

ĐỊNH TÍNH VÀ ĐỊNH LƯỢNG HUPERZINE A TRONG CÂY THẠCH TÙNG RĂNG CƯA (*HUPERZIA SERRATA*) Ở ĐÀ LẠT, TỈNH LÂM ĐỒNG

Vũ Thị Ngọc¹, Phạm Thị Hạnh³, Lê Thị Lan Anh⁴, Nguyễn Tiến Đạt², Lê Thị Bích Thủy¹

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

²Viện Hóa sinh biển, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³Viện Nghiên cứu cây nguyên liệu giấy, Tổng Công ty Giấy Việt Nam

⁴Trường Cao đẳng Sư phạm Hà Tây, Ủy ban Nhân dân thành phố Hà Nội

Ngày nhận bài: 28.10.2015

Ngày nhận đăng: 20.8.2016

TÓM TẮT

Huperzine A là một alkaloid có nguồn gốc tự nhiên, là hoạt chất chính có trong cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*). Chất này được ứng dụng trong việc điều trị lâm sàng bệnh mất trí nhớ ở người cao tuổi Alzheimer. Sự có mặt của Huperzine A làm tăng hàm lượng acetylcholine trong não bằng cách ức chế enzyme acetylcholinesterase. Ở Việt Nam, cây Thạch tùng răng cưa mới được phát hiện ở Sapa (Lào Cai) và Đà Lạt (Lâm Đồng), đây là nguồn dược liệu quý cho y học trong việc điều trị bệnh Alzheimer. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đánh giá sự có mặt của Huperzine A ở trong mẫu cây Thạch tùng răng cưa được thu hái tại Đà Lạt vào mùa Xuân và mùa Thu bằng phương pháp sắc kí bản mỏng (TLC) và sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Kết quả cho thấy, có Huperzine A trong mẫu lá cây Thạch tùng răng cưa và hàm lượng tương đương với kết quả phân tích mẫu Thạch tùng răng cưa của Trung Quốc. Hàm lượng của Huperzine A có sự khác nhau giữa hai mùa Xuân và Thu, mẫu Thạch tùng răng cưa thu hái vào mùa Thu có hàm lượng là 0,0925 mg/g mẫu khô và mùa Xuân là 0,0754 mg/g mẫu khô. Như vậy, Huperzine A trong mẫu lá Thạch tùng răng cưa thu hái vào mùa Thu cao hơn so với mẫu thu hái vào mùa Xuân là 0,0171 mg/g mẫu khô.

Từ khóa: Alzheimer, HPLC, Huperzine A, TLC, Thạch tùng răng cưa

MỞ ĐẦU

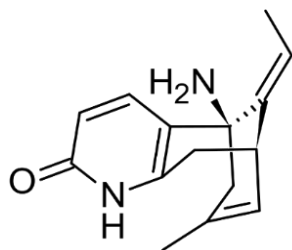
Thạch tùng răng cưa, tên khoa học là *Huperzia serrata* (Thunb.) Trev., là một loại thân thảo, thuộc họ Thông đất (*Lycopodiaceae*), thường mọc ở bề mặt đá, đất mùn ở dưới tán rừng quanh năm ẩm ướt, độ mùn cao, độ cao trên 1000m so với mặt nước biển. Ở Trung Quốc, cây này được sử dụng trong y học cổ truyền qua hàng ngàn năm với tác dụng lợi tiểu, chống co thắt, giảm đau và cầm máu. Vào năm 1986, các nhà khoa học Trung Quốc đã chiết được Huperzine A từ cây Thạch tùng răng cưa, chất này có khả năng tăng cường trí nhớ và điều trị bệnh Alzheimer (Liu *et al.*, 2003).

