

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.)**

Chuyên ngành: Dược liệu - Dược học cổ truyền
Mã số: 972.02.06

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Hà Nội, năm 2021

Công trình hoàn thành tại:

- Viện Dược liệu
- Trường Đại học Y Dược, Đại học Huế
- Trường Đại học Dược Hà Nội
- Viện Hóa học và Viện Hóa sinh biển (Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam)
- Học viện Quân y - Bộ Quốc phòng

Người hướng dẫn khoa học:

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

Phản biện 1: PGS. TS. Nguyễn Thu Hằng

Phản biện 2: PGS. TS. Phạm Thị Vân Anh

Phản biện 3: GS. TS. Nguyễn Mạnh Cường

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp Viện tổ chức tại Viện Dược liệu.

Vào hồi 08 giờ 30 phút, ngày 15 tháng 07 năm 2021

Có thể tìm đọc Luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Hà Nội.
- Thư viện Viện Dược liệu.

A. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

1. Tính cấp thiết của luận án

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. Theo Y học cổ truyền, toàn cây có vị nhạt, tính mát, có tác dụng thanh nhiệt chỉ thống, thông kinh trừ thấp. Các nghiên cứu trên thế giới cho thấy thành phần hóa học chính của loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. bao gồm các hợp chất alcaloid và terpenoid. Trong đó, một số alcaloid 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 đã được ứng dụng trong điều trị bệnh Alzheimer, một căn bệnh đang khan hiếm thuốc và gây tốn kém nhiều chi phí điều trị, đặc biệt ở các nước đang phát triển. Tại Việt Nam, cho tới nay chưa có công bố nào về thành phần hóa học cũng như tác dụng sinh học của loài Thạch tùng đuôi ngựa.

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.**”.

2. Mục tiêu và nội dung của Luận án

2.1. Mục tiêu của Luận án

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.

2.2. Nội dung của Luận án

➤ 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

➤ Về thành phần hóa học

- Định tính các nhóm chất trong dược liệu bằng phản ứng hóa học
- Chiết xuất và phân lập 15 hợp chất theo định hướng tác dụng sinh học

- Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất đã phân lập được

➤ 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.

3. Những đóng góp mới của Luận án

3.1. Về thực vật học

Luận án là tài liệu đầu tiên mô tả chi tiết đặc điểm hình thái thực vật, đặc điểm vi phẫu thân, lá và bột thân và lá của loài Thạch tùng đuôi ngựa (*Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.).

3.2. Về hóa học

Từ thân và lá loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 15 hợp chất, trong đó:

- 4 hợp chất mới, bao gồm 2 alkaloid (huperphlegmin A và huperphlegmin B) và 2 abietan diterpenoid (huperphlegmarin A và huperphlegmarin B);

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

- 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).

3.3. Về độc tính cấp và tác dụng sinh học

Luận án là công bố đầu tiên về độc tính cấp của loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm.

Luận án là công bố đầu tiên về:

- Tác dụng ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE) *in vitro* của các mẫu cao chiết nước, cao chiết methanol, cao chiết ethylacetat, cao

chiết dicloromethan và cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa.

- Tác dụng cải thiện hành vi nhận thức và trí nhớ của cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa trên mô hình chuột gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin thông qua các bài tập hành vi: mê lộ chữ Y, nhận diện đồ vật và mô hình mê lộ nước Morris.

- Tác dụng ức chế hoạt tính của AChE *in vivo* của cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa trên chuột gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin.

- Tác dụng chống lão suy của cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa trên mô hình gây lão suy bằng D-galactose ở chuột thí nghiệm thông qua đánh giá các chỉ số MDA, SOD và GSH-Px.

4. Ý nghĩa của luận án

Đây là lần đầu tiên loài Thạch tùng đuôi ngựa mọc tự nhiên ở Việt Nam được nghiên cứu đầy đủ về thực vật, thành phần hóa học và tác dụng sinh học.

- Tên khoa học của mẫu nghiên cứu đã được xác định giúp cho các kết quả nghiên cứu về hóa học và tác dụng sinh học được khẳng định rõ nguồn gốc.

- Đặc điểm vi học góp phần nhận biết và tiêu chuẩn hóa dược liệu.

- Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học: đã phân lập được 15 hợp chất ở các phân đoạn chiết khác nhau, trong đó có 4 hợp chất mới, 3 hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Huperzia* Bernh., 3 hợp chất lần đầu tiên công bố có trong loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. Kết quả nghiên cứu về thành phần hóa học đã 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.

- Kết quả nghiên cứu về tác dụng sinh học chứng minh cao chiết alcaloid toàn phần từ loài Thạch tùng đuôi ngựa có tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase trên *in vitro*, tác dụng cải thiện trí nhớ và nhận thức trên mô hình chuột gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin, tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase *in vivo* và tác dụng chống lão suy trên mô hình gây lão suy bởi D-galactose. Đây là cơ sở khoa học mở ra triển vọng nghiên cứu đầy đủ hơn để có thể sử dụng rộng rãi dược liệu này theo hướng điều trị bệnh Alzheimer.

5. Bộ cục của luận án

Luận án có 139 trang, gồm 4 chương, 38 bảng, 40 hình, 230 tài liệu tham khảo và 4 phụ lục. Các phần chính trong luận án: Đặt vấn đề (2 trang), Tổng quan (35 trang), Nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu (16 trang), Kết quả nghiên cứu (58 trang), Bàn luận (26 trang), Kết luận và kiến nghị (2 trang).

B. NỘI DUNG CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN

Đã tổng hợp và trình bày một cách hệ thống các kết quả nghiên cứu từ trước đến nay về thực vật, thành phần hóa học và tác dụng sinh học của chi *Huperzia* Bernh. và loài *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm. trên thế giới và ở Việt Nam.

