựa vào các giữ kiện trên, đồng thời so sánh với phổ của HPA và tài liệu tham khảo [121], xác định được vị trí tương đối của H-17 và H-18 (Hình 3.20). Từ những phân tích trên, cấu trúc hóa học của hợp chất HPB được xác định là (10*S*, 15*R*)-12,16-epoxy-6,11,14-trihydroxy 5,8,11,13-abietatetraen-7-on hay còn gọi là **lycoxanthol**.

Bảng 3.9. Số liệu phổ NMR của hợp chất HPB

Vị trí C/H	$\delta_C^{a, b}$	DEPT	$\delta_H^{a, c}$ (mult., J (Hz))
1	30,8	CH ₂	1,62 m; 3,25 m
2	18,6	CH ₂	1,72 m; 1,87 m
3	37,4	CH ₂	1,43*; 2,08 m
4	37,5	C	-
5	144,9	C	-
6	143,2	C	-
7	185,0	C	-
8	108,1	C	-
9	142,0	C	-
10	43,2	C	-
11	133,0	C	-
12	157,5	C	-
13	117,1	C	-
14	155,0	C	-
15	36,5	CH	3,70 m
16	81,5	CH ₂	4,28 dd (9,0; 6,0); 4,80*
17	18,9	CH ₃	1,38 d (7,0)
18	28,5	CH ₃	1,45 s
19	27,6	CH ₃	1,48 s
20	27,6	CH ₃	1,68 s

^a Đo trong DMSO, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, * tín hiệu chồng chập



Hình 3.20. Cấu trúc hóa học và các tương tác HMBC (→) chính của HPB

) Hợp chất HPH (Chất mới): *Huperphlegmarin B

Hợp chất HPH thu được dưới dạng bột màu vàng nhạt.

Phổ HR-ESI-MS của hợp chất này cho pic ion giả phân tử tại m/z 329,1747 $[M-H]^-$ tương ứng với công thức phân tử $C_{20}H_{25}O_4$ (tính theo lý thuyết là 329,1753), m/z 331,1925 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử $C_{20}H_{27}O_4$ (tính theo lý thuyết là 331,1909). Kết hợp với dữ kiện phổ ^{13}C -NMR, DEPT, công thức phân tử của HPH được đề nghị là $C_{20}H_{26}O_4$, độ bất bão hòa phân tử là 8.

Phổ 1H -NMR chỉ ra đặc trưng của 3 nhóm methyl bậc ba tại δ_H 1,17; 1,29, 1,30; 1 nhóm isopropyl tại δ_H 1,21 (6H, d, $J = 7,0$ Hz) và 3,35 (1H, m); 1 proton thơm tại δ_H 7,23; 2 nhóm carbinol tại δ_H 3,97 và 4,54 ở vùng trường thấp.

Phổ ^{13}C -NMR, DEPT và HSQC của HPH chỉ ra 20 tín hiệu carbon, gồm 5 nhóm methyl, 2 nhóm methylen, 5 nhóm methin và 8 carbon không liên kết hydro. Tín hiệu đặc trưng của 1 carbon carbonyl tại δ_C 200,0 (C-7) và 2 carbon của nhóm oxymethin tại δ_C 98,9 (C-1), 76,0 (C-6) cũng được quan sát. Các dữ kiện 1D-NMR gợi ý hợp chất HPH là một abietan diterpenoid.

Các dữ kiện phổ HSQC và HMBC cho thấy cấu trúc của hợp chất HPH tương tự như cấu trúc của 6 α -hydroxydemethylcryptojaponol [55], [163], ngoại trừ sự thay thế 1 carbon nhóm methylen trong cấu trúc của 6 α -hydroxydemethylcryptojaponol bởi 1 carbon của nhóm oxymethin trong phân tử của hợp chất HPH. Sự có mặt của nhóm carbinol (C-1) được xác định thông qua các tương tác HMBC giữa H-20 (δ_H 1,29) và H-5 (δ_H 1,98) với C-1, giữa H-1 (δ_H 3,97) với C-5 (δ_C 58,3)/C-9 (δ_C 148,5)/C-10 (δ_C 42,6).

Ngoài ra, cầu nối oxy giữa C-1 và C-11 được đề nghị nhằm hoàn thiện công thức phân tử của HPH. Đề nghị này được củng cố bởi giá trị hằng số chuyển dịch hóa học tại H-1 (δ_H 3,97) và C-1 (δ_C 98,9) tương tự như cấu trúc (1*R*,5*S*,10*S*)-1, 11-oxylferruginol (δ : 3,71 (H-1) và 98,5 (C-1)) [220].

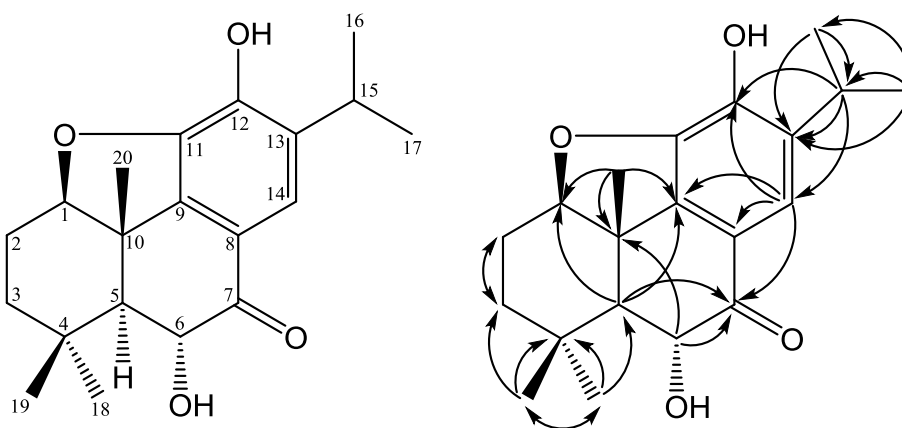
Cấu trúc lập thể của hợp chất HPH được xác định tương tự như hợp chất HPA và HPB. Phổ CD của HPH cho hiệu ứng cotton (+) tại vị trí 327 nm ($\Delta\epsilon$ +16,19) và hiệu ứng cotton (-) tại vị trí 301 nm ($\Delta\epsilon$ -4,27), theo quy tắc CD keton cho nhóm xyclohexenon, khi chiếu các nhóm thế H-6, H-5, CH₃-20 và OH sẽ ở các vị trí như sau: Nhóm thế CH₃-20 ở vị trí β do đó sẽ nằm phía bên phải phía trên, cho hiệu ứng cotton (-) và có cấu hình *S*, với H-5 ở vị trí α -axial do đó nằm ở phía bên trái phía dưới, có hiệu ứng cotton (-) và có cấu hình *S*, tương tự với nhóm thế OH-6 ở vị trí α -axial do đó sẽ nằm ở phía bên phải phía dưới, cho hiệu ứng cotton (+) và có cấu hình *R*. Điều này cũng được củng cố bởi thực tế là dữ liệu phổ NMR của hợp chất HPH phù hợp với cấu trúc (1*R*,5*S*,6*R*,10*S*)-1,11-oxylferruginol ở vòng A [220]. Căn cứ vào các giá trị hằng số tương tác vicinal lớn giữa H-1 và H-2 β (δ_H 2,35), giữa H-5 và H-6 (δ_H 4,54) ($J_{1,2\beta} = J_{5,6} = 12,5$ Hz) và tương tác NOESY giữa H-1 với H-5, giữa H-6 với H-20 cho phép xác định cấu trúc định hướng α cho H-1 và H-5 cũng như định hướng β cho H-6 và cấu hình tuyệt đối cho H-1. Từ những lập luận trên, cấu trúc hóa học của hợp chất HPH được thiết lập là (1*R*,5*S*,6*R*,10*S*)-1 β ,11-epoxy-6 α ,12-dihydroxy-8,11,13-abietatrien-7-on. Đây là hợp chất mới, được đặt tên là **huperphlegmarin B**.

Bảng 3.10. Số liệu phổ NMR của hợp chất HPH

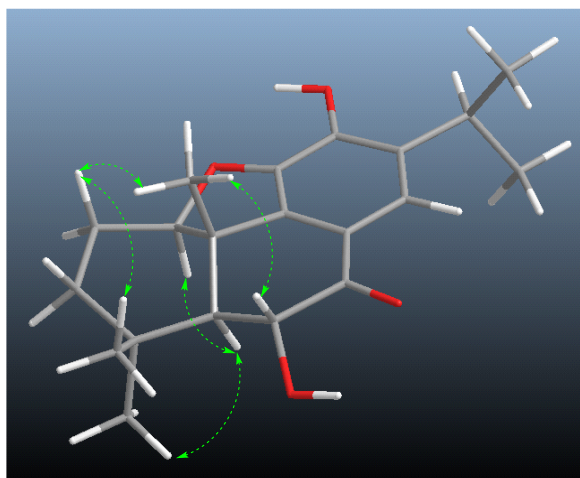
Vị trí C/H	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ (mult., <i>J</i> (Hz))
1	98,9	CH	3,97 dd (12,5; 3,5)
2	25,4	CH ₂	2,04 m (H α); 2,35 dq (12,0; 4,5) (H β)
3	43,4	CH ₂	1,59 m (H α); 1,82 m (H β)
4	36,5	C	-
5	58,3	CH	1,98 d (12,5)
6	76,0	CH	4,54 d (12,5)
7	200,0	C	-
8	144,7	C	-
9	148,5	C	-

Vị trí C/H	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J (Hz))
10	42,6	C	-
11	-	C	-
12	151,0	C	-
13	140,6	C	-
14	118,0	CH	7,23 s
15	28,2	CH	3,35 m
16	23,7	CH ₃	1,21 d (7,0)
17	23,3	CH ₃	1,21 d (7,0)
18	35,8	CH ₃	1,17 s
19	24,3	CH ₃	1,30 s
20	16,0	CH ₃	1,29 s

*^a Đo trong DMSO, ^b 125 MHz, ^c 500 MHz, *tín hiệu chồng chập*



Hình 3.21. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (\rightarrow) chính của hợp chất HPH



Hình 3.22. Tương tác NOESY chính của hợp chất HPH

***) Hợp chất HPD: 21 β -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat**

Hợp chất HPD thu được dưới dạng bột màu trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ chỉ ra các tín hiệu đặc trưng của 1 proton olefin tại δ_{H} 5,33; proton của 2 nhóm carbinol tại δ_{H} 4,46 (dd, $J = 11,5; 5,0$ Hz; H-3), 3,45 (brs, H-21); proton của nhóm acetyl methyl tại δ_{H} 2,04 (s). Ngoài ra, tín hiệu của 7 nhóm methyl singlet tại δ_{H} 0,69; 0,82; 0,84 (6H); 0,85; 0,87 và 0,93 cũng được ghi nhận.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT và HSQC chỉ ra 32 tín hiệu carbon, thuộc về 8 nhóm methyl, 10 nhóm methylen, 7 nhóm methin và 7 carbon không liên kết hydro. Trong đó có một số tín hiệu đặc trưng như carbon nhóm carboxyl tại δ_{C} 171,00 (C-1'), 2 carbon olefin tại δ_{C} 122,2 (C-15), 138,5 (C-14), 2 carbon của nhóm oxymethin tại δ_{C} 80,9 (C-3), 76,26 (C-21). Các dữ kiện trên đề nghị hợp chất HPD là một triterpenoid khung serratan.

Các tương tác HMBC giữa H-23 (δ_{H} 0,85)/H-24 (δ_{H} 0,84) và C-3 (δ_{C} 80,9)/C-4 (δ_{C} 38,32)/C-5 (δ_{C} 55,87), giữa H-25 (δ_{H} 0,82) và C-1 (δ_{C} 38,13)/C-5/C-9 (δ_{C} 62,81)/C-10 (δ_{C} 37,47), giữa H-26 (δ_{H} 0,84) và C-7 (δ_{C} 45,08)/C-8 (δ_{C} 37,17)/C-9/C-27 (δ_{C} 56,21), giữa H-28 (δ_{H} 0,69) và C-13 (δ_{C} 56,9)/C-17 (δ_{C} 43,45)/C-18 (δ_{C} 35,98)/C-19 (δ_{C} 31,24), giữa H-29 (δ_{H} 0,87)/H-30 (δ_{H} 0,93) và C-17/C-21 (δ_{C} 76,26)/C-22 (δ_{C} 37,93) đề nghị vị trí của các nhóm methyl lần lượt tại C-4, C-8, C-10, C-18 và C-22 cũng như các nhóm hydroxy lần lượt tại C-3 và C-21. Ngoài ra, tương tác giữa H-16 (δ_{H} 1,88, 1,67)/H-27 (δ_{H} 2,23, 1,70) và C-14 (δ_{C} 138,5)/C-15 (δ_{C} 122,2) khẳng định vị trí của liên kết đôi tại Δ^{14} . Tương tự, vị trí của nhóm acetoxy tại C-3 được thiết lập qua tương tác HMBC giữa H-3 và C-1'.

Hóa lập thể của hợp chất HPD được thiết lập chủ yếu qua phân tích hằng số tương tác (J) cũng như so sánh giá trị độ chuyển dịch hóa học với các giá trị tương ứng của chất tham khảo. Cụ thể, H-3 (δ_{H} 4,46) tương tác với 2 proton H-2a (δ_{H} 1,79), H-2b (δ_{H} 1,18) với các giá trị $J_1 = J_{\text{aa}} = 11,5$ Hz, $J_2 = J_{\text{ae}} = 5,0$ Hz gợi ý định hướng α -axial của H-3 trong cấu dạng ghế của vòng A. Trong khi đó, định hướng của nhóm 21-OH được xác định là β thông qua việc so sánh giá trị δ_{C} của C-17 (43,45), C-21 (76,26) với giá trị tương ứng của 2 đồng phân 21-epimer [21 α -OH: δ_{C} 50,2 (C-17), 78,4 (C-21); 21 β -OH:

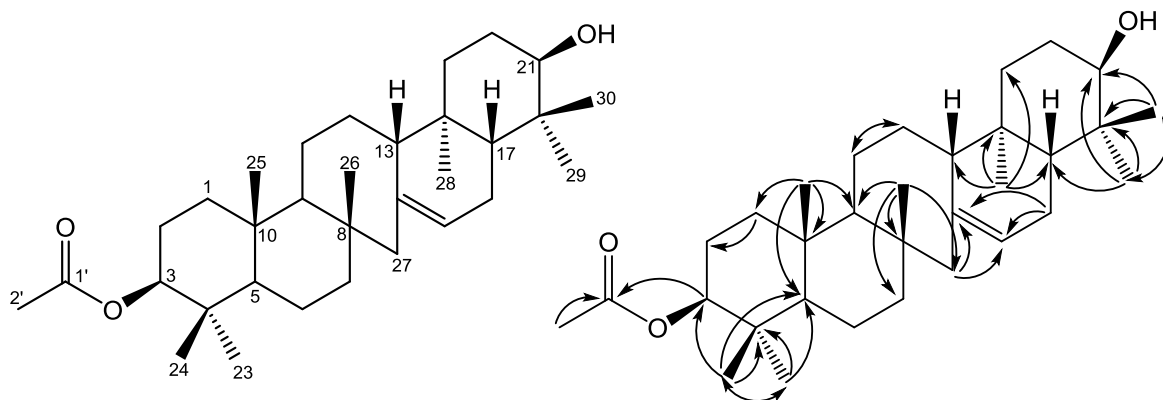
δ_C 43,9 (C-17), 75,3 (C-21)] [157]. Từ các lập luận trên, cấu trúc hóa học của hợp chất HPD được thiết lập là **21 β -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat** hay còn được gọi là **21-episerratenediol-3-O-acetat** [22], có CTPT là C₃₂H₅₂O₃.

Bảng 3.11. Số liệu phổ NMR của hợp chất HPD và hợp chất tham khảo

Vị trí C/H	$\delta_C^{\#}$ [157]	$\delta_C^{a,b}$	DEPT	$\delta_H^{a,c}$ (mult., J (Hz))
1	38,5	38,13	CH ₂	1,79 dt (13,5; 4,0); 1,18*
2	28,8	23,87	CH ₂	1,98*; 1,62*
3	78,1	80,9	CH	4,46 dd (11,5; 5,0)
4	39,7	38,32	C	—
5	56,5	55,87	CH	0,86*
6	19,5	18,82	CH ₂	1,47*
7	45,7	45,08	CH ₂	1,40*; 1,20*
8	38,1	37,17	C	-
9	63,1	62,81	CH	0,80*
10	39,2	37,47	C	-
11	25,6	25,21	CH ₂	1,72*; 1,07*
12	27,6	27,22	CH ₂	1,98*; 1,15 br,d (12,5)
13	57,4	56,9	CH	1,85*
14	139,1	138,5	C	-
15	122,8	122,2	CH	5,33 br,s
16	24,6	24,04	CH ₂	1,88*; 1,67*
17	43,9	43,45	CH	1,69*
18	36,5	35,98	C	-
19	31,9	31,24	CH ₂	1,55*; 1,44*
20	26,6	25,47	CH ₂	1,93*; 1,62*
21	75,3	76,26	CH	3,45 s
22	37,5	37,93	C	-
23	28,8	28,12	CH ₃	0,85 s
24	16,1	16,58	CH ₃	0,84 s
25	16,5	15,82	CH ₃	0,82 s
26	20,2	19,81	CH ₃	0,84 s
27	56,8	56,21	CH ₂	2,23 br,d (14,5); 1,70*
28	13,9	13,32	CH ₃	0,69 s
29	22,2	21,8	CH ₃	0,87 s
30	28,5	27,73	CH ₃	0,93 s
1'	-	171	C	-
2'	-	21,33	CH ₃	2,04 s

^a Đo trong CDCl₃, ^b125 MHz, ^c500 MHz, * tín hiệu chồng chập.

[#] δ_C của 21 β -hydroxyserrat-14-en-3 β -ol đo trong pyridin-d₅ [157]



Hình 3.23. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất HPD

***) Hợp chất HPI: 21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat**

Hợp chất HPI thu được dưới dạng bột trắng. Phổ $^1\text{H-NMR}$ chỉ ra các tín hiệu đặc trưng của 1 proton olefin tại δ_{H} 5,33; proton của 2 nhóm carbinol tại δ_{H} 4,46 (dd, $J = 12,0, 5,0$ Hz, H-3), 3,23 (dd, $J = 11,5, 4,5$ Hz, H-21); proton của nhóm acetyl methyl tại δ_{H} 2,04 (s). Ngoài ra, tín hiệu của 7 nhóm methyl singlet tại δ_{H} 0,67; 0,83 (9H); 0,84; 0,85 và 0,96 cũng được quan sát.

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT và HSQC chỉ ra 32 tín hiệu carbon bao gồm 8 nhóm methyl, 10 nhóm methylen, 7 nhóm methin và 7 carbon không liên kết hydro. Trong đó có một số tín hiệu đặc trưng như carbon carboxyl tại δ_{C} 171,00 (C-1'), 2 carbon olefin tại δ_{C} 122,3 (C-15), 138,1 (C-14), 2 carbon của nhóm oxymethin tại δ_{C} 80,84 (C-3), 79,16 (C-21).

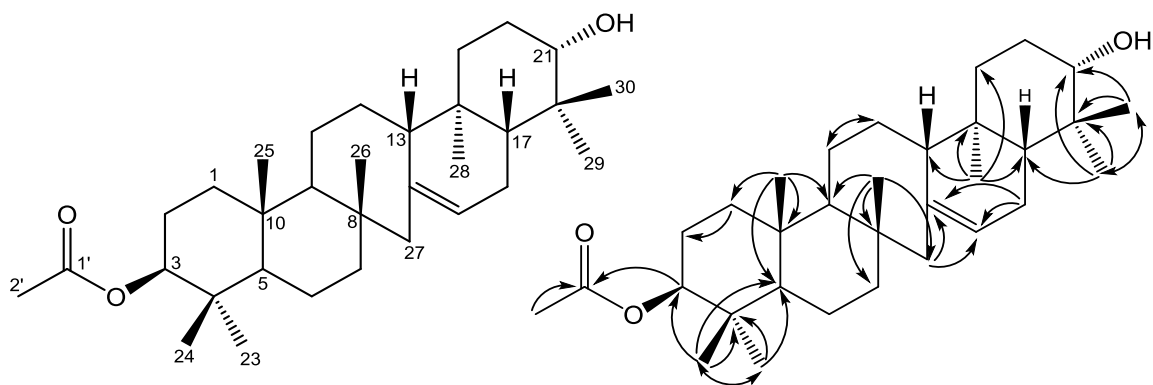
Các dữ kiện phổ 1D-NMR của hợp chất HPI nhìn chung rất giống với các giá trị tương ứng của hợp chất HPD, gợi ý sự tương đồng về mặt cấu trúc giữa chúng. Sự chênh lệch lớn giá trị δ_{C} của C-17, C-19, C-21, C-29 giữa hai hợp chất này gợi ý sự khác biệt cấu hình tại C-21. Hơn nữa, giá trị δ_{C} của C-17 (49,51), C-21 (79,16) đề nghị cấu hình 21 α -OH đối với hợp chất HPI. Điều này cũng được củng cố thêm bằng các hằng số tương tác giữa $\text{H}_{\beta/\text{axial-21}}$ (δ_{H} 3,23) và H-20 (δ_{H} 1,63) [$J_1 = J_{aa} = 11,5$ Hz, $J_2 = J_{ae} = 4,5$ Hz][224]. Sự gán ghép chi tiết cho các proton và carbon cũng được thực hiện bằng việc phân tích phổ HMBC, tương tự như đối với hợp chất HPD. Do vậy, cấu trúc hóa học của hợp chất HPI được kết luận là **21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat** hay còn được gọi là **serratenediol-3-O-acetat** [22], có CTPT là $\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_3$.

Bảng 3.12. Số liệu phổ NMR của hợp chất HPI và hợp chất tham khảo

Vị trí C/H	$\delta_c^{\#}$ [157]	$\delta_c^{a, b}$	DEPT	$\delta_H^{a, c}$ (mult., J (Hz))
1	39,3	38,29	CH ₂	1,79 dt (14,5; 5,0); 1,25*
2	28,7	23,85	CH ₂	1,63*
3	78,1	80,84	CH	4,46 dd (12,0; 5,0)
4	39,7	38,1	C	-
5	56,3	55,82	CH	0,86*
6	19,6	18,79	CH ₂	1,47*
7	45,7	45,01	CH ₂	1,40*; 1,20*
8	37,6	37,15	C	-
9	63,1	62,7	CH	0,80*
10	39,2	37,9	C	-
11	25,7	25,26	CH ₂	1,70*; 1,07*
12	27,7	27,24	CH ₂	1,97*; 1,12*
13	57,8	57,18	CH	1,73*
14	138,8	138,1	C	-
15	122,8	122,3	CH	5,33 br,s
16	24,8	24,07	CH ₂	2,09 dm; 1,90*
17	50,2	49,51	CH	1,23*
18	38,6	36,13	C	-
19	30,1	37,12	CH ₂	1,87 dt (14,0; 5,0); 1,25*
20	30,1	27,69	CH ₂	1,63*
21	78,4	79,16	CH	3,23 dt (11,5; 4,5)
22	39,6	38,88	C	-
23	28,5	28,1	CH ₃	0,85 s
24	16,3	16,57	CH ₃	0,84 s
25	16,5	15,81	CH ₃	0,83 s
26	20,2	19,81	CH ₃	0,83 s
27	56,7	55,99	CH ₂	2,22 br,d (14,5); 1,73*
28	13,9	13,43	CH ₃	0,67 s
29	15,6	14,63	CH ₃	0,83 s
30	28,8	27,57	CH ₃	0,96 s
1'	-	171,00	C	-
2'	-	21,31	CH ₃	2,04 s

^ađo trong CDCl₃, ^b125 MHz, ^c500 MHz, * tín hiệu chồng chập.

[#] δ_c của 21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -ol đo trong pyridin-d₅ [157]



Hình 3.24. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất HPI

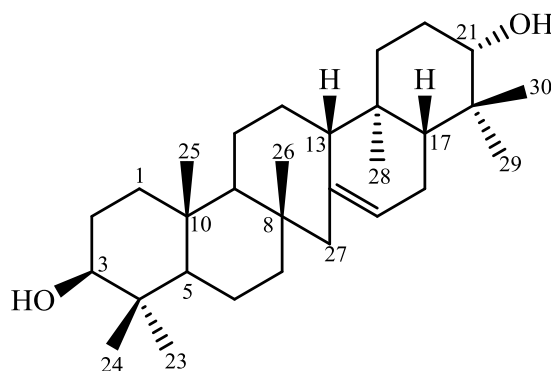
) Hợp chất HPJ: *21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -ol

Hợp chất HPJ thu được dưới dạng bột trắng. Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z bằng 477,3503 ($[M+Cl]^-$) cho $M = 442,3803$ tương ứng với công thức phân tử $C_{30}H_{50}O_2$ (tính theo lý thuyết là 442,3811).

Phổ 1H -NMR chỉ ra các tín hiệu đặc trưng của 1 proton olefin tại δ_H 5,33; proton của 2 nhóm carbinol tại δ_H 3,17 (dd, $J = 10,5; 5,5$ Hz, H-3), 3,21 (dd, $J = 11,0; 5,0$ Hz, H-21), 7 nhóm methyl singlet tại δ_H 0,67; 0,76; 0,81; 0,82; 0,83; 0,95 và 0,96.

Phổ ^{13}C -NMR, DEPT và HSQC chỉ ra 30 tín hiệu carbon bao gồm 7 nhóm methyl, 10 nhóm methylen, 7 nhóm methin và 6 carbon không liên kết hydro. Trong đó có một số tín hiệu đặc trưng như 2 carbon olefin tại δ_C 122,00 (C-15), 138,10 (C-14), 2 carbon của nhóm oxymethin tại δ_C 78,49 (C-3), 78,80 (C-21).

Các dữ kiện phổ 1D-NMR gợi ý hợp chất HPJ có cấu trúc tương tự hợp chất HPI ngoại trừ sự vắng mặt nhóm acetoxyl tại C-3. Điều này có thể nhận thấy qua sự dịch chuyển về trường cao của C-3 (78,49 so với 80,84) và theo chiều ngược lại của C-2 (27,16 so với 23,85). Sự gán ghép chi tiết cho các proton và carbon được thực hiện bằng việc phân tích phổ HMBC. Do vậy, cấu trúc hóa học của hợp chất HPJ được kết luận là ***21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -ol*** hay còn được gọi là **serratenediol** [22].



Hình 3.25. Cấu trúc hóa học của hợp chất HPJ

Bảng 3.13. Số liệu phổ NMR của hợp chất HPJ và hợp chất tham khảo

Vị trí C/H	$\delta_c^{\#}$ [157]	$\delta_c^{a, b}$	DEPT	$\delta_H^{a, c}$ (mult., J (Hz))
1	39,3	38,50	CH ₂	0,95 [*] ; 1,79 dt (13,5; 3,5)
2	28,7	27,16	CH ₂	1,61 [*] ; 1,12 [*]
3	78,1	78,49	CH	3,17 dd (10,5; 5,5)
4	39,7	38,76	C	-
5	56,3	55,61	CH	0,77 [*]
6	19,6	18,74	CH ₂	1,45 [*]
7	45,7	45,00	CH ₂	1,18 [*] ; 1,39 dt (13,0; 3,0)
8	37,6	36,93	C	-
9	63,1	62,71	CH	0,80 [*]
10	39,2	38,00	C	-
11	25,7	25,13	CH ₂	1,06 [*] ; 1,72 [*]
12	27,7	27,05	CH ₂	2,00 m; 1,61 [*]
13	57,8	57,04	CH	1,75 [*]
14	138,8	138,10	C	-
15	122,8	122,00	CH	5,33 br,s
16	24,8	23,89	CH ₂	2,09 dm (18,0); 1,93 m
17	50,2	49,73	CH	1,24 dd (12,0; 5,5)
18	38,6	35,92	C	-
19	30,1	37,03	CH ₂	1,85 dt (13,5; 3,5); 1,11 [*]
20	30,1	27,01	CH ₂	1,61 [*]
21	78,4	78,80	CH	3,21 dd (11,0; 5,0)
22	39,6	38,66	C	-
23	28,5	27,84	CH ₃	0,96 s
24	16,3	15,22	CH ₃	0,76 s

Vị trí C/H	$\delta_C^{\#}$ [157]	$\delta_C^{a, b}$	DEPT	$\delta_H^{a, c}$ (mult., J (Hz))
25	16,5	15,52	CH ₃	0,81 s
26	20,2	19,59	CH ₃	0,83 s
27	56,7	55,90	CH ₂	2,21 brs, d (14,0); 1,76*
28	13,9	13,18	CH ₃	0,67 s
29	15,6	14,40	CH ₃	0,82 s
30	28,8	27,29	CH ₃	0,95 s

^ađo trong CDCl₃&CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, *tín hiệu chồng chập.

[#] δ_C của 21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -ol đo trong pyridin-d₅ [157].

***) Hợp chất HPP: Lycophlegmariol A**

Hợp chất **HPP** thu được dưới dạng bột màu trắng.

Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử m/z 621,4156 ([M-H]⁻) tương ứng với công thức phân tử C₃₉H₅₇O₆ (tính theo lý thuyết là 621,4155). Do đó, công thức phân tử của hợp chất HPP là C₃₉H₅₈O₆.

Phổ ¹H-NMR của hợp chất này chỉ ra 3 proton thơm của hệ spin ABX tại δ_H 6,55 (1H, dd, $J_1 = 8,5$, $J_2 = 2,0$ Hz), 6,66 (1H, d, $J = 2,0$ Hz) và 6,68 (1H, d, $J = 8,5$ Hz). Tín hiệu của 1 proton olefin tại δ_H 5,35 (s) gợi ý sự hiện diện của nối đôi ba lần thế. Hai tín hiệu singlet tại δ_H 3,46 và 5,02 thuộc về hai nhóm carbinol. Tín hiệu tại δ_H 3,38 (1H, d, $J = 11,5$ Hz) và 3,71 (1H, d, $J = 11,5$ Hz) được gán cho nhóm oxymethylen. Ở vùng trường cao, tín hiệu singlet của 6 nhóm methyl bậc ba tại δ_H 0,76; 0,82; 0,86; 0,88, 0,91 và 0,93 cũng được ghi nhận.

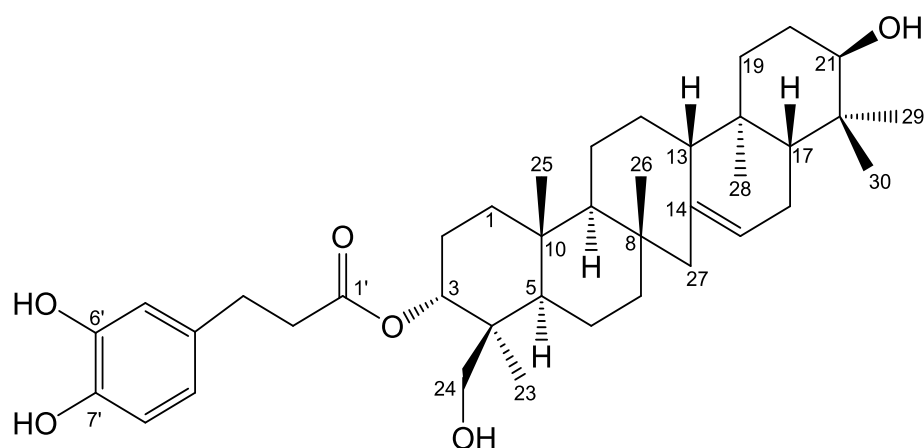
Phổ ¹³C-NMR và HSQC chỉ ra 39 tín hiệu carbon gồm 6 nhóm methyl, 13 nhóm methylen, 10 nhóm methin và 10 carbon không liên kết hydro. Một số tín hiệu dễ dàng gán ghép thông qua giá trị δ_C đặc trưng gồm 1 carbon thuộc nhóm carboxyl (δ_C 174,7), 8 carbon olefin (δ_C 116,4 – 146,3), 3 carbon sp³ mang oxy (δ_C 65,3; 75,4; 77,0). Các dữ liệu phổ trên cho phép dự đoán hợp chất HPP là một triterpen ester.

Các tương tác giữa H₃-23 (δ_H 0,88)/H-24 (δ_H 3,38 và 3,71) với C-3 (δ_C 75,4)/C-4 (δ_C 43,6)/C-5 (δ_C 52,5) cho phép xác định nhóm carbinol (C-3) của vòng A và nhóm oxymethylen (C-24) tại C-4. Tương tác HMBC giữa H₃-29 (δ_H 0,91)/H₃-30 (δ_H 0,93) với C-17 (δ_C 44,6)/C-21 (δ_C 77,0)/C-22 (δ_C 38,4) cho phép định vị nhóm carbinol còn lại tại vị trí 21 của vòng E. Tín hiệu HMBC từ H-27 (δ_H 2,32; 1,74) đến C-8 (δ_C 38,4)/C-9 (δ_C

64,2)/C-13 (δ_C 58,3)/C-14 (δ_C 139,9)/C-15 (δ_C 123,4) giúp định vị liên kết đôi tại Δ^{14} cũng như gợi ý cấu trúc vòng 7 cạnh của vòng C (Hình 3.28). Dựa vào các phân tích trên, hợp phần triterpen của HPP được đề nghị có bộ khung serratan. Các tương tác HMBC của các nhóm methyl khác, từ H₃-25 đến C-1/C-5/C-10, từ H₃-26 đến C-7/C-8/C-9/C-27, từ H₃-28 đến C-13/C-17/C-18/C-19 giúp củng cố đề nghị trên. Hơn nữa, các tương tác HMBC từ H-2' (δ_H 2,62) đến C-1' (δ_C 174,7)/C-3' (δ_C 31,7)/C-4' (δ_C 133,3); từ H-3' (δ_H 2,82) đến C-1' /C-2' (δ_C 37,3)/C-5' (δ_C 116,4)/C-9' (δ_C 120,5) chứng tỏ hợp phần acyl là dihydrocaffeoyl. Sự dịch chuyển mạnh về phía trường thấp của H-3 (δ_H 5,02) chứng tỏ nhóm OH tại C-3 bị ester hóa bởi dihydrocaffeic acid.

Về mặt hóa lập thể, tín hiệu singlet của H-3 và H-21 chứng tỏ hai proton này định hướng equatorial trong cấu hình dạng ghế của vòng A, E tương ứng. Ngoài ra, tương tác NOESY giữa H-24a (δ_H 3,71) với H _{β a}-2 (δ_H 1,85)/H _{β e}-3/H₃-25 (δ_H 0,82), giữa H _{β e}-3 với H-2 (δ_H 1,85; 1,54)/H₃-23 (δ_H 0,88) cho phép khẳng định hướng α -axial của 3-OH, β -axial của 4-CH₂OH. Tương tự, định hướng β -axial của 21-OH được xác lập thông qua tương tác NOESY H₃-29 (δ_H 0,91)/H-21 (δ_H 3,46) (Hình 3.28).

Từ các lập luận trên kết hợp với so sánh số liệu phổ của hợp chất tham khảo trong tài liệu [199], hợp chất HPP được xác định là **21 β ,24-dihydroxyserrat-14-en-3 α -yl dihydrocaffeate**, còn gọi là **lycophlegmariol A** (Hình 3.26).



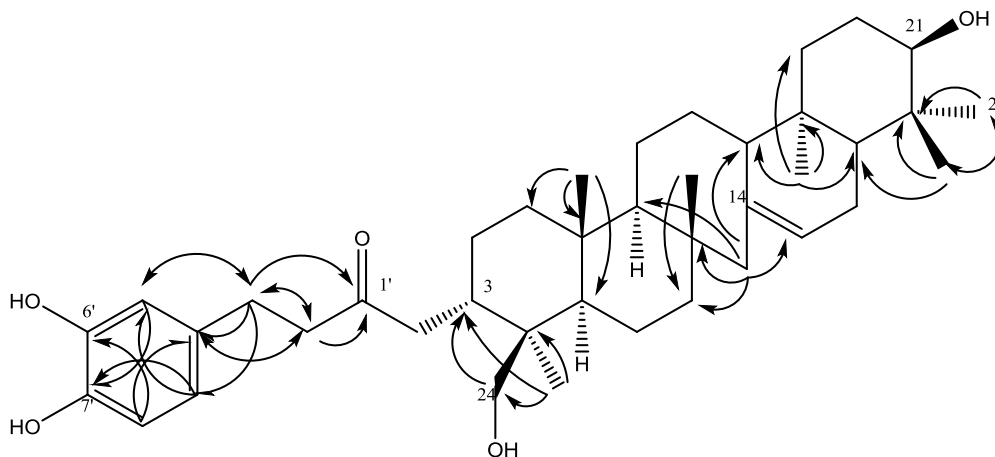
Hình 3.26. Cấu trúc hóa học của hợp chất HPP

Bảng 3.14. Số liệu phổ NMR của hợp chất HPP và hợp chất tham khảo

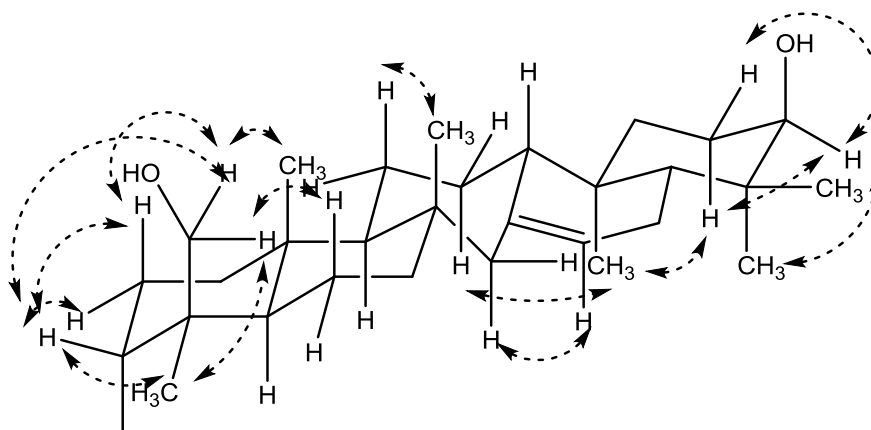
Vị trí C/H	$\delta_C^{\#}$ [199]	$\delta_C^{a, b}$	$\delta_H^{a, c}$ (mult., J (Hz))
1	33,8	34,9	1,48*; 1,03 m
2	26,6	23,7	1,85*; 1,54*
3	69,8	75,4	5,02 brs
4	42,4	43,6	-
5	50,0	52,5	1,35*
6	19,5	19,8	1,48 s
7	45,7	46,5	1,39*; 1,23 m
8	38,4	38,4	-
9	62,9	64,2	0,90*
10	37,6	39,1	-
11	25,4	26,3	1,81 m; 1,18*
12	27,6	28,5	2,04*; 1,18*
13	57,4	58,3	1,94*
14	139,1	139,9	-
15	122,8	123,4	5,35 s
16	24,6	25,1	2,02*; 1,95*
17	43,8	44,6	1,74*
18	36,4	37,1	-
19	31,9	32,4	1,60*; 1,52*
20	26,5	26,5	1,97*; 1,60*
21	75,3	77,0	3,46 brs
22	38,0	38,4	-
23	23,4	22,7	0,88 s
24	68,2	65,3	3,71 d (11,5) 3,38 d (11,5)
25	16,3	16,6	0,82 s
26	20,0	20,3	0,86 s
27	56,7	57,5	2,32 d (14,5); 1,74*
28	13,8	13,9	0,76 s
29	22,2	22,4	0,91 s
30	28,7	28,4	0,93 s
1'	173,3	174,7	-
2'	36,8	37,3	2,62 t (7,0)
3'	31,0	31,7	2,82 m
4'	132,6	133,3	-

Vị trí C/H	$\delta_C^{\#}$ [199]	$\delta_C^{a, b}$	$\delta_H^{a, c}$ (mult., J (Hz))
5'	116,9	116,4	6,66 d (2,0)
6'	147,3	146,3	-
7'	145,7	144,7	-
8'	116,6	116,4	6,68 d (8,5)
9'	119,7	120,5	6,55 dd (8,5, 2,0)

*^ađo trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, *tín hiệu chống chập $\delta_C^{\#}$ của hợp chất tham khảo đo trong pyridin-d₅ [199]*



Hình 3.27. Tương tác HMBC (→) chính của hợp chất HPP



Hình 3.28. Tương tác NOESY chính của hợp chất HPP

***) Hợp chất HP10A: 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd**

Hợp chất HP10A thu được ở dạng dầu, màu vàng.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ chỉ ra các tín hiệu đặc trưng của 1 proton nhóm carbonyl tại δ_{H} 9,56 (s); 2 proton thơm tại δ_{H} 7,40 và 6,60 (d, $J = 3,5$ Hz) và 2 proton của nhóm oxymethylen tại δ_{H} 4,63 (s).

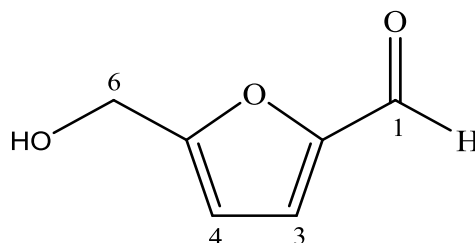
Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ chỉ ra 6 tín hiệu carbon. Trong đó có một số tín hiệu đặc trưng như carbon carbonyl (δ_{C} 179,5), 2 carbon sp^2 mang oxy tại (δ_{C} 153,9; 163,2) và 1 carbon thuộc nhóm oxymethylen (δ_{C} 57,6). Kết hợp với việc so sánh dữ liệu phổ của hợp chất tham khảo ở tài liệu [44], hợp chất HP10A được xác định là **5-hydroxymethyl-2-furaldehyd**, có CTPT là $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_3$.

Bảng 3.15. Số liệu phổ NMR của hợp chất HP10A và hợp chất tham khảo

Vị trí C/H	$\delta_{\text{C}}^{\#}$ [44]	$\delta_{\text{C}}^{\text{a, b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a, c}}$ (mult., J (Hz))
1	179,5	179,5	9,56s
2	153,91	153,9	-
3	124,8	124,8	7,40 d (3,5)
4	110,9	110,9	6,60 d (3,5)
5	163,2	163,2	-
6	57,6	57,6	4,63s

^ađo trong CD_3OD , ^b125 MHz, ^c500 MHz

[#] δ_{C} của 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd đo trong CDCl_3 [44]



Hình 3.29. Cấu trúc hóa học của hợp chất HP10A

***) Hợp chất HP10B: rehmanon C**

Hợp chất HP10B thu được dưới dạng dầu màu vàng nhạt. Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất HP10B xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z bằng 189,0513 ($[\text{M}+\text{Na}]^+$) cho $M = 166,0613$ tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_3$ (tính theo lý thuyết là 166,0630).

Phổ $^1\text{H-NMR}$ chỉ ra tín hiệu đặc trưng của liên kết đôi với cấu hình (*E*) tại δ_{H} 7,43 và 6,60 (d, $J = 16,0$ Hz). Tương tự như hợp chất HP10A, hai tín hiệu doublet khác tại δ_{H} 6,81 và 6,47 ($J = 3,5$ Hz) gợi ý sự hiện diện của dị vòng 5 cạnh trong cấu trúc của

hợp chất HP10B. Ở vùng trường cao, tín hiệu singlet tại δ_H 4,58 được gán cho nhóm oxymethylen, tín hiệu tại δ_H 2,35 là đặc trưng cho nhóm acetylmethyl.

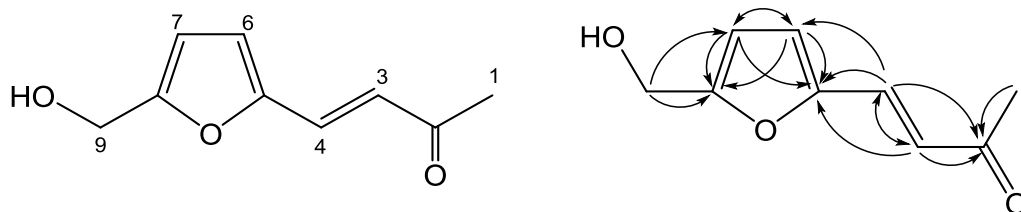
Phổ ^{13}C -NMR và HSQC của hợp chất này chỉ ra 9 tín hiệu cộng hưởng của carbon, bao gồm: 1 nhóm methyl, 1 nhóm methylen, 4 nhóm methin và 3 carbon không liên kết hydro. Thông qua giá trị độ chuyển dịch hóa học có thể dự đoán sự có mặt của một số nhóm đặc trưng như 1 nhóm carbonyl (δ_C 200,8), 2 carbon sp^2 mang oxy (δ_C 163,3 và 151,9). Tương tác HMBC giữa H_3-1 (δ_H 2,35)/ $H-3$ (δ_H 6,60)/ $H-4$ (δ_H 7,43) và C-2 (δ_C 200,8) khẳng định mảnh cấu trúc but-2-on-3-en-4-yl. Hợp phần này được gắn vào vòng furan tại C-5 thông qua các tương tác HMBC giữa H-3/H-4 với C-5 (δ_C 151,9), giữa H-4 với C-6 (δ_C 118,6). Tương tự, nhóm oxymethylen được định vị tại C-8 dựa trên các tương tác HMBC tại H_2-9 (δ_H 4,58) với C-8 (δ_C 163,3)/C-7 (δ_C 111,2). Dựa vào các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [45], cấu trúc của hợp chất HP10B được xác định là (*E*)-4-[5-(hydroxymethyl) furan-2-yl] but-3-en-2-on, còn có tên là **rehmanon C**.

Bảng 3.16. Số liệu phổ NMR của hợp chất HP10B và hợp chất tham khảo

Vị trí C/H	$\delta_C^{\#}$ [45]	$\delta_C^{a, b}$	$\delta_H^{a, c}$ (mult., J (Hz))
1	28,1	27,2	2,35s
2	198,4	200,8	-
3	124,3	124,7	6,60 d (16,0)
4	129,7	131,8	7,43 d (16,0)
5	150,9	151,9	-
6	117,0	118,6	6,81 d (3,5)
7	110,6	111,2	6,47 d (3,5)
8	157,3	163,3	-
9	57,7	57,5	4,58 s

^ađo trong CD_3OD , ^b125 MHz, ^c500 MHz

[#] δ_C của (*E*)-4-[5-(hydroxymethyl) furan-2-yl] but-3-en-2-on đo trong $CDCl_3$ [45]



Hình 3.30. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất HP10B

***) Hợp chất HP10D: Loliolid**

Hợp chất **HP10D** thu được ở dạng dầu, màu vàng. Phổ khối lượng phân giải cao HRESI-MS xuất hiện pic ion giả phân tử tại m/z 197,1171 ($[M+H]^+$) tương ứng với công thức phân tử $C_{11}H_{17}O_3$ (tính theo lý thuyết là 197,1099). Do đó, công thức phân tử của hợp chất HP10D là $C_{11}H_{16}O_3$.

Phổ 1H -NMR chỉ ra các tín hiệu đặc trưng của 1 proton olefin tại δ_H 5,77 (s), 1 nhóm carbinol tại δ_H 4,24 (tt, $J_1 = 4,0$, $J_2 = 3,0$ Hz) và 3 nhóm methyl singlet tại δ_H 1,30; 1,49 và 1,78.

Phổ ^{13}C -NMR và HSQC chỉ ra 11 tín hiệu carbon, gồm có 3 nhóm methyl, 2 nhóm methylen, 2 nhóm methin và 4 carbon không mang hydro. Trong đó tín hiệu carbon carbonyl (δ_C 174,4), 2 carbon olefin (δ_C 185,7; 113,3) và 2 carbon sp^3 mang oxy (δ_C 89,0; 67,2) được ghi nhận dễ dàng thông qua giá trị δ_C của chúng.

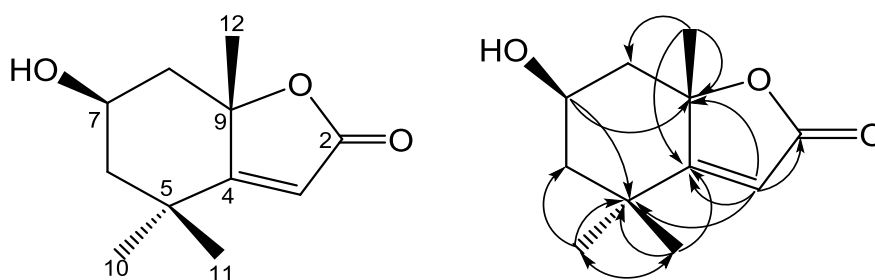
Các tương tác HMBC giữa H₃-10 (δ_H 1,30)/H₃-11 (δ_H 1,49) và C-4 (δ_C 185,7)/C-5 (δ_C 37,2)/C-6 (δ_C 48,0) chứng tỏ nhóm *gem*-dimethyl định vị tại C-5. Trong khi đó, tương tác HMBC từ H₃-12 (δ_H 1,78) đến C-4/C-8 (δ_C 46,4)/C-9 (δ_C 89,0) giúp khẳng định nhóm methyl còn lại tại C-9. Proton của nhóm carbinol tại δ_H 4,24 có tương tác HMBC với C-5 (δ_C 37,2), C-9 (δ_C 89,0) nhưng không tương tác với C-4 cho phép xác định nhóm hydroxyl tại C-7. Sự hiện diện của vòng γ -lacton với nối đôi ở vị trí α,β được khẳng định qua tương tác từ H-3 (δ_H 5,77) đến C-2 (δ_C 174,4)/C-4/C-5/C-9 trên phổ HMBC. Điều này cũng giải thích cho sự chuyển dịch mạnh về phía trường thấp một cách bất thường của C-4 (δ_C 185,7). Hơn nữa, tín hiệu của H-7 (δ_H 4,24) xuất hiện dưới dạng triplet triplet (tt) với các giá trị hằng số tương tác nhỏ ($J_1 = 4,0$, $J_2 = 3,0$ Hz) gợi ý proton này định hướng equatorial. Từ các phân tích trên kết hợp so sánh với số liệu phổ ở tài liệu tham khảo [28], [147], hợp chất HP10D được nhận dạng là **loliolid**.

Bảng 3.17. Số liệu phổ NMR của hợp chất HP10D và hợp chất tham khảo

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$ [27]	$\delta_C^{a, b}$	$\delta_H^{a, c}$ (mult., J (Hz))
1			
2	174,4	174,4	-
3	113,3	113,3	5,77 s
4	185,6	185,7	-
5	37,1	37,2	-

Vị trí C	$\delta_C^{\#}$ [27]	$\delta_C^{a, b}$	$\delta_H^{a, c}$ (mult., J (Hz))
6	48,0	48,0	1,55 dd (4,0; 14,0); 2,01 td (3,0; 14,0)
7	67,2	67,2	4,24 tt (3,0; 4,0)
8	46,4	46,4	1,76 [*] ; 2,44 td (3,0; 14,0)
9	88,9	89,0	-
10	31,0	31,0	1,30 s
11	26,9	26,9	1,49 s
12	27,4	27,4	1,78 s

^a trong CD₃OD, ^b125 MHz, ^c500 MHz, * tín hiệu chập.
 $\delta_C^{\#}$ của loliolid đo trong CD₃OD [27]



Hình 3.31. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (→) chính của hợp chất HP10D

3.3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VỀ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC

3.3.1. Kết quả nghiên cứu độc tính cấp

Mẫu thử được chuẩn bị theo mục 2.2.4.1, tiến hành thử độc tính cấp theo phương pháp ghi ở mục 2.2.4.2.

Kết quả dò liều độc tính cấp theo phương pháp dò liều với việc sử dụng từng cặp 2 chuột cho thấy liều 1250 mg/kg gây chết 1 trong 2 chuột, đây là liều cơ sở để tiến hành pha thành 5 liều để xác định liều gây chết 50% động vật thực nghiệm (LD₅₀) [6].

Bảng 3.18. Số chuột chết sau 72 giờ uống cao chiết ở 5 liều khác nhau

Lô	Liều (mg/kg)	Số chuột (n)	Số chuột chết	Tỷ lệ chết (%)
1	1667	10	10	100
2	1429	10	10	100
3	1250	10	8	80
4	1110	10	3	30
5	1000	10	0	0

Từ kết quả Bảng 3.18, sử dụng phương pháp xác định LD₅₀ của Litchfield – Wilcoxon [6], [107], xác định được liều LD₅₀ của cao chiết alkaloid toàn phần loài Thạch tùng đuôi ngựa đường uống trên chuột nhắt trắng là 1170 mg/kg (khoảng tin cậy 95% của LD₅₀ là 1148 mg/kg – 1192 mg/kg), tương đương 219,38 g dược liệu khô/kg thể trọng chuột.

Các biểu hiện của chuột được ghi nhận trong 72 giờ nghiên cứu độc tính cấp bao gồm: sau khi uống cao chiết alkaloid toàn phần của loài Thạch tùng đuôi ngựa, ở ngày thứ nhất chuột có hiện tượng giảm hoạt động, đi lại chậm chạp. Ở ngày thứ hai, chuột ít ăn uống, lừ đừ, giảm vận động, da và niêm mạc nhợt nhạt, lông hơi dựng, một số chuột bắt đầu xuất hiện tiêu chảy. Ở ngày thứ ba, chuột bỏ ăn, nằm co cụm lại một chỗ, tiêu chảy, một số chuột chết. Sau 72h, các chuột còn sống đều hoạt động, ăn uống bình thường trở lại.

3.3.2. Kết quả nghiên cứu về tác dụng sinh học

3.3.2.1. Tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro*

Từ loài Thạch tùng đuôi ngựa đã phân lập được 15 hợp chất sạch. Trong đó có 5 hợp chất được phân lập từ phân đoạn chiết alkaloid và 10 hợp chất được phân lập từ phân đoạn ethyl acetat (phân đoạn “non-alkaloid”). Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế AChE của các hợp chất được trình bày tại Bảng 3.19.

Bảng 3.19. Hoạt tính ức chế AChE *in vitro* của các hợp chất tinh khiết

STT	Tên hợp chất	Ký hiệu	IC ₅₀ ± SD (μM)
1	Fawcettidin	HP1	-
2	Huperphlegmin A	HP11A	65,50 ± 1,83
3	Huperphlegmin B	HP11B	73,55 ± 1,94
4	Phlegmariurin B	HP12	-
5	Huperzin A	HP13	0,74 ± 0,04
6	Huperphlegmarin A	HPA	-
7	Lycoxanthol	HPB	-
8	21β-hydroxyserrat-14-en-3β-yl acetat	HPD	-
9	21α-hydroxyserrat-14-en-3β-yl acetat	HPI	-
10	21α-hydroxyserrat-14-en-3β-ol	HPJ	-
11	Huperphlegmarin B	HPH	-

STT	Tên hợp chất	Ký hiệu	IC ₅₀ ± SD (μM)
12	Lycophlegmariol A	HPP	-
13	5-hydroxymethyl-2-furaldehyd	HP10A	-
14	Rehmanol C	HP10B	-
15	Loliolid	HP10D	-
16	Galantamin (Chứng dương)		1,15 ± 0,04

Ghi chú: “-“: không có hoạt tính.

Kết quả Bảng 3.19 cho thấy một số alkaloid có tác dụng ức chế AChE với giá trị IC₅₀ tốt. Đặc biệt hợp chất huperzin A (HP13) có hoạt tính ức chế AChE *in vitro* mạnh với IC₅₀ = 0,74 ± 0,04 μM, mạnh hơn chứng dương galantamin ở cùng điều kiện thử nghiệm. Hai alkaloid mới là huperphlegmin A (HP11A) và huperphlegmin B (HP11B) có hoạt tính ức chế AChE với giá trị IC₅₀ lần lượt là 65,50 ± 1,83 và 73,55 ± 1,94 μM. Các hợp chất khác chưa thể hiện hoạt tính ức chế AChE trong điều kiện thử nghiệm này.

3.3.2.2. Tác dụng cải thiện hành vi nhận thức và trí nhớ

Các thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp ghi ở mục 2.2.4.4.

a) Kết quả thử nghiệm mê lộ chữ Y

Kết quả đánh giá hành vi trong thử nghiệm mê lộ chữ Y của các nhóm nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 3.20.

Bảng 3.20. Kết quả đánh giá hành vi trong thử nghiệm mê lộ chữ Y

Nhóm nghiên cứu	Tổng số lần đi vào các cánh ($\bar{X} \pm SD$)	Phần trăm vận động luân phiên ($\bar{X} \pm SD$)
Nhóm chứng sinh lý (1)	16,00 ± 4,37	85,21 ± 17,60
Nhóm scopolamin (2)	51,10 ± 25,02	55,70 ± 19,92
T1 (50 mg/kg) (3)	36,30 ± 24,96	64,29 ± 23,03
T2 (100 mg/kg) (4)	18,80 ± 13,59	76,48 ± 24,13
T3 (150 mg/kg) (5)	23,50 ± 6,11	86,33 ± 11,84
Donepezil (5 mg/kg) (6)	24,40 ± 13,18	80,23 ± 14,65
p	p(1-2)<0,001 p(4,5,6-2)<0,05	p(1-2)<0,05 p(6-2)<0,1 p(5-2)<0,01

Kết quả ở Bảng 3.20 cho thấy:

- Tổng số lần đi vào các cánh của mê lộ chữ Y: Sử dụng phương pháp so sánh

phương sai một nhân tố (One-way ANOVA) cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tổng số lần đi vào các cánh ở các nhóm nghiên cứu [$F(5,59) = 6,226, p = 0,000$]. Phân tích sâu (post-hoc) cho thấy tổng số lần đi vào các cánh ở nhóm tiêm scopolamin tăng có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (Tukey test, $p < 0,001$). Ngược lại, khi sử dụng mẫu nghiên cứu với liều 100 mg/kg và 150 mg/kg cũng như điều trị bằng donepezil liều 5 mg/kg, tổng số lần đi vào các cánh đều giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm tiêm scopolamin (Tukey test, $p < 0,05$).

- Phần trăm vận động luân phiên ở các nhóm nghiên cứu: Phương pháp phân tích phương sai một nhân tố cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về phần trăm vận động luân phiên ở các nhóm nghiên cứu [$F(5,59) = 4,135, p = 0,003$]. Phân tích sâu (post-hoc) cho thấy phần trăm vận động luân phiên ở nhóm tiêm scopolamin là thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (Tukey, $p < 0,05$). Khi sử dụng mẫu nghiên cứu và donepezil, phần trăm vận động luân phiên tăng dần. Tuy nhiên, chỉ có phần trăm vận động luân phiên ở nhóm chuột uống mẫu nghiên cứu với liều 150 mg/kg là có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey test, $p < 0,01$) và donepezil liều 5 mg/kg là tiến tới ý nghĩa thống kê (Tukey test, $p < 0,1$) so với nhóm tiêm scopolamin.

b) Kết quả ở thử nghiệm nhận thức đồ vật

***) Tỷ lệ phần trăm thời gian khám phá đồ vật ở pha luyện tập:**

Bảng 3.21 thể hiện kết quả về tỷ lệ thời gian khám phá các đồ vật của chuột ở pha luyện tập. Phương pháp thống kê so sánh giá trị trung bình sử dụng kiểm định paired-sample t-test cho thấy không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian khám phá giữa hai đồ vật ở tất cả các nhóm nghiên cứu ($p > 0,05$).

Bảng 3.21. Thời gian khám phá đồ vật ở pha luyện tập

Nhóm nghiên cứu	Tỷ lệ % thời gian khám phá (%)		p
	Vật A1	Vật A2	
Nhóm chứng sinh lý	49,63 ± 11,62	50,37 ± 11,62	0,922
Nhóm scopolamin	50,11 ± 19,68	49,89 ± 19,68	0,986
T 1 (50 mg/kg)	47,74 ± 9,53	52,26 ± 9,53	0,473
T 2 (100 mg/kg)	46,73 ± 19,57	53,27 ± 19,57	0,610
T 3 (150 mg/kg)	48,63 ± 10,36	51,37 ± 10,36	0,685
Donepezil (5 mg/kg)	55,68 ± 20,45	44,32 ± 20,45	0,403

**) Tỷ lệ phần trăm thời gian khám phá đồ vật ở pha kiểm tra:*

Bảng 3.22. Tỷ lệ phần trăm thời gian khám phá đồ vật ở pha kiểm tra

Nhóm nghiên cứu	Tỷ lệ % thời gian khám phá (%)		p
	Vật cũ (A)	Vật mới (B)	
Nhóm chứng sinh lý	39,24 ± 21,48	60,76 ± 21,48	0,025
Nhóm scopolamin	46,59 ± 11,52	53,41 ± 11,52	0,373
T 1 (50mg/kg)	42,67 ± 12,36	57,33 ± 12,36	0,094
T 2 (100mg/kg)	38,75 ± 22,98	61,25 ± 22,98	0,033
T 3 (150mg/kg)	33,95 ± 20,49	66,05 ± 20,49	0,035
Donepezil (5 mg/kg)	34,16 ± 20,18	65,84 ± 20,18	0,035

Kết quả về tỷ lệ phần trăm thời gian khám phá đồ vật ở pha kiểm tra thể hiện ở Bảng 3.22 cho thấy, ở nhóm chứng sinh lý chuột có xu hướng tăng thời gian khám phá với đồ vật mới, cao hơn có ý nghĩa thống kê so với thời gian khám phá đồ vật cũ ($p < 0,05$). Ở nhóm tiêm scopolamin, thời gian khám phá giữa hai đồ vật cũ và đồ vật mới là không khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Khi sử dụng mẫu nghiên cứu, thời gian khám phá đồ vật mới cao hơn có ý nghĩa thống kê so với đồ vật cũ được thấy ở nhóm sử dụng mẫu nghiên cứu liều 100 mg/kg, 150 mg/kg và donepezil liều 5 mg/kg ($p < 0,05$).

c) Kết quả ở thử nghiệm mê lộ nước Morris

**) Thời gian tiềm (thời gian chuột bơi đến bên đảo):*

Bảng 3.23 thể hiện thời gian tiềm (thời gian chuột bơi đến bên đảo) ở các nhóm nghiên cứu trong các ngày từ ngày 1 đến ngày 7.

Bảng 3.23. Thời gian tiềm từ ngày 1 đến ngày 7

Nhóm Thời gian	Thời gian tiềm ($\bar{X} \pm SD$, giây)					
	Chứng sinh lý	Scopolamin	T1 50 mg/kg	T2 100 mg/kg	T3 150 mg/kg	Donepezil 5 mg/kg
Ngày 1	47,95 ± 14,93	47,94 ± 13,15	49,36 ± 6,56	50,09 ± 7,92	48,31 ± 10,73	44,89 ± 15,53
Ngày 2	41,09 ± 17,61	45,80 ± 10,61	48,87 ± 8,52	42,72 ± 11,03	43,30 ± 12,44	39,46 ± 12,90
Ngày 3	40,39 ± 11,14	46,16 ± 12,46	47,72 ± 7,33	42,52 ± 9,80	36,68 ± 10,90	39,84 ± 10,49
Ngày 4	32,52 ± 16,17	47,54 ± 9,69	36,15 ± 10,76	34,98 ± 11,77	30,04 ± 9,52	29,39 ± 11,53

Nhóm Thời gian	Thời gian tiềm ($\bar{X} \pm SD$, giây)					
	Chứng sinh lý	Scopolamin	T1 50 mg/kg	T2 100 mg/kg	T3 150 mg/kg	Donepezil 5 mg/kg
Ngày 5	26,50 ± 15,21	42,93 ± 8,51	35,63 ± 11,42	37,93 ± 10,58	31,89 ± 14,66	26,62 ± 12,13
Ngày 6	24,84 ± 15,96	44,45 ± 15,12	40,61 ± 15,95	32,83 ± 10,70	22,90 ± 8,08	21,15 ± 7,86
Ngày 7	24,44 ± 16,48	43,83 ± 10,97	39,92 ± 10,42	35,21 ± 14,55	18,06 ± 11,40	23,69 ± 8,92

Kết quả ở Bảng 3.23 thể hiện thời gian tiềm (thời gian bơi đến bên đõ) ở các nhóm nghiên cứu trong 7 ngày thử nghiệm. Phân tích bằng phương pháp so sánh phương sai hai nhân tố có lặp (repeated two way ANOVA) cho thấy có sự khác biệt về thời gian tiềm giữa 6 nhóm nghiên cứu [$F(5,54)=10,154, p<0,001$]. Phân tích sâu (post-hoc) cho thấy thời gian tiềm của nhóm chuột được tiêm scopolamin cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng sinh lý (Tukey test, $p<0,001$). Ở nhóm chuột uống mẫu nghiên cứu liều 150 mg/kg, thời gian tiềm ngắn hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm tiêm scopolamin (Tukey test, $p<0,001$). Khi điều trị bằng donepezil liều 5 mg/kg, thời gian tiềm cũng ngắn hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm tiêm scopolamin (Tukey test, $p<0,001$). Cụ thể ở từng ngày thí nghiệm như sau:

- Ở nhóm chứng sinh lý, thời gian tiềm ở ngày thứ 4, ngày thứ 5, ngày thứ 6 và ngày thứ 7 giảm có ý nghĩa thống kê so với ngày thứ nhất ($p<0,05$ và $p<0,01$).
- Ở nhóm tiêm scopolamin, không có sự khác biệt về thời gian tiềm giữa các thời điểm nghiên cứu ($p>0,05$).
- Ở nhóm T1 (sử dụng mẫu nghiên cứu liều 50 mg/kg), không có sự khác biệt về thời gian tiềm giữa các thời điểm nghiên cứu ($p>0,05$).
- Ở nhóm T2 (sử dụng mẫu nghiên cứu liều 100 mg/kg), thời gian tiềm ở ngày thứ 6 giảm có ý nghĩa thống kê so với ngày thứ nhất ($p<0,05$).
- Ở nhóm T3 (sử dụng mẫu nghiên cứu liều 150 mg/kg), thời gian tiềm ở ngày thứ 4, ngày thứ 6 và ngày thứ 7 giảm có ý nghĩa thống kê so với ngày thứ nhất ($p<0,01$).
- Ở nhóm chứng dương (sử dụng Donepezil liều 5 mg/kg), thời gian tiềm ở ngày thứ 4, ngày thứ 6 và ngày thứ 7 giảm có ý nghĩa thống kê so với ngày thứ nhất ($p<0,05$).

*) *Quãng đường chuột bơi đến bến đỗ:*

Bảng 3.24. Quãng đường chuột bơi đến bến đỗ

Nhóm Thời gian	Quãng đường chuột bơi đến bến đỗ ($\bar{X} \pm SD, m$)					
	Chứng sinh lý	Scopol-amin	T1 (50 mg/kg)	T2 (100 mg/kg)	T3 (150 mg/kg)	Donepezil (5 mg/kg)
Ngày 1	7,86 ± 2,21	8,75 ± 2,54	9,20 ± 2,16	9,08 ± 1,54	9,23 ± 1,43	8,98 ± 3,67
Ngày 2	6,73 ± 2,72	7,98 ± 1,37	9,46 ± 1,68	7,63 ± 1,81	8,39 ± 2,36	8,30 ± 3,40
Ngày 3	7,41 ± 2,34	8,48 ± 1,90	8,44 ± 1,14	8,07 ± 1,55	7,50 ± 2,26	8,35 ± 2,90
Ngày 4	5,66 ± 3,12	9,56 ± 2,63	7,07 ± 2,22	7,42 ± 2,37	7,04 ± 1,91	6,01 ± 1,54
Ngày 5	4,62 ± 2,76	8,15 ± 2,44	6,49 ± 2,05	7,20 ± 2,95	6,72 ± 2,64	5,87 ± 2,32
Ngày 6	4,64 ± 3,14	9,05 ± 2,86	7,00 ± 2,78	5,96 ± 2,39	5,41 ± 2,44	5,15 ± 1,35
Ngày 7	4,20 ± 2,40	8,73 ± 1,83	7,36 ± 1,27	6,49 ± 2,69	4,32 ± 2,49	6,19 ± 2,22

Bảng 3.24 thể hiện kết quả về quãng đường chuột bơi đến bến đỗ. Phân tích bằng phương pháp so sánh phương sai hai nhân tố có lặp (repeated two way ANOVA) cho thấy có sự khác biệt về quãng đường bơi đến đích giữa 6 nhóm nghiên cứu [$F(5,54)=7,58, p<0,001$]. Phân tích sâu (post-hoc) sử dụng kiểm định Tukey cho thấy quãng đường bơi đến bến đỗ ở nhóm chuột tiêm scopolamin dài hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng sinh lý (Tukey test, $p<0,001$). Quãng đường bơi đến đích ở nhóm chuột được uống mẫu nghiên cứu liều 150 mg/kg và donepezil 5 mg/kg ngắn hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm tiêm scopolamin (Tukey test, $p<0,01$ và $p<0,05$). Cụ thể ở từng ngày thí nghiệm như sau:

- Ở nhóm chứng sinh lý, quãng đường bơi đến chân đế ở ngày thứ 7 giảm có ý nghĩa thống kê so với ngày thứ nhất ($p<0,05$).

- Ở nhóm tiêm scopolamin, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về quãng đường bơi đến chân đế giữa các ngày thực hiện bài tập ($p>0,05$).

- Ở nhóm T1 và T2 (sử dụng mẫu nghiên cứu liều 50 và 100 mg/kg): không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về quãng đường bơi đến chân đế giữa các ngày thực hiện bài tập ($p > 0,05$).

- Ở nhóm T3 (sử dụng mẫu nghiên cứu liều 150 mg/kg): quãng đường bơi đến chân đế ở ngày 6 và ngày thứ 7 giảm có ý nghĩa thống kê so với ngày thứ nhất ($p < 0,05$).

- Ở nhóm chứng dương, quãng đường bơi đến chân đế ở ngày 4 và ngày thứ 6 giảm có ý nghĩa thống kê so với ngày thứ nhất ($p < 0,05$).

***) Thời gian chuột bơi ở góc phần tư đặt bển đổ trước đó ở ngày thứ 8:**

Bảng 3.25. Thời gian bơi ở góc phần tư đặt bển đổ trước đó ở ngày 8

Nhóm nghiên cứu	Thời gian chuột bơi trong góc phần tư đặt bển đổ trước đó ở ngày 8 ($\bar{X} \pm SD$, giây)
Nhóm chứng sinh lý (1)	32,17 ± 14,86
Nhóm scopolamin (2)	11,34 ± 5,05
T 1 (50 mg/kg) (3)	17,63 ± 11,56
T 2 (100 mg/kg) (4)	36,37 ± 13,46
T 3 (150 mg/kg) (5)	33,74 ± 7,88
Donepezil (5 mg/kg) (6)	35,61 ± 7,16
p	p(1-2) < 0,001 p(4,5,6-2) < 0,001

Bảng 3.25 thể hiện tỷ lệ thời gian chuột bơi ở góc phần tư đặt bển đổ trước đó ở ngày thứ 8. Sử dụng phương pháp so sánh phương sai một nhân tố cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian chuột bơi ở góc phần tư đặt bển đổ trước đó giữa các nhóm nghiên cứu [$F(5,59) = 10,019$, $p = 0,000$]. Phân tích sâu (post-hoc) sử dụng kiểm định Tukey cho thấy thời gian chuột bơi ở góc phần tư đặt bển đổ trước đó ở nhóm tiêm scopolamin giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng sinh lý ($p < 0,001$). Sau khi sử dụng mẫu nghiên cứu, thời gian bơi ở vùng đặt bển đổ trước đó tăng có ý nghĩa thống kê so với nhóm tiêm scopolamin được thấy ở nhóm chuột sử dụng mẫu nghiên cứu với liều 100 mg/kg và liều 150 mg/kg, tương đương với donepezil với liều 5 mg/kg ($p < 0,001$).

3.3.2.3. Tác dụng ức chế hoạt động AChE *in vivo*

Thí nghiệm được tiến hành như mục 2.2.4.5. Kết quả nghiên cứu được ghi ở Bảng 3.26.

Bảng 3.26. Hoạt độ của AChE ở hồi hải mã

Nhóm nghiên cứu	Hoạt độ AChE ($\bar{X} \pm SD$, mmol/mg/phút)
Nhóm chứng sinh lý (1)	39,53 \pm 16,69
Nhóm scopolamin (2)	60,94 \pm 17,20
T 1 (50 mg/kg) (3)	57,41 \pm 16,11
T 2 (100 mg/kg) (4)	42,74 \pm 14,28
T 3 (150 mg/kg) (5)	37,41 \pm 10,19
Donepezil (5 mg/kg) (6)	40,23 \pm 14,98
p	p(1-2)<0,05 p(5,6-2)<0,05

Bảng 3.26 thể hiện hoạt độ của AChE ở hồi hải mã của chuột thí nghiệm. Sử dụng phương pháp so sánh phương sai một nhân tố cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về hoạt độ của AChE ở hồi hải mã giữa các nhóm nghiên cứu [one way ANOVA, $F(5,59) = 4,468$, $p = 0,002$]. Phân tích sâu (post-hoc) bằng kiểm định Tukey cho thấy hoạt độ của AChE hồi hải mã ở nhóm tiêm scopolamin là cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,05$). Khi sử dụng mẫu nghiên cứu, hoạt độ của AChE hồi hải mã giảm có ý nghĩa thống kê so với ở nhóm tiêm scopolamin được thấy ở nhóm dùng liều 150 mg/kg ($p < 0,05$) và tiến tới ý nghĩa thống kê ở nhóm dùng mẫu nghiên cứu liều 100 mg/kg ($p < 0,1$). Kết quả điều trị bằng donepezil liều 5 mg/kg cũng làm giảm hoạt độ của AChE ở hồi hải mã so với nhóm tiêm scopolamin ($p < 0,05$).

3.3.2.4. Kết quả về hoạt tính chống lão suy

Thí nghiệm được thực hiện theo phương pháp ghi ở mục 2.2.4.6.

a) Nồng độ MDA huyết tương

Kết quả đo nồng độ MDA huyết tương ở các nhóm chuột được trình bày ở

Bảng 3.27.

Bảng 3.27. Nồng độ MDA huyết tương

Nhóm nghiên cứu	Nồng độ MDA huyết tương ($\bar{X} \pm SD$, mmol/L)
Nhóm chứng sinh lý (1)	1,65 \pm 0,07
Nhóm D-galactose (2)	1,96 \pm 0,23
T 1 (50 mg/kg) (3)	1,56 \pm 0,08
T 2 (100 mg/kg) (4)	1,74 \pm 0,16
T 3 (150 mg/kg) (5)	1,73 \pm 0,12
Vitamin E 50 mg/kg (6)	1,60 \pm 0,20
p	p(1-2)<0,01 p(3,4,5,6-2)<0,05

Bảng 3.27 thể hiện sự thay đổi nồng độ MDA huyết tương ở các nhóm nghiên cứu. Sử dụng phương pháp so sánh phương sai một nhân tố cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ MDA huyết tương giữa các nhóm nghiên cứu [$F(5,59) = 8,325$, $p = 0,000$]. Phân tích sâu (post-hoc) sử dụng kiểm định Tukey cho thấy nồng độ MDA huyết tương ở nhóm tiêm D-galactose là cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng sinh lý ($p < 0,01$). Điều trị bằng Vitamin E làm giảm nồng độ MDA huyết tương có ý nghĩa thống kê so với nhóm tiêm D-galactose ($p < 0,001$). Sự giảm nồng độ MDA huyết tương so với nhóm tiêm D-galactose cũng thấy ở cả ba nhóm chuột sử dụng mẫu nghiên cứu với liều 50, 100 và 150 mg/kg ($p < 0,05$ và $p < 0,001$).

b) Nồng độ SOD huyết tương

Sự khác nhau về nồng độ SOD huyết tương ở các nhóm nghiên cứu được thể hiện ở Bảng 3.28.

Bảng 3.28. Nồng độ SOD huyết tương

Nhóm nghiên cứu	Nồng độ SOD huyết tương ($\bar{X} \pm SD$, ng/ml)
Nhóm chứng sinh lý (1)	79,18 \pm 10,73
Nhóm D-galactose (2)	64,70 \pm 8,15
T 1 (50 mg/kg) (3)	73,18 \pm 7,80
T 2 (100 mg/kg) (4)	75,67 \pm 5,94
T 3 (150 mg/kg) (5)	81,32 \pm 13,40
Vitamin E 50 mg/kg (6)	78,63 \pm 13,41
p	p(1-2)<0,05 p(5,6-2)<0,05

Sử dụng phương pháp so sánh phương sai một nhân tố cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ SOD huyết tương giữa các nhóm nghiên cứu [$F(5,59) = 3,375$, $p = 0,010$]. Phân tích sâu (post-hoc) sử dụng kiểm định Tukey cho thấy nồng độ SOD huyết tương ở nhóm tiêm D-galactose giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,05$). Điều trị bằng vitamin E, nồng độ SOD huyết tương tăng có ý nghĩa thống kê so với nhóm tiêm D-galactose ($p < 0,05$). Sử dụng mẫu nghiên cứu liều 150 mg/kg, nồng độ SOD huyết tương tăng với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với nhóm tiêm D-galactose ($p < 0,01$)

c) Nồng độ GSH-Px huyết tương

Bảng 3.29. Nồng độ GSH-Px huyết tương

Nhóm nghiên cứu	Nồng độ GSH-Px huyết tương ($\bar{X} \pm SD$, pg/ml)
Nhóm chứng âm (1)	71,30 \pm 4,56
Nhóm D-galactose (2)	63,60 \pm 3,87
T 1 (50 mg/kg) (3)	67,14 \pm 5,68
T 2 (100 mg/kg) (4)	73,24 \pm 2,88
T 3 (150 mg/kg) (5)	71,69 \pm 8,23
Vitamin E 50 mg/kg (6)	69,60 \pm 6,60
p	p(1-2)<0,05 p(4,5-2)<0,05

Bảng 3.29 thể hiện sự khác biệt về nồng độ GSH-Px huyết tương giữa các nhóm nghiên cứu. Kết quả cho thấy có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về nồng độ GSH-Px

huyết tương giữa các nhóm nghiên cứu [$F(5,59) = 3,987, p = 0,004$]. Phân tích sâu (post-hoc) sử dụng kiểm định Tukey cho thấy nồng độ GSH-Px huyết tương ở nhóm tiêm D-Galactose thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,05$). Ngược lại, ở nhóm sử dụng mẫu nghiên cứu liều 100 mg/kg và liều 150 mg/kg, nồng độ GSH-Px huyết tương tăng có ý nghĩa thống kê so với nhóm tiêm D-Galactose ($p < 0,01$ và $p < 0,05$).

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

4.1. VỀ ĐẶC ĐIỂM THỰC VẬT LOÀI *HUPERZIA PHLEGMARIA* (L.) ROTHM.

Chi *Huperzia* Bernh. có khoảng hơn 400 loài, phân bố rộng khắp trên thế giới. Kể từ năm 1986, khi Liu và cộng sự phát hiện ra khả năng ức chế enzym acetylcholinesterase của huperzin A và huperzin B phân lập từ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*) thì các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. đã thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học [36], [110], [116], [183], [205]. Cây Thạch tùng đuôi ngựa là một loài thuộc chi *Huperzia* Bernh., phân bố rộng ở nhiều khu vực trên thế giới như Đông Nam Á, Ấn Độ, Châu Phi, Trung Quốc, Nhật Bản và Đài Loan, Nepal, Nam Mỹ [217], [219]. Cây có vị nhạt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt chi thông, thông kinh trừ thấp, được dùng làm thuốc trị đau họng, thủy thũng, đờn ngã tổn thương, sốt thấp khớp [4], [119]. Trên thế giới đã có một số nghiên cứu về thành phần hóa học của cây Thạch tùng đuôi ngựa, tuy nhiên tại Việt Nam cho tới nay chưa có nghiên cứu nào về loài này. Do đó, Thạch tùng đuôi ngựa là dược liệu tiềm năng, cần được nghiên cứu sâu và đầy đủ về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học nhằm tạo cơ sở cho việc khai thác và sử dụng nguồn dược liệu sẵn có trong nước theo hướng điều trị bệnh Alzheimer. Luận án là công trình nghiên cứu đầu tiên về cây Thạch tùng đuôi ngựa tại Việt Nam.

Sự phân nhóm đối với các loài thuộc họ Lycopodiaceae dựa vào đặc điểm khác nhau về dạng sống, thể giao tử và đặc điểm bào tử [79], [138-140], [142]. Tuy nhiên, cho đến nay, quan điểm về phân nhóm đối với các taxon thuộc họ này vẫn chưa đạt được sự thống nhất với nhiều quan điểm phân loại khác nhau [124]. Một số quan điểm phân loại thường được sử dụng trong các công bố khoa học như: Hệ thống phân loại của Ching (1978) [38], hệ thống phân loại của Holub (1985) [80], hệ thống phân loại của Øllgaard (1987) [140], [142], hệ thống phân loại của Wagner và Beitel (1992) [188], và hệ thống phân loại họ Lycopodiaceae đề xuất bởi nhóm PPG (2016) (The Pteridophyte Phylogeny Group) [26]. Trong đó, hệ thống phân loại của Øllgaard (1987) là hệ thống

phân loại được chấp nhận rộng rãi nhất trên thế giới [23], [121]. Do quan điểm về phân loại chưa thống nhất nên khóa phân loại các loài trong chi *Huperzia* Bernh. ở các quốc gia, khu vực cũng khác nhau: Thực vật chí Trung Quốc dựa theo hệ thống phân loại của Ching (1978) [219]. Thực vật chí Đài Loan, Thái Lan, Úc theo hệ thống phân loại của Øllgaard (1987) [227], [229], [230]. Thực vật chí Bắc Mỹ và một số nước châu Âu theo hệ thống phân loại của Wagner và Beitel (1992) [228].

Tại Việt Nam chưa tài liệu nào đề cập đến khóa phân loại các loài thuộc họ Lycopodiaceae. Theo tác giả Phạm Hoàng Hộ (1999) và Võ Văn Chi (2012), họ này phân bố ở Việt Nam có 3 chi gồm: *Lycopodiella* Holub., *Lycopodium* L. và *Huperzia* Bernh, trong đó, loài *Huperzia phlegmaria* thuộc chi *Huperzia* Bernh (theo hệ thống phân loại của Øllgaard (1987)). Sự chưa thống nhất về quan điểm phân loại như trên gây ra khó khăn nhất định trong việc định tên khoa học của loài nghiên cứu. Trên thực tế, quá trình giám định tên khoa học của loài nghiên cứu chủ yếu dựa vào tham khảo thông tin trong các tài liệu của Võ Văn Chi (2012) [4], Phạm Hoàng Hộ (1999) [9], thực vật chí Trung Quốc (2013) [219] và kết quả nghiên cứu của tác giả Yumkham S.D và cộng sự (2011) [217].

Thực vật chí Trung Quốc (2013) mô tả loài *Phlegmariurus phlegmaria* (L.) Holub) (tên đồng nghĩa là *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm): Loài thông đất (*Phlegmariurus phlegmaria* (L.) Holub) có kích thước trung bình. Thân dài, mảnh, mọc thành bụi, bông thông, chia nhánh 4-6 lần, nhánh chính dài 20-40 cm, đường kính khoảng 3 mm. Lá và thân tạo thành mặt phẳng hoặc gần như phẳng (không tạo thành hình xoắn ốc), lá dễ biến đổi hình dạng. Lá dinh dưỡng mọc xiên gắn thẳng vào thân, bóng, hình trứng, kích thước dài 5-10 mm, rộng 3-5 mm, hình tim hoặc gần như hình tim, gân rõ, cuống ngắn dễ thấy, bìa lá nguyên. Bào tử mọc ở nhánh bào tử, thẳng, dài cỡ 9-14 cm. Lá bào tử mọc thưa, hình trứng, kích thước 1,2 x 1 mm, gân rõ, bìa nguyên, đỉnh nhọn. Bào tử màu vàng, hình thận, nở thành hai mảnh [219].

Năm 2011, Ymkham S.D và cộng sự đã tiến hành nghiên cứu đặc điểm hình thái bào tử của loài *Huperzia phlegmaria* và so sánh với đặc điểm loài *Huperzia squarrosa* thu hái tại Manipur, Ấn Độ. Theo mô tả các tác giả này, loài *Huperzia phlegmaria* có thân thông, dài khoảng 80 cm, chia nhánh lưỡng phân. Lá xoan tam giác hoặc hình trứng, kích thước 1,5 x 2 cm, trải rộng, màu xanh lá đậm, có cuống ngắn, bìa nguyên. Bào tử nằm ở ngọn nhánh, nhánh bào tử có thể lưỡng phân, nhỏ và mềm, tập hợp thành cụm. Lá bào tử không có cuống. Túi bào tử hình tròn hay hình quả lê, có thể phân biệt được cuống với thân túi bào tử, khi chín có thể nứt theo đường nằm ngang. Bào tử có kích thước 37 x 35 μm , hình khối tứ diện 4 góc, mỗi góc không quá 130° , màu trắng hơi vàng [217].

Tài liệu Cây cỏ Việt Nam của Phạm Hoàng Hộ (1999) [9] và Từ điển cây thuốc Việt Nam của Võ Văn Chi (2012) [4] mô tả đặc điểm thực vật loài Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.): Cây thảo phụ sinh có thân thông, dài từ 30-100 cm, 1-4 lần lưỡng phân, to 3 mm. Lá hình xoan tam giác, rộng nhất ở góc, dài 6-13 mm gắn thẳng vào thân. Chùy ở ngọn nhánh, dài đến 16cm, lá bào tử nhỏ, dài cỡ 1 mm, cùng cỡ với túi bào tử. Túi bào tử nở thành hai mảnh như nhau.

Mô tả về thực vật cho thấy hầu hết các đặc điểm hình thái của loài nghiên cứu phù hợp với các tài liệu đã công bố. Mẫu cây nghiên cứu có một số đặc điểm hình thái nổi bật giúp nhận biết để phân biệt với các loài khác thuộc chi *Huperzia* Bernh. như: lá hình trứng hơi tam giác, có gân chính rõ, mép lá nguyên, đỉnh lá nhọn, gốc lá tròn hơi cụt, cuống lá ngắn. Bông lá bào tử ở đỉnh cành, lá bào tử sắp xếp đối chéo chữ thập, hình tương tự như lá sinh dưỡng nhưng kích thước nhỏ hơn nhiều lần, đỉnh nhọn; hạt bào tử phân ba nhánh lồi hình khối tam giác. Mẫu nghiên cứu được Tiến sĩ Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học & Công nghệ Việt Nam giám định tên khoa học là *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.

So với những đặc điểm nêu trong tài liệu tham khảo, nghiên cứu này đã mô tả đầy đủ và chi tiết hơn về đặc điểm hình thái của cây Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria*). Ngoài ra, luận án là tài liệu đầu tiên mô tả đặc điểm giải phẫu vi học của

thân, lá và đặc điểm bột lá và thân của loài nghiên cứu góp phần nhận biết và tiêu chuẩn hóa dược liệu.

Việc định danh tên khoa học cũng như các mô tả chi tiết về đặc điểm hình thái của loài Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria*) khẳng định các công bố về hóa học và tác dụng sinh học có nguồn gốc rõ ràng. Các kết quả nghiên cứu vi học cung cấp thông tin khoa học góp phần xây dựng cơ sở dữ liệu cho việc phân loại và hỗ trợ công tác tiêu chuẩn hóa dược liệu.

4.2. VỀ THÀNH PHẦN HÓA HỌC LOÀI *HUPERZIA PHLEGMARIA* (L.) ROTHM.

Như đã tổng hợp tài liệu ở phần tổng quan, cho đến nay có khá nhiều nghiên cứu về thành phần hóa học của các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. Mặc dù với số lượng khoảng hơn 400 loài, các nghiên cứu chủ yếu được thực hiện trên 16 loài, bao gồm: *H. serrata*, *H. selago*, *H. miyoshiana*, *H. chinense*, *H. saururus*, *H. lucidulum*, *H. phlegmaria*, *H. sieboldii*, *H. yunnanensis*, *H. fargesii*, *H. carinata*, *H. squarrosa*, *H. tetrasticha*, *H. goebelii*, *H. fordii* và *H. henryi.*, đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của khoảng 242 hợp chất thuộc các nhóm chính như alkaloid, terpenoid và flavonoid. Riêng đối với loài *Huperzia phlegmaria*, từ năm 1971 đến năm 2016 có 9 công trình công bố về thành phần hóa học, đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 39 hợp chất thuộc các nhóm alkaloid (16 hợp chất) và terpenoid (23 hợp chất). Các nghiên cứu về loài này được tiến hành chủ yếu bởi các nhà khoa học Nhật Bản và Trung Quốc. Tại Việt Nam chưa có nghiên cứu nào về thành phần hóa học của loài *Huperzia phlegmaria*, vì vậy, kết quả của luận án là những công bố đầu tiên về thành phần hóa học của loài này thu hái tại Việt Nam.

