

## **THIẾT LẬP CHẤT CHUẨN VÀ ĐỊNH LƯỢNG HUPERZIN A TRONG MỘT SỐ LOÀI HỌ THẠCH TÙNG Ở VIỆT NAM**

**Nguyễn Ngọc Chương<sup>1, \*</sup>, Trần Mạnh Hùng<sup>2</sup>, Trần Thị Kim Dung<sup>4</sup>, Trần Công Luận<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Trường Đại học Y Dược TP.HCM - 217 Đường Hồng Bàng, Quận 5, TP.HCM*

<sup>2</sup>*Trường Đại học Đà Nẵng - 41 Đường Lê Duẩn, Quận Hải Châu, TP. Đà Nẵng*

<sup>3</sup>*Trường Đại học Tây Đô – 68 Đường Trần Chiên, Quận Cái Răng, TP. Cần Thơ*

<sup>4</sup>*Trường Đại học Công nghệ Miền Đông – Đường 1A, Huyện Thống Nhất, Tỉnh Đồng Nai*

\*Email: *congluan53@gmail.com*

Đến Tòa soạn: 15 June 2016; Chấp nhận đăng: 28/10/2016

### **TÓM TẮT**

Huperzin A được phân lập lần đầu tiên từ loài Thạch tùng răng và có tác dụng ức chế acetylcholinesterase. Thiết lập chất chuẩn Huperzin A với độ tinh khiết 99,13 % đã được thực hiện là rất cần thiết để làm chất đối chiếu trong kiểm nghiệm đánh giá chất lượng các dược liệu. Quy trình định tính và định lượng bằng phương pháp HPLC được xây dựng và thẩm định đạt yêu cầu để ứng dụng phân tích hàm lượng huperzin A trong 10 loài thuộc họ Thạch tùng ở Việt Nam.

*Từ khóa:* Huperzin A, họ Thạch tùng, ức chế acetylcholinesterase.

### **1. MỞ ĐẦU**

Huperzin A, được phân lập từ cây Thạch tùng răng vào những năm 80 của thế kỷ XX. Nhiều nghiên cứu khoa học đã chứng minh huperzin A có khả năng ức chế enzym acetylcholinesterase (AChE), qua đó duy trì nồng độ acetylcholin trong não ở mức độ bình thường và có thể làm chậm lại quá trình tiến triển của bệnh Alzheimer [1, 2, 3]. Ở Việt Nam, các loài thực vật thuộc họ Thạch tùng (Lycopodiaceae) cũng có thể là nguồn cung cấp hợp chất này.

Huperzin A cũng là chất cần thiết được dùng để sàng lọc, kiểm tra, đánh giá chất lượng các dược liệu [2, 4, 6]. Thực tế hiện nay chưa có những đánh giá chi tiết về hàm lượng của hợp chất này trong nhóm thực vật thuộc họ Lycopodiaceae ở nước ta. Vì vậy, để phục vụ cho công tác kiểm nghiệm dược liệu, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu thiết lập chất chuẩn có độ tinh khiết cao theo quy định của một chất chuẩn gốc và xây dựng quy trình định tính, định lượng huperzin A trong một số loài thuộc họ Thạch tùng [7].

### **2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

#### **2.1. Nguyên liệu**

Huperzin A do nhóm nghiên cứu của PGS. Trần Công Luận phân lập và đã xác định cấu trúc hóa học [5]. Các dược liệu nghiên cứu bao gồm: *Lycopodium casuarinoides* (Thạch tùng dương), *Lycopodiella cernua* (Thạch tùng nghiêng), *Lycopodium clavatum* (Thông đá), *Lycopodium complanatum* (Thạch tùng dẹp), *Huperzia carinata* (Thạch tùng lá dùi), *Huperzia fordii* (Thạch tùng Ford), *Huperzia phlegmaria* (Thạch tùng đuôi ngựa), *Huperzia serrata* (Thạch tùng răng), *Huperzia squarrosa* (Râu rồng), *Huperzia tetrasticha* (Thạch tùng vuông), được thu hái tại rừng vùng cao Tây Nguyên như tỉnh Lâm Đồng, Kon tum, là những mẫu cây tươi có đủ bộ phận rễ, thân, lá. Mẫu thu thập được chụp hình và ghi nhận đặc tính sinh thái. Mẫu được định danh và lưu giữ tại Bộ môn Tài nguyên - Dược liệu, Trung tâm Sâm và dược liệu Tp.HCM.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Thiết lập chất chuẩn [7]