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

2.1. Nguyên vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu nghiên cứu là thân và lá của cây Thạch tùng đuôi ngựa thu hái tại xã Hương Sơn, huyện Hương Hóa, tỉnh Quảng Trị (Tọa độ: 16°47'37.0"N 106°43'44.0"E) vào tháng 5 năm 2016. 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.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

- Thăm định tên khoa học loài nghiên cứu trên cơ sở phân tích đặc điểm hình thái thực vật, so sánh với các tài liệu đã công bố của loài và các khóa phân loại thực vật.

- Xác định đặc điểm vi phẫu phần trên mặt đất, phần rễ và đặc điểm bột dược liệu bằng phương pháp hiển vi.

- Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được dựa trên các thông số vật lý và các phương pháp phổ FT-IR, UV-Vis, ESI-MS, HR-EI-MS, NMR 1 chiều và 2 chiều, CD kết hợp đối chiếu với tài liệu đã công bố.

- Đánh giá độc tính cấp của cao chiết alcaloid toàn phần theo hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam.

- Đánh giá tác dụng ức chế enzym acetylcholinesterase *in vitro* và

in vivo dựa theo nguyên tắc của Ellman G.

- Đánh giá tác dụng cải thiện trí nhớ và nhận thức trên mô hình chuột gây suy giảm trí nhớ bởi scopolamin thông qua các bài tập hành vi: mê lộ chữ Y, nhận diện đồ vật và mê lộ nước Morris.

- Đánh giá tác dụng chống lão suy trên mô hình gây lão suy bởi D-galactose.

CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Kết quả nghiên cứu về thực vật

3.1.1. Đặc điểm hình thái

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, có gân chính rõ, mép lá nguyên, đỉnh nhọn; các lá ở phần trên hình trứng hoặc tam giác, dạng thịt, có gân chính rõ, mép lá nguyên, đỉnh lá nhọn, gốc lá tròn; cuống lá ngắn. Bông lá bào tử ở đỉnh cành, lưỡng phân 2 - 4 lần, hình trụ. Lá bào tử sắp xếp đối chéo chữ thập, hình trứng hoặc tam giác, 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.

3.1.2. Thẩm định tên khoa học

Đã giám định tên khoa học của cây Thạch tùng đuôi ngựa thu hái tại huyện Hướng Hóa, tỉnh Quảng Trị là *Huperzia phlegmaria* (L.) Rothm., thuộc họ Lycopodiaceae.

3.1.3. Đặc điểm vi học

* **Vi phẫu thân:** Mặt cắt ngang qua thân cây có tiết diện hình uốn lượn. Quan sát dưới vật kính 40 cho thấy cấu tạo từ ngoài vào trong có: Biểu bì gồm các tế bào hình tròn xếp đều đặn nhau, màng ngoài phủ lớp cutin màu xanh đậm. Mô cứng 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 gồm các tế bào hình tròn xếp xen kẽ nhau để hở các khoảng gian bào. Mô cứng 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. Bó libe gồm các tế bào có kích thước rất nhỏ, hình thù đa dạng. Bó gỗ gồm các mạch gỗ lớn ở phía trong nhỏ ở phía ngoài, xếp thành hình tam giác xung quanh bó libe.

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

* **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 gồm các tế bào hình nhiều cạnh xếp sát nhau. Mảnh biểu bì mang lỗ khí. Mảnh mô mềm gồm các tế bào dài, thành tế bào mỏng. Mảnh mạch vòng và mảnh mạch hình thang. Các bào tử phân thành ba nhánh hình tam giác lồi ba cạnh.

3.2. Kết quả nghiên cứu về hóa học

3.2.1. Định tính các nhóm hợp chất hữu cơ

Kết quả 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 AChE *in vitro*

Tác dụng ức chế AChE của cao chiết toàn phần và cao chiết phân đoạn: Kết quả cho thấy cao chiết alcaloid toàn phần có tác dụng mạnh nhất với giá trị IC_{50} $1,54 \pm 0,10$ $\mu\text{g/ml}$. Cao chiết nước, cao chiết methanol, cao chiết dicloromethan có tác dụng ức chế AChE với giá trị IC_{50} lần lượt là $49,81 \pm 0,80$; $97,44 \pm 2,33$; $433,07 \pm 7,16$; còn lại cao chiết n-hexan và cao chiết ethyl acetat hầu như không có tác dụng. 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, phân lập các hợp chất

Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế AChE *in vitro* cho thấy cao chiết alcaloid có tác dụng ức chế AChE mạnh nhất. 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: Thân và lá của cây

Thạch tùng đuôi ngựa được rửa sạch, thái nhỏ, sấy khô ở 50°C (1,5 kg), chiết bằng MeOH (3 lần, mỗi lần 5,0 L) ở nhiệt độ phòng. Thu hồi dung môi thu được 75g cao toàn phần. Cao toàn phần được hòa tan bằng acid tartaric 3% (1,0 L), lọc thu được dịch lọc và phần cặn (57g).

- Dịch lọc acid lắ với ethylacetat, sau đó được điều chỉnh đến pH 10 với dung dịch bão hòa Na₂CO₃, tiếp tục lắ với dichloromethan, gộp dịch chiết dichloromethan, sau đó loại bỏ dung môi thu được cặn alcaloid toàn phần (ký hiệu: HC, 8 g). Phân lập các hợp chất từ cao alcaloid toàn phần thu được 5 hợp chất alcaloid ký hiệu là HP1, HP11A, HP11B, HP12, HP13.

- Phần cặn (57g) được rửa với nước cất đến khi trung hòa, sau đó hòa tan cặn trong methanol, lọc lấy dịch lọc methanol, thu hồi dung môi thu được cặn (51 g). Phân tán cặn trong nước rồi lắ với ethylacetat 3 lần thu được dịch EtOAc, thu hồi dung môi thu được cao EtOAc (ký hiệu: HE, 38 g). Phân lập các hợp chất từ cao EtOAc (HE) thu được 10 hợp chất ký hiệu là: HPA, HPB, HPH, HPD, HPI, HPJ, HPP, HP10A, HP10B và HP10D.