Hiện nay, trong lĩnh vực nghiên cứu hóa thực vật, phương pháp nghiên cứu phân lập hợp chất tự nhiên theo định hướng tác dụng sinh học được sử dụng khá phổ biến. Phương pháp này có ưu điểm là tìm kiếm các hợp chất có hoạt tính với xác suất thành công cao hơn đồng thời tiết kiệm được chi phí và thời gian nghiên cứu. Khi áp dụng phương pháp này, dựa trên kết quả sàng lọc tác dụng ức chế AChE *in vitro* của các cao phân đoạn, luận án đã định hướng quá trình nghiên cứu thành phần hóa học của phân

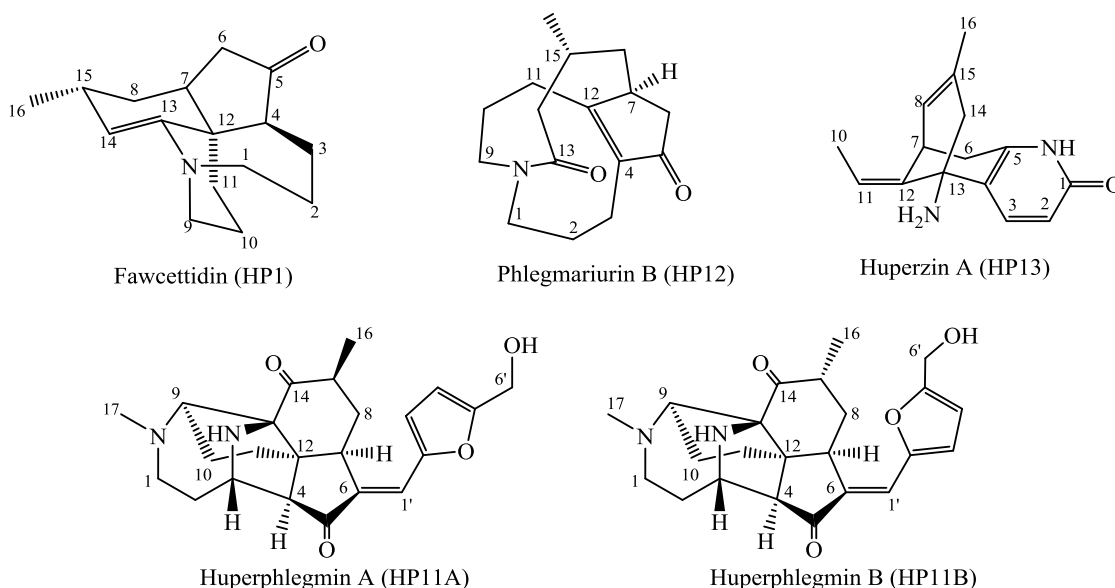
đoạn alcaloid (là phân đoạn cho tác dụng ức chế AChE *in vitro* mạnh nhất). Ngoài ra, với mong muốn nghiên cứu tìm kiếm các chất mới ngoài alcaloid (“non alcaloid”) của loài Thạch tùng đuôi ngựa, luận án tiến hành phân lập các hợp chất từ phân cao chiết alcaloid toàn phần và cả phần cặn sau khi đã chiết alcaloid.

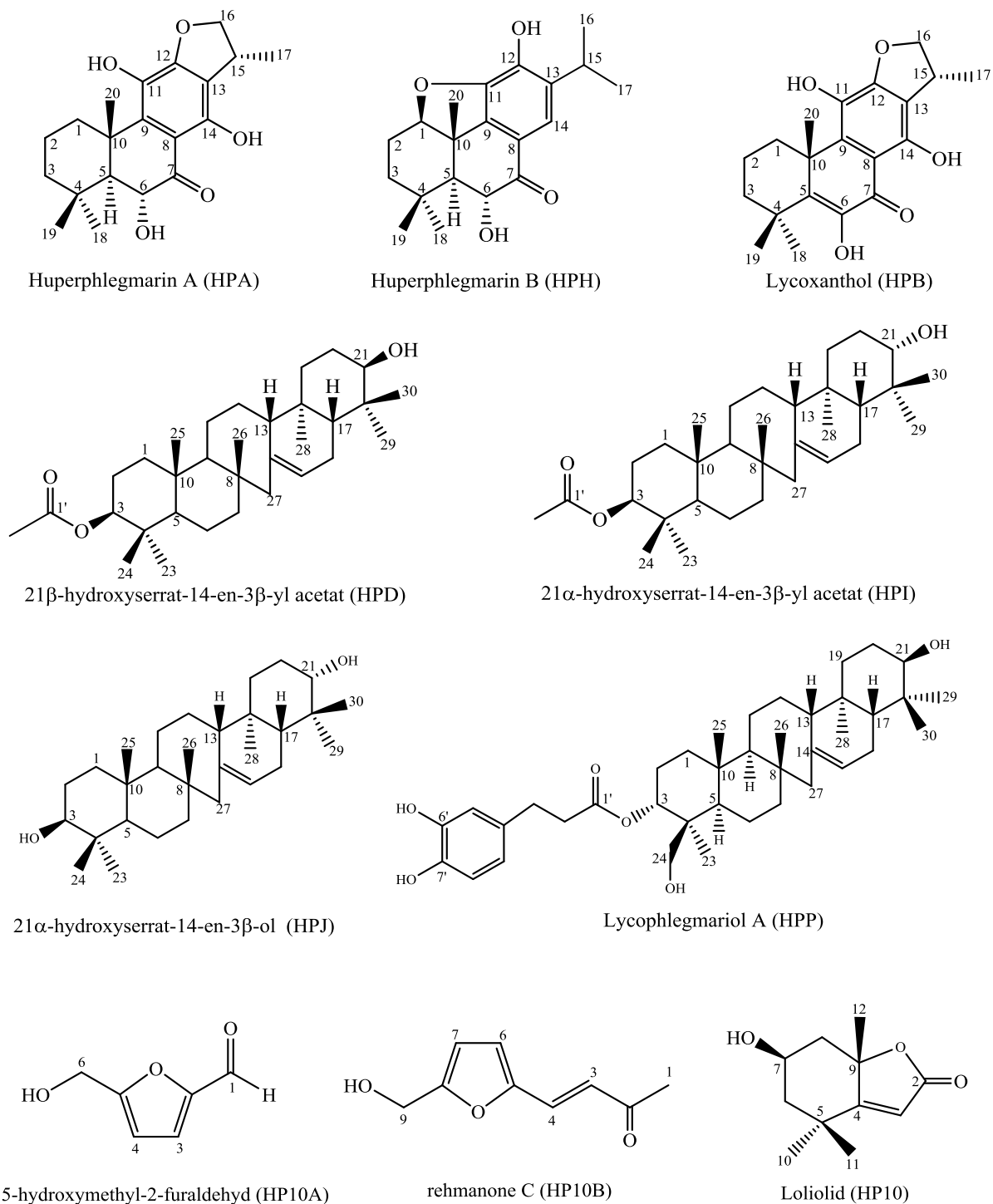
4.2.1. Về kết quả định tính

Kết quả định tính cho thấy thành phần hóa học các nhóm chất có trong dịch chiết methanol của loài Thạch tùng đuôi ngựa gồm có: Flavonoid, saponin, coumarin, tanin, alcaloid, chất béo, steroid, carotenoid, đường khử, acid amin và polysaccharid. Nhóm glycosid tim, anthranoid và acid hữu cơ không tìm thấy trong thành phần hóa học của loài này. Các nhóm hợp chất trên đều phù hợp với các công bố về thành phần hóa học của một số loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. [36], [123], [205].

4.2.2. Về kết quả phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất

Từ thân và lá của loài Thạch tùng đuôi ngựa, bằng các phương pháp sắc ký, luận án đã phân lập được 15 hợp chất sạch ký hiệu là HP1, HP11A, HP11B, HP12, HP13, HPA, HPB, HPH, HPD, HPI, HPJ, HPP, HP10A, HP10B và HP10D. Dựa vào các hằng số vật lý, phổ khối lượng (ESI-MS), phổ 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 15 hợp chất (Hình 4.1).





Hình 4.1. Cấu trúc hóa học của 15 hợp chất phân lập được từ cây Thạch tùng đuôi ngựa

Trong 15 hợp chất phân lập được có 5 hợp chất thuộc nhóm alkaloid (fawcettidin, huperphlegmin A, huperphlegmin B, phlegmariurin B, huperzin A), 3 hợp chất thuộc nhóm diterpenoid (huperphlegmarin A, huperphlegmarin B, lycoxanthol), 4 hợp chất là

triterpenoid (21β -hydroxyserrat-14-en- 3β -yl acetat, 21α -hydroxyserrat-14-en- 3β -yl acetat, 21α -hydroxyserrat-14-en- 3β -ol, lycophlemariol A) và 3 dẫn chất furan (5-hydroxymethyl-2-furaldehyd, rehmanon C, loliolid). Như vậy nhóm hợp chất chính có trong cây Thạch tùng đuôi ngựa là nhóm alkaloid (5 hợp chất) và nhóm terpenoid (7 hợp chất). Kết quả này cũng phù hợp với các kết quả nghiên cứu công bố về các lớp chất thuộc chi *Huperzia* Bernh. đã thống kê trong phần tổng quan.

4.2.2.1. Về các hợp chất alkaloid phân lập được:

- Fawcettidin và phlegmariurin B là hai alkaloid thuộc lớp fawcettimin. Lớp này được coi là sản phẩm của sự di chuyển liên kết C-4/C-13 thành liên kết C-4/C-12 từ các tiền chất là lớp lycopodin. Trong cấu trúc của fawcettidin, liên kết C-12/C-13 còn tồn tại và C-13 tạo thành liên kết đôi với C-14. Hợp chất này lần đầu tiên được phân lập từ loài *Lycopodium fawcettii* bởi Burnell R.H. năm 1959 [115], sau đó cũng được phân lập từ loài *Huperzia phlegmaria* bởi Inubushi Y. và cộng sự (1982) [84] và một số loài khác như *Lycopodium alopecuroides*, *Lycopodium annotinum*, *Huperzia squarrosa* (tên đồng nghĩa *Phlegmariurus squarrosus*) [115], [205]. Đã có một vài nghiên cứu tiến hành thử tác dụng ức chế acetylcholinesterase và butylcholinesterase *in vitro* của hợp chất fawcettidin, tuy nhiên kết quả cho thấy fawcettidin chưa thể hiện các tác dụng này [101], [177]. Trong cấu trúc hợp chất phlegmariurin B, liên kết C-12/C-13 bị phá vỡ và C-13 bị oxy hóa để tạo nhóm carbonyl. Phlegmariurin B lần đầu tiên được phân lập từ loài *Phlegmariurus fordii* (Tên đồng nghĩa: *Huperzia fordii*) bởi Tong S.H. và Xiang G.Q. năm 1984 [115], sau đó cũng được phân lập từ loài *Huperzia serrata*, *Phlegmariurus carinatus* (Tên đồng nghĩa: *Huperzia carinata*) và loài *Phlegmariurus squarrosus* (Tên đồng nghĩa: *Huperzia carinata*) [169], [205]. Kết quả của luận án là công bố đầu tiên phân lập được hợp chất phlegmariurin B từ loài *Huperzia phlegmaria*.

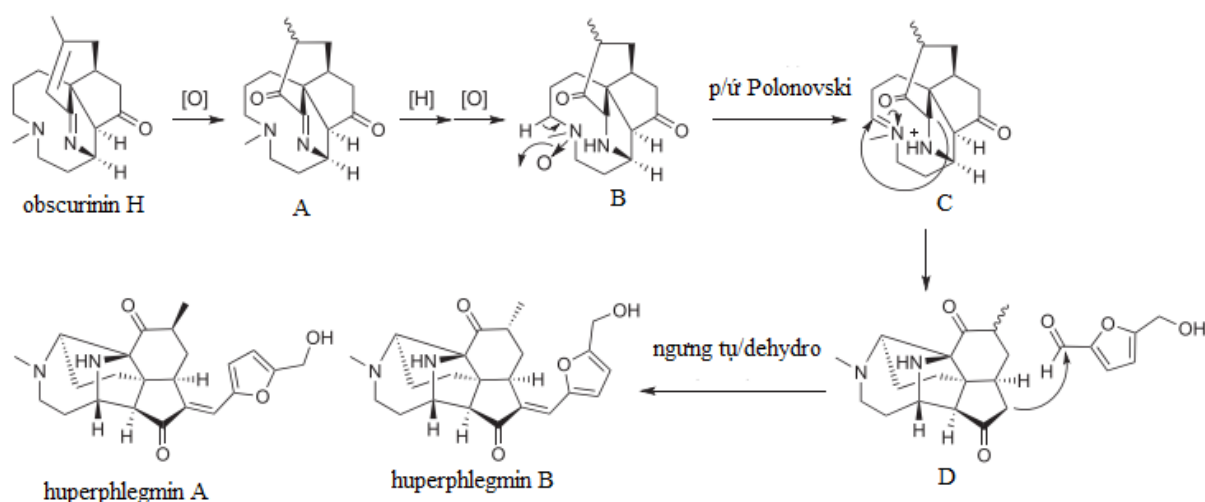
- Huperzin A là một alkaloid thuộc lớp lycodin với cấu trúc khung $C_{15}N_2$ chứa nhóm ethylien, 1 vòng pyridon nối với hệ thống vòng đôi có gắn nhóm amin bậc 1. Các đặc điểm cấu trúc này đóng vai trò quan trọng trong mối liên quan cấu trúc và tác dụng sinh học của huperzin A [19], [115]. Trong số các alkaloid lớp lycodin thì huperzin A là hợp chất có nhiều tác dụng nổi trội và được nghiên cứu nhiều nhất. Từ khi được phân

lập bởi Liu và cộng sự năm 1986 [110], hợp chất này đã được các nhà khoa học Trung Quốc đánh giá về hoạt tính sinh học, đặc biệt là tác dụng ức chế AChE mạnh, ít độc tính và ít tác dụng phụ trên hệ cholinergic [19], đã được ứng dụng trong điều trị các hội chứng bệnh Alzheimer [205]. Ngoài ra, huperzin A còn thể hiện một số tác dụng dược lý khác bao gồm: bảo vệ tế bào thần kinh, chống oxy hóa, chống viêm, chống co giật, dự phòng ngộ độc phospho hữu cơ, điều trị chứng nhược cơ, tâm thần phân liệt. Mặc dù huperzin A được biết đến chủ yếu để điều trị bệnh Alzheimer, hợp chất này còn được sử dụng trong trường hợp mất trí nhớ do bệnh mạch não [19]. Hiện nay, huperzin A được phê duyệt là thuốc ở Trung Quốc và là thực phẩm hỗ trợ điều trị bệnh Alzheimer ở Hoa Kỳ [205].

Các kết quả nghiên cứu về hoạt tính của huperzin A thu hút sự chú ý của các nhà khoa học trong nhiều năm trở lại đây, dẫn đến nhiều nỗ lực nghiên cứu tìm kiếm nguồn cung cấp huperzin A trong tự nhiên. Kết quả nhiều nghiên cứu cho thấy, ngoài loài *Huperzia serrata*, huperzin A còn tồn tại ở nhiều loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. như *Huperzia selago*, *Huperzia squarrosa*, *Huperzia phlegmaria* [119]. Theo kết quả định lượng hàm lượng huperzin A bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao của Ma X. và cộng sự (2005) cho thấy hàm lượng huperzin A trong loài *Huperzia phlegmaria* thu hái tại Vân Nam, Trung Quốc đạt $345,23 \pm 0,18 \mu\text{g/g}$ dược liệu khô, cao hơn hàm lượng huperzin A trong loài *Huperzia serrata* (đạt $148,30 \pm 0,21 \mu\text{g/g}$) thu hái tại cùng thời điểm và vị trí [117]. Tại Việt Nam, Nguyễn Ngọc Chương và cộng sự (2016) đã tiến hành định lượng huperzin A trong một số loài thuộc chi *Huperzia* Bernh có ở Việt Nam bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao. Kết quả cho thấy hàm lượng huperzin A trong loài *Huperzia phlegmaria* đạt $47,549 \mu\text{g/g}$, trong khi hàm lượng hợp chất này trong loài *Huperzia serrata* đạt $181,644 \mu\text{g/g}$ [5]. Kết quả nghiên cứu của luận án cũng đã phân lập được huperzin A từ loài Thạch tùng đuôi ngựa thu hái tại Hướng Hóa, Quảng Trị.

- Huperphlegmin A và huperphlegmin B là các lycopodium alkaloid có bộ khung carbon mới, với cấu trúc gồm hệ thống 5 vòng: 2,5-disubstituted dihydrofuran, vòng 16-methyl-Bicyclo [4.3.0] nonan, vòng cyclopentan, vòng N-methylazonan và vòng

pyrrolidin. Hai chất này có cấu trúc gần với Lycopalhin A [46]. So với Lycopalhin A, hai hợp chất HP11A và HP11B có thêm liên kết mới C-9/C-13 thay cho C-9/N-2' đồng thời mất đi liên kết C-6/C-16 để tạo ra 2 đồng phân lập thể tại C-15. Điểm mới khác của HP11A và HP11B là sự hiện diện của vòng furan thể tại C-1'. Ngoài ra, trong các lycopodium alcaloid phân lập được từ các loài thuộc họ Thạch tùng (Lycopodiaceae), hợp chất obscurinin H phân lập từ loài *Lycopodium obscurum* [115], có liên kết C-9/N-2 tạo bộ khung $C_{16}N_2$ gần tương tự như trong cấu trúc của huperphlegmin A, B. Tuy nhiên, đây là lần đầu tiên phân lập các lycopodium alcaloid với bộ khung $C_{16}N_2$ gồm năm vòng với liên kết C-9/C-13 mới. Có thể huperphlegmin A, B được tạo ra từ obscurinin thông qua quá trình oxy hóa tại C-14 để tạo thành hợp chất trung gian A, sau đó hydro hóa và oxy hóa hợp chất trung gian A để chuyển thành hợp chất trung gian B, tiếp đó xảy ra phản ứng Polonovski của B tạo ra hợp chất trung gian C, và đóng vòng để tạo thành hợp chất trung gian D. Hợp chất trung gian này ngưng tụ với rhemanon C (HP10B) cũng được phân lập trong nghiên cứu này, sau đó dehydroxyl hóa để kết nối hợp phần 2,5-disubstituted dihydrofuran tạo ra các hợp chất huperphlegmin A, B (Hình 4.2). Qua tra cứu tài liệu cho thấy hợp chất huperphlegmin A và huperphlegmin B là hai hợp chất mới, lần đầu tiên được công bố.



Hình 4.2. Giả thiết quá trình sinh tổng hợp huperphlegmin A, B

4.2.2.2. Về các hợp chất diterpenoid:

- Lycoxanthol là một hydroquinon diterpenoid lần đầu tiên được phân lập từ loài *Lycopodium lucidulum* Michx. (tên đồng nghĩa: *Huperzia lucidula*) năm 1971 [33]. Kết

quả của luận án là công bố đầu tiên phân lập được hợp chất này từ loài Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm).

- Huperphlegmarin A và huperphlegmarin B là 2 abietan diterpenoid có cấu trúc tương tự cấu trúc của hợp chất lycoxanthol. Liên kết đôi C-5/C-6 trong cấu trúc lycoxanthol được alkan hóa tạo thành hợp chất huperphlegmarin A. Trong cấu trúc của hợp chất huperphlegmarin A, nhóm OH ở C-11 và C-1, đồng thời nhóm OH ở C-12 và C-16 bị dehydro hóa tạo liên kết epoxy C-1/C-11 và C-12/C-16 tương ứng hình thành cấu trúc hợp chất huperphlegmarin B. Qua các tài liệu đã thu thập được, cho thấy sự xuất hiện liên kết epoxy trong cấu trúc của huperphlegmin B là trường hợp hiếm gặp trong các abietan diterpenoid được biết đến. Kết quả tra cứu tài liệu đã xác định hai hợp chất huperphlegmarin A và huperphlegmarin B là hai hợp chất mới.

4.2.2.3. Về các hợp chất triterpenoid:

Ngoài nhóm hợp chất alkaloid, nhiều nghiên cứu cho thấy triterpenoid loại serraten là nhóm hợp chất chiếm ưu thế thứ hai được phân lập từ loài *Huperzia phlegmaria*.

- Hợp chất 21β -hydroxyserrat-14-en- 3β -yl acetat được phân lập lần đầu tiên từ loài *Lycopodium megastachyum* Baker. bởi Miller N. và cộng sự năm 1971 [126], sau đó cũng được phân lập từ loài *Huperzia miyoshiana* và *Huperzia crassa* [22], [182]. Kết quả của luận án là công bố đầu tiên phân lập hợp chất 21β -hydroxyserrat-14-en- 3β -yl acetat từ loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.

- Hợp chất 21α -hydroxyserrat-14-en- 3β -yl acetat được phân lập từ loài *Huperzia miyoshiana* năm 2003 [182]. Sau đó, cũng được phân lập được từ dịch chiết phân đoạn ethylacetat loài *Huperzia phlegmaria* năm 2005 [158] và loài *Huperzia crassa* năm 2016 [22].

- Hợp chất 21α -hydroxyserrat-14-en- 3β -ol được phân lập từ nhiều loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. như *Huperzia serrata* [65], [222], *Huperzia crispate* [36], *Huperzia crassa* [22] và *Huperzia phlegmaria* [158]. Kết quả nghiên cứu của Ham Y.M. và cộng

sự (2012), 21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -ol (serratenediol) ức chế sự phát triển của dòng tế bào ung thư HL-60 với giá trị IC₅₀ là 12,9 μ M. Đặc biệt, hợp chất này không gây ức chế sự phát triển của các tế bào thường ở nồng độ kiểm tra. Cơ chế gây độc tế bào ung thư dòng HL-60 của serratenediol được chứng minh là do tham gia vào quá trình chết tự nhiên của tế bào (quá trình apoptosis) [65].

- Hợp chất lycophlemariol A lần đầu tiên được phân lập từ phân đoạn diethyl ete của loài *Huperzia phlegmaria* bởi nhóm nhà khoa học Thái Lan năm 2012 [199]. Cho đến nay, chưa có công bố nào về tác dụng sinh học của hợp chất được công bố. Tuy nhiên, những hợp chất có cấu trúc khung tương tự lycophlemariol A như lycophlemariol B, lycophlemariol D và lycophlegmarin đã được chứng minh có tác dụng gây độc tế bào [158], [199].

4.2.2.4. Các dẫn chất furan:

- 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd là một hợp chất vòng furan được hình thành từ quá trình dehydrat hoá đường trong môi trường acid. 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd có vai trò quan trọng trong tổng hợp vật liệu polymer, các hợp chất macrocyclic và các chất trung gian khác trong công nghiệp [44]. Hợp chất này có thể được hình thành trong quá trình chế biến các thực phẩm giàu carbohydrat ở nhiệt độ cao. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd ở nồng độ cao có tác dụng gây đột biến gen, độc tế bào, kích ứng mắt, đường hô hấp trên, da và niêm mạc [37]. Trong tự nhiên, 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd tồn tại ở một số thực vật như vỏ quả lựu (*Punica granatum*), họ Punicaceae [154], lá cây bạch đồng nữ (*Clerodendrum viscosum*), họ Verbenaceae [62], hoa của loài *Callistemon viminalis*, họ Myrtaceae [47]. Kết quả của luận án là công bố đầu tiên phân lập được hợp chất 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd từ chi *Huperzia* Bernh.

- Rehmanon C được phân lập từ rễ củ cây địa hoàng (*Rehmannia glutinosa*), họ Orobanchaceae [103] và rễ cây đan sâm (*Salvia miltiorrhiza*) họ Lamiaceae năm 2005 [45]. Kết quả nghiên cứu của luận án là công bố đầu tiên phân lập được hợp chất rehmanon C từ chi *Huperzia* Bernh. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học của hợp chất

này còn hạn chế. Trong một nghiên cứu về sự tác động của rehmanon C trên hệ thống miễn dịch của chuột thí nghiệm, các nhà khoa học đã chỉ ra rằng ở nồng độ 10 µg/mL rehmanon C có tác dụng tăng cường hoạt động miễn dịch, ngược lại ở nồng độ 100 µg/mL hợp chất này gây ức chế hoạt động miễn dịch. Các nghiên cứu về độc tính cho thấy rehmanon C không thể hiện độc tính ở nồng độ 1 µg/mL, 10 µg/mL và 100 µg/mL [103].

- Loliolid là một monoterpen lacton được phân lập lần đầu tiên từ cây lúa mạch đen (*Lolium perenne*) năm 1964 [78], sau đó cũng được phân lập từ nhiều loài thực vật (Ba gạc (*Rauwolfia yunnanensis* Tsiang), Rong đuôi chồn (*Hydrilla verticillata* (L. f) Royle), *Veronica persica* Poir., động vật như kiến đỏ (*Solenopsis invicta*) ở trên cạn và một số loài ở dưới nước như tảo, san hô. Các nghiên cứu trên thế giới chứng minh hợp chất loliolid có nhiều tác dụng sinh học như chống ung thư, kháng khuẩn, kháng nấm và chống oxy hóa [64]. Kết quả của luận án là công bố đầu tiên phân lập được hợp chất loliolid từ chi *Huperzia* Bernh.

Như vậy, kết quả nghiên cứu của luận án đã phân lập được 15 hợp chất, giúp bổ sung tư liệu cho ngành hóa học các hợp chất thiên nhiên nói chung cũng như chi *Huperzia* Bernh. và loài *Huperzia phlegmaria* nói riêng, trong đó:

- 4 hợp chất mới, bao gồm 2 alcaloid đặt tên là huperphlegmin A, huperphlegmin B và 2 abietan diterpenoid đặt tên là huperphlegmarin A và huperphlegmarin B.

- 3 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Huperzia* Bernh., bao gồm 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd, rehmanon C và loliolid.

- 3 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài *Huperzia phlegmaria*, bao gồm phlegmariurin B, lycoxanthol và 21β-hydroxyserrat-14-en-3β-yl acetat.

4.3. VỀ ĐỘC TÍNH CẤP VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC LOÀI *HUPERZIA PHLEGMARIA* (L.) ROTHM.

4.3.1. Về độc tính cấp

Độc tính cấp là độc tính xảy ra sau khi dùng mẫu thử một lần hoặc vài ba lần trong ngày. Nghiên cứu độc tính cấp nhằm cung cấp thông tin cho việc xếp loại mức độ độc của mẫu thử, dự đoán triệu chứng và dự kiến biện pháp điều trị ngộ độc cấp, thiết lập mức liều cho những thử nghiệm độc tính và tác dụng cũng như phạm vi an toàn của mẫu nghiên cứu tiếp theo. LD₅₀ là một thông số quan trọng để đánh giá độc tính của mẫu nghiên cứu, cũng như căn cứ để thăm dò liều có tác dụng dược lý [6].

Kết quả nghiên cứu đã xác định được liều LD₅₀ của cao chiết alcaloid toàn phần của loài Thạch tùng đuôi ngựa bằng đường uống là 1170 mg/kg (khoảng tin cậy 95% của LD₅₀ là 1148 mg/kg – 1192 mg/kg), tương đương 219,38 g dược liệu khô/kg thể trọng chuột. Đây là công bố đầu tiên về độc tính cấp của loài *Huperzia phlegmaria* thu hái ở Việt Nam.

Cho tới nay, các công bố về độc tính của cao chiết từ các loài thuộc chi *Huperzia* Bernh khá hạn chế. Nguyễn Duy Tài và cộng sự (2013) đã nghiên cứu và xác định được LD₅₀ của cao chiết ethanol của hai loài Thạch tùng răng cưa (*H. serrata*) và Thạch tùng râu rồng (*H. squarrosa*) đường uống trên chuột tương ứng lần lượt là 5,33 g cao/kg và 1,71 g cao/kg [14]. Các nghiên cứu về độc tính chủ yếu tiến hành trên hợp chất huperzin A (một hợp chất phân lập từ loài *Huperzia serrata* và 1 số loài thuộc chi *Huperzia* Bernh.). Kết quả cho thấy, huperzin A ít gây tác dụng phụ trên hệ cholinergic hơn các chất ức chế AChE khác như physostigmin và tacrin. Liều LD₅₀ của huperzin A trên chuột là 4,6 mg/kg đối với đường uống, 3,0 mg/kg đối với tiêm dưới da, 1,8 mg/kg đối với tiêm màng bụng và 0,63 mg/kg đối với tiêm tĩnh mạch [116]. Ngoài ra, một số hợp chất khác được phân lập từ các loài thuộc chi này cũng được nghiên cứu độc tính cấp và xác định liều LD₅₀ đường tiêm tĩnh mạch trên chuột như: lycopodin (27,58 ± 1,16 mg/kg), obscurin (99,17 ± 11,29 mg/kg), annotinin (114,6 ± 2,94 mg/kg) [68]. Như vậy, so với các hợp chất alcaloid sạch thì cao chiết alcaloid toàn phần của Thạch tùng đuôi ngựa có độc tính thấp hơn. Giá trị LD₅₀ này là cơ sở để ngoại suy liều trong các nghiên

cứu *in vivo* tiếp theo để đánh giá tác dụng sinh học của mẫu nghiên cứu theo hướng điều trị bệnh Alzheimer.

Theo tác giả Đỗ Trung Đàm (2015), khi lựa chọn liều để đánh giá tác dụng của thuốc chưa dùng cho người, “nếu xác định được liều LD₅₀ thì liều dùng thường xoay quanh 1/5-1/10 của liều LD₅₀” [7]. Luận án đã lựa chọn 3 liều cao chiết alkaloid toàn phần của loài Thạch tùng đuôi ngựa để tiến hành các nghiên cứu *in vivo* là 50 mg/kg, 100 mg/kg và 150 mg/kg.

4.3.2. Về tác dụng sinh học

Từ khi huperzin A, một chất ức chế AChE mạnh, thuận nghịch, có chọn lọc và được hứa hẹn là một loại thuốc đầy tiềm năng cho việc điều trị các triệu chứng của bệnh Alzheimer được phát hiện từ loài Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*), đã thu hút sự quan tâm của nhiều nhà khoa học với nhiều nghiên cứu tác dụng khác nhau được công bố như: tác dụng ức chế AChE, tác dụng bảo vệ tế bào thần kinh, tác dụng chống viêm, kháng khuẩn, chống oxy hóa và tác dụng gây độc tế bào của nhiều loài trong chi *Huperzia* Bernh.

Cho đến nay, chưa tìm thấy công bố nào về tác dụng sinh học của loài *Huperzia phlegmaria*. Luận án tiến hành nghiên cứu tác dụng ức chế AChE *in vitro*, tác dụng cải thiện hành vi nhận thức và trí nhớ trên chuột gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin, tác dụng ức chế AChE *in vivo* và tác dụng chống lão suy trên mô hình gây lão suy bởi D-galactose của loài Thạch tùng đuôi ngựa.

4.3.2.1. Về tác dụng ức chế AChE *in vitro*

Giả thuyết cholinergic cho rằng, sự suy giảm trí nhớ ở các bệnh nhân Alzheimer là kết quả của sự suy giảm chức năng cholinergic trong não, đặc biệt là sự giảm chất dẫn truyền thần kinh acetylcholin cũng như nồng độ của các enzym tổng hợp (acetyltransferase) và thủy phân (acetylcholinesterase) chất dẫn truyền này [29]. Như vậy, các chất ức chế AChE có thể phục hồi mức độ acetylcholin bằng cách ức chế các enzym này [94].

Luận án đã áp dụng mô hình thử nghiệm đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* theo phương pháp đo quang của Ellman, là mô hình được sử dụng phổ biến nhất và được

xem như tiêu chí “vàng” để đánh giá sàng lọc hoạt tính ức chế AChE của dược liệu cũng như các hợp chất tinh khiết [20], [155]. Tuy nhiên, so với phương pháp gốc đã được công bố của Ellman, nghiên cứu đã áp dụng phương pháp này với một vài hiệu chỉnh nhỏ về hoạt độ của enzym, dung dịch đệm sử dụng, nồng độ dung dịch cơ chất và thuốc thử cũng như tỷ lệ phối hợp của chúng vào hỗn hợp phản ứng để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

Khi tiến hành thử nghiệm *in vitro*, bên cạnh việc xác định các điều kiện thử nghiệm phù hợp, việc lựa chọn chất đối chứng dương có vai trò quan trọng trong nghiên cứu, giúp định lượng tương đối tác dụng của các mẫu nghiên cứu khi so sánh với cùng một chất chuẩn. Với nghiên cứu sàng lọc hoạt tính ức chế AChE *in vitro*, 3 hợp chất thường được sử dụng làm mẫu đối chứng dương là galantamin, tacrin và berberin chlorid [20], [127], [210]. Trong số 3 hợp chất này, galantamin và tacrin đã được sử dụng trên lâm sàng để điều trị bệnh Alzheimer. Trong nghiên cứu này, luận án đã chọn galantamin làm chất đối chứng dương.

Cho đến nay, chưa có quy chuẩn quy định mức độ ức chế AChE. Theo nghiên cứu của Santos T.C và cộng sự (2018) đánh giá tác dụng ức chế AChE trên 54 dược liệu thuộc 29 họ và 36 hợp chất tinh khiết, tác giả đã đề xuất mức độ ức chế AChE của cao chiết dược liệu và các hợp chất tinh khiết dựa vào các khoảng giá trị IC_{50} [155], được trình bày ở Bảng 4.1.

Bảng 4.1. Đánh giá mức độ ức chế AChE dựa vào các khoảng giá trị IC_{50} [155]

Đánh giá mức độ khả năng ức chế AChE	Giá trị IC_{50}	
	Cao chiết dược liệu ($\mu\text{g/ml}$)	Hợp chất tinh khiết (μM)
Mạnh	$IC_{50} < 20$	$IC_{50} < 15$
Trung bình	$20 < IC_{50} < 200$	$15 < IC_{50} < 50$
Yếu	$200 < IC_{50} < 1000$	$50 < IC_{50} < 1000$

Kết quả nghiên cứu cho thấy, cao chiết methanol, cao phân đoạn chiết *n*-hexan, phân đoạn dicloromethan, phân đoạn etylacetat, phân đoạn chiết nước còn lại và cao chiết alkaloid toàn phần có tác dụng ức chế AChE với giá trị IC_{50} được ghi ở Bảng 3.17. Trong đó, mẫu cao chiết alkaloid toàn phần có tác dụng ức chế AChE mạnh với giá trị IC_{50} $1,54 \pm 0,10$ $\mu\text{g/ml}$. Trên thế giới chưa có công bố nào về hoạt tính ức chế AChE của cao chiết toàn phần cũng như cao chiết alkaloid toàn phần từ loài *Huperzia phlegmaria*. Kết quả nghiên cứu này là một đóng góp mới của luận án, đồng thời cũng phù hợp với kết quả các nghiên cứu của nhiều tác giả khác về tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase của cao chiết một số loài trong chi *Huperzia* Bernh đã được trình bày ở Bảng 1.7. Như vậy, cao chiết alkaloid toàn phần của loài Thạch tùng đuôi ngựa có tác dụng ức chế AChE tốt hơn cao chiết methanol và các cao phân đoạn khác. Do đó, luận án đã lựa chọn cao chiết alkaloid toàn phần của mẫu nghiên cứu để phân lập các hợp chất và tiến hành các nghiên cứu tác dụng *in vivo* theo hướng để điều trị bệnh Alzheimer.

Trong các hợp chất phân lập được, chỉ có một số alkaloid thể hiện tác dụng ức chế AChE tốt là huperzin A với giá trị IC_{50} là $0,74 \pm 0,04$ μM , và hai hợp chất alkaloid lần đầu tiên phân lập trong tự nhiên (Huperphlegmin A và Huperphlegmin B) cũng có tác dụng ức chế AChE với giá trị IC_{50} lần lượt là $65,50 \pm 1,83$ và $73,55 \pm 1,94$ μM . Các hợp chất khác chưa thể hiện hoạt tính ức chế AChE ở nồng độ nghiên cứu. Chất đối chứng dương galantamin hoạt động ổn định trong điều kiện thí nghiệm với giá trị IC_{50} là $1,15 \pm 0,04$ μM .

4.3.2.2. Về tác dụng cải thiện hành vi nhận thức và trí nhớ

Các mô hình suy giảm trí nhớ trên động vật là một phần không thể thiếu trong việc đánh giá phương pháp trị liệu và đóng vai trò trong việc phát hiện và phát triển thuốc điều trị Alzheimer. Scopolamin là một chất đối kháng cholinergic điển hình, hoạt động dựa trên đối kháng cạnh tranh với ACh trên thụ thể muscaric, từ đó ngăn chặn dẫn truyền cholinergic [135]. Mô hình gâp sa sút trí nhớ bằng scopolamin ngày nay được áp dụng rộng rãi không chỉ bởi mô hình này có thể mô phỏng được quá trình sinh bệnh học đặc trưng của sa sút trí tuệ mà còn có những ưu điểm trong thực hành như đơn giản, dễ áp dụng và độ lặp lại cao [226]. Một yếu tố quan trọng để triển khai mô hình này là lựa

chọn liều scopolamin phù hợp. Nghiên cứu của Flood J.F. (1986) đã chỉ ra rằng liều scopolamin ít nhất từ 0,1 mg/kg cân nặng mới bắt đầu có khả năng gây ra sự khiếm khuyết trong chức năng nhận thức và ghi nhớ [54]. Trên thực tế có sự khác biệt lớn giữa các tác giả về liều scopolamin được sử dụng, dao động từ 0,1 – 3 mg/kg cân nặng [11], [134], [184]. Vì những lý do trên, luận án lựa chọn mô hình gây sa sút trí nhớ bằng scopolamin với liều 1,5 mg/kg để đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ và nhận thức của cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa.

Để kiểm chứng mô hình có được triển khai thành công hay không, đồng thời để so sánh tương đối các chỉ số nghiên cứu với nhóm sử dụng mẫu thử cần sử dụng thuốc đối chứng dương. Trên thực tế, liệu pháp điều trị đầu tay cho bệnh nhân sa sút trí tuệ là các thuốc ức chế acetylcholinesterase. Những chất này giúp giảm quá trình thủy phân AChE, làm tăng dẫn truyền tín hiệu cholinergic, cải thiện trí nhớ cho bệnh nhân. Hiện nay có 3 loại thuốc ức chế AChE trên thị trường là donepezil, galantamin, rivastigmin. Trong đó, donepezil thể hiện tính chọn lọc cao hơn đối với AChE do làm tăng khả năng dung nạp. Trong nhiều nghiên cứu, donepezil cũng thường được sử dụng làm thuốc đối chứng dương trong mô hình gây suy giảm trí nhớ [100], [105], [185]. Do đó, luận án lựa chọn donepezil làm thuốc đối chứng dương. Liều 5 mg/kg được lựa chọn trên cơ sở khảo sát các nghiên cứu gần đây có tương đồng về loại thử nghiệm hành vi và mức liều scopolamin áp dụng [92], [102], [215].

Trí nhớ là khả năng các sinh vật sống có thể lưu giữ những thông tin quan trọng để sử dụng khi cần. Trí nhớ được chia thành 3 loại: trí nhớ cảm giác, trí nhớ ngắn hạn và trí nhớ dài hạn. Thông tin từ thế giới xung quanh chúng ta được lưu trữ đầu tiên bởi trí nhớ cảm giác, do đó cho phép lưu trữ và tương lai sử dụng thông tin đó. Trí nhớ ngắn hạn giúp xử lý thông tin trong một khoảng thời gian ngắn. Bộ nhớ dài hạn cho phép chúng ta lưu trữ thông tin trong thời gian dài, bao gồm thông tin có thể được lấy một cách có ý thức hoặc vô thức [35].

Để đánh giá khả năng học tập, nhận thức, ghi nhớ của động vật bị gây sa sút trí nhớ bằng scopolamin, có nhiều thử nghiệm hành vi đã được áp dụng. Trong phạm vi nghiên cứu này, luận án lựa chọn mô hình mê cung chữ Y, nhận diện đồ vật và mô hình mê cung nước Morris. Đây là các thử nghiệm hành vi được nhiều tác giả sử dụng để

đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ và nhận thức của mẫu thử trên động vật gặm nhấm [187], [200]. Trong quá trình thử nghiệm, áp dụng hệ thống định vị chuột và phần mềm phân tích kết quả ANY maze (USA) để thu thập, xử lý số liệu cho kết quả chính xác, đơn giản, hạn chế sai số do người làm. Mô hình và bố trí thí nghiệm áp dụng trong luận án cũng đã được nhóm nghiên cứu của Học viện Quân y sử dụng nhằm đánh giá tác dụng cải thiện hành vi, nhận thức trên chuột gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin, được công bố trên các tạp chí khoa học quốc tế [106], [120].

a) Về tác dụng cải thiện hành vi trong thử nghiệm mê lộ chữ Y

Mô hình mê lộ chữ Y được sử dụng để đánh giá trí nhớ ngắn hạn ở chuột, dựa trên đặc tính tự nhiên là thích khám phá môi trường mới của chuột. Sau khi làm quen với mê lộ, chuột được phép tự do khám phá ba cánh tay của mê lộ. Chuột sẽ ghi nhớ các cánh tay đã truy cập trước đó và có xu hướng đi vào cánh tay ít truy cập gần đây. Trong quá trình chuột di chuyển vào các cánh tay của mê lộ, ghi lại số lần chuột đi vào từng cánh tay và số lần chuột đi vào tổ hợp cả ba cánh tay để tính toán phần trăm vận động luân phiên. Giá trị phần trăm này cao thì được coi là một trí nhớ làm việc tốt, vì điều này chỉ ra rằng chuột đã nhớ lại những cánh tay nó đã truy cập [96], [200]. Đây là mô hình thử nghiệm khá đơn giản và dễ tiến hành.

Trong thử nghiệm mê lộ hình chữ Y, kết quả nghiên cứu cho thấy sau khi tiêm scopolamin, tỷ lệ phần trăm vận động luân phiên của chuột giảm có nghĩa thống kê so với nhóm chứng. Ngược lại, khi sử dụng mẫu nghiên cứu liều ở 150 mg/kg, tỷ lệ vận động luân phiên tăng có ý nghĩa thống kê so với chuột ở nhóm tiêm scopolamin và ở liều 100 mg/kg sự tăng này là tiến tới có ý nghĩa thống kê. Takuya O. và cộng sự (2015) cũng tiến hành nghiên cứu tác dụng của cao chiết alcaloid loài thạch tùng răng cưa sử dụng mô hình tương tự, cho thấy cao chiết alcaloid của loài Thạch tùng răng cưa với liều 30 mg/kg/ngày có tác dụng làm tăng phần trăm vận động luân phiên so với nhóm chứng [167]. Kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa với liều 150 mg/kg có tác dụng cải thiện sự suy giảm trí nhớ và tăng khả năng khám phá trên chuột.

Về chỉ số tổng số lần chuột đi vào các cánh của mê lộ: sau khi tiêm scopolamin, tổng số lần chuột đi vào các cánh tăng so với nhóm chứng sinh lý và giá trị này giảm

dần về giá trị trên chuột bình thường sau khi uống mẫu nghiên cứu liều 100 và 150 mg/kg. Ở chuột tiêm scopolamin, nhiều nghiên cứu đã chứng minh có hiện tượng tăng vận động, giảm khám phá [34], [200]. Vì vậy, kết quả nói trên có thể liên quan đến rối loạn vận động trên chuột gây mô hình suy giảm trí nhớ bằng scopolamin. Kết quả luận án tương tự nghiên cứu gần đây của Harada và cộng sự (2012) cũng thấy hiện tượng tăng vận động và giảm phần trăm vận động luân phiên ở nhóm tiêm scopolamin và khi điều trị bằng ASP2535 thì thấy biểu hiện ngược lại, giảm số lần đi vào các cánh và tăng phần trăm vận động luân phiên [66]. Kết quả của luận án cũng cho thấy sự tăng vận động không ảnh hưởng đến kết quả đánh giá khả năng ghi nhớ của chuột.

b) Về tác dụng cải thiện hành vi trong thử nghiệm mê lộ nước Morris

Mê lộ nước Morris lần đầu tiên được tiến hành bởi Morris (1981) là một thử nghiệm về học tập không gian cho các loài gặm nhấm dựa vào tín hiệu xa làm điểm tham chiếu giúp con vật xác định vị trí nó đang bơi và vị trí bến đỗ trong chu vi của bể bơi tròn để thoát hiểm. Vì vậy, thời gian tìm và quãng đường từ vị trí bắt đầu đến vị trí an toàn càng ngắn, trí nhớ của con vật càng tốt. Đây được xem là một trong những thử nghiệm hành vi chủ chốt để đánh giá trí nhớ trên động vật gặm nhấm như chuột nhắt [31], [131], [187].

Trong nghiên cứu này, ở nhóm chứng sinh lý, thời gian tìm và quãng đường bơi đến đích của chuột giảm dần từ ngày thứ nhất đến ngày thứ bảy. Đây là kết quả thể hiện quá trình học tập và khả năng ghi nhớ mốc không gian ở chuột bình thường. Ở nhóm tiêm scopolamin, thời gian tìm và quãng đường bơi đến đích hầu như không khác biệt từ ngày thứ nhất đến ngày thứ bảy. Hai giá trị này ở nhóm chuột tiêm scopolamin là lớn hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng. Kết quả này cho thấy chuột tiêm scopolamin có sự suy giảm khả năng học tập và ghi nhớ không gian. Kết quả nghiên cứu của luận án cũng tương tự như kết quả của Yasushi và cộng sự (2016), ở nhóm chứng sinh lý, thời gian tìm giảm từ ngày thử nghiệm thứ 3, thời gian tìm của nhóm chuột tiêm scopolamin cao hơn ở nhóm chứng ở ngày thứ 3 và thứ 5 [208].

Khi được sử dụng mẫu nghiên cứu, kết quả cho thấy có xu hướng giảm dần thời gian tìm và quãng đường bơi đến đích tương tự như ở nhóm chứng, hai giá trị này ở nhóm chuột sử dụng mẫu nghiên cứu liều 150 mg/kg giảm có ý nghĩa thống kê so với

nhóm tiêm scopolamin. Để khẳng định rõ hơn kết quả, nghiên cứu tiếp tục đánh giá bước tiếp theo trong thử nghiệm mê lộ nước. Ở ngày thứ tám, bեն đỗ được lấy ra khỏi mê lộ nước. Trí nhớ của chuột được đánh giá bằng thời gian chuột bơi trong góc phần tư có bեն đỗ trước đó. Thời gian chuột bơi trong vùng bեն đỗ tăng thể hiện khả năng ghi nhớ mốt không gian tốt hơn [31]. Kết quả cho thấy, ở nhóm chuột được tiêm scopolamin, tỷ lệ thời gian chuột bơi ở góc phần tư đặt bեն đỗ trước đó giảm. Kết quả này phản ảnh sự suy giảm trí nhớ không gian trên chuột tiêm scopolamin. Khi được sử dụng mẫu cao chiết alcaloid toàn phần từ Thạch tùng đuôi ngựa với liều 100 mg/kg và 150 mg/kg, thời gian chuột bơi ở góc phần tư đặt bեն đỗ trước đó tăng dần và cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm scopolamin. Những kết quả này cho thấy chuột được sử dụng mẫu cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa có tác dụng cải thiện sự suy giảm trí nhớ rõ rệt trên mô hình động vật thực nghiệm.

c) Về tác dụng cải thiện suy giảm nhận thức trong thử nghiệm nhận diện đồ vật

Thử nghiệm nhận diện đồ vật là thử nghiệm đánh giá khả năng nhận thức, ghi nhớ ngắn hạn không liên quan đến vị trí và không gian làm việc. Thử nghiệm được xây dựng dựa trên đặc tính chuột có xu hướng khám phá đồ vật mới hơn là đồ vật cũ, thời gian khám phá từng đồ vật trong mỗi pha là chỉ số đánh giá khả năng nhận thức của chuột [99], [113]. Mô hình thử nghiệm này được sử dụng rộng rãi trong việc đánh giá khả năng cải thiện trí nhớ ngắn hạn của chuột mà không cần các tác động bên ngoài, không cần “phần thưởng” (thức ăn) cho chuột [21].

Thử nghiệm nhận diện đồ vật được chia thành 2 pha: pha luyện tập và pha kiểm tra. Trong pha luyện tập, chuột được cho khám phá hai đồ vật giống nhau. Ở pha này, hai đồ vật đều là những đồ vật mới với con vật. Vì vậy, thời gian khám phá là như nhau đối với hai đồ vật. Kết quả này đã được chứng minh trong kết quả thử nghiệm ở pha luyện tập, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về tỷ lệ thời gian khám phá hai đồ vật ở các nhóm nghiên cứu. Ở pha kiểm tra, khi một trong hai đồ vật được thay bằng một đồ vật mới. Sự khác biệt về nhận thức được thấy khá rõ rệt ở các nhóm nghiên cứu, cụ thể: ở nhóm chứng sinh lý, thời gian chuột khám phá ở đồ vật mới là lâu hơn có ý nghĩa thống kê so với thời gian khám phá đồ vật cũ. Đây là biểu hiện bình thường của chuột. Ở nhóm tiêm scopolamin, không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về thời gian

chuột khám phá đồ vật cũ và đồ vật mới. Điều này cho thấy dưới tác dụng của scopolamin, một chất ức chế chọn lọc thụ cảm thể hệ cholinergic, đã làm suy giảm trí nhớ nhận thức của chuột [135]. Con vật không còn nhận thức được đồ vật cũ và đồ vật mới.

Khi được sử dụng mẫu nghiên cứu, khả năng nhận thức của con vật được cải thiện rõ rệt. Thời gian chuột khám phá ở đồ vật mới là lâu hơn có ý nghĩa thống kê so với thời gian khám phá đồ vật cũ được thấy ở nhóm chuột uống liều 100 mg/kg và 150 mg/kg.

Như vậy, kết quả từ các thử nghiệm hành vi nói trên cho thấy cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ và nhận thức phụ thuộc liều trên mô hình gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin, cụ thể: Mẫu nghiên cứu thể hiện tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc trên mô hình mê lộ chữ Y, tác dụng cải thiện trí nhớ không gian dài hạn trên mô hình mê lộ nước Morris ở liều 150 mg/kg và cải thiện nhận thức trên mô hình nhận diện đồ vật ở mức liều thử nghiệm 100 mg/kg và 150 mg/kg. Kết quả này phù hợp với kết quả nhận được từ việc đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa. Điều này một lần nữa khẳng định, các chất ức chế AChE có ý nghĩa trong việc điều trị các triệu chứng suy giảm nhận thức, trí nhớ.

4.3.2.3. Về tác dụng ức chế AChE *in vivo*

Giả thuyết cholinergic cho rằng acetylcholin có vai trò rất quan trọng trong học tập, nhận thức và trí nhớ [67]. Sự suy giảm trí nhớ trong bệnh Alzheimer được cho là có liên quan đến sự suy giảm nồng độ acetylcholin ở các synap thần kinh [56]. Bình thường, sau khi gây ra tác dụng ở màng sau synap, acetylcholin bị phân hủy bởi AChE thành acid acetic và cholin. Do đó, chất có vai trò ức chế hoạt tính của AChE, dẫn đến tăng nồng độ acetylcholin ở khe synap, có tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ [94]. Trên chuột, hoạt động của AChE chủ yếu ở hồi hải mã và vùng vỏ não trước [98]. Trong đó, hồi hải mã được cho là có liên quan đến trí nhớ nhận thức, định hướng dựa trên không gian và bối cảnh trong các nghiên cứu trên mô hình động vật thực nghiệm [63].

Tác dụng cải thiện trí nhớ và nhận thức trên các thử nghiệm hành vi nêu trên gợi ý cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa có thể có tác dụng ức chế

hoạt tính của AChE trên não bộ. Để chứng minh giả thiết này, sau khi kết thúc các thử nghiệm hành vi, chuột được giết và bóc tách vùng hồi hải mã để tiến hành định lượng hoạt tính AChE *in vivo*. Kết quả của nghiên cứu cho thấy hoạt tính AChE ở nhóm tiêm scopolamin cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng, phù hợp với sự suy giảm trí nhớ trên các thử nghiệm hành vi của chuột. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu của Kwon S.H. và cộng sự (2010), hoạt tính của AChE tăng cao ở nhóm tiêm scopolamin so với nhóm chứng [98]. Hoạt tính AChE ở nhóm sử dụng cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa thấp hơn nhóm tiêm scopolamin với sự khác biệt có ý nghĩa thống kê được thấy ở liều 150 mg/kg và tiến tới có ý nghĩa thống kê ở liều 100 mg/kg. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả trong các thử nghiệm hành vi là cao chiết alcaloid toàn phần loài Thạch tùng đuôi ngựa ở các liều 100 mg/kg và 150 mg/kg có tác dụng cải thiện sự suy giảm trí nhớ và nhận thức. Tuy nhiên, mức liều có tác dụng rõ rệt là 150 mg/kg là tương đối gần với liều gây chết 50% động vật thử nghiệm (xấp xỉ bằng 1/8 liều LD₅₀ đã xác định được), do đó, cần cân nhắc xác định mức liều phù hợp trong các nghiên cứu tiếp theo trên lâm sàng.

Như vậy, kết quả nghiên cứu của luận án đã chứng minh cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa có tác dụng ức chế hoạt tính của AChE trên động vật thực nghiệm gây suy giảm trí nhớ bằng scopolamin.

4.3.2.4. Về tác dụng chống lão suy

Trong cơ chế chống oxi hóa, cơ thể động vật có các enzym đóng vai trò rất quan trọng trong việc loại bỏ các gốc tự do, giúp bảo vệ cơ thể như superoxide dismutase (SOD) và glutathion peroxidase (GSH-Px). Vì vậy, nồng độ các enzym nói trên tăng cao thể hiện khả năng chống oxi hóa hiệu quả của cơ thể [83]. Malondialdehyd (MDA) là một trong những sản phẩm cuối cùng của quá trình peroxy hóa acid béo không bão hòa trong các tế bào. Sự gia tăng các gốc tự do gây ra sự sản xuất quá mức của MDA. Nồng độ MDA tăng cao trong máu là một dấu hiệu thể hiện sự tăng quá trình oxi hóa [42].

D-galactose là một loại đường khử, phản ứng với amino acid trong phân tử protein và các peptid trên cả *in vitro* và *in vivo* để tạo thành sản phẩm glycat hóa bền vững (Advanced glycation endproducts-AGEs). Nồng độ AGEs tăng lên trong suốt quá

trình lão hóa và có liên quan đến sinh lý bệnh lão hóa não trong bệnh Alzheimer [160]. Các nghiên cứu cho thấy, mô hình gây lão suy bằng D-galactose trên động vật gặm nhấm mô tả được nhiều đặc điểm sinh lý bệnh và được áp dụng rộng rãi để nghiên cứu các cơ chế bệnh sinh của các triệu chứng lão hóa não, giảm khả năng học, nhớ và nhận thức [160], tăng nồng độ MDA và giảm hoạt độ của các enzym SOD và GSH-Px. Liều D-galactose được sử dụng trong các nghiên cứu từ 0-1250 mg/kg, trong đó liều 100-125 mg/kg được sử dụng khá phổ biến [153]. Trong mô hình gây lão suy bằng D-galactose, vitamin E thường được sử dụng với vai trò là thuốc chống oxy hóa với liều hay được sử dụng là từ 20-200 mg/kg [52], [61].

Dựa trên kết quả nhiều nghiên cứu cho thấy hợp chất huperzin A (hợp chất cũng đã được phân lập từ cây Thạch tùng đuôi ngựa trong nghiên cứu này) và một số loài thuộc chi *Huperzia* Bernh. có hoạt tính chống oxy hóa như đã trình bày ở phần tổng quan. Trong nghiên cứu này, luận án đánh giá tác dụng chống oxy hóa của cao chiết alkaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa trên mô hình động vật thực nghiệm gây lão suy bởi D-galactose thông qua đánh giá sự thay đổi nồng độ của SOD, GSH-Px và MDA huyết tương. Vitamin E (50 mg/kg) được lựa chọn là thuốc đối chứng trong nghiên cứu.

Kết quả nghiên cứu cho thấy ở nhóm tiêm D-galactose, có sự tăng nồng độ MDA huyết tương trong khi giảm nồng độ SOD và GSH-Px huyết tương so với nhóm chứng. Kết quả này cho thấy ở nhóm tiêm D-galactose có hiện tượng tăng quá trình oxy hóa. Như vậy, mô hình gây stress oxy hóa bằng D-galactose thành công và có thể sử dụng để đánh giá hoạt tính chống lão suy của cao chiết alkaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa. Khi được sử dụng cao chiết alkaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa với liều 100 mg/kg và liều 150 mg/kg cho thấy có tác dụng làm tăng có ý nghĩa thống kê nồng độ GSH-Px huyết tương so với nhóm chứng bệnh (chỉ tiêm D-galactose), với liều 150 mg/kg có tác dụng làm tăng SOD huyết tương so với nhóm chứng bệnh (chỉ tiêm D-galactose). Trong khi đó, cả ba liều 50 mg/kg, 100 mg/kg và 150 mg/kg mẫu nghiên cứu đều có tác dụng làm giảm có ý nghĩa thống kê nồng độ MDA huyết tương, khi so sánh với nhóm chỉ tiêm D-galactose. Với kết quả này, có thể khẳng định cao chiết

alcaloid toàn phần từ Thạch tùng đuôi ngựa với liều đã sử dụng có hoạt tính chống lão suy tốt ở động vật thực nghiệm trên mô hình gây lão suy bằng D-galactose.

4.4. VỀ MỐI LIÊN QUAN GIỮA THÀNH PHẦN HÓA HỌC VÀ TÁC DỤNG SINH HỌC

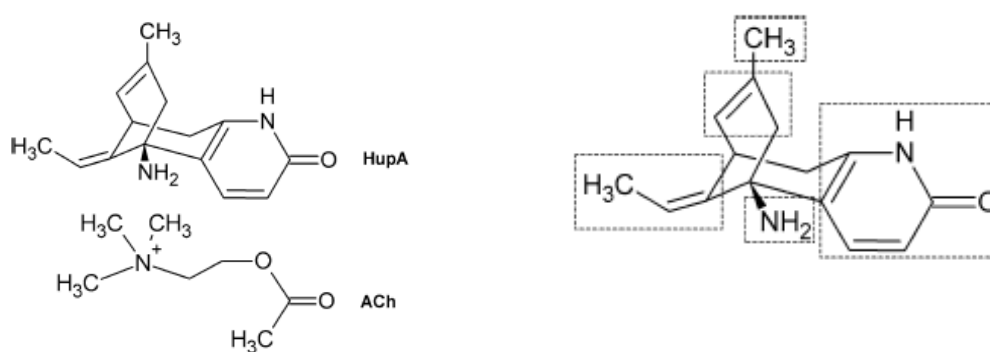
Các nghiên cứu tác dụng sinh học *in vitro* và *in vivo* cho thấy các alcaloid phân lập từ các loài thuộc họ Thông đất có hiệu quả nhất định trong điều trị các bệnh có liên quan đến hệ tim mạch, thần kinh-cơ hoặc có liên quan đến hoạt tính enzym cholinesterase (AChE). Những alcaloid này cũng được chứng minh là có tác động tích cực đến khả năng học tập và trí nhớ [115].

Theo các nghiên cứu về mối liên quan giữa cấu trúc và tác dụng sinh học, hầu hết các hợp chất có tác dụng ức chế AChE đều thuộc nhóm alcaloid. Có được hoạt tính này là do cấu trúc nitơ phức tạp trong phân tử các alcaloid. Hợp phần cấu trúc này gắn với vị trí hoạt động “anionic” trong cấu trúc của phân tử AChE [155]. Trong các alcaloid phân lập từ các loài thuộc họ Thông đất, Huperzin A có tác dụng mạnh nổi trội. Hợp chất này đã thu hút sự quan tâm nghiên cứu nhiều nhất về cấu trúc hóa học cũng như tác dụng sinh học.

Cơ chế tác dụng ức chế AChE của huperzin A đã được chứng minh thông qua các nghiên cứu về động học, nghiên cứu lắp ghép với sự hỗ trợ của máy tính (docking study) và nghiên cứu tinh thể thông qua tia X. Kết quả các nghiên cứu cho thấy, huperzin A ức chế AChE bằng cách liên kết trực tiếp với vị trí hoạt động của enzym này, do đó ngăn chặn tiếp cận vị trí hoạt động của enzym với chất nền. Kozikowski và đồng nghiệp đã đưa ra giả thuyết rằng cấu trúc cầu ba carbon của huperzin A là cấu trúc tiên quyết cho hoạt động ức chế AChE, hoạt tính ức chế này sẽ giảm xuống nếu liên kết đôi bị loại khỏi phần này của phân tử [19].

Các nghiên cứu về mối liên quan giữa cấu trúc và tác dụng sinh học của huperzin A cho thấy hợp chất này sở hữu cấu trúc khá tương đồng với cấu trúc của AChE (Hình 4.3). Sự tương đồng cấu trúc này được tìm thấy giữa các nhóm N, O và carbonyl của

phân tử ACh, và tương ứng với N nhóm amino và nhóm carbonyl của huperzin A. Khoảng cách từ nguyên tử N nhóm amino đến nhóm carbonyl của vòng pyridin trong phân tử hợp chất huperzin A tương đồng với khoảng cách từ nguyên tử N bậc 4 đến nhóm carbonyl ester trong phân tử của AChE, do đó hợp phần 5-aminomethyl-2(1H)-pyridon được công nhận là phần cấu trúc tạo ra tác dụng sinh học của hợp chất này. Sự hiện diện đồng thời của các nhóm amin, vòng α -pyridon, nhóm ethylden, cầu nối 3 carbon với nối đôi của nó và nhóm methyl ở cầu nối này được chứng minh là cần thiết cho hoạt tính ức chế AChE mạnh của huperzin A. Vì vậy, việc loại bỏ hoặc thay thế một trong những đặc điểm cấu trúc này sẽ làm giảm mạnh tác dụng ức chế AChE của huperzin A [19].



Hình 4.3. Cấu trúc hóa học của huperzin A và AChE [19]

Thực tế, kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy hợp chất huperzin A phân lập được từ phân đoạn alcaloid loài Thạch tùng đuôi ngựa thể hiện tác dụng ức chế AChE mạnh với giá trị $IC_{50} = 0,74 \pm 0,04 \mu M$. Hai hợp chất alcaloid mới hyperphlegmin A và hyperphlegmin B có tác dụng ức chế AChE với giá trị IC_{50} lần lượt là $65,50 \pm 1,83$ và $73,55 \pm 1,94 \mu M$. Cao chiết phân đoạn alcaloid của loài Thạch tùng đuôi ngựa có tác dụng ức chế AChE *in vitro* mạnh nhất (so với các phân đoạn chiết khác) với giá trị IC_{50} 1,54 $\mu g/ml$. Phân đoạn này cũng thể hiện tác dụng cải thiện hành vi nhận thức và trí nhớ, đồng thời giảm hoạt tính của AChE ở hồi hải mã ở chuột trên mô hình gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin.

Ngoài tác dụng ức chế AChE, một số nghiên cứu chứng minh rằng huperzin A có tác dụng chống oxy hóa dựa trên cơ chế làm tăng hoạt độ của các enzym superoxid dismutase (SOD), catalase (CAT) và glutathion peroxidase (GSH-Px), đồng thời làm giảm nồng độ malondialdehyd (MDA) từ đó làm tăng khả năng sống sót của tế bào u ưa crôm ở chuột khỏi tác nhân oxy hóa hydrogen peroxid và các mảng peptid β -amyloid [201], [202]. Kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy cao chiết phân đoạn alcaloid của thân và lá Thạch tùng đuôi ngựa có tác dụng làm tăng hoạt độ SOD và GSH-Px, giảm nồng độ MDA trên chuột gây lão suy bởi D-galactose.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

1. Về đặc điểm thực vật loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.

- Đã mô tả chi tiết kèm theo ảnh chụp đặc điểm thực vật của loài Thạch tùng đuôi ngựa và giám định tên khoa học là *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm., họ Thông đất (Lycopodiaceae).

- Đã mô tả đặc điểm vi phẫu lá, thân và đặc điểm bột thân và lá của loài Thạch tùng đuôi ngựa, góp phần tiêu chuẩn hóa dược liệu.

2. Về thành phần hóa học của loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.

- Đã xác định các nhóm hợp chất có trong loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. gồm: Flavonoid, saponin, coumarin, tanin, alcaloid, chất béo, steroid, carotenoid, đường khừ, acid amin và polysaccharid.

- Từ thân và lá loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 15 hợp chất bao gồm: 5 alcaloid (fawcettidin, huperphlegmin A, huperphlegmin B, phlegmariurin B, huperzin A), 3 diterpenoid (huperphlegmarin A, huperphlegmarin B, lycoxanthol), 4 triterpenoid (21 β -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat, 21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat, 21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -ol, lycophlemariol A) và 3 dẫn chất furan (5-hydroxymethyl-2-furaldehyd, rehmanon C, loliolid).

- Trong 15 hợp chất phân lập được, có 4 hợp chất mới, bao gồm 2 alcaloid (huperphlegmin A và huperphlegmin B) có dạng khung 5 vòng lần đầu tiên phân lập trong tự nhiên; 2 abietan diterpenoid (huperphlegmarin A và huperphlegmarin B) lần đầu tiên phân lập trong tự nhiên; 3 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Huperzia* Bernh. (5-hydroxymethyl-2-furaldehyd, rehmanon C và loliolid) và 3 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. (phlegmariurin B, lycoxanthol và 21 β -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat).

3. Về độc tính cấp và tác dụng sinh học loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.

- Đã xác định được liều LD₅₀ của cao chiết alcaloid toàn phần loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. bằng đường uống trên chuột nhắt trắng là 1170 mg/kg (khoảng

tin cậy 95% của LD₅₀ là 1148 mg/kg – 1192 mg/kg), tương đương 219,38 g dược liệu khô/kg thể trọng chuột.

- Về tác dụng ức chế AChE *in vitro*:

+ Các mẫu cao chiết nước, methanol, dicloromethan có tác dụng ức chế AChE yếu với giá trị IC₅₀ từ 49,81 ± 0,80 đến 433,07 ± 7,16 µg/ml. Mẫu cao chiết alcaloid toàn phần có hoạt tính mạnh với giá trị IC₅₀ 1,54 ± 0,10 µg/ml.

+ Hai alcaloid mới là huperphlegmin A và huperphlegmin B có hoạt tính ức chế AChE với giá trị IC₅₀ lần lượt là 65,50 ± 1,83 và 73,55 ± 1,94 µM. Hợp chất huperzin A có hoạt tính ức chế AChE *in vitro* mạnh với IC₅₀ = 0,74 ± 0,04 µM, mạnh hơn chứng dương galantamin ở cùng điều kiện thử nghiệm.

- Về tác dụng cải thiện hành vi nhận thức và trí nhớ trên mô hình chuột gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin: Cao chiết alcaloid toàn phần thể hiện tác dụng cải thiện trí nhớ làm việc trên mô hình mê lộ chữ Y ở liều 150 mg/kg, cải thiện trí nhớ không gian dài hạn trên mô hình mê lộ nước Morris ở liều 150 mg/kg và cải thiện nhận thức trên mô hình nhận diện đồ vật ở mức liều 100 mg/kg và 150 mg/kg. Với liều 150 mg/kg, cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa có tác dụng ức chế hoạt tính của AChE *in vivo* trên động vật thực nghiệm.

- Về tác dụng chống lão suy: Cao chiết alcaloid Thạch tùng đuôi ngựa với liều 100 mg/kg và liều 150 mg/kg có tác dụng làm tăng nồng độ GSH-Px, liều 150 mg/kg có tác dụng làm tăng SOD; cả ba mức liều 50 mg/kg, 100 mg/kg và 150 mg/kg có tác dụng làm giảm nồng độ MDA huyết tương trên mô hình gây lão suy bằng D-galactose ở chuột thí nghiệm.

KIẾN NGHỊ

- Nghiên cứu độc tính bán trường diễn của cao chiết alcaloid toàn phần (sử dụng dung môi ethanol) từ loài Thạch tùng đuôi ngựa; Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cao chiết alcaloid toàn phần và nghiên cứu dạng bào chế thích hợp để có thể thử nghiệm trên lâm sàng theo hướng hỗ trợ điều trị bệnh Alzheimer.

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

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. **Huong Thi Doan**, Viet Duc Ho, Thi Bich Hien Le, Tuan Anh Le, Thanh Ky, Pham, Thi Hoai Nguyen, Ain Raal (2018), “Two new abietane diterpenes huperphlegmarins A and B from *Huperzia phlegmaria*”, *Natural Product Research*, 33 (14), pp. 1-9.
2. Hoai Thi Nguyen, **Huong Thi Doan**, Duc Viet Ho, Ky Thanh Pham, Ain Raal, Hiroyuki Morita (2018), “Huperphlegmines A and B, two novel Lycopodium alkaloids with an unprecedented skeleton from *Huperzia phlegmaria*, and their acetylcholinesterase inhibitory activities”, *Fitoterapia*, 129, pp. 267–271.
3. **Đoàn Thị Hường**, Hồ Việt Đức, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Thị Hoài (2018), “Thành phần hóa học phần trên mặt đất của cây Thạch tùng đuôi ngựa”, *Tạp chí Dược liệu*, 23 (2), tr. 67-71.
4. **Đoàn Thị Hường**, Hồ Việt Đức, Phạm Thanh Kỳ, Nguyễn Thị Hoài (2018), “Một số hợp chất phân lập từ phần trên mặt đất của cây Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.) ở Việt Nam”, *Tạp chí Dược học*, 506, tr. 42-45.
5. **Đoàn Thị Hường**, Lê Văn Quân, Nguyễn Thị Hoài, Phạm Thanh Kỳ (2018), “Nghiên cứu hoạt tính ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* và độc tính cấp của cây Thạch tùng đuôi ngựa ở Việt Nam”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, 468 (2), tr. 20-23.
6. Nguyễn Thị Hoài, **Đoàn Thị Hường**, Hồ Việt Đức, Phạm Thanh Kỳ (2018), “Các hợp chất alkaloid và terpenoid phân lập từ cây Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.)”, *Tạp chí Dược học*, 512, tr. 37-41.
7. Nguyễn Thị Hoài, **Đoàn Thị Hường**, Phạm Thanh Kỳ (2018), “Nghiên cứu đặc điểm thực vật của cây Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.)”, *Tạp chí Dược học*, 511, tr. 40-43.
8. **Đoàn Thị Hường**, Lê Văn Quân, Nguyễn Thị Hoài, Phạm Thanh Kỳ (2020), “Tác dụng cải thiện trí nhớ của cao chiết alkaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm) trên mô hình thực nghiệm gây suy giảm trí nhớ bằng scopolamin”, *Tạp chí Y học Việt Nam*, tập 490 (1), tr. 24-29.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tài liệu tiếng Việt:

- [1] Bộ môn Dược liệu (2019), *Thực tập dược liệu*, Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội, Hà Nội.
- [2] Bộ môn thực vật (2005), *Thực vật dược*, Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội.
- [3] Bộ môn thực vật (2004), *Thực tập thực vật và nhận biết cây thuốc*, Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội.
- [4] Võ Văn Chi (2012), *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tr. 808-813, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- [5] Nguyễn Ngọc Chương và cộng sự (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*. 54 (2C), tr. 417-424.
- [6] Đỗ Trung Đàm (2014), *Phương pháp nghiên cứu độc tính của thuốc*, tr.101-12, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- [7] Đỗ Trung Đàm (2015), *Đánh giá về lượng các kết quả nghiên cứu y dược sinh học*, tr. 554-562, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.
- [8] Trần Mạnh Đạt và Nguyễn Tân Hiếu (2019), "Hiện trạng phân bố và đặc điểm hình thái của cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trevis.) ở khu bảo tồn thiên nhiên Bắc Hương Hóa, Quảng Trị.", *Tạp chí khoa học & công nghệ nông nghiệp*. Tập 3(1) pp. 1025-1032.
- [9] Phạm Hoàng Hộ (1999), *Cây cỏ Việt Nam*, Vol. 1, tr. 22-26, Nhà xuất bản Trẻ, Thành phố Hồ Chí Minh.
- [10] Phan Kế Lộc (2001), *Danh lục các loài thực vật Việt Nam*, tr. 951-953, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội.
- [11] Nguyễn Thị Thu Hương , Đoàn Thị Ngọc Hạnh (2006), "Nghiên cứu mô hình thực nghiệm gây suy giảm khả năng học tập và trí nhớ", *Tạp chí Dược liệu*. 11 (2), tr. 70-73.
- [12] Nguyễn Việt Thân (2003), *Kiểm nghiệm dược liệu bằng phương pháp hiển vi*, Nhà xuất bản Hà Nội, Hà Nội.
- [13] Phạm Thanh Kỳ và cộng sự (2007), *Dược liệu học*, Nhà xuất bản Y học, Hà Nội.

- [14] Nguyễn Duy Tài và cộng sự (2013), "Nghiên cứu tác dụng cải thiện suy giảm trí nhớ của các cao chiết cồn từ hai loài thạch tùng thuộc họ Lycopodiaceae trên chuột nhắt trắng", *Tạp chí Y Học TP. Hồ Chí Minh* 1(17), tr. 243-248.
- [15] Viện Dược liệu (2006), *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*, Tập số 2, tr. 986, Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.
- [16] Viện Dược liệu (2016), *Danh lục cây thuốc Việt Nam*, tr. 912-913, Nhà xuất bản Khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.

Tài liệu tiếng Anh:

- [17] Adams M. et al (2007), "Plants traditionally used in age related brain disorders-- a survey of ethnobotanical literature", *Journal of Ethnopharmacol.* 113 (3), pp. 363-381.
- [18] Allgaier M. , Allgaier C. (2014), "An update on drug treatment options of Alzheimer's disease", *Frontiers in Bioscience* 19, pp. 1345-1354.
- [19] Ana F. et al (2014), "Huperzine A from *Huperzia serrata*: a review of its sources, chemistry, pharmacology and toxicology", *Phytochemistry Reviews.* 15 (1), pp. 51-85.
- [20] Ana P.M. et al (2013), "Natural AChE Inhibitors from Plants and their Contribution to Alzheimer's Disease Therapy", *Current Neuropharmacology.* 11, pp. 388-413.
- [21] Antunes M. , Biala G. (2012), "The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure and its modifications", *Cognitive Processing.* 13 (2), pp. 93-110.
- [22] Armijos C. et al (2016), "Phytochemical and ethnomedicinal study of *Huperzia* species used in the traditional medicine of Saraguros in Southern Ecuador; AChE and MAO inhibitory activity", *Journal of Ethnopharmacology.* 193 (4), pp. 546-554.
- [23] Ashley R. F et al (2013), "New and existing combinations in Palaeotropical Phlegmariurus (Lycopodiaceae) and lectotypification of the type species *Phlegmariurus phlegmaria* (L.) T.Sen & U.Sen.", *PhytoKeys.* 20, pp. 33-51.
- [24] Ayer W.A et al. (1994), "Macleanine, a unique type of dinitrogenous lycopodium alkaloid", *Canadian journal of chemistry.* 72 (1), pp. 128-130.

- [25] Ayer W.A. et al. (1969), "Alkaloids of *Lycopodium lucidulum* Michx. Structure and properties of alkaloid L. 23", *Canadian Journal of Chemistry*. 47 (3), pp. 449-455.
- [26] Ayer W.A. et al. (1963), "Lycopodium alkaloids: V. The bromination of lycopodine and the structure of alkaloid L.20", *Canadian Journal of Chemistry*. 41 (3), pp. 649-657.
- [27] Ayer W.A. , Kasitu G.C. (1989), "Some new Lycopodium alkaloids", *Canadian Journal of Chemistry*. 67 (6), pp. 1077-1086.
- [28] Borkosky S. et al (1996), "Sesquiterpene lactones and other constituents of *Eirmocephala megaphylla* and *Cyrtocymura cincta*", *Phytochemistry*. 42 (6), pp. 1637-1639.
- [29] Bowen D.M. et al (1982), "Choline acetyltransferase activity and histopathology of frontal neocortex from biopsies of demented patients", *Journal of the Neurological Sciences* 57, pp. 191-202.
- [30] Braekman J.C. et al. (1974), "Distribution des alcaloides dans le genre *Lycopodium*", *Phytochemistry*. 13 (11), pp. 2519-2528.
- [31] Bromley-Brits K. et al (2011), "Morris Water Maze Test for Learning and Memory Deficits in Alzheimer's Disease Model Mice", *Journal of Visualized Experiments*. 53, pp. 1-5.
- [32] Brown D.R. (2005), "Neurodegeneration and oxidative stress: Prion disease results from loss of antioxidant defence", *Folia Neuropathologica*. 43 (4), pp. 229-243.
- [33] Burnell R.H. , Moinas M. (1971), "Lycoxanthol, a Hydroquinone Diterpenoid from *Lycopodium lucidulum* Michx. ", *Journal of chemical society*. 16, pp. 897-898.
- [34] Bushnell P. J. (1987), "Effects of scopolamine on locomotor activity and metabolic rate in mice", *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 26 (1), pp. 195-198.
- [35] Camina E. , Güell F. (2017), "The Neuroanatomical, Neurophysiological and Psychological Basis of Memory: Current Models and Their Origins", *Frontiers in Pharmacology*. 8, pp. 1-16.
- [36] Cao H. et al (2017), "Phytochemicals from fern species: potential for medicine applications", *Phytochemistry Reviews*. 16 (3), pp. 379-440.

- [37] Capuano E. , Fogliano V. (2011), "Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies.", *Food Science and Technology*. 44 (4), pp. 793–810.
- [38] Ching R.C. (1978), "The Chinese fern families and genera: systematic arrangement and historical origin", *Acta Phytotaxonomica Sinica* 16, pp. 1-9.
- [39] Chuong N.N. et al. (2014), "Anti-Cholinesterase activity of lycopodium alkaloids from Vietnamese *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis", *Molecules*. 19, pp. 19172-19179.
- [40] Czapski G.A. et al (2014), "Assessment of antioxidative activity of alkaloids from *Huperzia selago* and *Diphasiastrum complanatum* using in vitro systems", *Folia Neuropathologica*. 53 (4), pp. 394-406.
- [41] Damar U. et al (2016), "Huperzine A as a neuroprotective and antiepileptic drug: a review of preclinical research", *Expert review of neurotherapeutics*. 16 (6), pp. 671-680.
- [42] Daniele D.R. et al. (2005), "A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress", *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 15 (4), pp. 316–328.
- [43] Dante J. M. (2017), "Facing Alzheimer's disease in the developing countries", *Revista de Neuro-Psiquiatria*. 80 (2).
- [44] Dibenedetto A. et al (2016), "Organic Carbonates: Efficient Extraction Solvents for the Synthesis of HMF in Aqueous Media with Cerium Phosphates as Catalysts", *ChemSusChem*. 9, pp. 118 - 125.
- [45] Don M.J. et al (2006), "Cytotoxic and aromatic constituents from *Salvia miltiorrhiza*", *Phytochemistry*. 67, pp. 497-503.
- [46] Dong L.B. et al. (2012), "Lycopalhine A, a novel sterically congested Lycopodium alkaloid with an unprecedented skeleton from *Palhinhaea cernua*", *Chemical Communications*. 48, pp. 9038–9040.
- [47] El-Hefny M. et al (2017), "Antibacterial activities of the phytochemicals-characterized extracts of *Callistemon viminalis*, *Eucalyptus camaldulensis* and *Conyza dioscoridis* against the growth of some phytopathogenic bacteria", *Microbial Pathogenesis*. 113, pp. 348-356.
- [48] Ellman G.L. et al (1961), "A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity ", *Biochemical Pharmacology* Vol. 7, pp. 88-95.

- [49] Elzbieta M.O. et al. (2007), "Diagnostics and therapy of Alzheimer's disease", *Indian Journal of Experimental Biology*. 45, pp. 315-325.
- [50] Ennaceur A. , Delacour J. (1988), "A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data", *Behavioural Brain Research*. 31 (1), pp. 47-59.
- [51] Fan T. et al (1999), "Abietane diterpenoids from *Clerodendrum mandarinorum*", *Phytochemistry*. 51, pp. 1005-1008.
- [52] Fang A. et al (2012), "Antioxidant effects of the orientin and vitexin in *Trollius chinensis* Bunge in D-galactose-aged mice", *Neural Regeneration Research*. 7 (33), pp. 2565-2575.
- [53] Fei Liu et al. (2014), "Carinatines A and B, Lycopodium alkaloids from *Phlegmariurus carinatus*", *Natural Product Bioprospect*. 4 (4), pp. 221–225.
- [54] Flood J. F. , Cherkin A. (1986), "Scopolamine effects on memory retention in mice: A model of dementia? ", *Behavioral and Neural Biology*. 45 (2), pp. 169-184.
- [55] Fraga B.M. et al (1986), "Diterpenes from the roots of *Salvia canariensis*", *Phytochemistry*. 25 (1), pp. 269-271.
- [56] Francis P.T. (2005), "The Interplay of Neurotransmitters in Alzheimer's Disease", *CNS Spectrums*. 10 (18), pp. 6-9.
- [57] Gao W.Y et al. (2000), "Three lycopodium alkaloid A/-Oxides from *Huperzia serrata*", *Planta medica*. 66, pp. 664-667.
- [58] Gao W.Y. et al. (2000), "A new alkaloid and arbutin from the whole plant of *Huperzia serrata*", *Chinese Journal of Chemistry*. 18 (4), pp. 614-616.
- [59] Gao X. et al (2009), "Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against β -amyloid peptide", *Free Radical Biology and Medicine*. 46 (11), pp. 1454-1462.
- [60] Garcia M.V. et al (2017), "Anticholinesterase activity and identification of huperzine A in three Mexican lycopods: *Huperzia cuernavacensis*, *Huperzia dichotoma* and *Huperzia linifolia* (Lycopodiaceae)", *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*. 30 (1), pp. 235-239.
- [61] Ghanbari S. et al (2012), "Effects of IMOD™ and Angipars™ on mouse D-galactose-induced model of aging", *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. 20 (68), pp. 1-8.

- [62] Ghosh G. et al (2015), "GC-MS analysis of bioactive compounds in the methanol extract of *Clerodendrum viscosum* leaves", *Pharmacognosy Research*. 7 (1), pp. 110-113.
- [63] Good M. (2002), "Spatial Memory and Hippocampal Function: Where are we now?", *Psicológica*. 23 (1), pp. 109-138.
- [64] Grabarczyk M. et al (2015), "Loliolide - the most ubiquitous lactone", *Folia Biologica et Oecologica*. 11, pp. 1-8.
- [65] Ham Y.M. et al (2012), "Investigation of the component of *Lycopodium serratum* extract that inhibits proliferation and mediates apoptosis of human HL-60 leukemia cells", *Food and Chemical Toxicology*. 50 (8), pp. 2629-2634.
- [66] Harada K. et al (2012), "A novel glycine transporter-1 (GlyT1) inhibitor, ASP2535 (4-[3-isopropyl-5-(6-phenyl-3-pyridyl)-4H-1,2,4-triazol-4-yl]-2,1,3-benzoxadiazole), improves cognition in animal models of cognitive impairment in schizophrenia and Alzheimer's disease", *European Journal of Pharmacology*. 685 (1-3), pp. 59-69.
- [67] Hasselmo M.E. (2006), "The Role of Acetylcholine in Learning and Memory", *Current Opinion in Neurobiology*. 16 (6), pp. 710-715.
- [68] Henry M.L. , Cheni K.K. (1945), "The pharmacologic action of certain lycopodium alkaloids", *Journal of the American Pharmaceutical Association* 34 (7), pp. 197-198.
- [69] Hirasawa Y. et al. (2002), "Lyconesidines A–C, new alkaloids from *Lycopodium chinense*", *Tetrahedron*. 58 (27), pp. 5483-5488.
- [70] Hirasawa Y. et al. (2003), "Senepodines B–E, new C₂₂N₂ alkaloids from *Lycopodium chinense*", *Tetrahedron*. 59 (20), pp. 3567-3573.
- [71] Hirasawa Y. et al (2008), "Malycorins A-C, New lycopodium alkaloids from *Lycopodium phlegmaria*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 56 (10), pp. 1473-1476.
- [72] Hirasawa Y. et al. (2011), "Lycotetrastine A, a novel hexacyclic alkaloid from *Huperzia tetrasticha*", *Tetrahedron Letters* 52 (32), pp. 4126-4128.
- [73] Hirasawa Y. et al. (2012), "Lycobelines A–C, Novel C₁₆N₂-type Lycopodium alkaloids from *Huperzia goebelii*", *Tetrahedron Letters* 53 (31), pp. 3971-3973.

- [74] Hirasawa Y. et al. (2013), "Huperminone A, a novel C16N-type Lycopodium alkaloid from *Huperzia phlegmaria*", *Tetrahedron Letters* 54 (12), pp. 1593-1595.
- [75] Hirasawa Y. et al. (2014), "Hupermine A, a novel C16N2-type Lycopodium alkaloid from *Huperzia phlegmaria*", *Tetrahedron Letters* 55 (11), pp. 1902-1904.
- [76] Hirasawa Y. et al. (2018), "Hupercumines A and B, Lycopodium alkaloids from *Huperzia cunninghamioides*, inhibiting acetylcholinesterase", *Organic letters*. 20 (5), pp. 1384-1387.
- [77] Ho S.C. et al. (2003), "Establishment of the mimetic aging effect in mice caused by D-galactose", *Biogerontology*. 4, pp. 15-18.
- [78] Hodges R. , Porte A. L. (1964), "The structure of loliolide", *Tetrahedron*. 20 (6), pp. 1463-1467.
- [79] Holub J. (1964), "Lycopodiella, nový rod radu Lycopodiales", *Preslia*. 36, pp. 16-22.
- [80] Holub J. (1985), "Transfers of Lycopodium species to Huperzia-with a note on generic classification in Huperziaceae", *Folia Geobotanica&Phytotaxonomica*. 20, pp. 67-80.
- [81] Hong W. , Tang X.C. (1998), "Anticholinesterase effects of huperzine A, E2020, and tacrine in rats", *Acta Pharmacologica Sinica*. 19 (1), pp. 27-30.
- [82] Hu P. et al. (1992), "Mass spectrometric differentiation of huperzine, N, N-dimethylhuperzine A and N-methylhuperzine B", *Organic mass spectrometry*. 27 (2), pp. 99-104.
- [83] Ighodaro O. M. , Akinloye O. A. (2018), "First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid", *Alexandria Journal of Medicine*. 54 (4), pp. 287-293.
- [84] Inubushi Y. , Harayama T. (1982), "Alkaloid Constituents of *Lycopodium phlegmaria* L.", *Yakugaku zasshi*. 102 (5), pp. [Abstract].
- [85] Inubushi Y. et al. (1971), "Triterpenoid constituents of *Lycopodium phlegmaria* L.", *Journal of the Chemical Society C: Organic* pp. 3109-3114.

- [86] Inubushi Y. et al. (1967), "Study on the constituents of domestic Lycopodium plants. VII. Alkaloids constituents of *Lycopodium serratum* var. *serratum* f. *serratum* ", *Yakugaku Zasshi*. 87, [Abstract].
- [87] Jiang W.W et al. (2014), "Huperserines A–E, Lycopodium alkaloids from *Huperzia serrata*", *Fitoterapia* 99, pp. 72-77.
- [88] José A.F.P et al (2008), "The genus *Huperzia* (Lycopodiaceae) in the Azores and Madeira", *Botanical Journal of the Linnean Society*. 158, pp. 522-533.
- [89] Katakawa K. et al. (2005), "Structure elucidation and synthesis of lycoposerramine-B, a novel oxime-containing Lycopodium alkaloid from *Lycopodium serratum* Thunb", *The Journal of organic chemistry*. 70 (2), pp. 658-663.
- [90] Kaur J. et al (2016), "A Systematic Review on *Huperzia serrata*", *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research* 8(8), pp. 1250-1255.
- [91] Khalil A.K. , Kasim S.A. (2017), "The Measurements of the Cholinesterase Activity of Brain and Plasma in Rabbits by Using Modified Michel and Ellman Assays", *Insights in Enzyme Research*. 1 (29), pp. 1-7.
- [92] Kim M.S. et al (2018), "Terminalia chebula extract prevents scopolamine-induced amnesia via cholinergic modulation and anti-oxidative effects in mice", *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 18 (136), pp. 1-11.
- [93] Kolgazi M et al (2013), "The role of cholinergic anti-inflammatory pathway in acetic acid-induced colonic inflammation in the rat", *Chemico-Biological Interactions*. 205, pp. 72-80.
- [94] Konrath E.L. et al (2012), "*Huperzia quadrifariata* and *Huperzia reflexa* alkaloids inhibit acetylcholinesterase activity in vivo in mice brain", *Phytomedicine*. 19 pp. 1321- 1324.
- [95] Konrath E.L. et al (2013), "Alkaloid profiling and anticholinesterase activity of South American Lycopodiaceae species", *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*. 28 (1), pp. 218-222.
- [96] Kraeuter A. K. et al (2019), "The Y-Maze for assessment of spatial working and reference memory in mice", *Methods in Molecular Biology*. 1916, pp. 105-111.
- [97] Kubitzki K. (1990), "Pteridophytes and Gymnosperms", trong Kubitzki K., chủ biên, *The Families and Genera of Vascular Plants*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.

- [98] Kwon S. H. et al. (2010), "Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice", *European Journal of Pharmacology*. 649, pp. 210-217.
- [99] Leger M. et al (2013), "Object recognition test in mice", *Nature Protocols*. 8 (12), pp. 2531-2537.
- [100] Lenz R. A. et al (2012), "The scopolamine model as a pharmacodynamic marker in early drug development", *Psychopharmacology*. 220 (1), pp. 97-107.
- [101] Li P. et al (2015), "Seven new Lycopodium alkaloids from the aerial parts of *Phlegmariurus squarrosus*", *Tetrahedron*. 71 (33), pp. 5308-5314.
- [102] Li S.P. et al (2018), "Analogous β -carboline alkaloids harmaline and harmine ameliorate scopolamine-induced cognition dysfunction by attenuating acetylcholinesterase activity, oxidative stress, and inflammation in mice", *Frontiers in Pharmacology*. 9 (346), pp. 1-16.
- [103] Li Y.S. et al (2005), "A novel Bis-Furan derivative, two new natural furan derivatives from *Rehmannia glutinosa* and their bioactivity", *Natural Product Research*. 19 (2), pp. 165–170.
- [104] Lin S. et al (2010), "Abietane and C20-norabietane diterpenes from the stem bark of *Fraxinus sieboldiana* and their biological activities", *Journal of natural Product*. 73, pp. 1914-1921.
- [105] Lindner M. D. et al (2006), "Donepezil primarily attenuates scopolamine-induced deficits in psychomotor function, with moderate effects on simple conditioning and attention, and small effects on working memory and spatial mapping", *Psychopharmacology*. 188 (4), pp. 629-640.
- [106] Linh L.T.M.. et al (2016), "Anti-cholinesterases and memory improving effects of Vietnamese *Xylia xylocarpa*", *Chemistry Central Journal*. 10 (48), pp. 1-10.
- [107] Litchfield W. (1948), "A simplified method of evaluating dose-effect experiments", *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. Vol. 96, pp. 99-113.
- [108] Liu J. et al (1999), "Inhibitory effects of huperzine B on cholinesterase activity in mice", *Zhongguo Yao Li Xue Bao*. 20 (2), [Abstract].
- [109] Liu J.S. , Huang M.F. (1994), "The alkaloids huperzines C and D and huperzine from *Lycopodium casuarinoides*", *Phytochemistry*. 37 (6), pp. 1759-1761.