Alzheimer là một căn bệnh nguy hiểm ảnh hưởng đến những người cao tuổi trên toàn thế giới. Căn bệnh này do sự rối loạn trong quá trình lão hóa của tế bào thần kinh liên quan đến việc tạo các mảng neuritic, gây sự ảnh hưởng đến vỏ não, hạch nhân và vùng đồi thị. Ngoài ra, nó còn ảnh hưởng đến quá trình dẫn truyền thần kinh trong não (Selkoe, 1994). Acetylcholine (ACh) là một neurotransmitter (chất

dẫn truyền thần kinh) kết hợp với bộ nhớ và có chức năng nhận thức. Ở những người mắc bệnh Alzheimer diễn ra sự suy giảm chức năng nghiêm trọng của các tế bào thần kinh cholinergic, liên quan đến việc mất trí nhớ hoặc suy giảm nhận thức ở bệnh Alzheimer, điều này là do sự suy giảm mức độ của ACh trong não (Knusel *et al.*, 1996). Huperzine A là một alkaloid có khả năng ức chế acetylcholinesterase (AChE) mạnh nên sự có mặt của Huperzine A làm giảm lượng enzyme AChE có trong não. Nhờ đó, hàm lượng ACh tăng lên làm cải thiện trí nhớ cho bệnh nhân Alzheimer. Các nghiên cứu dược lý cho thấy nó có tác dụng ức chế chọn lọc cao và lâu dài trên acetylcholinesterase (AChE) trong não, và có khả năng tăng cường khả năng học tập và trí nhớ ở chuột và chuột mô hình thực nghiệm (Kozikauski *et al.*, 1991). Một số báo cáo lâm sàng cũng nhận định, Huperzin A tạo điều kiện dẫn truyền thần kinh cholinergic bằng cách tăng nồng độ acetylcholine trong hệ thần kinh trung ương. Ngoài ra, hoạt động của chất này lớn hơn so với tetrahydroaminoacridine (THA, tacrine), một loại thuốc được sử dụng rộng rãi

đối với bệnh nhân Alzheimer là khoảng 100 lần và duy trì được trong thời gian dài hơn. Hơn nữa, chúng có thể đi vào một cách dễ dàng qua các hàng rào máu não và hoạt tính butyrylcholinesterase (BchE) rất thấp, do đó, tác dụng phụ thấp hơn so với một số thuốc ức chế AchE khác và không gây ảnh hưởng cho cơ thể người (Campiani *et al.*, 1993).

Huperzine A được chiết trong tự nhiên là một phân tử bất đối thường gọi là L-Huperzin A hoặc (-)-Huperzine A. Ngoài ra, nghiên cứu gần đây cho thấy một số alkaloids có cấu trúc tương tự với Huperzine A trong *H. serrata*, như Huperzine B, 6 β -hydroxy huperzine A and N-methyl-Huperzine B, đã được chứng minh có khả năng gây ức chế AchE (Wu *et al.*, 2006).



Hình 1. Công thức cấu tạo của huperzine A.

Gần đây ở Việt Nam, Thạch tùng rừng chua đã được phát hiện ở Sapa (Lào Cai) và Đà Lạt (Lâm Đồng) gồm có 2 chi là *Lycopodium* và *Lycopodiella* với 9 loài có chứa Huperzine A có khả năng ức chế AchE (Chuong *et al.*, 2014). Trong các nghiên cứu gần đây, Ma và đồng tác giả (2005) đã sử dụng phương pháp RP- HPLC để xác định sự có mặt và định lượng Huperzine A trong các mẫu cây thảo được thuộc chi Huperziaceae thu hái ở Trung Quốc. Nghiên cứu của Wu và đồng tác giả (2005) xác định hàm lượng của Huperzine A trong cây *Huperzia serrata* bằng phương pháp HPLC- UV và xác định các alkaloid tách chiết từ cây này bằng phương pháp HPLC- DAD- MS- MS. Các nghiên cứu này đã chỉ ra rằng đây là phương pháp đơn giản, nhanh, có độ tin cậy cao và giá thành hợp lý. Ở Việt Nam, Nguyễn Ngọc Chương và Trần Công Luận (2014) đã tách được Huperzine A từ cây rau rống (*Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis) và xác định cấu trúc bằng phương pháp phổ nghiệm. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng phương pháp sắc ký bản mỏng (Thin layer chromatography - TLC) để định tính sơ bộ sự có mặt của Huperzine A trong hai mẫu Thạch tùng rừng chua được thu hái vào mùa Xuân và mùa Thu ở Đà Lạt. Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (High Performance Liquid Chromatography - HPLC) được dùng để xác định hàm lượng của