Trong điều kiện không có chất chuẩn đối chiếu huperzin A trong quá trình nghiên cứu, việc định lượng hợp chất tinh khiết phân lập huperzin A từ cây Râu rồng được thực hiện bằng phương pháp dùng máy HPLC quy về 100 % diện tích pic trên sắc kí đồ. Điều kiện sắc kí: máy HPLC Merck – Hitach L2000, đầu dò PDA, cột sắc kí LiChropher RP 18e (5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4 mm), pha động là hỗn hợp MeOH-H<sub>2</sub>O/ acid phosphoric 0,1 % (18:82), thể tích tiêm mẫu 10  $\mu$ l, tốc độ dòng: 1 mL/phút, bước sóng phát hiện 230 nm và 310 nm. Mẫu thử Huperzin A 1000 ppm trong MeOH 100 %.

Quá trình thiết lập chất chuẩn huperzin A được thực hiện theo các bước: đóng gói, đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ sau khi đóng gói, đánh giá kết quả định lượng liên phòng thí nghiệm tại hai phòng thí nghiệm đạt GLP, xác định giá trị định lượng công bố.

Đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ sau khi đóng gói: số lọ đánh giá (g) được tính theo công thức  $g = \sqrt{N} + 1$  (với N là số lọ). Mỗi lọ được định lượng bằng máy HPLC, kết quả được quy về 100 % diện tích pic, thực hiện 2 lần định lượng và lấy kết quả trung bình để tránh sai số. Kết quả từ phép kiểm Dixon phải không có giá trị bất thường trong kết quả định lượng.

### 2.2.2. Hệ thống HPLC và điều kiện sắc kí

Quá trình phân tích huperzin A được thực hiện bằng kỹ thuật sắc kí lỏng hiệu năng cao trên máy HPLC Merck – Hitach L2000, đầu dò PDA, cột sắc kí LiChropher RP 18e (5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4 mm) do Merck sản xuất với bước sóng phát hiện được đặt tại 230 nm và 310 nm, thể tích tiêm mẫu 10  $\mu$ l, tốc độ dòng: 1 ml/phút và nhiệt độ cột: 25°C. Dung môi pha động là hỗn hợp MeOH-H<sub>2</sub>O/ acid phosphoric 0,1 % (18:82). Dung môi và hóa chất đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích dùng cho HPLC.

### 2.2.3. Chuẩn bị mẫu [4]

Mẫu chuẩn: Sử dụng huperzin A đã thiết lập chất chuẩn làm chất chuẩn đối chiếu cho quy trình phân tích và các bước thẩm định quy trình phân tích tiếp theo. Cân chính xác 5mg chất chuẩn huperzin A, hòa tan trong 5 ml methanol. Các dung dịch chuẩn huperzin A có nồng độ nhỏ hơn được chuẩn bị bằng cách pha loãng dung dịch trên bằng methanol. Sử dụng mẫu chuẩn để thực hiện các bước khảo sát bước sóng phát hiện và khảo sát các hệ dung môi pha động tối ưu nhất phù hợp cho quy trình phân tích.

Mẫu thử: Cân chính xác 1 g bột Râu rồng, chiết siêu âm 3 lần trong 30 phút, lọc và chuyển toàn bộ dịch chiết vào bình định mức 10 ml, thêm methanol đến vạch. Lọc qua màng lọc 0,45  $\mu$ l thu được dung dịch tiến hành phân tích sắc kí.