- [110] Liu J.S. et al. (1986), "The structures of huperzine A and B, two new alkaloids exhibiting marked anticholinesterase activity", *Revue canadienne de chimie*. 64 (4), pp. 837-839.
- [111] Liu Y.-C. et al. (2017), "Lycodine-Type Lycopodium Alkaloids from the whole plants of *Huperzia serrata*", *Natural Products and Bioprospecting*. 7 (5), pp. 405-411.
- [112] Lu W.H. et al (1988), "Improving effect of huperzine A on discrimination performance in aged rats and adult rats with experimental cognitive impairment", *Zhongguo Yaoli Xuebao*. 9 (1), [Abstract].
- [113] Lueptow L. M. (2017), "Novel object recognition test for the investigation of learning and memory in mice", *Journal of Visualized Experiments*. 126, pp. 1-9.
- [114] Luo H. et al. (2010), "Comparison of 454-ESTs from *Huperzia serrata* and *Phlegmariurus carinatus* reveals putative genes involved in lycopodium alkaloid biosynthesis and developmental regulation", *BMC plant biology*. 10 (1), pp. 1.
- [115] Ma X. , Gang D.R. (2004), "The Lycopodium alkaloids", *Natural Product Reports*. 21, pp. 752-772.
- [116] Ma X. et al. (2007), "Huperzine A from *Huperzia* species - An ethnopharmacological review", *Journal of Ethnopharmacology*. 113, pp. 15-34.
- [117] Ma X. et al. (2005), "Is There a Better Source of Huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A Content of Huperziaceae Species in China", *J. Agric. Food Chem*. 53, pp. 1393-1398.
- [118] Ma X.C. et al (2003), "A cute effects of huperzine A and tacrine on rat liver", *Acta Pharmacologica Sinica*. 24 (3), pp. 247-250.
- [119] Ma X.C. et al (2006), "A survey of potential huperzine A natural resources in China: The Huperziaceae", *Journal of Ethnopharmacology*. 104, pp. 54-67.
- [120] Mao C.V. et al (2018), "*Willughbeia cochinchinensis* prevents scopolamine-induced deficits in memory, spatial learning, and object recognition in rodents", *Journal of Ethnopharmacology*. 214 pp. 99-105.
- [121] Marcelo D.A. et al (2017), "A Revision of Lycopodiaceae from Uruguay", *International Journal of Advanced Research in Botany*. 3 (4), pp. 24-29.
- [122] Mariana G.V. et al. (2013), "N-Demethyl-sauroxine, a novel Lycodine Group alkaloid from *Huperzia saururus*", *Tetrahedron Letters*. 54 (38), pp. 5197-5200.

- [123] Maridass M. , Raju G. (2009), "Investigation of phytochemical and antimicrobial activity of *Huperzia* species", *Pharmacologyonline*. 3, pp. 688-692.
- [124] Marteen J. M. et al (2011), "A linear sequence of extant families and genera of lycophytes and ferns", *Phytotaxa* 19, pp. 7-54.
- [125] Melnikova T. et al (2006), "Cyclooxygenase-2 activity promotes cognitive deficits but not increased amyloid burden in a model of Alzheimer's disease in a sex-dimorphic pattern", *Neuroscience*. Vol. 141 (3), pp. 1149-1162.
- [126] Miller N. et al (1973), "Triterpenoids of *Lycopodium megastachyum*", *Phytochemistry*. 12 (7), pp. 1759-1761.
- [127] Min B. S. et al (2010), "Cholinesterase inhibitors from *Cleistocalyx operculatus* buds", *Archives of Pharmacal Research*. 33 (10), pp. 1665-1670.
- [128] Morita H. et al. (2000), "Serratezomines AC, New Alkaloids from *Lycopodium serratum* var. *serratum*", *The Journal of organic chemistry*. 65 (19), pp. 6241-6245.
- [129] Morita H. et al. (2003), "Himeradine A, a novel C27N3-type alkaloid from *Lycopodium chinense*", *The Journal of organic chemistry*. 68 (11), pp. 4563-4566.
- [130] Morita H. et al. (2004), "New phlegmarane-type, cernuane-type, and quinolizidine alkaloids from two species of *Lycopodium*", *Tetrahedron*. 60 (33), pp. 7015-7023.
- [131] Morris R. (1984), "Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat", *Journal of Neuroscience Methods*. 11 (1), pp. 47-60.
- [132] Mukherjee P.K. et al (2007), "Acetylcholinesterase inhibitors from plants", *Phytomedicine*. 14 pp. 289-300.
- [133] Murata T. et al (2016), "Abietanetype diterpenoids from the roots of *Caryopteris mongolica* and their cholinesterase inhibitory activities. ", *Phytochemistry*. 130, pp. 152-158.
- [134] Nath C. et al (2009), "Cholinergic influence on memory stages: A study on scopolamine amnesic mice", *Indian Journal of Pharmacology*. 41 (4), pp. 192.
- [135] Neha R.K.S. et al (2014), "Animal models of dementia and cognitive dysfunction", *Life sciences*. 109 (2), pp. 73-86.
- [136] Odorczyk F.K. et al (2017), "Administration of *Huperzia quadrifariata* extract, a cholinesterase inhibitory alkaloid mixture, has neuroprotective effects in a rat

model of cerebral hypoxia-ischemia", *Neurochemical research*. 42 (2), pp. 552-562.

- [137] Ollgaard B. (1987), "A revised classification of the Lycopodiaceae s. lat.", *Opera Botanica*. 92, pp. 153-178.
- [138] Ollgaard B. (1975), "Studies in the Lycopodiaceae I. Observations of the structure of the sporangium wall. ", *American Fern Journal*. 65, pp. 19-27.
- [139] Ollgaard B. (1979), "Studies in the Lycopodiaceae II. The branching patterns and infrageneric groups of *Lycopodium* sensu lato", *American Fern Journal*. 69, pp. 49-61.
- [140] Ollgaard B. (1989), "Index of the Lycopodiaceae", *Royal Danish Academy of Sciences and Letters*. 34, pp. 3-141.
- [141] Ollgaard B. (1992), "Neotropical Lycopodiaceae-An Overview", *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 79 (3), pp. 687-717.
- [142] Ollgaard B. (1987), "A revised classification of the Lycopodiaceae s. lat. ", *Opera Botanica* 92, pp. 153-178.
- [143] Orhan I. , Sener B. (2006), "Lead compounds and drug candidates from some Turkish plants for human health", *Advances in Phytomedicine*. 2, pp. 331-352.
- [144] Ortega M.G. et al. (2004), "Sauroine - a novel *Lycopodium* alkaloid from *Huperzia saururus*", *Tetrahedron letters*. 45 (38), pp. 7003-7005.
- [145] Ortega M.G. et al (2004), "Anticholinesterase activity in an alkaloid extract of *Huperzia saururus*", *Phytomedicine*. 11 (6), pp. 539-543.
- [146] Ou L.Y. et al (2001), "Effect of huperzine A on working memory in reserpine- or yohimbine-treated monkeys", *Europe Journal of Pharmacology*. 433 (2-3), pp. 15 11-156.
- [147] Panyo J. et al (2016), "Bioassay-guided isolation and evaluation of antimicrobial compounds from *Ixora megalophylla* against some oral pathogens", *Pharmaceutical biology*. 54 (9), pp. 1522–1527.
- [148] Pepping J. (2000), "Huperzine A", *American Journal of Health-System Pharmacy*. 57 (6), pp. 530–534.
- [149] Piyooosh S. et al. (2019), "Comprehensive review of mechanisms of pathogenesis involved in Alzheimer's disease and potential therapeutic strategies", *Progress in Neurobiology*. 174, pp. 53-89.

- [150] Rodewald W.J. , Gryniewicz G. (1968), "Lycopodium alkaloids. VI. The alkaloids of *Lycopodium selago* L.", *Roczniki Chemii*. 42, pp. 465-474.
- [151] Ruan Q. et al (2013), "The anti-inflamm-aging and hepatoprotective effects of huperzine A in d-galactose treated rats.", *Mechanisms of Ageing and Development*. 134 (3), pp. 89-97.
- [152] Rüedi P. et al (1982), "Nachweis von C (15)-epimeren Coleonen C und D in der natur und ihre bedeutung für den sterischen verlauf der bildung des spirocyclopropanrings", *Helvetica Chimica Acta* 65 (7), pp. 2181–2188.
- [153] Sadigh-Eteghad S. et al (2017), "D-galactose-induced brain ageing model: A systematic review and meta-analysis on cognitive outcomes and oxidative stress indices", *PloS one*. 12 (8), pp. 1-13.
- [154] Sangeetha J. , Vijayalakshmi K. (2011), "Determination of bioactive components of ethyl acetate fraction of *Punica granatum* rind extract", *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*. 3 (2), pp. 116-122.
- [155] Santos T. C et al (2018), "Naturally Occurring Acetylcholinesterase Inhibitors and Their Potential Use for Alzheimer's Disease Therapy", *Frontiers in Pharmacology*. 9.
- [156] Schneider B.M. et al (2009), "Clinical use of an herbal-derived compound (Huperzine A) to treat putative complex partial seizures in a dog", *Epilepsy & Behavior*. 15, pp. 529-534.
- [157] Seto H. et al (1988), "Assignments of the ¹H- and ¹³C-NMR spectra of four Lycopodium triterpenoids by the application of a new two-dimensional technique, heteronuclear multiple bond", *Agricultural and Biological Chemistry*. 52 (7), pp. 1797-1801.
- [158] Shi H. et al. (2005), "A new serratane-type triterpene from *Lycopodium phlegmaria*", *Natural Product Research*. 19 (8), pp. 777-781.
- [159] Skolnick A.A. (1997), "Old Chinese herbal medicine used for fever yields possible new Alzheimer disease therapy", *Jama Network*. 277 (10), pp. 776.
- [160] Song X. et al (1999), "Advanced glycation in d-galactose induced mouse aging model", *Mechanisms of Ageing and Development*. 108 (3), pp. 239-251.
- [161] Southon I.W. , Buckingham J. (1989), *Dictionary of alkaloids*, Champan & Hall, London.

- [162] Stärk D. et al. (2004), "Selagoline, a new alkaloid from *Huperzia selago*", *Natural Product Research*. 18 (3), pp. 197-203.
- [163] Su W.C. et al (1996), "Diterpenoids from leaves of *Cryptomeria japonica*", *Phytochemistry*. 41 (1), pp. 255-261.
- [164] Takayama H. et al. (2001), "A New Type of Lycopodium Alkaloid, Lycoposerramine-A, from *Lycopodium serratum* Thunb", *Organic letters*. 3 (26), pp. 4165-4167.
- [165] Takayama H. et al. (2002), "Seven new Lycopodium alkaloids, lycoposerramines-C,-D,-E,-P,-Q,-S, and-U, from *Lycopodium serratum* Thunb", *Tetrahedron letters*. 43 (46), pp. 8307-8311.
- [166] Takayama H. et al. (2003), "Ten new Lycopodium alkaloids having the lycopodane skeleton isolated from *Lycopodium serratum* Thunb", *Chemical and pharmaceutical bulletin*. 51 (10), pp. 1163-1169.
- [167] Takuya O. et al (2015), "Japanese *Huperzia serrata* extract and the constituent, huperzine A, ameliorate the scopolamine-induced cognitive impairment in mice", *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 79 (11), pp. 1838–1844.
- [168] Tan C.H. et al. (2002), "Huperzine R, a novel 15-carbon Lycopodium alkaloid from *Huperzia serrata*", *Journal of natural products*. 65 (7), pp. 1021-1022.
- [169] Tan C.H. et al. (2002), "Three new phlegmariurine B type lycopodium alkaloids from *Huperzia serrata*", *Journal of Asian natural products research*. 4 (3), pp. 227-231.
- [170] Tan C.H. et al. (2000), "Huperzine P, a novel Lycopodium alkaloid from *Huperzia serrata*", *Tetrahedron Letters*. 41 (30), pp. 5733-5736.
- [171] Tan C.H. et al. (2002), "Two novel Lycopodium alkaloids from *Huperzia serrata*", *Helvetica chimica acta*. 85 (4), pp. 1058-1061.
- [172] Tan C.H. et al. (2003), "Huperzines S, T, and U: New Lycopodium alkaloids from *Huperzia serrata*", *Canadian journal of chemistry*. 81 (4), pp. 315-318.
- [173] Tan C.H. et al. (2002), "Three new hydroxylated serratidine alkaloids from *Huperzia serrata*", *Natural product letters*. 16 (3), pp. 149-153.
- [174] Tan C.H. et al. (2003), "Two novel hydroperoxylated Lycopodium alkaloids from *Huperzia serrata*", *Acta Botanica Sinica*. 45 (1), pp. 118-121.
- [175] Tan C.H. et al. (2002), "New lycopodium alkaloids from *Huperzia serrata*", *Planta medica*. 68 (2), pp. 188-190.

- [176] Tan C.H. , Zhu D.Y. (2004), "Lycopodine-Type Lycopodium Alkaloids from *Huperzia serrata*", *Helvetica chimica acta*. 87 (8), pp. 1963-1967.
- [177] Tang Y. et al (2017), "Annotinolide F and lycoannotines AeI, further Lycopodium alkaloids from *Lycopodium annotinum*", *Phytochemistry*. 143, pp. 1-11.
- [178] Thu D.K. et al. (2019), "Two Lycopodium alkaloids from the aerial parts of *Huperzia phlegmaria*", *Pharmacognosy Research*. 11 (4), pp. 396-399.
- [179] Tiago S. et al (2014), "Alzheimer's disease, enzyme targets and drug discovery struggles: From natural products to drug prototypes", *Ageing Research Reviews*. 15, pp. 116-145.
- [180] Tian X. et al (1993), "Abietane diterpenes from *Clerodendron cyrtophyllum*", *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 41, pp. 1415-1417.
- [181] Tong X.T. et al. (2003), "Miyoshianines A and B, two new lycopodium alkaloids from *Huperzia miyoshiana*", *Planta Med*. 69 (6), pp. 576-579.
- [182] Tong X.T. et al (2003), "Triterpenoid Constituents of *Huperzia miyoshiana*", *Chinese Journal of Chemistry*. 21 (10), pp. 1364-1368
- [183] Tong X.T. et al (2003), "Triterpenoid Constituents of *Huperzia miyoshiana*", *Chinese Journal of Chemistry*. 21, pp. 1364-1368.
- [184] Tung B.T. et al (2017), "Antioxidant and acetylcholinesterase inhibitory activities in vitro of different fraction of *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis extract and attenuation of scopolamine-induced cognitive impairment in mice.", *Journal of Ethnopharmacology*. 198, pp. 24-32.
- [185] Van der Staay F.J. , Bouger P.C. (2005), "Effects of the cholinesterase inhibitors donepezil and metrifonate on scopolamine-induced impairments in the spatial cone field orientation task in rats", *Behavioural Brain Research*. 156 (1).
- [186] Vincent M. et al (2013), *Mycoheterotrophy: Taxonomy and Classification*, Springer New York.
- [187] Vorhees C.V. , Williams M.T. (2014), "Assessing spatial learning and memory in rodents", *Laboratory Animal Research Journal*. 55 (2), pp. 310-332.
- [188] Wagner W.H. , Beitel J.M. (1992), "Generic classification of modern North American Lycopodiaceae", *Annals of the Missouri Botanical Garden* 79, pp. 676-686.

- [189] Wang B.D. et al. (2000), "Structural elucidation of huperzine O", *Chinese Journal of Organic Chemistry*. 20 (5), pp. 812-814.
- [190] Wang H.B. et al. (2009), "Two new N-oxide Lycopodium alkaloids from *Huperzia serrata*", *Natural Product Research*. 23 (15), pp. 1363-1366.
- [191] Wang J. et al (2010), "Huperzine an improves chronic inflammation and cognitive decline in rats with cerebral hypoperfusion", *Journal of Neuroscience Research*. 88, pp. 807-815.
- [192] Wang L.S. et al (2003), "Huperzine A attenuates cognitive deficits and brain injury after hypoxia-ischemic brain damage in neonatal rats", *Zhonghua Er Ke Za Zhi*. 41 (1), [Abstract].
- [193] Wang R. , Tang X.C. (2005), "Neuroprotective effects of huperzine A: A natural cholinesterase inhibitor for the treatment of Alzheimer's disease", *Neurosignals*. 14 (1), pp. 71-82.
- [194] Wang Z. et al (2008), "HuperzineA exhibits anti-inflammatory and neuroprotective effects in a rat model of transient focal cerebral ischemia", *Journal of neurochemistry*. 106, pp. 1594-1603.
- [195] Wang Z.F et al. (2015), "Two new Lycopodium alkaloids from *Phlegmariurus phlegmaria* (L.) Holub", *Natural Product Research*. 30 (2), pp. 1-5.
- [196] Wang Z.F. , Tang X.C. (2007), "Huperzine A protects C6 rat glioma cells against oxygen-glucose deprivation-induced injury", *FEBS Letter*. 581 (4), pp. 596-602.
- [197] Wikstrom N. et al (2001), "Evolution of Lycopodiaceae (Lycopside): Estimating divergence times from rbcL gene sequences by use of nonparametric rate smoothing", *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 19 (2), pp. 177–186.
- [198] Wikström N. et al (2000), "Relationships of *Lycopodium* and *Lycopodiella* based on combined plastid rbcL gene and trnL intron sequence data", *Systematic Botany* 25 (3), pp. 495–510.
- [199] Wittayalaia S et al. (2012), "Lycophlegmariols A–D: Cytotoxic serratene triterpenoids from the club moss *Lycopodium phlegmaria* L.", *Phytochemistry*. 76, pp. 117–123.
- [200] Wolf A. et al (2016), "A comprehensive behavioral test battery to assess learning and memory in 129S6/Tg2576 Mice", *PloS one*. Vol. 11 (1), pp. 1-23.

- [201] Xiao Q.X. et al (1999), "Huperzine A protects rat pheochromocytoma cells against hydrogen peroxide-induced injury", *Neuroscience Letters*. 275 (2), pp. 73-76.
- [202] Xiao Q.X. et al (2000), "Protective effects of huperzine A on β -amyloid25–35 induced oxidative injury in rat pheochromocytoma cells", *Neuroscience Letters*. 286 (3), pp. 155-158.
- [203] Xu M. F. et al (2016), "A new bioactive diterpenoid from *Pestalotiopsis adusta*, an endophytic fungus from *Clerodendrum canescens*", *Natural Product Research*. 30 (23), pp. 2642-2647.
- [204] Yadav D. et al. (2010), "Diterpenoids from *Premna integrifolia*", *Phytochemistry Letters*. 3 (3), pp. 143–147.
- [205] Yang Y. et al. (2016), "Chemical Constituents of Plants from Genus *Phlegmariurus*", *Chem. Biodiversity*. 13, pp. 269-274.
- [206] Yang Y. et al. (2009), "Two diterpenoids from herbs of *Huperzia serrata*", *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 34 (8), pp. 987-989.
- [207] Yang Y.B. et al. (2008), "A new flavone glycoside from *Huperzia serrata*", *Chinese Journal of Natural Medicines*. 6 (6), pp. 408-410.
- [208] Yasushi H. et al (2016), "Effects of scallop shell extract on scopolamine-induced memory impairment and MK801-induced locomotor activity", *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 9 (7), pp. 662-667.
- [209] Yi R. et al (2013), "A study of *Lycium barbarum* polysaccharides (LBP) extraction technology and its anti-aging effect", *Africa journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 10 (4), pp. 171-174.
- [210] Youssef D. et al (2019), "Synthesis and biological assessment of KojoTacrines as new agents for Alzheimer's disease therapy", *Journal of Enzyme inhibition and Medical chemistry*. 34 (1), pp. 163-170.
- [211] Yu-Chen Liu et al. (2016), "Five new Lycopodium alkaloids from the aerial parts of *Phlegmariurus henryi*", *Fitoterapia* 115, pp. 148-154.
- [212] Yuan S. et al. (2002), "Structural identification of neohuperzine", *Acta pharmaceutica Sinica*. 37 (12), pp. 946-949.
- [213] Yuan S. F. R., Gu G., (1994), "Studies on the Alkaloids of Shezushishan (*Huperzia serrata*)", *Chinese Traditional and Herbal Drugs*. 9, pp. 002.

- [214] Yuan S.Q. , Zhao Y.M. (2003), "A novel phlegmariurine type alkaloid from *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev", *Acta pharmaceutica Sinica*. 38 (8), pp. 596-598.
- [215] Yulan L. et al (2019), "Aster glehni Extract Ameliorates Scopolamine-Induced Cognitive Impairment in Mice", *Journal of Medicinal Food*. 22 (7), pp. 685-695.
- [216] Yumkham D. et al (2013), "Study on uses and trading of *Huperzia squarrosa* (G. Forst.) Trevis. (Lycopodiaceae) in Manipur, India ", *Ethnobotany Research & Applications*. 11, pp. 153-163.
- [217] Yumkham S.D. , Potsangbam K.S. (2011), "Additional Notes on Spore morphology of two *Huperzia* (Lycopodiaceae) species and systematic significance", *Research Journal of bontany*. 6 (2), pp. 78-86.
- [218] Zangara A. et al (2003), "The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease", *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 75 (3), pp. 675-686.
- [219] Zhang L. B. et al (2013), *Flora of China*, pp. 13-34, Science Press, Beijing.
- [220] Zhao S.S. et al (2015), "Nine new diterpenes from the leaves of plantation-grown *Cunninghamia lanceolata*", *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*. 25, pp. 1483-1489.
- [221] Zhou B.N. et al. (1993), "NMR assignments of huperzine A, serratinine and lucidioline", *Phytochemistry*. 34 (5), pp. 1425-1428.
- [222] Zhou H. (2004), "Serratane-type Triterpenoids from *Huperzia serrata*", *Natural Product Research*. 18 (5), pp. 453-459.
- [223] Zhou H. et al (2003), "New epoxyserratanes from *Huperzia serrata*", *Planta Medica*. 69 (1), pp. 91-94.
- [224] Zhou H. et al (2003), "Serratene-Type Triterpenoids from *Huperzia serrata*", *Journal of Natural Products* 66 (10), pp. 1328-1332.
- [225] Zhu D.Y. et al. (1994), "Huperserratinine from *Huperzia serrata*", *Phytochemistry*. 36 (4), pp. 1069-1072.
- [226] Zhu L. et al. (2014), "The effects of Zibu Piyin Recipe components on scopolamine-induced learning and memory impairment in the mouse", *Journal of Ethnopharmacology* 151 (1), pp. 576-582.
- [227] <http://thaifernflora.myspecies.info>, ngày truy cập Ngày truy cập: 29/6/2020.

- [228] http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=115890, ngày truy cập Ngày truy cập: 29/6/2020.
- [229] http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=101&taxon_id=115890, ngày truy cập Ngày truy cập: 29/6/2020.
- [230] <https://profiles.ala.org.au/opus/foa/profile/Huperzia>, ngày truy cập Ngày truy cập: 29/6/2020.

DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC CỦA LUẬN ÁN

	Trang
PHỤ LỤC 1 Phiếu giám định tên khoa học	PL 1
PHỤ LỤC 2 Cấu trúc hóa học của các hợp chất (1-242) được phân lập từ chi <i>Huperzia</i> Bernh.	PL 6
PHỤ LỤC 3 Phổ của các hợp chất tinh khiết phân lập được từ loài <i>Huperzia phlegmaria</i>	PL 18
Phụ lục 3.1. Phổ của hợp chất HP1	PL 19
Phụ lục 3.2. Phổ của hợp chất HP11A	PL 22
Phụ lục 3.3. Phổ của hợp chất HP11B	PL 36
Phụ lục 3.4. Phổ của hợp chất HP12	PL 50
Phụ lục 3.5. Phổ của hợp chất HP13	PL 54
Phụ lục 3.6. Phổ của hợp chất HPA	PL 57
Phụ lục 3.7. Phổ của hợp chất HPB	PL 70
Phụ lục 3.8. Phổ của hợp chất HPH	PL 76
Phụ lục 3.9. Phổ của hợp chất HPD	PL 87
Phụ lục 3.10. Phổ của hợp chất HPI	PL 91
Phụ lục 3.11. Phổ của hợp chất HPJ	PL 95
Phụ lục 3.12. Phổ của hợp chất HPP	PL 130
Phụ lục 3.13. Phổ của hợp chất HP10A	PL 103
Phụ lục 3.14. Phổ của hợp chất HP10B	PL 105
Phụ lục 3.15. Phổ của hợp chất HP10D	PL 108
PHỤ LỤC 4 Hình ảnh chuột trong các thử nghiệm hành vi	PL 111

PHỤ LỤC 1
Phiếu giám định tên khoa học

VIỆN SINH THÁI VÀ
TÀI NGUYÊN SINH VẬT
PHÒNG THỰC VẬT

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

Hà Nội, ngày 04 tháng 08 năm 2016

Kính gửi: TS. Nguyễn Thị Hoài, Khoa Y Dược, Trường Đại học Y Dược Huế

Phòng Thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật nhận được Đề nghị giám định mẫu thực vật, ngày 08/04/2016 của TS. Nguyễn Thị Hoài, Khoa Y Dược, Trường Đại học Y Dược Huế, có gửi theo mẫu vật và toàn bộ thông tin liên quan đến mẫu vật.

Địa điểm thu mẫu: huyện Hương Hóa, tỉnh Quảng Trị; thời gian thu mẫu: tháng 02/2016; người thu: Lê Tuấn Anh, Trung tâm Khoa học và Công nghệ Quảng Trị.

Đại diện của Phòng Thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã tiến hành giám định mẫu trên. Người giám định: TS. Nguyễn Thế Cường. Kết thúc giám định, đại diện của Phòng Thực vật, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật có kết luận giám định sau:

Mẫu mang số 01 có tên khoa học là *Pogostemon auricularius* (L.) Hassk. (Tu hùng tai), thuộc họ Bạc hà (Lamiaceae)

Mẫu mang số 02 có tên khoa học là *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. (Thông đất rêu), thuộc họ Thông đất (Lycopodiaceae)

Xin gửi kết luận giám định tới TS. Nguyễn Thị Hoài, Khoa Y Dược, Trường Đại học Y Dược Huế

Xác nhận của Viện Sinh thái & TNSV



Trương Xuân Lam

Người giám định

Nguyễn Thế Cường

PHIẾU KẾT QUẢ GIÁM ĐỊNH MẪU

(Kết quả giám định chỉ có giá trị với mẫu đem thử)

Số: *DL.120*

Mẫu giám định: Thạch tùng đuôi ngựa

Số lượng mẫu: 01 mẫu (Mẫu được lưu tại Phòng Tiêu bản của Khoa Tài nguyên Dược liệu với số hiệu là: DL-020120).

Nơi lấy mẫu: Huyện Hương Hóa, tỉnh Quảng Trị.

Ngày lấy mẫu: 25/06/2018.

Người yêu cầu: Đoàn Thị Hương.

Đơn vị: Cục Y tế - Bộ Công an.

Địa chỉ: 47 Phạm Văn Đồng, Cầu Giấy, Hà Nội.

Nội dung yêu cầu: Xác định tên khoa học.

Phương pháp giám định: So sánh hình thái.

Cán bộ giám định: ThS. Nguyễn Quỳnh Nga.

Sau khi phân tích mẫu có ký hiệu DL-020120 kể trên, tham khảo các tài liệu hiện có kết hợp đối chiếu với tiêu bản của loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. đang lưu giữ tại Phòng Tiêu bản của Khoa Tài nguyên Dược liệu (có số hiệu TB-1233, TB-1284), đã xác định được tên khoa học của mẫu, cụ thể như sau:

Yêu cầu	Kết quả
Tên khoa học:	<i>Huperzia phlegmaria</i> (L.) Rothm.
Synonym:	<i>Phlegmariurus phlegmaria</i> (L.) Holub ; <i>Lepidotis phlegmaria</i> (L.) P. Beauv. ; <i>Urostachys phlegmaria</i> (L.) Herter ex Nessel; <i>Lycopodium phlegmaria</i> L.
Tên Việt Nam:	Thạch tùng đuôi ngựa; Mã vĩ sam; Râu cây.
Họ thực vật:	Lycopodiaceae – Họ Thông đất

Tài liệu tham khảo

- Phạm Hoàng Hộ. (1999) . *Cây cỏ Việt Nam*, quyển 1: 22 - 26. Nhà xuất bản Trẻ, TP HCM.
- Zhang, L. B. & K. Iwatsuki. (2013). Lycopodiaceae. In: Z. Y. Wu, P. H. Raven & D. Y. Hong, eds., *Flora of China*, Vol. 2-3 (Pteridophytes): 13-34. Science Press, Beijing; Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Võ Văn Chi. (2012). *Từ điển cây thuốc Việt Nam*, tập 2: 810. Nhà xuất bản Y học Hà Nội.

KHOA TÀI NGUYÊN DƯỢC LIỆU

Phạm Thanh Huyền

Hà Nội, ngày 07 tháng 9 năm 2020

KT. VIỆN TRƯỞNG
PHÓ VIỆN TRƯỞNG

VIỆN
DƯỢC LIỆU

Lê Việt Dũng

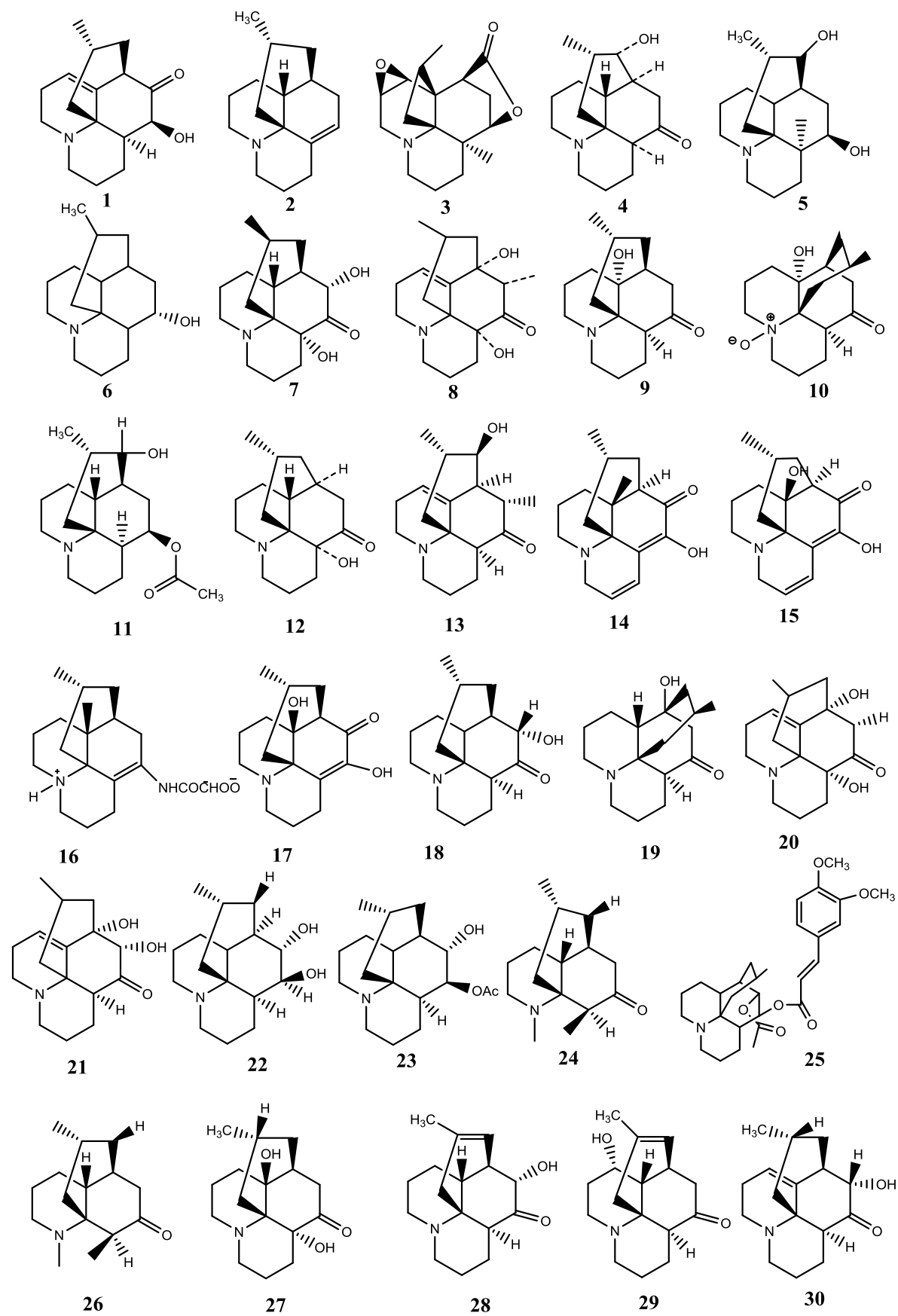
VIỆN
DƯỢC LIỆU

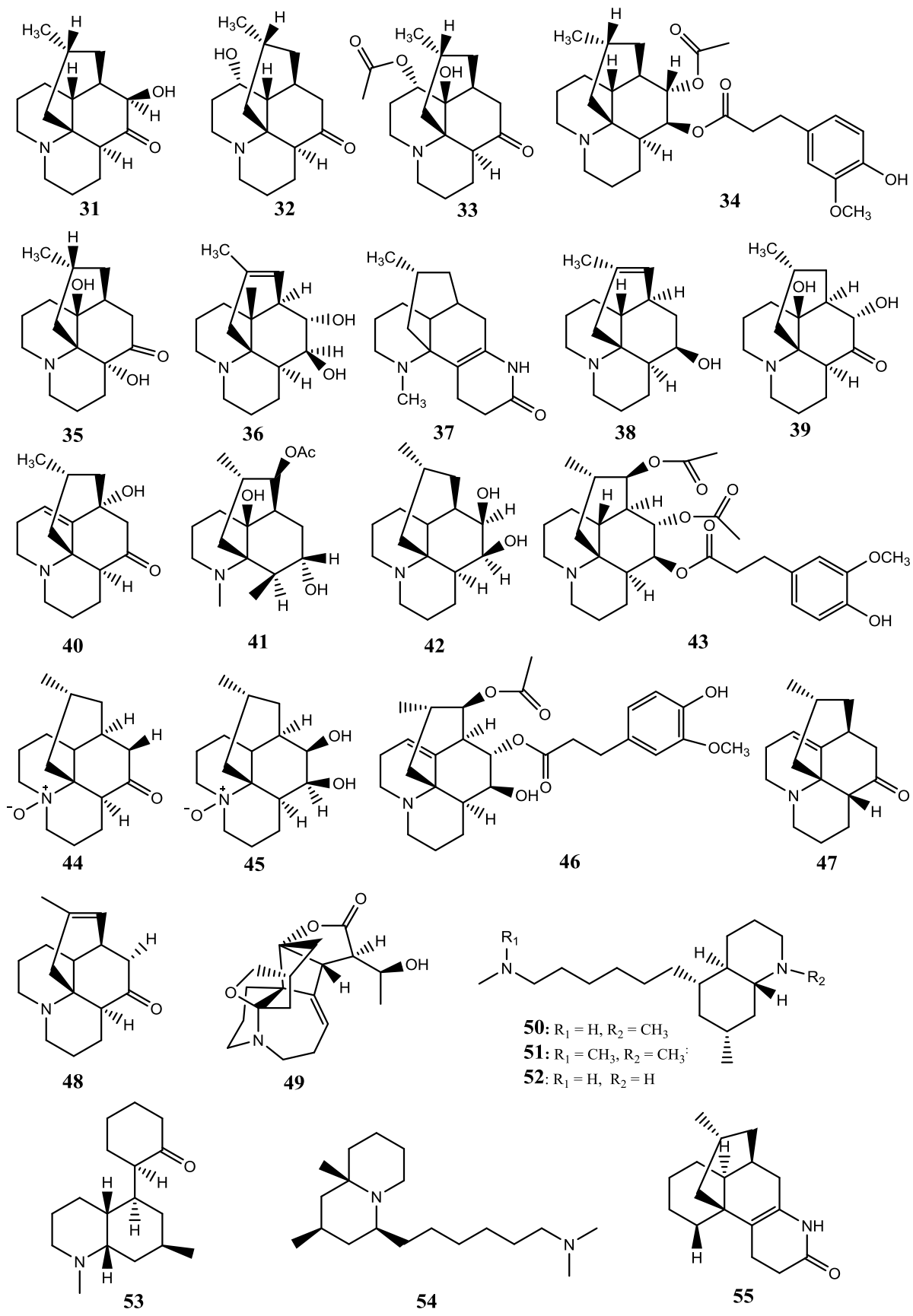
Phụ lục: Ảnh mẫu DL-020120

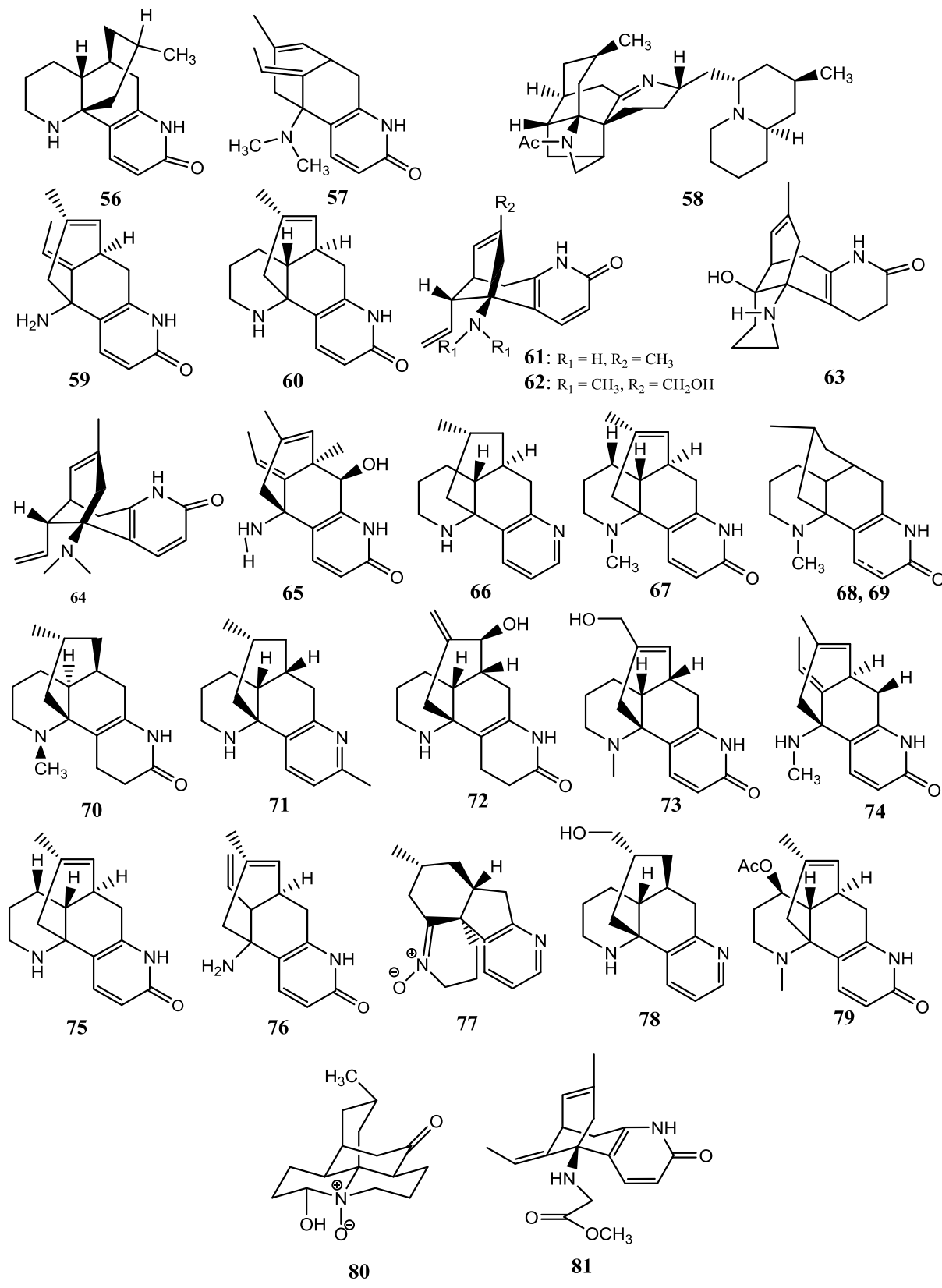


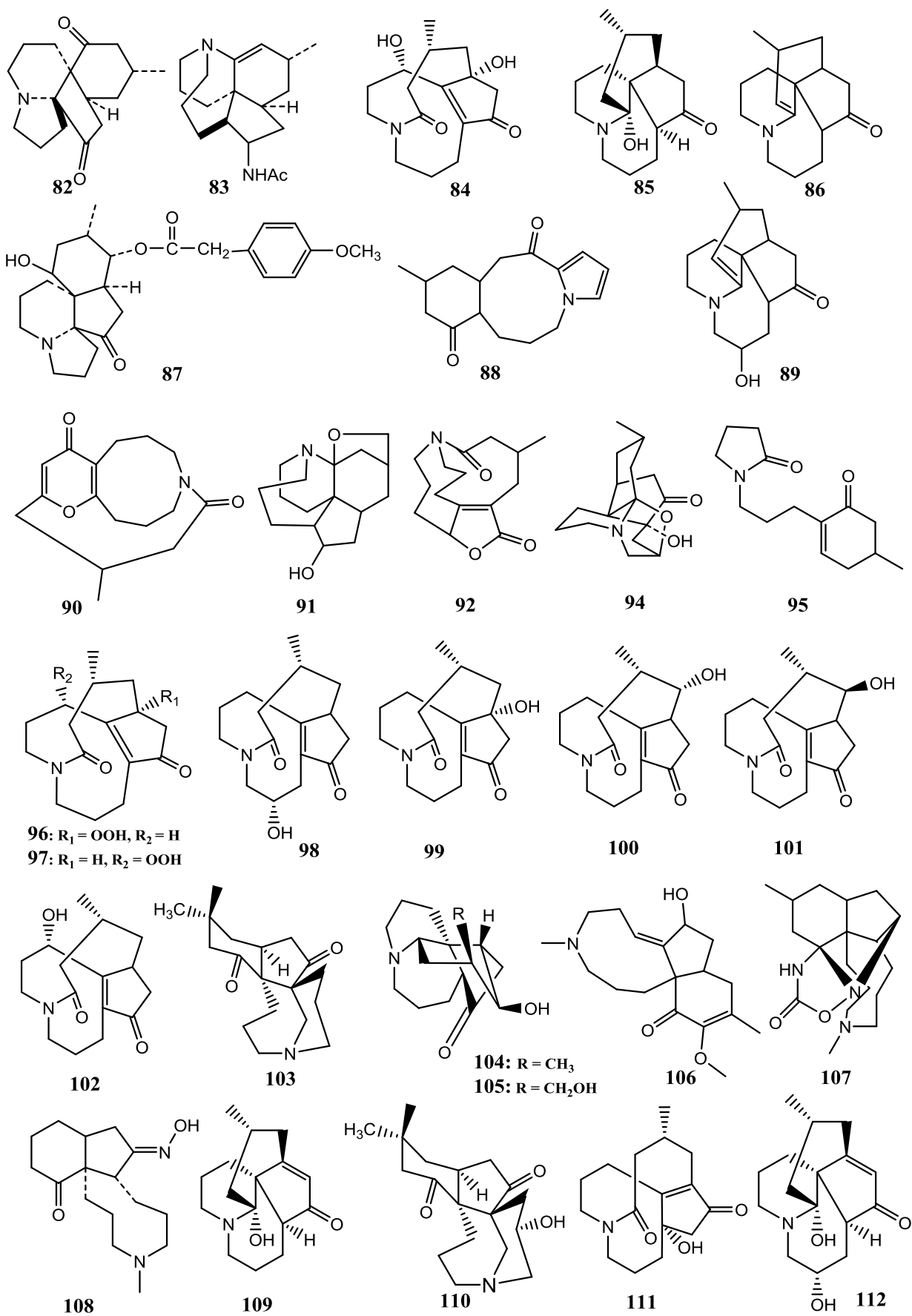
PHỤ LỤC 2

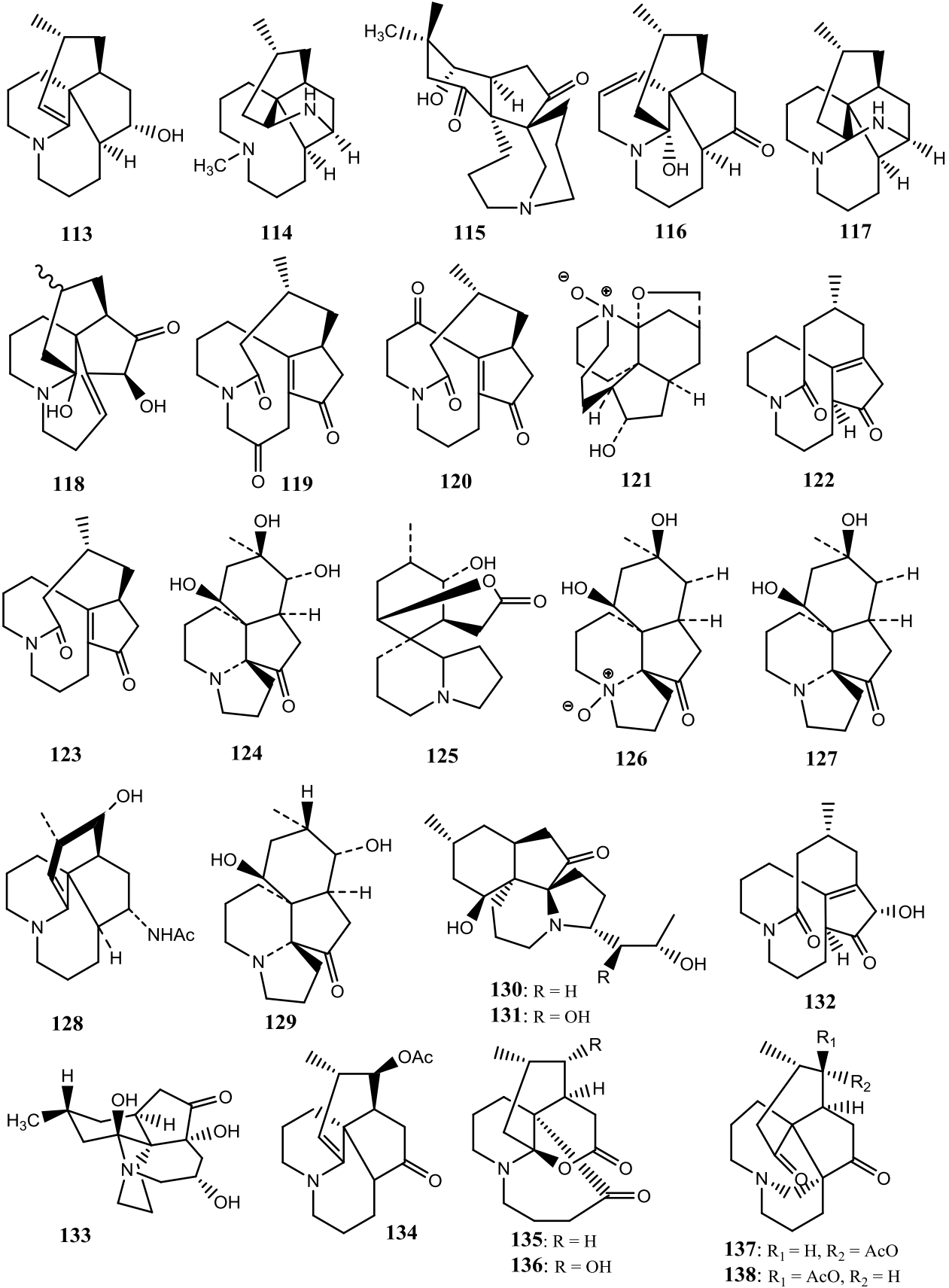
**Cấu trúc hóa học của các hợp chất (1-242) được phân lập từ chi
Huperzia Bernh.**

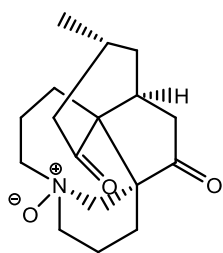




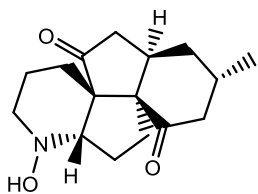




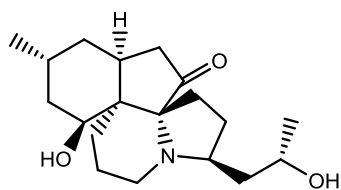




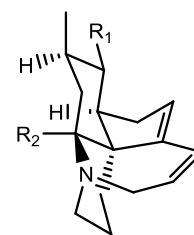
139



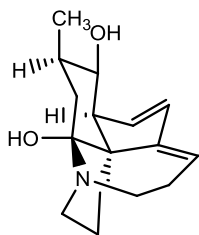
140



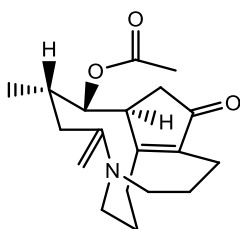
141



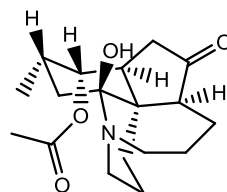
142: R₁ = OH, R₂ = OH
143: R₁ = OH, R₂ = OCH₃
144: R₁ = H, R₂ = OH



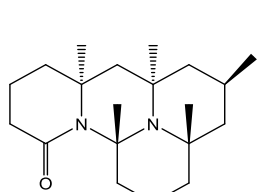
145



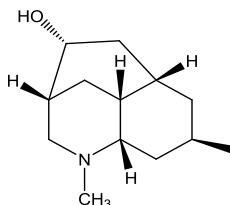
146



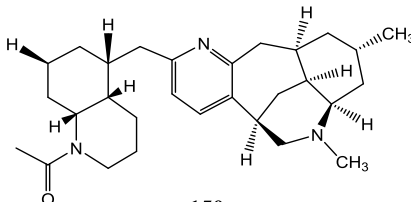
147



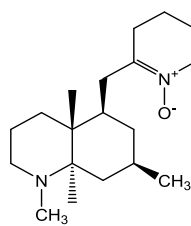
148



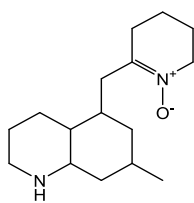
149



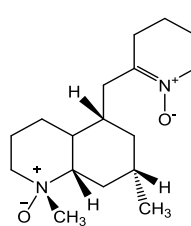
150



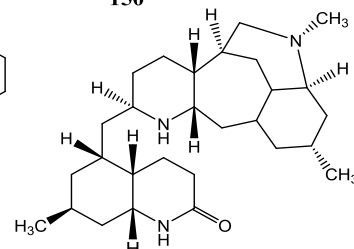
151



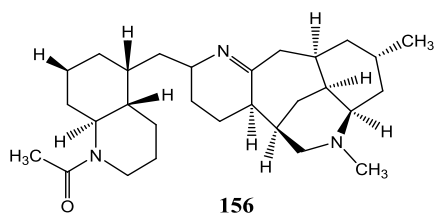
152



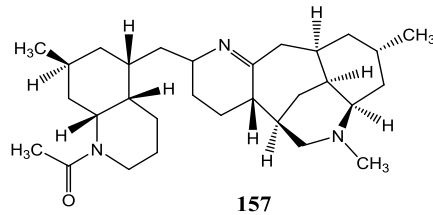
153



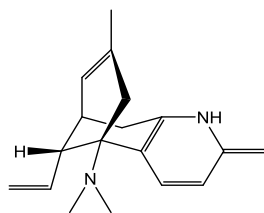
154



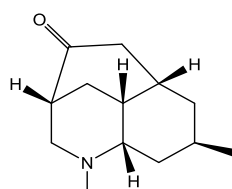
156



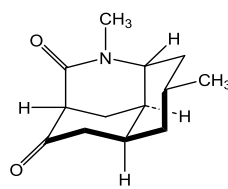
157



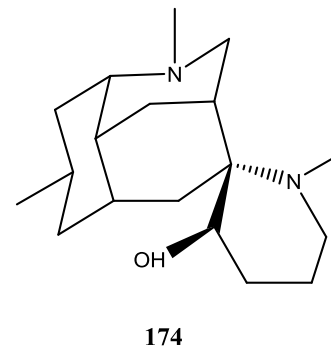
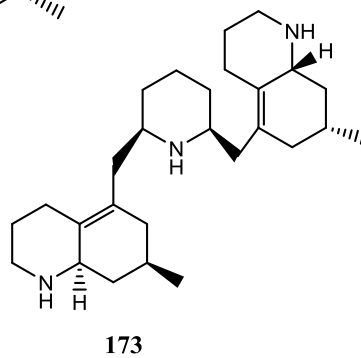
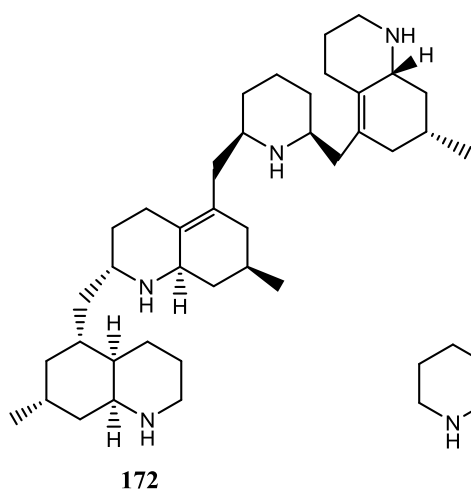
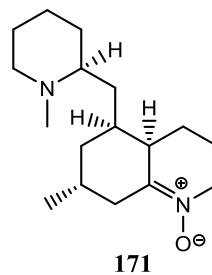
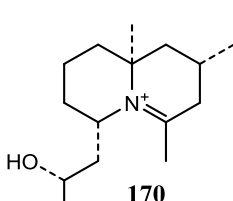
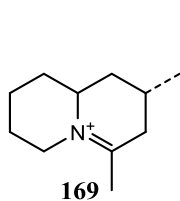
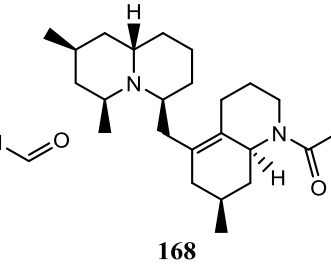
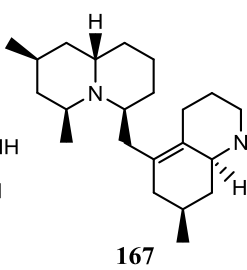
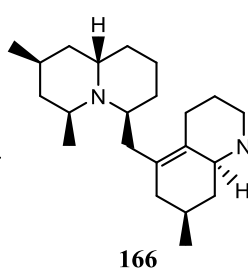
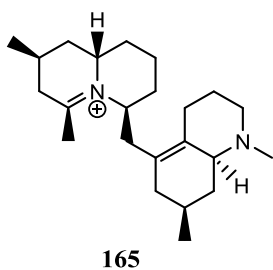
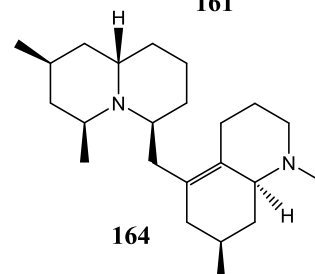
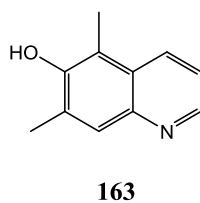
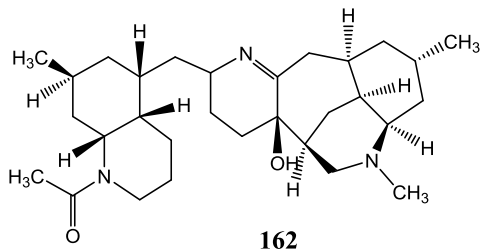
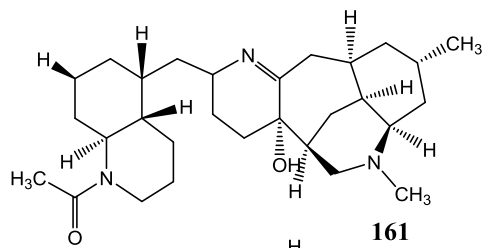
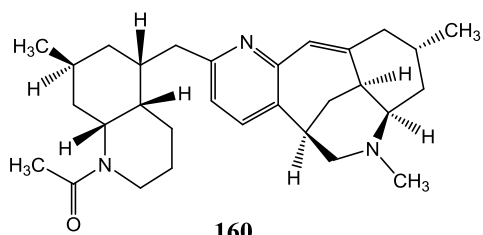
155

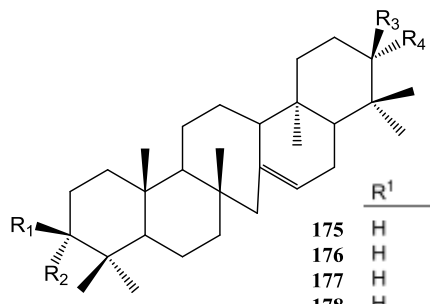


158

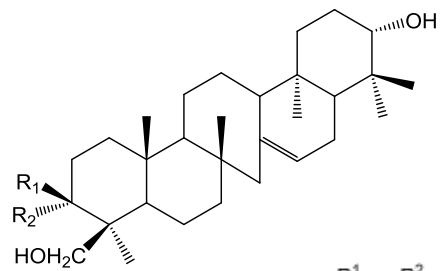


159

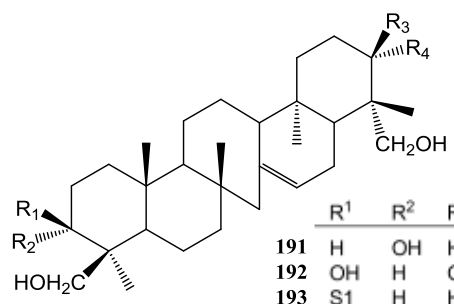




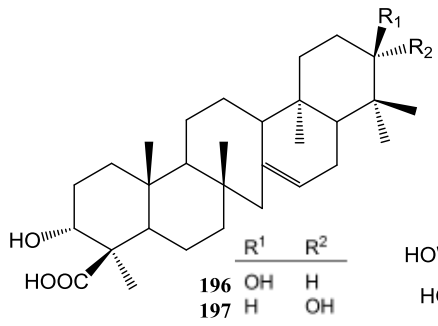
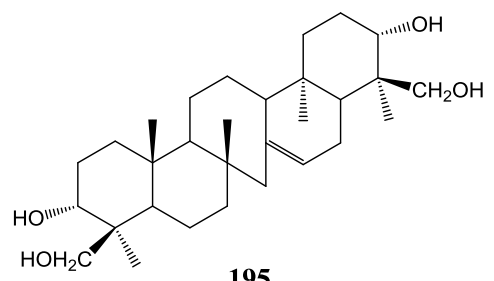
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
175	H	OH	H	OH
176	H	AcO	H	OH
177	H	OH	OH	H
178	H	AcO	OH	H
179	OH	H	OH	H
180	OH	H	H	OH
181	AcO	H	H	OH
182	S1	H	H	OH
183	S2	H	H	OH
184	AcO	H	OH	H
185	S3	H	H	OH
186	OH	H	=O	



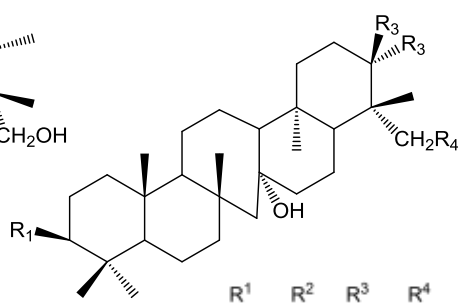
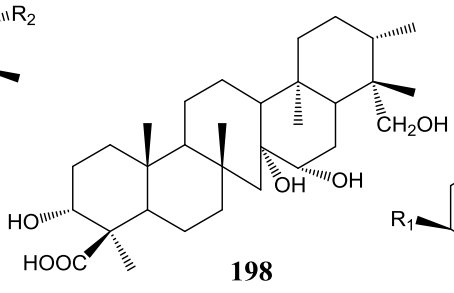
	R ¹	R ²
187	H	OH
188	OH	H
189	S1	H
190	S4	H



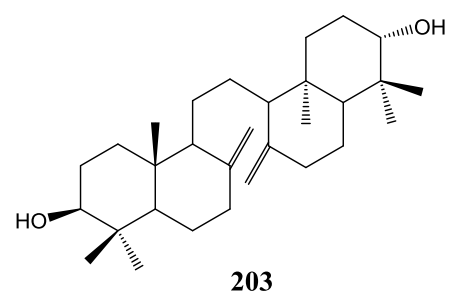
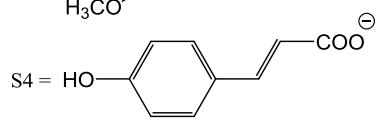
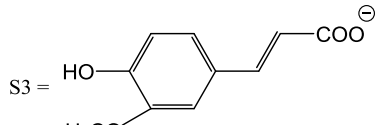
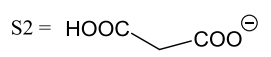
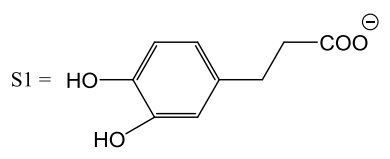
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
191	H	OH	H	OH
192	OH	H	OH	H
193	S1	H	H	OH
194	H	OH	OH	H

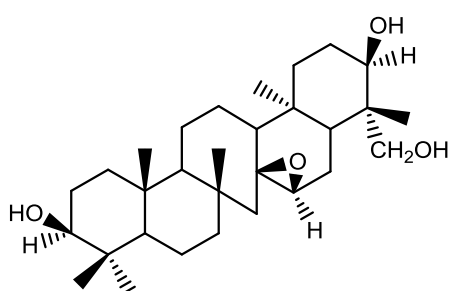


	R ¹	R ²
196	OH	H
197	H	OH

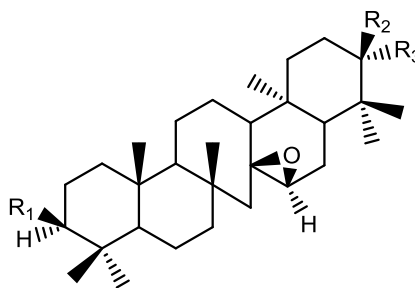


	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
199	OH	H	OH	H
200	OH	=O		H
201	S1	H	OH	H
202	S1	H	OH	OH





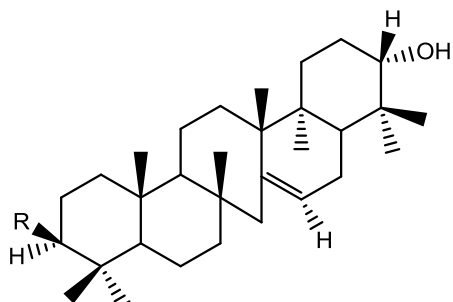
204



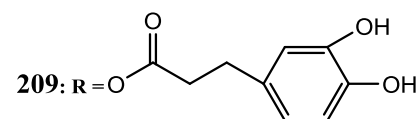
205: $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}$

206: $R_1 = \text{OAc}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OH}$

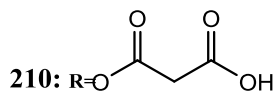
207: $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{OH}, R_3 = \text{H}$



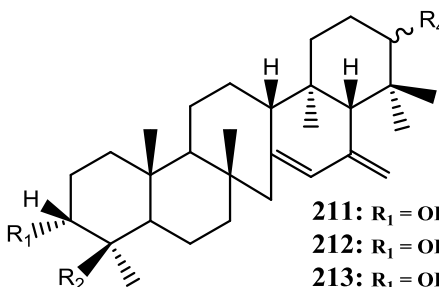
208: $R = \text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{OH}$



209: $R = \text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_3(\text{OH})_2$



210: $R = \text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{OH}$



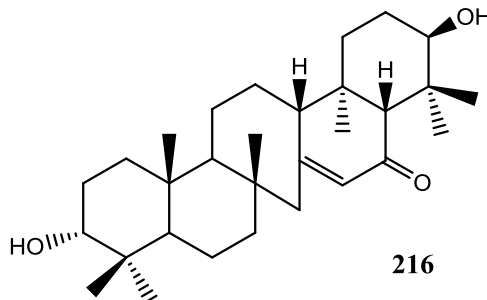
211: $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{COOH}, R_3 = \text{H}_2, R_4 = \alpha\text{OH}$

212: $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{CHO}, R_3 = \text{O}, R_4 = \beta\text{OH}$

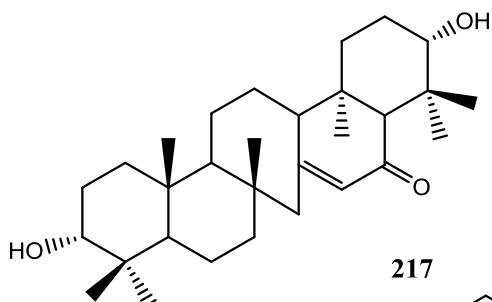
213: $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{COOH}, R_3 = \text{O}, R_4 = \beta\text{OH}$

214: $R_1 = \text{OAc}, R_2 = \text{CH}_3, R_3 = \text{O}, R_4 = \beta\text{OH}$

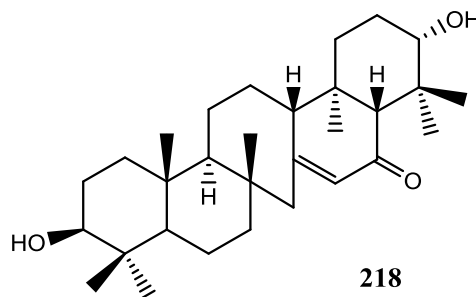
215: $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{CH}_3, R_3 = \text{O}, R_4 = \beta\text{OH}$



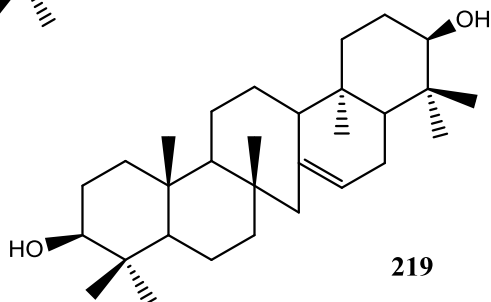
216



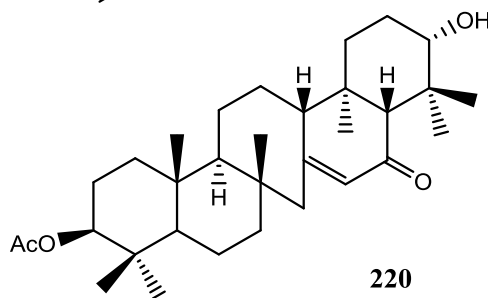
217



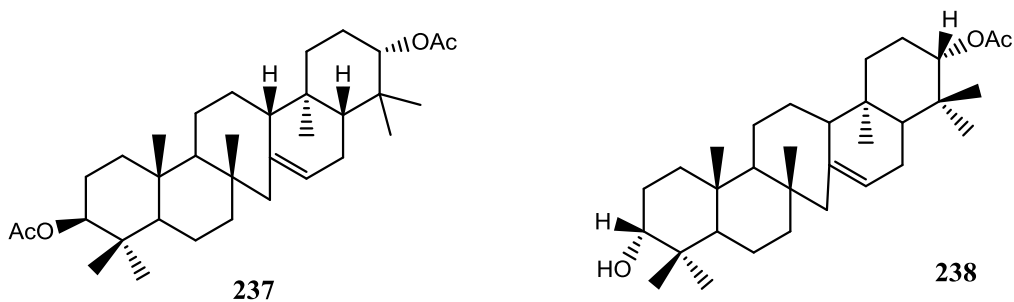
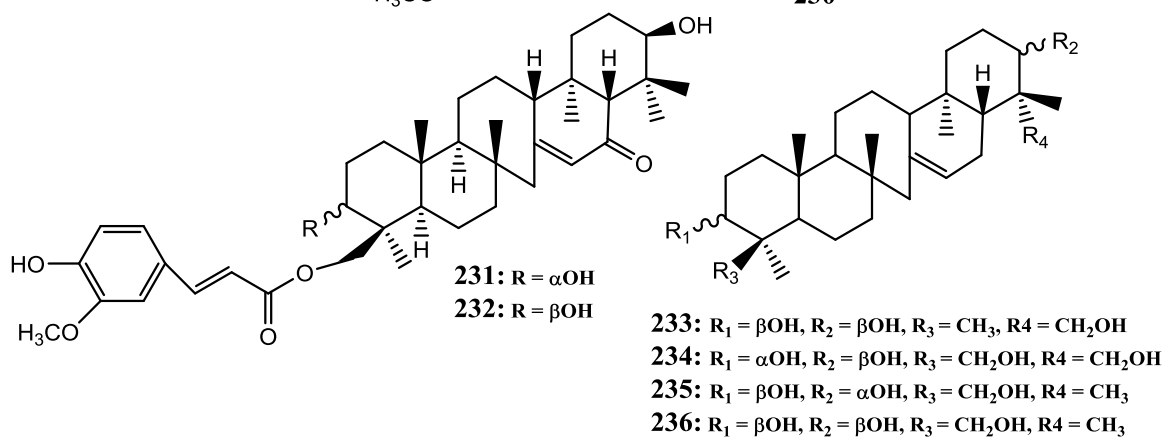
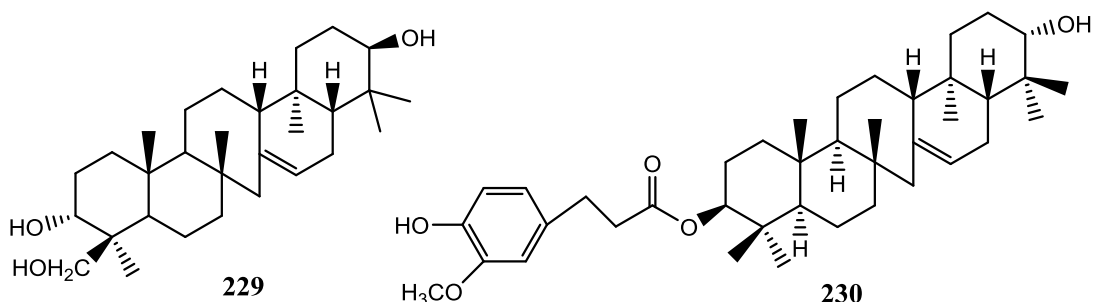
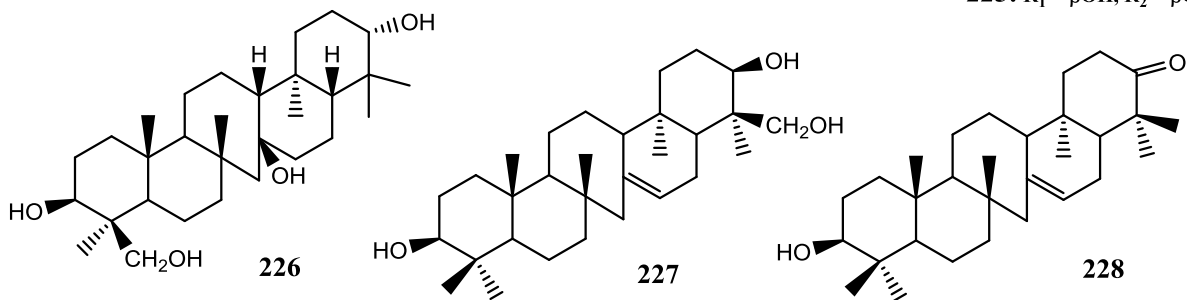
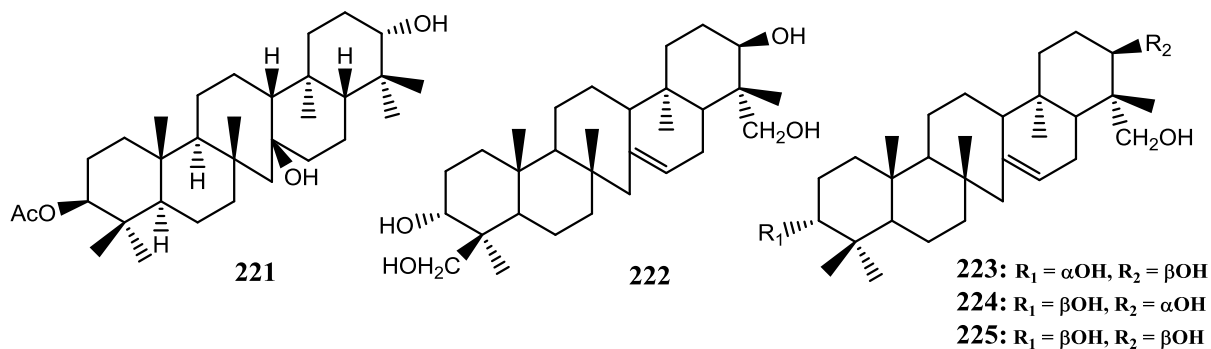
218

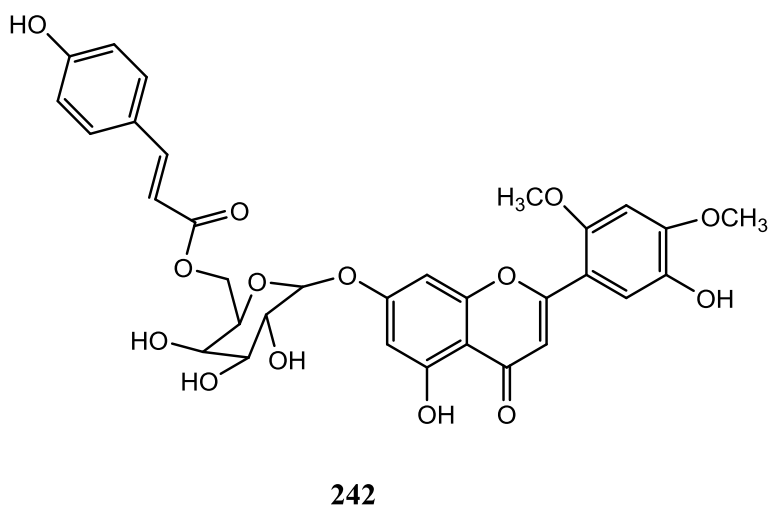
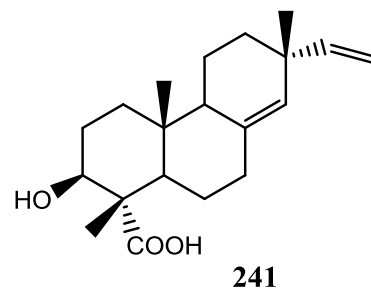
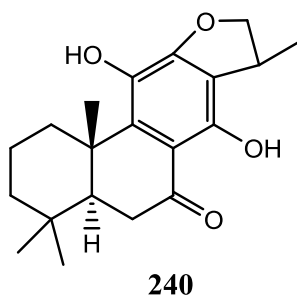
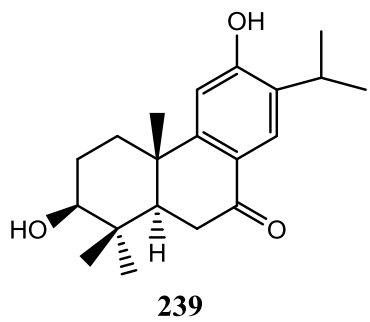


219



220



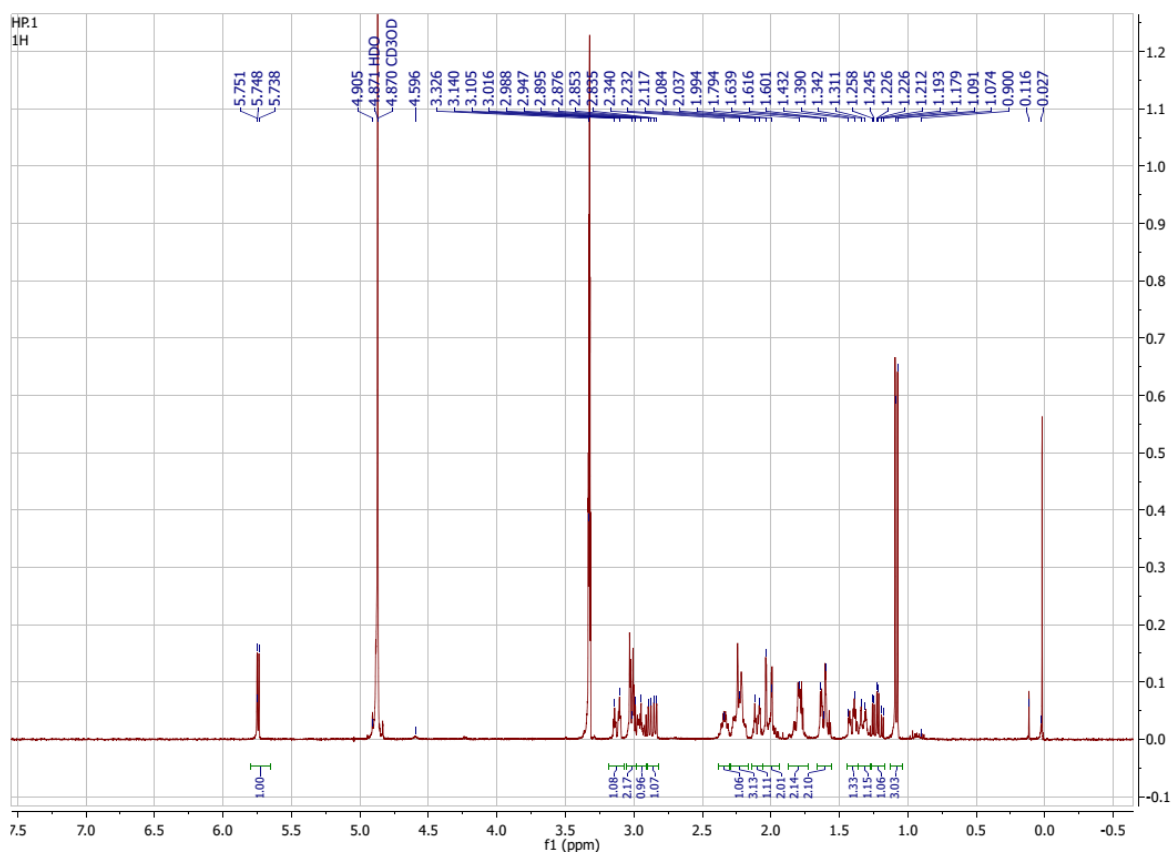
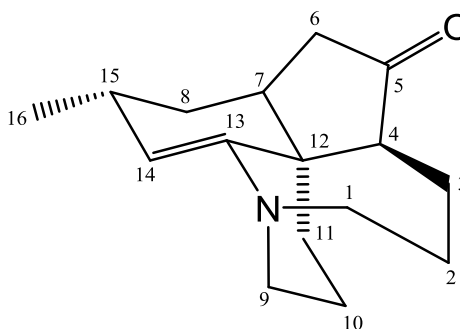


PHỤ LỤC 3

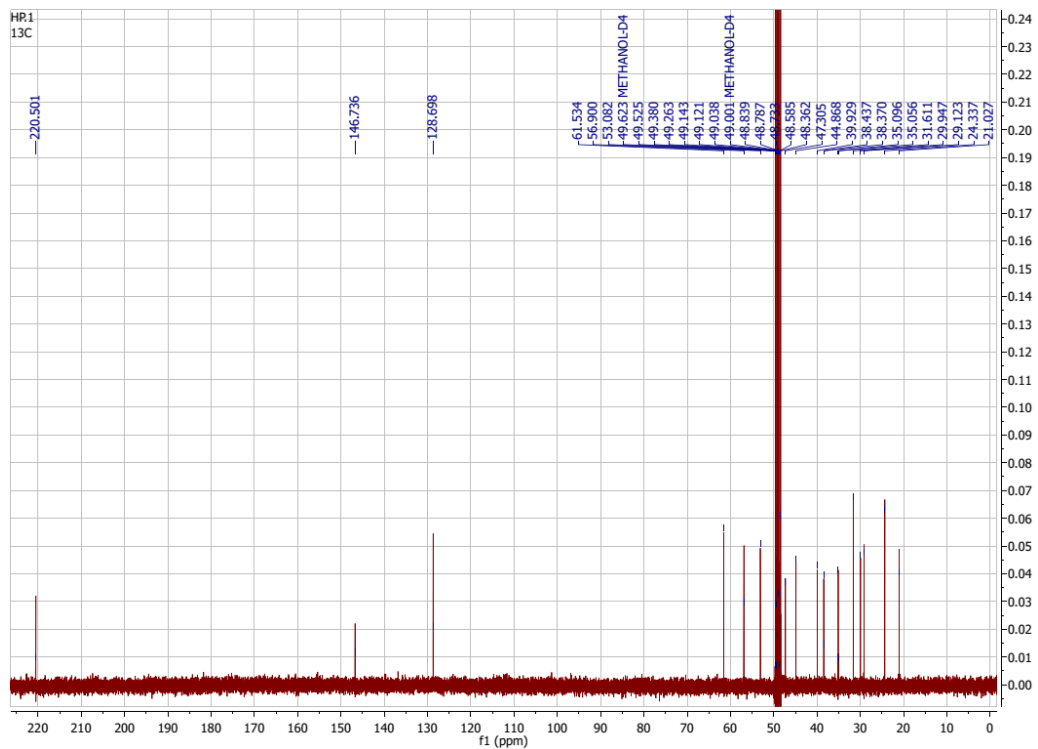
**Phổ của các hợp chất tinh khiết phân lập được từ loài
*Huperzia phlegmaria***

Phụ lục 3.1. Phổ của hợp chất HP1 (Fawcettidin)

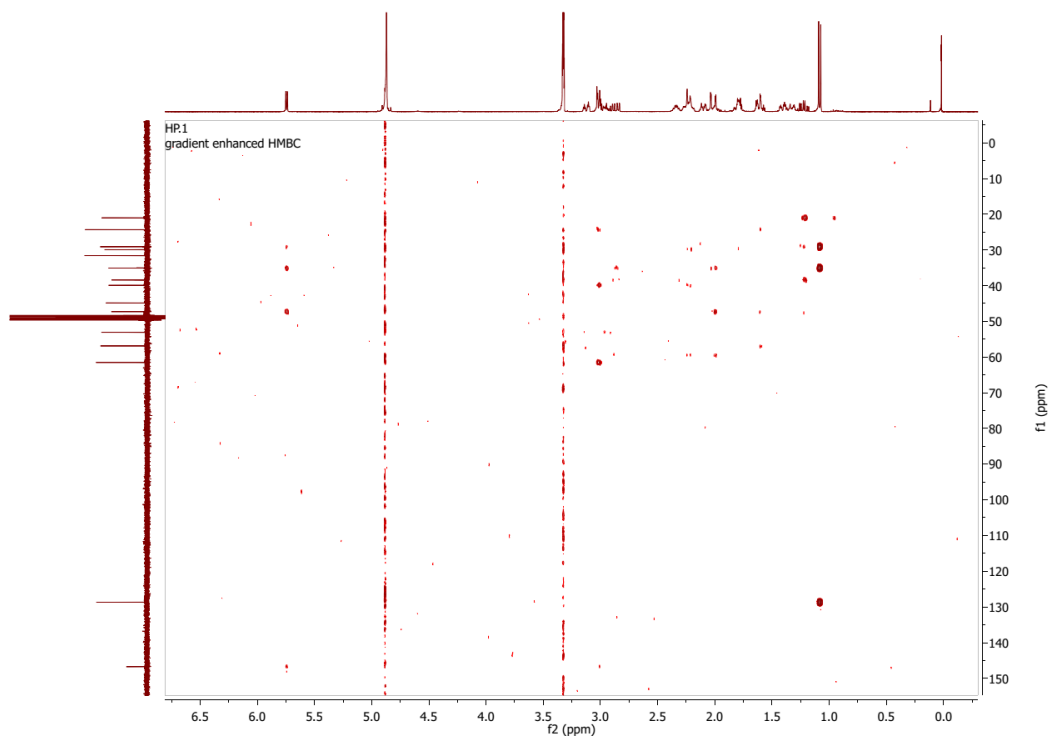
- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ HMBC
- Phổ HMQC
- Phổ COSY



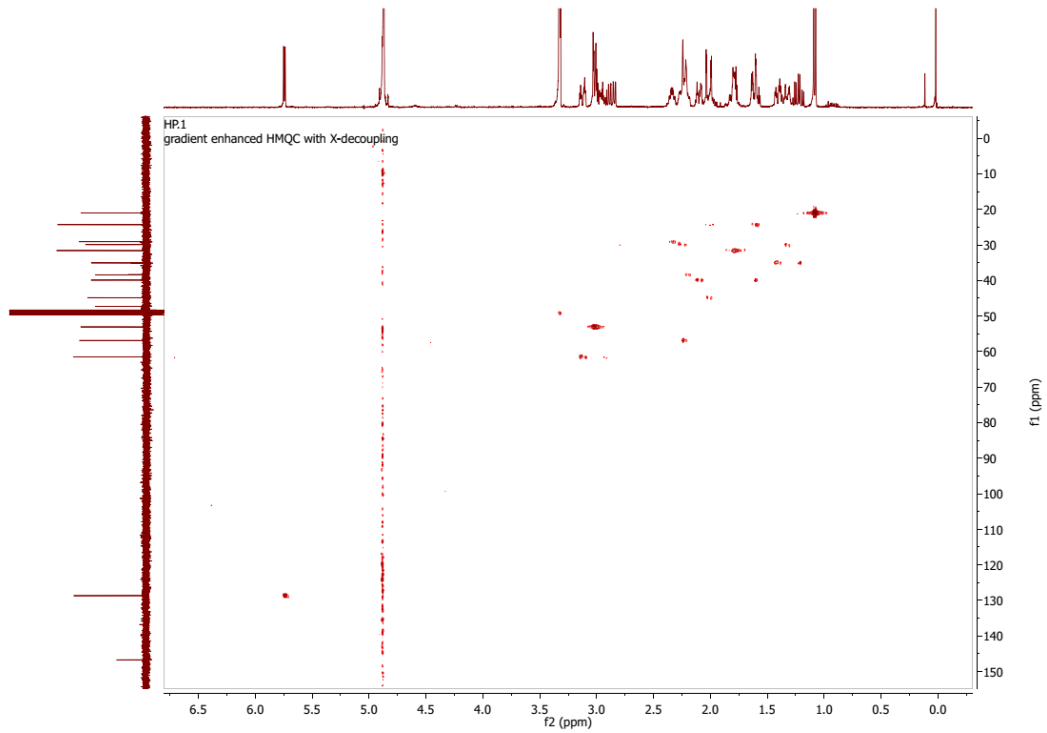
Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất HP1 đo trong CD_3OD



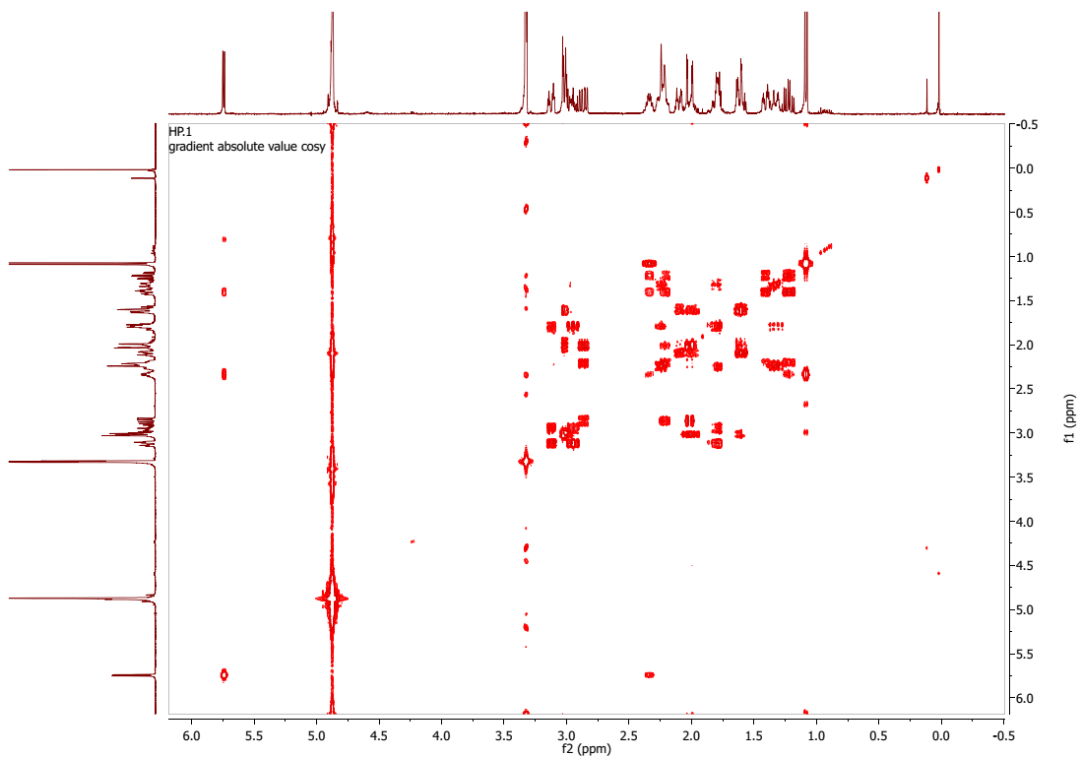
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất HP1 đo trong CD_3OD