Huperzine A trong mỗi mẫu bằng hệ thống phân tích LC-MS (Agilent 1260 Series Single Quadrupole LC/MS Systems, Viện Hóa sinh biển - Viện Hàn lâm KHCNVN). Tín hiệu của Huperzine A được phát hiện dựa trên sự trùng thời gian lưu Rt giữa detector LC và detector MS.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Nguyên liệu thực vật: Mẫu Thạch tùng rừng chua thu ở Đà Lạt vào mùa Thu (tháng 9/2014) và mùa Xuân (tháng 2/2015) do TS. Nông Văn Duy định danh, cung cấp và lưu tiêu bản tại Viện Nghiên cứu khoa học Tây Nguyên, Đà Lạt - Lâm Đồng.

Hóa chất: Huperzine A chuẩn (độ tinh sạch 98%) và các hóa chất khác được đặt mua của các hãng Agilent, Merck, Sigma.

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu mẫu: Cây Thạch tùng rừng chua được thu hái từ rừng ở Đà Lạt. Sau đó, sấy mẫu ở 50°C cho đến khô và bảo quản ở nhiệt độ 25-26°C.

Phương pháp chiết Huperzine A: Huperzine A được tách chiết theo Ma và đồng tác giả năm 2005 có cải tiến cụ thể như sau: Nghiên cứu mẫu lá bằng nitrogen lỏng, 1g bột bổ sung 30ml HCl 0.5% (chiết qua đêm). Tiếp theo, siêu âm ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Lọc hỗn hợp sau khi siêu âm bằng giấy lọc và thêm ammonia vào phần dung dịch lọc được cho đến pH 9.0. Chiết bằng chloroform 2 lần với tỉ lệ 1:1, thu pha dưới. Loại chloroform bằng máy cô quay chân không. Hòa tan cạn với 3ml methanol, lưu giữ ở 4°C.

Phương pháp chạy sắc ký bản mỏng (TLC - Thin Layer Chromatography) (Ma *et al.*, 2005): TLC là một kỹ thuật tách các chất được tiến hành khi cho pha động di chuyển qua pha tĩnh. Các chất được tách ra dựa trên khả năng hấp phụ của chất tan với pha tĩnh. Pha Huperzine A chuẩn với methanol ở nồng độ 1mg/100ml (giữ ở 4°C). Dịch chiết Huperzine A được chạy với các hệ dung môi khác nhau như: Chloroform- isopropanol- acetone- ammonia (4- 1,5- 4- 0,15); Chloroform- isopropanol- ethyl acetate- ammonia (4- 1,5- 4- 0,1); 1-butanol- isopropanol- acetic acid (7,5- 2- 4) hoặc 1-butanol- isopropanol- H₂O (10- 5- 4)

Chấm 1 μ l mẫu Huperzine A chuẩn và 10 μ l các dung dịch chiết ở trên lên bản silicagel (bản sắc ký lớp mỏng tráng sẵn Silica gel 60 F254). Các mẫu chấm cách nhau 7mm, sấy khô rồi chạy ở các hệ dung môi

khác nhau. Làm khô bản silica gel bằng máy sấy, sau đó phun kali permanganate 0.3% lên bản silicagel, Huperzine xuất hiện có màu vàng nhạt (vết đốm).

Phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC - High-Performance Liquid Chromatography) (theo Wu *et al.*, 2006): Mẫu chất chỉ thị được pha trong hỗn hợp dung môi MeOH thành nồng độ 1 mg/ml, sau đó pha loãng thành dãy các nồng độ khác nhau để thiết lập đường chuẩn định lượng. Hai mẫu lá Thạch tùng mùa Xuân và mùa Thu được cân để xác định khối lượng, sau đó được chiết trong MeOH với thể tích xác định, dịch chiết được lọc qua màng lọc trước khi bơm vào hệ thống LC/MS. Các dung dịch chất chỉ thị và mẫu phân tích đều được lọc qua màng lọc 0,45 μ m trước khi bơm vào hệ thống LC/MS. Lượng mẫu bơm vào 1 μ L, tốc độ dòng là 0,7 mL/phút. Hệ thống LC/MS được kết nối với phần mềm Agilent OpenLAB Control Panel. Khí nitơ được bơm với tốc độ dòng 5,0 L/phút, áp suất đầu phun đạt 60 psi, nhiệt độ làm khô đạt 250°C. Chế độ bắn mảnh phổ khối lựa chọn ESI ở mode positive với pic ion phân tử được lựa chọn 243,0 [M+H]⁺ của Huperzine A. Pha động sử dụng hệ dung môi: ACN / H₂O (20 mM ammonium acetate, pH=4,0) với gradient nồng độ được thiết lập như sau:

Bảng 1. Gradient nồng độ ACN / H₂O (20 mM ammonium acetate, pH = 4,0) theo thời gian.

Thời gian (min)	% ACN	% H ₂ O (20 mM ammonium acetate, pH = 4,0)
0	10	90
15	10	90
20	100	0

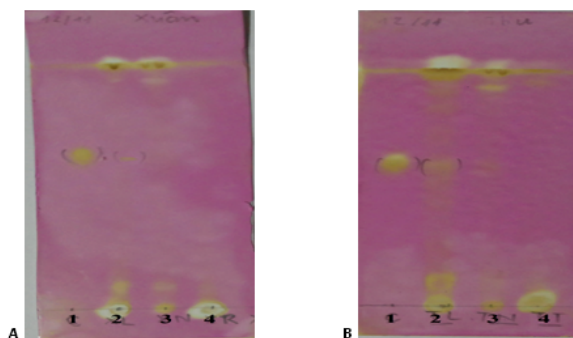
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả định tính bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC)

Mẫu cây Thạch tùng rừng cưa sau khi thu hái về được làm khô ở 50°C rồi chiết theo quy trình ở trên. Dịch chiết được chạy sắc ký bản mỏng với các hệ dung môi khác nhau cùng với chất chuẩn. Kết quả chạy thử các hệ dung môi cho thấy, với hệ dung môi chloroform- isopropanol- ethyl acetate-ammonia (4- 1,5- 4- 0,1) thì khả năng phân tách của các chất trên bản TLC rõ ràng và phù hợp nhất.

Các mẫu Thạch tùng rừng cưa thu hái ở Đà Lạt vào mùa Xuân và mùa Thu được chiết ở cả 3 bộ phận rễ, thân và lá. Dịch chiết rễ, thân và lá của 2 mẫu trên được chạy sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi đã chọn ở trên.

Kết quả chạy sắc ký (hình 2) cho thấy, đối với dịch chiết thân và rễ của cả 2 mẫu mùa Xuân và mùa Thu đều không thấy xuất hiện vạch đốm vàng tương đương với vạch của chất chuẩn. Còn đối với dịch chiết từ lá của cả hai mẫu mùa Xuân và Thu thì đều có xuất hiện vạch đốm có màu vàng (R_f = 0.62). Ở mẫu lá mùa Thu thì vạch này khá đậm nhưng vẫn còn vết dài và còn một số vạch ở vị trí khác. Ở mẫu lá mùa Xuân vạch này màu vàng nhạt, hơi mờ và còn một số vạch ở vị trí khác. Như vậy có thể kết luận sơ bộ, đã chiết được Huperzine A từ mẫu lá cây Thạch tùng rừng cưa ở cả hai mùa Xuân và Thu, tuy dịch chiết vẫn còn lẫn nhiều tạp chất. Mẫu lá mùa Xuân và mùa Thu này được sử dụng để tiến hành định lượng bằng phương pháp sắc ký hiệu năng cao HPLC.