#### 2.2.4. Thẩm định quy trình phân tích và ứng dụng cho nghiên cứu Huperzin A trong dược liệu [4, 6]

##### 2.2.4.1. Khảo sát điều kiện sắc kí

Khảo sát bước sóng phát hiện bằng cách triển khai mẫu chuẩn có nồng độ 12,5 µg/ml trên HPLC với tốc độ dòng 1 ml/phút, dải bước sóng phát hiện từ 200–400 nm. Dựa vào phổ UV tìm bước sóng hấp thu cao nhất của chất chuẩn, từ đó lựa chọn bước sóng phát hiện. Khảo sát hệ dung môi dùng cho HPLC: Tiến hành khảo sát trên mẫu thử đã chuẩn bị như trên. Khảo sát 2 hệ dung môi MeOH-nước acid phosphoric 0,1 % (18:82), MeOH-đệm amoni acetat 80 mM, pH 6 (40:60). Sắc kí đồ phải cho thấy pic của chất cần phân tích phải tách rời, nhọn và đối xứng với độ phân giải lớn hơn 1,5.

##### 2.2.4.2. Tính tương thích hệ thống

Bơm 6 lần liên tục mẫu chuẩn có nồng độ 12,5 µg/ml. Ghi nhận các thông số sau: Thời gian lưu ( $t_R$ ), diện tích đỉnh (S), hệ số bất đối (As), hệ số dung lượng ( $k'$ ), số đĩa lí thuyết (N). Tính độ lệch chuẩn tương đối (RSD). Yêu cầu:  $RSD \leq 2\%$  ( $t_R$ , S, N);  $k' \geq 1$  và  $0,8 \leq As \leq 1,5$ .

##### 2.2.4.3. Khảo sát tính tuyến tính

Các mẫu dung dịch chuẩn có nồng độ 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml, 10 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml trong MeOH được tiến hành triển khai HPLC với điều kiện sắc kí đã chọn. Sử dụng phần mềm Excel để biện luận và đưa ra phương trình hồi quy tuyến tính  $y = ax + b$ , kiểm tra tính tương thích của phương trình hồi quy và ý nghĩa của các hệ số hồi quy, tính giá trị của hệ số tương quan R<sup>2</sup>. Yêu cầu  $R^2 > 0,998$ .

##### 2.2.4.4. Độ đặc hiệu

Chuẩn bị mẫu trắng, mẫu chuẩn, mẫu thử và mẫu thử thêm chuẩn. Triển khai trên HPLC các dung dịch vừa chuẩn bị. Sắc kí đồ phải đạt yêu cầu pic cần khảo sát của các dung dịch khảo sát có thời gian lưu giống nhau và diện tích đỉnh của dung dịch thử thêm chuẩn phải có tăng lên so với dung dịch thử theo tỷ lệ đã thêm vào. Mẫu trắng phải không có pic tại thời gian lưu của huperzin A.

##### 2.2.4.5. Độ lặp lại

Chuẩn bị 6 mẫu thử bột dược liệu Râu rồng, tiến hành định lượng bằng HPLC với cùng điều kiện đã chọn. Tính hàm lượng trung bình của huperzin A trong dược liệu, SD và RSD (%). RSD cho phép đối với phương pháp HPLC trên đối tượng nghiên cứu dược liệu là  $RSD \leq 5\%$ .

##### 2.2.4.6. Độ đúng

Thêm chính xác một lượng chuẩn huperzin A vào lượng chính xác dược liệu đã xác định hàm lượng tương đương với 80 %, 100 %, 120 % so với hàm lượng trong mẫu thử. Tiến hành chiết xuất và định lượng theo quy trình đã xây dựng. Tính phần trăm hàm lượng chất chuẩn tìm lại được so với lượng chuẩn ban đầu đã thêm vào.