3.2.4. Xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất

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.

* **Hợp chất HP1: Fawcettidin** dạng bột màu trắng. **Phổ ¹H NMR** (CD₃OD, 400 MHz) δ_H (ppm): 2,94 (1H, m, H-1a), 3,12 (1H, m, H-1b); 1,33 (1H, m, H-2a), 1,80*(1H, H-2b); 1,80*(1H, H-3^a), 2,23*(1H, H-3b); 2,22*(1H, H-4); 1,99*(1H, H-6a), 2,03*(1H, H-6b); 2,20*(1H, H-7); 1,22 (1H, m, H-8a), 1,41 (1H, m, H-8b); 3,03*(2H, H-9); 1,60*(1H, H-10a), 2,00*(1H, H-10b); 1,60*(1H, H-11a), 2,10*(1H, H-11b); 5,74 (1H, d, *J* = 5,2 Hz, H-14); 2,34 (1H, m, H-15); 1,08 (3H, d, *J* = 6,8 Hz, H-16). **Phổ ¹³C-NMR** (CD₃OD, 100 MHz) δ_C (ppm): 61,5 (C-1), 29,9 (C-2), 31,6 (C-3), 56,9 (C-4), 220,5 (C-5), 44,9 (C-6), 38,4 (C-7), 35,1 (C-8), 53,1 (C-9), 24,3 (C-10), 39,9 (C-11), 47,3 (C-12), 146,7 (C-13), 128,7 (C-14), 29,1 (C-15), 21,0 (C-16).

* **Hợp chất HP11A: Huperphlegmin A (chất mới)** dạng dầu màu vàng, góc quay cực riêng [α]²²_D = - 65 (c 0,01, MeOH). Phổ IR: 3439 và

1701 cm⁻¹. Phổ UV: λ_{\max} 347 nm. Phổ HR-ESI-MS: m/z 397,2122 [M+H]⁺, CTPT: C₂₃H₂₈O₄N₂. **Phổ ¹H-NMR** 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 ¹³C-NMR 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 sp² bậc 4 mang oxy [δ_{C} 160,1 (C-5'), 152,2 (C-2')], một carbon sp² bậc 4 [δ_{C} 138,9 (C-6)], một carbon sp² nhóm methin [δ_{C} 120,9 (C-1')], hai carbon sp² nhóm methin thuộc dị vòng [δ_{C} 120,5 (C-3'), 111,5 (C-4')], hai carbon sp³ bậc 4 [δ_{C} 81,6 (C-13), 63,6 (C-12)], 5 carbon sp³ 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, H₂-8), 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)]. 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'. 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' gợi ý sự xuất hiện của hợp phần 2,5-disubstituted dihydrofuran với nhóm olefin và hydroxymethylen trong cấu trúc của hợp chất HP11A. Sự xuất hiện vòng 16-methyl-14-indenon 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-2'. 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 tác NOESY giữa H-7/H₂-8 với H-3' 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 cũng cho thấy nhóm methyl ở C-16 ở vị trí đối lập với H-7. Điều này được chứng minh qua tương tác NOESY giữa H-7/H-15 và sự vắng mặt tương tác giữa H-7/H₃-16. Như vậy, từ các lập luận trên cho phép đề nghị cấu trúc của hợp chất HP11A 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**.

* **Hợp chất HP11B: Huperphlegmin B (chất mới)** dạng dầu màu vàng, góc quay cực riêng $[\alpha]^{22}_D = -162$ (c 0,01, MeOH). Phổ IR: 3402 và 1699 cm^{-1} . Phổ UV: 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 $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{O}_4\text{N}_2$. Các dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của hợp chất HP11B 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. 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). 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. Sự khác biệt trong định hướng của vòng furan giữa HP11A và HP11B có thể được giải thích bằng sự xoay quanh cầu nối liên kết C-1'/C-2' của hợp phần này. Từ các lập luận trên, cấu trúc của hợp chất HP11B được xác định, 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** dạng dầu màu vàng nâu. Phổ HR-ESI-MS: m/z 262,1800 [M+H]⁺, CTPT: C₁₆H₂₃NO₂. **Phổ ¹H-NMR** (CD₃OD, 500 MHz) δ_{H} (ppm): 3,95 (1H, ddd, $J = 12,0; 5,0; 2,0$ Hz, H-1a), 3,04 (1H, ddd, $J = 12,5; 12,0; 4,5$ Hz, H-1b); 2,33 (1H, m, H-2a), 1,42 (1H, m, H-2b); 2,59 (1H, dt, $J = 13,0; 2,0$ Hz, H-3a), 2,50 (1H, m, H-3b); 2,40 (1H, dd, $J = 15,5; 7,0$ Hz, H-6a), 2,17 (1H, dd, $J = 15,5; 1,5$ Hz, H-6b); 2,88 (1H, m, H-7); 2,08 (1H, m, H-8a), 1,81* (H-8b); 4,02 (1H, m, H-9a), 3,03 (1H, m, H-9b); 2,80* (H-10); 2,80* (H-11a); 1,94 (1H, m, H-11b); 2,66 (1H, dd, $J = 9,5; 3,5$ Hz, H-14a), 1,81* (H-14b); 2,00 (1H, m, H-15); 1,10 (1H, d, $J = 7,0$ Hz, H-16). **Phổ ¹³C-NMR** (CD₃OD, 125 MHz) δ_{C} (ppm): 51,9 (C-1); 20,8 (C-2); 23,0 (C-3); 142,3 (C-4); 210,8 (C-5); 39,5 (C-6); 42,7 (C-7); 41,4 (C-8); 52,1 (C-9); 26,4 (C-10); 29,8 (C-11); 177,2 (C-12); 176,3 (C-13); 41,4 (C-14); 28,3 (C-15); 26,7 (C-16).

