

## ĐÁNH GIÁ HOẠT TÍNH ỨC CHẾ ENZYME ACETYLCHOLINESTERASE CỦA MỘT SỐ LOÀI DƯƠNG XỈ BẢN ĐỊA VIỆT NAM

**Chu Nhật Huy, Ngô Văn Hiếu, Chu Hoàng Hà, Dương Thị Huyền Trang, Nguyễn Minh Hà, Trần Hải Nam, Bùi Long Vũ, Hồ Ngọc Anh**

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

### TÓM TẮT

Hoạt tính ức chế enzyme Acetylcholinesterase (AChE) có nhiều ứng dụng quan trọng trong y học, đặc biệt là trong điều trị các bệnh liên quan đến hệ thần kinh. Nghiên cứu về khả năng ức chế enzyme AChE của dương xỉ đang mở ra nhiều triển vọng trong y học, đặc biệt là trong điều trị các bệnh lý thần kinh như Alzheimer. Nhiều lớp chất chiết xuất từ dương xỉ như flavonoid, alkaloid và terpenoid, đã được chứng minh có khả năng ức chế AChE, giúp tăng cường nồng độ acetylcholine trong não, cải thiện chức năng nhận thức và trí nhớ. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu thập và chiết tách với các dung môi có độ phân cực khác nhau của 05 loài Dương xỉ bản địa Việt Nam là *Drynaria bonni*, *Cyrtomium hemionitis*, *Alsophila podophylla*, *Alsophila latebrosa*, *Diplazium esculentum* và đánh giá hoạt tính ức chế enzyme AChE của chúng. Kết quả cho thấy 13 trên tổng số 20 cao chiết có khả năng ức chế enzyme AChE tại nồng độ 128 µg/mL cao nhất đạt 45% với cao chiết ethylacetate của loài *A. podophylla*. Đối với cao chiết có hoạt tính trong các mẫu thử từ loài *A. podophylla*, đã tiến hành tách phân đoạn. Trong 03 phân đoạn tinh sạch được, xuất hiện phân đoạn H2 thể hiện hoạt tính ức chế enzyme AChE với  $IC_{50}$   $10,87 \pm 0,36$  µg/mL. Từ đó, phân đoạn này có thể trở thành mục tiêu cho nghiên cứu tiếp theo về cấu trúc, cũng như phát triển thêm theo hướng ứng dụng cho phòng và điều trị các bệnh sa sút trí tuệ hay Alzheimer.

*Từ khóa: Alsophila latebrosa, Alsophila podophylla, Cyrtomium hemionitis, dương xỉ, Drynaria bonni, Diplazium esculentum, enzyme acetylcholinesterase.*

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Sa sút trí tuệ (SSTT, dementia) là một thuật ngữ chung cho sự suy giảm khả năng nhận thức đủ nghiêm trọng để cản trở cuộc sống hàng ngày. Bệnh Alzheimer (AD) chiếm gần 3/4 các trường hợp SSTT, với phần còn lại do SSTT mạch máu (VaD), hỗn hợp Alzheimer và VaD, SSTT với thể Lewy, và SSTT vùng trán. SSTT là nguyên nhân chính gây ra tình trạng khuyết tật và phụ thuộc ở những người lớn tuổi trên toàn thế giới, đặt ra gánh nặng to lớn cho cá nhân, gia đình, cộng đồng và xã hội (Ehab *et al.*, 2019). Trong khi đó, khả năng ức chế enzyme acetylcholinesterase (AChE) có vai trò quan trọng trong điều trị Alzheimer. Các chất ức chế AChE như Donepezil, Rivastigmine và Galantamine giúp ngăn chặn phân giải acetylcholine, tăng cường nồng độ của chất dẫn truyền thần kinh này trong não. Điều này cải thiện chức năng nhận thức và trí nhớ của bệnh nhân Alzheimer, giảm các triệu chứng hành vi và tâm lý, và nâng cao chất lượng cuộc sống (Enz *et al.*, 1995).