Hình 2. Hình ảnh chạy sắc ký dịch chiết Huperzine A. **A.** Mẫu thu hái vào mùa Xuân (1: Huperzine A chuẩn, 2: dịch chiết từ lá, 3: dịch chiết từ thân, 4: dịch chiết từ rễ). **B.** Mẫu thu hái vào mùa Thu (1: Huperzine A chuẩn, 2: dịch chiết từ lá, 3: dịch chiết từ thân, 4: dịch chiết từ rễ).

Kết quả định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC

Phân tích các tín hiệu trên hệ thống LC

Tín hiệu của Huperzine A được phát hiện dựa trên sự trùng thời gian lưu R_t giữa detector LC và detector MS (hình 3,4). Trên hệ thống LC, pic tín hiệu được lựa chọn của Huperzine A được phát hiện một cách ổn định tại thời gian lưu R_t 11,4 – 11,7 min đối với các mẫu chất chỉ thị dùng trong thang định lượng, đồng thời hệ thống MS phát hiện được pic ion phân tử của Huperzine A tại thời điểm 11,5 – 11,8 min với pic ion phân tử 243,0 $[M+H]^+$.

Dựng đường chuẩn định lượng

Đường chuẩn được tính toán xây dựng bằng phần mềm Chemstation dựa trên diện tích pic UV 310 nm tại thời gian lưu R_t 11,4 – 11,7 min. Đường chuẩn định lượng có dạng $y = ax + b$ được xây dựng dựa trên mối quan hệ giữa diện tích pic UV được chọn (y) và nồng độ tương ứng của chất chỉ thị (x). Đường chuẩn định lượng thu được có phương trình $y = 5534,34104x + 41,2753$ với hệ số tương quan $R^2 = 0,99992$.

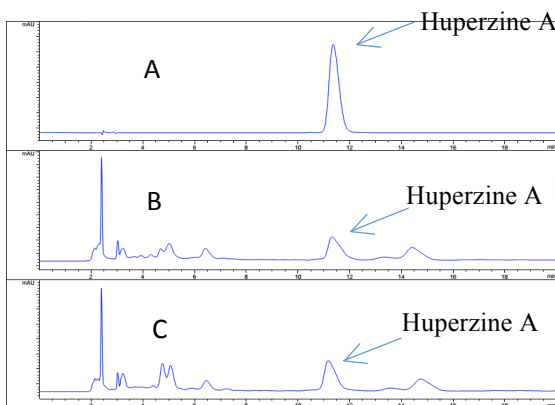
Định lượng Huperzine A trong lá cây Thạch tùng răng cưa

Mẫu lá Thạch tùng mùa Xuân và mùa Thu được bơm vào hệ thống sắc ký với các điều kiện phân tích đã được thiết lập ở trên. Pic chất Huperzine A được phát hiện dựa trên sự trùng khớp về thời gian lưu R_t và số khối MS so với chất chỉ thị. Dựa vào đường chuẩn định lượng chúng tôi tính được kết quả hàm lượng Huperzine A trong mẫu lá Thạch tùng răng cưa mùa Xuân là 75,4 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ mẫu khô) và trong mẫu lá