* **Hợp chất HP13: Huperzin A** dạng dầu màu vàng. **Phổ ¹H-NMR** (DMSO, 500 MHz) δ_{H} (ppm): 6,13 (1H, d, $J = 9,5$ Hz, H-2); 7,79 (1H,

d, $J = 9,5$ Hz, H-3); 2,60 (1H, dd, $J = 17,0$; 5,0 Hz, H-6a), 2,47* (H-6b); 3,52 (1H, m, H-7); 5,39 (1H, brs, $J = 4,5$ Hz, H-8); 1,61 (2H, d, $J = 7,0$ Hz, H-10); 5,49 (1H, q, $J = 7,0$ Hz, H-11); 2,06 (1H, d, $J = 17,0$ Hz, H-14a); 1,97 (1H, d, $J = 17,0$ Hz, H-14b); 1,48 (3H, s, H-16). **Phổ ^{13}C -NMR** (DMSO, 125 MHz) δ_{C} (ppm): 162,7 (C-1); 116,9 (C-2); 139,7 (C-3); 122,0 (C-4); 142,3 (C-5); 34,9 (C-6); 32,3 (C-7); 124,5 (C-8); 12,1 (C-10); 110,7 (C-11); 142,0 (C-12); 53,7 (C-13); 48,8 (C-14); 133,6 (C-15); 22,4 (C-16).

* **Hợp chất HPA: Huperphlegmarin A (Chất mới)** dạng bột màu vàng nhạt. Phổ UV (MeOH): λ_{max} 299, 355 nm gợi ý sự có mặt của hệ vòng thơm liên hợp. Phổ HR-ESI-MS: m/z 345,1697 [M-H]⁻, CTPT: 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 mang oxy tại δ_{H} 4,27 (d, $J = 9,0, 6,5$ Hz) và 4,80. **Phổ ^{13}C -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. Cấu trúc này tương tự như hợp chất HPB ngoại trừ sự vắng mặt của liên kết đôi tại Δ^5 . Phổ CD của hợp chất HPA

cho thấy hiệu ứng cotton âm tại 237 nm và 255 nm, dương tại 218 nm và 312 nm, tương tự như hợp chất cyrtophyllon B. 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. Ngoài ra, dựa vào quy tắc CD keton cho nhóm C=O: Nhóm 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*. Trên phổ NOESY của HPA cho thấy 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. Tương tự, hằng số tương tác giữa H-15 và H-16a ($J_{15,16} = J_{aa} = 9,0; 6,0$ 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. 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 và được đặt tên là **huperphlegmarin A**.

* **Hợp chất HPB: Lycoxanthol** dạng bột màu vàng nhạt. Phổ UV (MeOH): λ_{\max} 295, 335, 381 nm. Phổ HR-ESI-MS: m/z 345,1697 [M+H]⁺, CTPT: C₂₀H₂₄O₅. **Phổ ¹H-NMR (DMSO, 500 MHz)** δ_{H} (ppm): 1,62 (1H, m, H-1a), 3,25 (1H, m, H-1b); 1,72 (1H, m, H-2a); 1,87 (1H, m, H-2b); 1,43^{*}(H-3a); 2,08 (1H, m, H-3b); 3,70 (1H, m, H-15); 4,28 (1H, dd $J = 9,0; 6,0$ Hz, H-16a); 4,80^{*}(H-16B); 1,38 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, H-17); 1,45 (3H, s, H-18); 1,48 (3H, s, H-19); 1,68 (3H, s, H-20). **Phổ ¹³C-NMR (DMSO, 125 MHz)** δ_{C} (ppm): 30,8 (C-1); 18,6 (C-2); 37,4 (C-3); 37,5 (C-4); 144,9 (C-5); 143,2 (C-6); 185,0 (C-7); 108,1 (C-8); 142,0 (C-9); 43,2 (C-10); 133,0 (C-11); 157,5 (C-12); 117,1 (C-13); 155,0 (C-14); 36,5 (C-15); 81,5 (C-16); 18,9 (C-17); 28,5 (C-18); 27,6 (C-19); 27,6 (C-20).

* **Hợp chất HPH: Huperphlegmarin B (Chất mới)** dạng bột màu vàng nhạt. Phổ HR-ESI-MS: m/z 329,1747 [M-H]⁻, m/z 331,1925 [M+H]⁺, CTPT: C₂₀H₂₆O₄. **Phổ ¹H-NMR (DMSO, 500 MHz)** δ_{H} (ppm):

3,97 (1H, dd, $J = 12,5; 3,5$, H-1); 2,04 (1H, m, H-2a); 2,35 (1H, dq, $J = 12,0; 4,5$, H-2b); 1,59 (1H, m, H-3a); 1,82 (1H, m, H-3b); 1,98 (1H, d, $J = 12,5$, H-5); 4,54 (1H, d, $J = 12,5$, H-6); 7,23 (1H, s, H-14); 3,35 (1H, m, H-15); 1,21 (1H, d, $J = 7,0$, H-16); 1,21 (1H, d, $J = 7,0$, H-17); 1,17 (3H, s, H₃-18); 1,30 (3H, s, H₃-19); 1,29 (3H, s, H₃-20). **Phổ ¹³C-NMR** (DMSO, 125 MHz) δ_c (ppm): 30,8 (C-1); 18,6 (C-2); 37,4 (C-3); 37,5 (C-4); 144,9 (C-5); 143,2 (C-6); 185,0 (C-7); 108,1 (C-8); 142,0 (C-9); 43,2 (C-10); 133,0 (C-11); 157,5 (C-12); 117,1 (C-13); 155,0 (C-14); 36,5 (C-15); 81,5 (C-16); 18,9 (C-17); 28,5 (C-18); 27,6 (C-19); 27,6 (C-20). Cấu trúc hóa học của hợp chất HPH được thiết lập là (1R, 5S, 6R, 10S)-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**.