Nghiên cứu về khả năng ức chế AChE của dương xỉ đang mở ra nhiều triển vọng trong y học, đặc biệt là trong điều trị các bệnh lý thần kinh như Alzheimer. Các hợp chất chiết xuất từ dương xỉ, bao gồm flavonoid, alkaloid và terpenoid, đã được chứng minh có khả năng ức chế AChE, giúp tăng cường nồng độ acetylcholine trong não, cải thiện chức năng nhận thức và trí nhớ. Một trong những chất phân lập từ dương xỉ đang được ứng dụng rộng rãi từ nghiên cứu cơ bản đến các sản phẩm thương mại, thực phẩm chức năng là Huperzine A chiết xuất từ cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*). Hợp chất này nổi bật với khả năng ức chế enzyme AChE, giúp tăng nồng độ acetylcholine trong não, cải thiện trí nhớ và chức năng nhận thức. Điều này khiến huperzine A trở thành một ứng viên tiềm năng trong điều trị bệnh Alzheimer và các rối loạn thần kinh khác (Yuan *et al.*, 2012). Dương xỉ là nguồn tài nguyên thiên nhiên phong phú và đa dạng, dễ dàng tiếp cận và khai thác. Việc nghiên cứu các hợp chất ức chế AChE từ dương xỉ không chỉ giúp phát triển các liệu pháp điều trị mới mà còn góp phần bảo tồn và sử dụng bền vững nguồn dược liệu tự nhiên. Tuy nhiên, việc nghiên cứu vẫn còn một số thách thức. Cần xác định chính xác hoạt chất từ đối tượng nghiên cứu này và đánh giá đầy đủ về độ an toàn và hiệu quả qua các thử nghiệm tiền lâm sàng và lâm sàng. Bên cạnh đó, việc chuẩn hóa quy trình chiết xuất và điều chế các hợp chất từ dương xỉ cũng là một yếu tố quan trọng để đảm bảo tính nhất quán và chất lượng của sản phẩm cuối cùng. Tóm lại, nghiên cứu về khả năng ức chế enzyme AChE của dương xỉ là một hướng đi đầy triển vọng, đòi hỏi sự đầu tư và hợp tác từ các nhà khoa học, nhà nghiên cứu và các cơ quan y tế để mang lại những hướng nghiên cứu mới trong điều trị các bệnh lý thần kinh.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thu thập được 05 loài Dương xỉ bản địa: *Drynaria bonni*, *Cyrtomium hemionitis*, *Alsophila podophylla*, *Alsophila latebrosa* và *Diplazium esculentum*. Các mẫu thu được trên đều chưa được nghiên cứu về khả năng ức chế enzyme AChE hay nghiên cứu theo định hướng ứng dụng chúng cho khả

năng phòng và điều trị Alzheimer. Trong đó, những loài này đều chưa xuất hiện nhiều công bố theo hướng hóa hợp chất thiên nhiên, như loài *A. podophylla* chỉ có những nghiên cứu về phân loại, định loại phân bố. Bộ mẫu thực vật này chứa đầy đủ các dạng phát triển theo hình thái như thân gỗ, thân thảo, leo bám của các loài dương xỉ điển hình. Từ đó, chúng tôi triển khai nghiên cứu, đánh giá khả năng ức chế enzyme AChE của các dịch chiết với dung môi có độ phân cực khác nhau của chúng. Nghiên cứu này có thể đặt nền móng, định hướng cho những nghiên cứu chuyên sâu tiếp theo cho phân lập, xác định các hoạt chất có tiềm năng từ các loài dương xỉ bản địa Việt Nam.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Các mẫu dương xỉ được thu hái và định danh theo hình thái bởi Lữ Thị Ngân, Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam, Viện HL KH CN VN và Đỗ Thị Xuyên, Trường Đại học KHTN, Đại học QGHN.

