

SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF HUPERZINE A AND B IN *HUPERZIA SQUARROSA*: METHOD DEVELOPMENT, EXTRACTION OPTIMIZATION, AND QUALITY CONTROL APPLICATION

Hoang Nhu Quynh^{1,2,*}, Dao Thi Vui³, Nguyen Thi Kieu Anh², Bui Thi Lan Phuong^{1,*}

¹National Institute of Pharmaceutical Technology, Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam

²Faculty of Analytical Chemistry and Drug Quality Control, Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam

³Faculty of Pharmacology - Clinical Pharmacy, Hanoi University of Pharmacy, Hanoi, Vietnam

ABSTRACT – FCC 2026

Products derived from the medicinal herb *Huperzia squarrosa*, are increasingly used to support the treatment of neurological disorders and memory impairment, owing to the potent acetylcholinesterase inhibitory effects of Huperzine A (HupA) and Huperzine B (HupB), two lycodine-group alkaloids. However, the structural similarities and low concentration of HupA and HupB in the herbal material make their accurate evaluation exceptionally difficult. Therefore, it is necessary to optimize sample processing conditions in the method for simultaneous quantification of HupA and HupB. The sample was acidified, then alkalized with ammonia and extracted with chloroform, and then dried under nitrogen. The residue was dissolved in methanol before HPLC analysis on a C18 column (250 × 4.6 mm, 5 µm) at 50°C, with a mobile phase consisting of methanol and 80 mM ammonium acetate pH 6.0 (25:75, v/v), at 308 nm. The sample processing conditions were optimized using Modde Pro software. Results showed that the best yield was obtained by acidifying the herbal powder with 10% tartaric acid, macerating for 22.33 minutes, and performing one aqueous extraction followed by three chloroform extractions. This method was validated for selectivity, linearity, accuracy, repeatability, and detection/quantification limits according to ICH and AOAC guidelines, and then applied to commercial *Huperzia squarrosa* products. Results showed that the HupA and HupB contents were 0.044–0.072 mg/g and 0.041–0.072 mg/g, respectively, with one sample below the LOQ. In summary, this method allows for the simultaneous quantification of HupA and HupB in *Huperzia squarrosa*, providing a basis for the quality control of both herbal raw materials and finished products.

Keywords: *Huperzia squarrosa*, Huperzine A, Huperzine B, extraction, optimization

*Corresponding author: Bui Thi Lan Phuong (phuongbtl@hup.edu.vn)

Hoang Nhu Quynh (hngquynh27@gmail.com)

ĐỊNH LƯỢNG ĐỒNG THỜI HUPERZINE A VÀ B TRONG *HUPERZIA SQUARROSA*: XÂY DỰNG PHƯƠNG PHÁP, TỐI ƯU HÓA QUÁ TRÌNH CHIẾT XUẤT VÀ ỨNG DỤNG TRONG KIỂM TRA CHẤT LƯỢNG

Hoàng Như Quỳnh^{1,2,*}, Đào Thị Vui³, Nguyễn Thị Kiều Anh², Bùi Thị Lan Phương^{1,*}

¹*Viện Công nghệ Dược phẩm Quốc gia, Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam*

²*Khoa Hóa phân tích và Kiểm nghiệm thuốc, Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam*

³*Khoa Dược lý - Dược lâm sàng, Trường Đại học Dược Hà Nội, Hà Nội, Việt Nam*

TÓM TẮT – FCC 2026

Các sản phẩm có nguồn gốc từ dược liệu *Huperzia squarrosa* (Thạch tùng vảy) ngày càng được sử dụng phổ biến để hỗ trợ điều trị các rối loạn thần kinh và suy giảm trí nhớ, nhờ vào tác dụng ức chế acetylcholinesterase mạnh mẽ của Huperzine A (HupA) và Huperzine B (HupB), hai alkaloid thuộc nhóm lycodin. Tuy nhiên, sự tương đồng về cấu trúc và hàm lượng của HupA và HupB tương đối thấp trong dược liệu khiến việc đánh giá chính xác chúng trở nên khó khăn. Vậy nên, việc tối ưu hóa các điều kiện xử lý mẫu trong phương pháp định lượng đồng thời HupA và HupB là rất cần thiết. Mẫu bột dược liệu được acid hóa, sau đó kiềm hóa bằng amoniac, chiết xuất bằng chloroform và cô cạn với khí nitơ. Cặn thu được hòa tan trong methanol trước khi phân tích bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC) với cột C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm) ở nhiệt độ 50°C, pha động gồm methanol và đệm ammonium acetate 80 mM pH 6,0 (25:75, v/v), bước sóng phát hiện 308 nm. Các điều kiện xử lý mẫu được tối ưu hóa bằng phần mềm Modde Pro. Kết quả cho thấy hiệu suất chiết cao nhất đạt được khi acid hóa bột dược liệu bằng dung dịch acid tartaric 10%, ngâm trong 22,33 phút và chiết siêu âm một lần với nước, kiềm hóa dịch chiết và lọc chiết ba lần với chloroform. Phương pháp này đã được thẩm định về các chỉ tiêu độ đặc hiệu, khoảng tuyến tính, độ đúng, độ lặp lại và giới hạn phát hiện/giới hạn định lượng (LOD/LOQ) theo hướng dẫn của ICH và AOAC, sau đó được ứng dụng phân tích các sản phẩm *Huperzia squarrosa* thương mại. Kết quả phân tích cho thấy hàm lượng HupA và HupB lần lượt là 0,044–0,072 mg/g và 0,041–0,072 mg/g, trong đó có một mẫu nằm dưới giới hạn định lượng (LOQ). Tóm lại, phương pháp này cho phép định lượng đồng thời HupA và HupB trong *Huperzia squarrosa*, cung cấp cơ sở cho việc kiểm tra chất lượng của cả nguồn nguyên liệu dược liệu và thành phẩm.

Từ khóa: *Huperzia squarrosa*, Huperzine A, Huperzine B, tối ưu hóa quá trình chiết

*Corresponding author: Bui Thi Lan Phuong (phuongbtl@hup.edu.vn)

Hoang Nhu Quynh (hngquynh27@gmail.com)