* **Hợp chất HPD: 21 β -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat** dạng bột màu trắng. **Phổ ¹H-NMR** (CDCl₃, 500 MHz) δ_H (ppm): 1,79 (1H, dt, $J = 13,5; 4,0$, H-1a), 1,18* (1H, H-1b); 1,98* (1H, H-2a), 1,62*(1H, H-2b); 4,46 (1H, dd, $J = 11,5; 5,0$ Hz, H-3); 0,86*(1H, H-5); 1,47*(1H, H-6); 1,40*(1H, H-7a); 1,20*(1H, H-7b); 0,80*(1H, H-9); 1,72*(1H, H-11a), 1,07*(1H, H-11b); 1,98*(1H, H-12a), 1,15 (1H, br,d, $J = 12,5$ Hz, H-12b); 1,85*(1H, H-13); 5,33(1H, br,s, H-15); 1,88*(1H, H-16a), 1,67*(1H, H-16b); 1,69*(1H, H-17); 1,55*(1H, H-19a), 1,44*(1H, H-19b); 1,93*(1H, H-20a), 1,62*(1H, H-20b); 3,45 (1H, s, H-21); 0,85 (3H, s, H-23); 0,84 (3H, s, H-24); 0,82 (3H, s, H-25); 0,84 (3H, s, H-26); 2,23 (1H, br,d, $J = 14,5$ Hz, H-27a), 1,70*(1H, H-27b); 0,69 (3H, s, H-28); 0,87 (3H, s, H-29); 0,93 (3H, s, H-30); 2,04 (3H, s, H-2'). **Phổ ¹³C-NMR** (CDCl₃, 125 MHz) δ_c (ppm): 38,13 (C-1); 23,87 (C-2); 80,9 (C-3); 38,32 (C-4); 55,87 (C-5); 18,82 (C-6); 45,08 (C-7); 37,17 (C-8); 62,81 (C-9); 37,47 (C-10); 25,21 (C-11); 27,22 (C-12); 56,9 (C-13); 138,5 (C-14); 122,2 (C-15); 24,04 (C-16); 43,45 (C-17); 35,98 (C-18); 31,24 (C-19); 25,47 (C-20); 76,26 (C-21); 37,93 (C-22); 28,12 (C-23); 16,58 (C-24); 15,82 (C-25); 19,81 (C-26); 56,21 (C-27); 13,32 (C-28); 21,8 (C-29); 27,73 (C-30); 171 (C-1'); 21,33 (C-2').

* **Hợp chất HPI: 21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat** dạng bột trắng. **Phổ ¹H-NMR** (CDCl₃, 500 MHz) δ_H (ppm): 1,79 (1H, dt, $J = 14,5; 5,0$ Hz, H-1a), 1,25*(1H, H-1b); 1,63*(2H, H-2); 4,46 (1H, dd, $J = 12,0; 5,0$ Hz, H-3); 0,86* (1H, H-5); 1,47* (2H, H-6); 1,40*(1H, H-7a),

1,20*(1H, H-7b); 0,80*(1H, H-9); 1,70*(1H, H-11a), 1,07*(1H, H-11b); 1,97*(1H, H-12a), 1,12*(1H, H-12b); 1,73*(1H, H-13); 5,33 (1H, br,s, H-15); 2,09 (1H, dm, H-16a), 1,90*(1H, H-16b); 1,23*(1H, H-17); 1,87 (1H, dt, $J = 14,0$; 5,0 Hz, H-19a); 1,25*(1H, H-19b); 1,63* (2H, H-20); 3,23 (1H, dt, $J = 11,5$; 4,5 Hz, H-21); 0,85 (3H, s, H-23); 0,84 (3H, s, H-24); 0,83 (3H, s, H-25); 0,83 (3H, s, H-26); 2,22 (1H, br,d, $J = (14,5$ Hz, H-27a); 1,73*(1H, H-27b); 0,67 (3H, s, H-28); 0,83 (3H, s, H-29); 0,96 (3H, s, H-30); 2,04 (3H, s, H-2'). **Phổ ^{13}C -NMR** (CDCl_3 , 125 MHz) δ_{C} (ppm): 38,29 (C-1); 23,85 (C-2); 80,84 (C-3); 38,1 (C-4); 55,82 (C-5); 18,79 (C-6); 45,01 (C-7); 37,15 (C-8); 62,7 (C-9); 37,9 (C-10); 25,26 (C-11); 27,24 (C-12); 57,18 (C-13); 138,1 (C-14); 122,3 (C-15); 24,07 (C-16); 49,51 (C-17); 36,13 (C-18); 37,12 (C-19); 27,69 (C-20); 79,16 (C-21); 38,88 (C-22); 28,1 (C-23); 16,57 (C-24); 15,81 (C-25); 19,81 (C-26); 55,99 (C-27); 13,43 (C-28); 14,63 (C-29); 27,57 (C-30); 171,00 (C-1'); 21,31 (C-2').