**Bảng 1. Các mẫu dương xỉ sử dụng trong nghiên cứu**

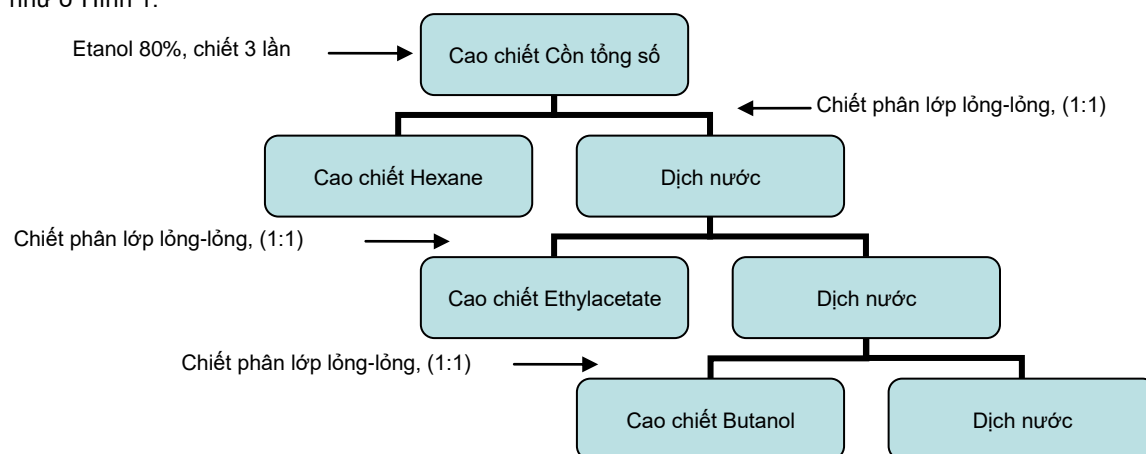
STT	Tên Khoa học	Họ	Nơi thu mẫu	Ký hiệu mẫu
1	<i>Drynaria bonni</i>	Polypodiaceae	Vườn Quốc Gia Dù Già	DX01
2	<i>Cyrtomium hemionitis</i>	Dryopteridaceae	Pà Cò (Mai Châu – Hòa Bình)	DX02
3	<i>Alsophila podophylla</i>	Cyatheaceae	Tam Đảo – Vĩnh Phúc	DX04
4	<i>Alsophila latebrosa</i>	Cyatheaceae	Tam Đảo – Vĩnh Phúc	DX06
5	<i>Diplazium esculentum</i>	Athyriaceae	Tam Đảo – Vĩnh Phúc	DX08

Các dung môi có độ phân cực khác nhau như n-Hexane, Ethylacetate, n-Butanol, nước. Các hóa chất cho phép thử hoạt tính ức chế enzyme AChE: dung dịch đệm phosphat (200 mM, pH 7,7), enzyme AChE, Acetylthiocholine (ACTI), Acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB), chất chuẩn dopenezil.

### Phương pháp nghiên cứu

#### Xử lý và chiết tách mẫu thực vật với các dung môi có độ phân cực khác nhau

Sau khi sấy khô, xay nhỏ, mẫu dược liệu được ngâm chiết với EtOH 80% ở nhiệt độ 40°C trong bể siêu âm trong vòng 1 giờ. Thực nghiệm chiết bằng siêu âm này được thực hiện lặp lại 3 lần với mỗi mẫu vật và gộp chung dịch chiết. Sau đó lọc loại bã dược liệu, gộp dịch chiết và cô quay dưới áp suất giảm để loại bỏ các dung môi dễ bay hơi, thu được cao dược liệu toàn phần, tiến hành cân khối lượng cao toàn phần trên cân phân tích. Cao dược liệu toàn phần được hòa tan trong 200 mL nước cất, chiết phân đoạn lần lượt với các dung môi có độ phân cực khác nhau như n-Hexane, Ethylacetate, n-Butanol theo tỉ lệ 1:1, mỗi dung môi thực hiện chiết 3 lần (Zhang *et al.*, 2018). Với mỗi mẫu vật tổng cộng sẽ có 4 loại dịch chiết sau phân lớp (3 loại dịch chiết với dung môi tương ứng và dịch cuối cùng là dịch nước sau khi chiết phân lớp với n-Butanol). Quy trình chiết phân đoạn dương xỉ được tóm tắt như ở Hình 1.



**Hình 1. Sơ đồ chiết xuất phân đoạn dương xỉ**

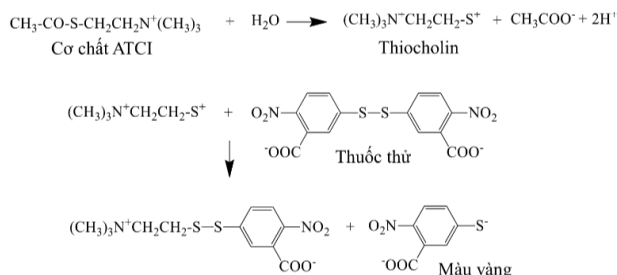
### Phương pháp sắc ký lớp mỏng

Các cao chiết hoặc phân đoạn được định tính sơ bộ bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng. Cao chiết các phân đoạn được hòa tan với dung môi thích hợp, khảo sát các hệ dung môi chạy sắc ký lớp mỏng phù hợp để phân tách các chất trong cao chiết. Tiến hành chấm lượng khoảng 5 µL cao chiết đã hòa tan trong dung môi lên bản

sắc ký lớp mỏng trắng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (Merck 1.05715) và RP-18 F254s (Merck). Các chất sau đó được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở bước sóng 254 nm (Vũ Thị Ngọc *et al.*, 2016).