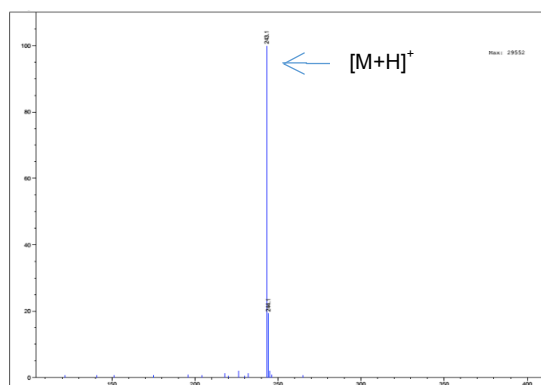
Thạch tùng răng cưa mùa Thu là 92,5 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ mẫu khô). Từ kết quả định lượng bằng phương pháp HPLC, chúng tôi nhận thấy hàm lượng của Huperzine A trong mẫu là Thạch tùng răng cưa thu hái vào mùa Thu cao hơn so với mẫu thu hái và mùa Xuân là 17,1 ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ mẫu khô). Như vậy, ở các thời điểm khác nhau ở trong năm thì hàm lượng Huperzine A trong cây Thạch tùng răng cưa là có sự khác nhau. Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Ma và đồng tác giả đã kết luận hàm lượng Huperzine A thay đổi rõ rệt ở các thời điểm khác nhau trong năm, giảm dần khi bắt đầu vào mùa đông và tăng dần vào mùa hè, với hàm lượng cao nhất vào giữa mùa Thu và thấp nhất vào đầu mùa Xuân (Ma *et al.*, 2005).

So sánh hàm lượng Huperzine A trong cây Thạch tùng răng cưa ở Đà Lạt và ở Trung Quốc (80,2- 182,6 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) cho thấy là gần tương đương nhau. Tuy nhiên, hàm lượng này lại thấp hơn khoảng 6 lần so với mẫu *Huperzia elmeri* ở Philippines (608 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) và thấp hơn khoảng 9 lần so với mẫu *Huperzia carinata* ở Queensland, Australia (1030 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) (Goodger *et al.*, 2008). Cây Thạch tùng răng cưa ở Đà Lạt có hàm lượng Huperzine A gần tương đương với loài này ở Trung Quốc và nhỏ hơn nhiều so với chi Huperziaceae nhưng khác loài ở Australia và Philippines.

Qua những kết quả trên cho thấy, HPLC là một phương pháp định lượng nhanh chóng, thuận tiện, có tính khoa học và chính xác cao, có thể xác định được hàm lượng Huperzine A trong cây với lượng nhỏ mẫu thí nghiệm. Từ kết quả này có thể xác định thời điểm thu hoạch cây dược liệu Thạch tùng răng cưa thích hợp nhất là mùa thu vì vào mùa này hàm lượng Huperzine A có trong cây cao nhất.



Hình 3. A. Sắc ký đồ HPLC (UV 310 nm) của chất chỉ thị Huperzine. B. Mẫu lá thạch tùng mùa Xuân. C. Mẫu lá thạch tùng mùa Thu



Hình 4. Phổ ESI - MS Positive và pic ion phân tử 243,0 $[M+H]^+$ của Huperzine A.

KẾT LUẬN

Sự có mặt của Huperzine A có trong lá cây Thạch tùng răng cưa ở Đà Lạt đã được định tính sơ bộ bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng (TLC) với hệ dung môi phù hợp là chloroform- isopropanol- ethyl acetate- ammonia (4- 1,5- 4- 0,1). Đã thiết lập được điều kiện sắc ký lỏng hiệu năng cao HPLC phân tích định tính và định lượng Huperzine A ở bước sóng 310 nm và xây dựng được đường chuẩn định lượng của chất chỉ thị Huperzine A. Đã định lượng được Huperzine A ở trong hai mẫu lá Thạch tùng mùa Xuân là 75,4 ($\mu\text{g.g}^{-1}$ mẫu khô) và lá mùa Thu là 92,5 ($\mu\text{g.g}^{-1}$ mẫu khô).

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện dưới sự hỗ trợ kinh phí của đề tài Quy gen - Bộ Khoa học và Công nghệ: “Khai thác và phát triển nguồn gen loài Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata* (Thunb.) Trev.) tại Sapa và Đà Lạt”.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Campiani G, Sun LQ, Kozikowski AP, Aagaard P, McKinney M (1993) A palladium-catalyzed route to Huperzine A and its analogues and their anticholinesterase activity. *J Org Chem* 58: 7660-7669.

Chuong NN, Huong NT, Hung TM, Luan TC (2014) Anticholinesterase activity of lycopodium alkaloids from Vietnamese *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis. *Molecules*

19(11): 19172-19179.