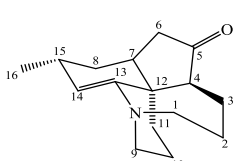
* **Hợp chất HPJ: 21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -ol** dạng bột trắng. **Phổ HR-ESI-MS**: m/z 477,3503 $[\text{M}+\text{Cl}]^-$, CTPT: $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$. **Phổ ^1H -NMR** (CDCl_3 & CD_3OD , 500 MHz) δ_{H} (ppm): 0,95*(1H, H-1a), 1,79 (1H, dt, $J = 13,5$; 3,5 Hz, H-1b); 1,61*(1H, H-2a), 1,12*(1H, H-2b); 3,17 (1H, dd, $J = 10,5$; 5,5 Hz, H-3); 0,77*(1H, H-5); 1,45*(2H, H-6); 1,18*(1H, H-7a), 1,39 (1H, dt, $J = 13,0$; 3,0 Hz, H-7b); 0,80*(1H, H-9); 1,06*(1H, H-11a), 1,72*(1H, H-11b); 2,00 (1H, m, H-12a), 1,61*(1H, H-12b); 1,75*(1H, H-13); 5,33 (1H, br,s, H-15); 2,09 (1H, dm, $J = 18,0$ Hz, H-16a), 1,93 (1H, m, H-16b); 1,24 (1H, dd, $J = 12,0$; 5,5 Hz, H-17); 1,85 (1H, dt, $J = 13,5$; 3,5 Hz, H-19a); 1,11*(1H, H-19b); 1,61*(2H, H-20); 3,21 (1H, dd, $J = 11,0$; 5,0 Hz, H-21); 0,96 (3H, s, H-23); 0,76 (3H, s, H-24); 0,81 (3H, s, H-25); 0,83 (3H, s, H-26); 2,21 (1H, brs, d, $J = 14,0$ Hz, H-27a), 1,76*(1H, H-27b); 0,67 (3H, s, H-28); 0,82 (3H, s, H-29); 0,95 (3H, s, H-30). **Phổ ^{13}C -NMR** (CDCl_3 & CD_3OD , 125 MHz) δ_{C} (ppm): 38,50 (C-1); 27,16 (C-2); 78,49 (C-3); 38,76 (C-4); 55,61 (C-5); 18,74 (C-6); 45,00 (C-7); 36,93 (C-8); 62,71 (C-9); 38,00 (C-10); 25,13 (C-11); 27,05 (C-12); 57,04 (C-13); 138,10 (C-14); 122,00 (C-15); 23,89 (C-16); 49,73 (C-17); 35,92 (C-18); 37,03 (C-19); 27,01 (C-20); 78,80 (C-21); 38,66 (C-22); 27,84 (C-23); 15,22 (C-24); 15,52 (C-25); 19,59 (C-26); 55,90 (C-27); 13,18 (C-28); 14,40 (C-29); 27,29 (C-30).

* **Hợp chất HPP: Lycophlegmariol A** dạng bột màu trắng. Phổ HR-ESI-MS: m/z 621,4156 ($[M-H]^-$), CTPT: $C_{39}H_{58}O_6$. **Phổ 1H -NMR** (CD_3OD , 500 MHz) δ_H (ppm): 1,48*(1H, H-1a), 1,03 (1H, m, H-1b); 1,85*(1H, H-2a), 1,54*(1H, H-2b); 5,02 (1H, brs, H-3); 1,35*(1H, H-5); 1,48 (2H, s, H-6); 1,39*(1H, H-7a), 1,23 (1H, m, H-7b); 0,90*(1H, H-9); 1,81 (1H, m, H-11a), 1,18*(1H, H-11b); 2,04*(1H, H-12a), 1,18*(1H, H-12b); 1,94*(1H, H-13); 5,35 (1H, s, H-15); 2,02*(1H, H-16a), 1,95*(1H, H-16b); 1,74*(1H, H-17); 1,60*(1H, H-19a), 1,52*(1H, H-19b); 1,97*(1H, H-20a), 1,60*(1H, H-20b); 3,46 (1H, brs, H-21); 0,88 (3H, s, H-23); 3,71 (1H, d, $J = 11,5$ Hz, H-24a), 3,38 (1H, d, $J = 11,5$ Hz, H-24b); 0,82 (3H, s, H-25); 0,86 (3H, s, H-26); 2,32 (1H, d, $J = 14,5$ Hz, H-27a), 1,74*(1H, H-27b); 0,76 (3H, s, H-28); 0,91 (3H, s, H-29); 0,93 (3H, s, H-30); 2,62 (2H, t, $J = 7,0$ Hz, H-2'); 2,82 (2H, m, H-3'); 6,66 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-5'); 6,68 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-8'); 6,55 (1H, dd, $J = (8,5, 2,0$ Hz, H-9'). **Phổ ^{13}C -NMR** (CD_3OD , 125 MHz) δ_C (ppm): 34,9 (C-1); 23,7 (C-2); 75,4 (C-3); 43,6 (C-4); 52,5 (C-5); 19,8 (C-6); 46,5 (C-7); 38,4 (C-8); 64,2 (C-9); 39,1 (C-10); 26,3 (C-11); 28,5 (C-12); 58,3 (C-13); 139,9 (C-14); 123,4 (C-15); 25,1 (C-16); 44,6 (C-17); 37,1 (C-18); 32,4 (C-19); 26,5 (C-20); 77,0 (C-21); 38,4 (C-22); 22,7 (C-23); 65,3 (C-24); 16,6 (C-25); 20,3 (C-26); 57,5 (C-27); 13,9 (C-28); 22,4 (C-29); 28,4 (C-30); 174,7 (C-1'); 37,3 (C-2'); 31,7 (C-3'); 133,3 (C-4'); 116,4 (C-5'); 146,3 (C-6'); 144,7 (C-7'); 116,4 (C-8'); 120,5 (C-9').

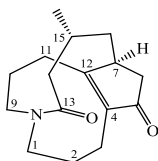
* **Hợp chất HP10A: 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd** dạng dầu, màu vàng. **Phổ 1H -NMR** (CD_3OD , 500 MHz) δ_H (ppm): 9,56 (1H, s, H-1); 7,40 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-3); 6,60 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-4); 4,63 (2H, s, H-6). **Phổ ^{13}C -NMR** (CD_3OD , 125 MHz) δ_C (ppm): 179,5 (C-1); 153,9 (C-2); 124,8 (C-3); 110,9 (C-4); 163,2 (C-5); 57,6 (C-6).