Phổ HMBC của hợp chất HP1 đo trong CD_3OD



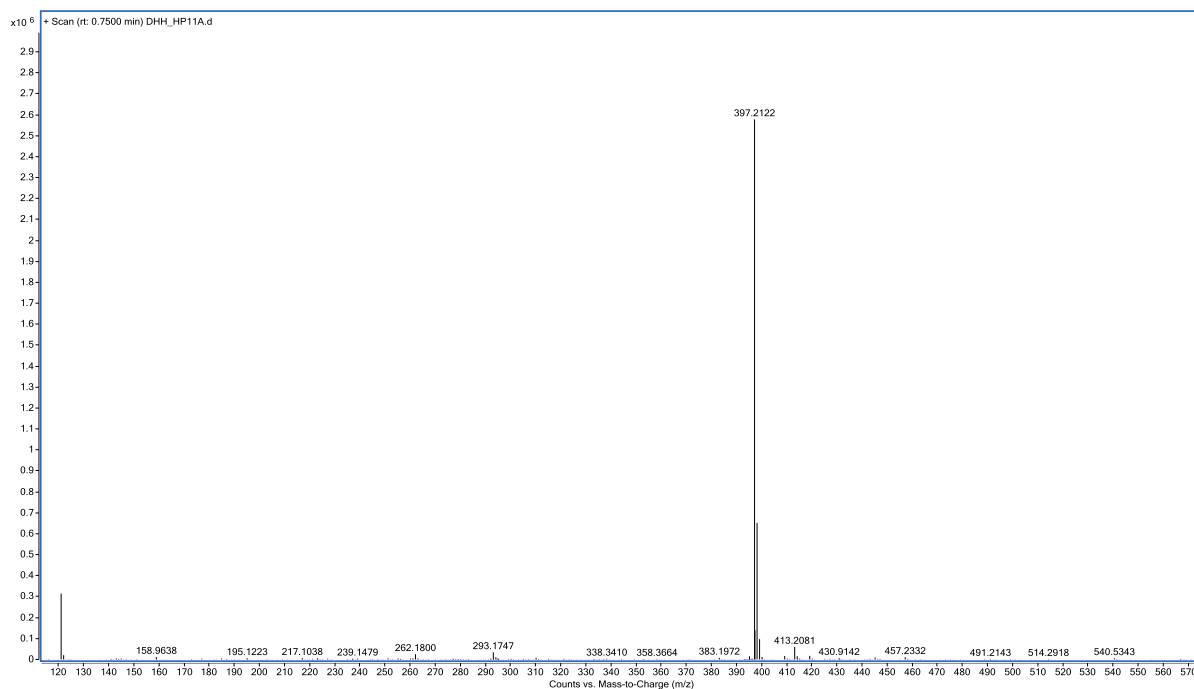
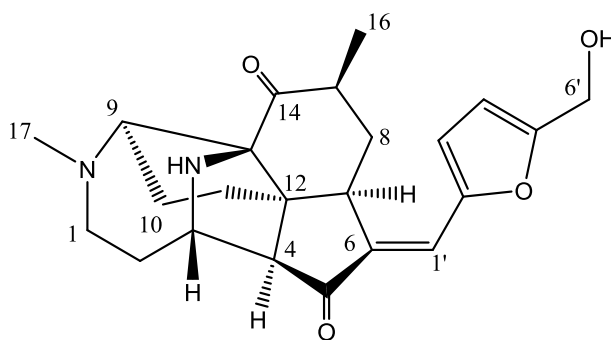
Phổ HMQC của hợp chất HP1 đo trong CD₃OD



Phổ COSY của hợp chất HP1 đo trong CD₃OD

Phụ lục 3.2. Phổ của hợp chất HP11A (Huperphlegmin A)

- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ UV
- Phổ IR
- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC
- Phổ COSY
- Phổ NOESY

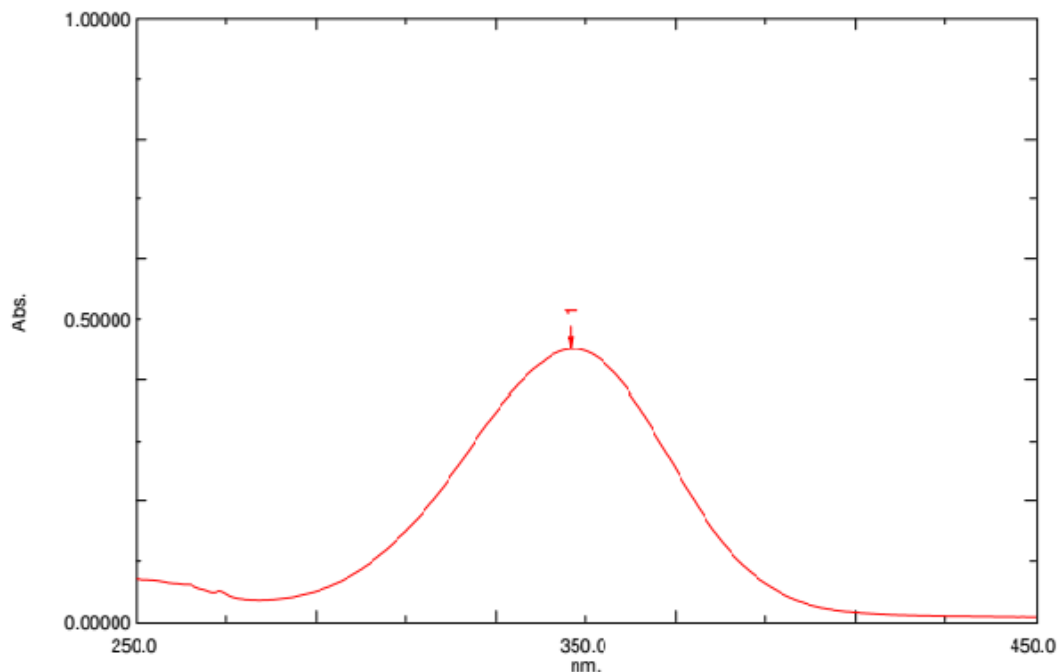


Phổ HR-ESI-MS của hợp chất HP11A

Spectrum Peak Pick Report

07/21/2018 03:25:33 PM

Data Set: HP 11A_151847.spc - RawData

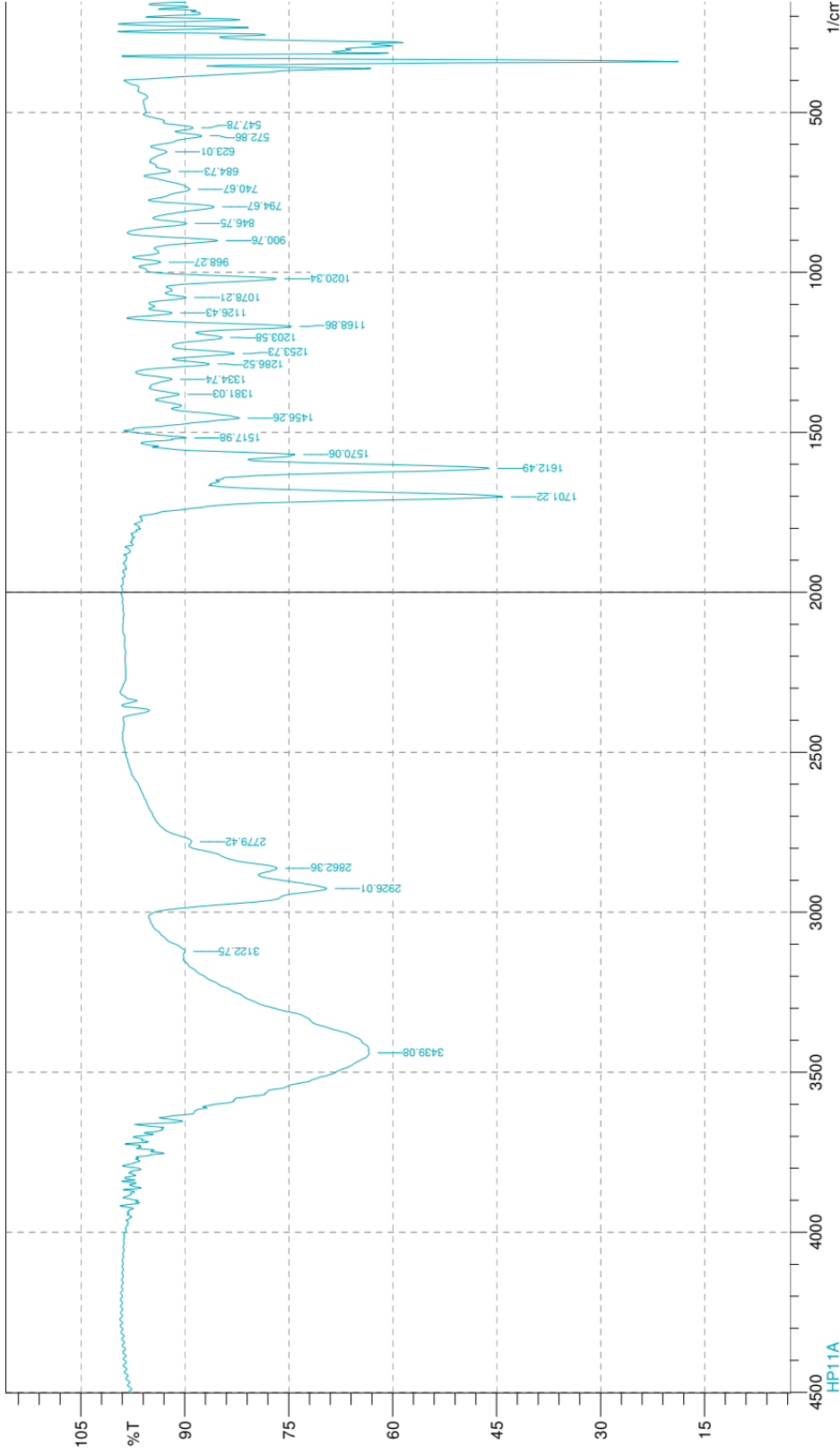
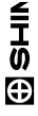


Measurement Properties
Wavelength Range (nm.): 190.0 to 700.0
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0.5
Auto Sampling Interval: Disabled
Scan Mode: Auto

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	346.5	0.45181	

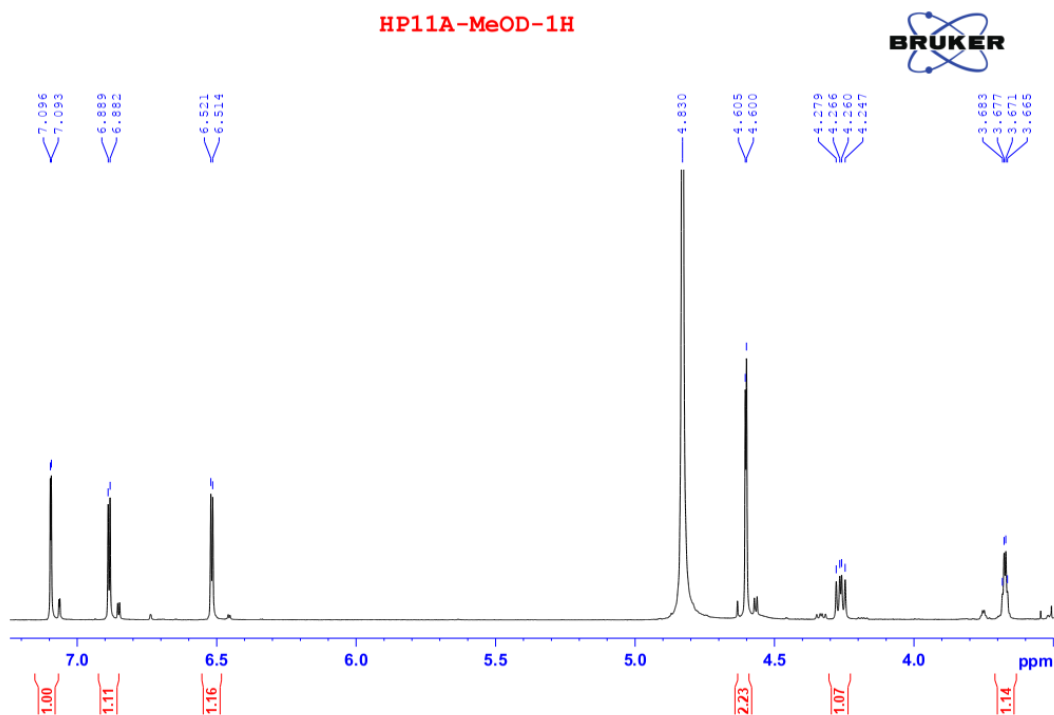
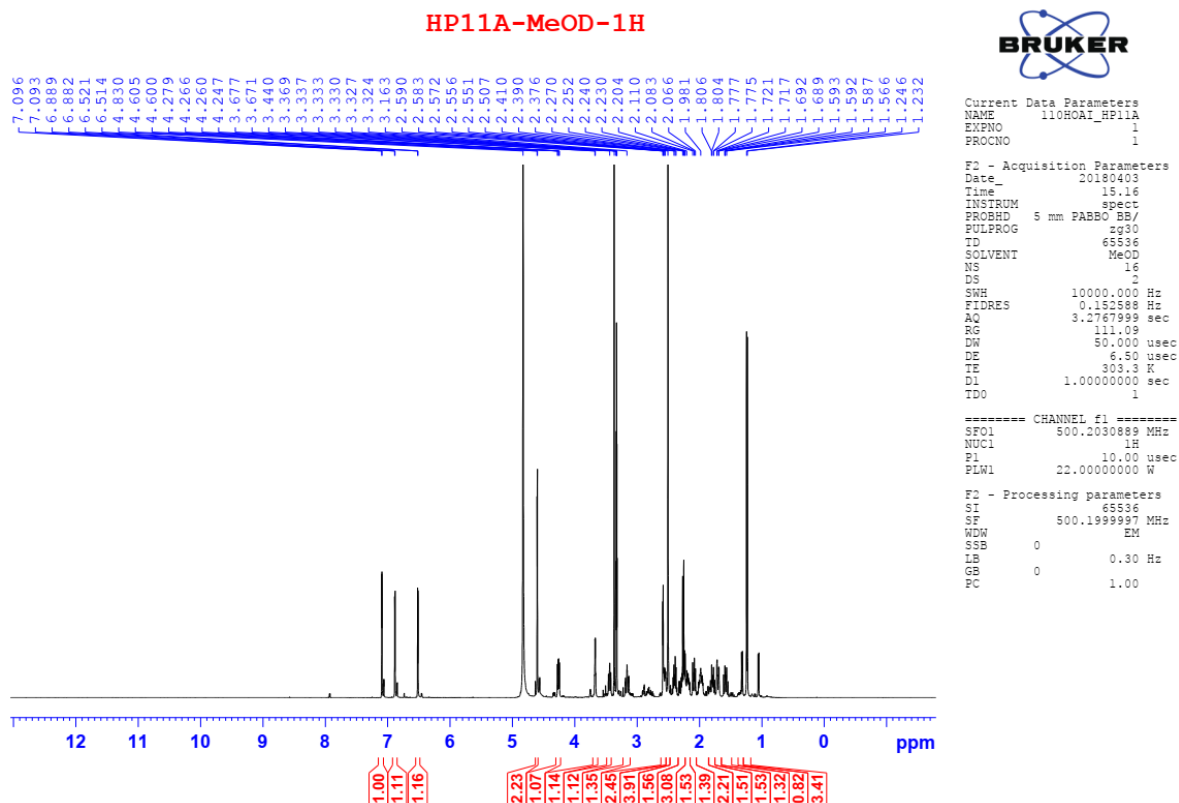
Instrument Properties
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
S/R Exchange: Normal

Phổ UV của hợp chất HP11A

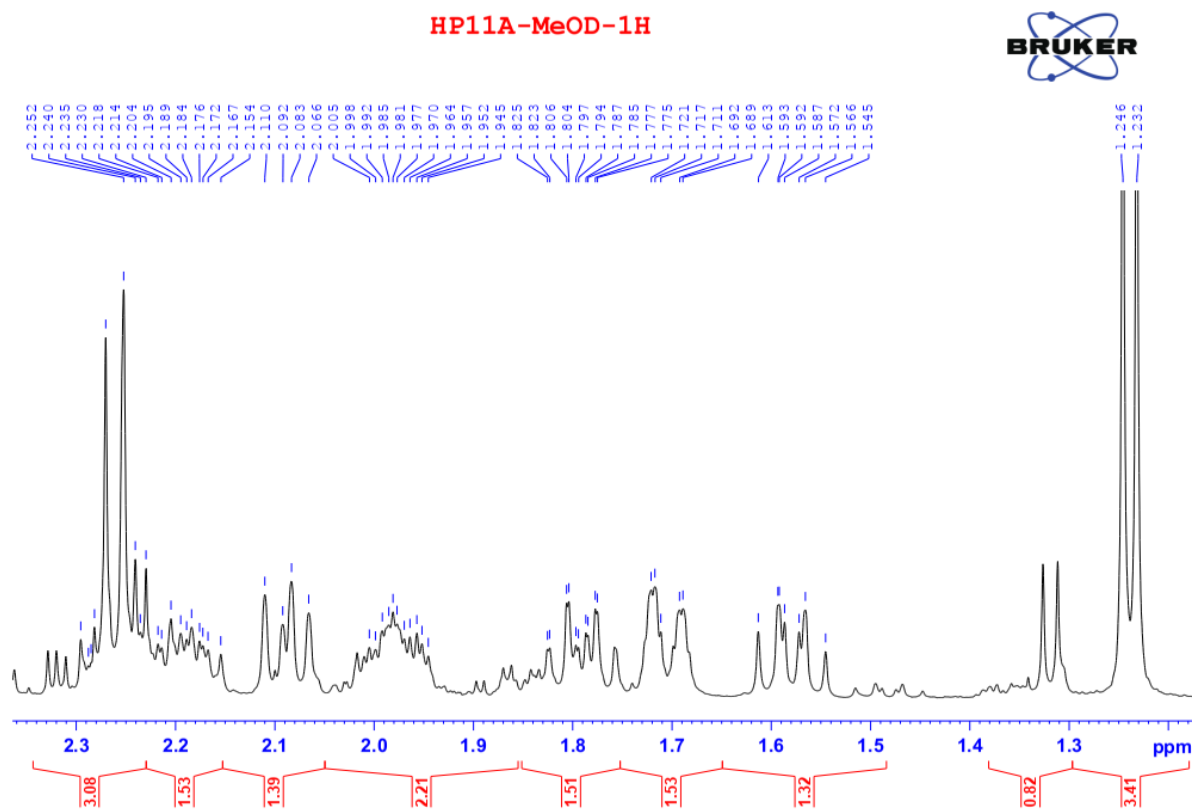
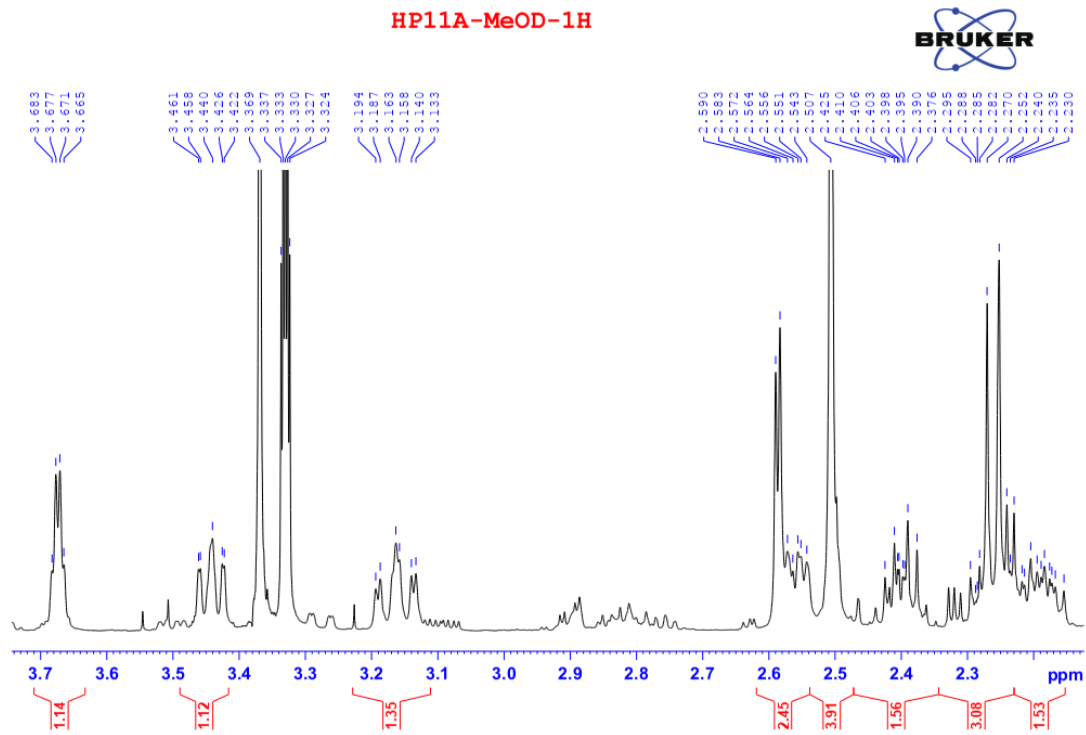


Sample name: HP11A
HP11A
Apodization; Resolution; No. of Scans;
Date/Time: 5/9/2018 12:51:12 PM
User: IR-Prestige

Phổ IR của hợp chất HP11A

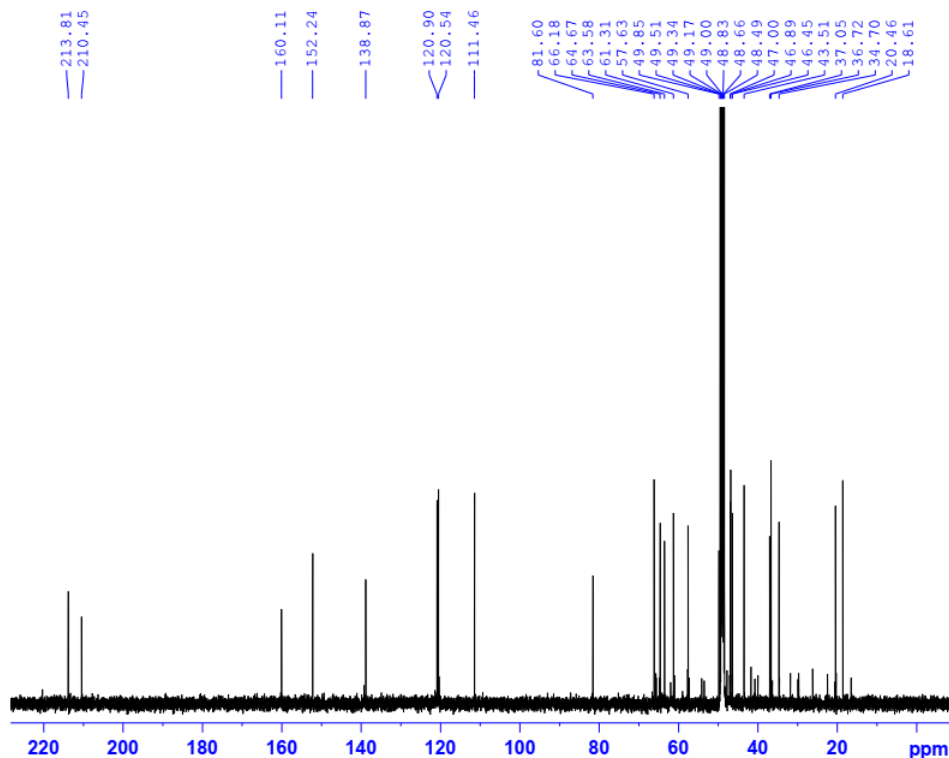


Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất HP11A



Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất HP11A

HP11A-MeOD-C13CPD



Current Data Parameters
 NAME 110H0AR_HP11A
 EXPNO 2
 PROCNO 1

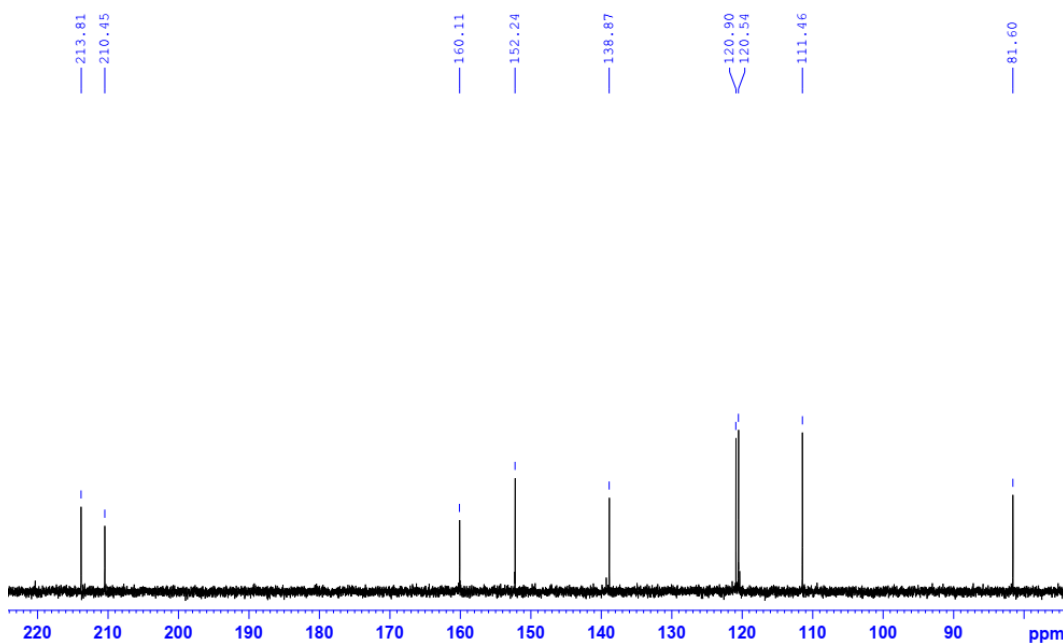
F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20180403
 Time 17.30
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zgpg30
 TD 65536
 SOLVENT MeOD
 NS 1024
 DS 4
 SWH 31250.000 Hz
 FIDRES 0.476637 Hz
 AQ 1.0488760 sec
 RG 198.57
 DW 16.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 302.8 K
 D1 2.00000000 sec
 D11 0.03000000 sec
 TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
 SF01 125.7892253 MHz
 NUC1 13C
 P1 10.00 usec
 PLW1 88.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
 SF02 500.2020008 MHz
 NUC2 1H
 CPDPRG12 waltz16
 PCPD1 80.00 usec
 PLW2 22.00000000 W
 PLW12 0.34375000 W
 PLW13 0.22000000 W

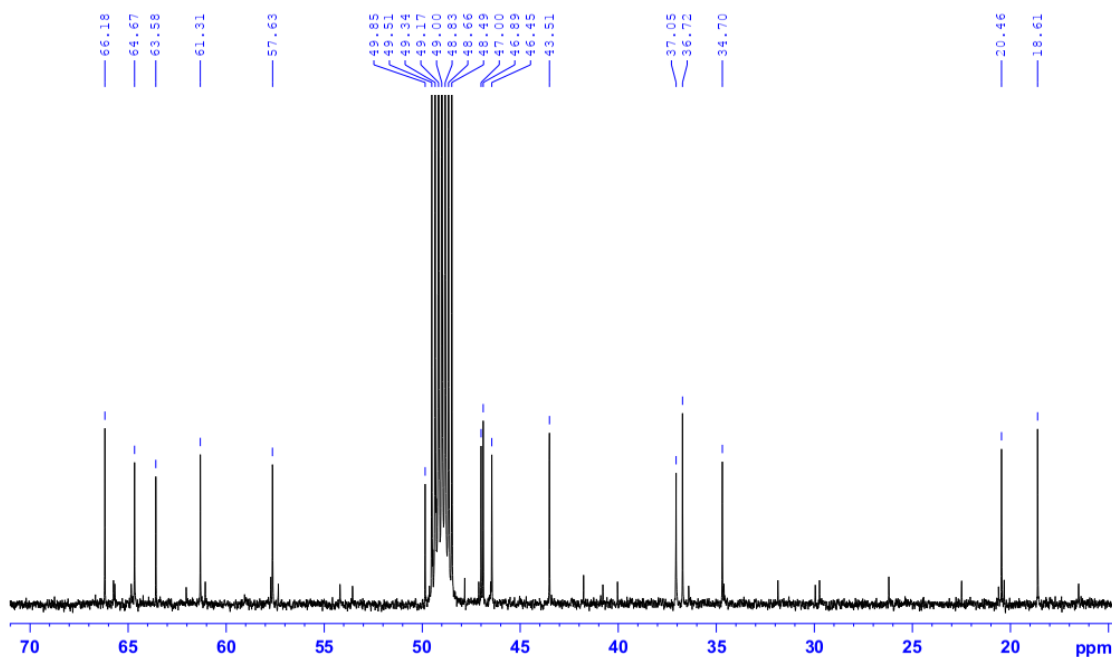
F2 - Processing parameters
 SI 32768
 SF 125.7752142 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 GB 0
 PC 1.40

HP11A-MeOD-C13CPD

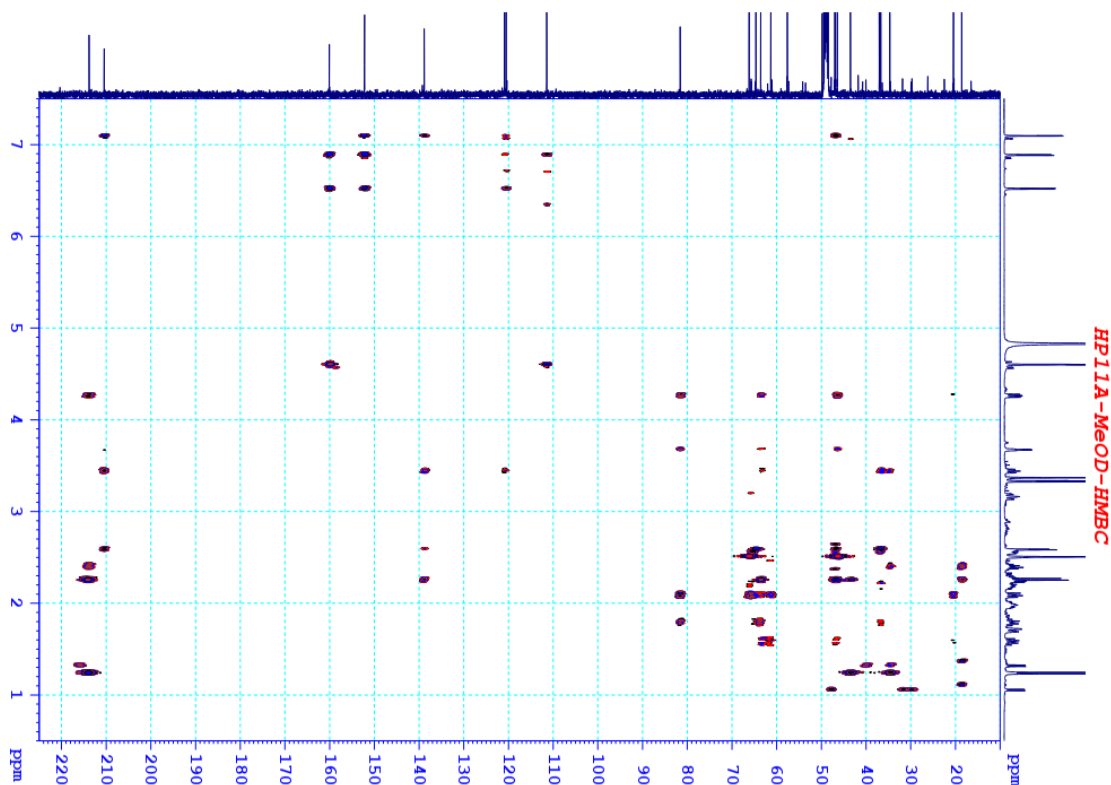


Phổ Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HP11A

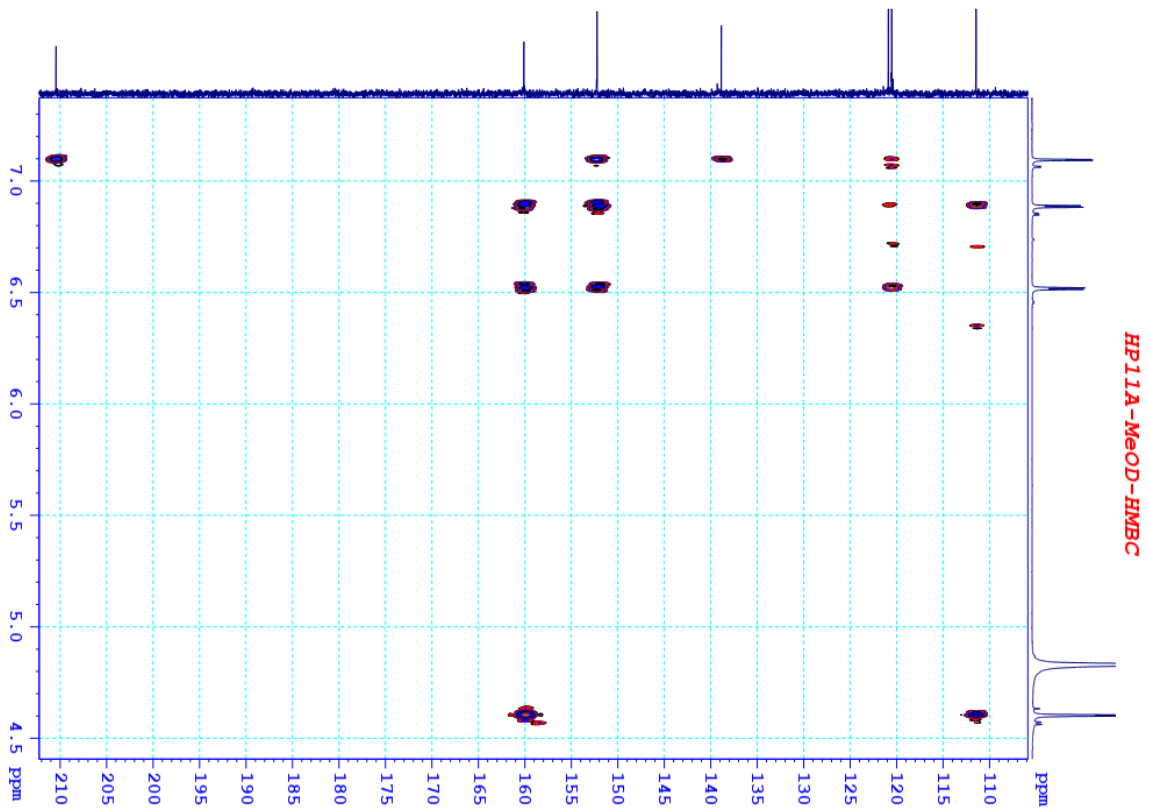
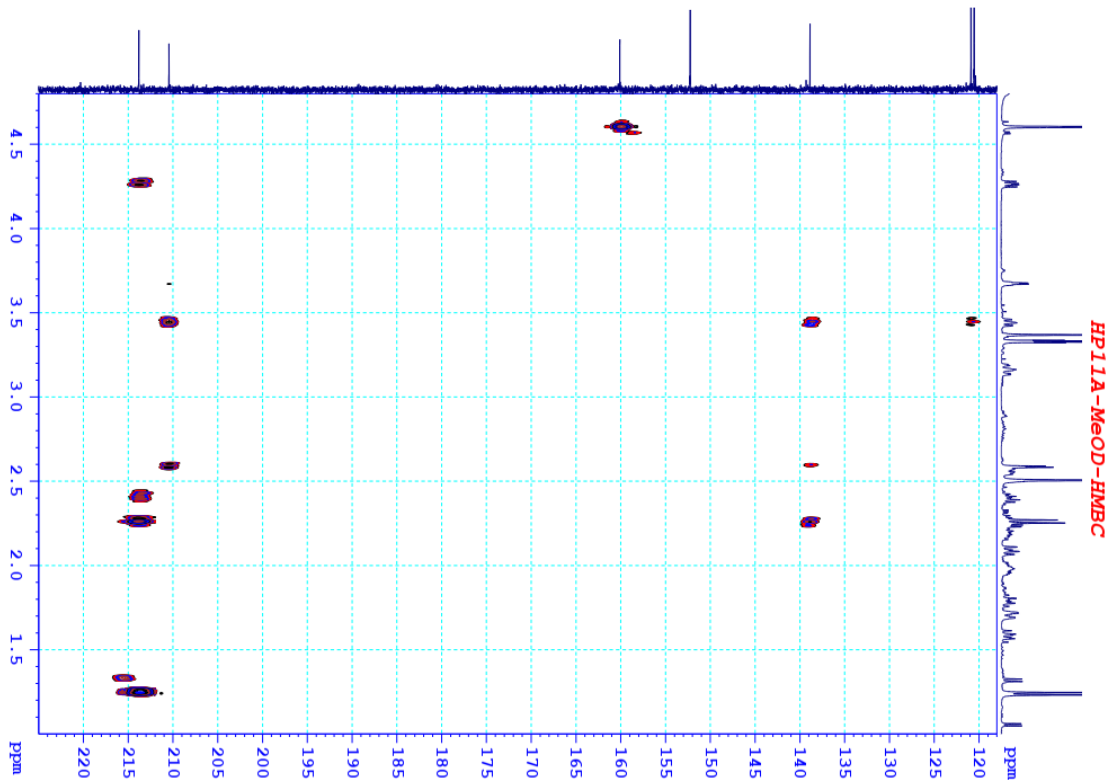
HP11A-MeOD-C13CPD



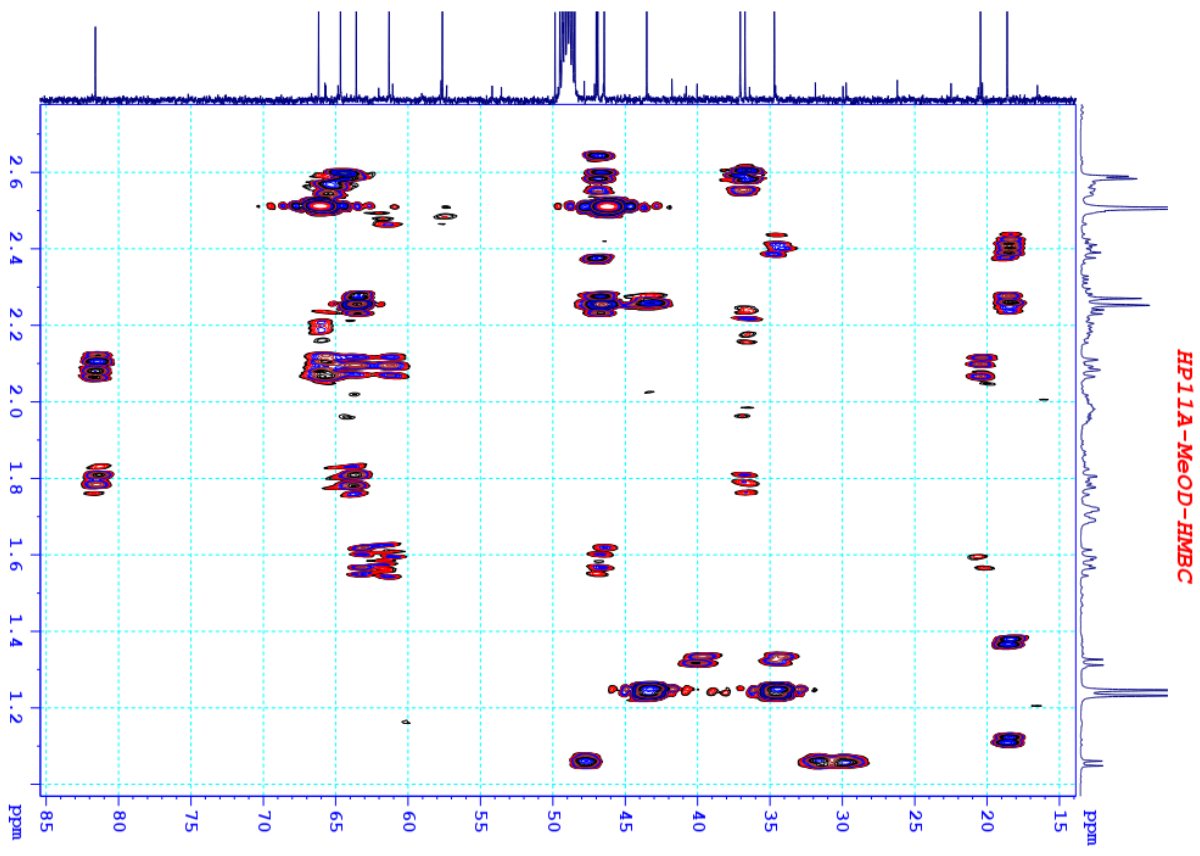
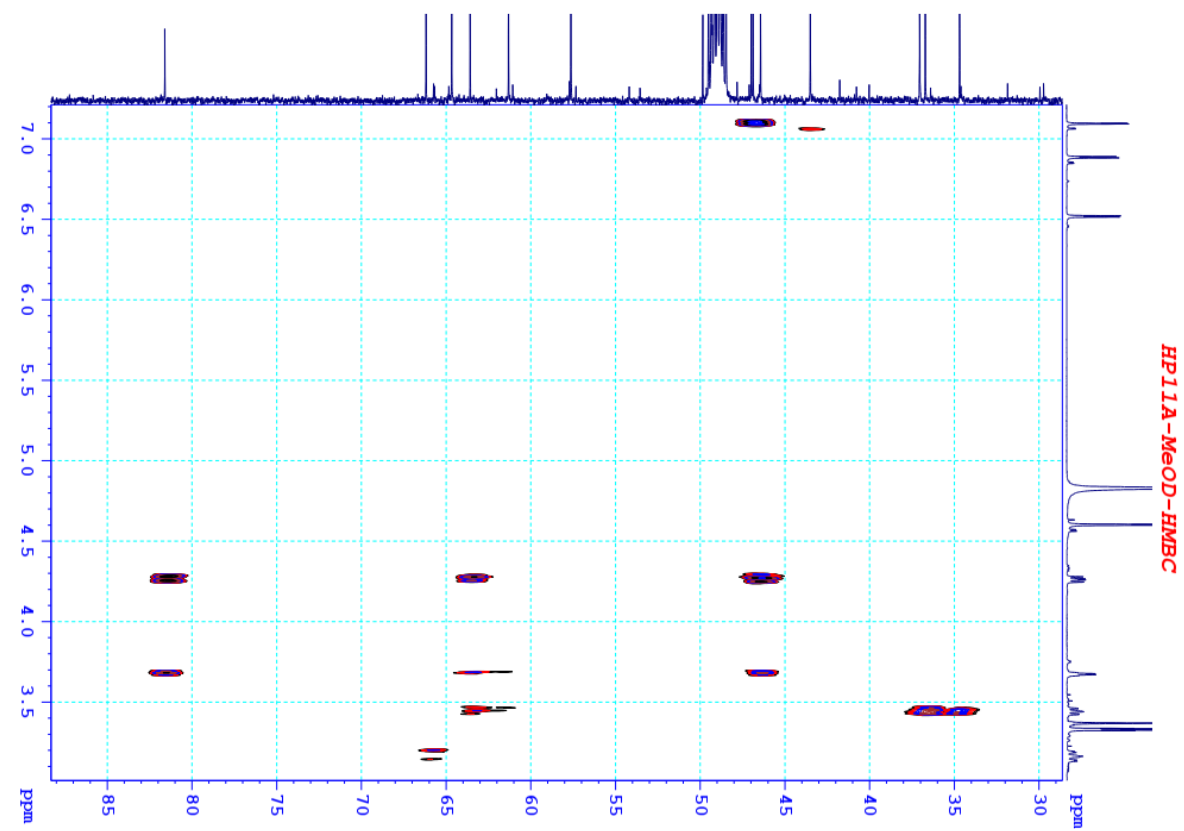
Phổ Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất HP11A



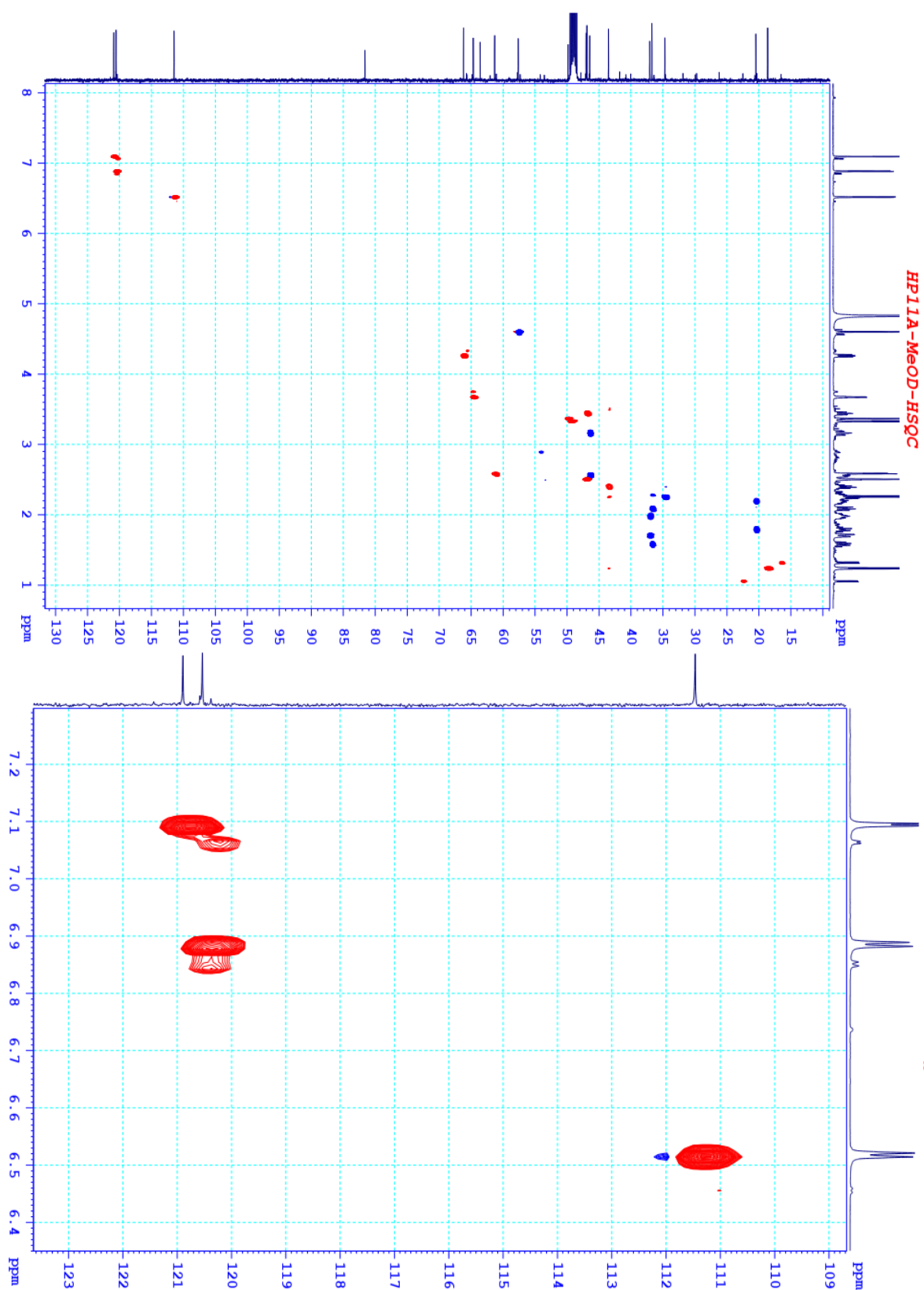
Phổ HMBC của hợp chất HP11A



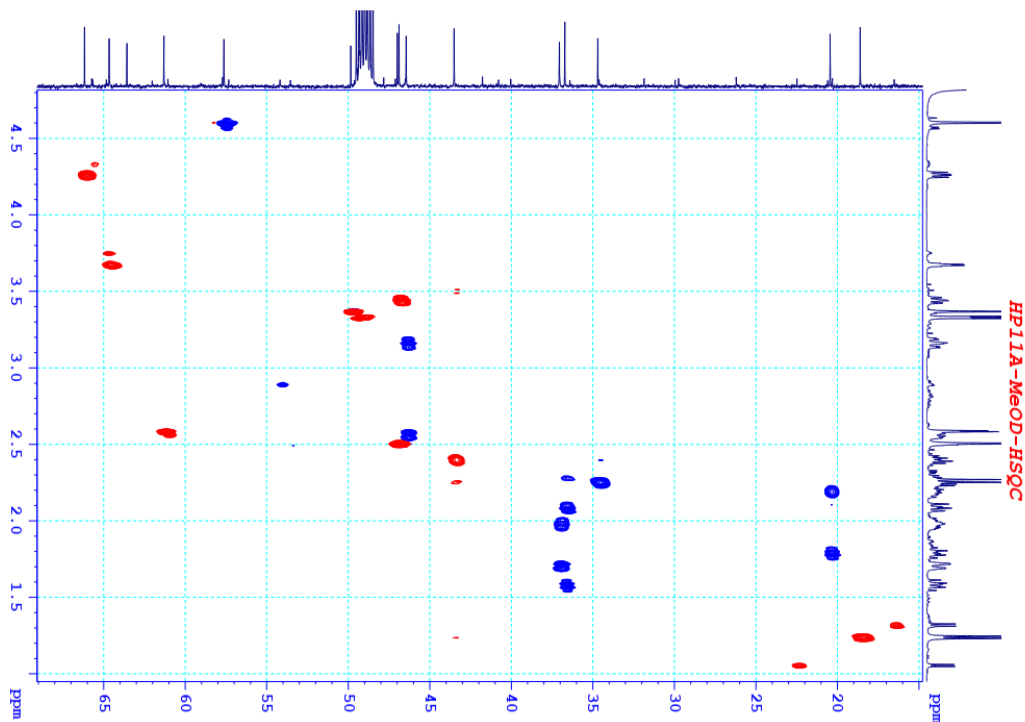
Phổ HMBC của hợp chất HP11A



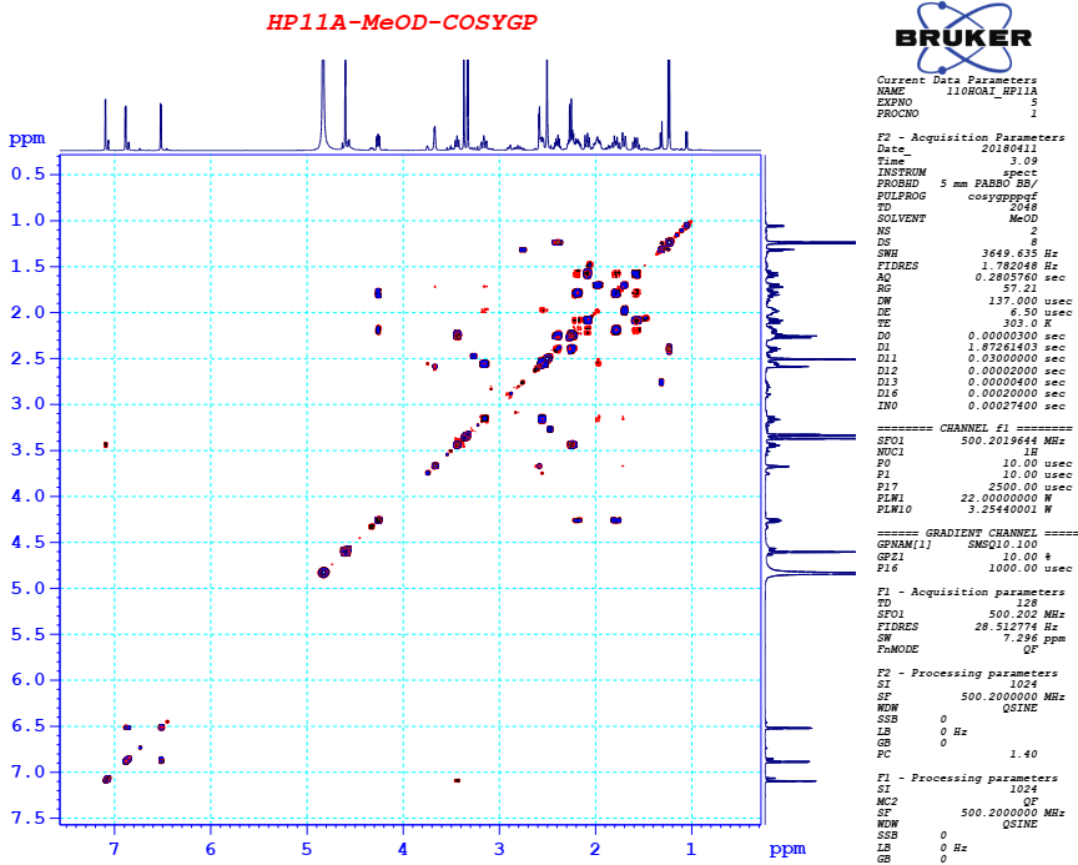
Phổ HMBC của hợp chất HP11A



Phổ HSQC của hợp chất HP11A

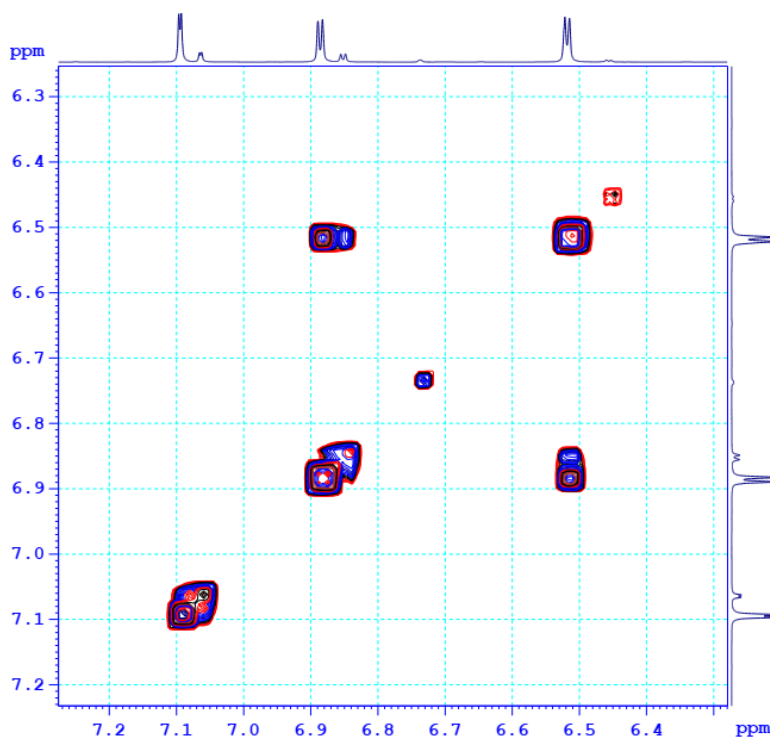


Phổ HSQC của hợp chất HP11A



Phổ COSY của hợp chất HP11A

HP11A-MeOD-COSYGP



```

Current Data Parameters
NAME      110HOAT_HP11A
EXPNO    5
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180411
Time     3.09
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  cosypppggf
TD        2048
SOLVENT  MeOD
NS        2
DS        8
SWH       3649.635 Hz
FIDRES    1.782048 Hz
AQ         0.2805760 sec
RG         57.21
DW         137.000 usec
DE         6.50 usec
TE         303.0 K
DO         0.0000300 sec
D1         1.87261403 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
INO        0.00027400 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      500.2019644 MHz
NUC1      1H
P0         10.00 usec
P1         10.00 usec
P17        2500.00 usec
PLW1      22.00000000 W
PLW10     3.25440001 W

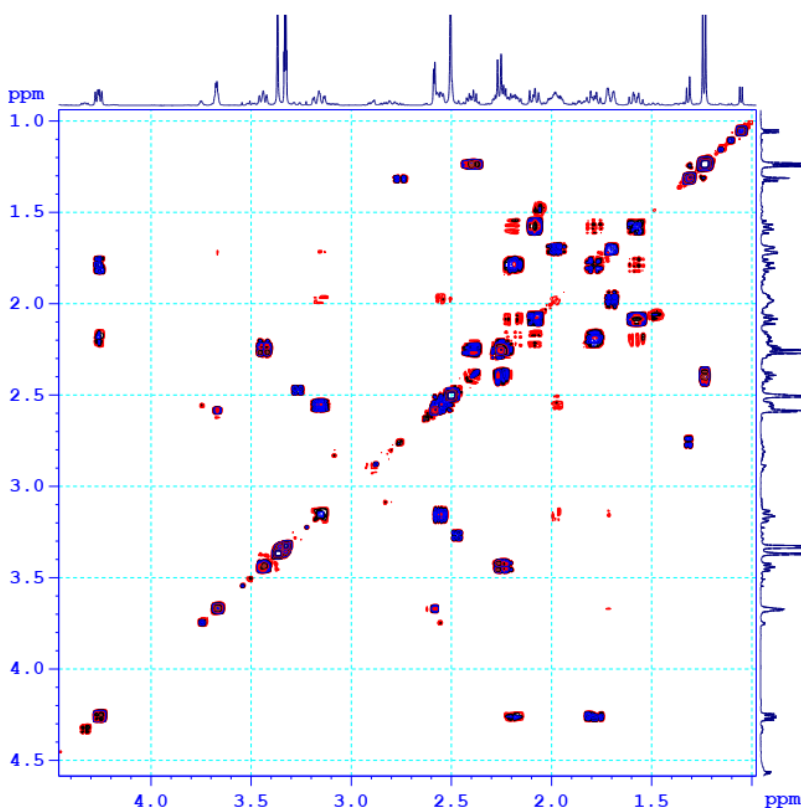
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM(1)  SMSQ10.100
GP21      10.00 %
P16        1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         128
SFO1       500.202 MHz
FIDRES     28.512774 Hz
SW         7.296 ppm
FnMODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         500.2000000 MHz
WDW        QSINE
SSB         0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         500.2000000 MHz
WDW        QSINE
SSB         0
LB         0 Hz
GB         0
    
```

HP11A-MeOD-COSYGP



```

Current Data Parameters
NAME      110HOAT_HP11A
EXPNO    5
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180411
Time     3.09
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  cosypppggf
TD        2048
SOLVENT  MeOD
NS        2
DS        8
SWH       3649.635 Hz
FIDRES    1.782048 Hz
AQ         0.2805760 sec
RG         57.21
DW         137.000 usec
DE         6.50 usec
TE         303.0 K
DO         0.0000300 sec
D1         1.87261403 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D13        0.00000400 sec
D16        0.00020000 sec
INO        0.00027400 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      500.2019644 MHz
NUC1      1H
P0         10.00 usec
P1         10.00 usec
P17        2500.00 usec
PLW1      22.00000000 W
PLW10     3.25440001 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM(1)  SMSQ10.100
GP21      10.00 %
P16        1000.00 usec

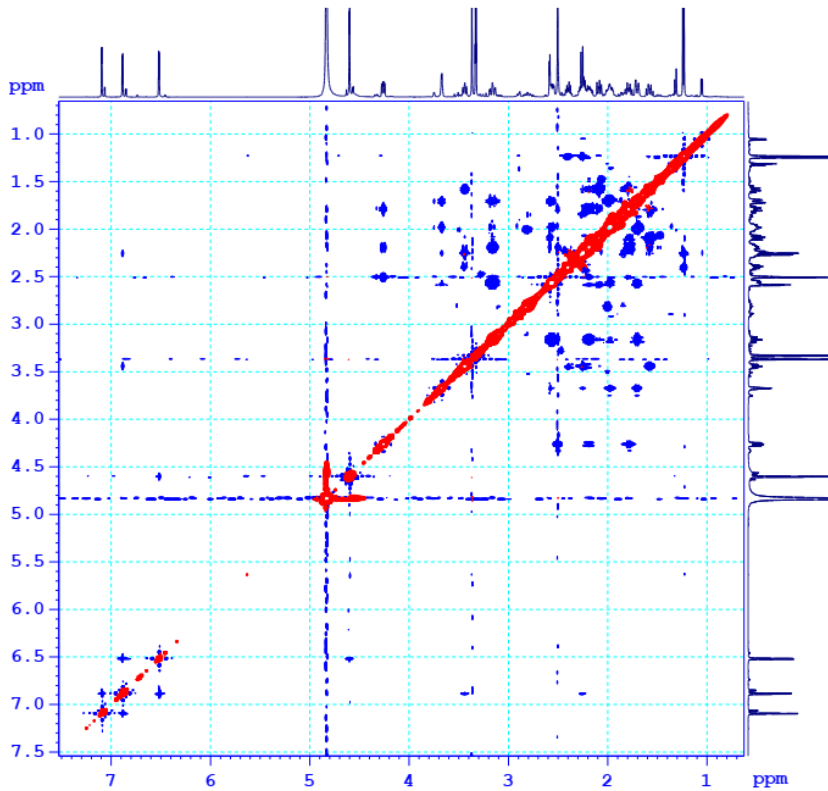
F1 - Acquisition parameters
TD         128
SFO1       500.202 MHz
FIDRES     28.512774 Hz
SW         7.296 ppm
FnMODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         500.2000000 MHz
WDW        QSINE
SSB         0
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.40

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        QF
SF         500.2000000 MHz
WDW        QSINE
SSB         0
LB         0 Hz
GB         0
    
```

Phổ COSY của hợp chất HP11A

HP11A-MeOD-NOESY



```

Current Data Parameters
NAME      110H0A1_HP11A
EXPNO    6
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180411
Time     3.21
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  noesypphpgp
TD       2048
SOLVENT  MeOD
NS       8
DS       32
SWH      3649.635 Hz
FIDRES   1.782048 Hz
AQ       0.2805760 sec
RG       57.21
DW       137.000 usec
DE       6.50 usec
TE       303.0 K
D0       0.00012427 sec
D1       1.9242402 sec
D8       0.30000001 sec
D11      0.03000000 sec
D12      0.00020000 sec
D16      0.00020000 sec
INO      0.00027400 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1     500.2019644 MHz
NUC1     1H
P1       10.00 usec
P2       20.00 usec
P17      2500.00 usec
PLW1     22.00000000 W
PLW10    3.25440001 W

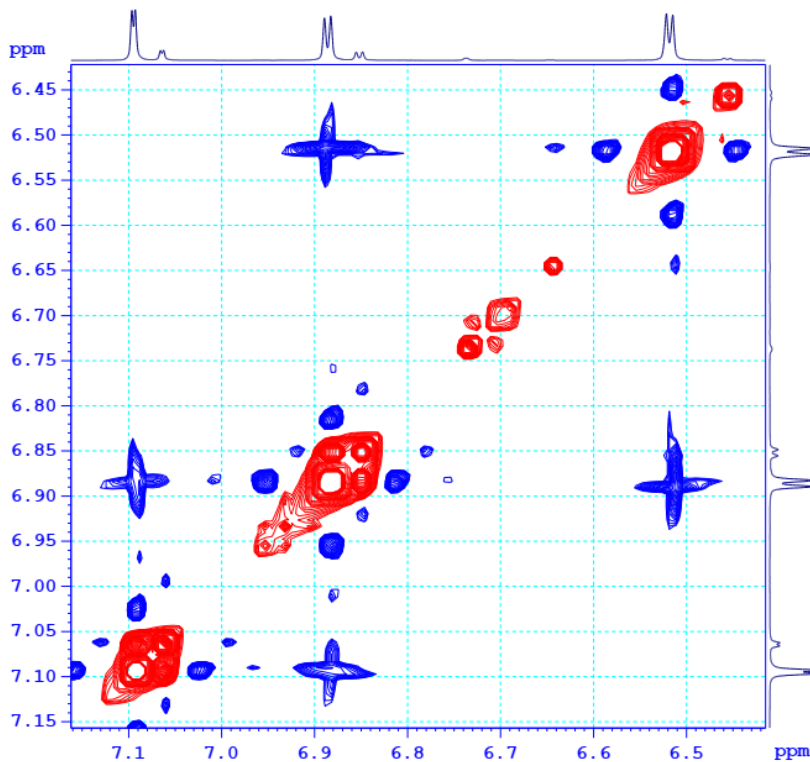
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1] SMSQ10.100
GP21     40.00 %
P16      1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD       256
SFO1     500.202 MHz
FIDRES   28.512774 Hz
SW       7.296 ppm
FhMODE   States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI       1024
SF       500.1999996 MHz
WDW      QSINE
SSB      2
LB       0 Hz
GB       0
PC       1.00

F1 - Processing parameters
SI       1024
MC2      States-TPPI
SF       500.1999995 MHz
WDW      QSINE
SSB      2
LB       0 Hz
GB       0
    
```

HP11A-MeOD-NOESY



```

Current Data Parameters
NAME      110H0A1_HP11A
EXPNO    6
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180411
Time     3.21
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  noesypphpgp
TD       2048
SOLVENT  MeOD
NS       8
DS       32
SWH      3649.635 Hz
FIDRES   1.782048 Hz
AQ       0.2805760 sec
RG       57.21
DW       137.000 usec
DE       6.50 usec
TE       303.0 K
D0       0.00012427 sec
D1       1.9242402 sec
D8       0.30000001 sec
D11      0.03000000 sec
D12      0.00020000 sec
D16      0.00020000 sec
INO      0.00027400 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1     500.2019644 MHz
NUC1     1H
P1       10.00 usec
P2       20.00 usec
P17      2500.00 usec
PLW1     22.00000000 W
PLW10    3.25440001 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1] SMSQ10.100
GP21     40.00 %
P16      1000.00 usec

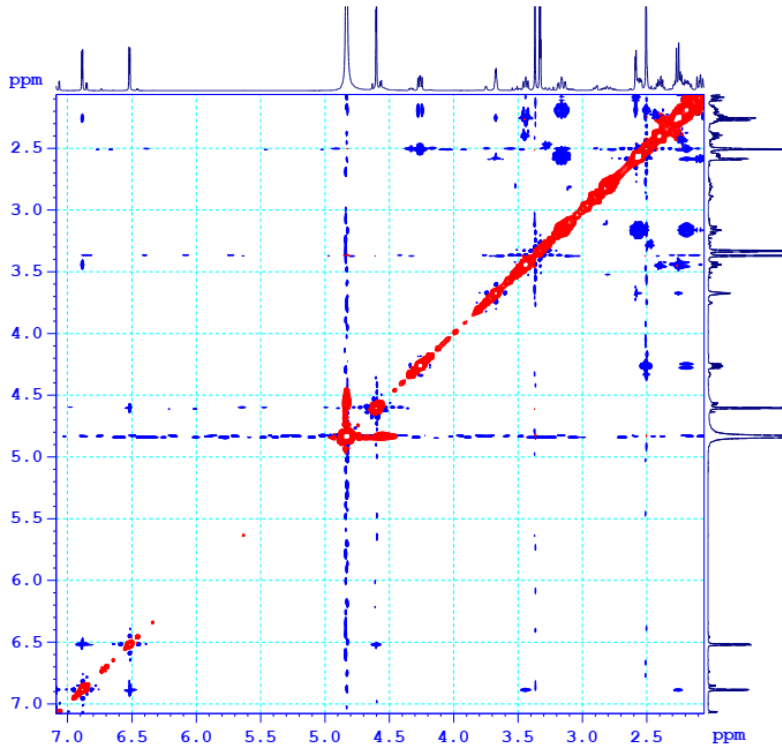
F1 - Acquisition parameters
TD       256
SFO1     500.202 MHz
FIDRES   28.512774 Hz
SW       7.296 ppm
FhMODE   States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI       1024
SF       500.1999996 MHz
WDW      QSINE
SSB      2
LB       0 Hz
GB       0
PC       1.00

F1 - Processing parameters
SI       1024
MC2      States-TPPI
SF       500.1999995 MHz
WDW      QSINE
SSB      2
LB       0 Hz
GB       0
    
```

Phổ NOESY của hợp chất HP11A

HP11A-MeOD-NOESY



```

Current Data Parameters
NAME      11080A1_HP11A
EXPNO     6
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20180411
Time      3.21
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   noesypprog
TD         2048
SOLVENT   MeOD
NS         8
DS         32
SWH        3649.635 Hz
FIDRES     1.782048 Hz
AQ         0.2805760 sec
RG         57.21
DM         137.000 usec
DE         6.50 usec
TE         303.0 K
D0         0.0001227 sec
D1         1.92422402 sec
D8         0.30000001 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00020000 sec
D16        0.00020000 sec
IN0        0.00027400 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      500.2019644 MHz
NUC1      1H
P1         10.00 usec
P2         20.00 usec
P17        2500.00 usec
PLW1      22.00000000 W
PLW10     3.25440001 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPRAM[1] SMSQ10.100
GP21      40.00 %
P16       1000.00 usec

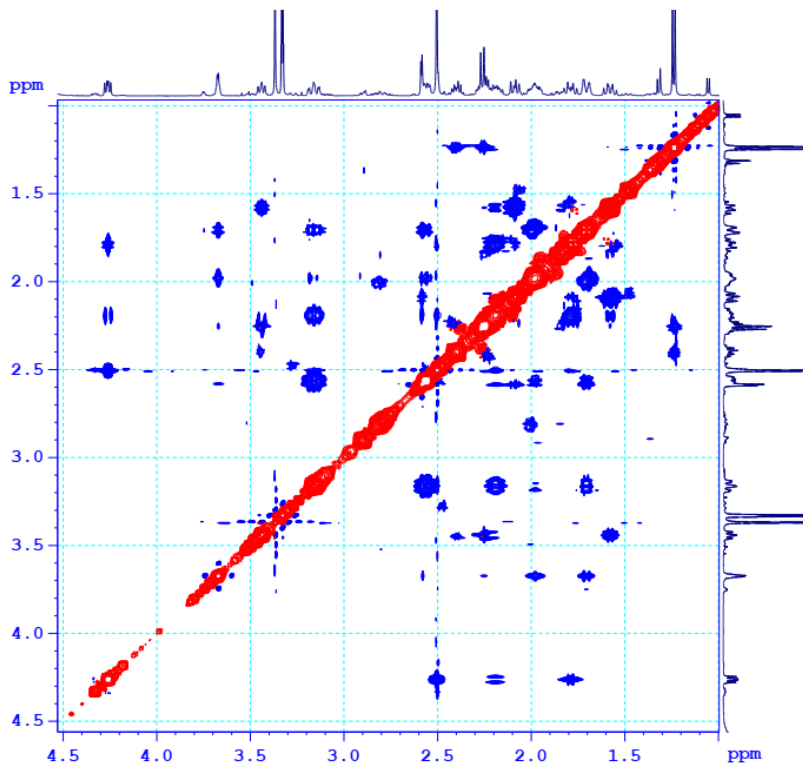
F1 - Acquisition parameters
TD         256
SFO1      500.202 MHz
FIDRES     28.512774 Hz
SW         7.296 ppm
FbMODE     States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         500.1999996 MHz
WDW        QSINE
SSB         2
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.00

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        States-TPPI
SF         500.1999996 MHz
WDW        QSINE
SSB         2
LB         0 Hz
GB         0

```

HP11A-MeOD-NOESY



```

Current Data Parameters
NAME      11080A1_HP11A
EXPNO     6
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20180411
Time      3.21
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   noesypprog
TD         2048
SOLVENT   MeOD
NS         8
DS         32
SWH        3649.635 Hz
FIDRES     1.782048 Hz
AQ         0.2805760 sec
RG         57.21
DM         137.000 usec
DE         6.50 usec
TE         303.0 K
D0         0.0001227 sec
D1         1.92422402 sec
D8         0.30000001 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00020000 sec
D16        0.00020000 sec
IN0        0.00027400 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      500.2019644 MHz
NUC1      1H
P1         10.00 usec
P2         20.00 usec
P17        2500.00 usec
PLW1      22.00000000 W
PLW10     3.25440001 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPRAM[1] SMSQ10.100
GP21      40.00 %
P16       1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         256
SFO1      500.202 MHz
FIDRES     28.512774 Hz
SW         7.296 ppm
FbMODE     States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         500.1999996 MHz
WDW        QSINE
SSB         2
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.00

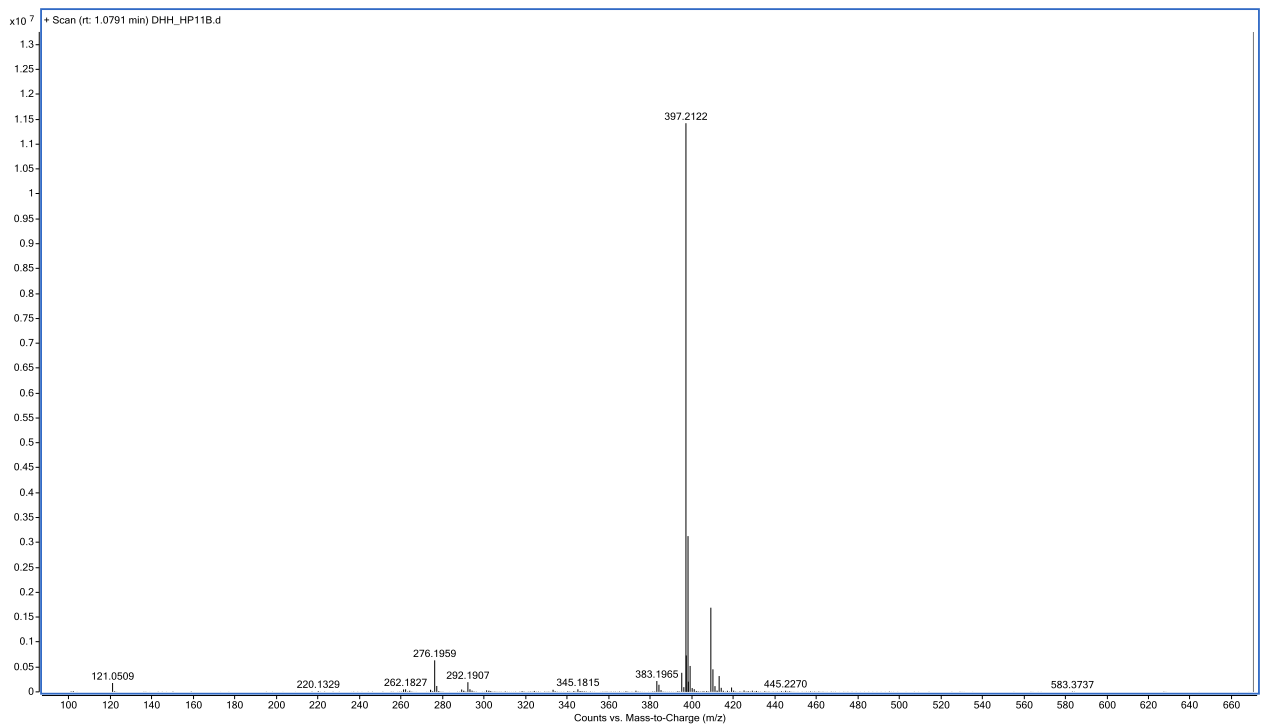
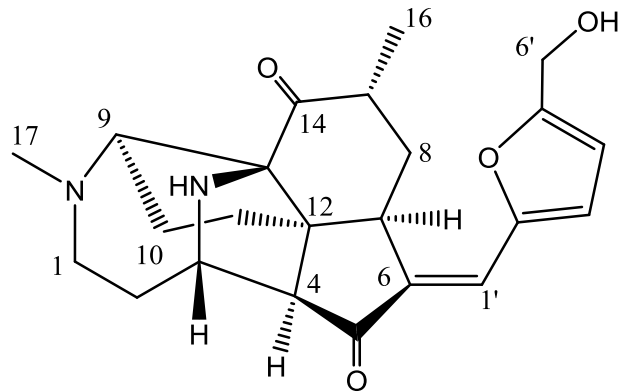
F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        States-TPPI
SF         500.1999996 MHz
WDW        QSINE
SSB         2
LB         0 Hz
GB         0

```

Phổ NOESY của hợp chất HP11A

Phụ lục 3.3. Phổ của hợp chất HP11B (Huperphlegmin B)

- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ UV
- Phổ IR
- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC
- Phổ COSY
- Phổ NOESY

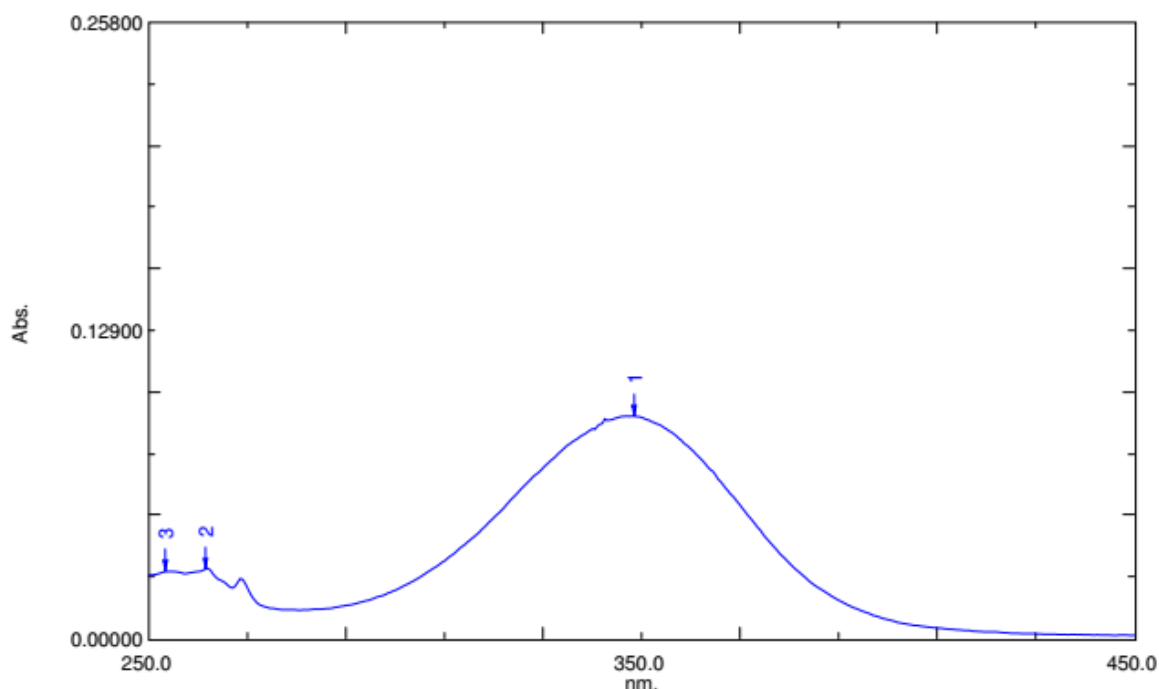


Phổ HR-ESI-MS của hợp chất HP11B

Spectrum Peak Pick Report

07/21/2018 03:43:12 PM

Data Set: HP 11B_153153.spc - RawData

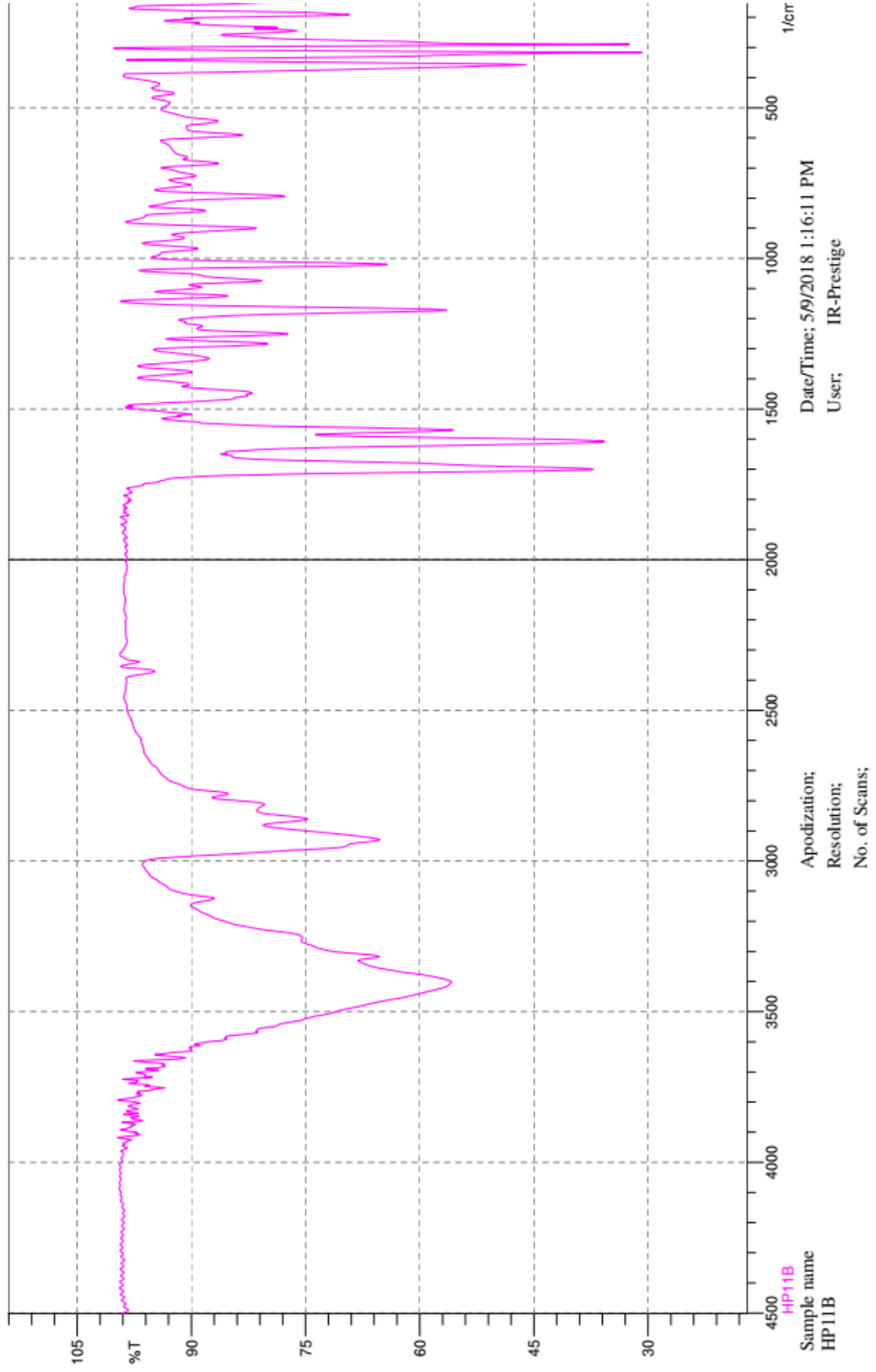


Measurement Properties
Wavelength Range (nm.): 190.0 to 700.0
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0.5
Auto Sampling Interval: Disabled
Scan Mode: Auto

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	①	348.5	0.09315	
2	②	261.5	0.02936	
3	③	253.5	0.02814	

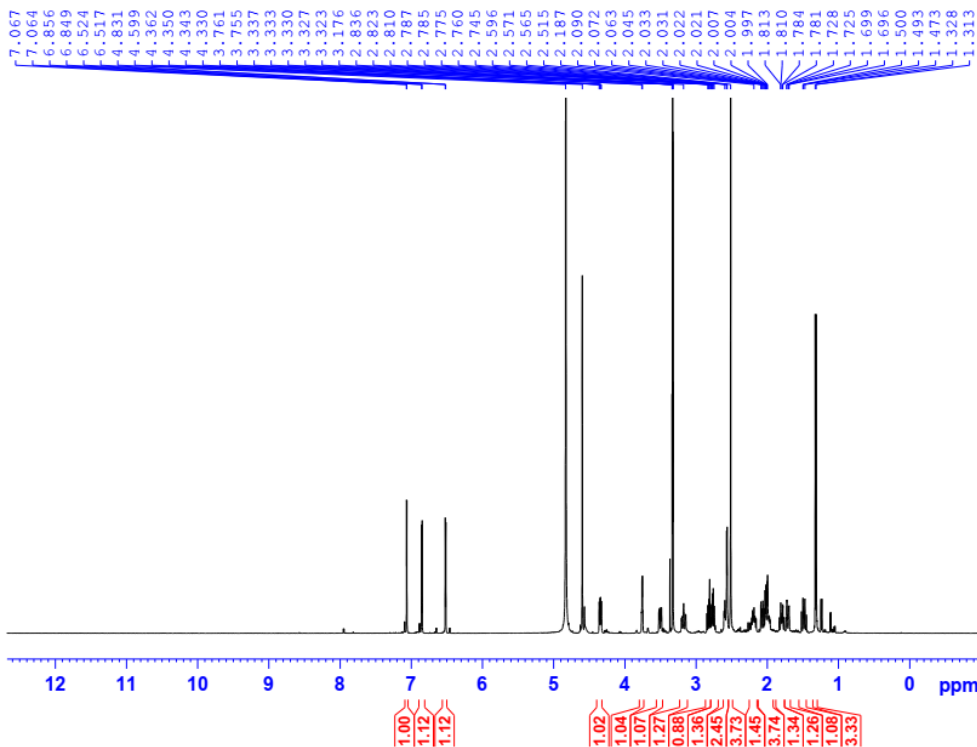
Instrument Properties
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
S/R Exchange: Normal

Phổ UV của hợp chất HP11B



Phổ IR của hợp chất HP11B

HP11B-MeOD-1H



```

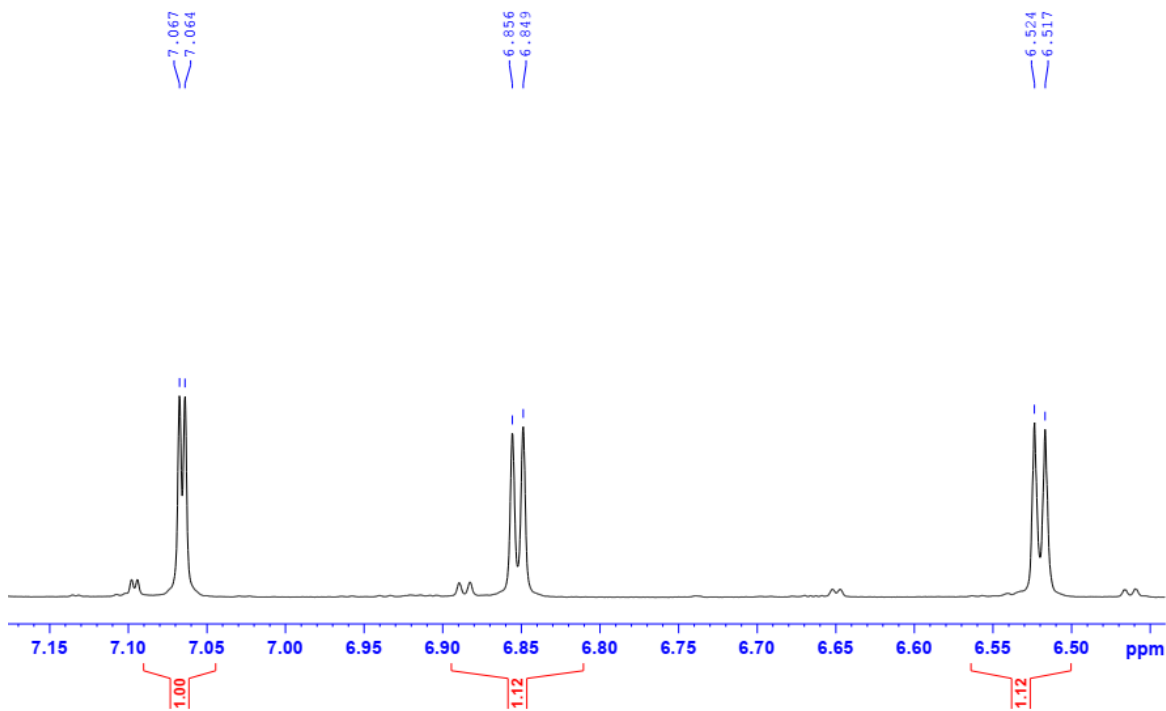
Current Data Parameters
NAME      110HOAI_HP11B
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180403
Time     15.20
INSTRUM spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG zg30
TD       65536
SOLVENT  MeOD
NS       16
DS       2
SWH      10000.000 Hz
FIDRES   0.152588 Hz
AQ       3.2787999 sec
RG       157.35
DE       50.000 usec
TE       303.2 K
D1       1.00000000 sec
TD0      1

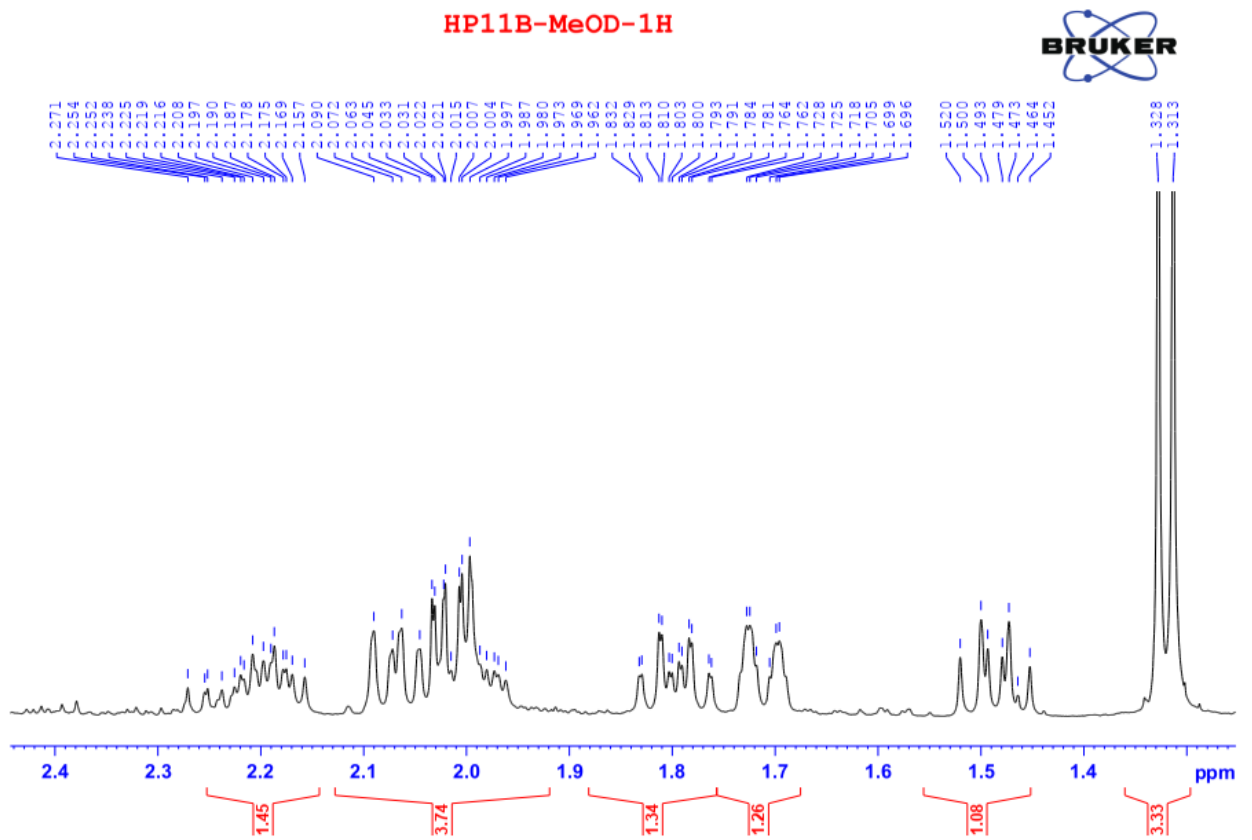
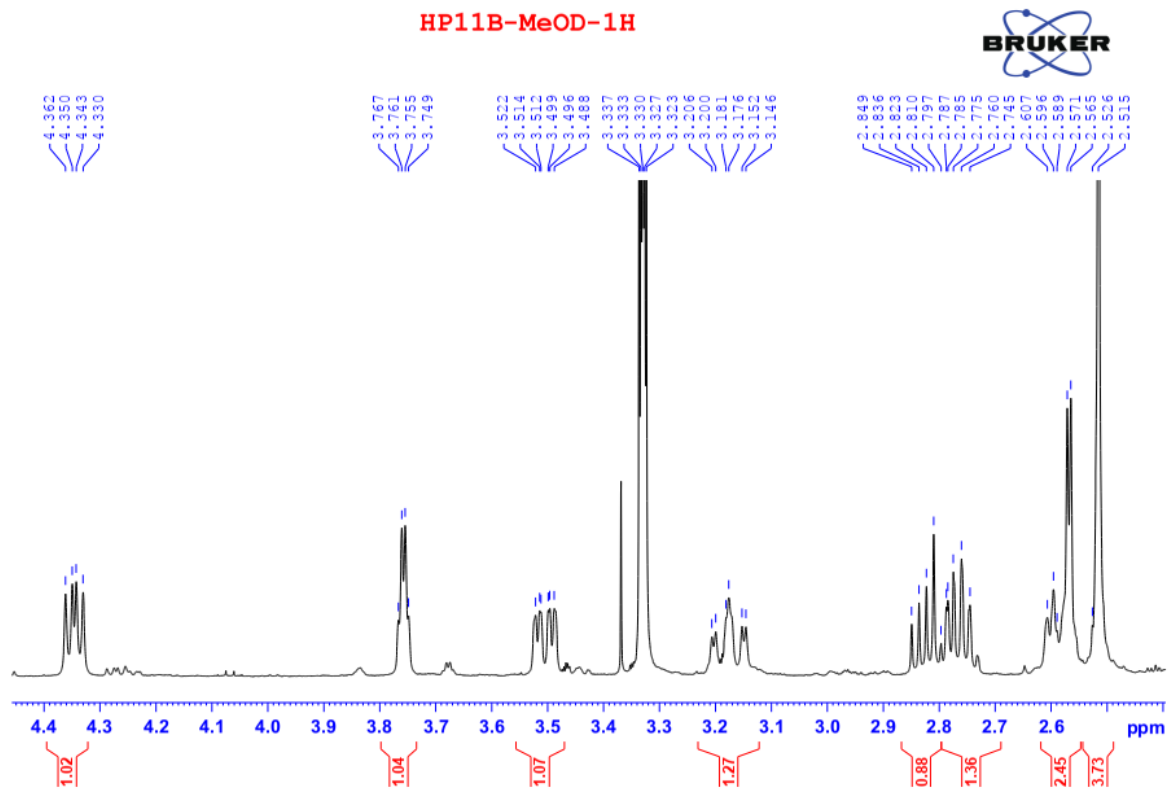
===== CHANNEL f1 =====
SF01     500.130889 MHz
NUC1     1H
P1       10.00 usec
PLW1     22.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI       65536
SF       500.130889 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.30 Hz
GB       0
PC       1.00
    
```