**Phương pháp sàng lọc hoạt tính ức chế Acetylcholinesterase của các cao chiết**

Phương pháp đo quang *in vitro* dùng để đánh giá tác dụng ức chế AChE được xây dựng và sử dụng trong nghiên cứu rất phổ biến hiện nay theo phương pháp của Ellman và đồng tác giả (1961). Cơ chất acetylthiocholin iodid (ACTI) bị thủy phân nhờ xúc tác của AChE tạo thiocholin. Sản phẩm thiocholin phản ứng với thuốc thử acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic (DTNB) tạo thành hợp chất acid 5-thio-2-nitro benzoic có màu vàng. Lượng hợp chất màu được tạo thành này tỷ lệ thuận với hoạt độ của AChE. Phương trình phản ứng được trình bày như ở Hình 2:



**Hình 2. Quá trình phản ứng diễn ra trong phương pháp đo quang sử dụng thuốc thử Ellman**

Phương pháp thử được tiến hành như sau: thêm lần lượt từng dung dịch gồm: dung dịch đệm phosphate (200 mM, pH 7,7) + 15 µL dịch thử nghiệm + 80 µL DTNB (3,96 mg DTNB và 1,5 mg NaHCO<sub>3</sub> hòa tan trong 10 mL phosphate đệm pH 7,7) + 10 µl AChE (2 U/mL), trộn đều hỗn hợp, ủ trong 5 phút ở 25°C. Sau đó, thêm 15 µL acetylthiocholine iodide (10,85 mg trong 5 mL phosphate buffer) và ủ lại trong 5 phút. Lắc đều, đo ngay ở bước sóng 412 nm. Hoạt độ enzym AchE được tính toán dựa trên độ hấp thụ tại bước sóng 412 ở trên. Phản ứng được thực hiện trên đĩa 96 giếng ở nhiệt độ phòng (25°C). Mỗi thử nghiệm được làm lặp lại 3 lần, mỗi lần được làm trên 3 giếng. Giá trị tính toán là % giảm hoạt độ enzym so với nhóm đối chứng thông qua đo hoạt độ enzym AchE theo công thức:

$$I\% = \frac{Ac - At}{Ac - A0} \times 100$$

Trong đó: I%: Phần trăm hoạt tính AChE bị ức chế.

Ac: Độ hấp thu của mẫu chứng.

At: Độ hấp thu của mẫu thử.

Ao: Độ hấp thu của mẫu trắng.

Từ giá trị I% xác định được, tiến hành tính giá trị IC<sub>50</sub> (nồng độ của mẫu ức chế 50% hoạt tính enzyme) của từng mẫu thử như sau: Pha 1 dãy nồng độ của mẫu thử, xác định I% của từng nồng độ mẫu thử đó. Với những mẫu thử có sự tương quan tuyến tính giữa giá trị I% và nồng độ, tiến hành xây dựng đường hồi quy tuyến tính  $y = a \cdot x + b$ , trong đó, y là giá trị % tác dụng ức chế enzym và x là nồng độ mẫu thử. Với những mẫu không có sự tương quan tuyến tính giữa I% và nồng độ, tiến hành xây dựng đường hồi quy tuyến tính  $y = a \cdot \log(x) + b$ . Thay giá trị y = 50% vào phương trình tuyến tính mới xây dựng được từ đó tính được giá trị của nồng độ x. Giá trị tìm được này chính là giá trị IC<sub>50</sub>. Để có cơ sở đánh giá tác dụng ức chế AChE *in vitro* của mẫu nghiên cứu, donepezil được sử dụng làm mẫu chứng dương. Hợp chất này đã được nghiên cứu và chứng minh tác dụng ức chế AChE khá mạnh được sử dụng làm mẫu chứng dương trong nhiều nghiên cứu (Ferreira *et al.*, 2020).

**Xử lý số liệu**

Các thí nghiệm được thực hiện lặp lại 3 lần. Kết quả nghiên cứu được xử lý và phân tích có ý nghĩa thống kê sinh học bằng phần mềm Excel 2013 (Microsoft Office, Mỹ) và Origin Pro 10.1.