Hàm lượng huperzin A có trong dược liệu được tính theo công thức:

$$x = \frac{St}{Sc} \times C_s \times \frac{k}{m(100 - k)} \times p \times 100$$

trong đó, X: Hàm lượng huperzin A có trong dược liệu (%); Sc: Diện tích đỉnh thu được của mẫu chuẩn; St: Diện tích đỉnh thu được của mẫu thử; Cc: Nồng độ mẫu huperzin A chuẩn (mg/ml); k: Độ pha loãng mẫu đo; m: Khối lượng dược liệu (mg); h: Hàm ẩm dược liệu; p: Độ tinh khiết của chất chuẩn.

Quy trình đã xây dựng được áp dụng định tính và định lượng huperzin A trong dược liệu.

### 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

#### 3.1. Thiết lập chất chuẩn

##### 3.1.1. Đóng gói và đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ

Khối lượng huperzin A được đóng gói: 800 mg. Khối lượng đóng gói: 10 mg/lọ. Số lọ: 80. Huperzin A phân lập được đóng gói trong lọ Glove-Box chứa 99,00 % khí nitơ ở điều kiện tiêu chuẩn.

Đánh giá độ đồng nhất giữa các lọ sau khi đóng gói: Số lọ đánh giá (g) được tính theo công thức  $g = \sqrt{N} + 1$  (với N là số lọ) = 10 lọ. Mỗi lọ được định lượng 2 lần để tránh sai số. Kết quả từ phép kiểm Dixon cho thấy không có giá trị bất thường trong kết quả định lượng.

Bảng 1. Kết quả phân tích phương sai một yếu tố theo ANOVA.

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương	$F_m$	$F_{tc}$
Giữa các nhóm	0,026	9	0,003	2,339	3,020
Trong từng nhóm	0,012	10	0,001		
Tổng cộng	0,038	19			

Nhận xét:  $F_{tm} = 2,339 < F_{0,05} = 3,020$  và  $\frac{3x}{\sqrt{n}} = 0,0247 < U_{55} = 0,0779$ . Như vậy các lọ huperzin A đạt yêu cầu về độ đồng nhất về hàm lượng huperzin A trong các lọ sau khi đóng gói (Bảng 1).

##### 3.1.2. Đánh giá kết quả định lượng liên phòng thí nghiệm

Việc đánh giá kết quả liên phòng thí nghiệm được thực hiện tại 2 phòng thí nghiệm đạt GLP. Kết quả được trình bày trong Bảng 2 và Bảng 3.

Bảng 2. Kiểm tra tính phù hợp hệ thống và kết quả xác định hàm lượng huperzin A tại 2 phòng thí nghiệm (n = 6).

	PTN 1	PTN 2
Hàm lượng huperzin A trung bình	99,19 %	99,08 %
Số đĩa lí thuyết (Phải lớn hơn 30000)	31762	33216
RSD của thời gian lưu (Phải nhỏ hơn 2%)	0,78	0,92
RSD của hàm lượng (Phải nhỏ hơn 2%)	0,34	0,36

PTN 1: Khoa thiết lập chất chuẩn – chất đối chiếu, Viện Kiểm nghiệm thuốc TP.Hồ Chí Minh.

PTN 2: Khoa Vật lí đo lường, Viện Kiểm nghiệm thuốc TP.Hồ Chí Minh.

Bảng 3. Xác định giá trị các kết quả định lượng công bố.

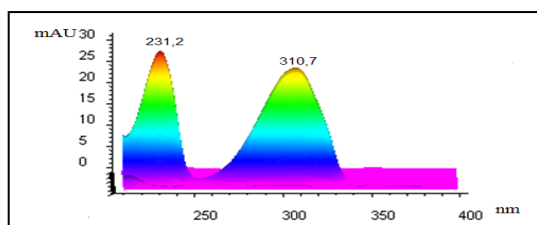
	$X_0^*$	$X_1^*$	$X_2^*$
$\delta = 1,5 \times S^*$	-	0,096	0,102
$x^* - \delta$	-	99,102	98,976
$x^* + \delta$	-	99,298	99,188
Trung bình	99,346	99,135	99,135
Độ lệch s	0,063	0,061	0,061
$x^*$ mới	99,228	99,135	99,135
$s^*$ mới	0,065	0,069	0,069

Sau hai lần thay đổi,  $s^* = 0,068$  không đổi,  $x^* = 99,135$  được chọn. Từ kết quả trên tính z-score và tất cả các giá trị đều có  $|z| < 2$ , tính giá trị ấn định trên 12 kết quả. Như vậy, độ tinh khiết của huperzin A là 99,13 % tính trên chế phẩm nguyên trạng với độ không đảm bảo đo là 0,336 và độ lệch 0,063, Các lọ chuẩn được bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8 °C, tránh ánh sáng.