* **Hợp chất HP10B: rehmanon C** dạng dầu màu vàng nhạt. Phổ HR-ESI-MS: m/z 189,0513 $[M+Na]^+$, CTPT: $C_9H_{10}O_3$. **Phổ 1H -NMR** (CD_3OD , 500 MHz) δ_H (ppm): 2,35 (3H, s, H-1); 6,60 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-3); 7,43 (1H, d, $J = 16,0$ Hz, H-4); 6,81 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-6); 6,47 (1H, d, $J = 3,5$ Hz, H-7); 4,58 (2H, s, H-9). **Phổ ^{13}C -NMR** (CD_3OD , 125 MHz) δ_C (ppm): 27,2 (C-1); 200,8 (C-2); 124,7 (C-3); 131,8 (C-4); 151,9 (C-5); 118,6 (C-6); 111,2 (C-7); 163,3 (C-8); 57,5 (C-9).

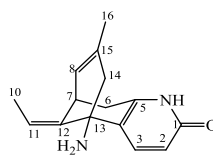
* **Hợp chất HP10D: Loliolid** dạng dầu, màu vàng. Phổ HR-ESI-MS: m/z 197,1171 ($[M+H]^+$), CTPT: $C_{11}H_{16}O_3$. **Phổ 1H -NMR** (CD_3OD , 500 MHz) δ_H (ppm): 5,77 (1H, s, H-3); 1,55 (1H, dd, $J = 4,0; 14,0$ Hz, H-6a), 2,01 (1H, td, $J = 3,0; 14,0$ Hz, H-6b); 4,24 (1H, tt, $J = 3,0; 4,0$ Hz, H-7); 1,76* (1H, H-8a), 2,44 (1H, td, $J = 3,0; 14,0$ Hz, H-8b); 1,30 (3H, s, H-10); 1,49 (3H, s, H-11); 1,78 (3H, s, H-12). **Phổ ^{13}C -NMR** (CD_3OD , 125 MHz) δ_C (ppm): 174,4 (C-2); 113,3 (C-3); 185,7 (C-4); 37,2 (C-5); 48,0 (C-6); 67,2 (C-7); 46,4 (C-8); 89,0 (C-9); 31,0 (C-10); 26,9 (C-11); 27,4 (C-12).



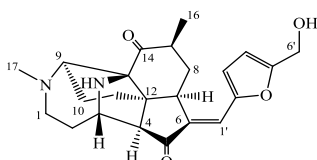
Fawcettidin (HP1)



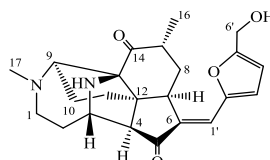
Phlegmariurin B (HP12)



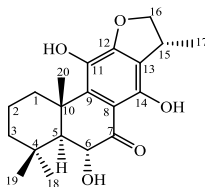
Huperzin A (HP13)



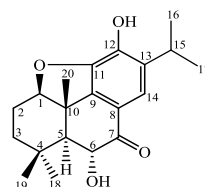
Huperphlegmin A (HP11A)



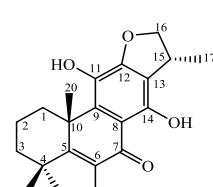
Huperphlegmin B (HP11B)



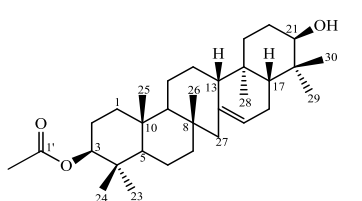
Huperphlegmarin A (HPA)



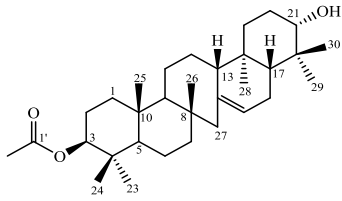
Huperphlegmarin B (HPH)



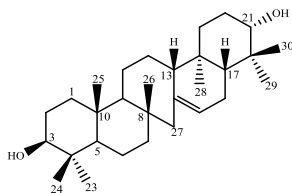
Lycoxanthol (HPB)



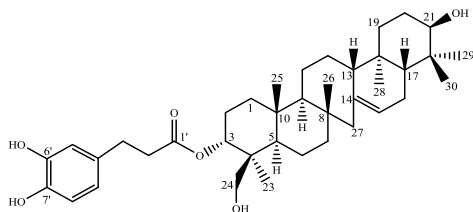
21 β -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat (HPD)



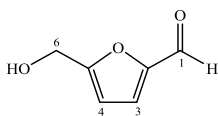
21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -yl acetat (HPI)



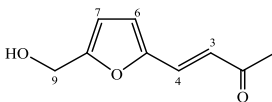
21 α -hydroxyserrat-14-en-3 β -ol (HPJ)



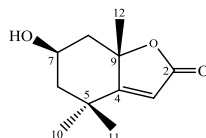
Lycophlegmariol A (HPP)



5-hydroxymethyl-2-furaldehyd (HP10A)



rehmanone C (HP10B)



Loliolid (HP10)

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

3.3. Kết quả nghiên cứu về độc tính cấp và tác dụng sinh học

Chuẩn bị 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 (trung 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 kiểm hóa bằng dung dịch Na₂CO₃ bão hòa (điều chỉnh để đạt pH 10). Dung dịch sau khi kiểm 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%).

3.3.1. Kết quả nghiên cứu về độc tính cấp

Đã xác định LD₅₀ của Litchfield Wilcoxon, xác định được liều LD₅₀ của cao chiết alcaloid 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.