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Tạo cao chiết với các dung môi có độ phân cực khác nhau**

Từ các mẫu dương xỉ đã thu thập, chúng tôi đã xử lý và chiết tách với 03 loại dung môi có độ phân cực khác nhau n-Hexane, Ethylacetate, n-Butanol và nước để thu được các cao chiết tương ứng. Với mỗi loại mẫu thực vật tương ứng sẽ có 04 loại cao chiết đó là cao chiết Hexane, cao chiết Ethylacetate, cao chiết Butanol và cao chiết nước. Kết quả thu được trình bày ở bảng sau:

**Bảng 2. Khối lượng các cao chiết thu được**

STT	Tên khoa học	Mẫu khô (g)	Dịch chiết tổng (g)	Cao chiết Hexane (g)	Cao chiết Ethylacetate (g)	Cao chiết Butanol (g)	Cao chiết nước (g)
1	<i>Drynaria bonni</i>	271,3	4,387	0,8034	1,2335	0,9105	1,0619
2	<i>Cyrtomium hemionitis</i>	540,0	8,6121	1,8352	2,401	2,027	2,1794
3	<i>Alsophila podophylla</i>	1268,0	20,931	3,7165	5,7138	6,2	6,2107
4	<i>Alsophila latebrosa</i>	405,7	12,723	2,0142	3,5841	3,1054	3,002
5	<i>Diplazium esculentum</i>	619,2	8,590	1,7602	2,3818	1,9017	2,0599

Với mục tiêu, khảo sát, điều tra, đánh giá sơ bộ hoạt tính ức chế enzyme AChE của các loài dương xỉ bản địa Việt Nam thì lượng cao chiết như bảng trên đáp ứng được về số lượng mẫu dùng cho phép thử nghiệm này. Kết quả ở bảng trên cho thấy ở cả 05 loài nghiên cứu trọng lượng của cao chiết Ethylacetate luôn chiếm lượng cao nhất trong các cao chiết thu được. Điều này một phần xuất phát từ độ phân cực trung bình nhưng trải rộng của dung môi này khi so sánh với n-Hexane hay n-Butanol, nhưng kết quả này cũng cho thấy trong các loài dương xỉ thì các hợp chất thứ cấp triển vọng có khoảng độ phân cực này chiếm một phần lớn; vì những lớp chất như flavonoid, alkaloid, terpene, triterpene đều có khả năng hòa tan tốt trong dung môi này. Đồng thời các acid béo, các chất tinh dầu, kém phân cực dễ hòa tan hơn trong n-Hexane, và các chất có độ phân cực mạnh hay đường, aglycon lại dễ dàng hòa tan hơn trong Butanol và nước. Ngoài ra, trọng lượng cần thiết của cao chiết cho phép thử hoạt tính *in-vitro* này chỉ cần lượng tối thiểu 30 mg. Trong điều kiện một hoặc một số cao chiết thể hiện hoạt tính, thì lượng mẫu cần dùng cho hướng hóa học các hợp chất thiên nhiên cần phải có số lượng nhiều hơn, ví dụ như trong trường hợp của Huperzine A chỉ chiếm từ 0,0171 mg/g đến 0,0925 mg/g mẫu khô (Vũ Thị Ngọc *et al.*, 2016). Cho những nghiên cứu tiếp theo, với một đơn chất 5 mg cần thiết cho đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân, xác định cấu trúc của hợp chất tinh sạch được lượng mẫu khô tối thiểu cần từ khoảng 500 g mẫu khô do Huperzine A đã được xác định là chất chiếm hàm lượng cao trong Thạch tùng răng cưa. Trong khi đó với đối tượng là 05 loài dương xỉ của nghiên cứu này, chưa từng được nghiên cứu sâu về thành phần hóa học, khả năng xuất hiện hoạt tính ức chế enzyme AChE có thể do một số chất với hàm lượng thấp trong cao chiết. Vì vậy tại bước nghiên cứu này chúng tôi đề xuất cần thu thập thêm về số lượng cũng như chủng loài của nhóm thực vật nghiên cứu.

**Đánh giá hoạt tính ức chế enzyme AChE của các cao chiết thu được**

Các cao chiết thu được tương ứng với số lượng mẫu và các dung môi có độ phân cực khác nhau tổng số 20 mẫu cao chiết. Vì các mẫu đều chưa được nghiên cứu về thành phần hóa học, nên chúng tôi đặt vấn đề khảo sát với các dung môi khác nhau. Đối với mỗi dung môi có độ phân cực khác nhau số lượng các chất trong mẫu nghiên cứu sẽ giảm xuống so với dịch chiết tổng ban đầu. Đồng thời hàm lượng của chúng trong cao chiết riêng biệt cũng sẽ tăng lên, từ đó chúng ta có thể dễ dàng hơn phát hiện sự có mặt của các chất cho hoạt tính sinh học này khi thử nghiệm đánh giá với các cao chiết từ các dung môi có độ phân cực khác nhau. Các cao chiết được ký hiệu như Bảng 1 kèm theo ký hiệu của loại dung môi sử dụng chiết tương ứng như n-Hx: n-Hexane; EtoAc: Ethylacetate; BuOH: n-Butanol; N: cao chiết nước. Kết quả thu được ở bảng sau:

**Bảng 3. Hoạt tính ức chế enzyme AChE của các cao chiết**

STT	Mẫu thử	Nồng độ % ức chế tương ứng			
		128 µg/mL	32 µg/mL	8 µg/mL	2 µg/mL
1	DX01-n-Hx	23	0	0	0
2	DX01-EtoAc	21	0	0	0
3	DX01-BuOH	12	0	0	0
4	DX01 - N	30	0	0	0
5	DX02-nHx	21	0	0	0
6	DX02-EtoAc	15	0	0	0
7	DX02-BuOH	39	25	0	0
8	DX02-N	35	21	0	0
9	DX04-nHx	35	25	0	0
10	DX04-EtoAc	45	36	25	0
11	DX04-BuOH	30	22	0	0

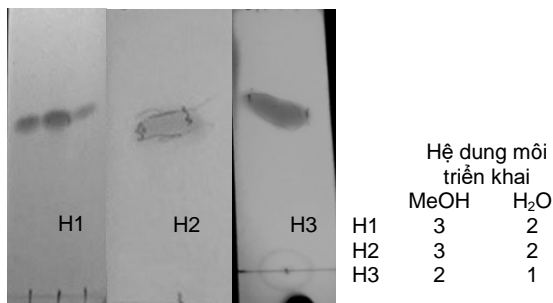
## CÔNG NGHỆ HÓA SINH VÀ PROTEIN

12	DX04-N	0	0	0	0
13	DX06-nHx	0	0	0	0
14	DX06-EtoAc	0	0	0	0
15	DX06-BuOH	35	16	0	0
16	DX06-N	0	0	0	0
17	DX08-nHx	0	0	0	0
18	DX08-EtoAc	27	10	0	0
19	DX08-BuOH	0	0	0	0
20	DX08-N	0	0	0	0

Kết quả cho thấy, trong 20 mẫu được thử hoạt tính ức chế AChE, có 7 mẫu không thể hiện hoạt tính, đó là các mẫu DX04-N, DX06-nHx, DX06-EtoAc, DX06-N, DX08-nHx, DX08-BuOH và DX08-N. Ở nồng độ 128  $\mu\text{g/mL}$ , lượng mẫu thể hiện hoạt tính ức chế enzyme AChE là 13 mẫu, trong đó, cao chiết Ethylacetate của mẫu DX04 vẫn thể hiện hoạt tính ức chế tốt nhất với 45% hoạt tính AChE bị ức chế, tiếp theo sau là cao chiết BuOH của DX02 với 39%. Trong 13 mẫu, cao chiết EtOAc của DX08 thể hiện hoạt tính thấp nhất với chỉ 10% hoạt tính AChE bị ức chế. Tuy vậy kết quả ở bảng trên cho thấy hoạt tính này không được thể hiện rõ rệt với các mẫu thử, vì ở nồng độ cao nhất khả năng ức chế enzyme AChE vẫn chưa vượt quá 50%. Vì vậy chúng tôi tiếp tục thực hiện chiết tách các phân đoạn từ cao chiết có hoạt tính tốt nhất là DX04-EtoAc. Thí nghiệm này được tiếp tục bằng sắc ký cột mở pha thuận.

### Đánh giá hoạt tính của một số phân đoạn tinh sạch được từ cao chiết mẫu DX04

Để làm sáng tỏ thêm về khả năng thể hiện hoạt tính ức chế enzyme AChE của cao chiết mẫu DX04, bằng phương pháp sắc ký trên cột silica-gel pha thuận chúng tôi thu được 03 phân đoạn bao gồm: H1, H2, H3. Các phân đoạn này được kiểm tra định tính độ tinh sạch trên sắc ký lớp mỏng bản TLC tráng sẵn RP-18 với hệ dung môi methanol (MeOH) / nước ( $\text{H}_2\text{O}$ ) là 3:2, 3:2 và 2:1 tương ứng với H1, H2, H3 tại bước sóng 254 nm.