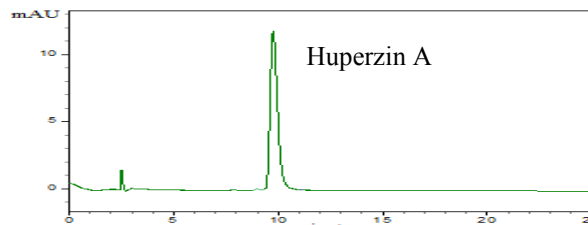
### 3.2. Xây dựng và thẩm định quy trình định lượng huperzin A

#### 3.2.1. Khảo sát điều kiện sắc kí

Khảo sát bước sóng phát hiện: Kết quả thực nghiệm cho thấy dung dịch chuẩn huperzin A hấp thu tốt nhất ở các bước sóng 230 nm, 310 nm (Hình 1). Ở bước sóng này các pic đều có đỉnh hấp thu cao, hình dạng pic đối xứng (Hình 2 và Hình 3). Do đó chọn bước sóng 230 nm, 310 nm làm bước sóng phát hiện.

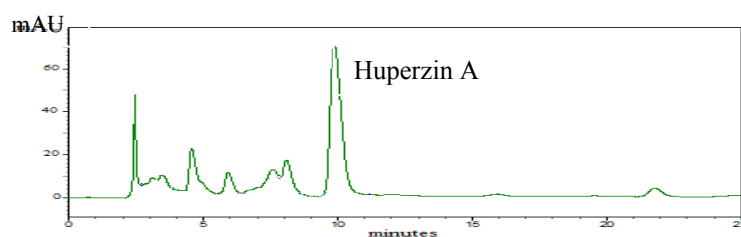


Hình 1. Phổ UV của chuẩn huperzin A



Hình 1. Sắc kí đồ của chuẩn huperzin A

Khảo sát hệ dung môi chạy HPLC: Tham khảo các tài liệu sử dụng dung môi pha động để tách huperzin A bằng phương pháp HPLC, tiến hành khảo sát các hệ dung môi như: MeOH - nước acid và MeOH - dung dịch đệm phosphat [2, 4, 6]. Kết quả cho thấy hệ MeOH-acid phosphoric 0,1 % cho pic nhọn, đối xứng với độ phân giải lớn hơn 1,5. Do đó hệ dung môi MeOH-acid phosphoric 0,1 % được chọn để tiến hành xây dựng quy trình định lượng huperzin A.



Hình 2. Sắc kí đồ mẫu thử với hệ dung môi MeOH- acid phosphoric 0,1 % (18:82).

### 3.2.2. Tính thích hợp của hệ thống

Được thực hiện trên kết quả của 6 lần tiêm lặp lại cùng một mẫu chuẩn có nồng độ 12,5  $\mu\text{g/ml}$ . Các thông số sắc kí có giá trị trung bình và RSD như sau: Thời gian lưu ( $t_R$ ) = 10,98 phút và RSD = 0,12 %; Diện tích pic ( $S$ ) = 2745945,83 và RSD = 0,3 %; Hệ số dung lượng ( $k'$ ) = 4,48 và RSD = 0,01 %; Hệ số bất đối ( $A_s$ ) = 1,21 và RSD = 0,01 %; Số đĩa lí thuyết ( $N$ ) = 32418 và RSD = 1,16 %. Các thông số trên đều đạt yêu cầu về tính tương thích hệ thống của quy trình định lượng với RSD < 2 %,  $k' \geq 1$  và  $0.8 \leq A_s \leq 1.5$ .