HP11B-MeOD-1H

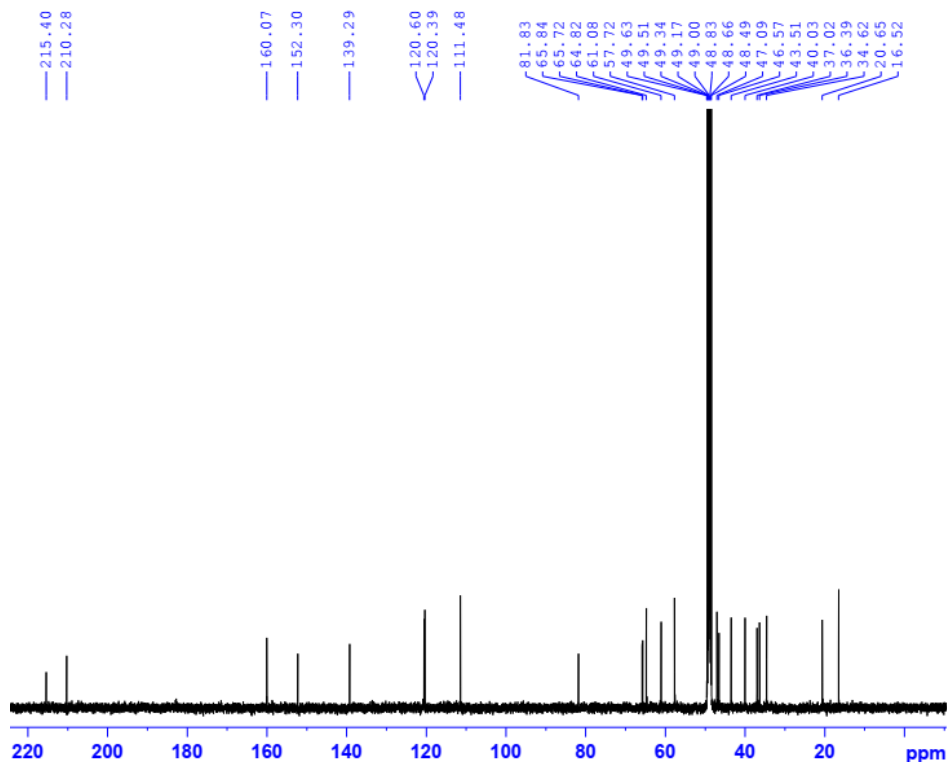


Phổ ^1H -NMR của hợp chất HP11B



Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất HP11B

HP11B-MeOD-C13CPD



```

Current Data Parameters
NAME      110HOAI_HP11B
EXPNO    1
PROCNO   1

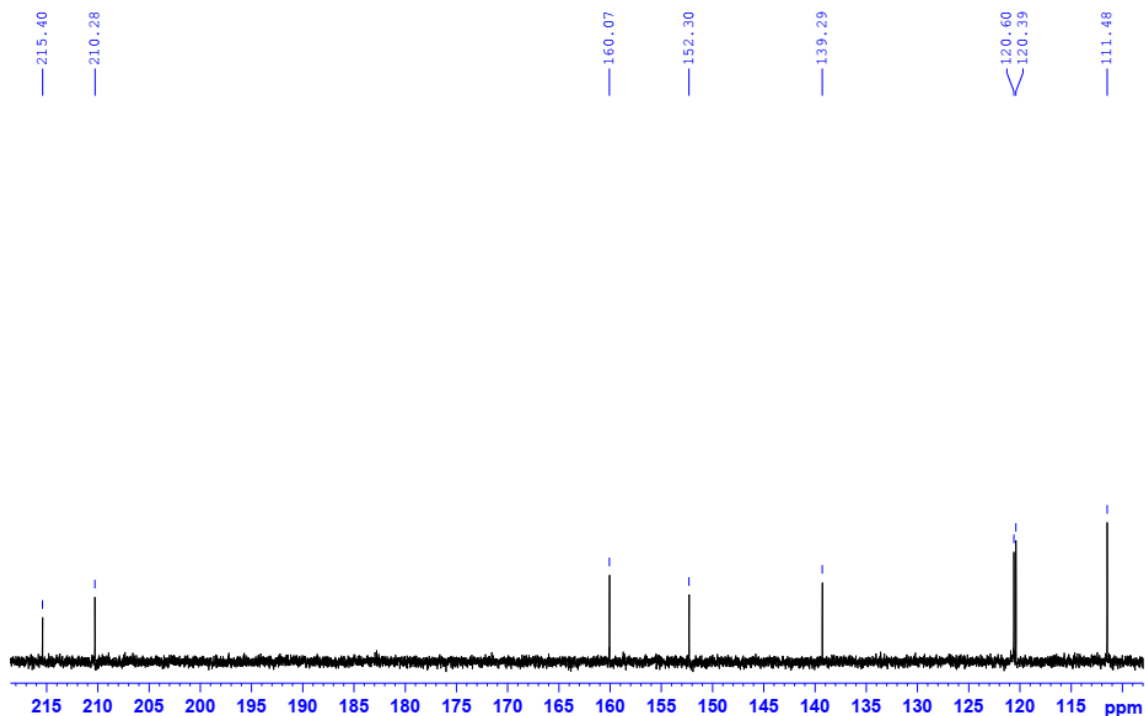
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180403
Time     19.28
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  MeOD
NS       2048
DS       4
SWH      31250.000 Hz
FIDRES   0.476837 Hz
AQ       1.0488760 sec
RG       199.57
DM       16.000 usec
DE       6.50 usec
TE       302.4 K
D1       2.00000000 sec
d11      0.03000000 sec
TDO      1

===== CHANNEL f1 =====
SFO1    125.7892333 MHz
NUC1     13C
P1      10.00 usec
PL1     88.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SFO2    500.2020008 MHz
NUC2     1H
CPDPRG2  waltz16
PCPD2    80.00 usec
PLM2    22.00000000 W
PLM12   0.24375000 W
PLM18   0.22000000 W

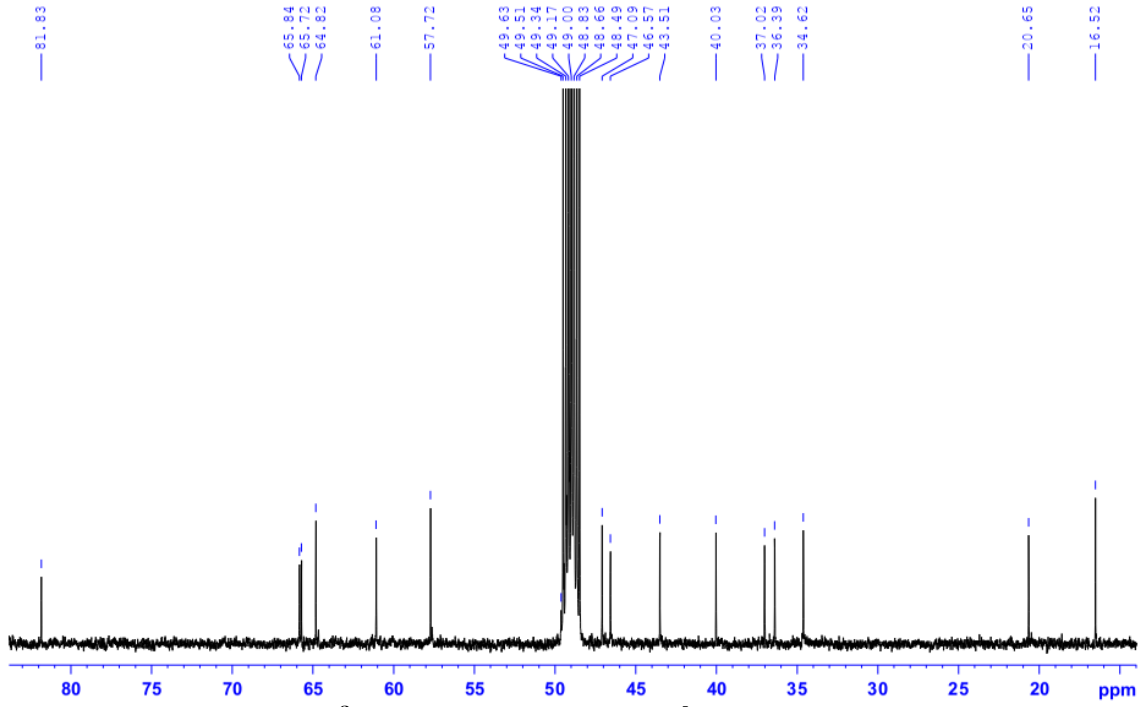
F2 - Processing parameters
SI      32768
SF      125.7752136 MHz
WDW     EM
SSB     0
LB      1.00 Hz
GB      0
PC      1.40
    
```

HP11B-MeOD-C13CPD

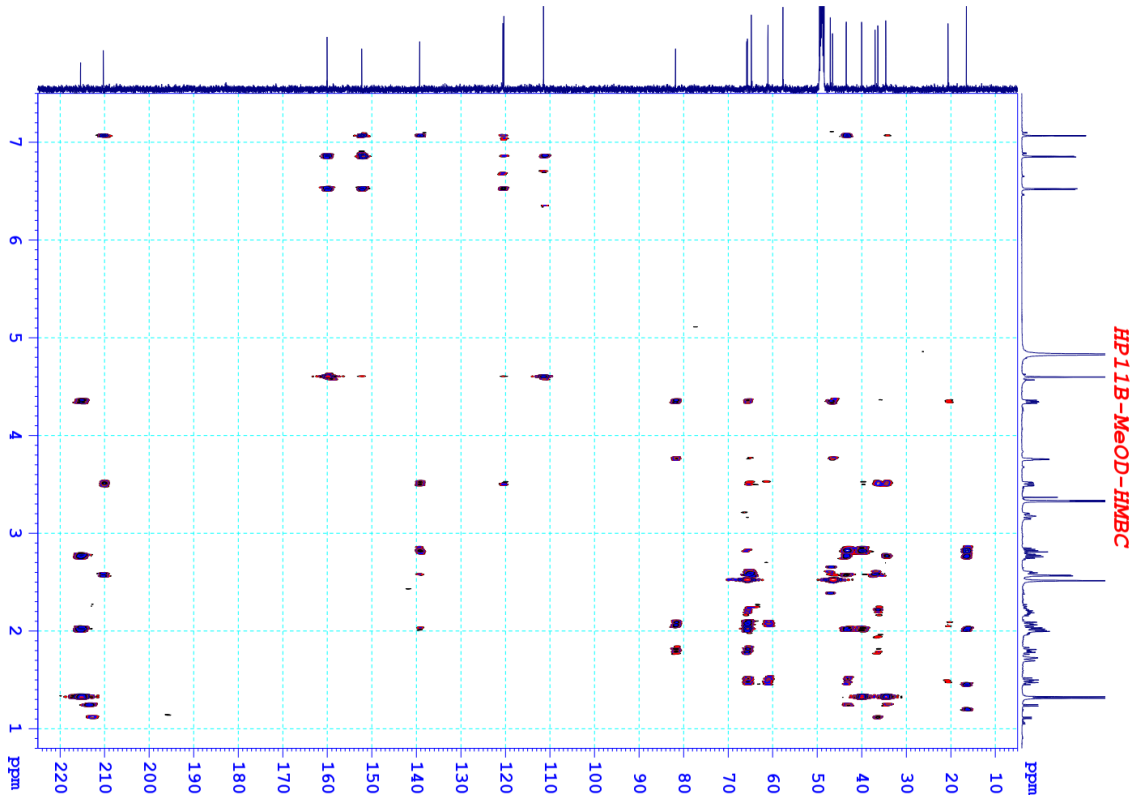


Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HP11B

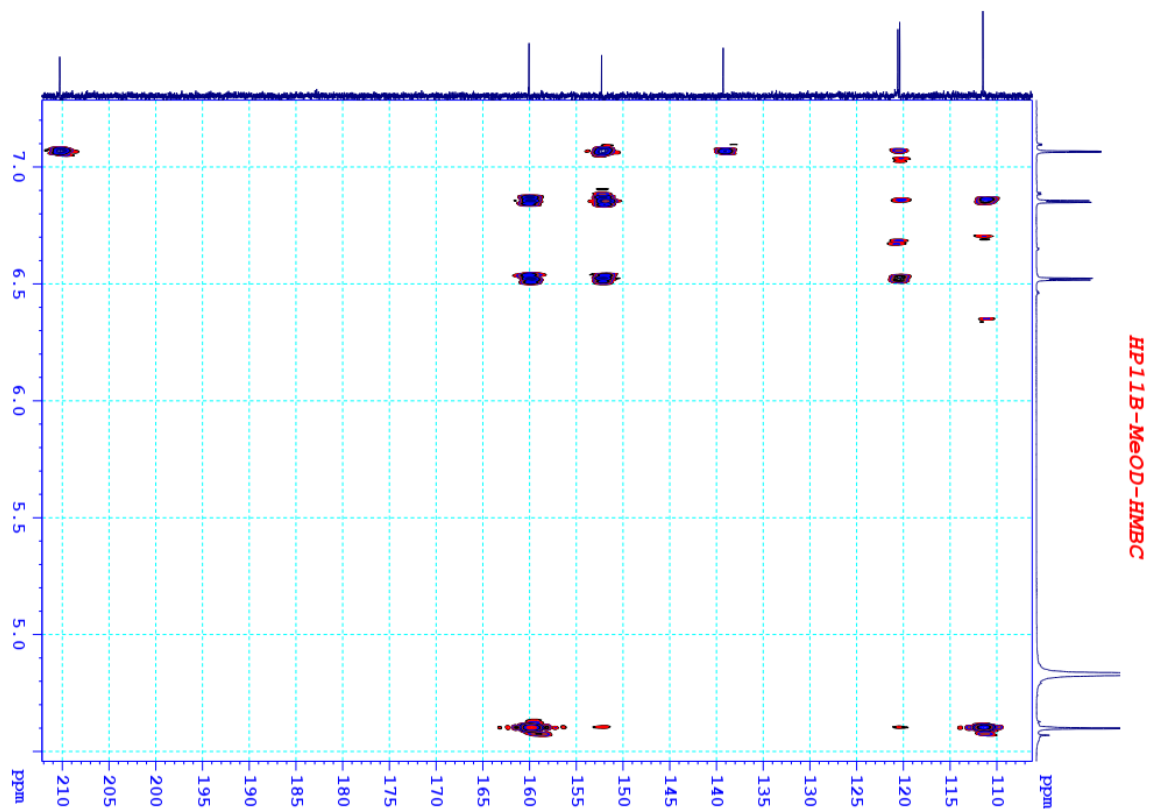
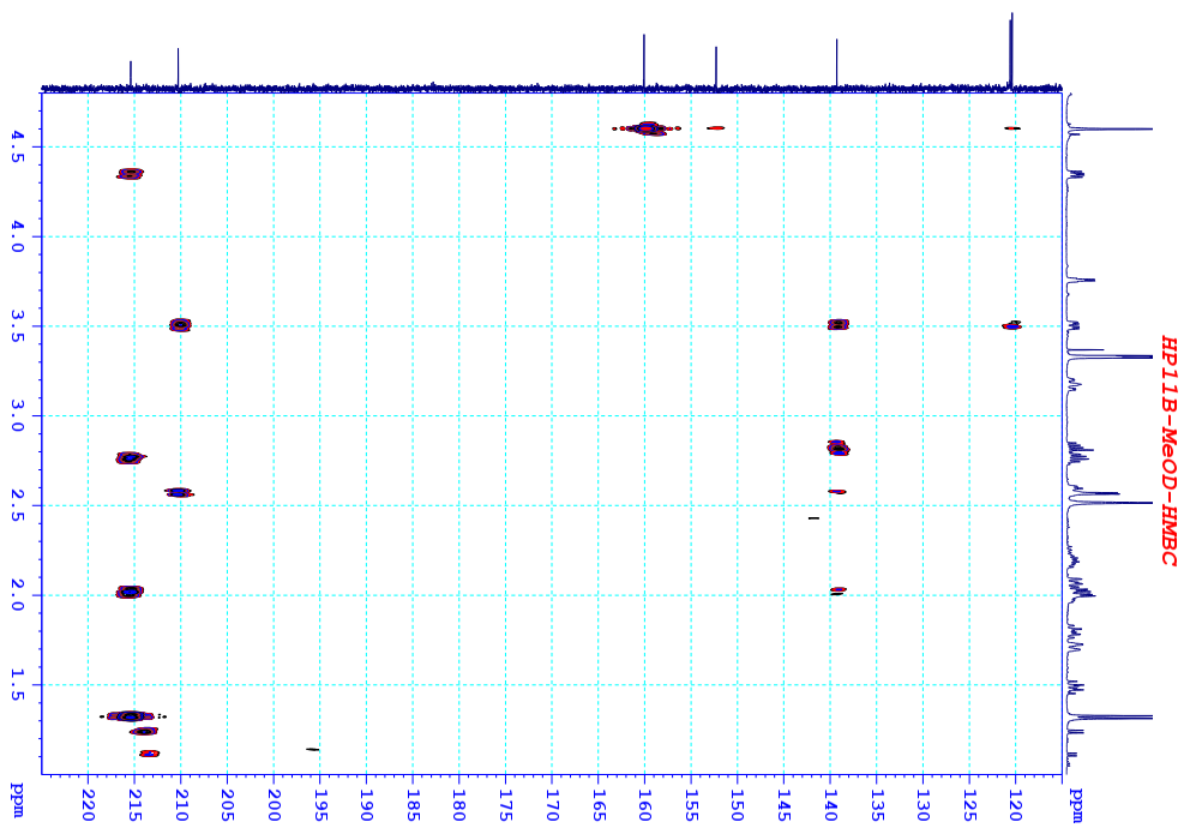
HP11B-MeOD-C13CPD



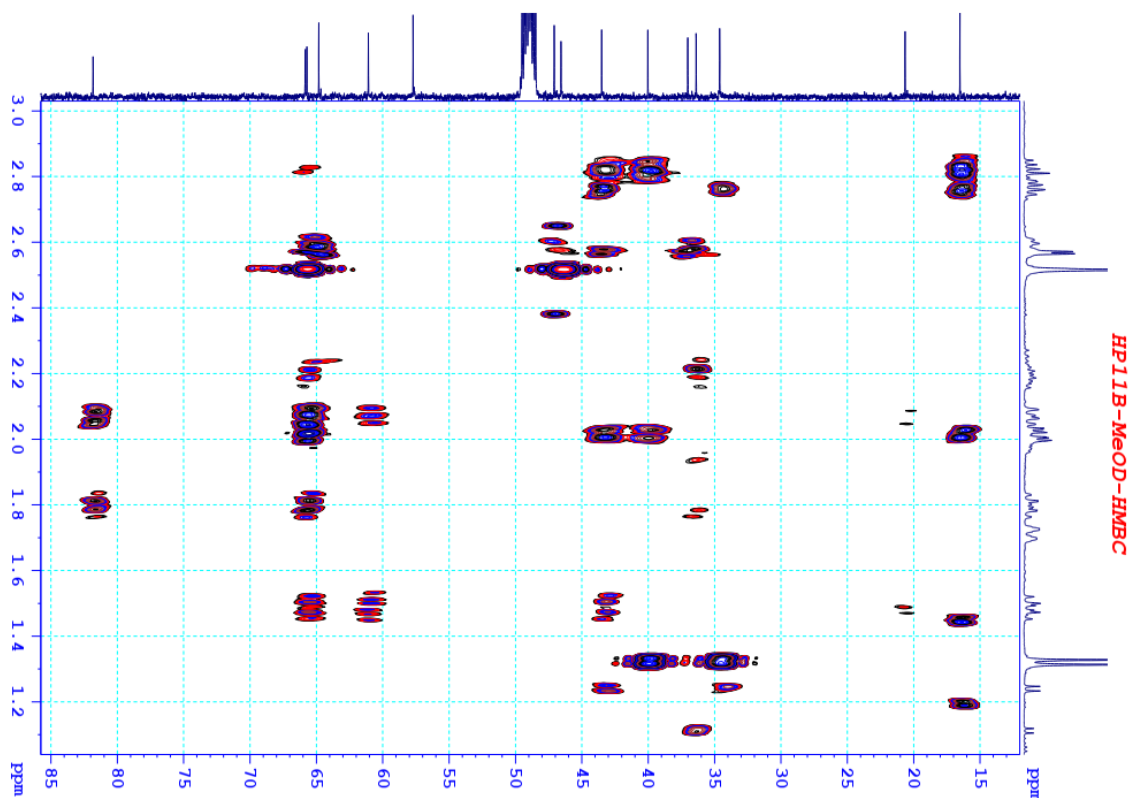
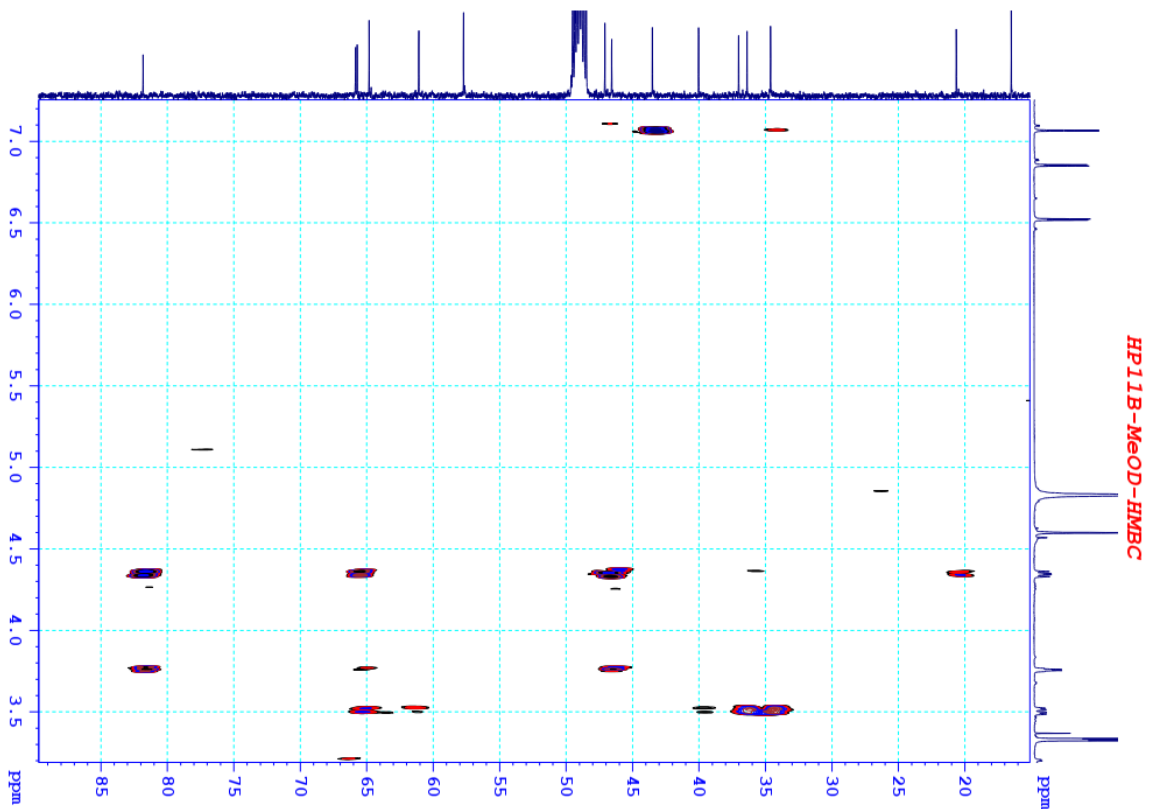
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất HP11B



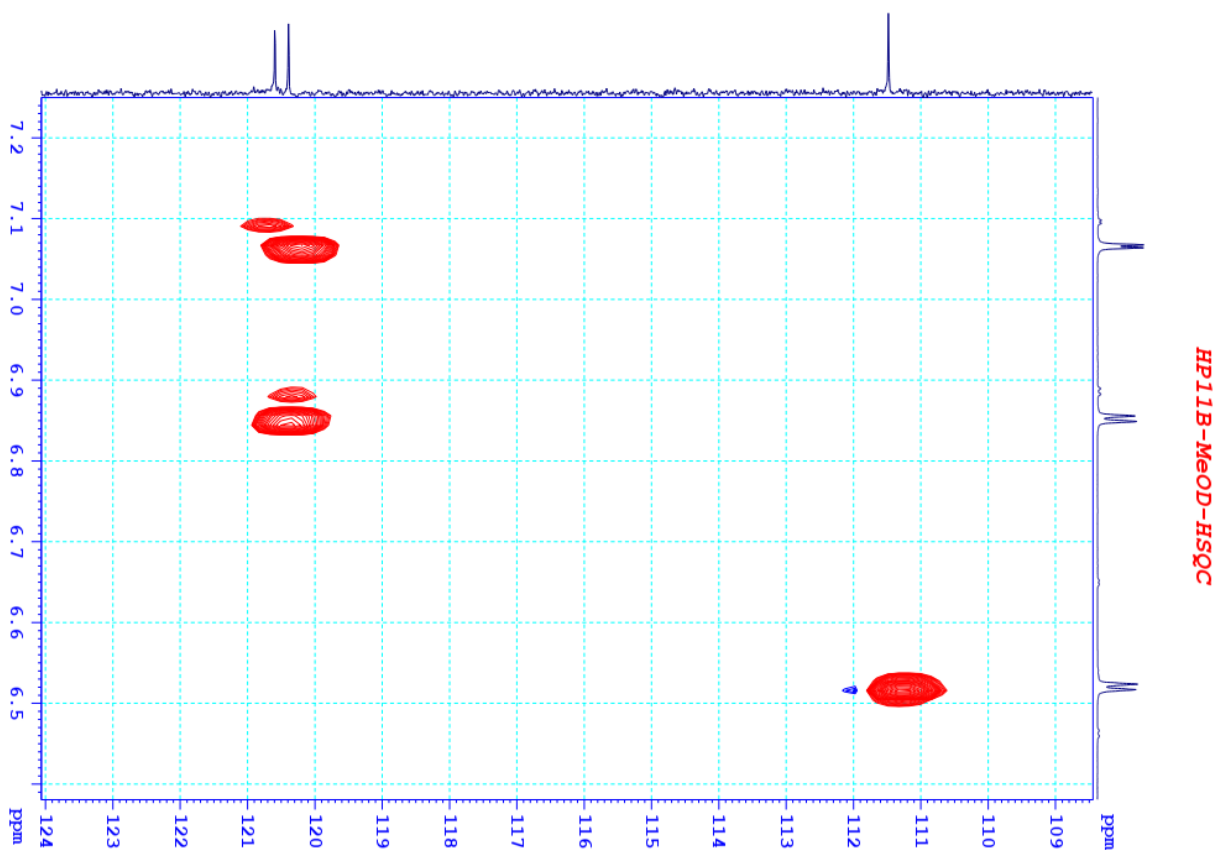
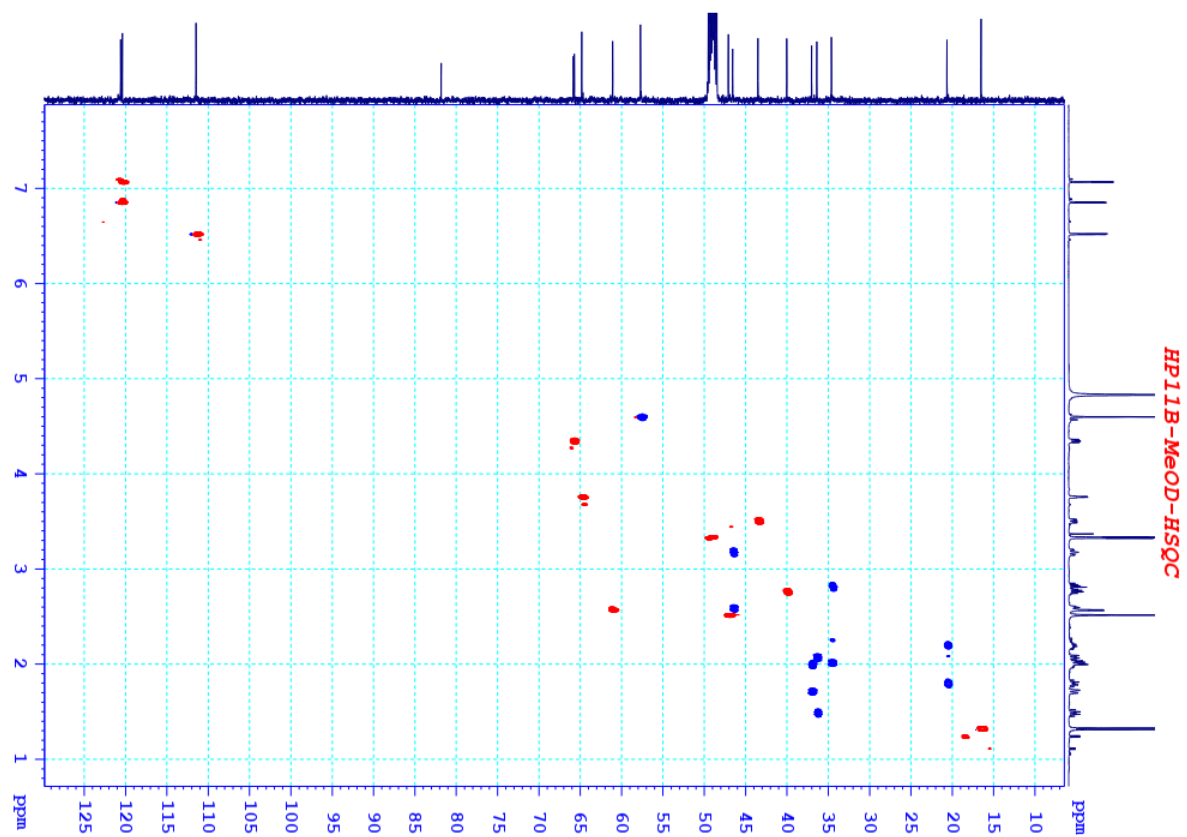
Phổ HMBC của hợp chất HP11B



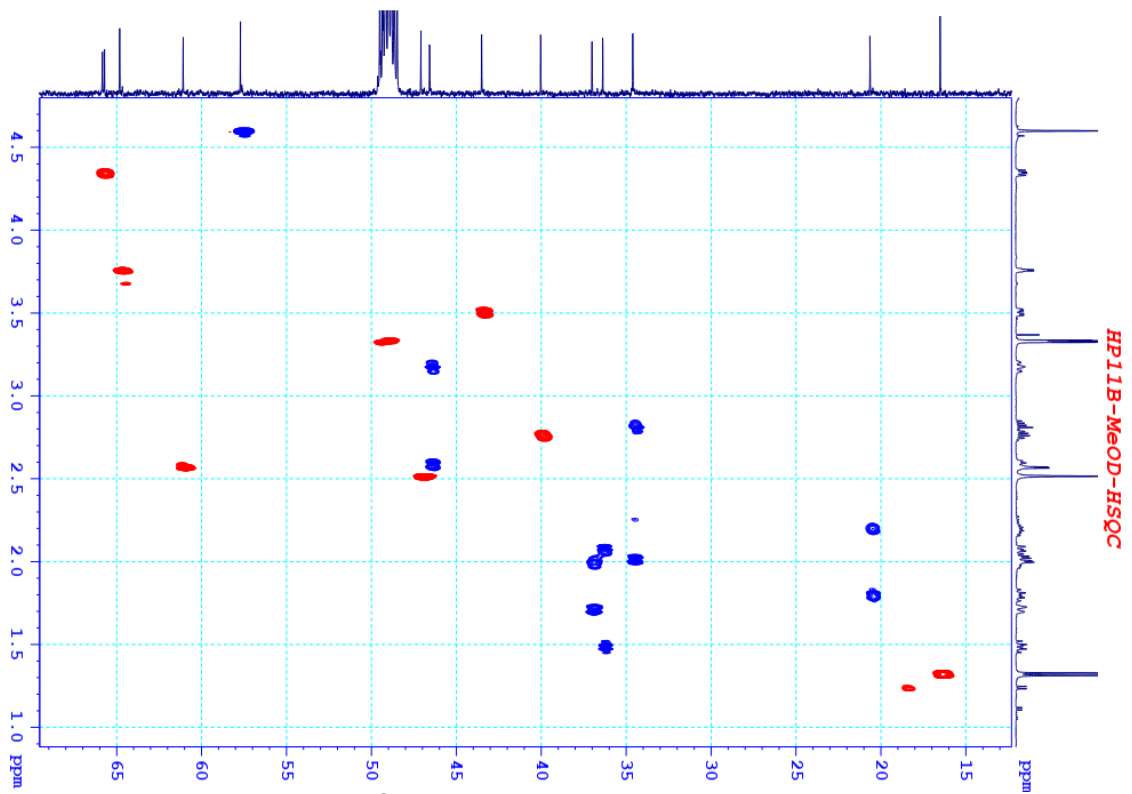
Phổ HMBC của hợp chất HP11B



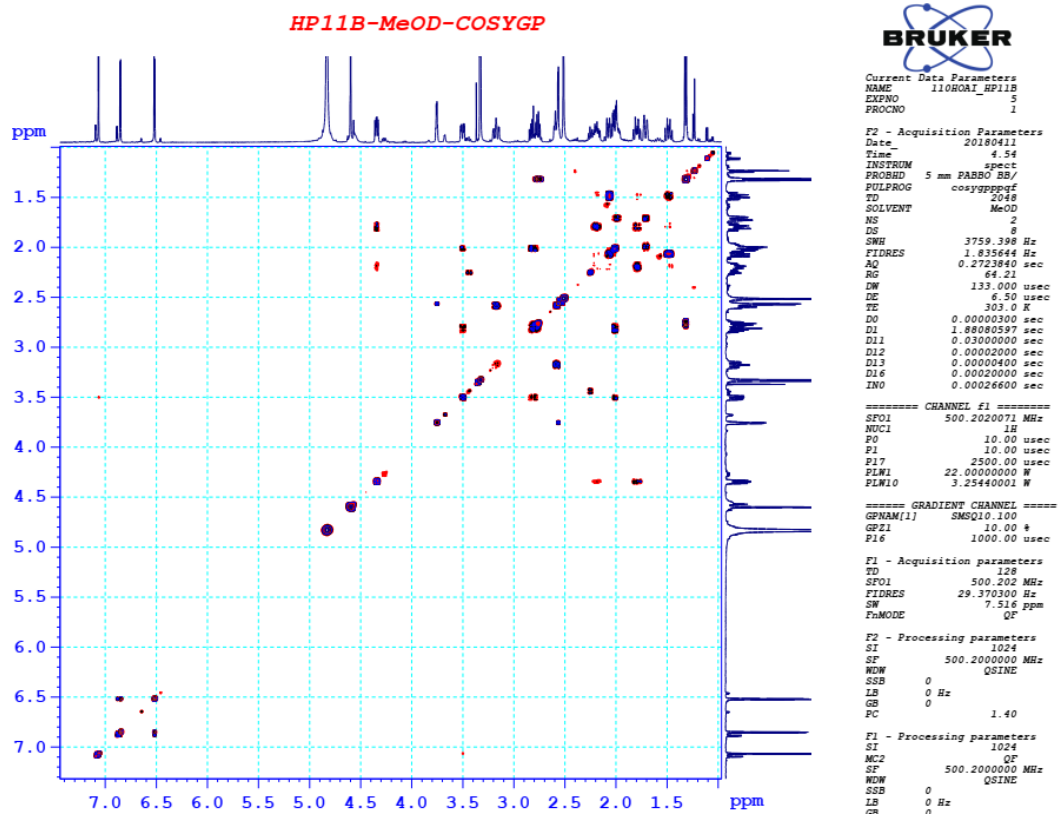
Phổ HMBC của hợp chất HP11B



Phổ HSQC của hợp chất HP11B

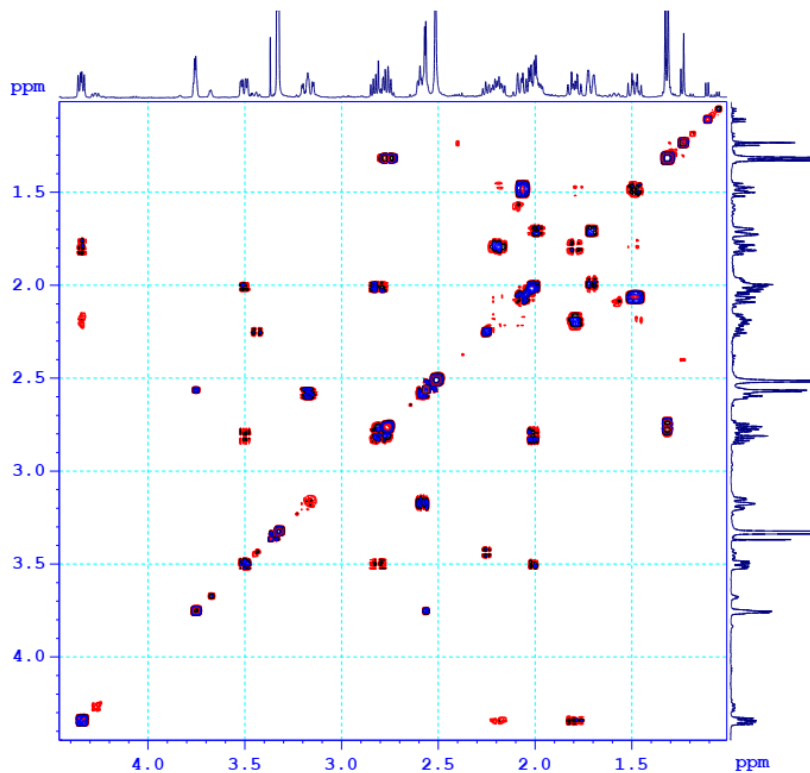


Phổ HSQC của hợp chất HP11B



Phổ COSY của hợp chất HP11B

HP11B-MeOD-COSYGP



```

Current Data Parameters
NAME      110HOAI_HP11B
EXPNO    5
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180411
Time     4.54
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm FAPBO BB/
PULPROG  cosypppqf
TD        2048
SOLVENT  MeOD
NS        2
DS        8
SWH       3759.398 Hz
FIDRES    1.835644 Hz
AQ        0.2723840 sec
RG        64.21
DW        133.000 usec
DE        6.50 usec
TE        303.0 K
DO        0.00000300 sec
D1        1.88080597 sec
D11       0.03000000 sec
D12       0.00002000 sec
D13       0.00004000 sec
D16       0.00020000 sec
INO       0.00026600 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1     500.2020071 MHz
NUC1     1H
P0       10.00 usec
P1       10.00 usec
P17      2500.00 usec
PLW1     22.00000000 W
PLW10    3.25440001 W

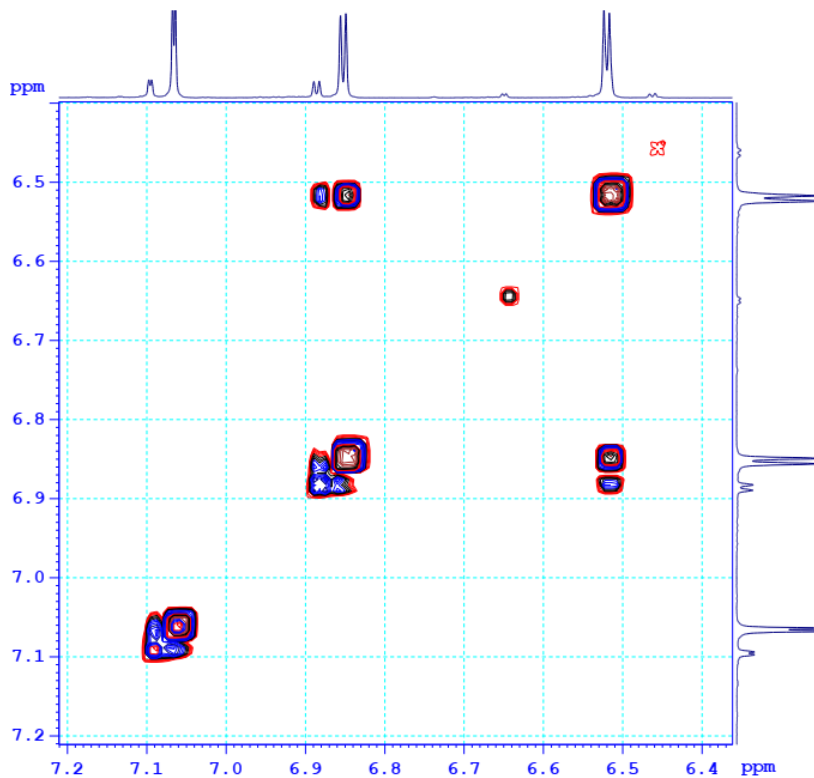
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1     10.00 #
P16      1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD        128
SFO1     500.202 MHz
FIDRES    29.370300 Hz
SW        7.516 ppm
FnMODE    QF

F2 - Processing parameters
SI        1024
SF        500.2000000 MHz
WDW       QSINE
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
PC        1.40

F1 - Processing parameters
SI        1024
MC2       QF
SF        500.2000000 MHz
WDW       QSINE
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
    
```

HP11B-MeOD-COSYGP



```

Current Data Parameters
NAME      110HOAI_HP11B
EXPNO    5
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180411
Time     4.54
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm FAPBO BB/
PULPROG  cosypppqf
TD        2048
SOLVENT  MeOD
NS        2
DS        8
SWH       3759.398 Hz
FIDRES    1.835644 Hz
AQ        0.2723840 sec
RG        64.21
DW        133.000 usec
DE        6.50 usec
TE        303.0 K
DO        0.00000300 sec
D1        1.88080597 sec
D11       0.03000000 sec
D12       0.00002000 sec
D13       0.00004000 sec
D16       0.00020000 sec
INO       0.00026600 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1     500.2020071 MHz
NUC1     1H
P0       10.00 usec
P1       10.00 usec
P17      2500.00 usec
PLW1     22.00000000 W
PLW10    3.25440001 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1] SMSQ10.100
GPZ1     10.00 #
P16      1000.00 usec

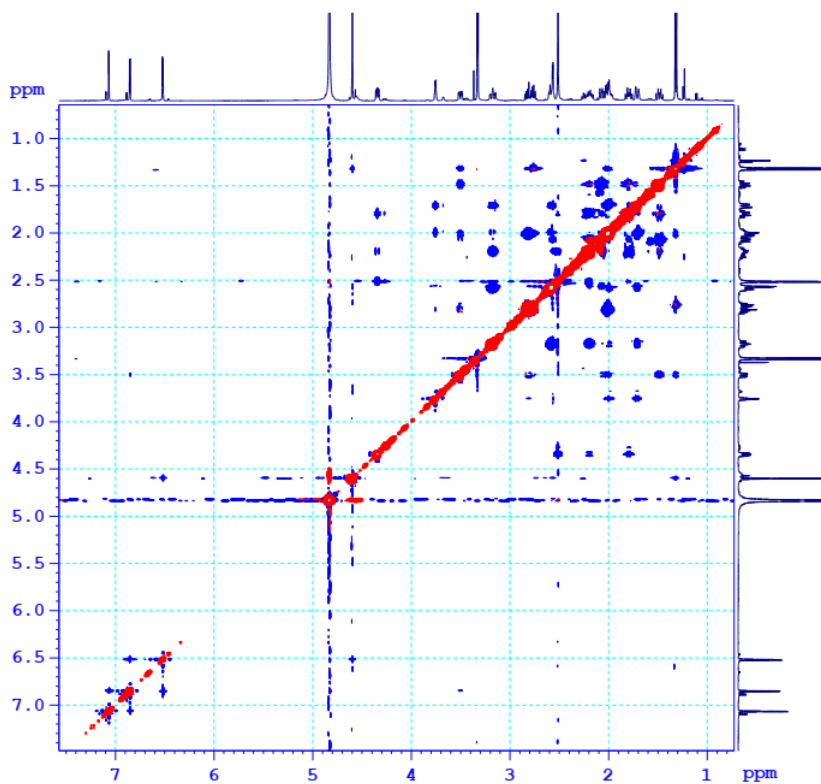
F1 - Acquisition parameters
TD        128
SFO1     500.202 MHz
FIDRES    29.370300 Hz
SW        7.516 ppm
FnMODE    QF

F2 - Processing parameters
SI        1024
SF        500.2000000 MHz
WDW       QSINE
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
PC        1.40

F1 - Processing parameters
SI        1024
MC2       QF
SF        500.2000000 MHz
WDW       QSINE
SSB       0
LB        0 Hz
GB        0
    
```

Phổ COSY của hợp chất HP11B

HP11B-MeOD-NOESY



```

Current Data Parameters
NAME      110H0A1_HP11B
EXPNO    6
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180411
Time     5.06
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  noesypphpgp
TD        2048
SOLVENT  MeOD
NS        8
DS        32
SWH       3649.635 Hz
FIDRES    1.782048 Hz
AQ        0.2803760 sec
RG        64.21
DW        137.000 usec
DE        6.50 usec
TE        303.0 K
DO        0.00012427 sec
D1        1.92422402 sec
D8        0.30000001 sec
D11       0.03000000 sec
D12       0.00002000 sec
D16       0.00020000 sec
INO       0.00027400 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1     500.2019644 MHz
NUC1     1H
P1       10.00 usec
P2       20.00 usec
P17     2500.00 usec
PLW1    22.00000000 W
PLW10   3.25440001 W

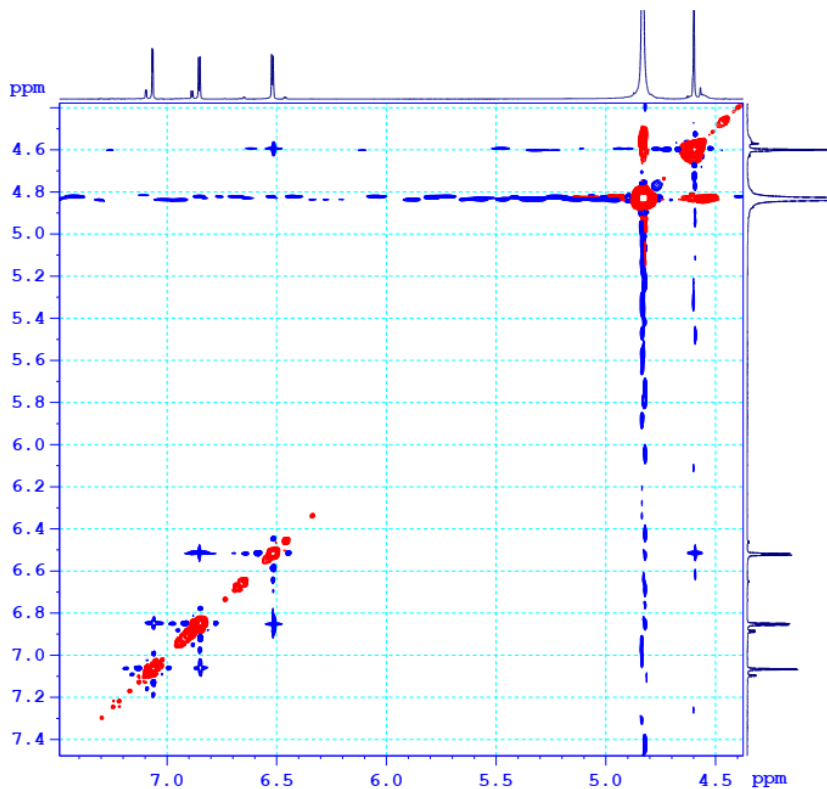
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPRAM[1] SMSQ10.100
GP21     40.00 %
P16     1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD       256
SFO1     500.202 MHz
FIDRES   28.512774 Hz
SW       7.296 ppm
FhMODE   States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI       1024
SF       500.2000003 MHz
WDW      QSINE
SSB      2
LB       0 Hz
GB       0
PC       1.00

F1 - Processing parameters
SI       1024
MC2     States-TPPI
SF       500.2000000 MHz
WDW      QSINE
SSB      2
LB       0 Hz
GB       0
    
```

HP11B-MeOD-NOESY



```

Current Data Parameters
NAME      110H0A1_HP11B
EXPNO    6
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180411
Time     5.06
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  noesypphpgp
TD        2048
SOLVENT  MeOD
NS        8
DS        32
SWH       3649.635 Hz
FIDRES    1.782048 Hz
AQ        0.2803760 sec
RG        64.21
DW        137.000 usec
DE        6.50 usec
TE        303.0 K
DO        0.00012427 sec
D1        1.92422402 sec
D8        0.30000001 sec
D11       0.03000000 sec
D12       0.00002000 sec
D16       0.00020000 sec
INO       0.00027400 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1     500.2019644 MHz
NUC1     1H
P1       10.00 usec
P2       20.00 usec
P17     2500.00 usec
PLW1    22.00000000 W
PLW10   3.25440001 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPRAM[1] SMSQ10.100
GP21     40.00 %
P16     1000.00 usec

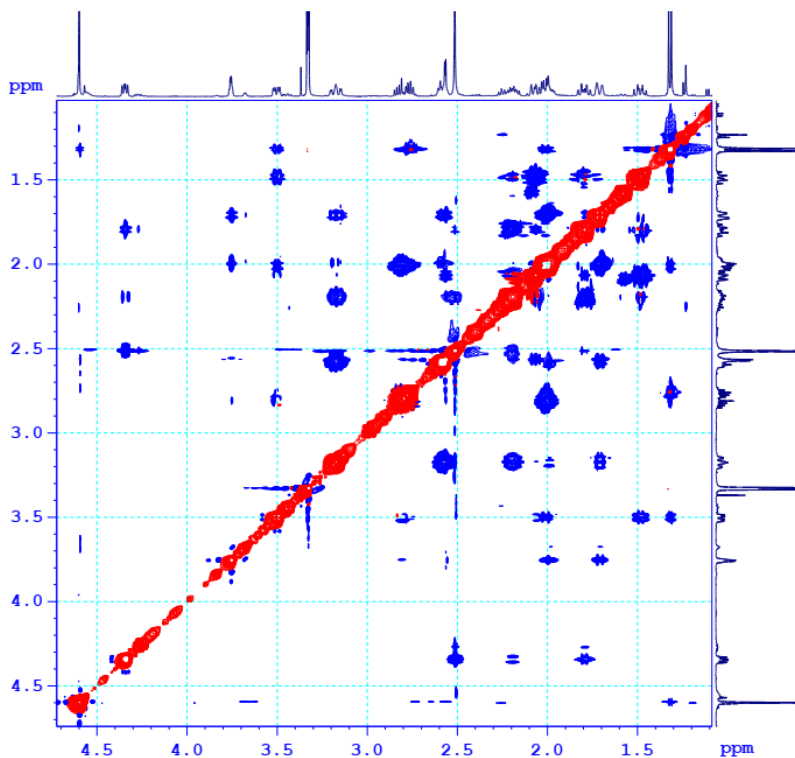
F1 - Acquisition parameters
TD       256
SFO1     500.202 MHz
FIDRES   28.512774 Hz
SW       7.296 ppm
FhMODE   States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI       1024
SF       500.2000003 MHz
WDW      QSINE
SSB      2
LB       0 Hz
GB       0
PC       1.00

F1 - Processing parameters
SI       1024
MC2     States-TPPI
SF       500.2000000 MHz
WDW      QSINE
SSB      2
LB       0 Hz
GB       0
    
```

Phổ NOESY của hợp chất HP11B

HP11B-MeOD-NOESY



```

Current Data Parameters
NAME      110H0AI_HP11B
EXPNO     6
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20180411
Time      5.06
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PARBO BB/
PULPROG   noesypphpgp
TD         2048
SOLVENT   MeOD
NS         8
DS         32
SWH        3649.635 Hz
FIDRES     1.782048 Hz
AQ         0.2805760 sec
RG         64.21
DW         137.000 usec
DE         6.50 usec
TE         303.0 K
DO         0.00012427 sec
D1         1.92422402 sec
D8         0.30000001 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D16        0.00020000 sec
INO        0.00027400 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      500.2019644 MHz
NUC1      1H
P1         10.00 usec
P2         20.00 usec
P17        2500.00 usec
PLW1      22.00000000 W
PLW10     3.25440001 W

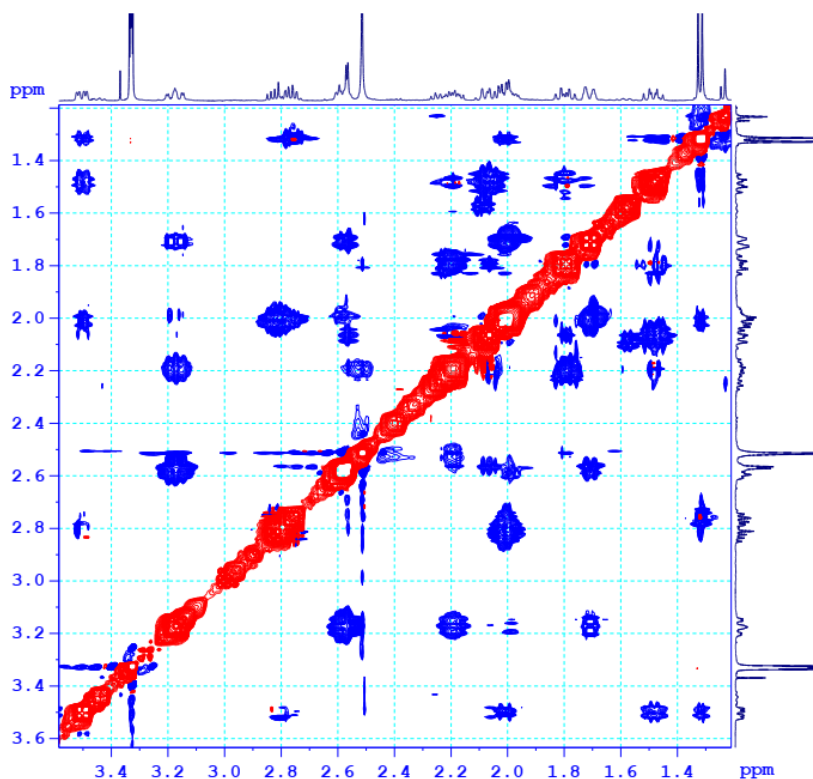
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]  SMSQ10.100
GP21      40.00 #
P16       1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         256
SFO1      500.202 MHz
FIDRES     28.512774 Hz
SW         7.296 ppm
FhMODE     States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         500.2000003 MHz
WDW        QSINE
SSB         2
LB          0 Hz
GB          0
PC          1.00

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        States-TPPI
SF         500.2000000 MHz
WDW        QSINE
SSB         2
LB          0 Hz
GB          0
    
```

HP11B-MeOD-NOESY



```

Current Data Parameters
NAME      110H0AI_HP11B
EXPNO     6
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20180411
Time      5.06
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PARBO BB/
PULPROG   noesypphpgp
TD         2048
SOLVENT   MeOD
NS         8
DS         32
SWH        3649.635 Hz
FIDRES     1.782048 Hz
AQ         0.2805760 sec
RG         64.21
DW         137.000 usec
DE         6.50 usec
TE         303.0 K
DO         0.00012427 sec
D1         1.92422402 sec
D8         0.30000001 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00002000 sec
D16        0.00020000 sec
INO        0.00027400 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      500.2019644 MHz
NUC1      1H
P1         10.00 usec
P2         20.00 usec
P17        2500.00 usec
PLW1      22.00000000 W
PLW10     3.25440001 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]  SMSQ10.100
GP21      40.00 #
P16       1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         256
SFO1      500.202 MHz
FIDRES     28.512774 Hz
SW         7.296 ppm
FhMODE     States-TPPI

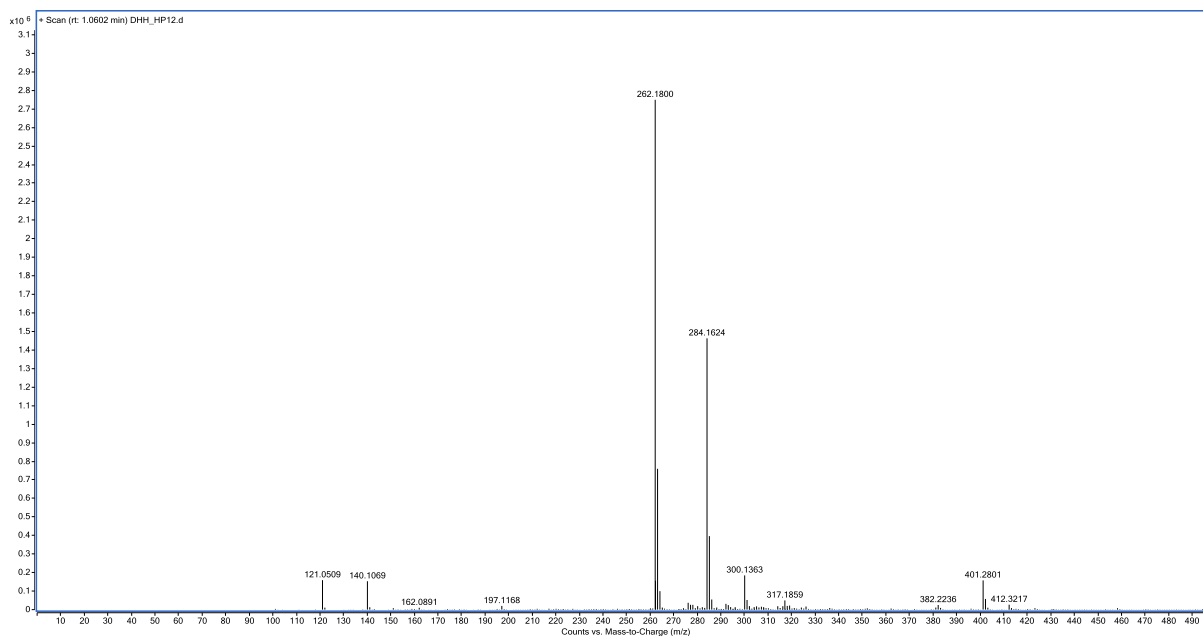
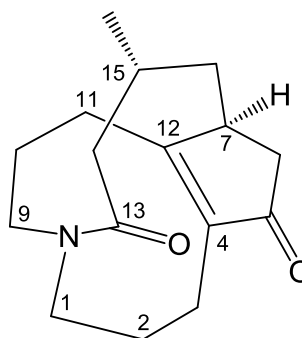
F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         500.2000003 MHz
WDW        QSINE
SSB         2
LB          0 Hz
GB          0
PC          1.00

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        States-TPPI
SF         500.2000000 MHz
WDW        QSINE
SSB         2
LB          0 Hz
GB          0
    
```

Phổ NOESY của hợp chất HP11B

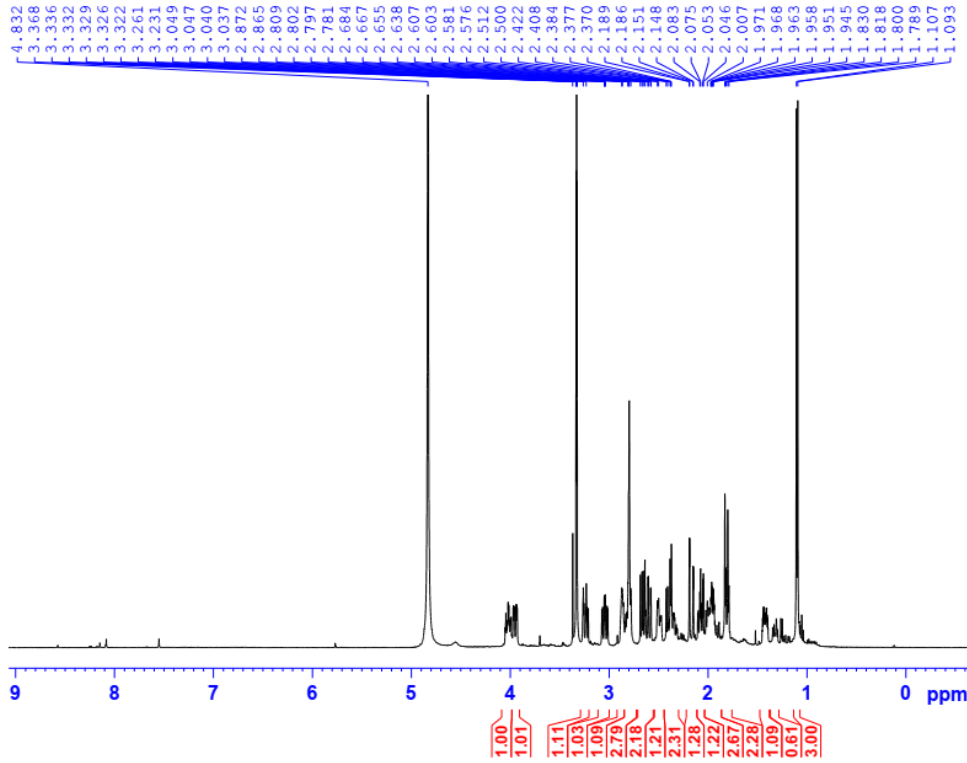
Phụ lục 3.4. Phổ của hợp chất HP12 (Phlegmariurin B)

- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC



Phổ HR-ESI-MS của hợp chất HP12

HP12-MeOD-1H



Current Data Parameters
NAME 11UHOAI_HP12
EXPNO 1
PROCNO 1

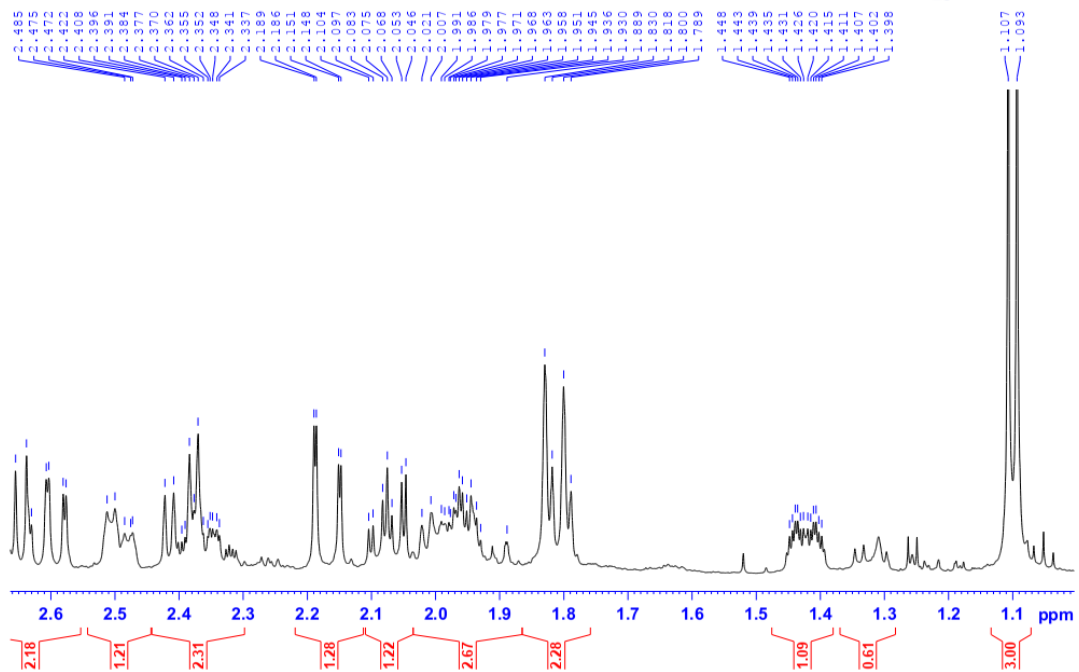
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20180403
Time 15.36
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zg30
TD 65536
SOLVENT MeOD
NS 16
DS 2
SWH 10000.000 Hz
FIDRES 0.152588 Hz
AQ 3.2767999 sec
RG 142.98
LW 50.000 usec
DE 6.50 usec
TE 302.9 K
D1 1.00000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SF01 500.2030889 MHz
NUC1 1H
P1 10.00 usec
PLW1 22.00000000 W

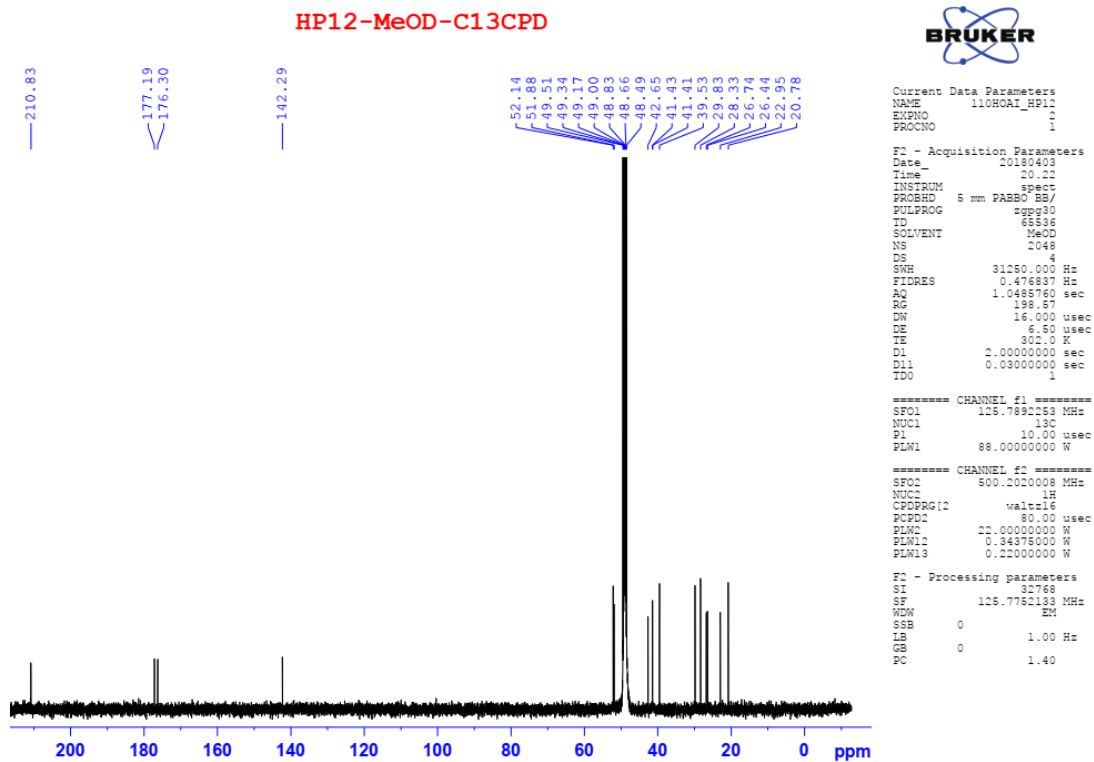
F2 - Processing parameters
SI 65536
SF 500.2000002 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.30 Hz
GB 0
PC 1.00

Phổ ¹H-NMR của hợp chất HP12

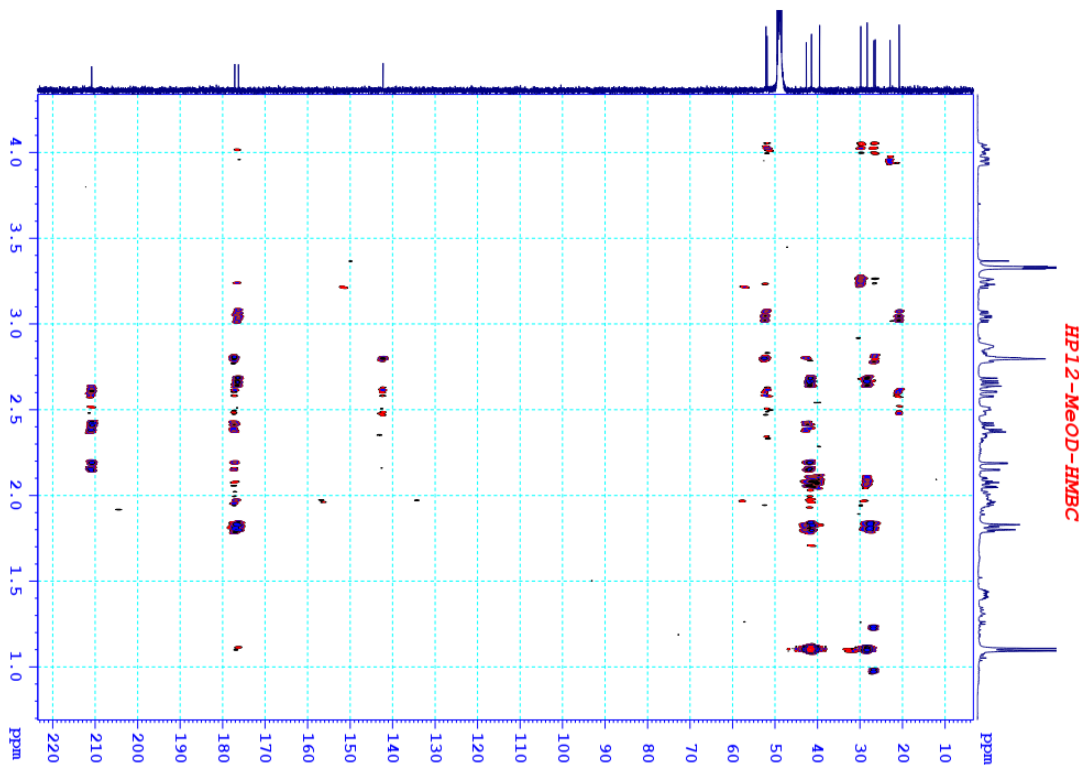
HP12-MeOD-1H



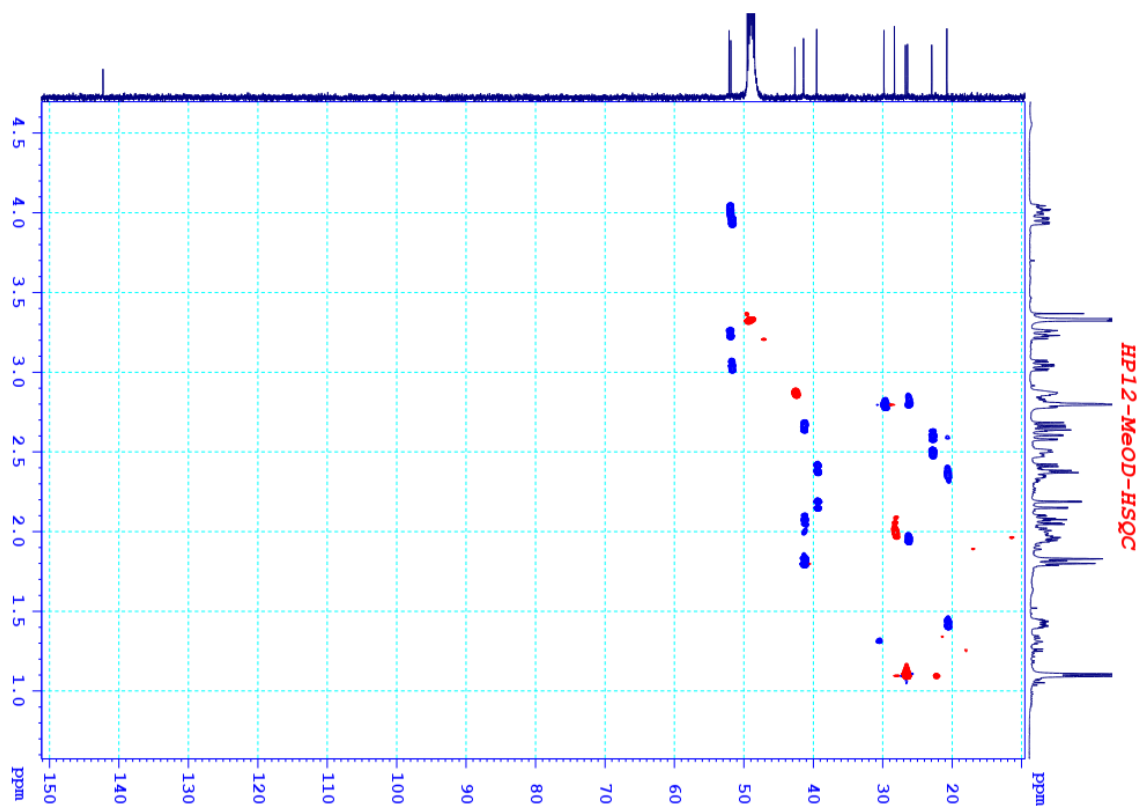
Phổ ¹H-NMR của hợp chất HP12



Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất HP12



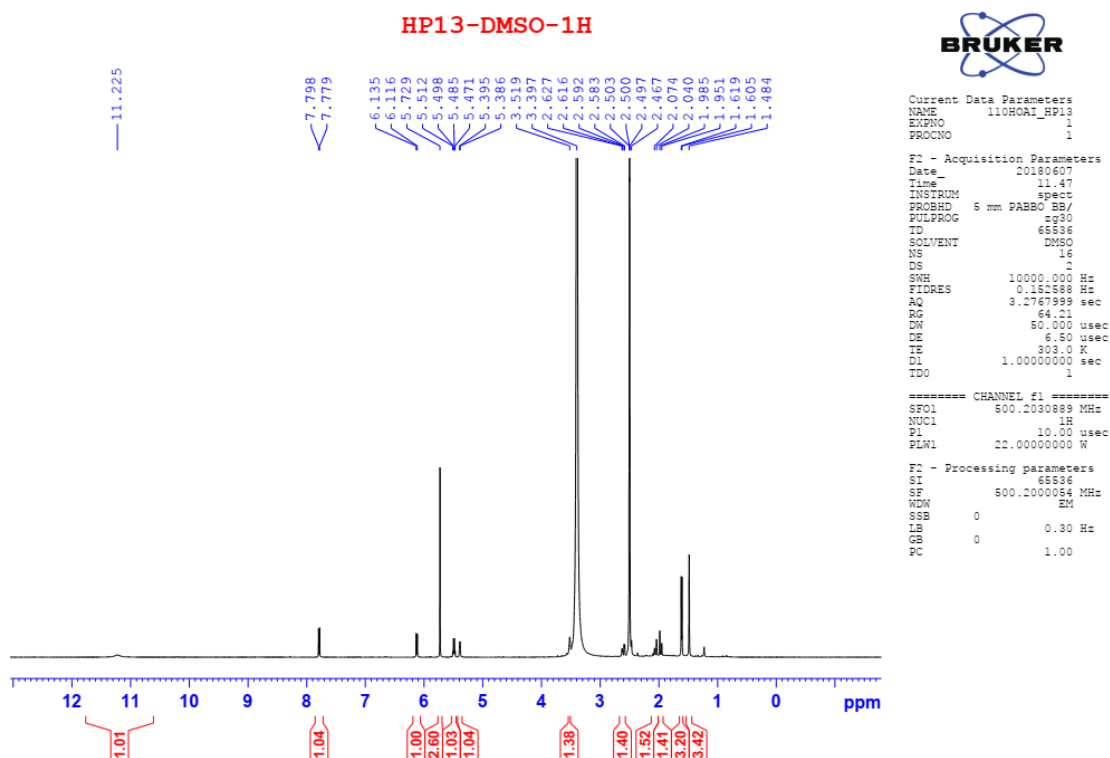
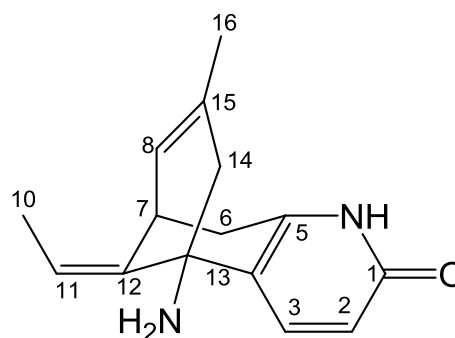
Phổ HMBC của hợp chất HP12



Phổ HSQC của hợp chất HP12

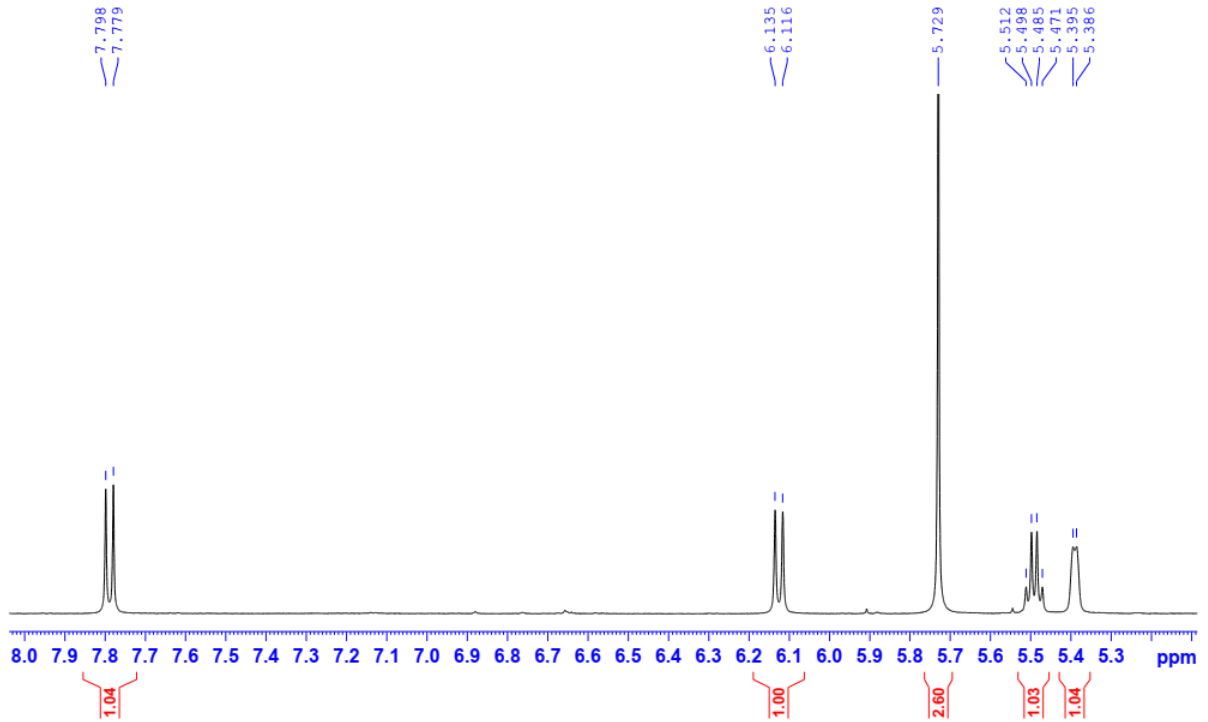
Phụ lục 3.5. Phổ của hợp chất HP13 (Huperzin A)

- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- HMBC
- HMQC

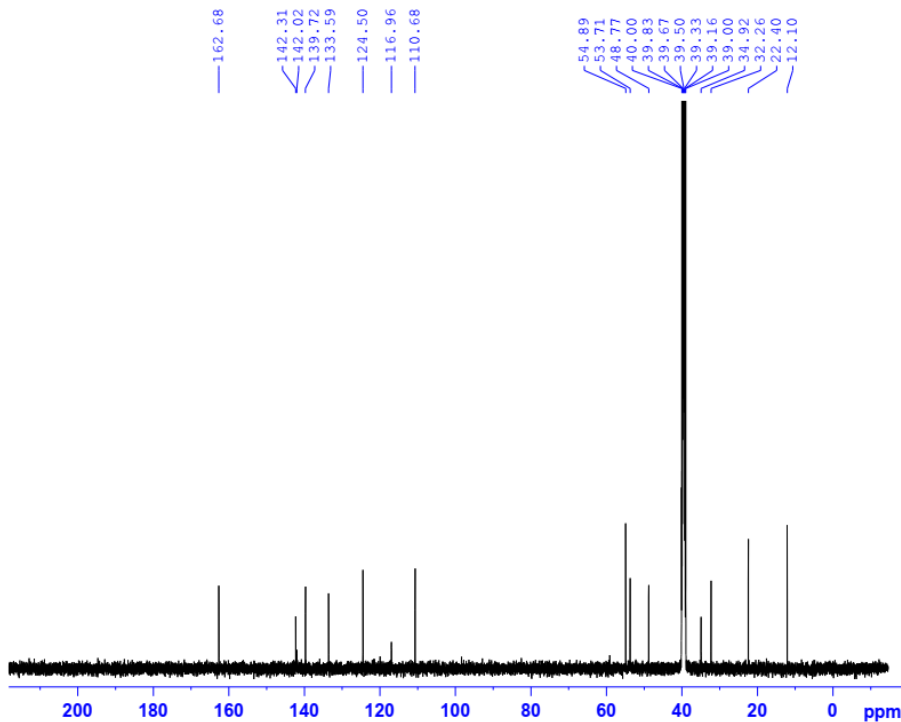


Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất HP13

HP13-DMSO-1H



HP13-DMSO-C13CPD



```

Current Data Parameters
NAME      110HOAI_HP13
EXPNO    1
PROCNO   1

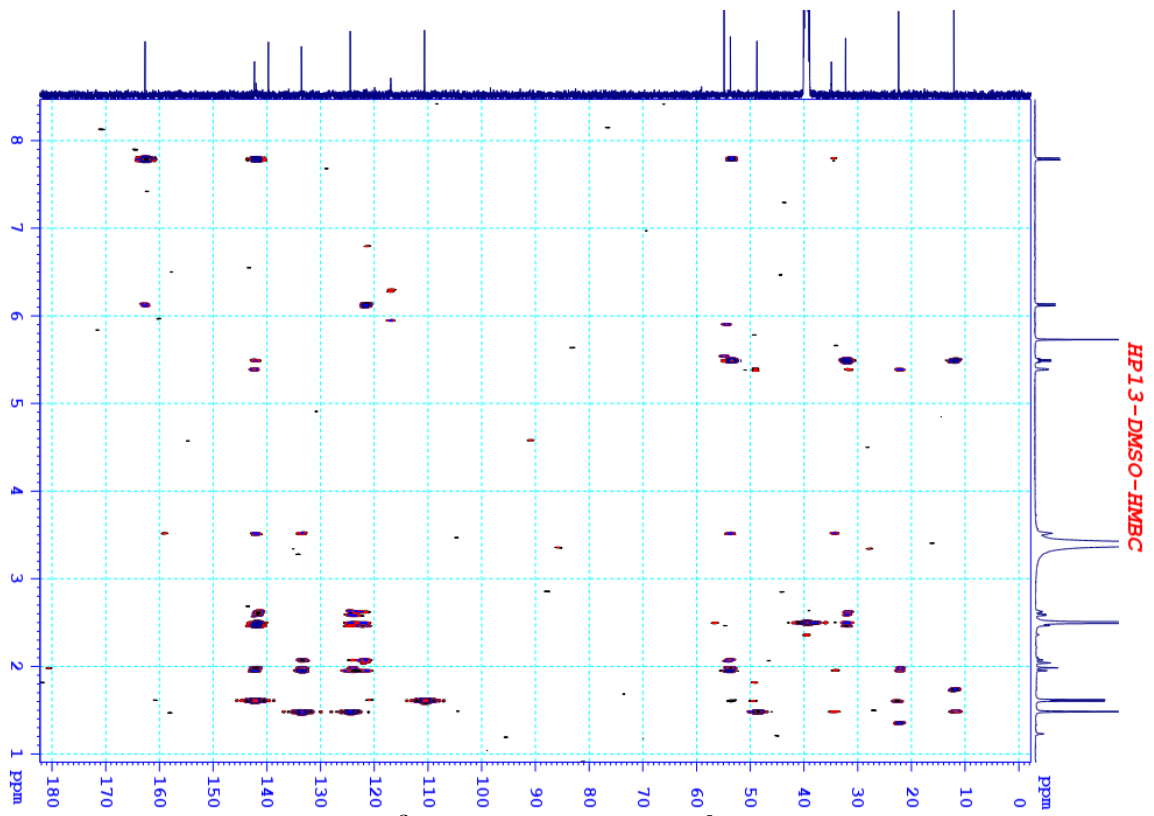
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180608
Time     5.21
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zgpg30
TD       65536
SOLVENT  DMSO
NS       2048
DS       4
SWH      31250.000 Hz
FIDRES   0.4768837 Hz
AQ       1.0485760 sec
RG       198.57
DW       16.000 usec
DE       6.50 usec
TE       303.0 K
DL       2.00000000 sec
D11      0.03000000 sec
TD0      1

===== CHANNEL f1 =====
SF01    125.7692263 MHz
NUC1    13C
P1      10.00 usec
PLW1    88.00000000 W

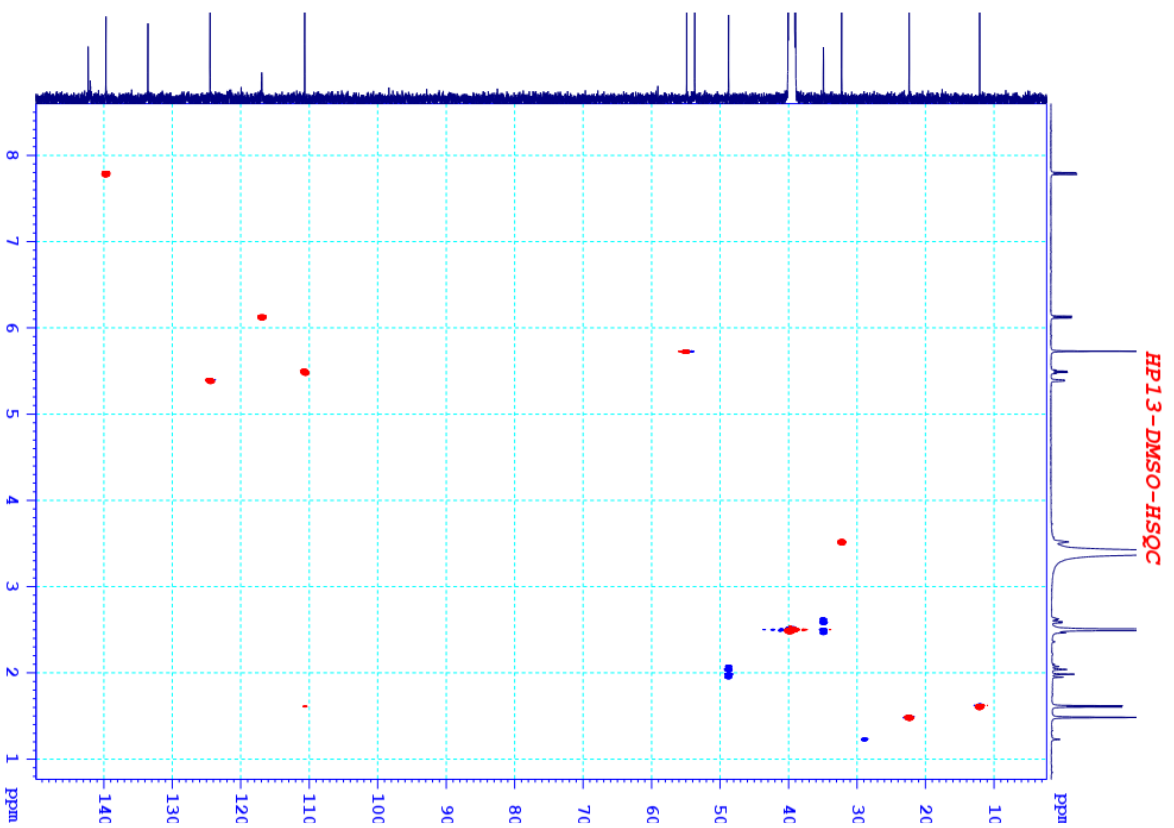
===== CHANNEL f2 =====
SF02    500.2020008 MHz
NUC2    1H
CPDPRG2 walz16
PCPD2   80.00 usec
PLW2    22.00000000 W
PLW12   0.34375000 W
PLW13   0.22000000 W

F2 - Processing parameters
SI      32768
SF      125.7754450 MHz
WDW     EM
SSB     0
LB      1.00 Hz
GB      0
PC      1.40
    
```

Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HP13



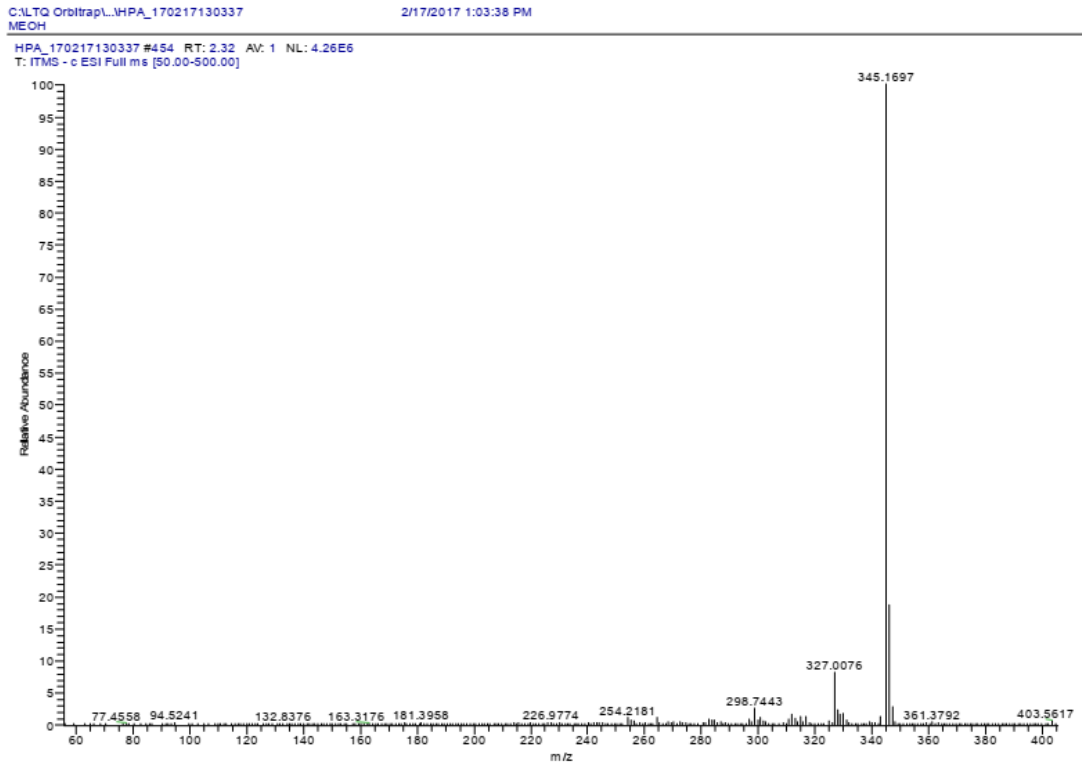
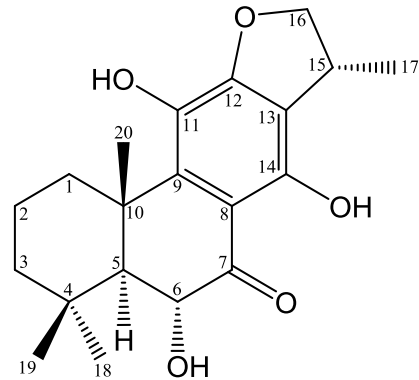
Phổ HMBC của hợp chất HP13



Phổ HSQC của hợp chất HP13

Phụ lục 3.6. Phổ của hợp chất HPA (Huperphlegmarin A)

- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ UV
- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ DEPT
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC
- Phổ NOESY
- Phổ CD

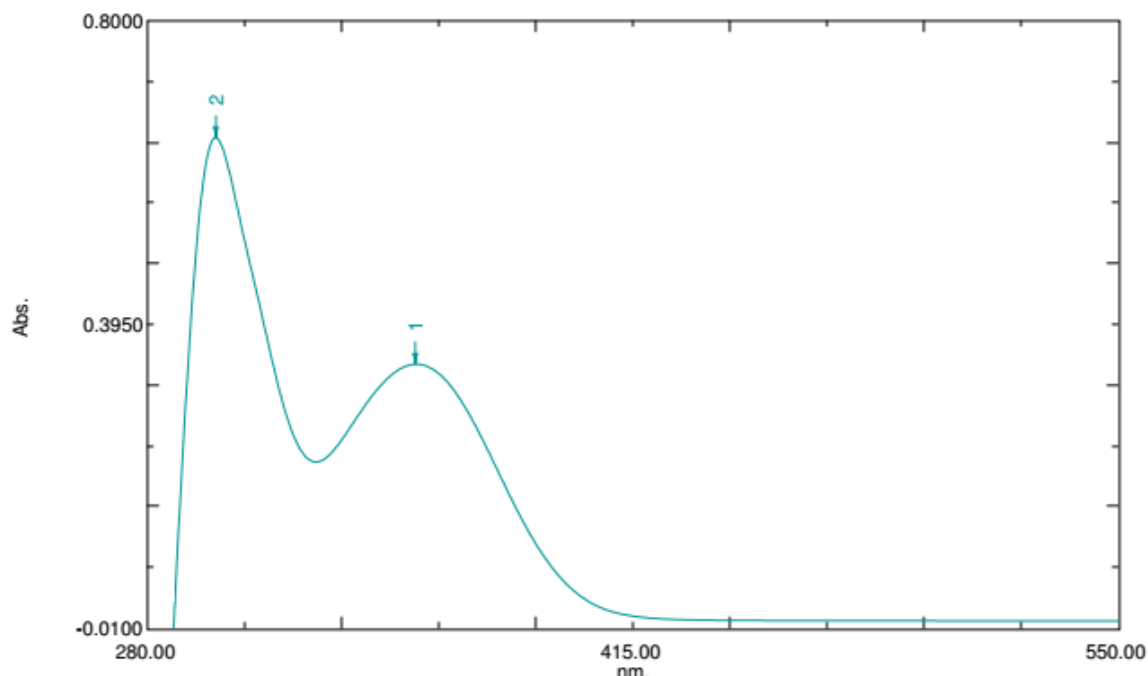


Phổ HR-ESI-MS của hợp chất HPA

Spectrum Peak Pick Report

02/06/2017 02:57:59 PM

Data Set: HPA_142828.spc - Dataset 145707



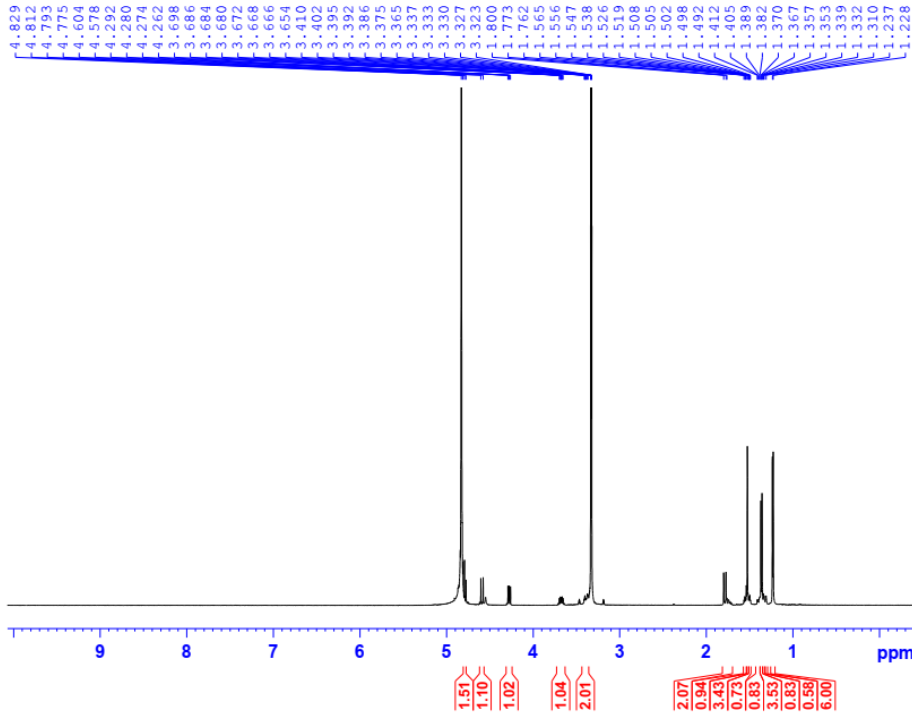
Measurement Properties
Wavelength Range (nm.): 190.00 to 1100.00
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0.50
Auto Sampling Interval: Disabled
Scan Mode: Auto

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	①	354.50	0.3420	
2	②	299.00	0.6442	

Instrument Properties
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
S/R Exchange: Normal

Phổ UV của hợp chất HPA

HPA-MeOD-1H



```

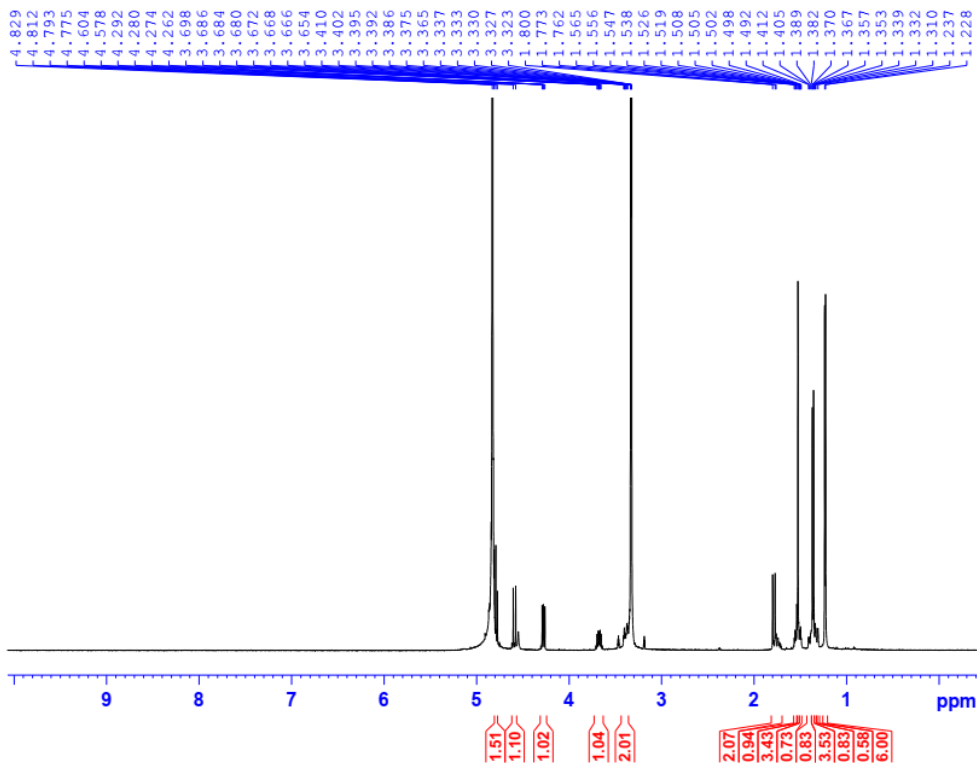
Current Data Parameters
NAME      110HOAI_HPA
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20170123
Time     10.08
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zg30
TD        65536
SOLVENT  MeOD
NS        16
DS        2
SWH       10000.000 Hz
FIDRES    0.152588 Hz
AQ        3.2767999 sec
RG        198.57
DW        50.000 usec
DE        6.50 usec
TE        303.1 K
DL        1.00000000 sec
TDO       1

===== CHANNEL f1 =====
SF01     500.2030889 MHz
NUC1      1H
P1        10.00 usec
PLW1     22.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        500.1999999 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0
PC        1.00
    
```

HPA-MeOD-1H



```

Current Data Parameters
NAME      110HOAI_HPA
EXPNO    1
PROCNO   1

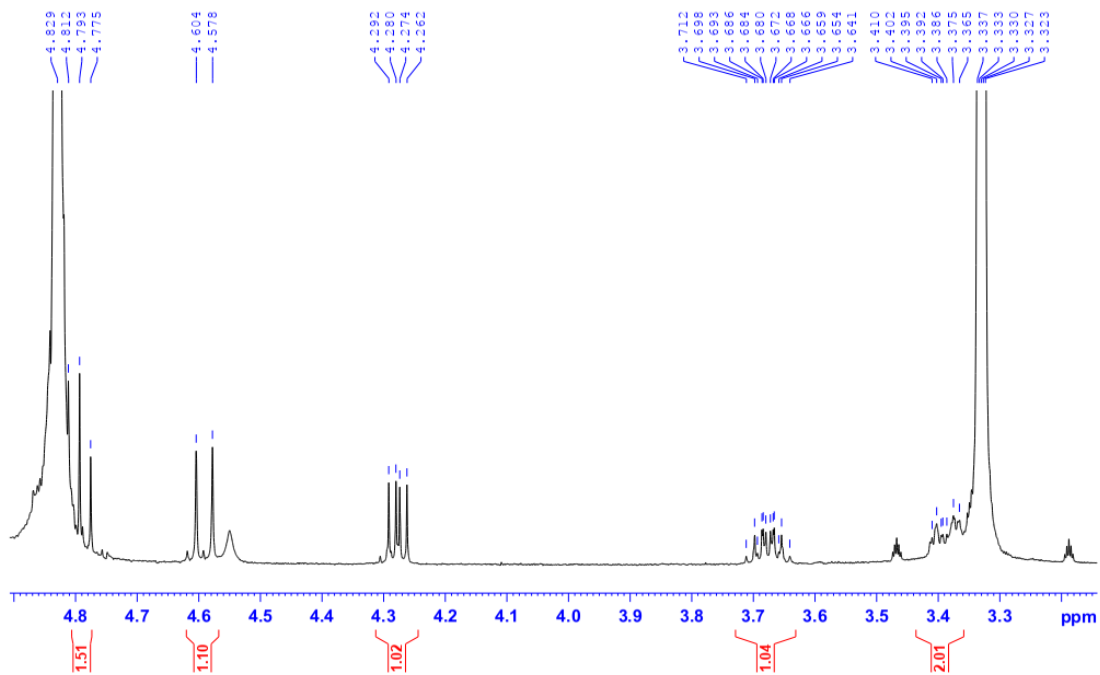
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20170123
Time     10.08
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zg30
TD        65536
SOLVENT  MeOD
NS        16
DS        2
SWH       10000.000 Hz
FIDRES    0.152588 Hz
AQ        3.2767999 sec
RG        198.57
DW        50.000 usec
DE        6.50 usec
TE        303.1 K
DL        1.00000000 sec
TDO       1

===== CHANNEL f1 =====
SF01     500.2030889 MHz
NUC1      1H
P1        10.00 usec
PLW1     22.00000000 W

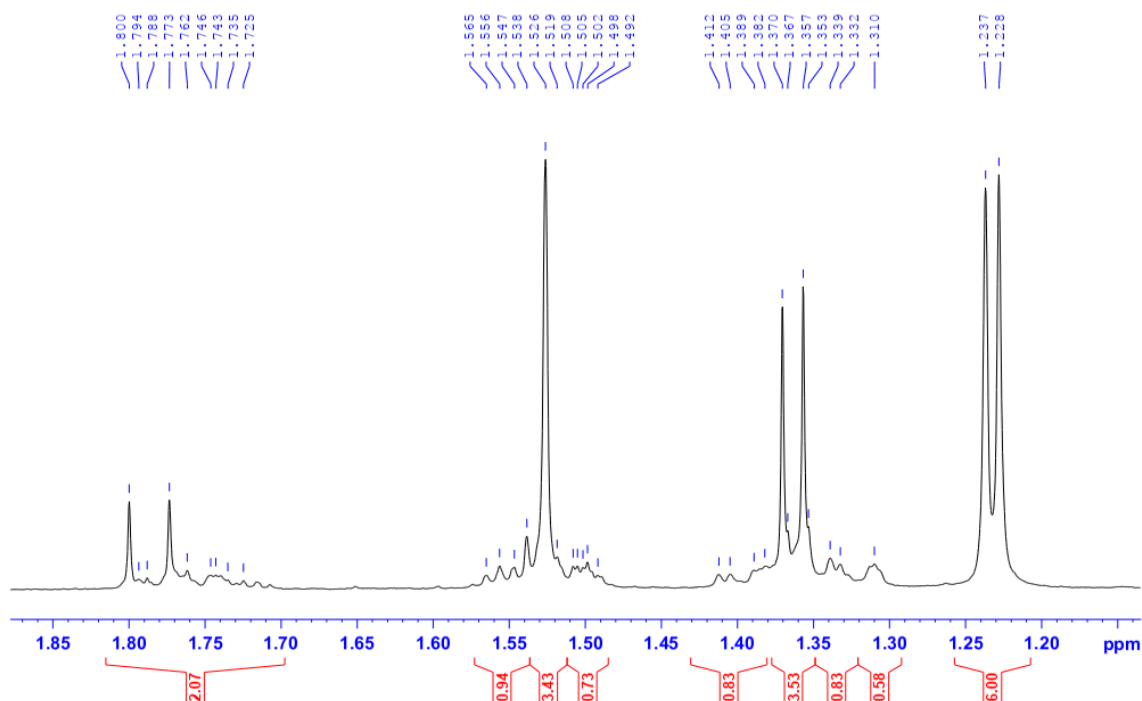
F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        500.1999999 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0
PC        1.00
    
```

Phổ ¹H-NMR của hợp chất HPA

HPA-MeOD-1H

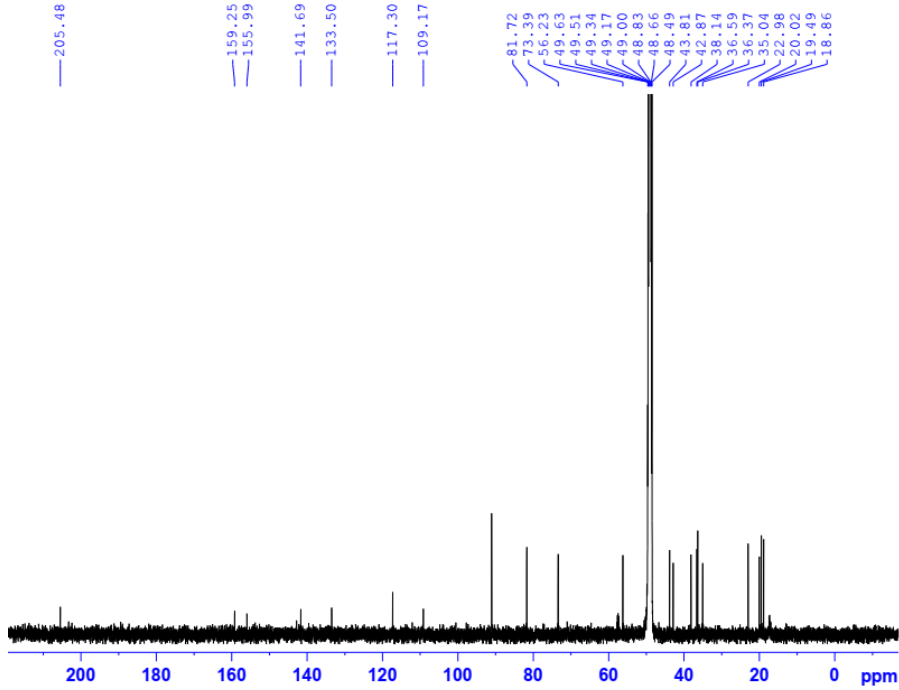


HPA-MeOD-1H



Phổ ¹H-NMR của hợp chất HPA

HPA-MeOD-C13CPD



Current Data Parameters
NAME 110H0AI_HPA
EXPNO 7
PROCNO 1

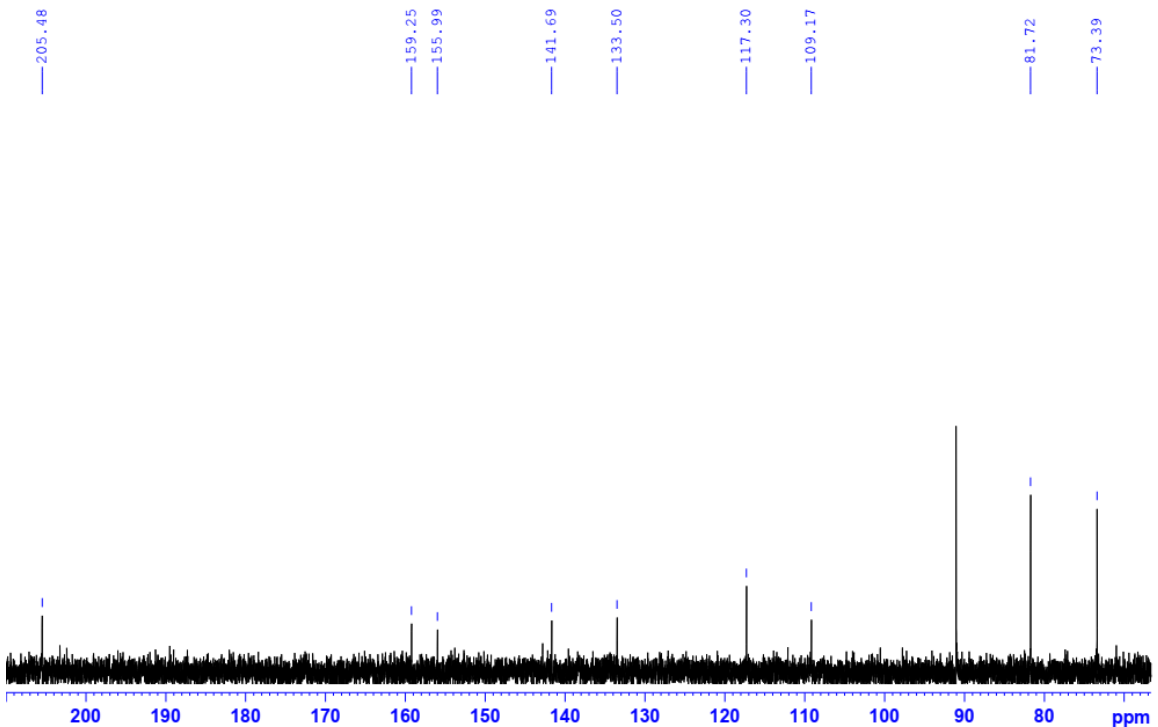
F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170127
Time_ 6.25
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zgpg30
TD 83836
SOLVENT MeOD
NS 16384
DS 4
SWH 29761.894 Hz
FIDRES 0.454131 Hz
AQ 1.1010048 sec
RG 198.57
DN 16.800 usec
DE 8.50 usec
TE 303.2 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TD0 1

===== CHANNEL f1 =====
SF01 125.7879670 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PLW1 88.00000000 W

===== CHANNEL f2 =====
SF02 500.2020008 MHz
NUC2 1H
CPDPRG2 waltz16
PCPD2 80.00 usec
PLW2 22.00000000 W
PLW12 0.34375000 W
PLW13 0.22000000 W

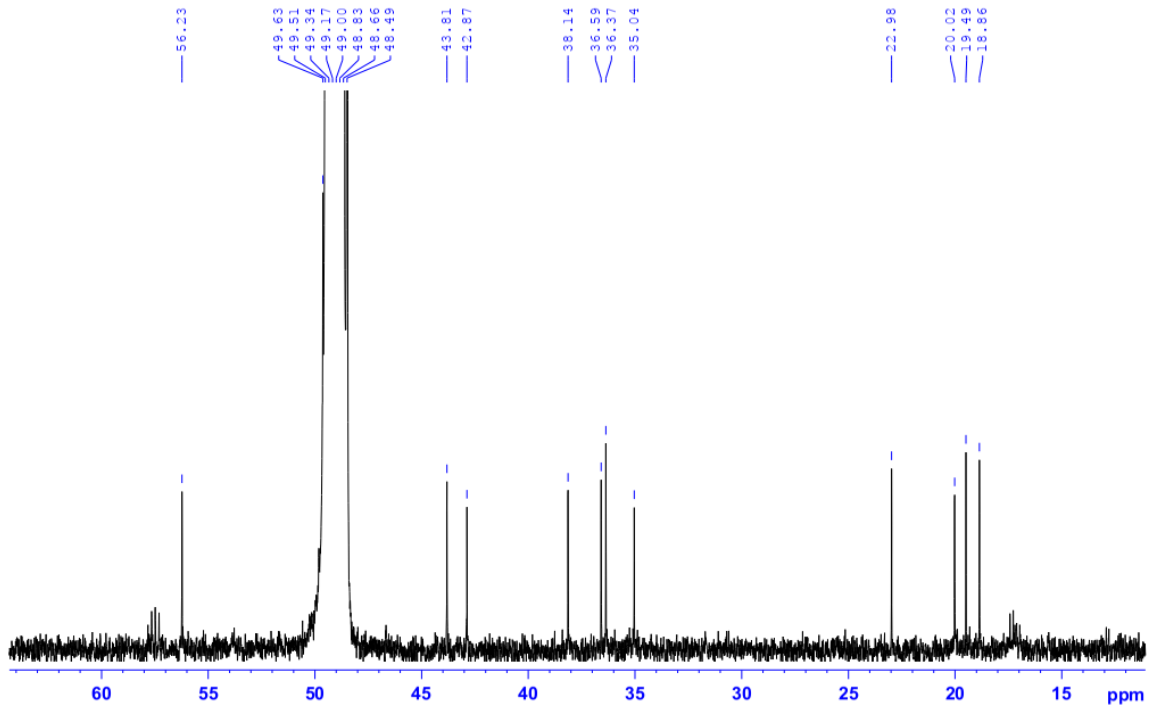
F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7752126 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

HPA-MeOD-C13CPD



Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HPA

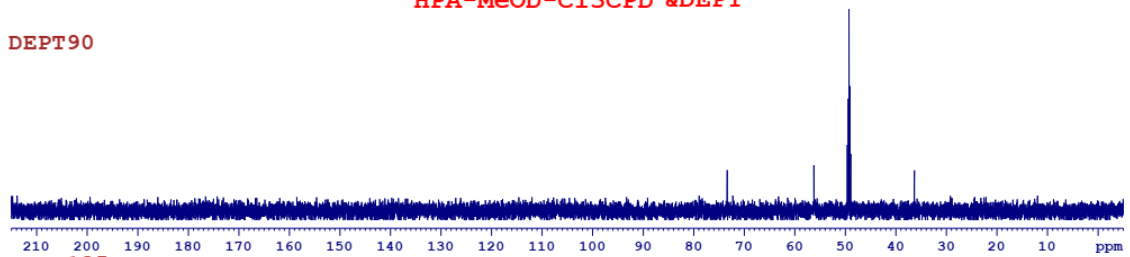
HPA-MeOD-C13CPD



Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất HPA

HPA-MeOD-C13CPD &DEPT

DEPT90



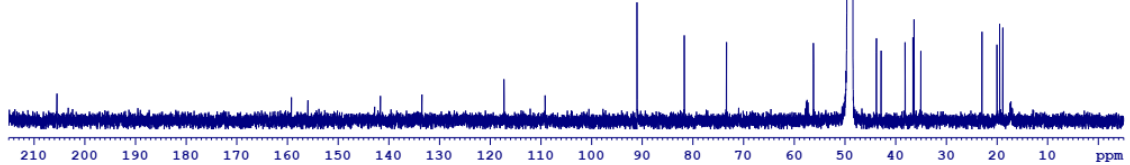
DEPT135



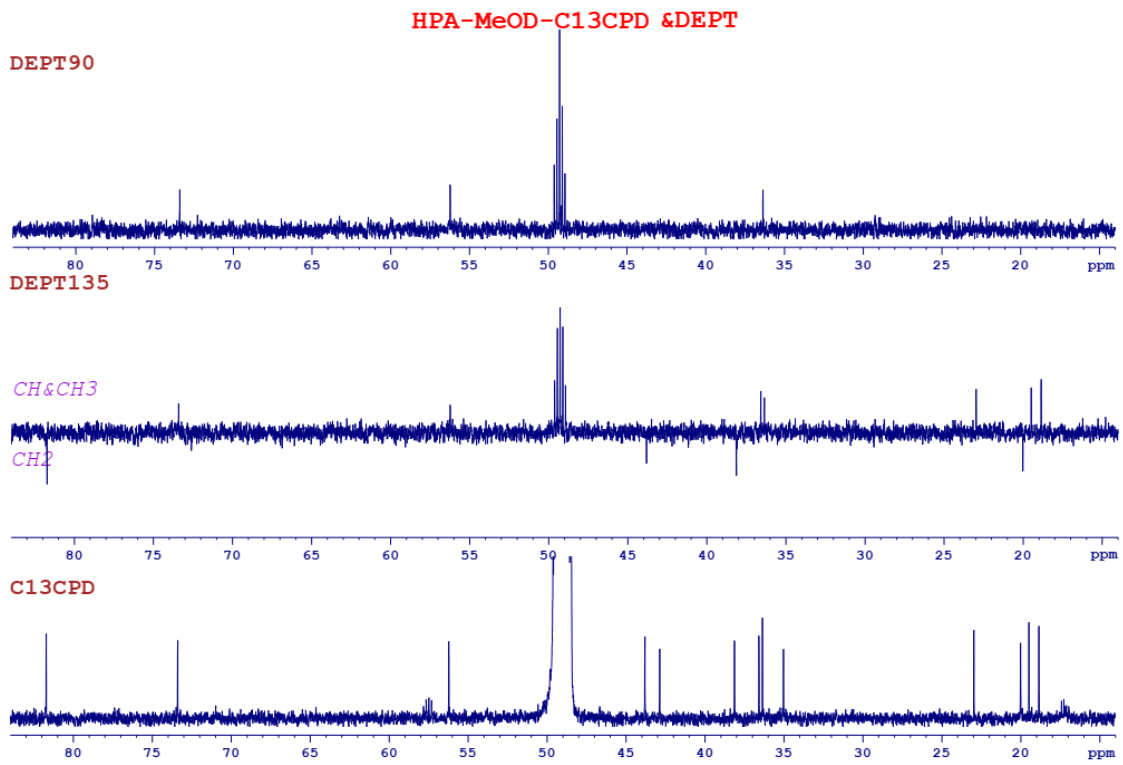
CH&CH3

CH2

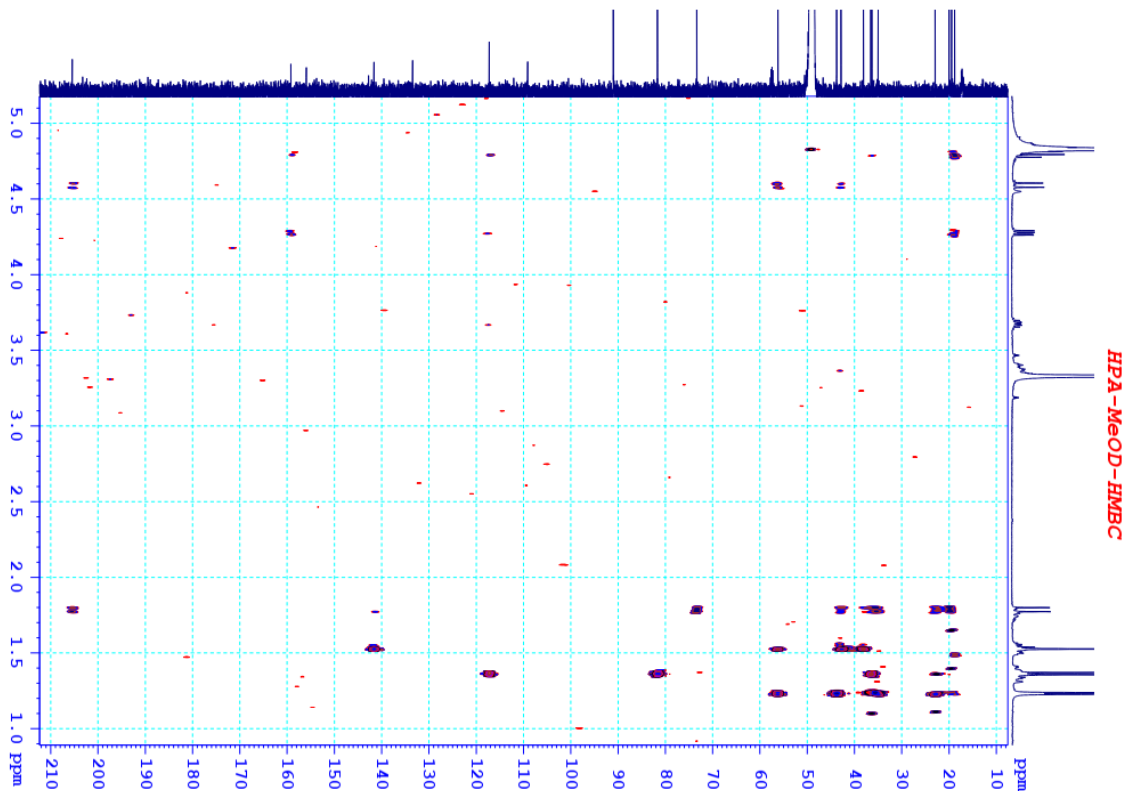
C13CPD



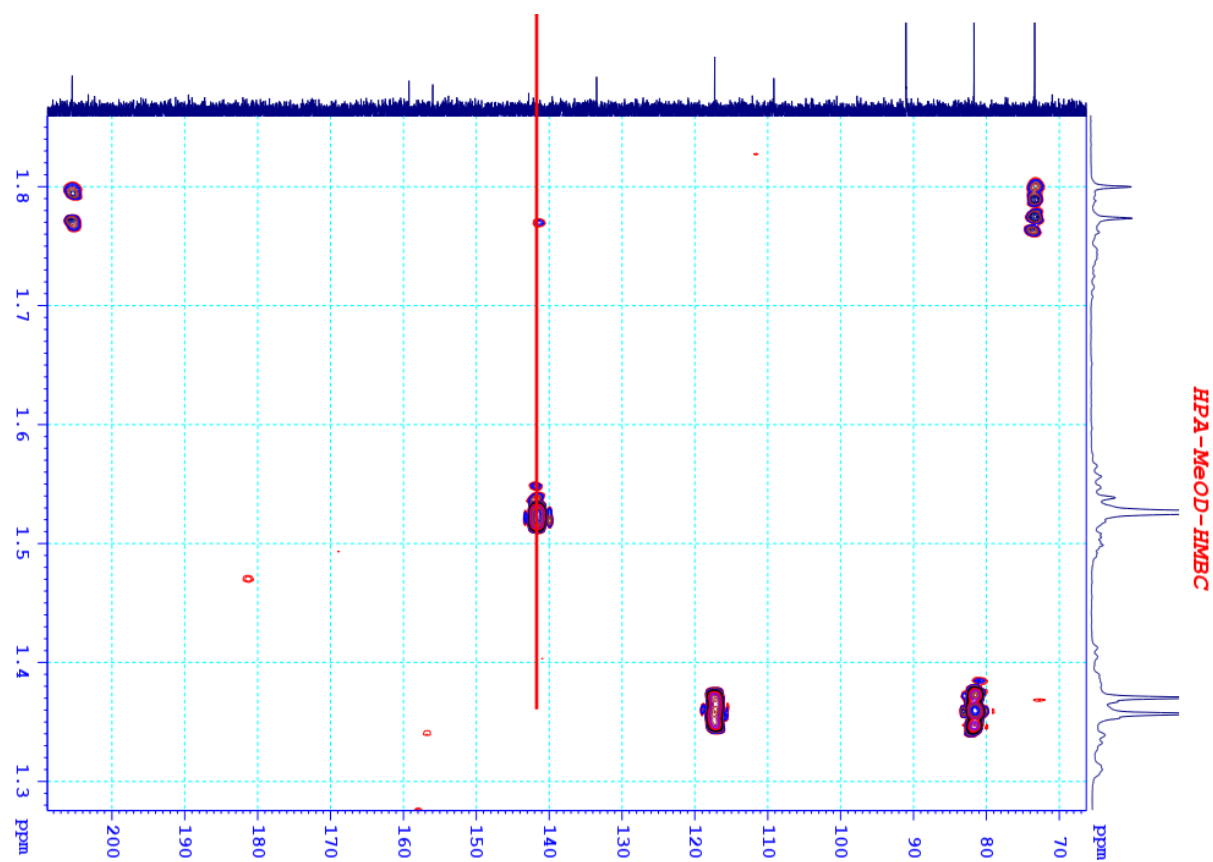
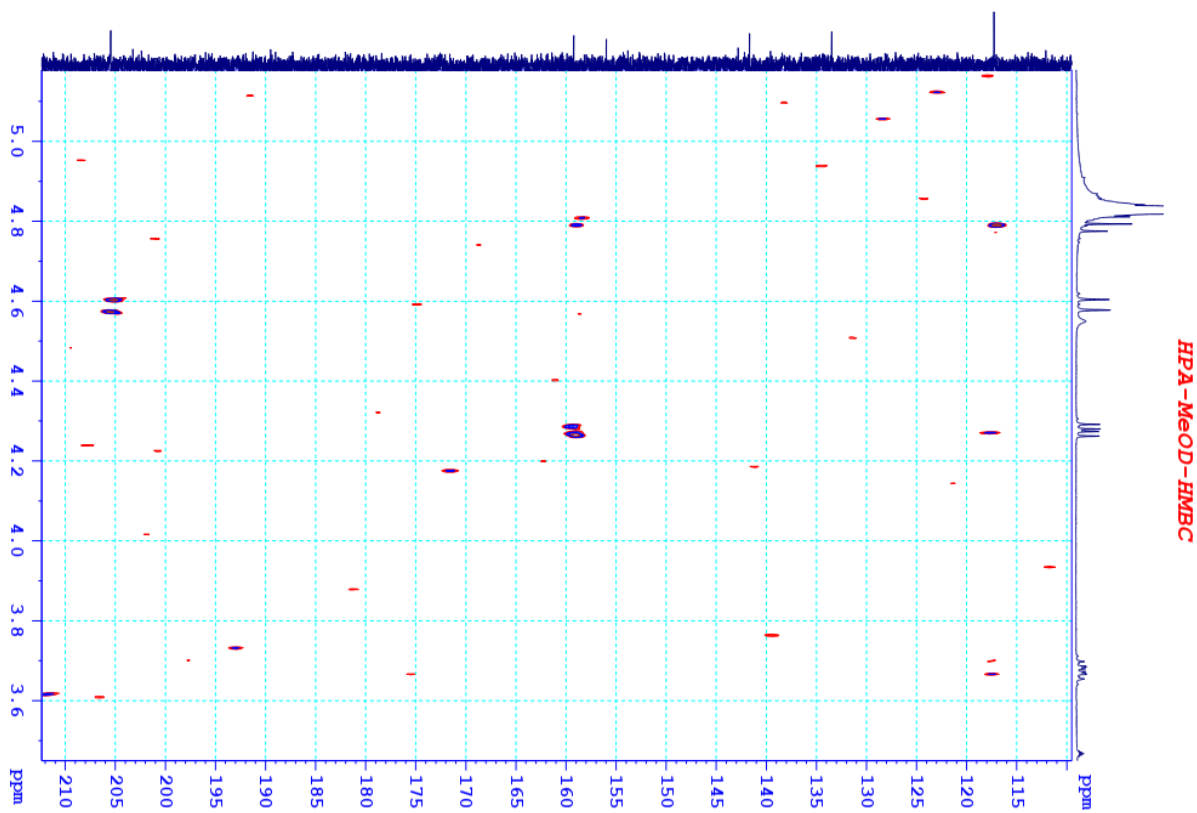
Phổ DEPT của hợp chất HPA



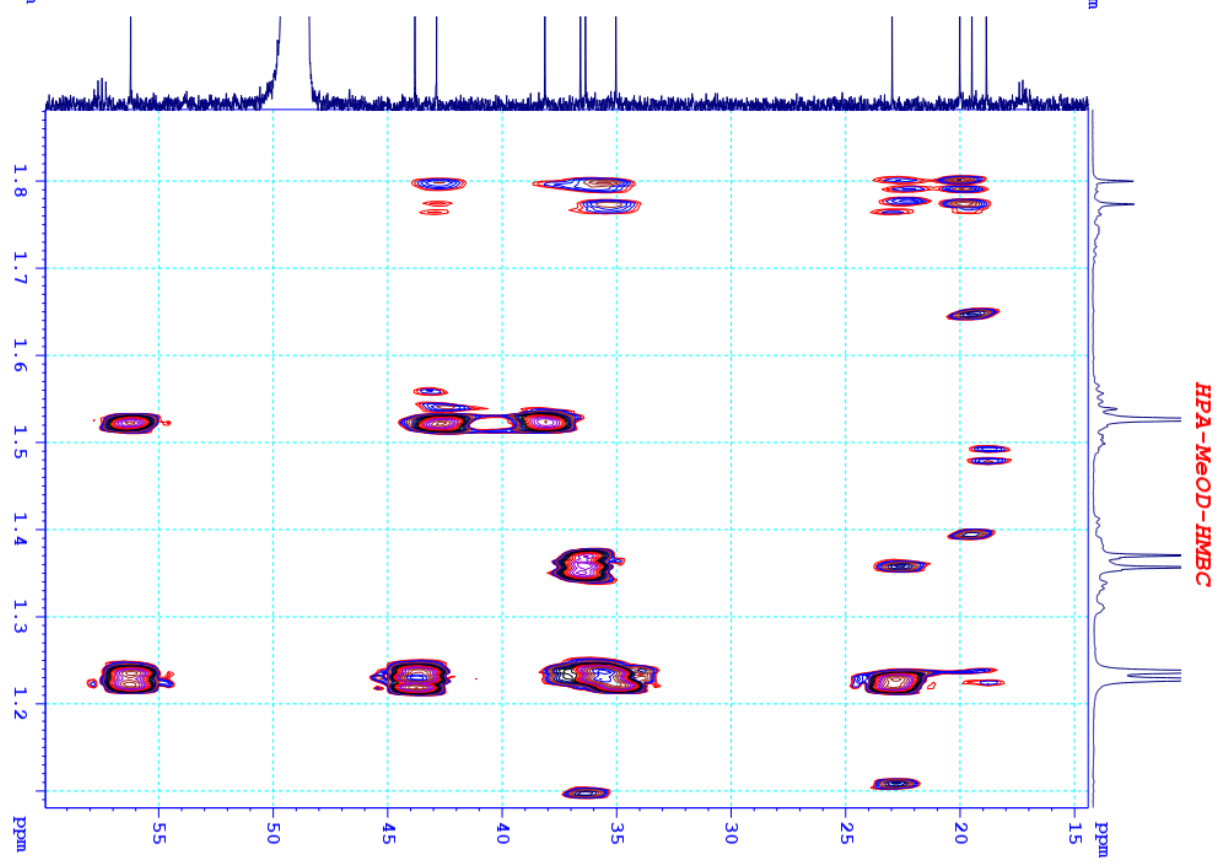
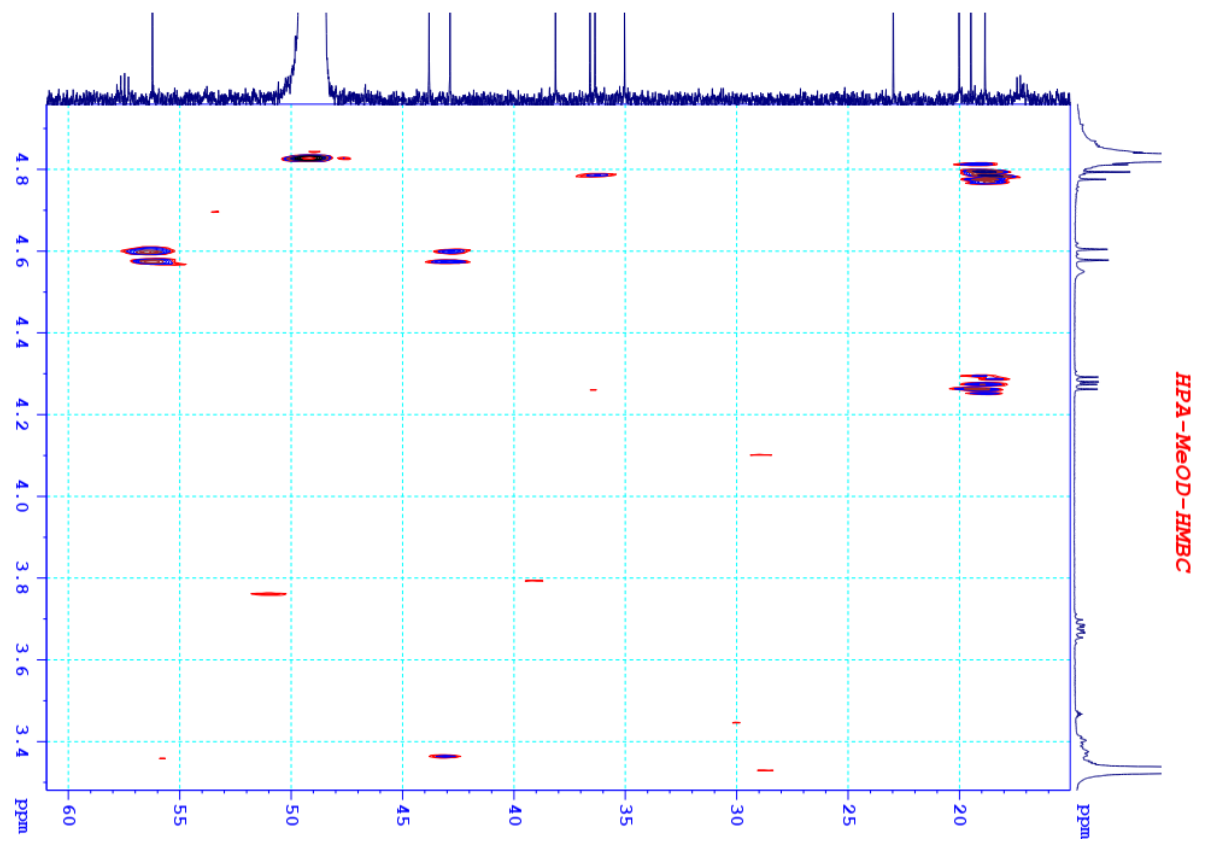
Phổ DEPT của hợp chất HPA



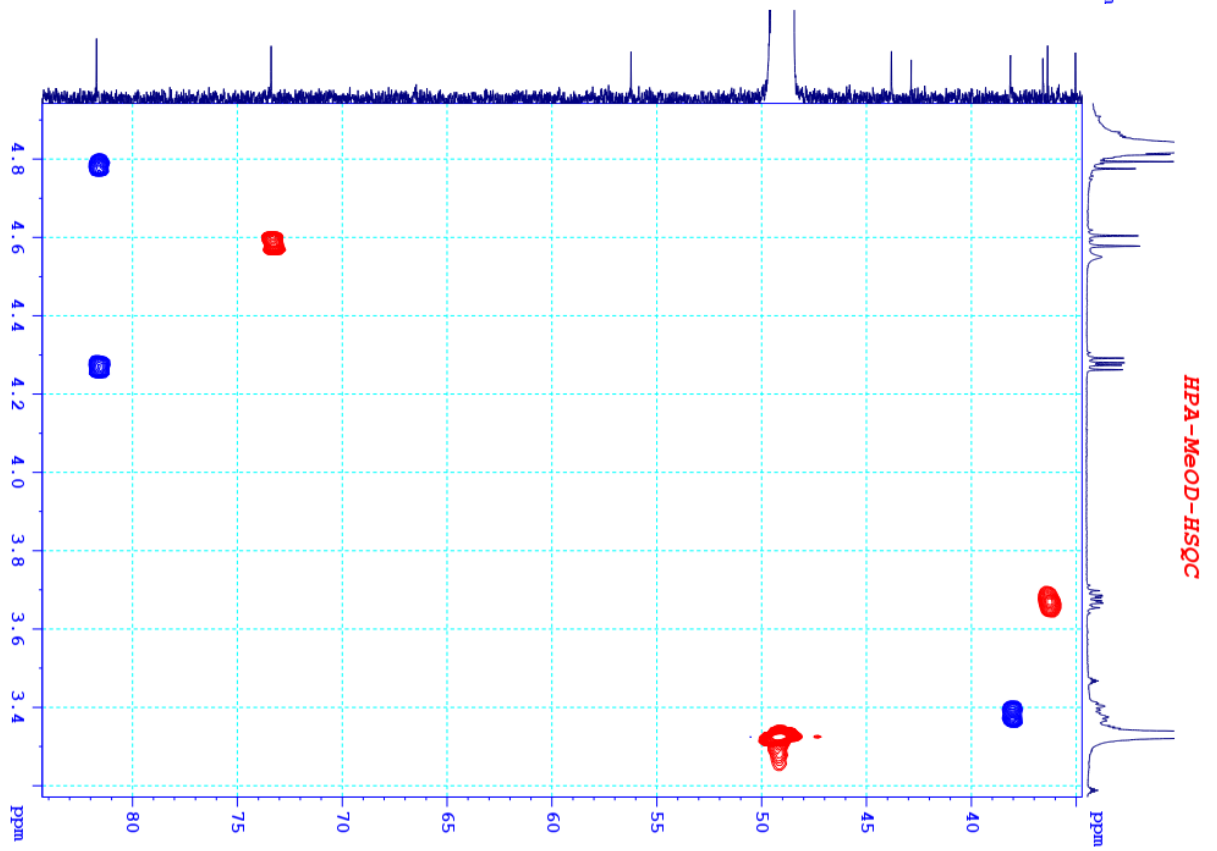
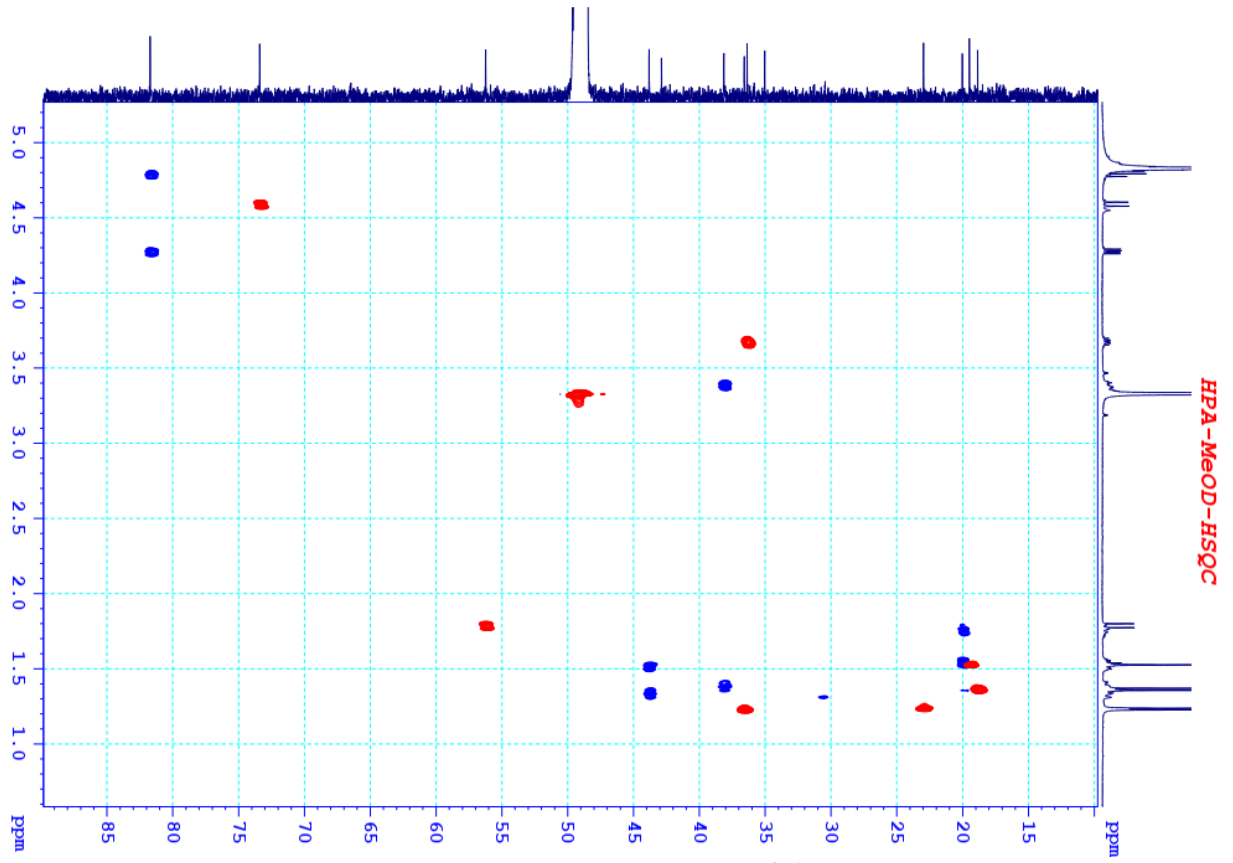
Phổ HMBC của hợp chất HPA



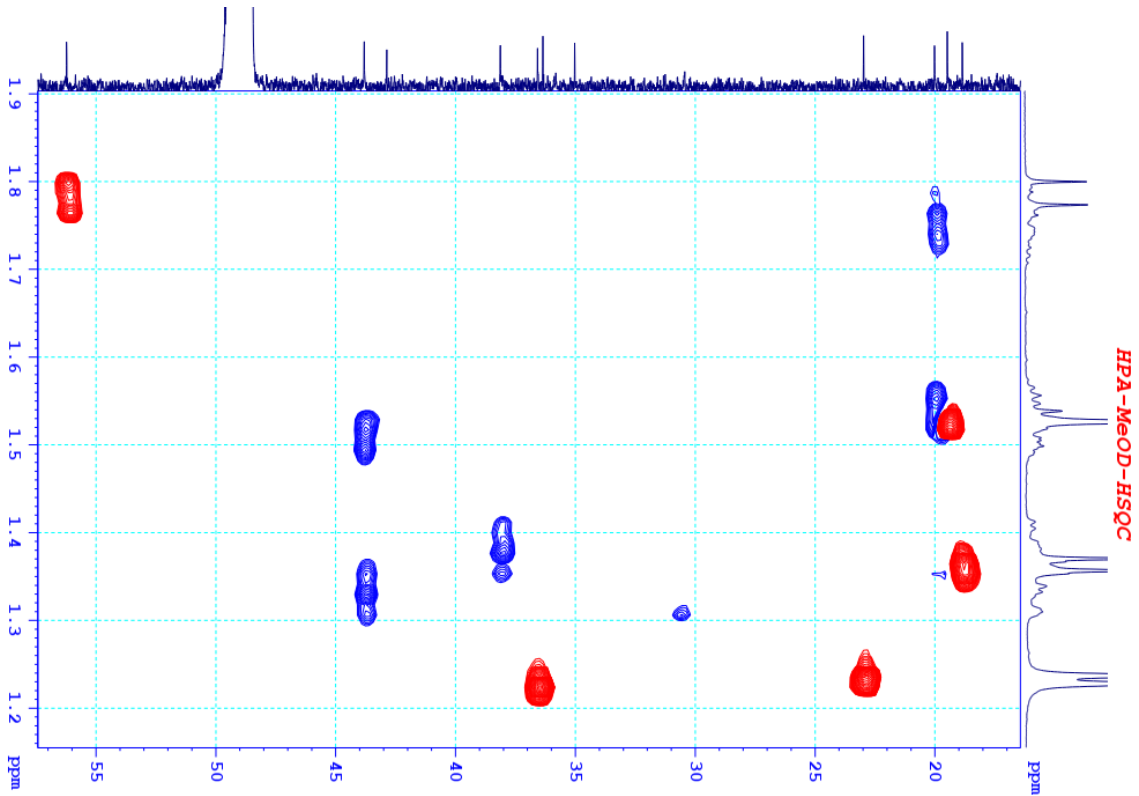
Phổ HMBC của hợp chất HPA



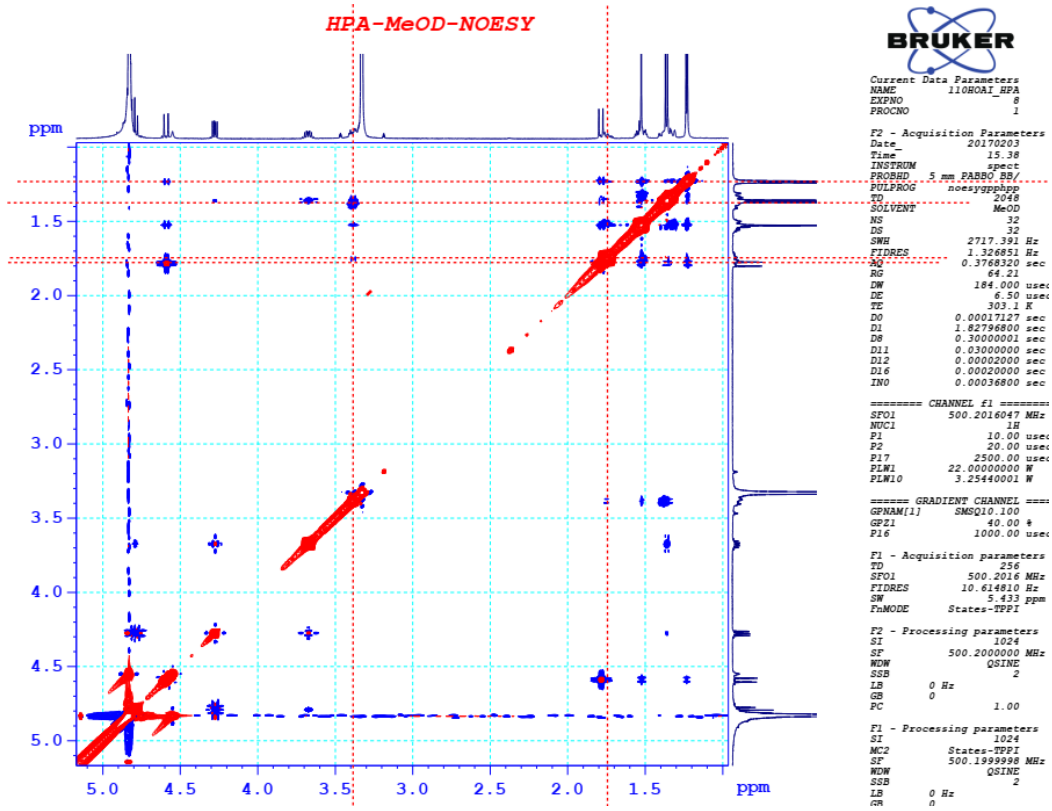
Phổ HMBC của hợp chất HPA



Phổ HSQC của hợp chất HPA

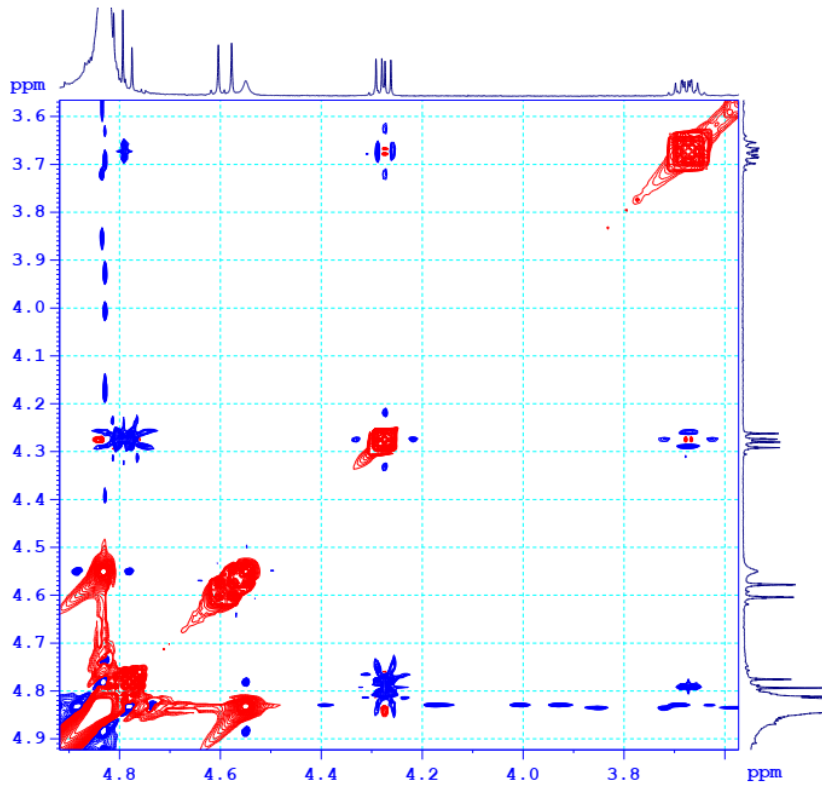


Phổ HSQC của hợp chất HPA



Phổ NOESY của hợp chất HPA

HPA-MeOD-NOESY



Current Data Parameters
NAME 110ROAI_HPA
EXPNO 8
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170203
Time_ 15.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm FAREO BB/
PULPROG noesypphpgp
TD 2048
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 32
SWH 2717.391 Hz
FIDRES 1.326851 Hz
AQ 0.3768320 sec
RG 64.21
DW 184.000 usec
DE 6.50 usec
TE 303.1 K
DO 0.00017127 sec
D1 1.8279800 sec
D8 0.30000001 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00036800 sec

==== CHANNEL f1 =====
SFO1 500.2016047 MHz
NUC1 1H
P1 10.00 usec
P2 20.00 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 22.00000000 W
PLW10 3.2544001 W

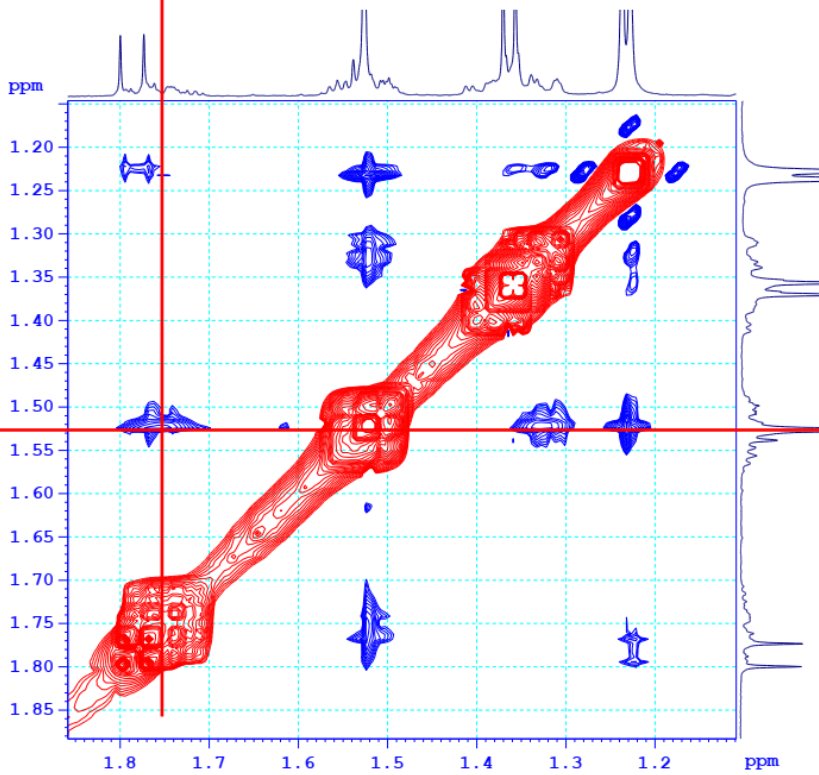
==== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM11) SMCQ10.100
GPZ1 40.00 #
P16 1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD 256
SFO1 500.2016 MHz
FIDRES 10.614810 Hz
SW 5.433 ppm
FnMODE States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 500.2000000 MHz
WDW QSINE
SSB 2
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 States-TPPI
SF 500.1999998 MHz
WDW QSINE
SSB 2
LB 0 Hz
GB 0

HPA-MeOD-NOESY



Current Data Parameters
NAME 110ROAI_HPA
EXPNO 8
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170203
Time_ 15.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm FAREO BB/
PULPROG noesypphpgp
TD 2048
SOLVENT MeOD
NS 32
DS 32
SWH 2717.391 Hz
FIDRES 1.326851 Hz
AQ 0.3768320 sec
RG 64.21
DW 184.000 usec
DE 6.50 usec
TE 303.1 K
DO 0.00017127 sec
D1 1.8279800 sec
D8 0.30000001 sec
D11 0.03000000 sec
D12 0.00002000 sec
D16 0.00020000 sec
INO 0.00036800 sec

==== CHANNEL f1 =====
SFO1 500.2016047 MHz
NUC1 1H
P1 10.00 usec
P2 20.00 usec
P17 2500.00 usec
PLW1 22.00000000 W
PLW10 3.2544001 W

==== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM11) SMCQ10.100
GPZ1 40.00 #
P16 1000.00 usec

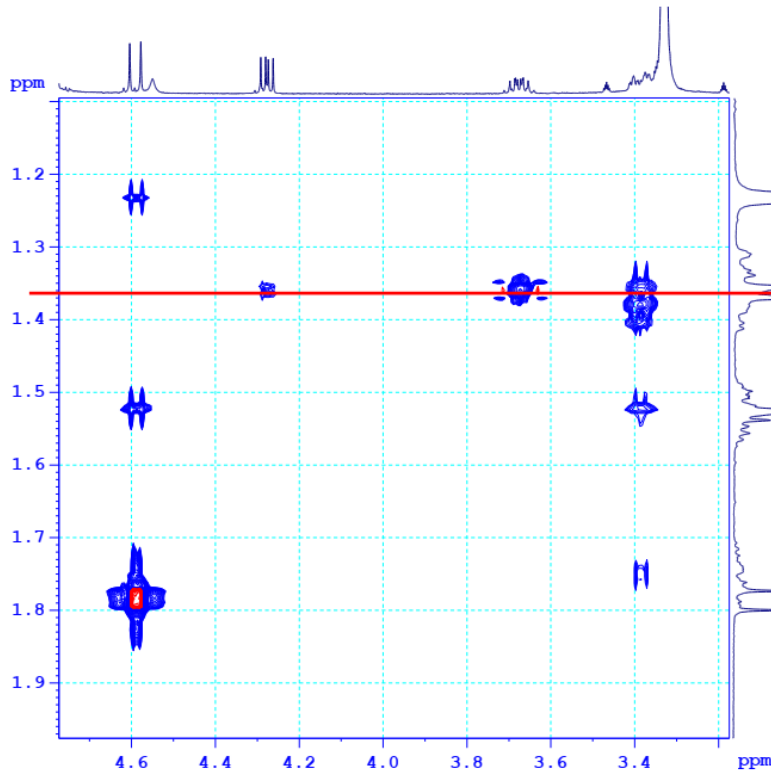
F1 - Acquisition parameters
TD 256
SFO1 500.2016 MHz
FIDRES 10.614810 Hz
SW 5.433 ppm
FnMODE States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 500.2000000 MHz
WDW QSINE
SSB 2
LB 0 Hz
GB 0
PC 1.00

F1 - Processing parameters
SI 1024
MC2 States-TPPI
SF 500.1999998 MHz
WDW QSINE
SSB 2
LB 0 Hz
GB 0

Phổ NOESY của hợp chất HPA

HPA-MeOD-NOESY



```
Current Data Parameters
NAME      11080A1_HPA
EXPNO     8
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20170203
Time      15.38
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   noesypphpgp
TD         2048
SOLVENT   MeOD
NS         32
DS         32
SWH        2717.391 Hz
FIDRES     1.328851 Hz
AQ         0.3768320 sec
RG         64.21
DW         184.000 usec
DE         6.50 usec
TE         303.1 K
DO         0.00017127 sec
D1         1.82796800 sec
D11        0.30000001 sec
D12        0.03000000 sec
D13        0.00002000 sec
D16        0.00020000 sec
INO        0.00036800 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      500.2016047 MHz
NUC1      1H
P1         10.00 usec
P2         20.00 usec
P17        2500.00 usec
PLN1      22.00000000 W
PLN10     3.25440001 W

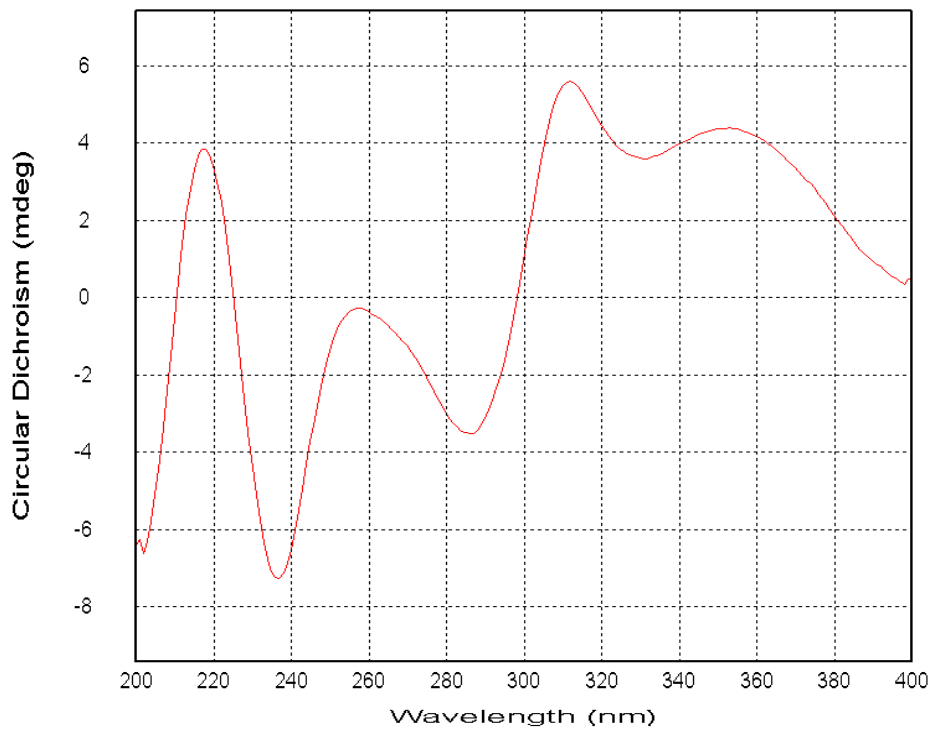
===== GRADIENT CHANNEL =====
GPNAM[1]  SMSQ10.100
GPZ1      40.00 %
P16       1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         256
SFO1      500.2016 MHz
FIDRES     10.614810 Hz
SW         5.433 ppm
FhMODE     States-TPPI

F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         500.2000000 MHz
WDW        QSINE
SSB        2
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.00

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        States-TPPI
SF         500.1999998 MHz
WDW        QSINE
SSB        2
LB         0 Hz
GB         0
```

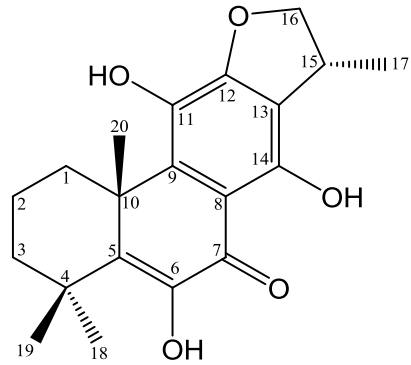
Phổ NOESY của hợp chất HPA



Phổ CD của hợp chất HPA

Phụ lục 3.7. Phổ của hợp chất HPB (Lycoxanthol)

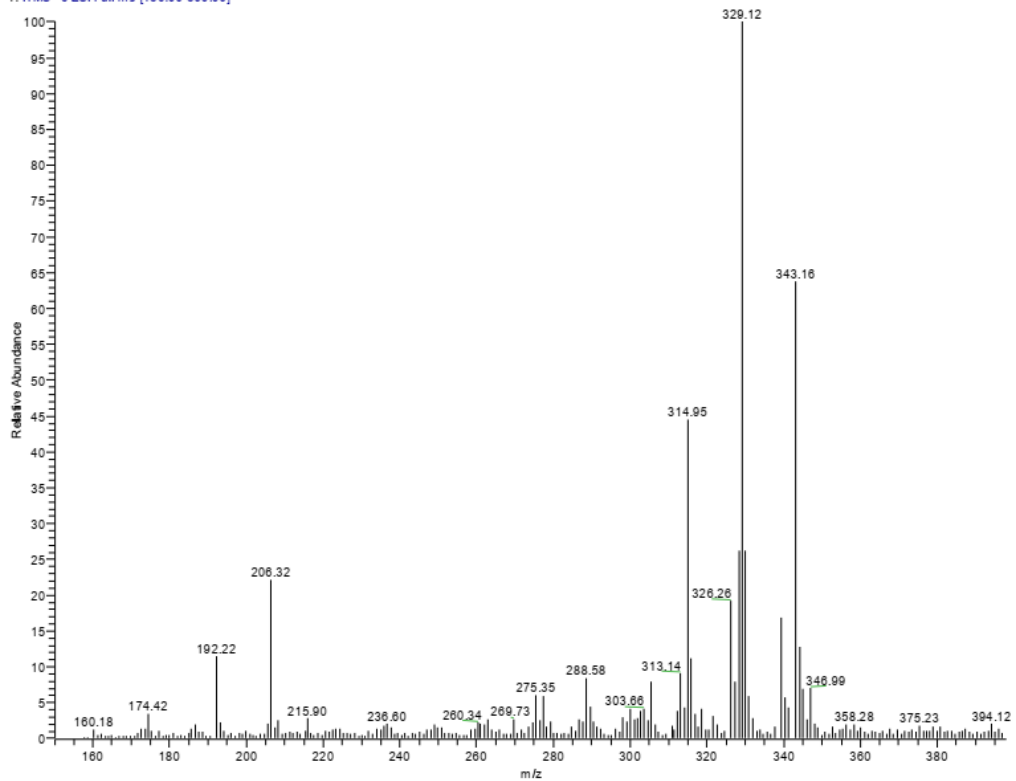
- Phổ ESI-MS
- Phổ UV
- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ DEPT
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC
- Phổ NOESY
- Phổ CD



C:\LTQ OrbitrapL\HPB_170217141017
MEOH

2/17/2017 2:10:17 PM

HPB_170217141017 #3887 RT: 26.11 AV: 1 NL: 2.24E5
T: ITMS - c ESI Full ms [150.00-500.00]

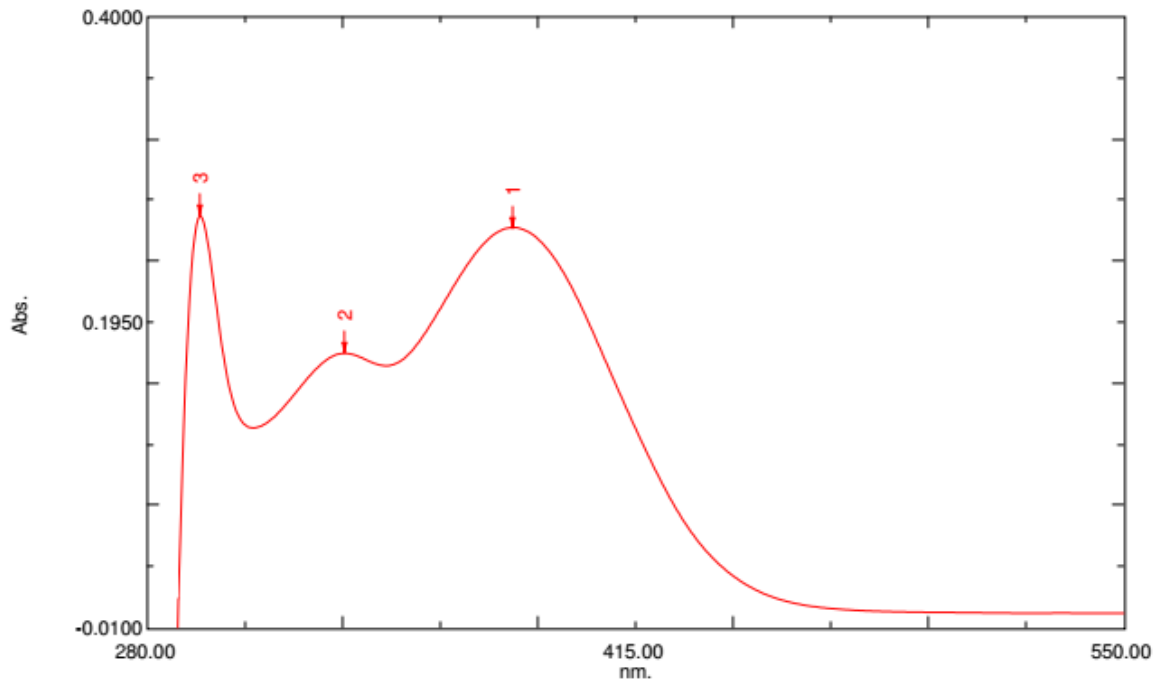


Phổ HR-ESI-MS của hợp chất HPB

Spectrum Peak Pick Report

02/06/2017 03:01:53 PM

Data Set: HPB_143833.spc - Dataset 150051



Measurement Properties
Wavelength Range (nm.): 190.00 to 1100.00
Scan Speed: Medium
Sampling Interval: 0.50
Auto Sampling Interval: Disabled
Scan Mode: Auto

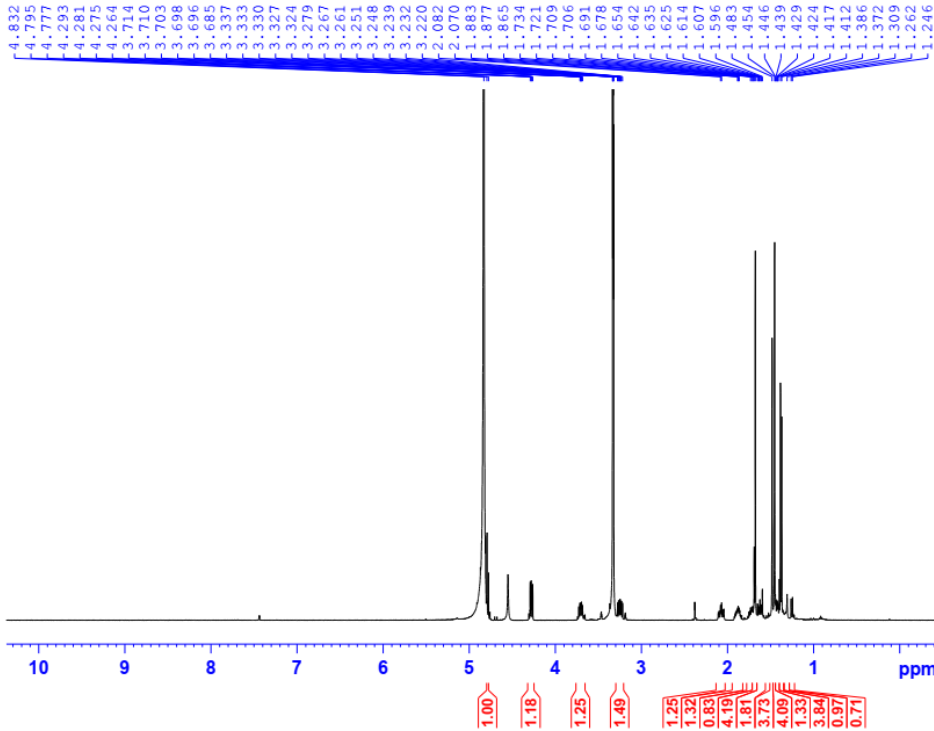
Instrument Properties
Instrument Type: UV-1800 Series
Measuring Mode: Absorbance
Slit Width: 1.0 nm
Light Source Change Wavelength: 340.8 nm
S/R Exchange: Normal

Attachment Properties
Attachment: None

No.	P/V	Wavelength	Abs.	Description
1	●	381.00	0.2586	
2	●	334.50	0.1742	
3	●	294.50	0.2663	
4	●	263.50	-0.9717	
5	●	202.50	0.3219	

Phổ UV của hợp chất HPB

HPB-MeOD-1H



```

Current Data Parameters
NAME      110H0A1_HP
EXPNO     1
PROCNO    1

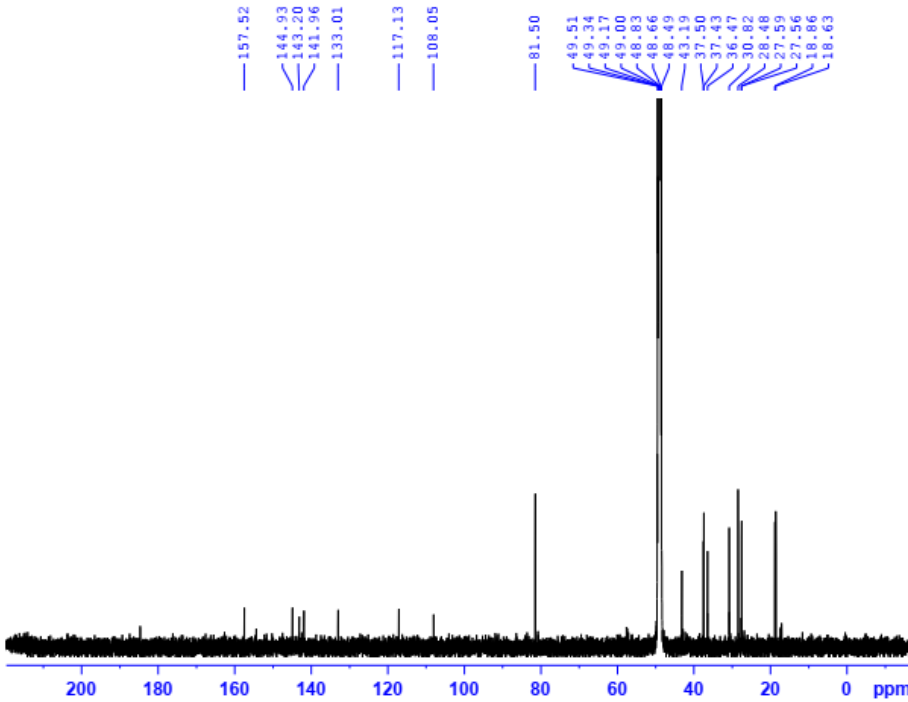
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20170123
Time      10.13
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   zgpg30
ID        65536
SOLVENT   MeOD
NS        16
DS        2
SWH       10000.000 Hz
FIDRES    0.152588 Hz
AQ        3.2767999 sec
RG        157.95
DM        80.000 usec
DE        6.50 usec
TE        303.1 K
DL        1.00000000 sec
TDO       1

===== CHANNEL f1 =====
SF01     500.2030889 MHz
NUC1     1H
P1        10.00 usec
PLW1     22.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        500.1999994 MHz
WDW       EM
SSB       0
GB        0.30 Hz
PC        1.00
    
```

Phổ ¹H-NMR của hợp chất HPB

HPB-MeOD-C13CPD



```

Current Data Parameters
NAME      110H0A1_HP
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20170127
Time      20.52
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   zgpg30
ID        65536
SOLVENT   MeOD
NS        16384
DS        4
SWH       19761.904 Hz
FIDRES    0.494131 Hz
AQ        1.1010048 sec
RG        198.87
DM        16.800 usec
DE        6.50 usec
TE        303.1 K
DL        2.00000000 sec
D11       0.02000000 sec
TDO       1

===== CHANNEL f1 =====
SF01     125.7679670 MHz
NUC1     13C
P1        10.00 usec
PLW1     88.00000000 W

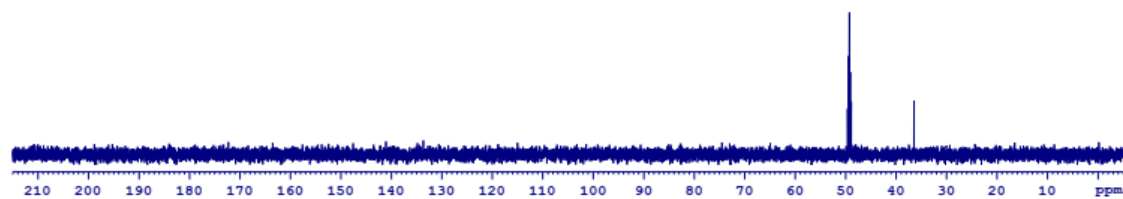
===== CHANNEL f2 =====
SF02     500.2020008 MHz
NUC2     1H
CPDPRG2   waltz16
PCPD1     80.00 usec
PLM1     22.00000000 W
PLM11    0.34275000 W
PLM13    0.22000000 W

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        125.7753990 MHz
WDW       EM
SSB       0
GB        0.100 Hz
PC        1.40
    
```

Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HPB

HPB-MeOD-C13CPD &DEPT

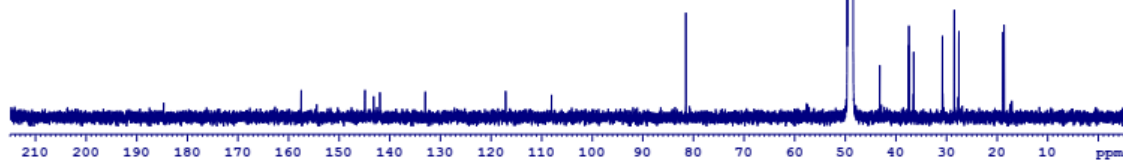
DEPT90



DEPT135

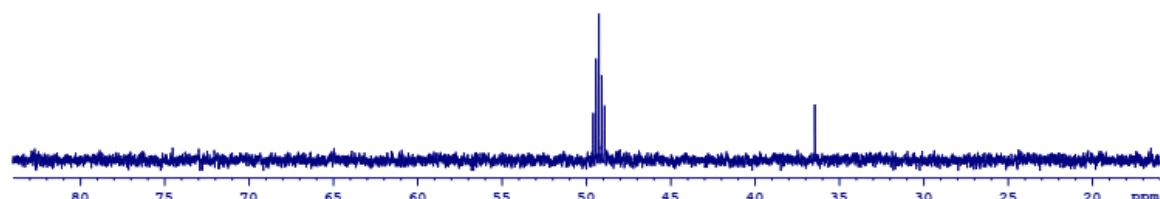


C13CPD

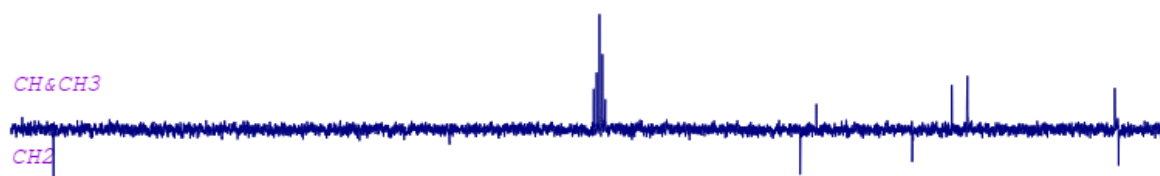


HPB-MeOD-C13CPD &DEPT

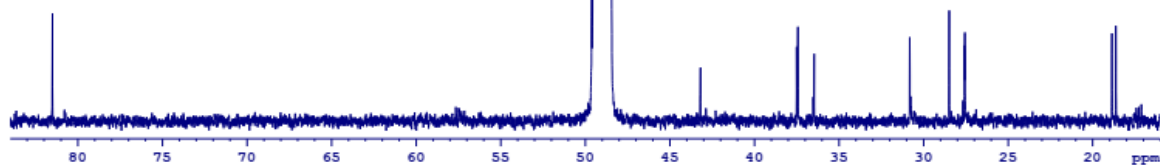
DEPT90



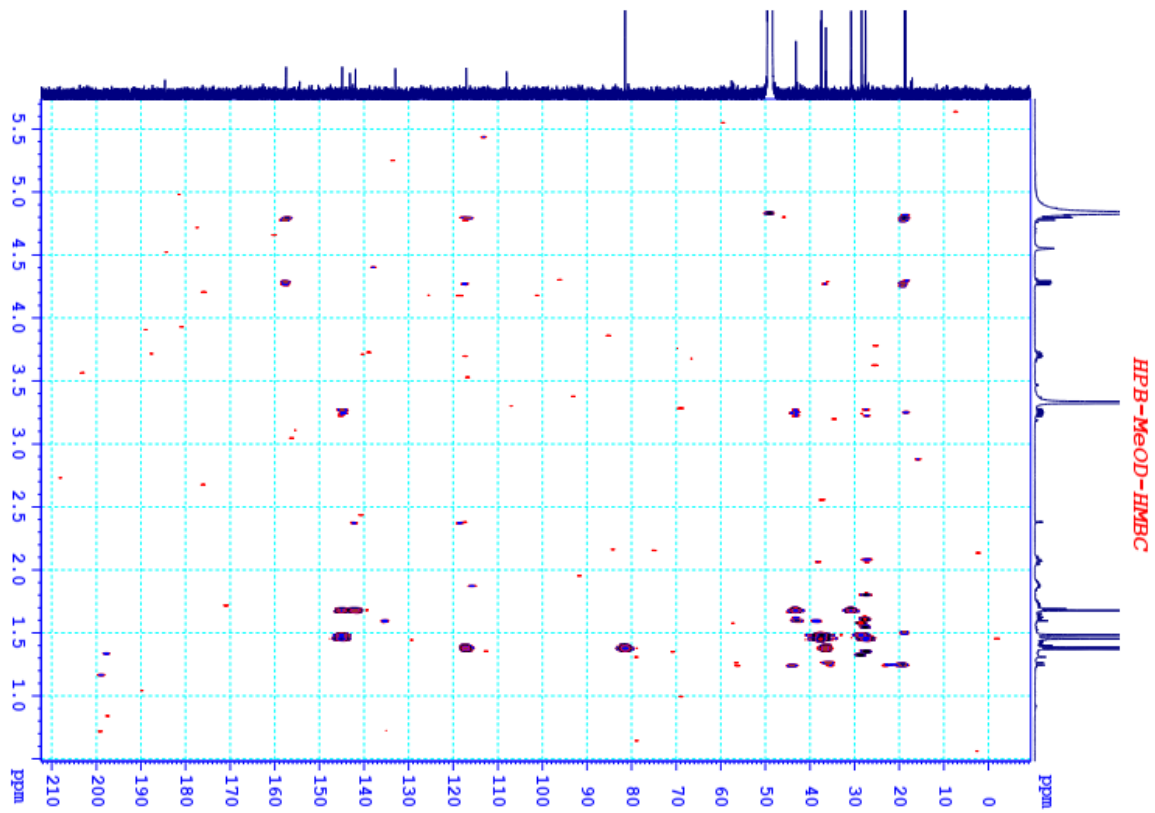
DEPT135



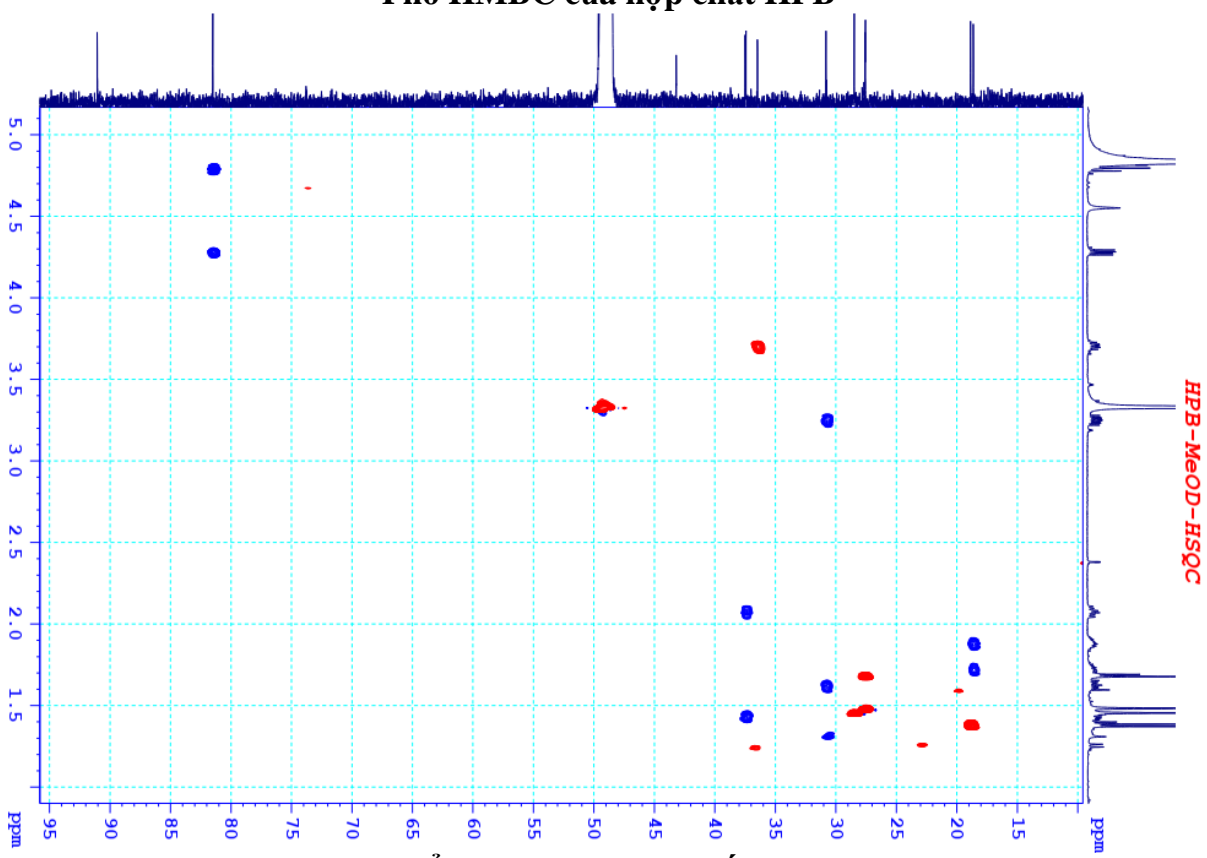
C13CPD



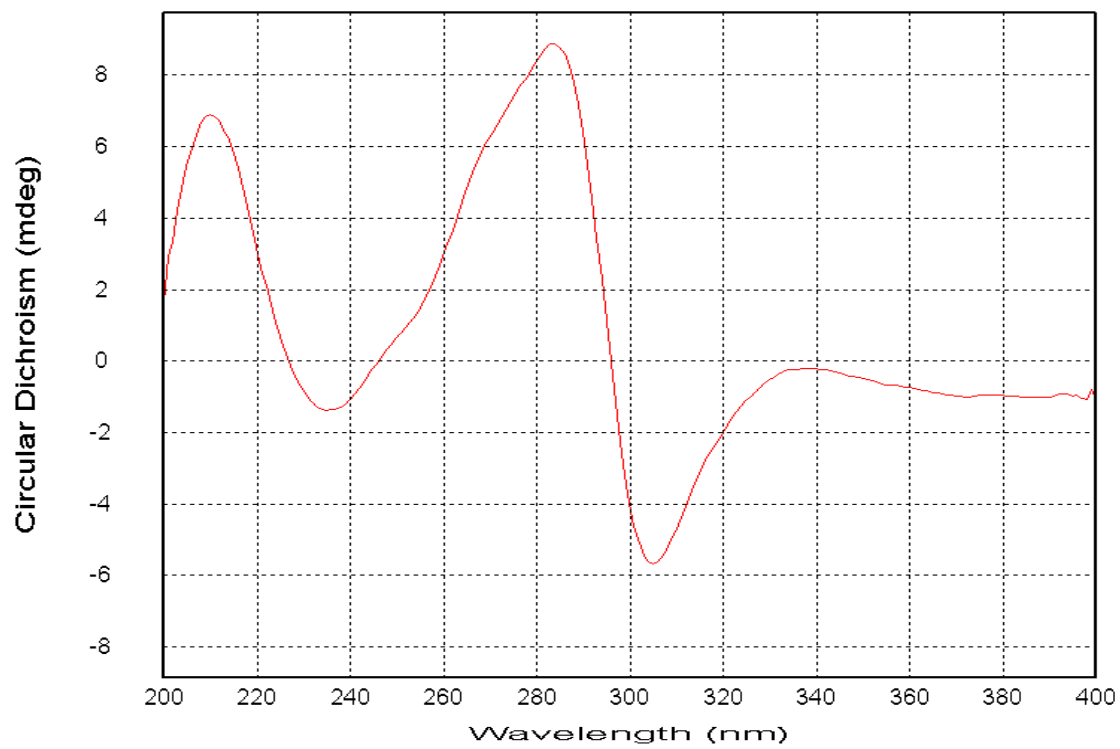
Phổ DEPT của hợp chất HPB



Phổ HMBC của hợp chất HPB



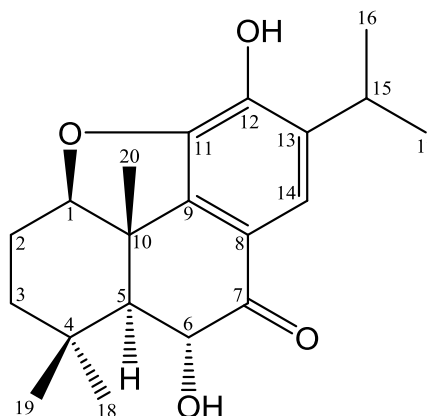
Phổ HSQC của hợp chất HPB



Phổ CD của hợp chất HPB

Phụ lục 3.8. Phổ của hợp chất HPH (Huperphlegmarin B)

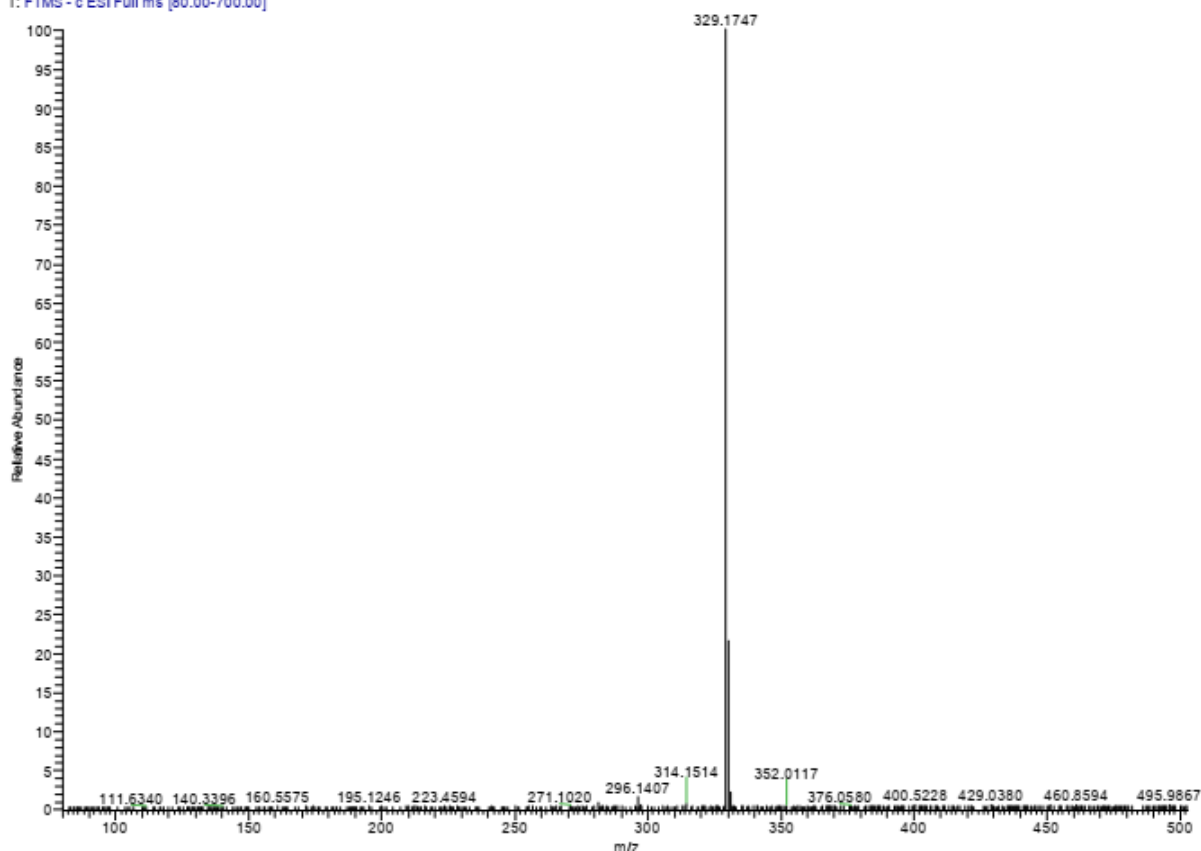
- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ DEPT
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC
- Phổ NOESY
- Phổ CD



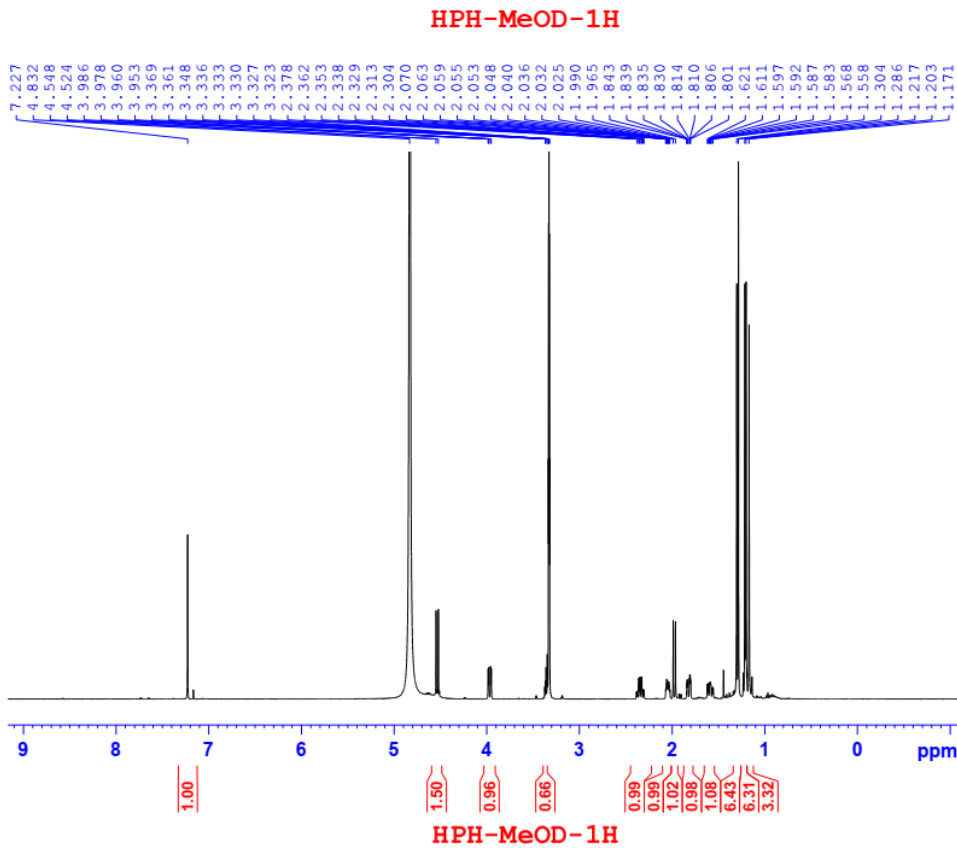
C:\LTQ Orbitrap\...IT3\HPH_170307144616
MEOH

3/7/2017 2:46:16 PM

HPH_170307144616#126 RT: 0.72 AV: 1 NL: 4.92E7
T: FTMS - c ESI Full ms [80.00-700.00]



Phổ HR-ESI-MS của hợp chất HPH



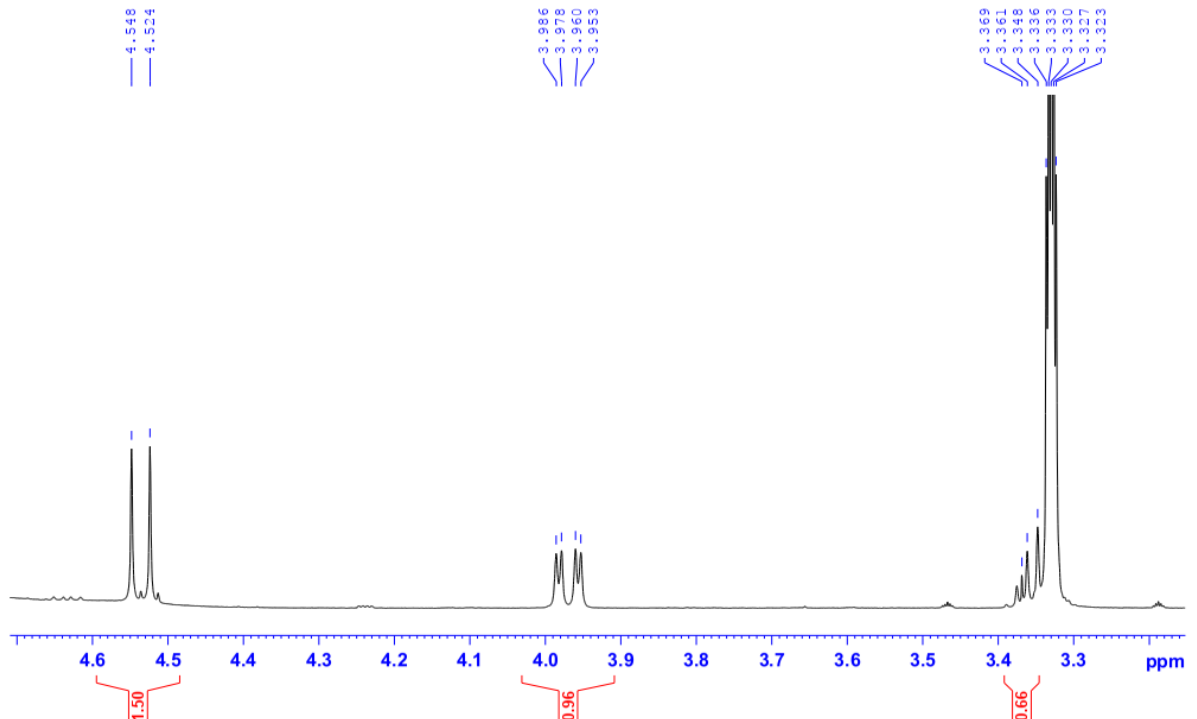
BRUKER

Current Data Parameters
 NAME 110H0AI_HPH
 EXPNO 1
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20170222
 Time 11.59
 INSTRUM spect
 PROBHD 5 mm PABBO BB/
 PULPROG zg30
 TD 65536
 SOLVENT MeOD
 NS 16
 DS 2
 SWH 10000.000 Hz
 FIDRES 0.152588 Hz
 AQ 3.2767999 sec
 RG 127.68
 DW 50.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 303.8 K
 D1 1.00000000 sec
 TDO 1

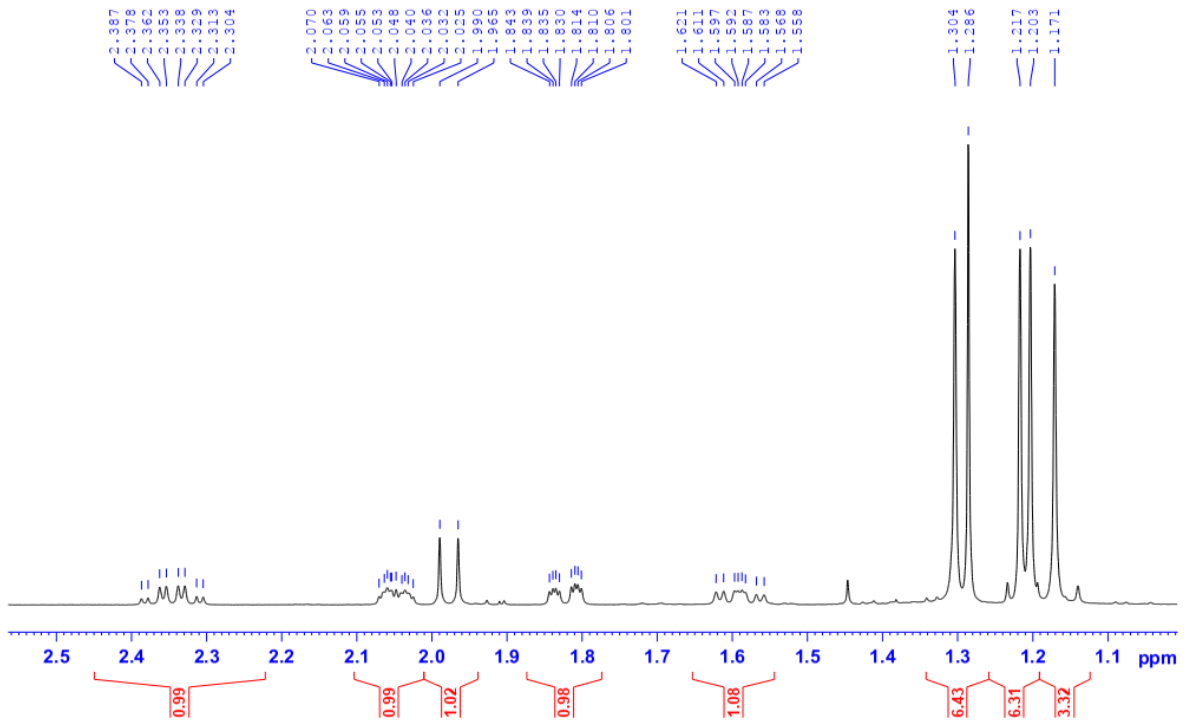
===== CHANNEL f1 =====
 SFO1 500.2030889 MHz
 NUC1 1H
 P1 10.00 usec
 PLW1 22.00000000 W

F2 - Processing parameters
 SI 65536
 SF 500.2000000 MHz
 WDW EM
 SSB 0
 LB 0.30 Hz
 GB 0
 PC 1.00



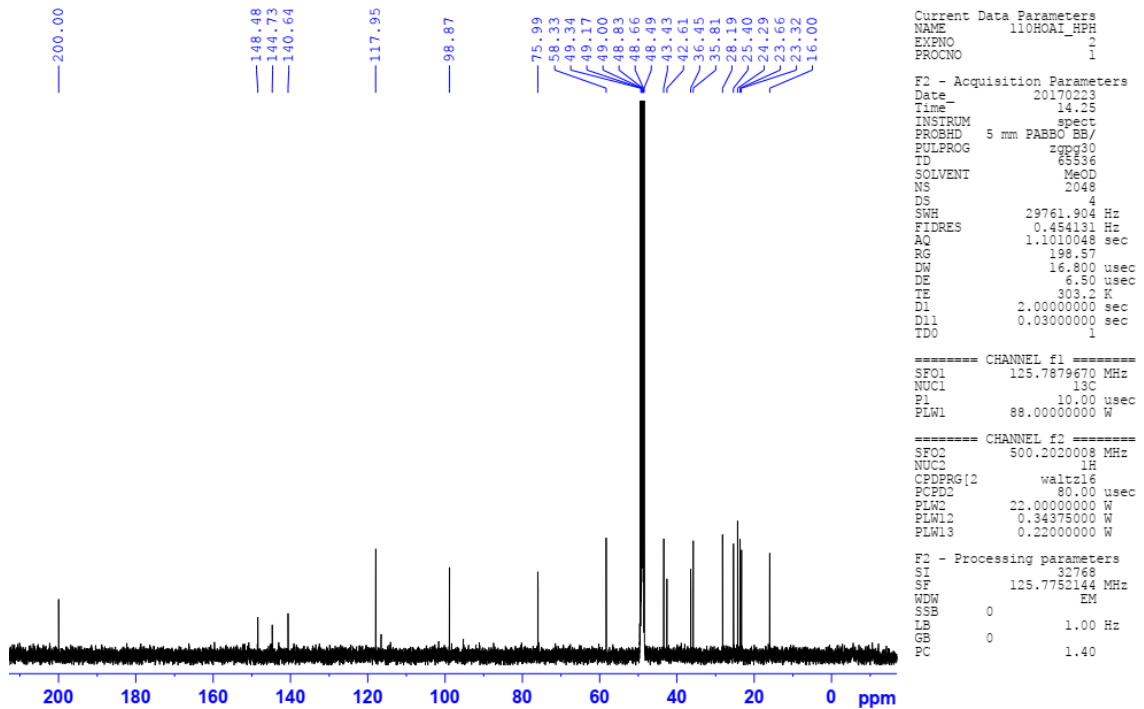
Phổ ¹H-NMR của hợp chất HPH

HPH-MeOD-1H

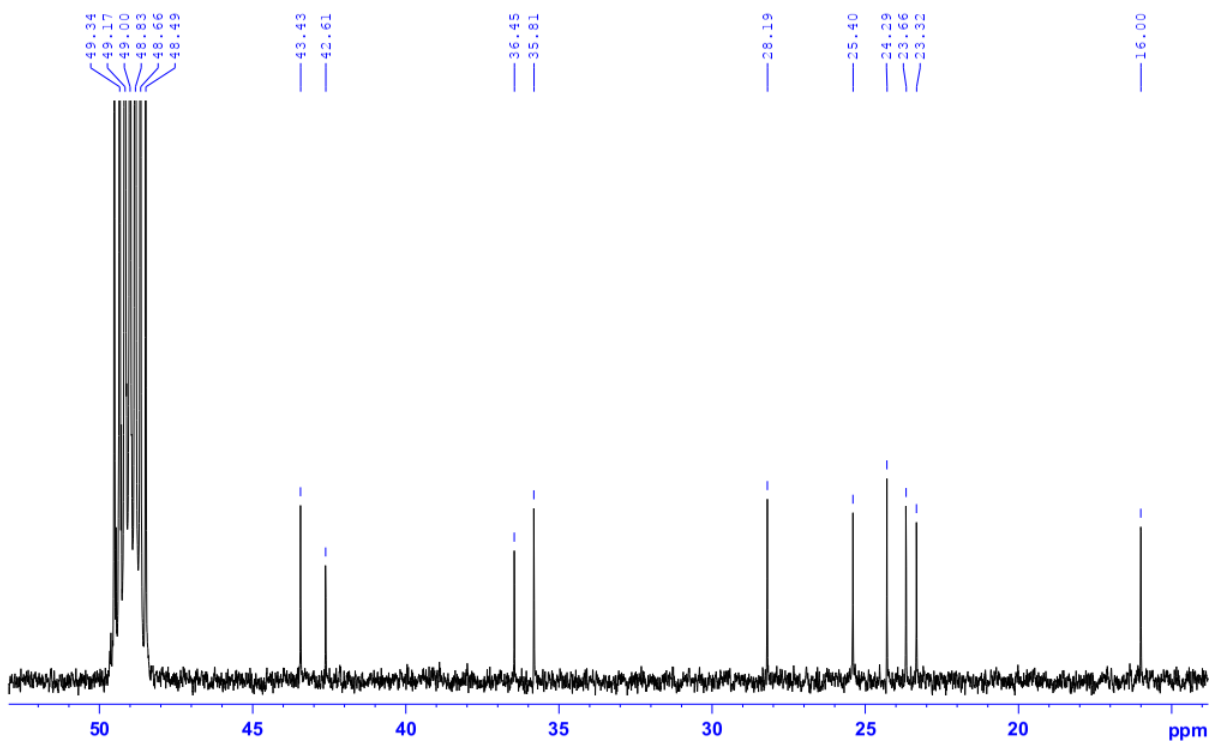
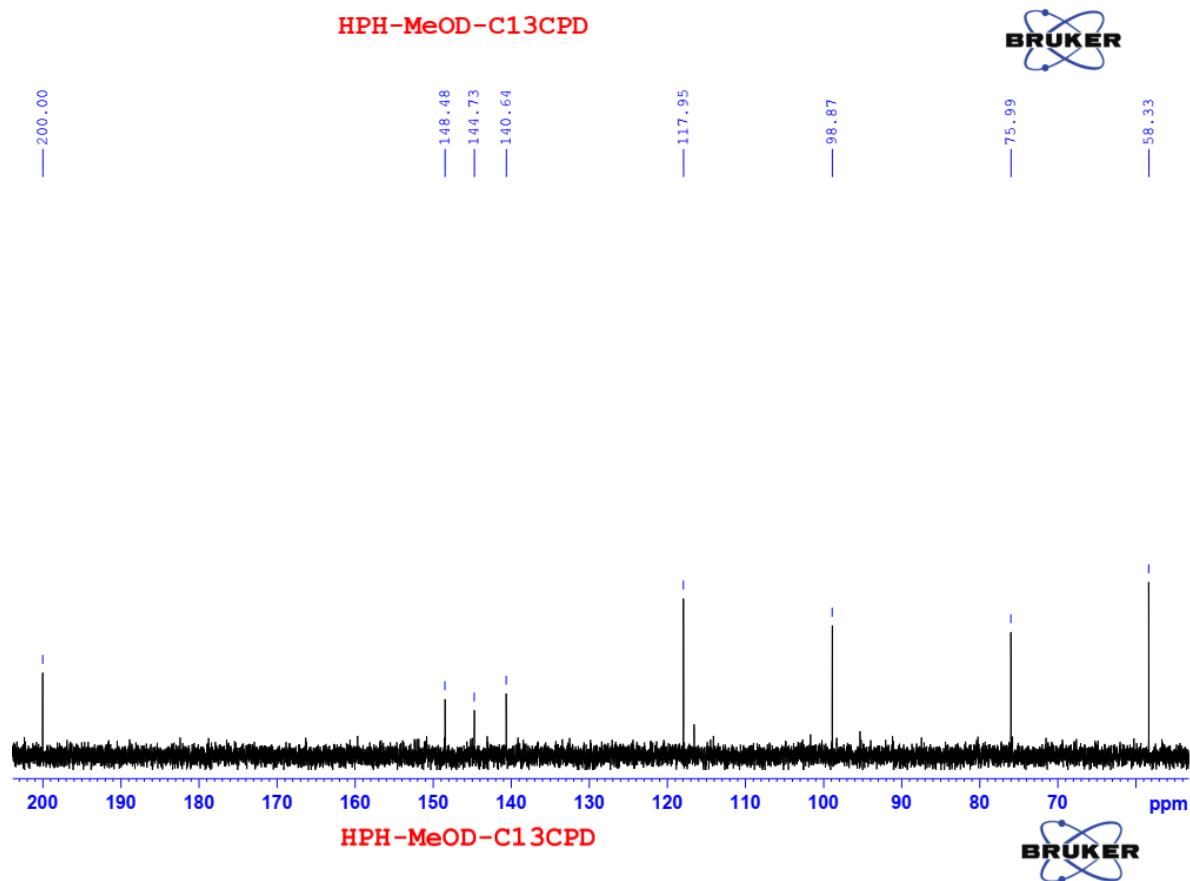


Phổ ¹H-NMR của hợp chất HPH

HPH-MeOD-C13CPD



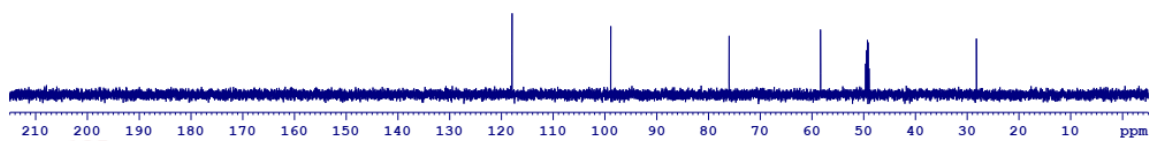
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HPH



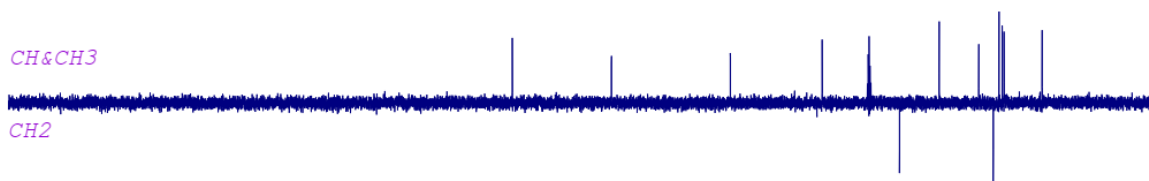
Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất HPH

HPH-MeOD-C13CPD&DEPT

DEPT90



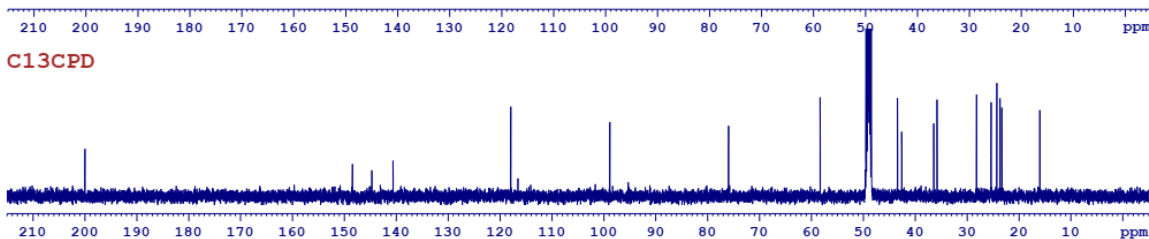
DEPT135



CH&CH3

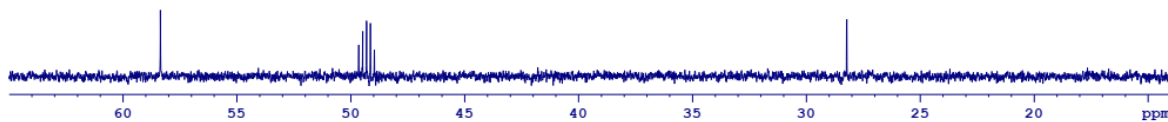
CH2

C13CPD

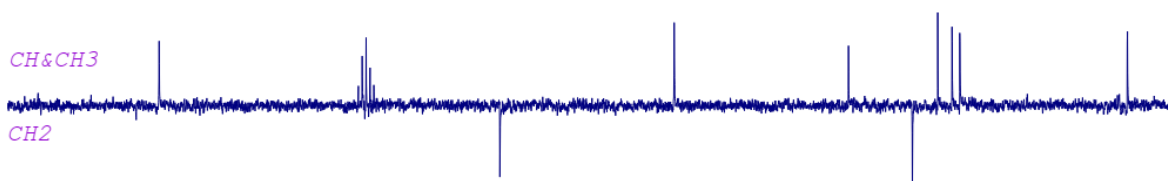


HPH-MeOD-C13CPD&DEPT

DEPT90



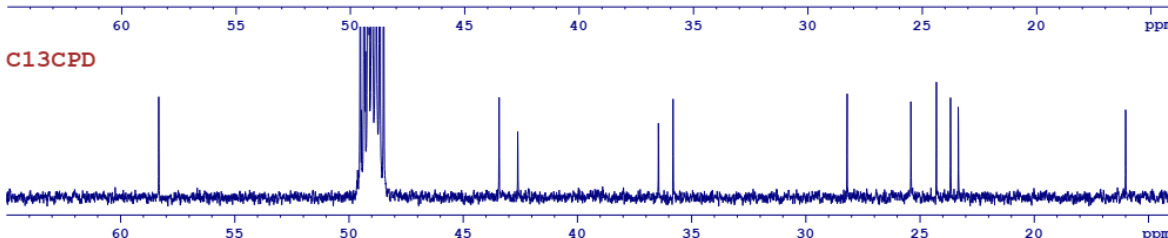
DEPT135



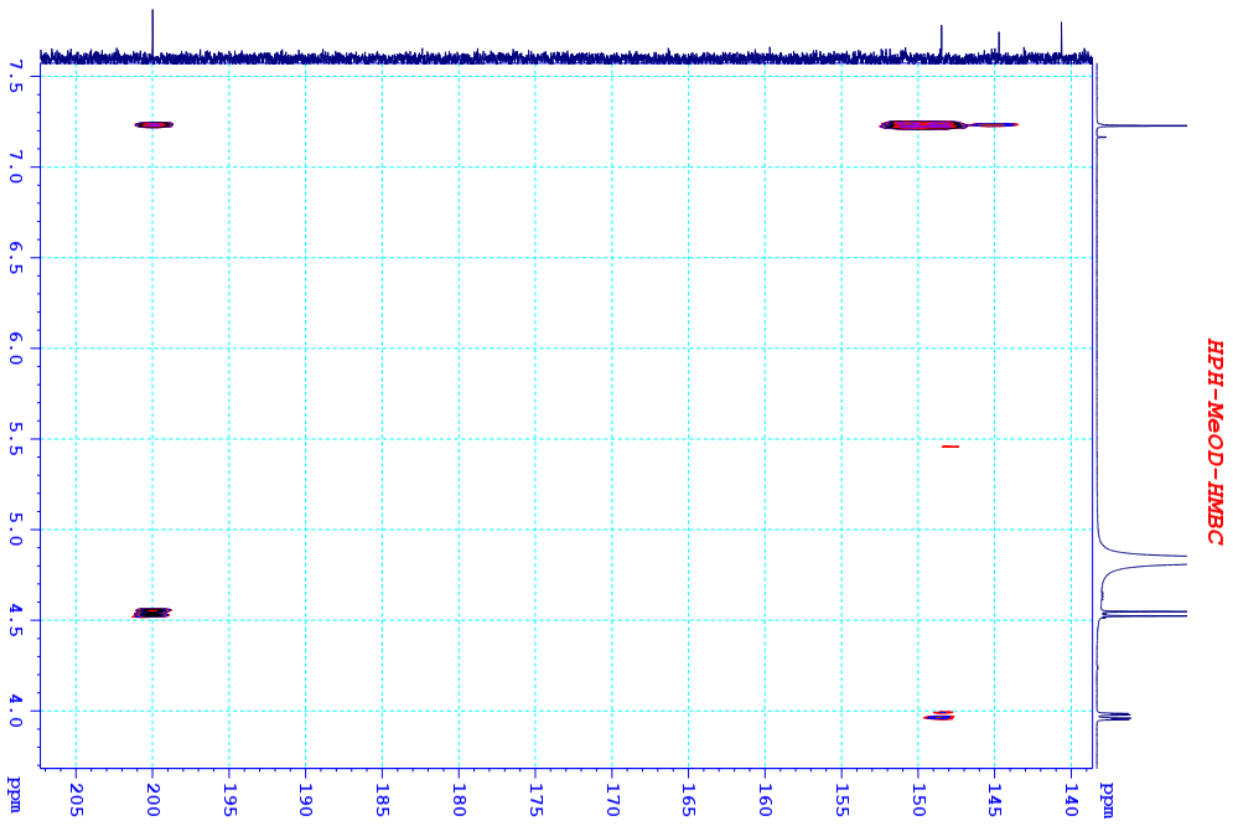
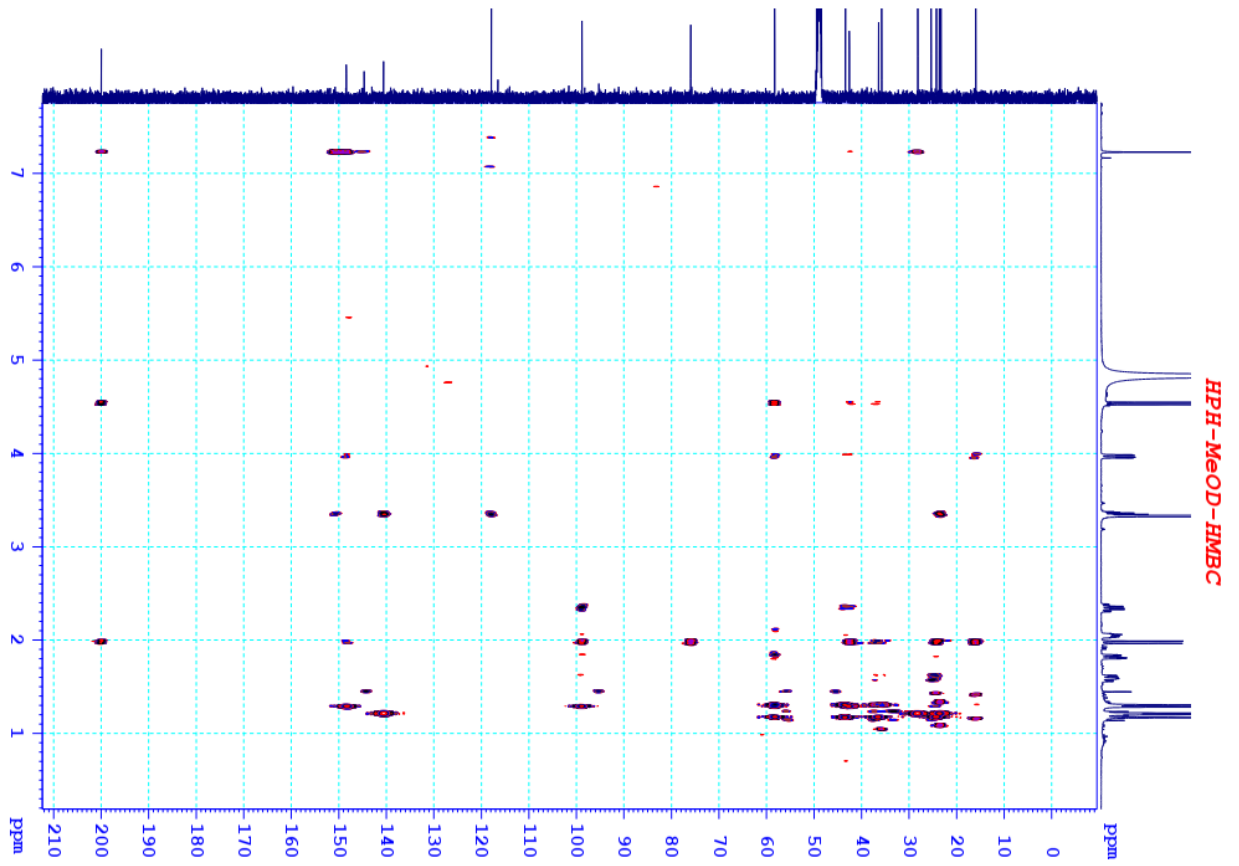
CH&CH3

CH2

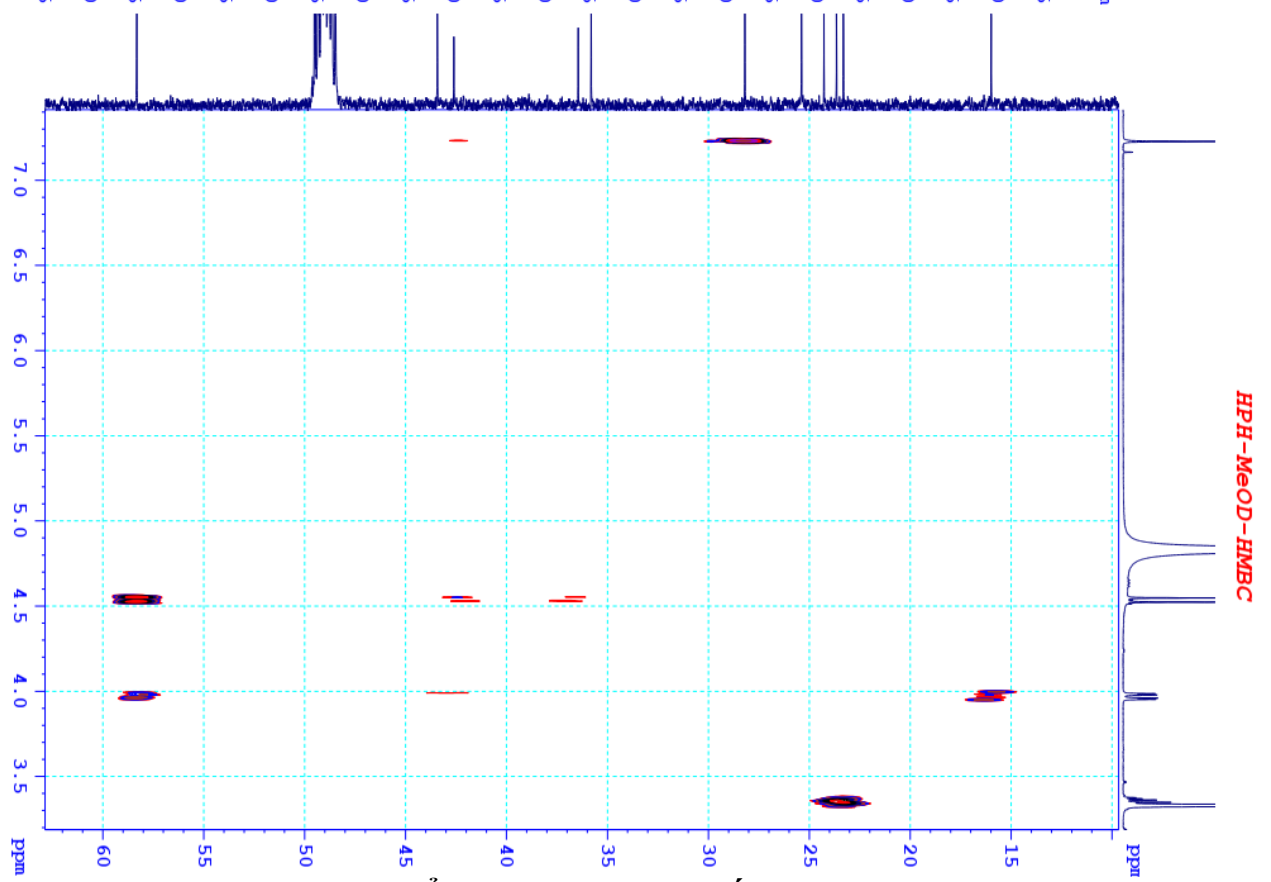
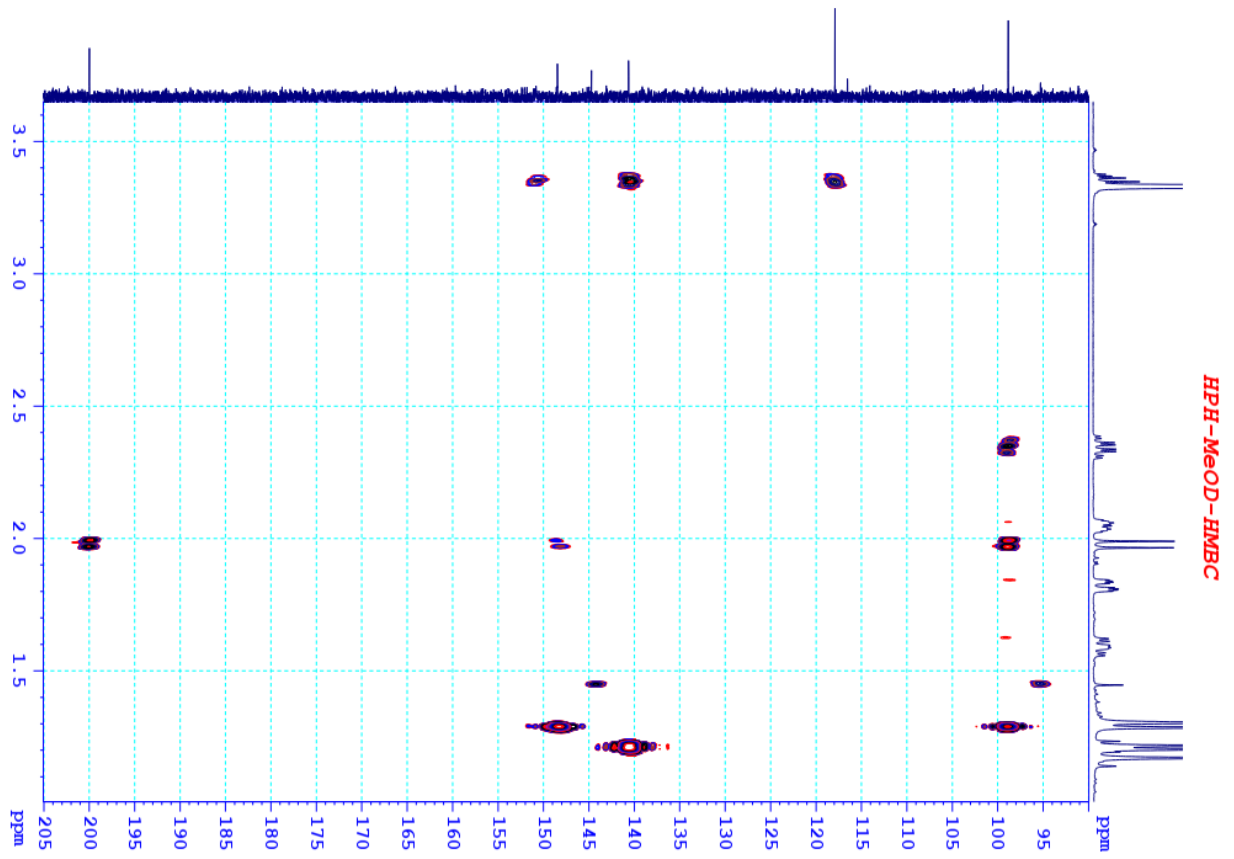
C13CPD



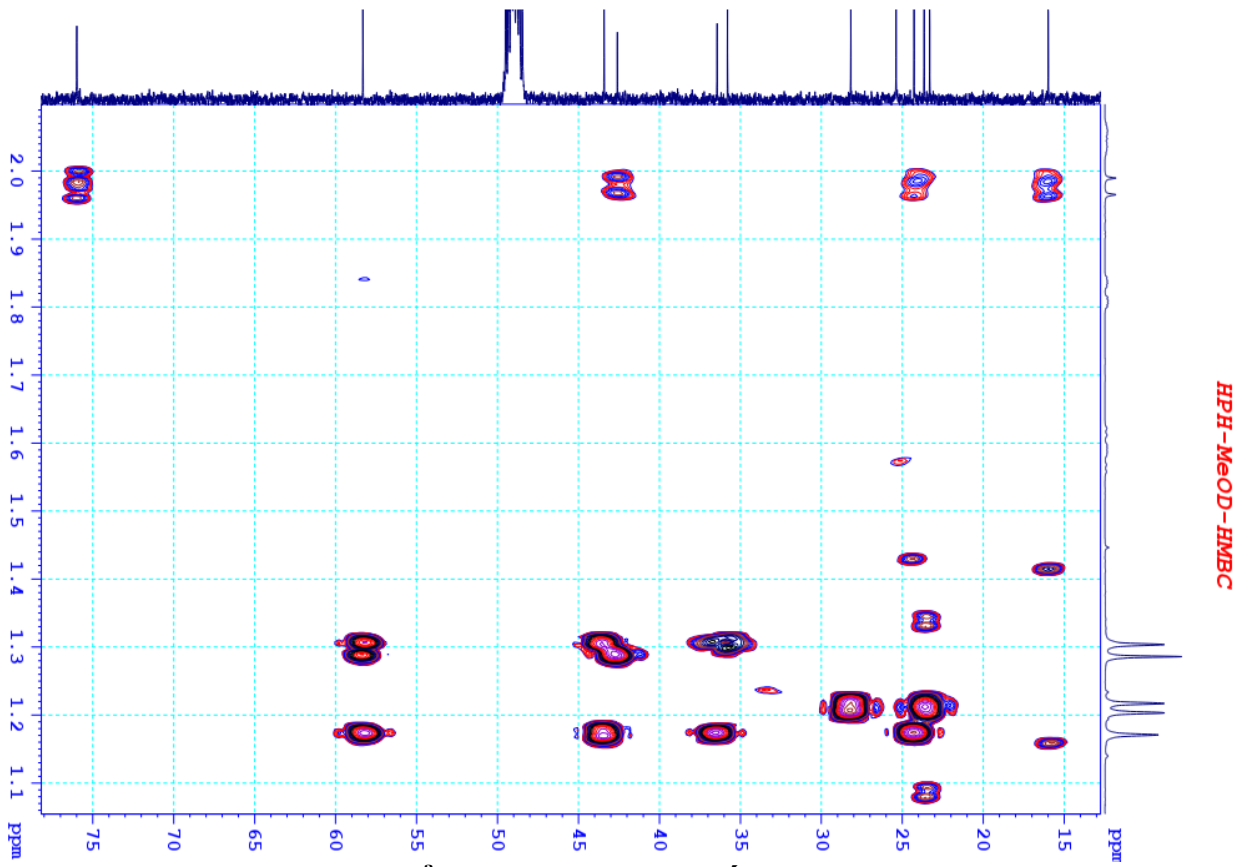
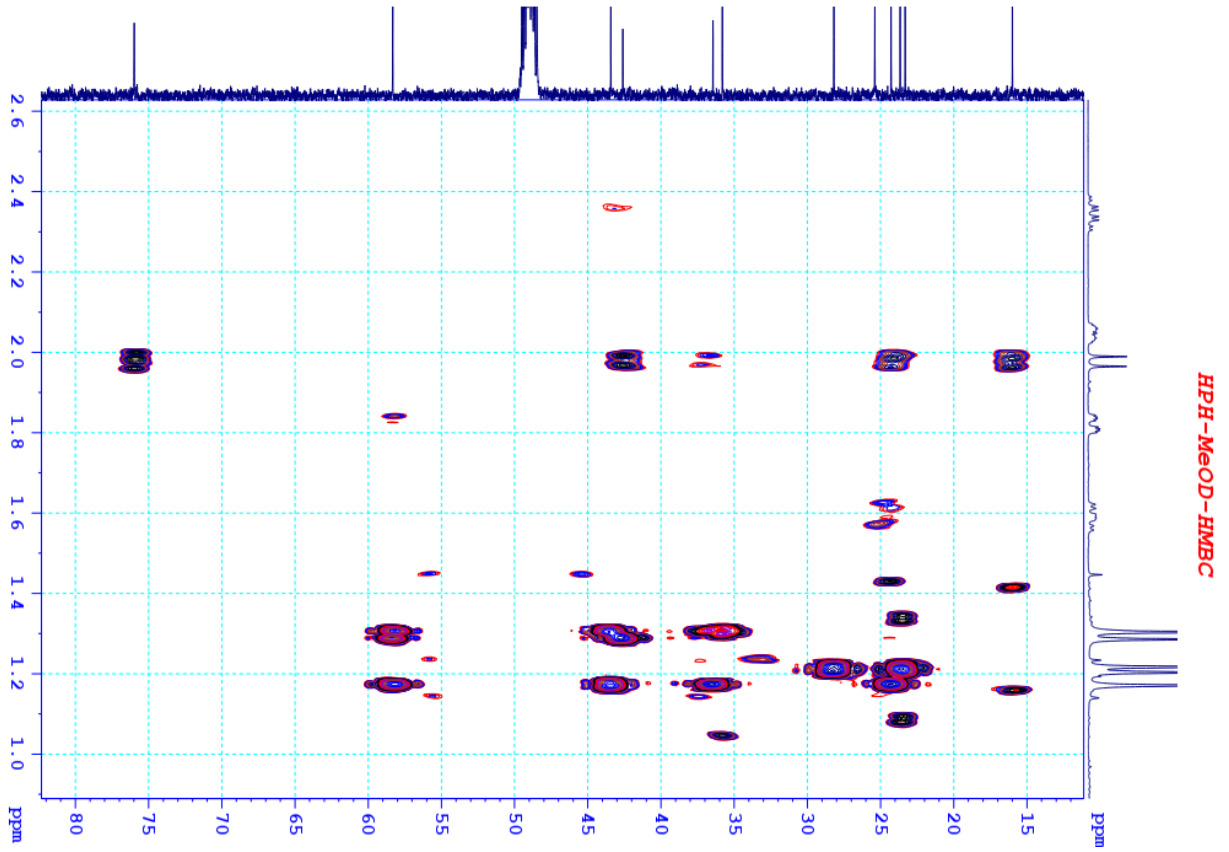
Phổ DEPT của hợp chất HPH



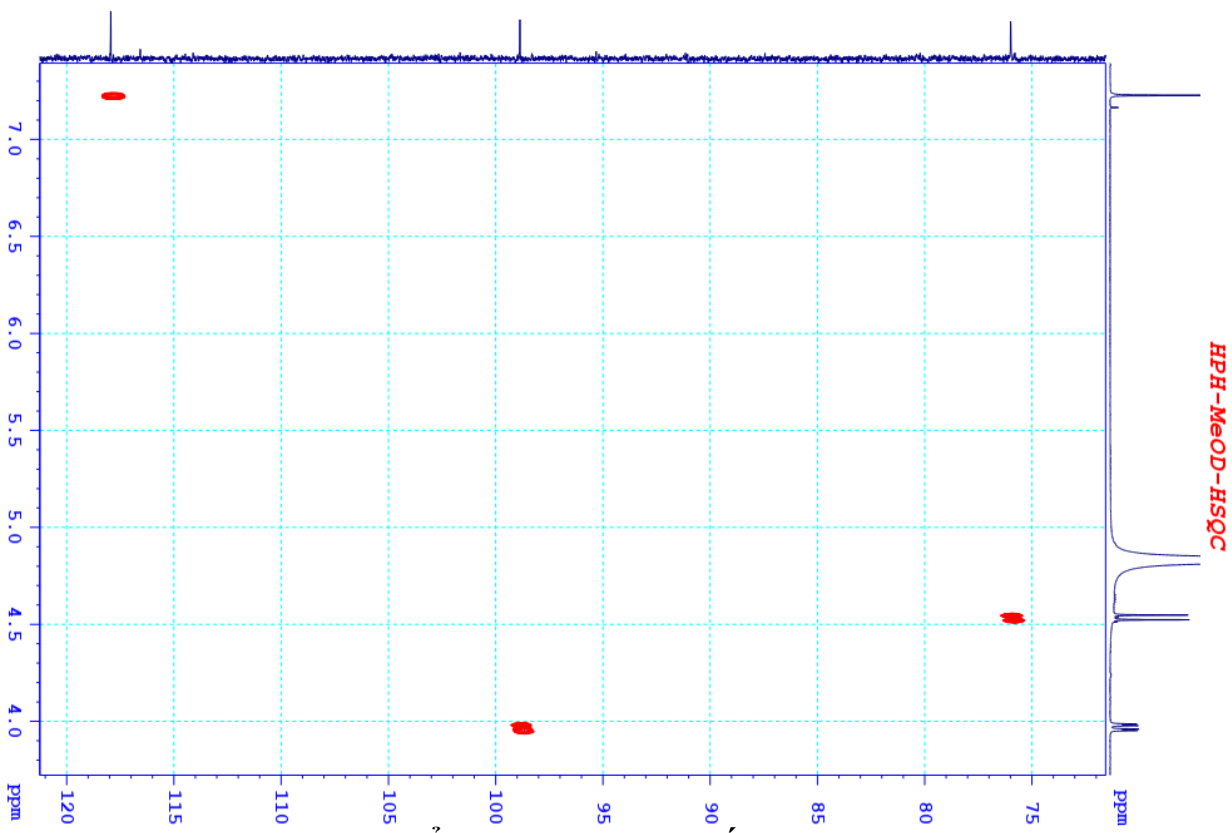
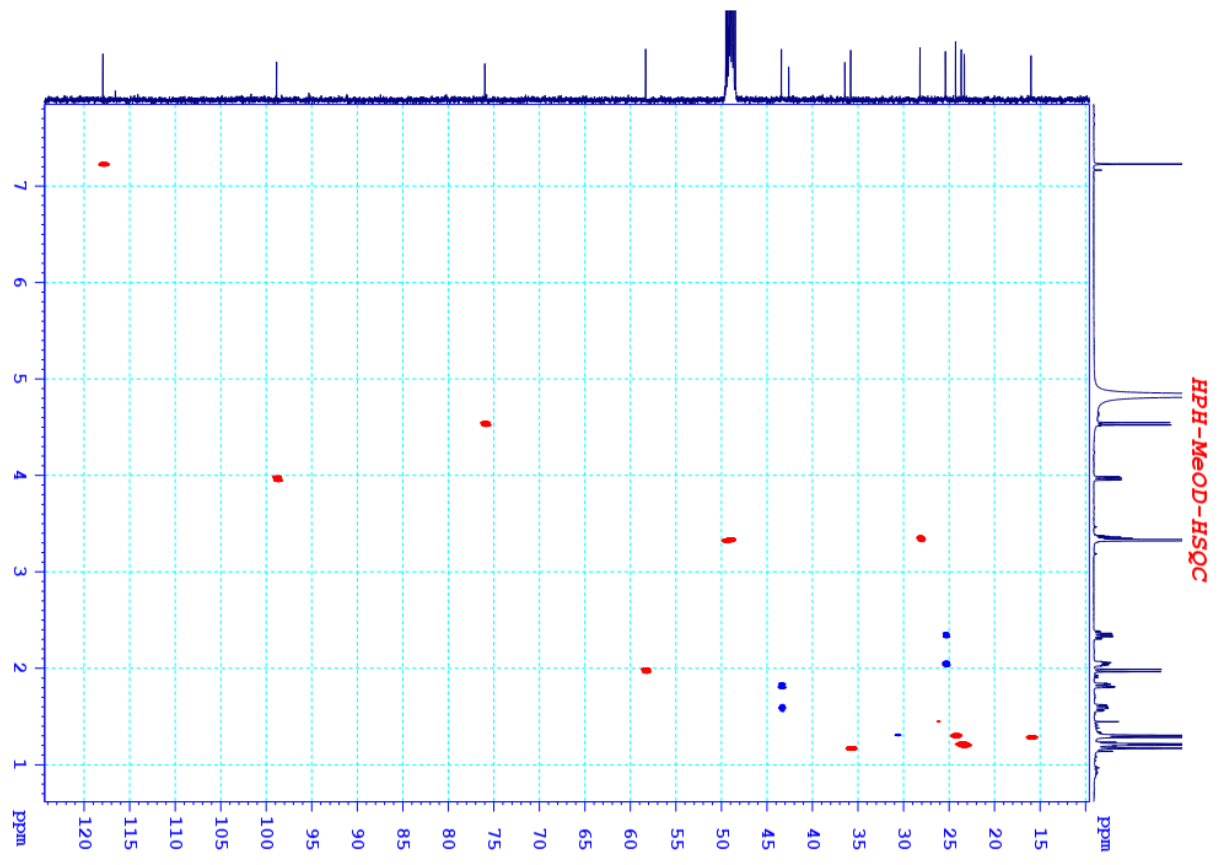
Phổ HMBC của hợp chất HPH



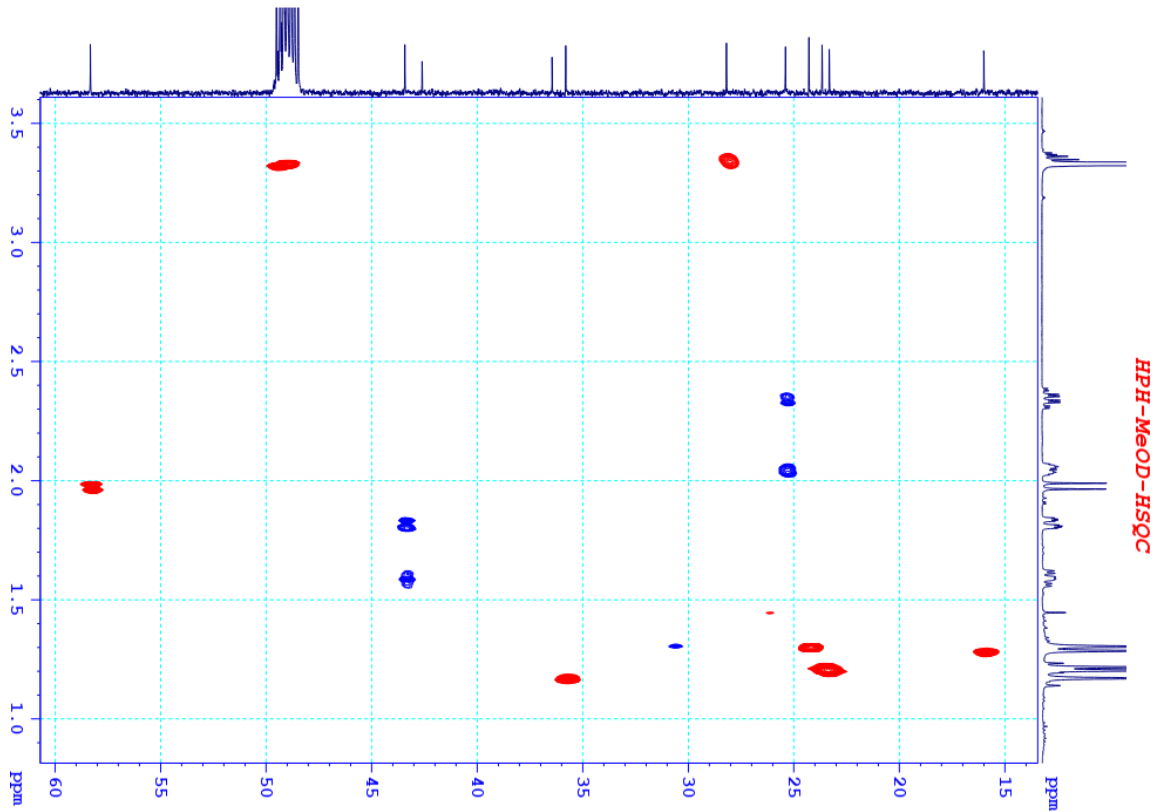
Phổ HMBC của hợp chất HPH



Phổ HMBC của hợp chất HPH



Phổ HSQC của hợp chất HPH



Phổ HSQC của hợp chất HPH

HPH-MeOD-NOESY



Current Data Parameters
 NAME 110H0AI_HPH
 EXPNO 7
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
 Date_ 20170228
 Time 17.59
 INSTRUM spect
 PROBEH 5 mm PARBO BB/
 PULPROG noesypphpgp
 TP 2048
 SOLVENT MeOD
 NS 8
 DS 32
 SWH 3816.794 Hz
 FIDRES 1.863669 Hz
 AQ 0.2682880 sec
 RG 79.36
 DW 131.000 usec
 DE 6.50 usec
 TE 303.2 K
 D0 0.0001827 sec
 D1 1.93651199 sec
 D8 0.30000001 sec
 D11 0.03000000 sec
 D12 0.00020000 sec
 D16 0.00020000 sec
 INO 0.00026200 sec

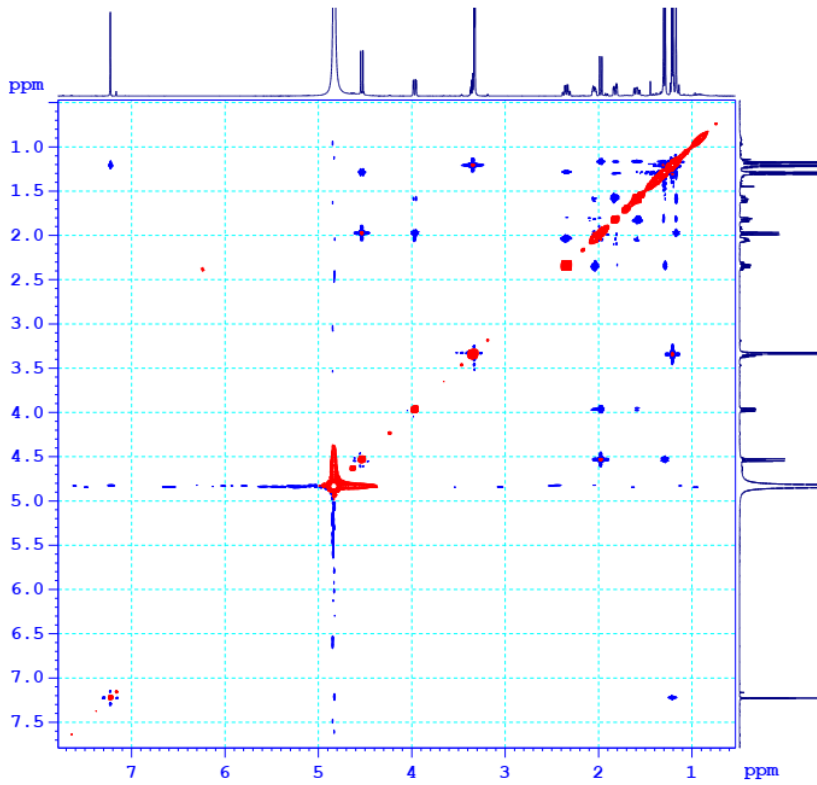
===== CHANNEL f1 =====
 SF01 500.2019887 MHz
 NUCL1 1H
 F1 10.00 usec
 P2 20.00 usec
 P17 2500.00 usec
 PLW1 22.0000000 W
 PLW10 3.25440001 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
 GPNAM11 SMOQ10.100
 GPZ1 40.00 *
 P16 1000.00 usec

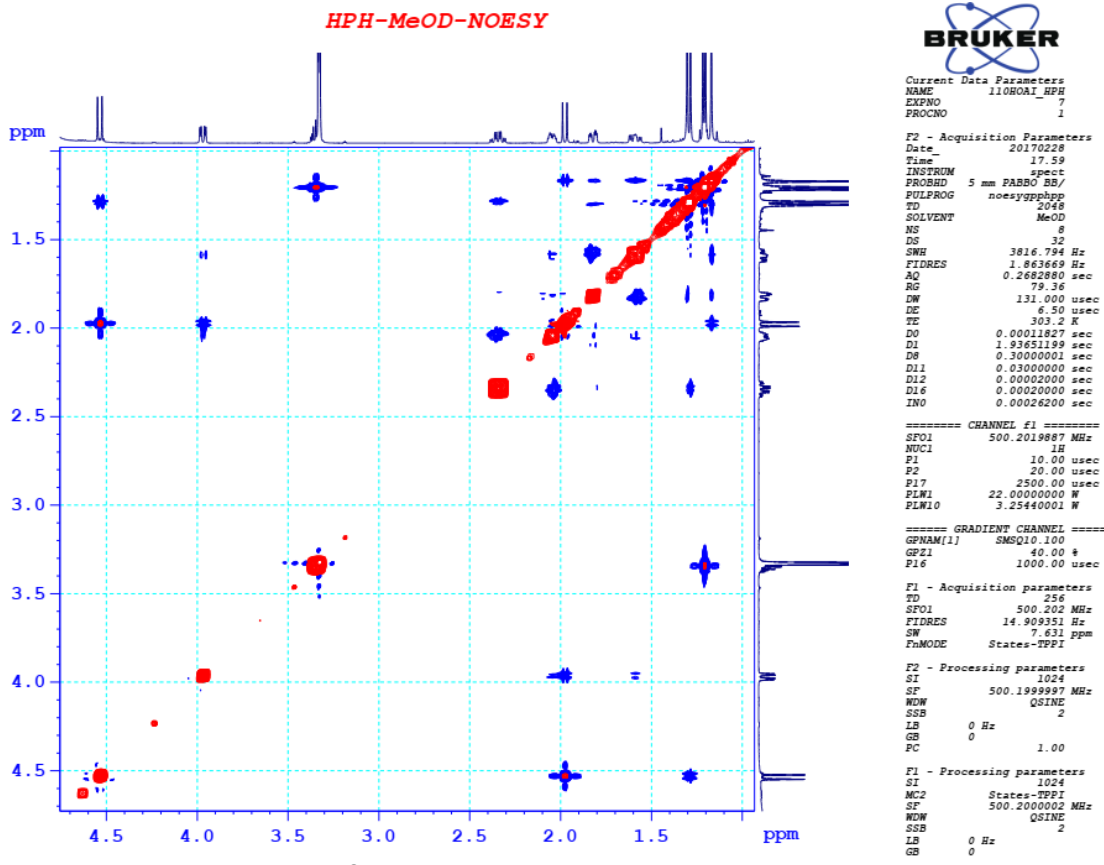
F1 - Acquisition parameters
 TD 256
 SF01 500.202 MHz
 FIDRES 14.909351 Hz
 SW 7.631 ppm
 FMODE States-TFPI

F2 - Processing parameters
 SI 1024
 SF 500.1999997 MHz
 WDW QSINE
 SSB 2
 LB 0 Hz
 GB 0
 PC 1.00

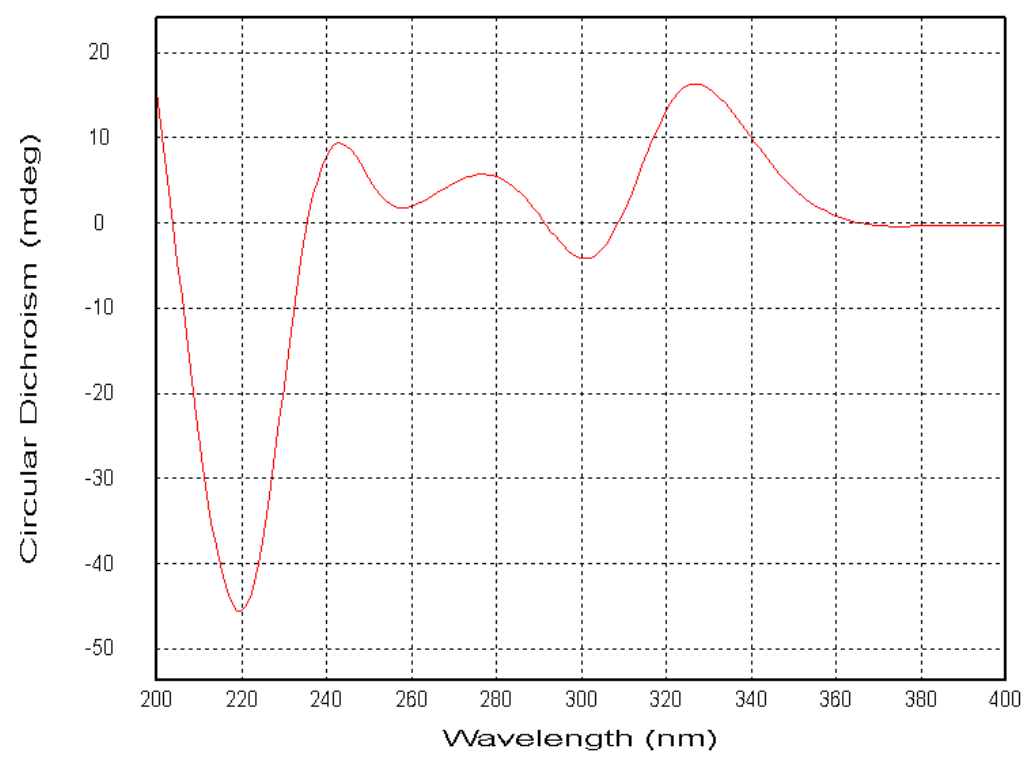
F1 - Processing parameters
 SI 1024
 MC2 States-TFPI
 SF 500.2000002 MHz
 WDW QSINE
 SSB 2
 LB 0 Hz
 GB 0



Phổ NOESY của hợp chất HPH



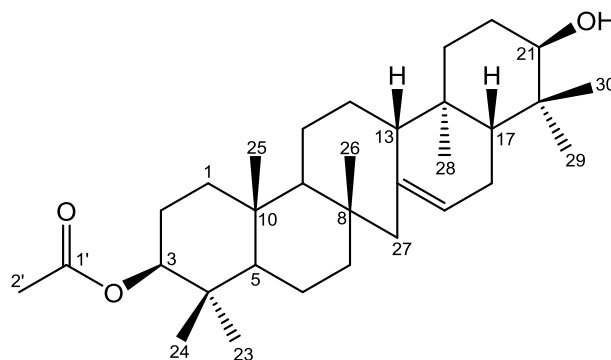
Phổ NOESY của hợp chất HPH



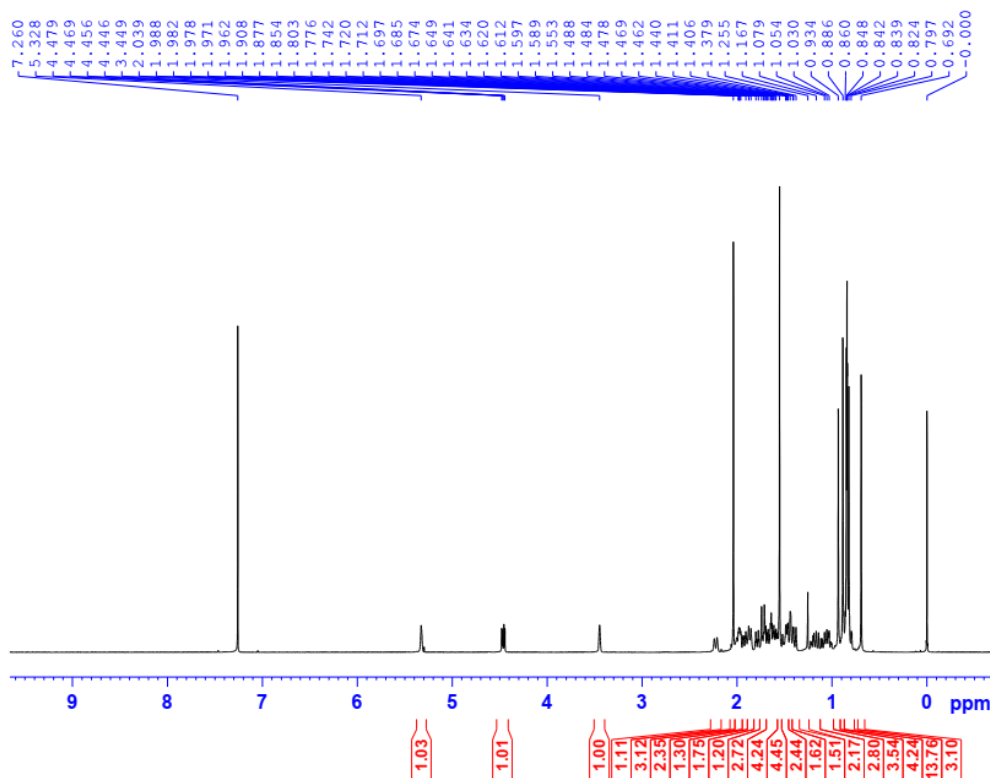
Phổ CD của hợp chất HPH

Phụ lục 3.9. Phổ của hợp chất HPD (21-episerratenediol-3-O-acetat)

- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ DEPT
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC



HPD-CDCl3-1H



```
Current Data Parameters
NAME      110H0A1_HP
EXPNO    1
PROCNO   1

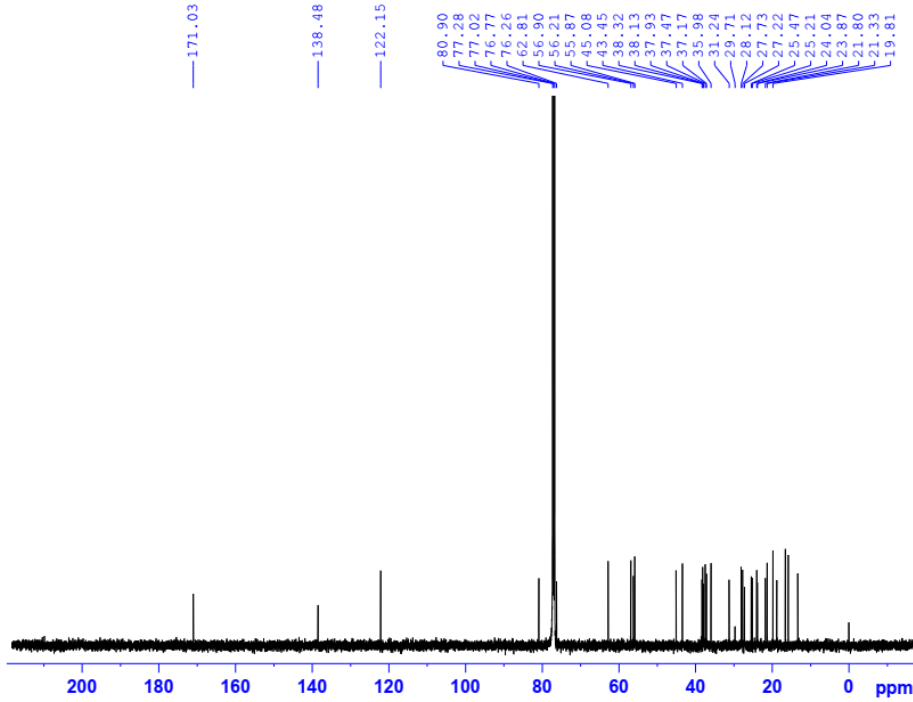
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20170123
Time_    10.26
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zg30
TD        65536
SOLVENT  CDCl3
NS        16
DS        1
SWH       10000.000 Hz
FIDRES    0.15258 Hz
AQ        3.2767988 sec
RG         187.35
DN         50.000 usec
DE         6.50 usec
TE        303.2 K
D1        1.00000000 sec
TD0       1

===== CHANNEL f1 =====
SF01     500.2030889 MHz
NUC1      1H
P1        10.00 usec
PLW1     22.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        500.2000119 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0
PC        1.00
```

Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất HPD

HPD-CDC13-C13CPD



```
Current Data Parameters
NAME      110H0A1_HPD
EXPNO     2
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20170123
Time      15.18
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   CDCl3
NS         2048
DS         4
SMH        29761.904 Hz
FIDRES     0.454131 Hz
AQ         1.1010048 sec
RG         198.57
DW         16.800 usec
DE         6.50 usec
TE         303.1 K
D1         2.00000000 sec
D11        0.03000000 sec
TDO        1

===== CHANNEL f1 =====
SF01      125.7879670 MHz
NUC1       13C
P1         10.00 usec
PLW1       88.00000000 W

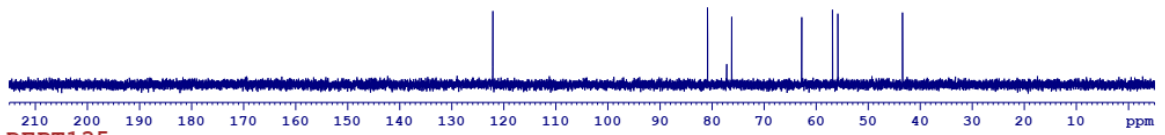
===== CHANNEL f2 =====
SF02      500.2020008 MHz
NUC2       1H
CFDPRG[2]  waltz16
PCPD2      80.00 usec
PLW2       22.00000000 W
PLW12      0.34375000 W
PLW13      0.22000000 W

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         125.7753876 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
```

Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HPD

HPD-CDC13-C13CPD&DEPT

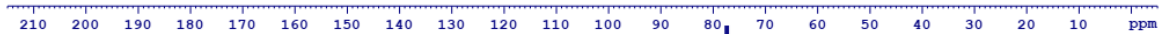
DEPT90



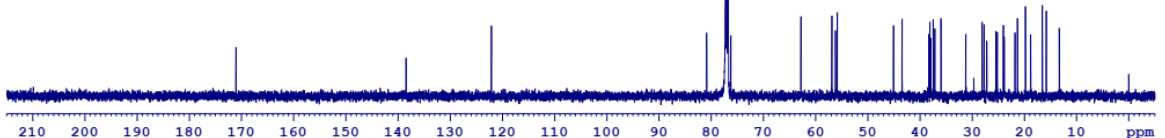
DEPT135



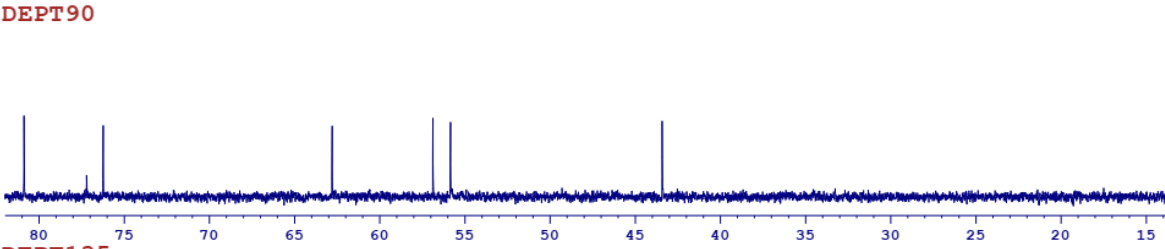
CH&CH3



CH2

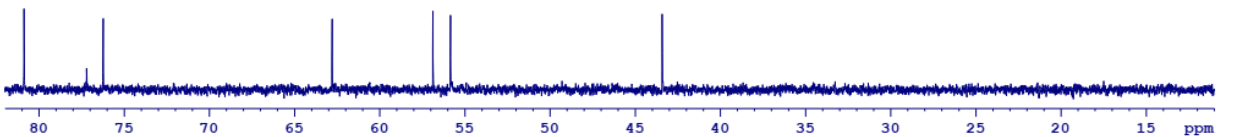


C13CPD

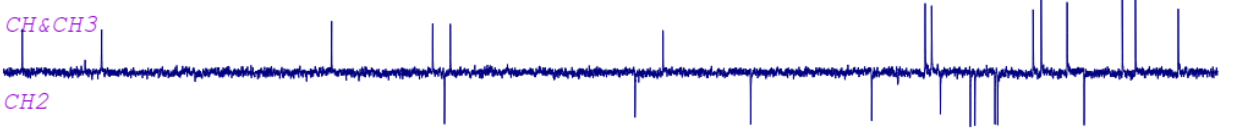


HPD-CDC13-C13CPD&DEPT

DEPT90

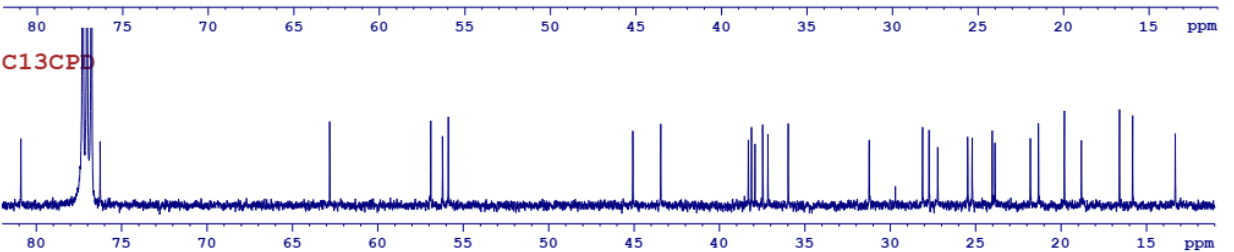


DEPT135

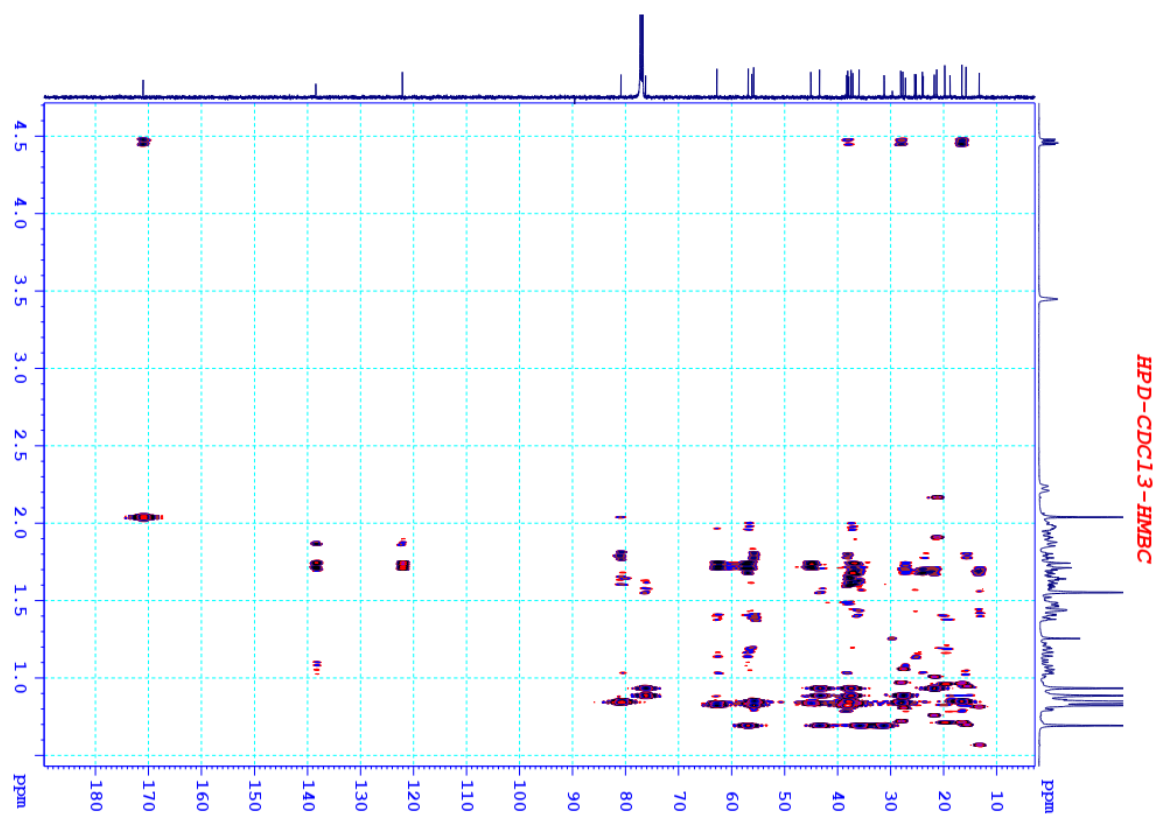


CH&CH3

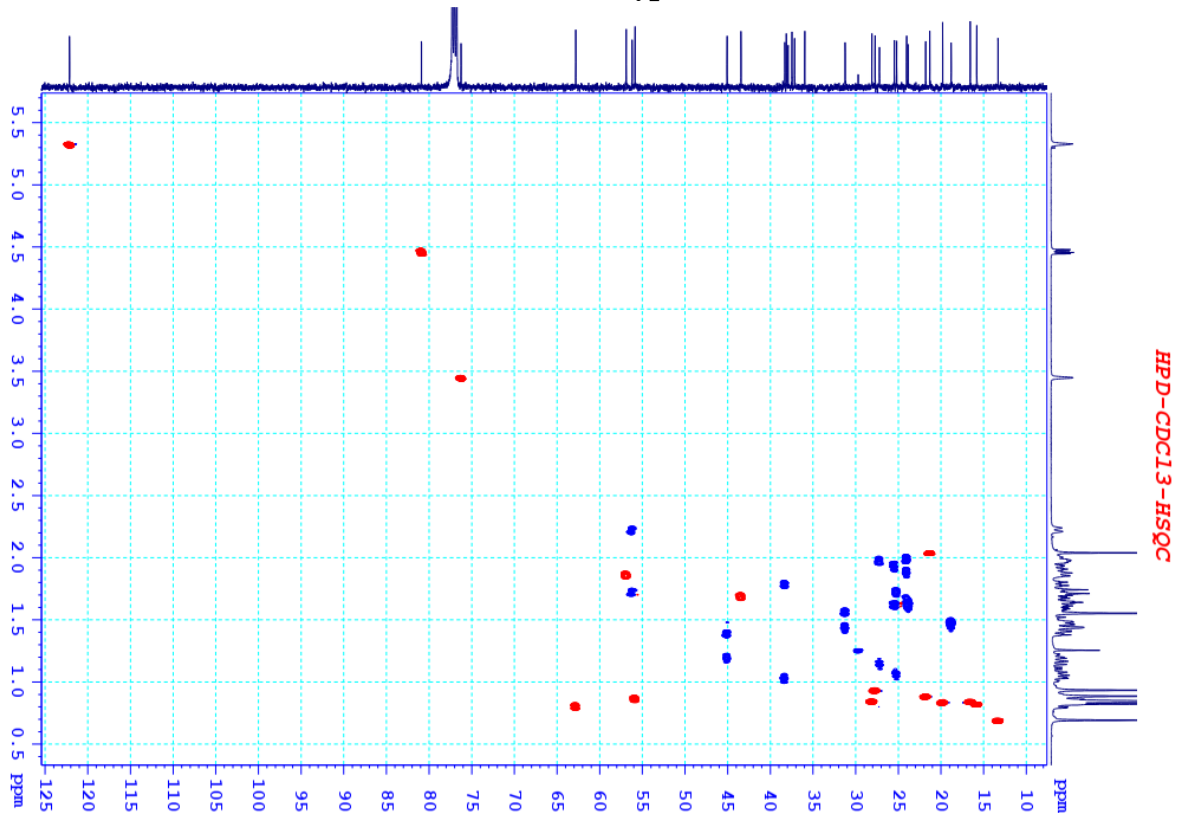
CH2



Phổ DEPT của hợp chất HPD



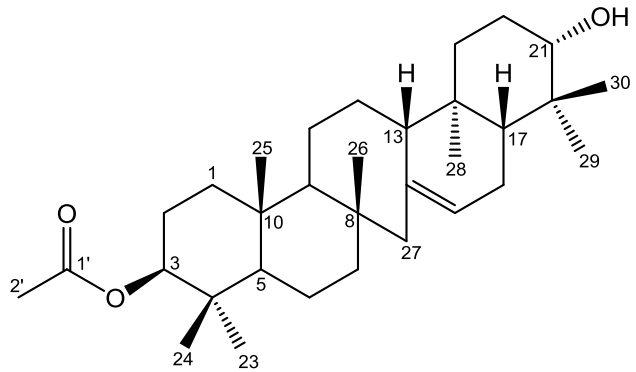
Phổ HMBC của hợp chất HPD



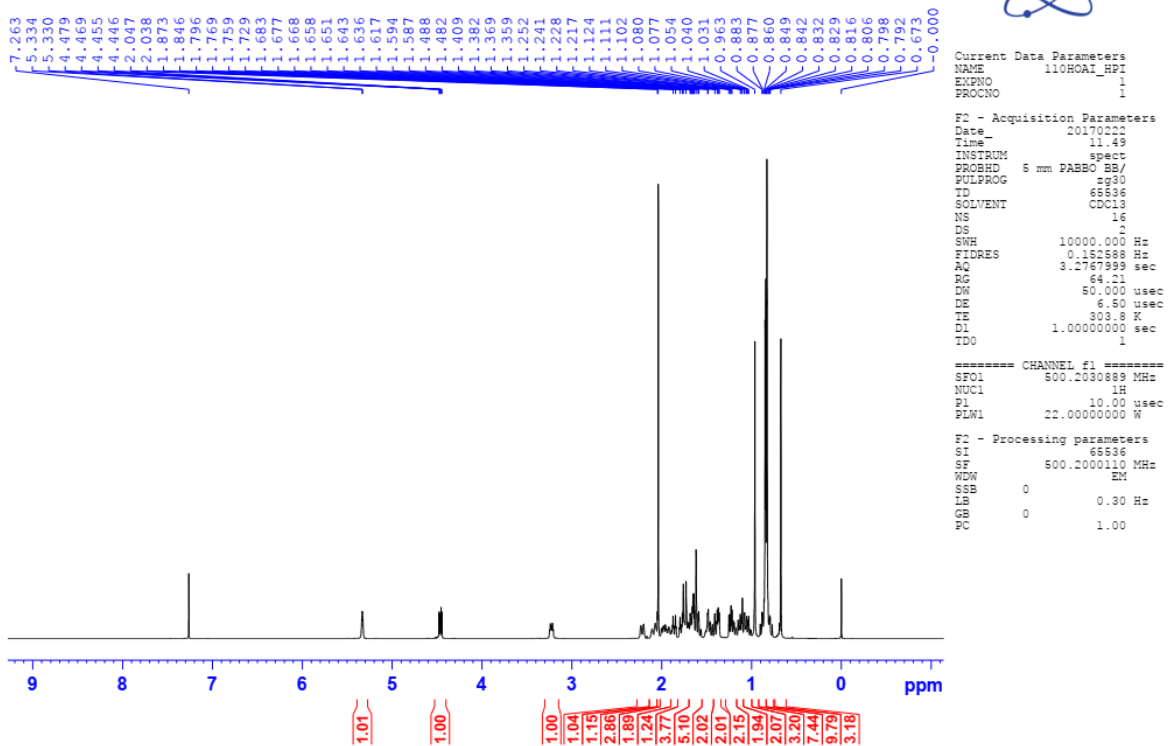
Phổ HSQC của hợp chất HPD

Phụ lục 3.10. Phổ của hợp chất HPI (Serratenediol-3-O-acetat)

- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ DEPT
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC

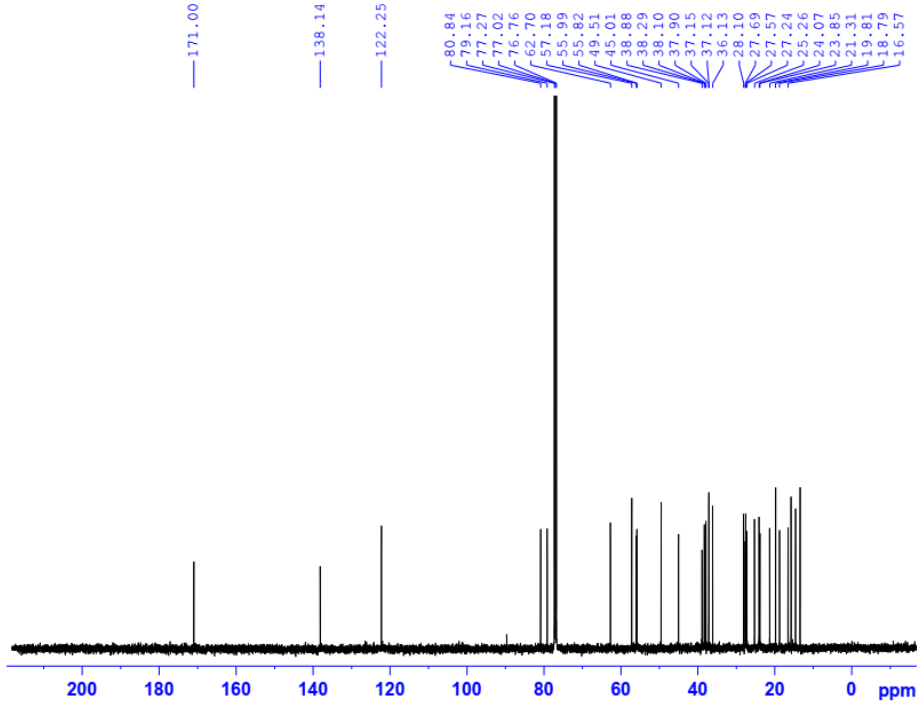


HPI-CDC13-1H



Phổ $^1\text{H-NMR}$ của hợp chất HPI

HPI-CDC13-C13CPD



Current Data Parameters
NAME 110HOAI_HPI
EXPNO 2
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 20170223
Time_ 12.23
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm PABBO BB/
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT CDC13
NS 256
DS 4
SWH 29761.904 Hz
FIDRES 0.454131 Hz
AQ 1.1010048 sec
RG 198.57
DW 16.800 usec
DE 6.50 usec
TE 303.2 K
D1 2.00000000 sec
D11 0.03000000 sec
TDO 1

===== CHANNEL f1 =====
SF01 125.7679670 MHz
NUC1 13C
P1 10.00 usec
PLW1 88.00000000 W

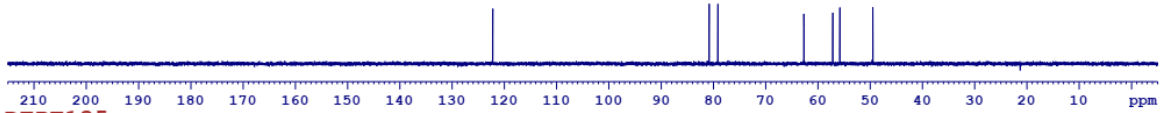
===== CHANNEL f2 =====
SF02 500.2020008 MHz
NUC2 1H
PCPD2 waltz16
PCPD2 80.00 usec
PLW2 22.00000000 W
PLW12 0.34375000 W
PLW13 0.22000000 W

F2 - Processing parameters
SI 32768
SF 125.7753900 MHz
WDW EM
SSE 0
LB 1.00 Hz
GB 0
PC 1.40

Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HPI

HPI-CDC13-C13CPD&DEPT

DEPT90



DEPT135



CH&CH3

CH2

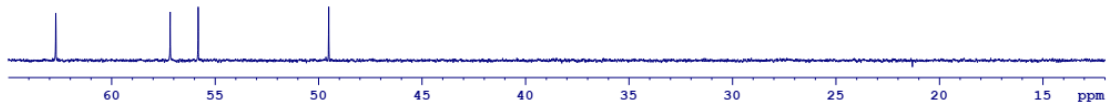


C13CPD

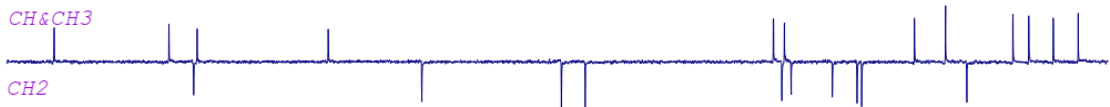


HPI-CDC13-C13CPD&DEPT

DEPT90



DEPT135

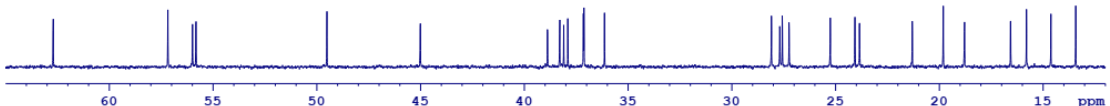


CH&CH3

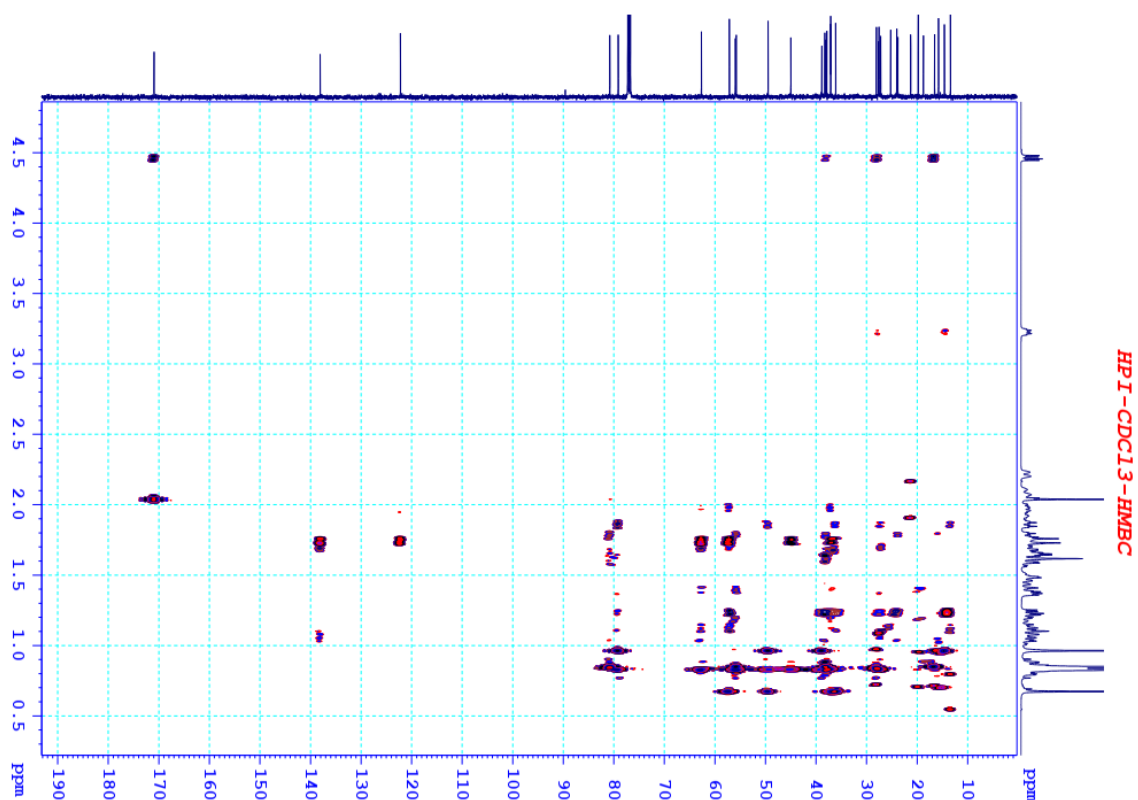
CH2



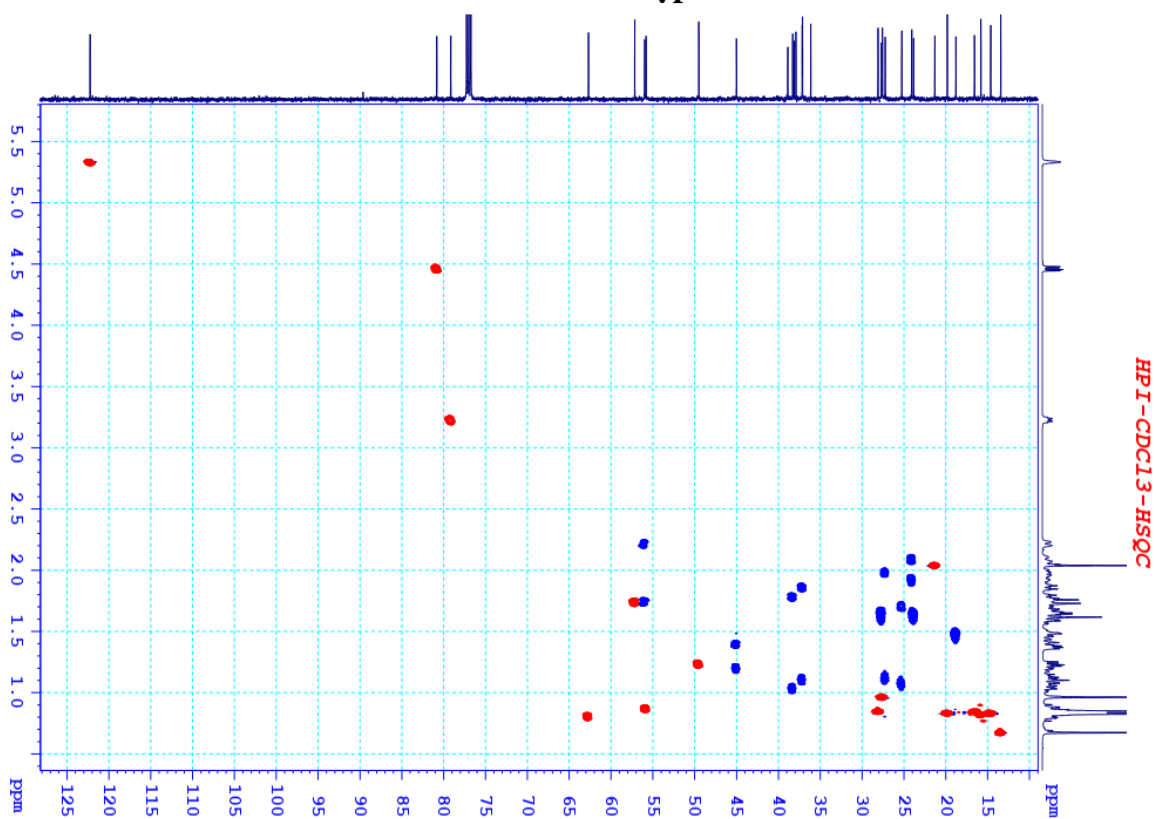
C13CPD



Phổ DEPT của hợp chất HPI



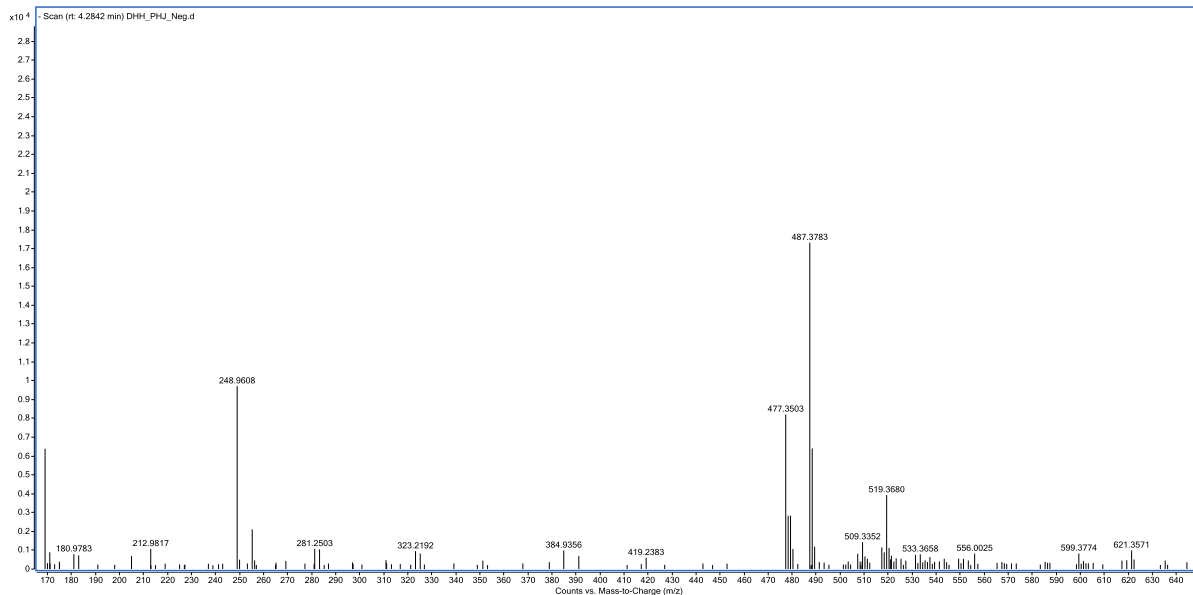
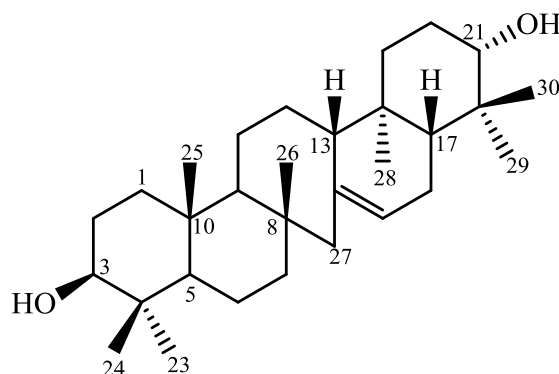
Phổ HMBC của hợp chất HPI



Phổ HSQC của hợp chất HPI

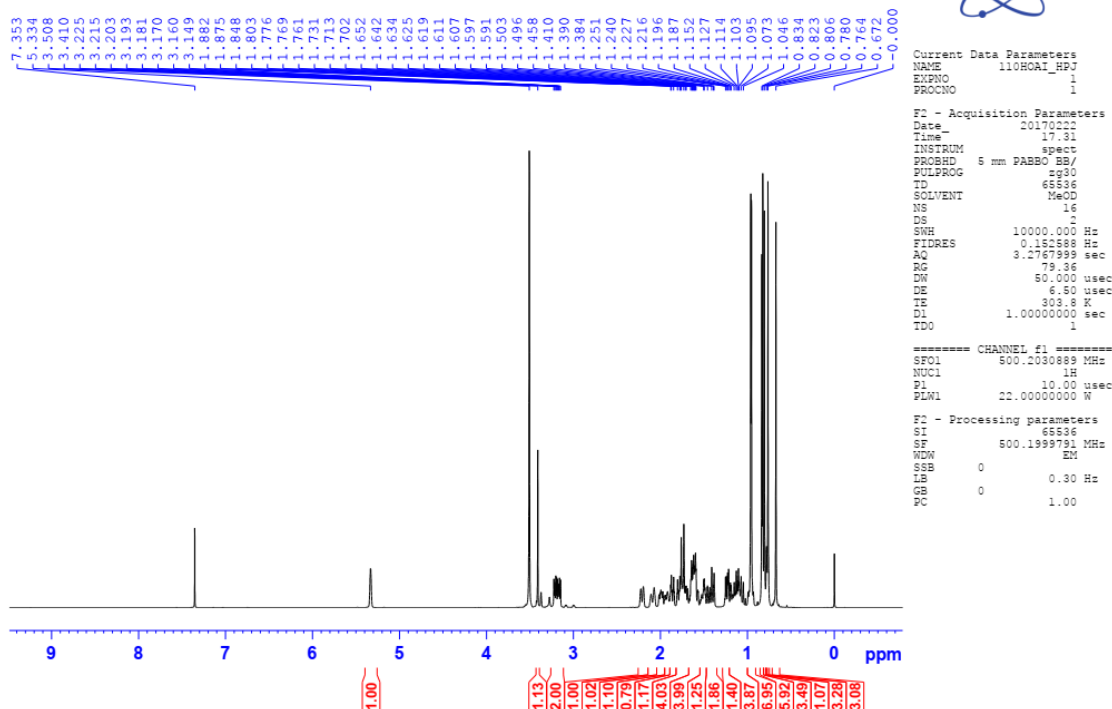
Phụ lục 3.11. Phổ của hợp chất HPJ (21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -ol)

- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ DEPT
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC



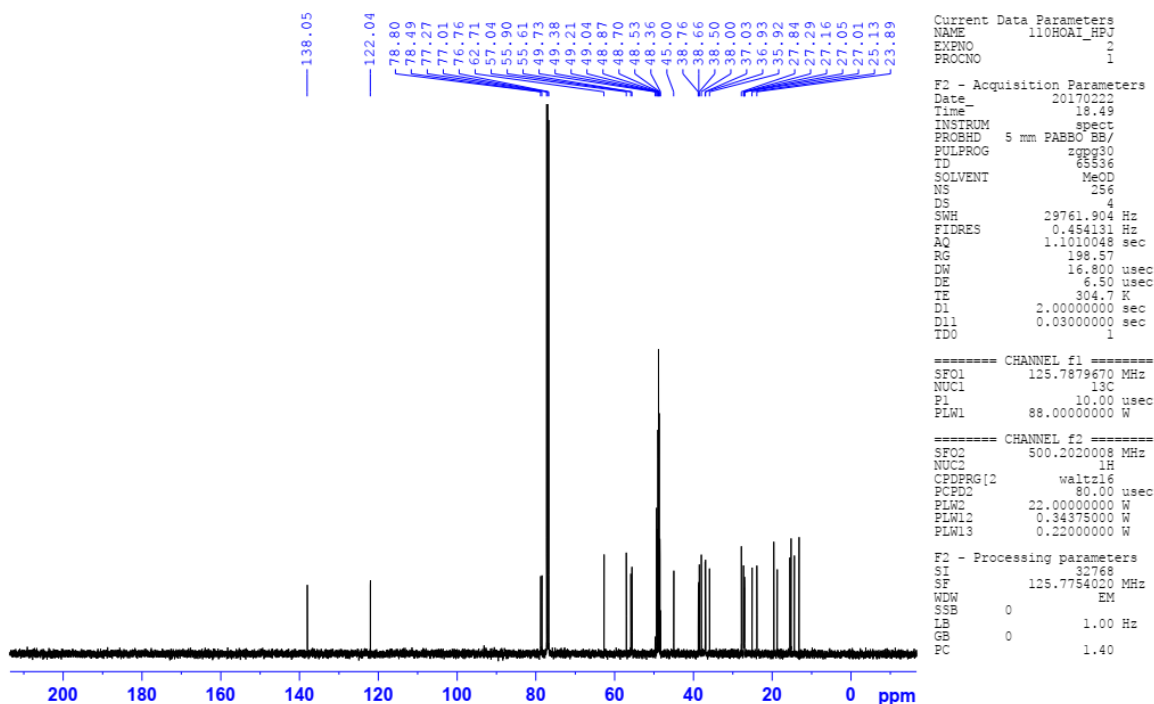
Phổ HR-ESI-MS của hợp chất HPJ

HPJ-CDC13&MeOD-1H



Phổ ¹H-NMR của hợp chất HPJ

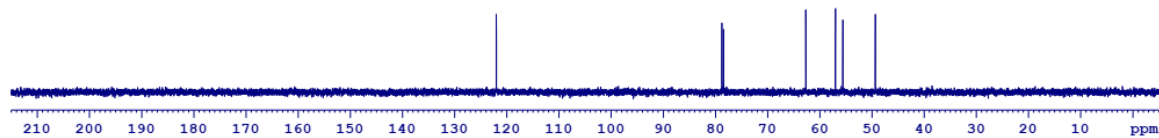
HPJ-CDC13&MeOD-C13CPD



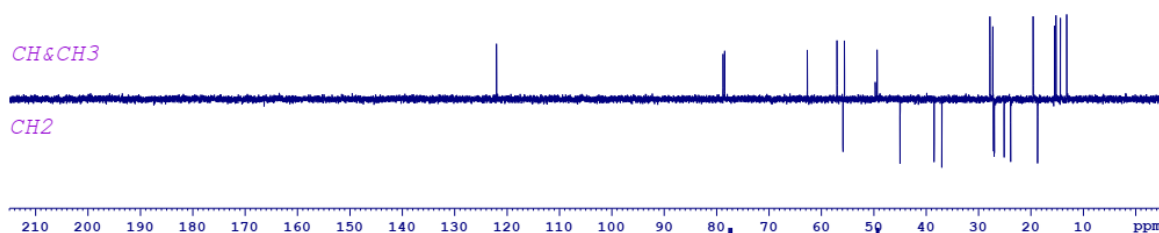
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HPJ

Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất HPJ
HPJ- CDCl_3 &MeOD- C^{13}CPD &DEPT

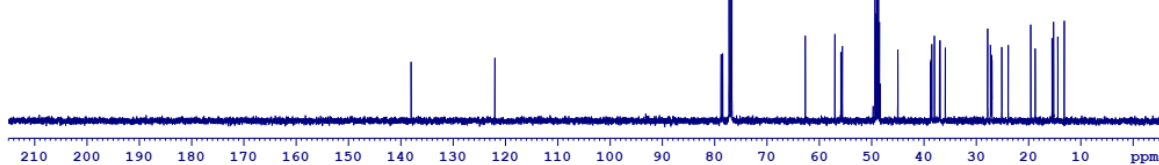
DEPT90



DEPT135

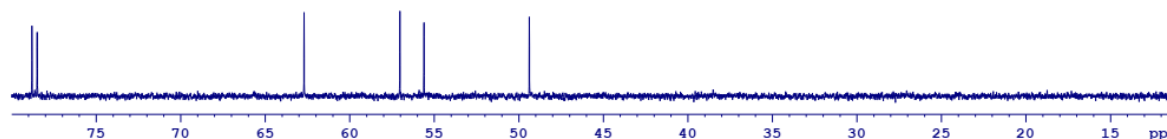


C^{13}CPD

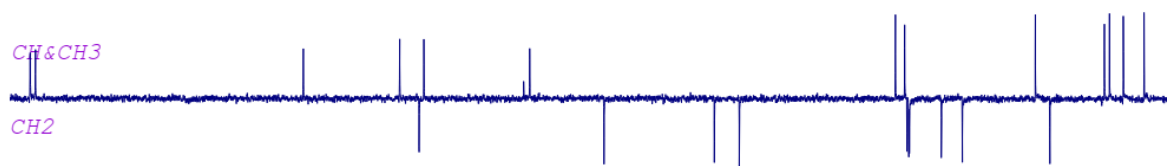


HPJ- CDCl_3 &MeOD- C^{13}CPD &DEPT

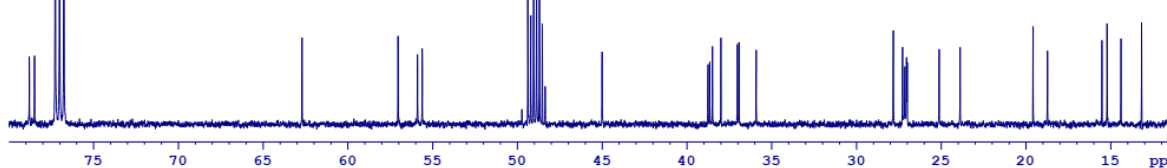
DEPT90



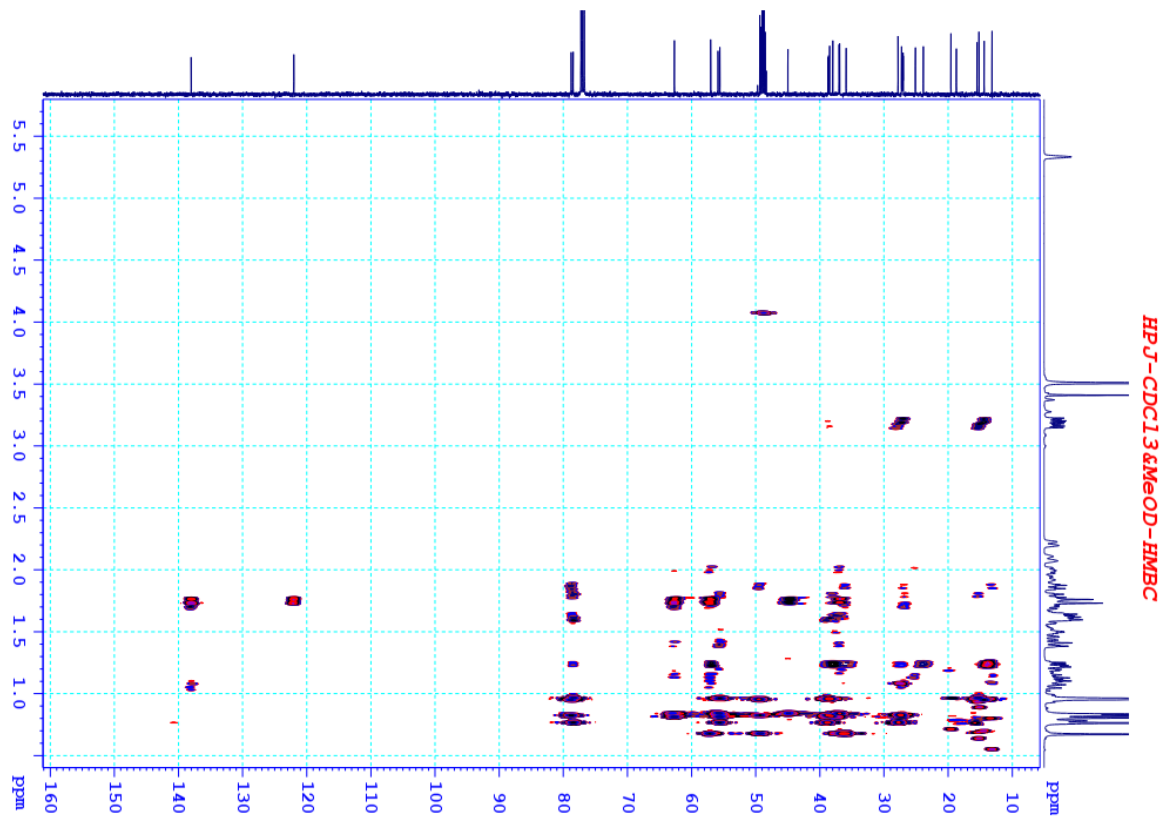
DEPT135



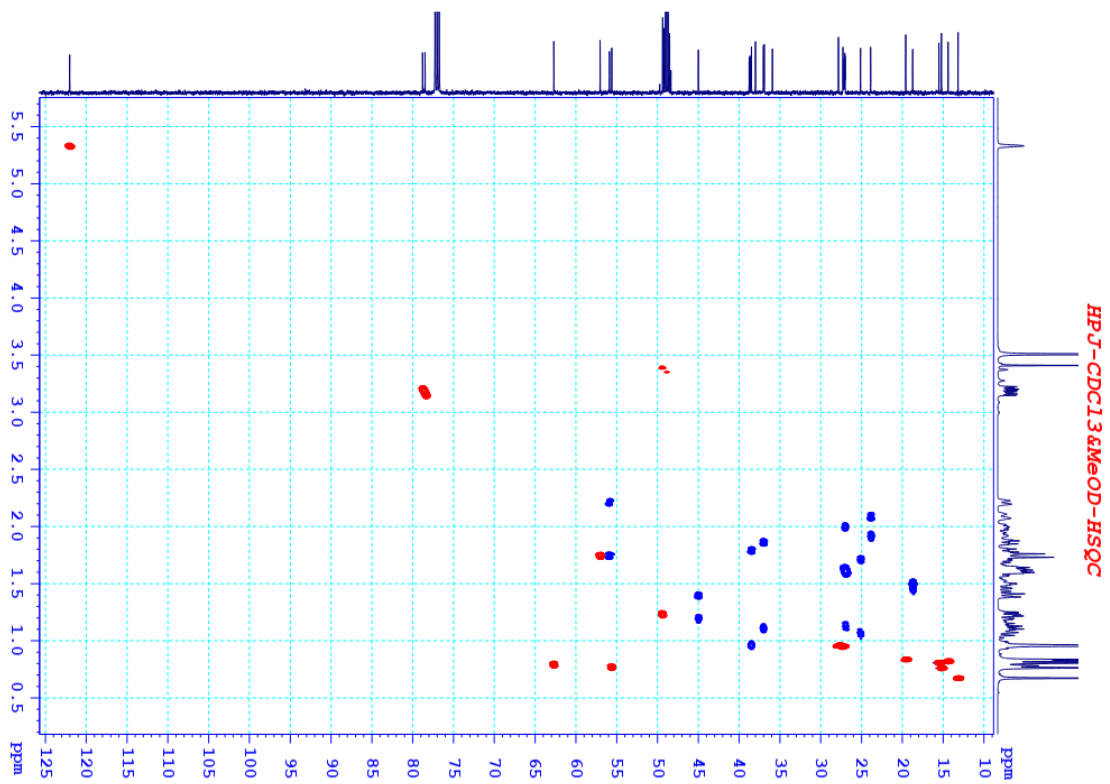
C^{13}CPD



Phổ DEPT của hợp chất HPJ



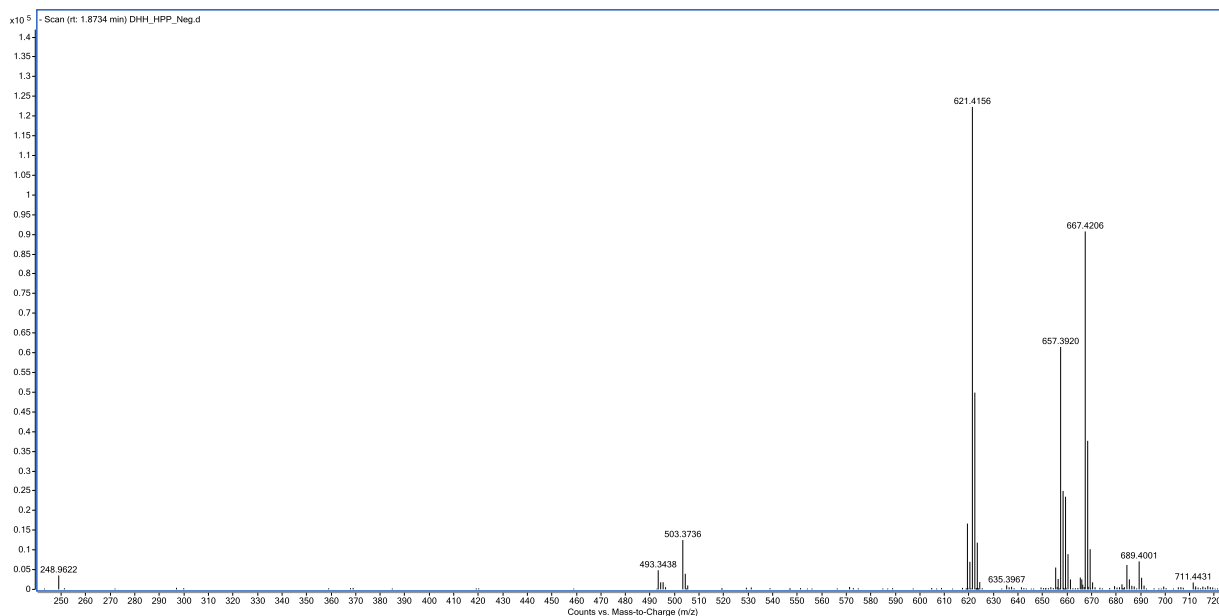
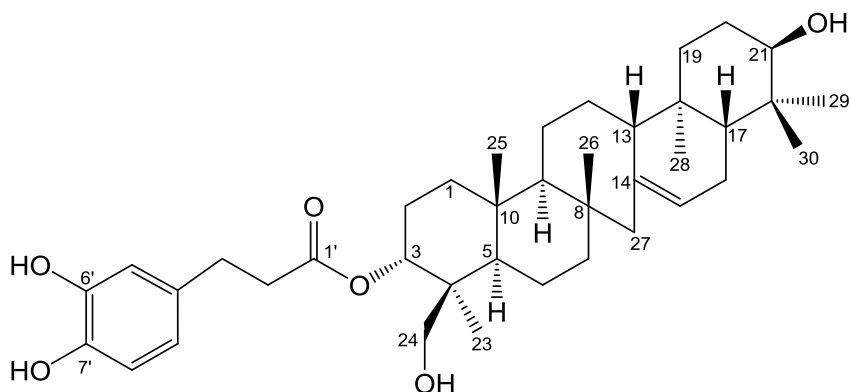
Phổ HMBC của hợp chất HPJ



Phổ HSQC của hợp chất HPJ

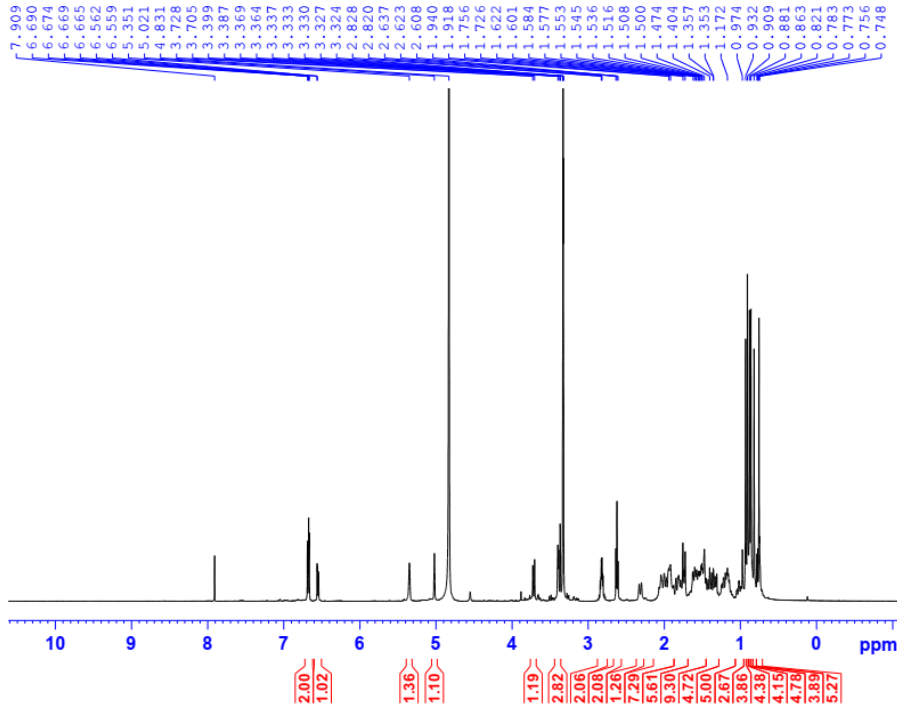
Phụ lục 3.12. Phổ của hợp chất HPP (lycophlegmariol A)

- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ HMBC
- Phổ HSQC
- Phổ NOESY



Phổ HR-ESI-MS của hợp chất HPP

HPP-MeOD-1H



```
Current Data Parameters
NAME      110H0A1_HPP
EXPNO    1
PROCNO   1

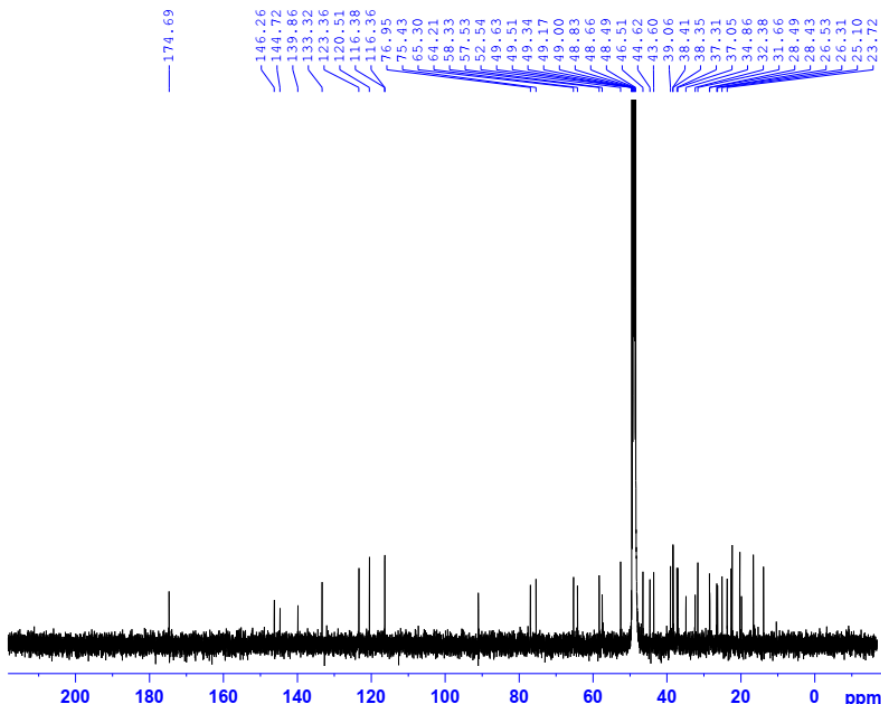
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180108
Time     18.35
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zg30
TD        65536
SOLVENT  MeOD
NS        16
DS        2
SWH       10000.000 Hz
FIDRES    0.152588 Hz
AQ        3.2767999 sec
RG        157.35
DW        50.000 usec
DE        6.50 usec
TE        303.0 K
DL        1.00000000 sec
TDO       1

===== CHANNEL f1 =====
SF01     500.2030889 MHz
NUC1     1H
P1       10.00 usec
PLW1     22.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI       65536
SF       500.1999998 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       0.30 Hz
GB       0
PC       1.00
```

Phổ ¹H-NMR của hợp chất HPP

HPP-MeOD-C13CPD



```
Current Data Parameters
NAME      110H0A1_HPP
EXPNO    1
PROCNO   1

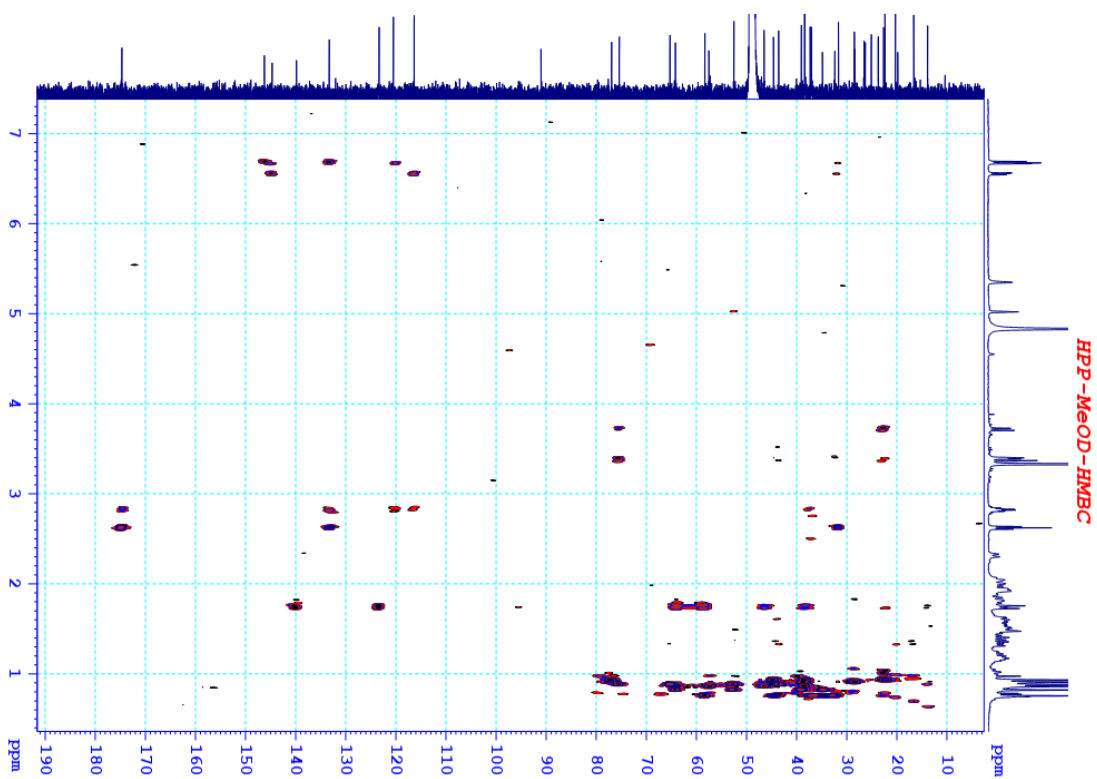
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180108
Time     9.35
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  MeOD
NS        2048
DS        4
SWH       29761.904 Hz
FIDRES    0.454131 Hz
AQ        1.1010048 sec
RG        158.948
DW        16.800 usec
DE        6.50 usec
TE        303.0 K
DL        2.00000000 sec
Dl1      0.03000000 sec
TDO       1

===== CHANNEL f1 =====
SF01     125.7879670 MHz
NUC1     13C
P1       10.00 usec
PLW1     88.00000000 W

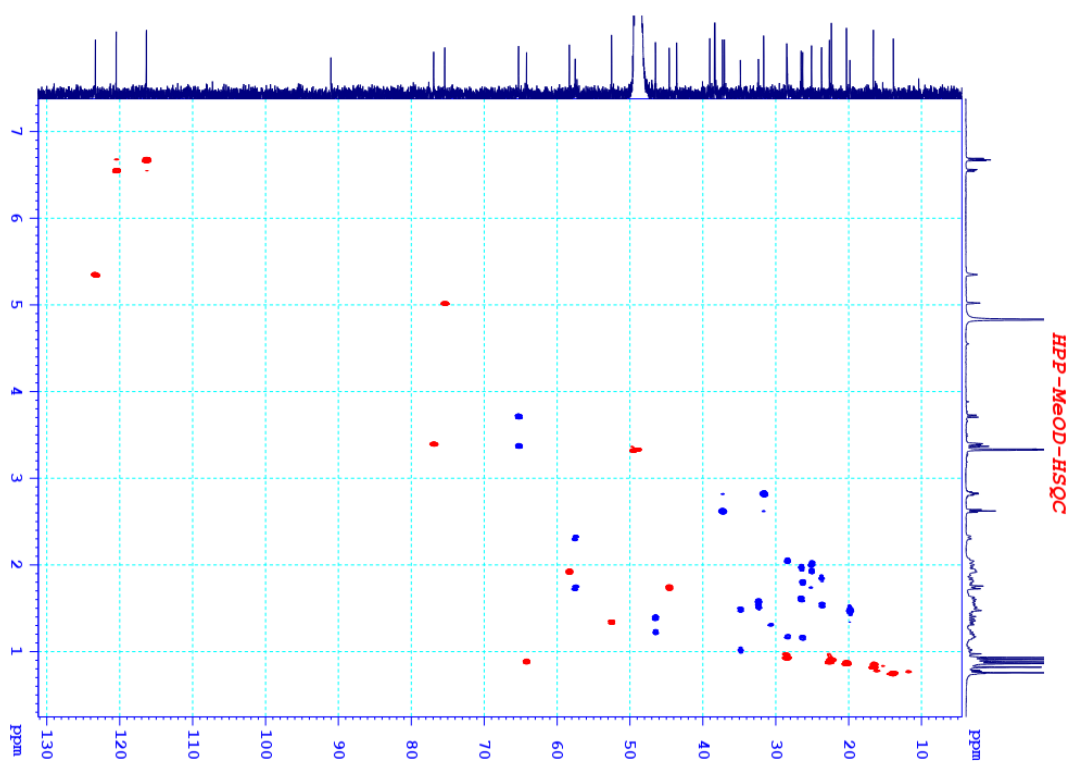
===== CHANNEL f2 =====
SF02     500.2020008 MHz
NUC2     1H
CPDPRG12 waltz16
PCPD2    80.00 usec
PLW2     22.00000000 W
PLW12    0.34375000 W
PLW13    0.22000000 W

F2 - Processing parameters
SI       32768
SF       125.7752133 MHz
WDW      EM
SSB      0
LB       1.00 Hz
GB       0
PC       1.40
```

Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HPP

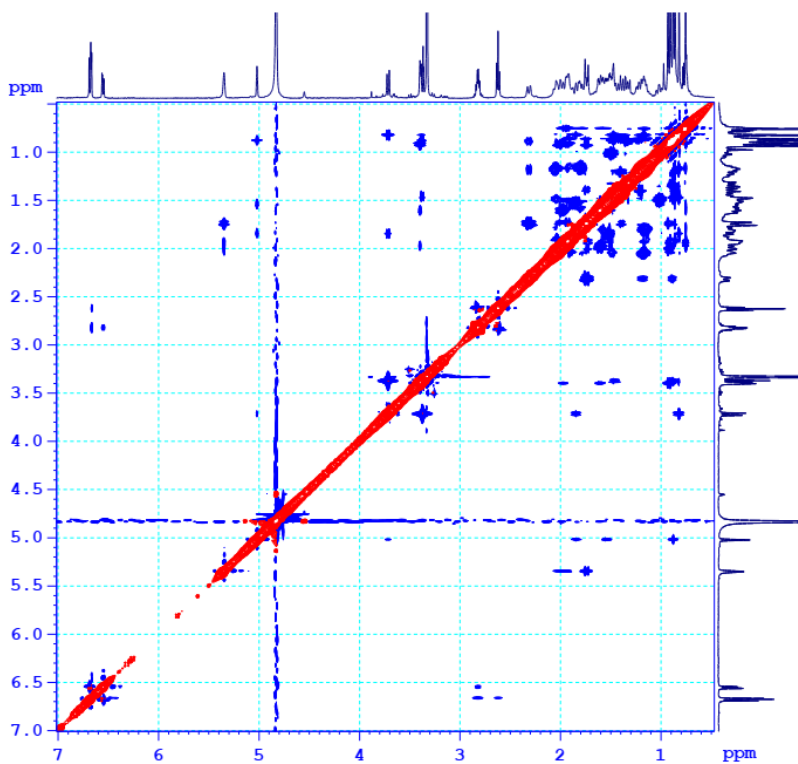


Phổ HMBC của hợp chất HPP



Phổ HSQC của hợp chất HPP

HPP-MeOD-NOESY



```
Current Data Parameters
NAME      110R0AI_HPP
EXPNO     5
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20180114
Time      7.36
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   noesypprog
TD         2048
SOLVENT   MeOD
NS         16
DS         32
SWH        3968.254 Hz
FIDRES     1.937624 Hz
AQ         0.2580480 sec
RG         64.23
DW         126.000 usec
DE         6.50 usec
TE         303.0 K
D0         0.00011327 sec
D1         1.94675195 sec
D8         0.30000001 sec
D11        0.03000000 sec
D12        0.00020000 sec
D16        0.00020000 sec
INO        0.00025200 sec

===== CHANNEL f1 =====
SFO1      500.2017065 MHz
NUC1      1H
P1        10.00 usec
P2        20.00 usec
P17       2500.00 usec
PLW1      22.00000000 W
PLW10     3.25440001 W

===== GRADIENT CHANNEL =====
GPMAM[1] SMSQ10.100
GPE1      40.00 %
P16       1000.00 usec

F1 - Acquisition parameters
TD         256
SFO1      500.2017 MHz
FIDRES     38.340618 Hz
SW         7.933 ppm
FhMODE     States-TPPI

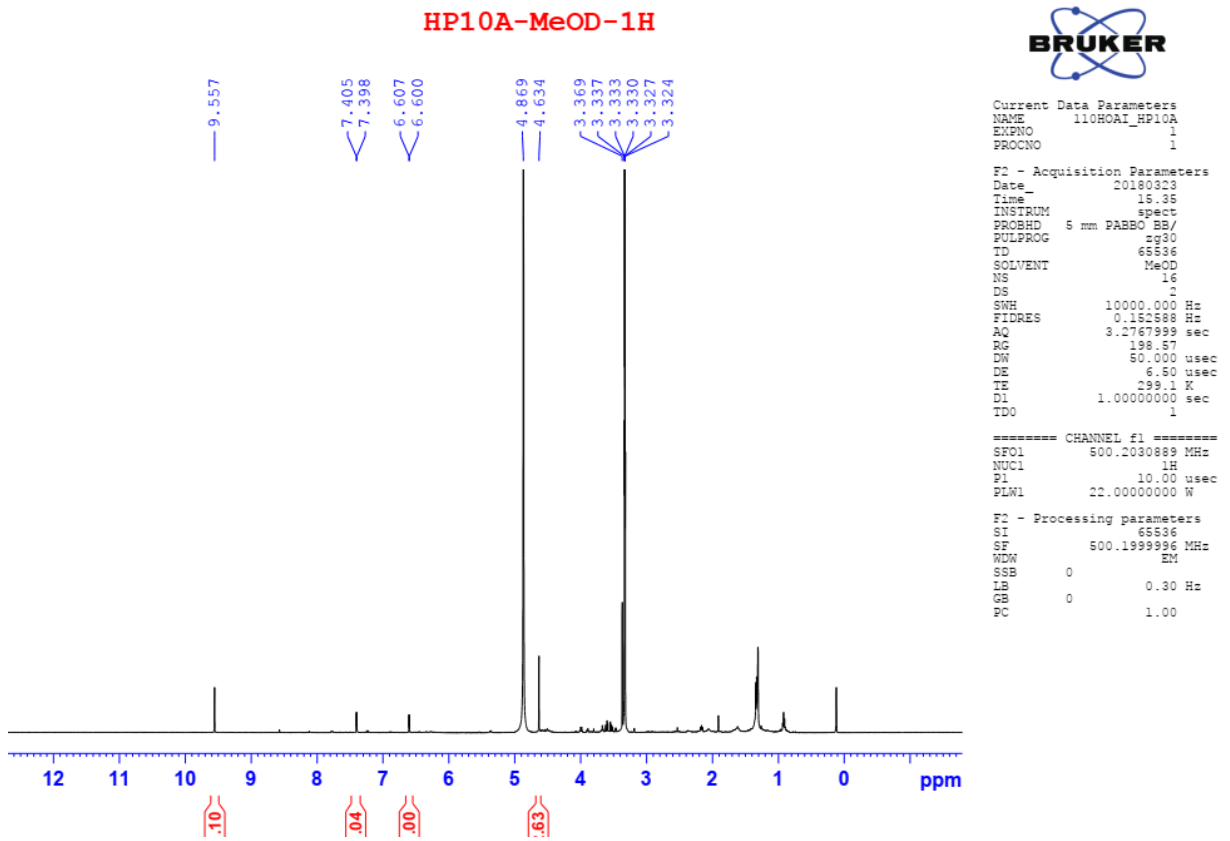
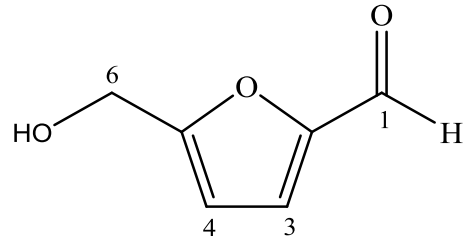
F2 - Processing parameters
SI         1024
SF         500.2000000 MHz
WDW        QSIINE
SSB        2
LB         0 Hz
GB         0
PC         1.00

F1 - Processing parameters
SI         1024
MC2        States-TPPI
SF         500.2000000 MHz
WDW        QSIINE
SSB        2
LB         0 Hz
GB         0
```

Phổ NOESY của hợp chất HPP

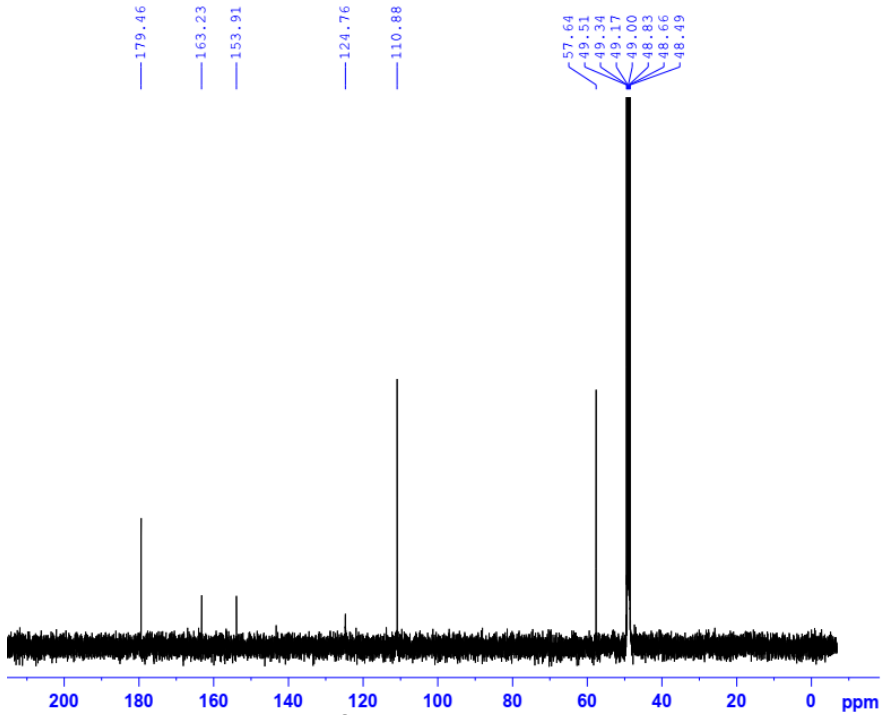
Phụ lục 3.13. Phổ của hợp chất HP10A (5-hydroxymethyl-2-furaldehyd)

- Phổ ^1H -NMR
- Phổ ^{13}C -NMR



Phổ ^1H -NMR của hợp chất HP10A

HP10A-MeOD-C13CPD



```
Current Data Parameters
NAME      110H0AI_HP10A
EXPNO     1
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20180326
Time      7.54
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm PABBO BB/
PULPROG   zgpg30
TD         65536
SOLVENT   MeOD
NS         3072
DS         4
SWH        29761.904 Hz
FIDRES     0.454131 Hz
AQ         1.1010048 sec
RG         138.57
DW         16.800 usec
DE         6.50 usec
TE         304.1 K
D1         2.0000000 sec
D11        0.0300000 sec
TDO        1

===== CHANNEL f1 =====
SF01      125.7592253 MHz
NUC1       13C
P1         10.00 usec
PLW1       88.0000000 W

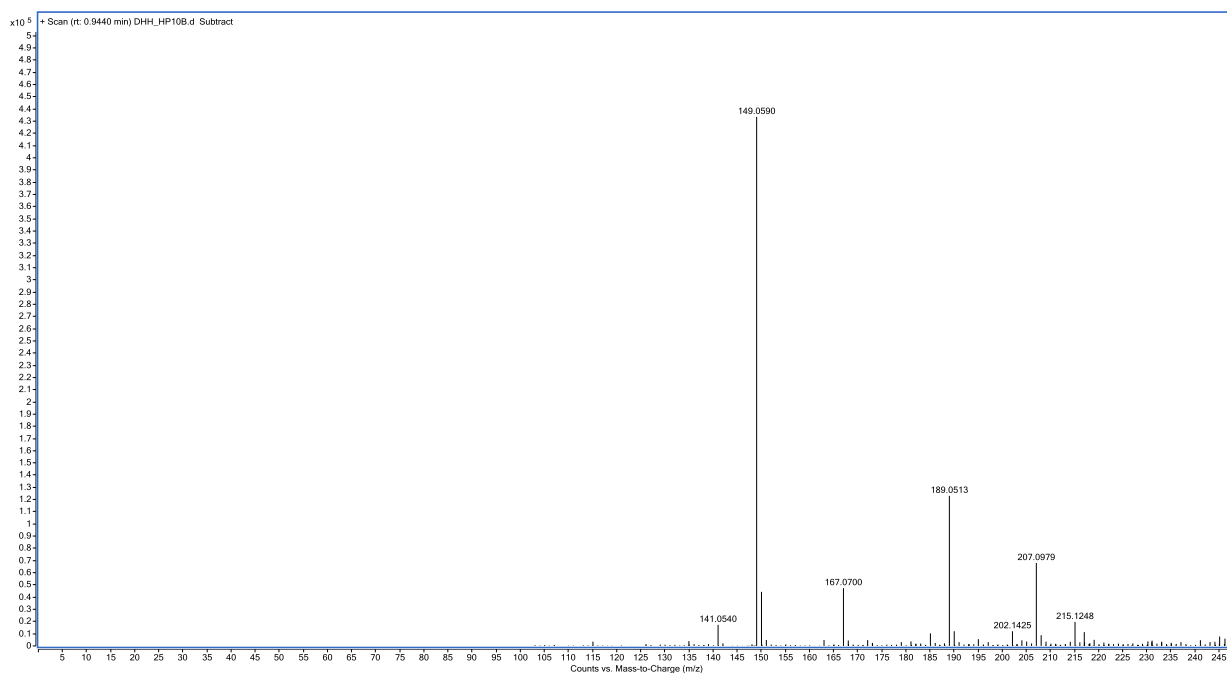
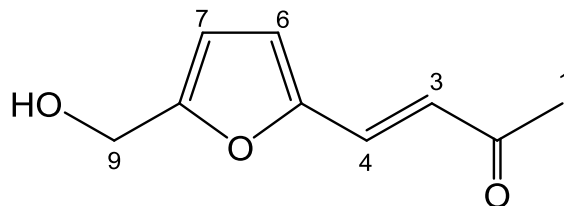
===== CHANNEL f2 =====
SF02      500.2020008 MHz
NUC2       1H
CPDPRG2   waltz16
PCPD2      80.00 usec
PLW2       22.0000000 W
PLW12      0.24375000 W
PLW13      0.22000000 W

F2 - Processing parameters
SI         32768
SF         125.7753900 MHz
WDW        EM
SSB        0
LB         1.00 Hz
GB         0
PC         1.40
```

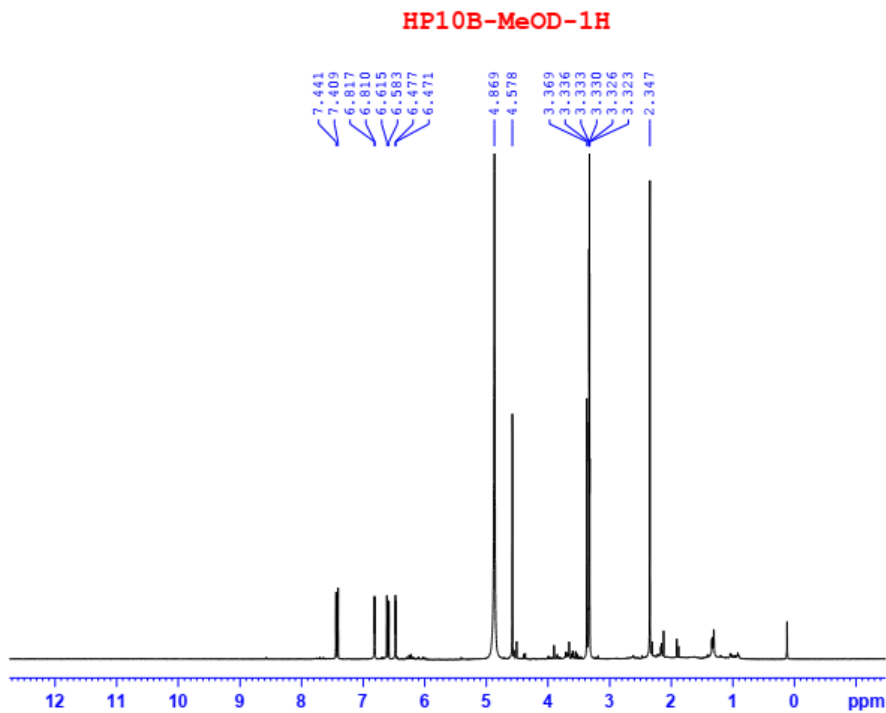
Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HP10A

Phụ lục 3.14. Phổ của hợp chất HP10B (Rehmanon C)

- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ $^1\text{H-NMR}$
- Phổ $^{13}\text{C-NMR}$
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC



Phổ HR-ESI-MS của hợp chất HP10B



BRUKER

```

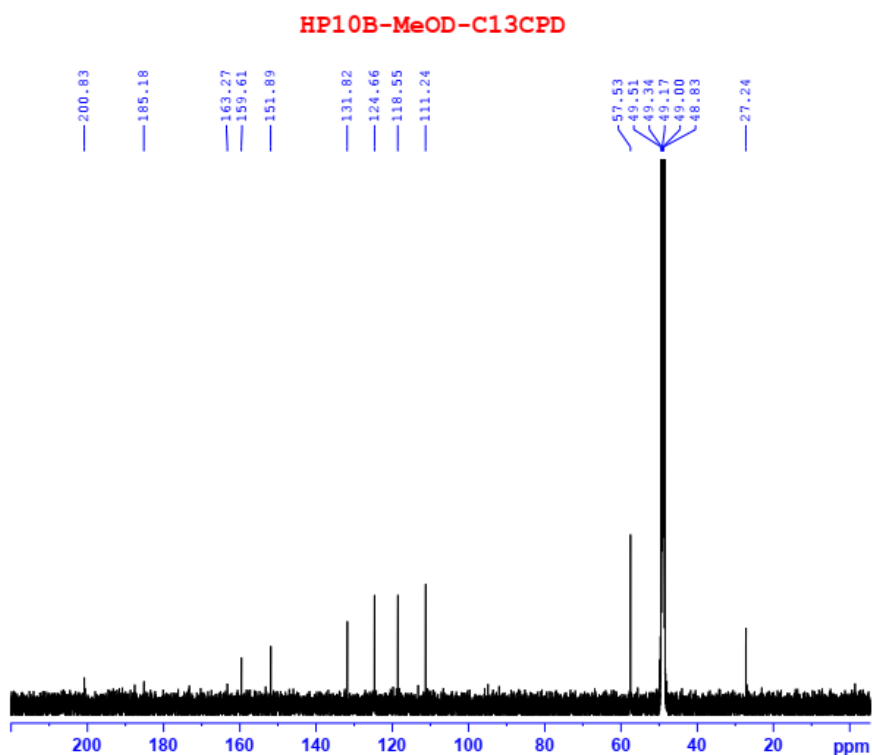
Current Data Parameters
NAME      110H0AI_HP10B
EXPNO    1
PROCNO   1

F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180323
Time     15.38
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zg30
TD        65536
SOLVENT  MeOD
NS        16
DS        2
SWH       10000.000 Hz
FIDRES    0.152588 Hz
AQ        3.2767999 sec
RG        175.34
DW        50.000 usec
DE        6.50 usec
TE        299.1 K
D1        1.00000000 sec
TDO       1

----- CHANNEL f1 -----
SFO1     500.2030889 MHz
NUC1      1H
P1        10.00 usec
PLW1     22.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        500.1999998 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0
PC        1.00
  
```

Phổ ^1H -NMR của hợp chất HP10B



BRUKER

```

Current Data Parameters
NAME      110H0AI_HP10B
EXPNO    2
PROCNO   1

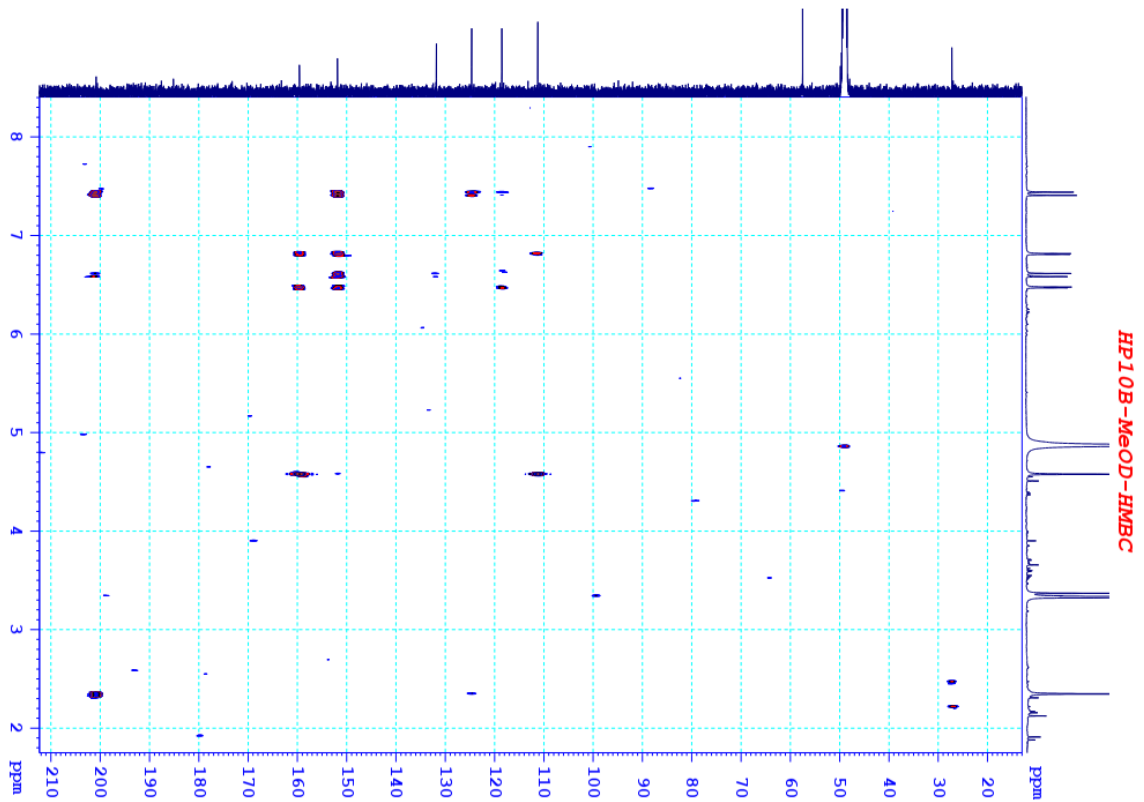
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180324
Time     15.23
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zgpg30
TD        65536
SOLVENT  MeOD
NS        2048
DS        4
SWH       29761.904 Hz
FIDRES    0.454131 Hz
AQ        1.1010048 sec
RG        198.57
DW        16.800 usec
DE        6.50 usec
TE        301.3 K
D1        2.00000000 sec
D11       0.03000000 sec
TDO       1

----- CHANNEL f1 -----
SFO1     125.7892253 MHz
NUC1      13C
P1        10.00 usec
PLW1     88.00000000 W

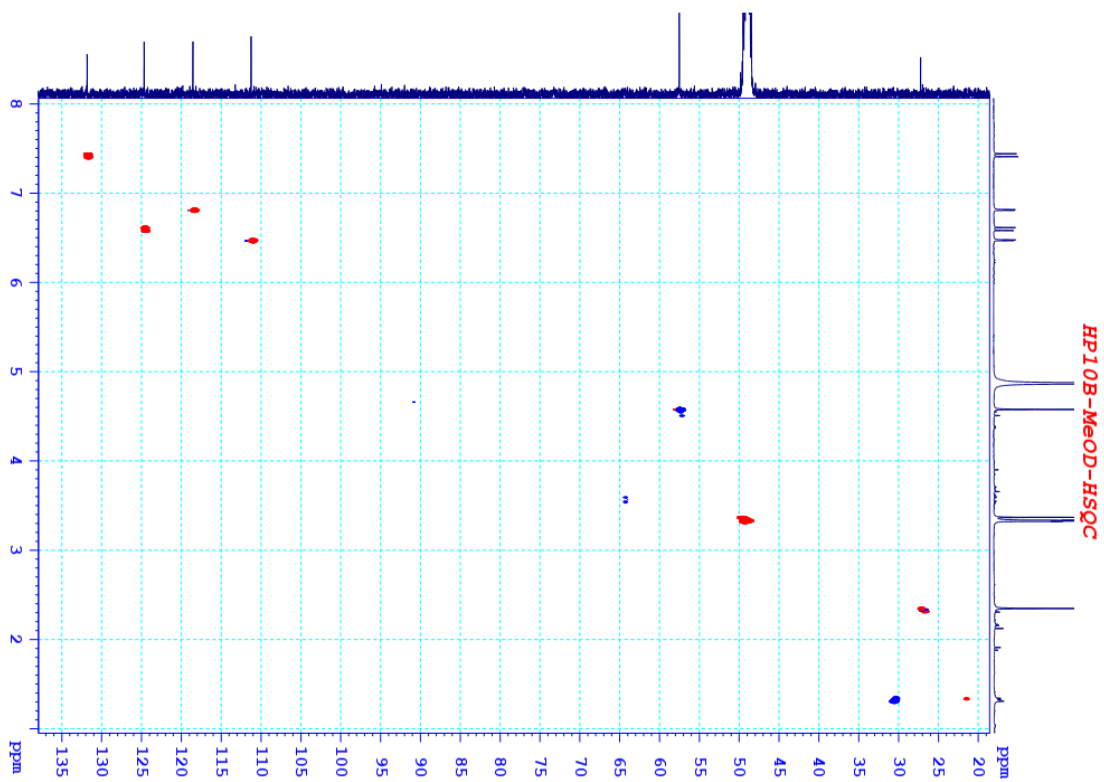
----- CHANNEL f2 -----
SFO2     500.2020008 MHz
NUC2      1H
CPDPRG2  waltz16
PCPD2    80.00 usec
PLW2     22.00000000 W
PLW12    0.34375000 W
PLW13    0.22000000 W

F2 - Processing parameters
SI        32768
SF        125.7752131 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.00
  
```

Phổ ^{13}C -NMR của hợp chất HP10B



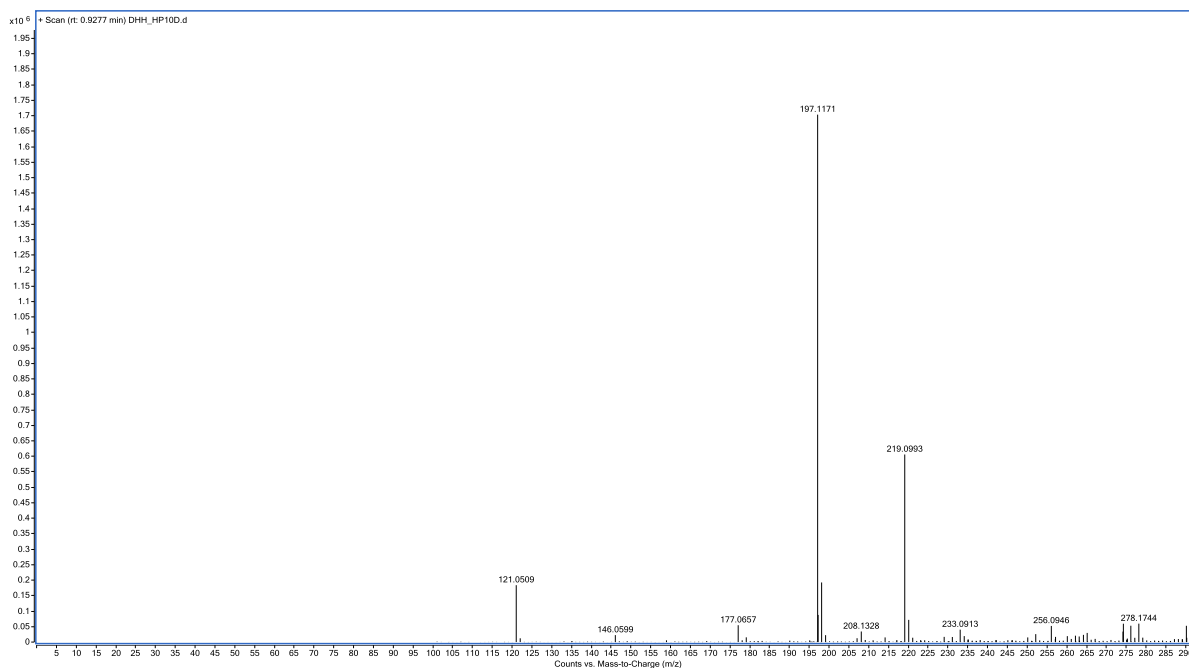
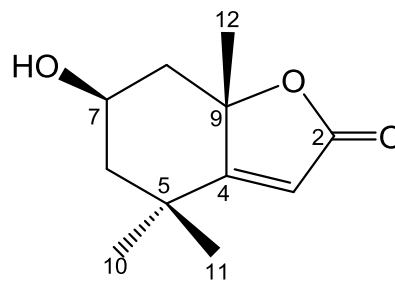
Phổ HMBC của hợp chất HP10B



Phổ HSQC của hợp chất HP10B

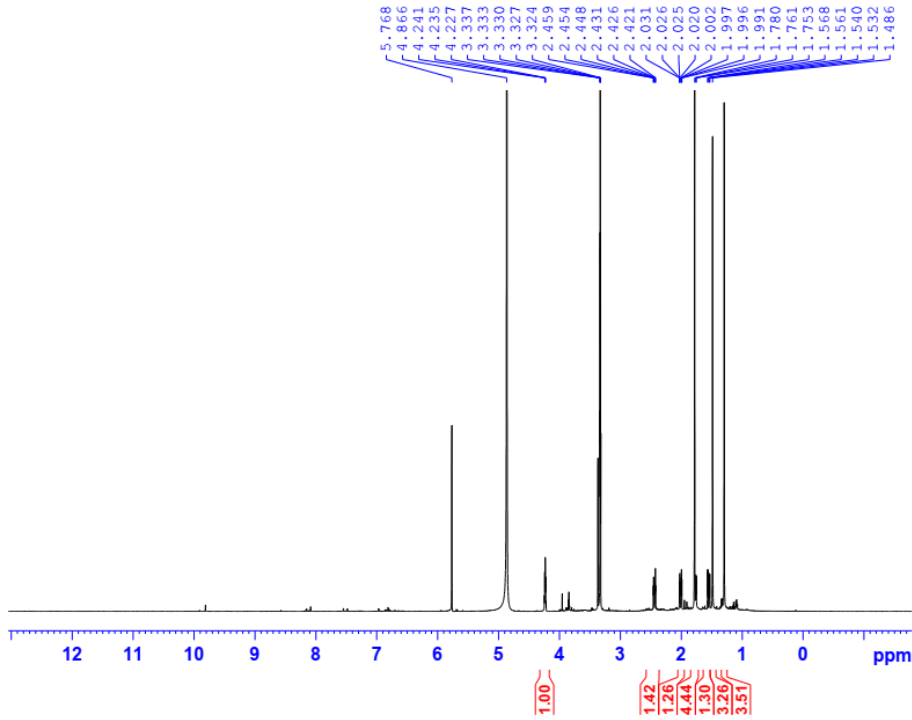
Phụ lục 3.15. Phổ của hợp chất HP10D (Loliolid)

- Phổ HR-ESI-MS
- Phổ ^1H -NMR
- Phổ ^{13}C -NMR
- Phổ HSQC
- Phổ HMBC



Phổ HR-ESI-MS của hợp chất HP10D

HP10D-MeOD-1H



```

Current Data Parameters
NAME      110H0AI_HP10D
EXPNO    1
PROCNO   1

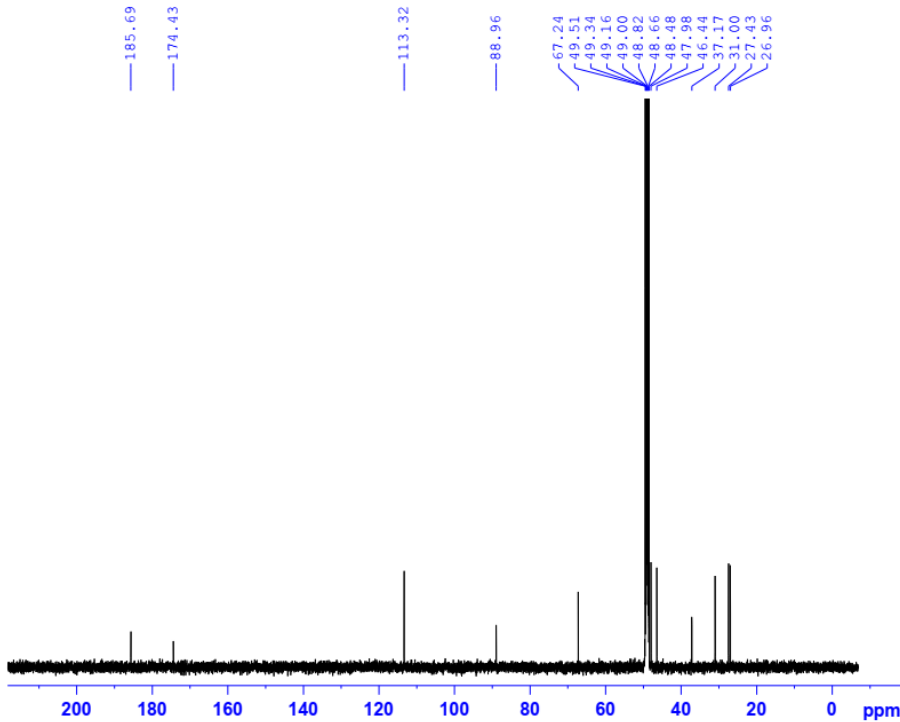
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180323
Time     16.36
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zg30
TD        65536
SOLVENT  MeOD
NS        16
DS        4
SWH       10000.000 Hz
FIDRES   0.152588 Hz
AQ        3.2767999 sec
RG        157.35
DW        50.000 usec
DE        6.50 usec
TE        299.3 K
DL        1.00000000 sec
TDO       1

===== CHANNEL f1 =====
SF01     500.2030889 MHz
NUC1     1H
P1       10.00 usec
PLW1     22.00000000 W

F2 - Processing parameters
SI        65536
SF        500.1999997 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        0.30 Hz
GB        0
PC        1.00
    
```

Phổ ¹H-NMR của hợp chất HP10D

HP10D-MeOD-C13CPD



```

Current Data Parameters
NAME      110H0AI_HP10D
EXPNO    1
PROCNO   1

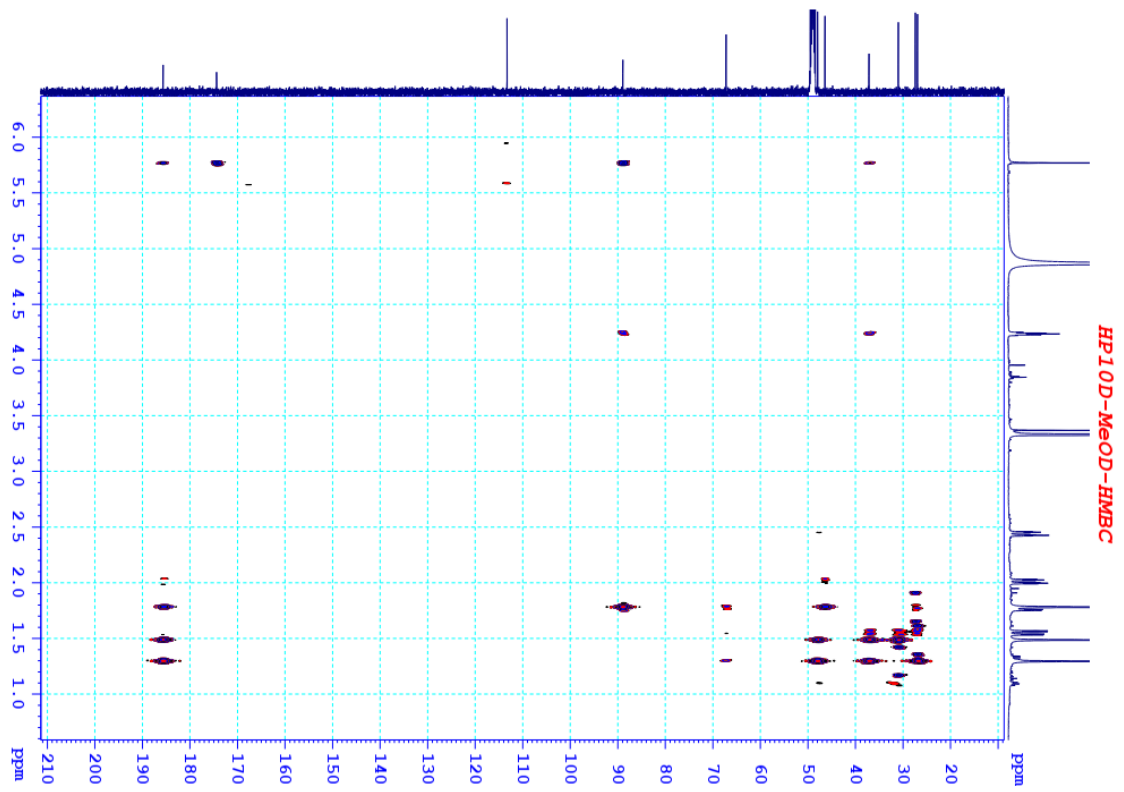
F2 - Acquisition Parameters
Date_    20180324
Time     13.31
INSTRUM  spect
PROBHD   5 mm PABBO BB/
PULPROG  zgpg30
TD        85536
SOLVENT  MeOD
NS        2048
DS        4
SWH       29761.904 Hz
FIDRES   0.454131 Hz
AQ        1.1010048 sec
RG        198.57
DW        16.800 usec
DE        6.50 usec
TE        300.1 K
DL        2.00000000 sec
D11      0.03000000 sec
TDO       1

===== CHANNEL f1 =====
SF01     125.7692253 MHz
NUC1     13C
P1       10.00 usec
PLW1     88.00000000 W

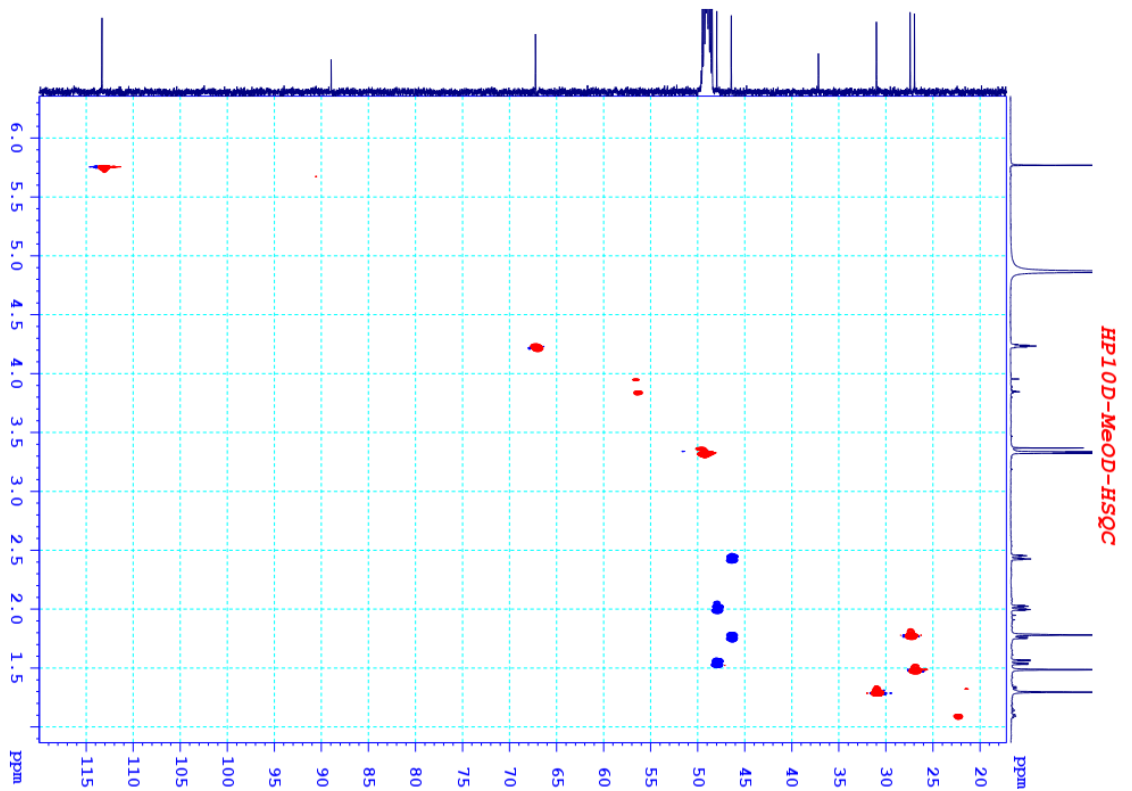
===== CHANNEL f2 =====
SF02     500.2020008 MHz
NUC2     1H
CPDPRG12  waltz16
PCPD2     80.00 usec
PLW2     22.00000000 W
PLW12    0.34375000 W
PLW13    0.22000000 W

F2 - Processing parameters
SI        85536
SF        125.7752140 MHz
WDW       EM
SSB       0
LB        1.00 Hz
GB        0
PC        1.40
    
```

Phổ ¹³C-NMR của hợp chất HP10D



Phổ HMBC của hợp chất HP10D



Phổ HSQC của hợp chất HP10B

PHỤ LỤC 4

Một số hình ảnh chuột trong các thử nghiệm hành vi



Chuột được uống thuốc



Chuột được tiêm scopolamin



Thử nghiệm mê lộ chữ Y



Thử nghiệm nhận diện đồ vật



Thử nghiệm mê lộ nước Morris