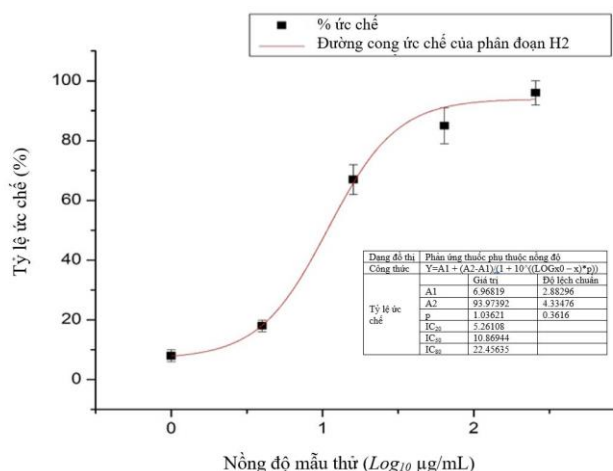
**Hình 3. Sắc ký lớp mỏng của các phân đoạn tinh sạch được**

Các phân đoạn đã tinh sạch tiếp tục được đánh giá hoạt tính ức chế enzyme AChE cho kết quả như sau:

**Bảng 4. Khả năng ức chế enzyme AChE của các phân đoạn**

STT	Mẫu thử	Nồng độ % ức chế tương ứng					$\text{IC}_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )
		256 $\mu\text{g/mL}$	64 $\mu\text{g/mL}$	16 $\mu\text{g/mL}$	4 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	
1	H1	8	0	0	0	0	>256
2	H2	96	85	67	18	8	$10,87 \pm 0,36$
3	H3	14	0	0	0	0	>256
4	Donepezil					0	$0,029 \pm 0,004$

Nhìn vào kết quả ở Bảng 4 thấy ở nồng độ 256  $\mu\text{g/mL}$  cả 3 phân đoạn H1, H2, H3 đều có % ức chế và H2 có % ức chế cao nhất, còn tại những nồng độ khác % ức chế của phân đoạn H1, H3 đều bằng không nên các chất H1, H3 không có khả năng ức chế enzyme AChE. Từ nồng độ 256  $\mu\text{g/mL}$  đến 1  $\mu\text{g/mL}$  chất H2 có % ức chế giảm dần với  $\text{IC}_{50} = 10,87 \pm 0,36$   $\mu\text{g/mL}$ .



Hình 4. Khả năng ức chế enzyme AChE của chất H2 phụ thuộc nồng độ

Đối chứng dương là Donepezil là một loại thuốc dùng để điều trị bệnh Alzheimer. Chất này phần nào cải thiện chức năng tinh thần và khả năng hoạt động. Donepezil đã được chấp thuận cho sử dụng y tế tại Hoa Kỳ vào năm 1996. Năm 2016, đây là loại thuốc được kê đơn nhiều thứ 98 tại Hoa Kỳ với hơn 7 triệu đơn thuốc. Trong trường hợp của phân đoạn H2, tuy thể hiện hoạt tính là thấp hơn so với một đơn chất thương mại kể trên, nhưng khi so sánh với giá trị IC<sub>50</sub> của các hoạt chất chiết tách từ thực vật đã công bố như Huperzine A (18,04 µg/mL) (Dang *et al.*, 2023) phân lập từ cây thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrata*), hay [(7S)-8'-(4'-hydroxy-3'-methoxyphenyl)-7-hydroxypropyl]benzene-2,4-diol (10.2 µg/mL) và malabaricone C (15,6 µg/mL) (Cuong *et al.*, 2014) phân lập được từ cây Nhục đậu khấu (*Myristica fragrans*) thì phân đoạn này cũng có mức hoạt tính đáng kể. Như vậy dựa vào kết quả so sánh trên ta có thể thấy phân đoạn H2 với nồng độ ức chế 50% (IC<sub>50</sub>) bằng 10,87 µg/mL có khả năng ức chế enzyme AChE theo triển vọng phát triển tạo ra sản phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh sa sút trí tuệ và bệnh Alzheimer.

## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, 05 loài dương xỉ đã được thu hái, xử lý và chiết tách với các dung môi có độ phân cực khác nhau. Tổng cộng thu được 20 mẫu cao chiết tương ứng. Với đánh giá trên hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase thể hiện đây là nguồn mẫu có tiềm năng nghiên cứu mới từ kết quả của 13 trên tổng số 20 cao chiết đều có thể hiện hoạt tính. Tuy nhiên hoạt tính thu được là thấp khi ở nồng độ thử nghiệm cao nhất 128 µg/mL đều không có mẫu thử đạt trên 50% ức chế, điều này có thể do hàm lượng các chất có hoạt tính là thấp trong mẫu vật nghiên cứu. Khi thực hiện tiếp tục nghiên cứu các phân đoạn từ cao chiết DX04 có khả năng ức chế 45% ở nồng độ 128 µg/mL, chúng tôi đã thu được phân đoạn sạch, ký hiệu H2 có IC<sub>50</sub> đạt 10,87 µg/mL. Mặc dù khi so sánh với Donepezil (0,029 µg/mL) hay Huperzine A (18,04 µg/mL) (Dang *et al.*, 2023), phân đoạn H2 vẫn thể hiện hoạt tính đáng kể. Phân đoạn này cần tiếp tục tiến hành xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ hiện đại.