### 3.2.3. Khảo sát tính tuyến tính

Trong khoảng nồng độ khảo sát từ 2,5 – 25  $\mu\text{g/ml}$ , phương trình hồi quy thu được là  $y = 247539x - 203331$ . Hệ số tương quan  $R^2 = 0,9996$ . Hệ số a và b có ý nghĩa với độ tin cậy 95 %.

### 3.2.4. Độ đặc hiệu

Phân tích mẫu trắng là dung môi pha động MeOH-H<sub>2</sub>O/ acid phosphoric 0,1 % (18:82) và mẫu chuẩn huperzin A có nồng độ 10  $\mu\text{g/ml}$ . Mẫu trắng không có pic nào trùng với các pic cần định lượng, sắc kí đồ của mẫu thử có đỉnh huperzin A tương ứng với mẫu chuẩn. Sắc kí đồ của mẫu thử thêm chuẩn cho thấy diện tích đỉnh tăng lên rõ rệt so với lúc chưa thêm chất chuẩn.

### 3.2.5. Độ lặp lại của phương pháp

Kết quả của 6 lần phân tích độc lập của 6 mẫu được liệu với  $X_{tb} = 5751091,67$ ; SD = 256672,80;  $e = \pm 269361,59$ ; Khoảng tin cậy:  $\mu = 5751091,67 \pm 269361,59$  và giá trị RSD = 4,46 % đã chứng tỏ quy trình đạt yêu cầu về độ lặp lại.

### 3.2.6. Độ đúng

Được thực hiện bằng phương pháp thêm chuẩn vào nền mẫu ở 3 mức nồng độ khác nhau. Mỗi mẫu được thêm một lượng chính xác 80 %, 100 %, 120 % chất chuẩn so với hàm lượng huperzin A trong 1 g dược liệu Râu rồng. Kết quả tỉ lệ phục hồi tương ứng ở mỗi nồng độ thêm chuẩn như trên là 94,56 %, 96,36 %, 95,12 % đã chứng tỏ rằng quy trình định lượng Huperzin A trong dược liệu khảo sát đạt yêu cầu về độ đúng.

## 3.3. Ứng dụng quy trình

Quy trình sau khi thẩm định đã được ứng dụng để kiểm tra định tính và định lượng huperzin A trong một số loài thực vật thuộc họ Thạch tùng ở Việt Nam. Phương pháp HPLC được áp dụng bằng cách so sánh thời gian lưu và diện tích pic của mẫu thử và mẫu chuẩn, áp

dụng công thức tính kết quả như trên để tính được hàm lượng huperzin A trong các mẫu phân tích. Mẫu thử được cân chính xác 1 g bột dược liệu từng loài riêng biệt, chiết siêu âm 3 lần trong 30 phút bằng MeOH, lọc và chuyển toàn bộ dịch chiết vào bình định mức 10 ml, thêm methanol đến vạch. Lọc qua màng lọc 0,45 µl thu được dung dịch tiến hành phân tích sắc kí.

Các loài thuộc chi *Lycopodium* và *Lycopodiella* là *Lycopodium casuarinoides* (Thạch tùng dương), *Lycopodiella cernua* (Thạch tùng nghiêng), *Lycopodium clavatum* (Thông đá), *Lycopodium complanatum* (Thạch tùng dẹp) đều không có chứa huperzin A. Kết quả này phù hợp với công bố của tác giả Ma X. [4]. Mặt khác, huperzin A hiện diện trong tất cả 6 loài thuộc chi *Huperzia* với hàm lượng (µg/g) như sau: *Huperzia carinata* (Thạch tùng lá dùi) 208,622; *Huperzia fordii* (Thạch tùng Ford) 47,287; *Huperzia phlegmaria* (Thạch tùng đuôi ngựa) 47,549; *Huperzia serrata* (Thạch tùng răng) 181,644; *Huperzia squarrosa* (Râu rồng) 235,949; *Huperzia tetrasticha* (Thạch tùng vuông) 155,345.