Nguyễn Ngọc Chương, Trần Công Luận (2014) Isolation of huperzine A from *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis., Lycopodiaceae. *Tạp chí Dược liệu*. 19(1): 22-26

Knusel B, Gao H (1996) Neurotrophins and Alzheimer's disease: beyond the cholinergic neurons. *Life Sci* 58(22): 2019-2027

Kozikauski AP, Xia Y, Rajirathnam RE, Tuckmantel W, Hanin I, Tang XC (1991) Synthesis of Huperzine A and its analogues and their antiacetylcholinesterase activity. *J Org Chem* 56: 4636-4645

Liu JS, Yu CM, Zhou YZ, Han YY, Qi BR, Zhu YL (1986) Study on the chemistry of Huperzine A and B. *Acta Chimica Sinica* 44: 1035-1040

Ma X, Tan C, Zhu D, Gang DR. (2005). “Is There a Better Source of Huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A Content of Huperziaceae Species in China”. *J Agricult Food Chem* 53(5): 1393-1398

Goodger JQD, Whincup AL, Field AR, Holtum JAM, Woodrow LE. (2008). “Variation in huperzine A and B in Australasian *Huperzia* species”. *Biochem System Ecol* 36(8): 612- 618

Selkoe DJ (1994). Normal and Abnormal Biology of the beta-Amyloid Precursor Protein. *Ann Rev Neurosci* 17: 489-517

Wu Q, Gu Y (2006). “Quantification of Huperzine A in *Huperzia serrata* by HPLC-UV and identification of the major constituents in its alkaloid extracts by HPLC-DAD-MS-MS”. *J Pharm Biomed Anal* 40: 993-998

QUALIFICATION AND QUANTIFICATION OF HUPERZINE A FROM *HUPERZIA SERRATA* IN DA LAT, LAM DONG PROVINCE

Vu Thi Ngoc¹, Pham Thi Hanh³, Le Thi Lan Anh⁴, Nguyen Tien Dat², Le Thi Bich Thuy^{1,✉}

¹Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

²Institute of Marine Biochemistry, Vietnam Academy of Science and Technology

³Forest Research Centre, Vietnam Paper Corporation

⁴Ha Tay College of Education, People's Committee of Ha Noi

SUMMARY

Huperzine A, an alkaloid, was originally isolated from *Huperzia serrata*. This compound potentially enhances the memory in animal, hence, it has been approved as a drug for the clinical treatment of Alzheimer's disease, a major disease affecting the elderly population throughout the world. Because Huperzine A is an acetylcholinesterase inhibitor, the presentation of Huperzine A in brain inhibited acetylcholinesterase activity, thus, leading to the increase in concentration of acetylcholine. In Vietnam, *H. serrata* distributed in Sapa (Lao Cai) and Da Lat (Lam Dong), this species provide valuable pharmaceutical materials to the treatment for Alzheimer's diseases. In this research, we evaluated the availability of Huperzine A in *Huperzia serrata*, which was collected from Da Lat (Lam Dong) in two seasons: Spring and Autumn. Thin layer chromatography (TLC) method was used to preliminary qualitative analysis. High performance liquid chromatography (HPLC) method were used for determining Huperzine A content in samples. In the result, Huperzine A is almost existed in

✉ Author for correspondence: E-mail: lbthuy@ibt.ac.vn

leaves of Da Lat *Huperzia serrata* and equivalent levels of Chinese *Huperzia serrata*. The Content of Huperzine A was different between two collection samples in Spring and Autumn, by analyze HPLC data, the samples was harvested in Autumn contents 92.5 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry sample and the spring is 75.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry sample. Therefore, the content of Huperzine A in *Huperzia serrata*'s leaves sample is harvested in the fall compared with samples collected in the spring is higher 17.1 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ dry samples.

Keywords: Alzheimer's disease, HPLC, *Huperzia serrata*, Huperzine A, TLC