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu được thực hiện nhờ kinh phí của Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam với mã số đề tài DL0000.09/22-24.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cuong TD, Hung TM, Han HY, Roh HS, Seok JH, Lee JK, Jeong JY, Choi JS, Kim JA, Min BS (2014). Potent Acetylcholinesterase Inhibitory Compounds from *Myristica fragrans*. *Nat Prod Commun*, 9 (4): 499-502.
- Dang TK, Hong SM, Dao VT, Phuong TTT, Hiep TT, Giang DH, Hai NT, Hang PTN, Sun YK (2023). Anti-neuroinflammatory effects of alkaloid-enriched extract from *Huperzia serrata* on lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglial cells. *PharmBiol*, 61: 135-143.
- Enz A (1995). Acetylcholinesterase Inhibitors (AChE-I) as a Potential Use for Alzheimer's Disease (AD) Therapy: Differences in Mechanisms of Enzyme Inhibition. *Enzymes of the Cholinesterase Family*, 475-476.
- Ferreira J, Santos S, Pereira H (2020). *In vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of *Quercus suber* cork and corkback extracts. *eCAM*, 2020: 3825629.
- Vũ Thị Ngọc, Phạm Thị Hạnh, Lê Thị Lan Anh, Nguyễn Tiến Đạt, Lê Thị Bích Thủy (2016). Định tính và định lượng Huperzine A trong cây Thạch tùng răng cưa (*Huperzia serrate*) ở Đà Lạt, tỉnh Lâm Đồng. *Tạp chí Công nghệ sinh học Việt Nam*, 14: 473-478.
- Yuan JQ, Zhou XL, Wang S, Miao JH, Yan ZG, Feng SX, Ma XJ (2012). Advances in studies on chemical constituents of *Huperzia serrata* and their pharmacological effects. *Chinese traditional and herbal drugs*, 43: 399-407.
- Zhang QW, Lin LG, Ye WC (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*, 13: 1-26.

## EVALUATION OF ACETYLCHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY OF SOME VIETNAMESE NATIVE FERN

Nhat Huy Chu, Van Hieu Ngo, Hoang Ha Chu, Thi Huyen Trang Duong,  
Minh Ha Nguyen, Hai Nam Tran, Long Vu Bui, Ngoc Anh Ho

*Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology*

### SUMMARY

The inhibitory activity of the acetylcholinesterase (AChE) enzyme holds significant applications in medicine, particularly in the treatment of neurological disorders. Research on the AChE inhibitory potential of ferns is promising, especially for conditions such as Alzheimer's disease. Various classes of fern extracts, including flavonoids, alkaloids, and terpenoids, have demonstrated AChE inhibition, thereby enhancing acetylcholine levels in the brain and improving cognitive function and memory. In this study, we collected and extracted five native fern species of Vietnam as *Drynaria bonii*, *Cyrtomium hemionitis*, *Alsophila podophylla*, *Alsophila latebrosa*, and *Diplazium esculentum*; using solvents of different polarities and evaluated their AChE inhibitory activity. The results showed that 13 out of 20 extracts were able to inhibit the AChE enzyme at a concentration of 128 µg/mL, with the highest inhibition of 45% observed in the ethyl acetate extract of *A. podophylla*. For the active extract from *A. podophylla*, fractionation was performed. Among the three purified fractions, the H2 fraction exhibited AChE inhibitory activity with an IC<sub>50</sub> of 10.87 ± 0.36 µg/mL. This fraction presents a promising target for further structural analysis and development towards applications in the prevention and treatment of dementia or Alzheimer's disease.

*Keywords:* *Alsophila latebrosa*, *Alsophila podophylla*, *Cyrtomium hemionitis*, fern, *Drynaria bonii*, *Diplazium esculentum*, acetylcholinesterase enzyme.

---

\* Author for correspondence: Tel: 0988832488; Email: hongocanh1612@gmail.com