#### 4. KẾT LUẬN

Thiết lập chất chuẩn huperzin A từ nguồn chất tinh khiết phân lập được từ cây Râu rồng có độ tinh khiết cao 99,13 % và được thẩm định theo các tiêu chuẩn đầy đủ của một chất chuẩn gốc đáng tin cậy trong kiểm nghiệm dược liệu. Quy trình phân tích huperzin A trong dược liệu bằng HPLC được xây dựng và thẩm định. Các quy trình định tính và định lượng huperzin A trong các loài dược liệu thuộc họ Thạch tùng được áp dụng với Máy HPLC Merck Hitachi, detector PDA, cột sắc kí LiChropher RP 18e (5 µm, 250 mm × 4 mm) do Merck sản xuất, pha động: MeOH-H<sub>2</sub>O/ acid phosphoric 0,1 % (18:82), tốc độ dòng: 1 ml/phút, nhiệt độ cột: 25 °C, thể tích tiêm mẫu: 10 µl, thời gian phân tích là 25 phút.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bai D. L., Tang X. C. and He X. C. - Huperzin A, A Potential Therapeutic Agent for Treatment of Alzheimer's Disease **7** (2000) 355-378.
2. Jason Q. D. G., Anne L. W., Ashley R. F., Joseph A. M. H., Woodrow I. E. - Variation in huperzine A and B in Australasian *Huperzia* species, *Biochemical Systematics and Ecology* **36** (2008) 612-618.
3. Ma X. and Gang D. R. - The lycopodium alkaloids, *Natural product reports* **21** (6) (2004) 752-772.
4. Ma X., Tan C., Zhu D. and Gang D. R. - Is there a better source of huperzine A than *Huperzia serrata*? Huperzine A content of *Huperziaceae* species in China, *Journal of agricultural and food chemistry* **53** (5) (2005) 1393-1398.
5. Nguyen N. C., Tran C. L. - Isolation of huperzine A from *Huperzia squarrosa* (Forst.) Trevis., *Lycopodiaceae*, *Tạp chí Dược liệu* **19** (1) (2014) 22-27.
6. Wu Q., Gu Y. - 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, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **40** (2006) 993-998.
7. ISO Guide 34:2009, General requirements for the competence of reference material producers, 2009, pp. 4-18.

**ABSTRACT**

**ESTABLISHING HUPERZINE A REFERENCE STANDARD FOR QUANTITATIVE ANALYSIS OF LYCOPODIACEAE SPECIES FOUND IN VIET NAM**

Nguyen Ngoc Chuong<sup>1, \*</sup>, Tran Manh Hung<sup>2</sup>, Tran Thi Kim Dung<sup>3</sup>, Tran Cong Luan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>*University of Medicine and Pharmacy, Ho Chi Minh city - 217 Hong Bang Street, District 5, Ho Chi Minh City*

<sup>2</sup>*Da Nang University - 41 Le Duan Street, Hai Chau District, Da Nang City*

<sup>3</sup>*Tay Do University - 68 Tran Chien, Cai Rang District, Can Tho City*

<sup>4</sup>*Mien Dong University of Technology - 1A Street, Thong Nhat District, Dong Nai Province*

\*Email: *congluan53@gmail.com*

Huperzine A (HupA), isolated from Chinese herb *Huperzia serrata*, is a potent, highly specific and reversible inhibitor of acetylcholinesterase. A reference standard of HupA was established with the purity of 99,13 % for evaluation of the Vietnamese natural plants. An HPLC method was developed for determination of HupA in 10 species of Lycopodiaceae found in Viet Nam. The quantitative HPLC analysis was validated for system suitability, selectivity, linearity ranges and precision. Experimental results show that the reference standard of HupA and the HPLC method were applicable to quality control of medicinal plants.

*Keywords:* Huperzine A, Lycopodiaceae, acetylcholinesterase.