3.3.2. Kết quả nghiên cứu về tác dụng sinh học

3.3.2.1. Tác dụng ức chế AChE *in vitro*

Tác dụng ức chế AChE của các hợp chất phân lập được: Kết quả đánh giá hoạt tính ức chế AChE của 15 hợp chất sạch phân lập được từ loài Thạch tùng đuôi ngựa cho thấy hợp chất huperzin A (HP13) có hoạt tính ức chế AChE *in vitro* mạnh với $IC_{50} = 0,74 \pm 0,04 \mu M$, mạnh hơn chứng dương galantamin ($IC_{50} = 0,33 \pm 0,01 \mu M$) ở cùng điều kiện thử nghiệm. Hai alcaloid mới là huperphlegmin A (HP11A) và huperphlegmin B (HP11B) cũng có hoạt tính ức chế AChE với giá trị IC_{50} lần lượt là $65,50 \pm 1,83$ và $73,55 \pm 1,94 \mu M$.

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

a) Kết quả thử nghiệm mê lộ chữ Y

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 ($\bar{X} \pm SD$)
Chứng sinh lý (1)	16,00 ± 4,37	85,21 ± 17,60
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 3.19 cho thấy: có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê về phần trăm vận động luân phiên ở các nhóm nghiên cứu [$F(5,59) = 4,135$, $p = 0,003$]. Cụ thể, phần trăm vận động luân phiên ở nhóm tiêm scopolamin là thấp hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng (Tukey, $p < 0,05$); 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, $p < 0,01$) so với nhóm tiêm scopolamin.

b) Kết quả ở thử nghiệm nhận diện đồ vật

***) Tỷ lệ phần trăm thời gian khám phá đồ vật ở pha luyện tập:**
 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 ($p > 0,05$).

***) 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 ở Bảng 3.21 cho thấy, 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 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 bến đỗ):**

Kết quả ở Bảng 3.22 cho thấy có sự khác biệt về thời gian tiềm giữa 6 nhóm nghiên cứu [$F(5,54)=10,154$, $p < 0,001$]. Cụ thể, 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, $p < 0,001$) tương tự như khi điều trị bằng donepezil liều 5 mg/kg.

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

Thời gian \ Nhóm	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
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

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

Bảng 3.23 cho thấy có sự khác biệt về quãng đường bơi đến đích giữa 6 nhóm nghiên cứu [$F(5,54)=7,58$, $p < 0,001$]. Cụ thể, 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 $p < 0,05$).

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	Scopolamin	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

** Thời gian bơi ở góc phần tư đặt bến đỗ trước đó ở ngày thứ 8:*

Bảng 3.25. Thời gian bơi ở góc phần tư đặt bến đỗ trước đó ở ngày 8

Nhóm nghiên cứu	Thời gian chuột bơi trong góc phần tư đặt bến đỗ 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 3.24 cho thấy thời gian chuột bơi ở góc phần tư đặt bến đỗ trước đó ở nhóm tiêm scopolamin giảm có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng sinh lý ($p < 0,001$). Thời gian bơi ở vùng đặt bến đỗ 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*

Bảng 3.26. Hoạt độ của AChE ở hồi hải mã

Nhóm nghiên cứu	Hoạt độ AChE ($\bar{X} \pm SD$, mmol/mg/phút)
Chứng sinh lý (1)	39,53 \pm 16,69
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 3.25 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, $F(5,59) = 4,468$, $p = 0,002$]. Hoạt độ của AChE hồi hải mã ở nhóm tiêm scopolamin cao hơn có ý nghĩa thống kê so với nhóm chứng ($p < 0,05$). Hoạt độ của AChE hồi hải mã của nhóm dùng mẫu nghiên cứu liều 150 mg/kg giảm có ý nghĩa thống kê so với ở nhóm tiêm scopolamin ($p < 0,05$), tương tự nhóm sử dụng donepezil liều 5 mg/kg.

3.3.2.4. Kết quả về hoạt tính chống lão suy

Kết quả về hoạt tính chống lão suy được thể hiện thông qua sự thay đổi nồng độ MDA, SOD và GSH-Px huyết tương.

Bảng 3.27, 28, 29. Nồng độ MDA, SOD và GSH-Px huyết tương

Nhóm nghiên cứu	Nồng độ MDA huyết tương ($\bar{X} \pm SD$, mmol/L)	Nồng độ SOD huyết tương ($\bar{X} \pm SD$, ng/ml)	Nồng độ GSH-Px huyết tương ($\bar{X} \pm SD$, pg/ml)
Chứng sinh lý (1)	1,65 \pm 0,07	79,18 \pm 10,73	71,30 \pm 4,56
D-glactose (2)	1,96 \pm 0,23	64,70 \pm 8,15	63,60 \pm 3,87
T 1 (50mg/kg) (3)	1,56 \pm 0,08	73,18 \pm 7,80	67,14 \pm 5,68
T 2 (100mg/kg) (4)	1,74 \pm 0,16	75,67 \pm 5,94	73,24 \pm 2,88
T 3 (150mg/kg) (5)	1,73 \pm 0,12	81,32 \pm 13,40	71,69 \pm 8,23
Vitamin E 50 mg/kg (6)	1,60 \pm 0,20	78,63 \pm 13,41	69,60 \pm 6,60
p	p(1-2)<0,01 p(3,4,5,6-2) <0,05	p(1-2)<0,05 p(5,6-2)<0,05	p(1-2)<0,05 p(4,5-2)<0,05

Kết quả cho thấy cao chiết alaloid 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.

CHƯƠNG 4: BÀN LUẬN

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

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 khử, 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: fawcettidin, huperphlegmin A, huperphlegmin B, phlegmariurin B, huperzin A, huperphlegmarin A, huperphlegmarin B, lycoxanthol, 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 5-hydroxymethyl-2-furaldehyd, rehmanon C, loliolid. Trong đó, có 4 hợp chất mới (huperphlegmin A-B, huperphlegmarin A-B huperphlegmarin B); 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 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.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

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 cây 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.