

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

BÙI VĂN TRUNG

NGHIÊN CỨU PHÂN TÍCH
THÀNH PHẦN, CẤU TRÚC HÓA HỌC
VÀ ĐỊNH LƯỢNG HỢP CHẤT CÓ TÁC DỤNG BẢO
VỆ GAN CỦA HAI LOÀI BÀN TAY MA

Ngành: Hóa phân tích

Mã số: 9.44.01.18

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ

Hà Nội -2023

Công trình được hoàn thành tại: Học viện Khoa học và Công nghệ
- Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Người hướng dẫn khoa học 1: GS. TS. Phạm Hùng Việt

Người hướng dẫn khoa học 2: PGS.TS. Dương Hồng Anh

Phản biện 1: PGS.TS. Trần Thu Hương

Phản biện 2: PGS.TS. Lê Đình Chi

Phản biện 3: PGS.TS. Bùi Thanh Tùng

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án tiến sĩ cấp Học viện, họp tại Học viện Khoa học và Công nghệ - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam vào hồi 09 giờ 00', ngày 17 tháng 10 năm 2023

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Học viện Khoa học và Công nghệ
- Thư viện Quốc gia Việt Nam

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Bài thuốc “Bàn tay ma”, đã được GS.TS. Phạm Hùng Việt chủ trì nghiên cứu trong chương trình Phát triển Khoa học Công nghệ vùng Tây Bắc giai đoạn 2017 – 2019, gồm 3 thành phần dược liệu khô: thân cây Bàn tay ma, phần trên mặt đất cây Giảo cổ lam và thân cây Cà gai leo. Trong đó, Giảo cổ lam và Cà gai leo đã được chứng minh là có tác dụng bảo vệ gan tốt và cũng được nghiên cứu kỹ về thành phần hóa học hướng tác dụng bảo vệ gan. Vị thuốc có hàm lượng lớn nhất trong bài thuốc là Bàn tay ma, được xem là vị chủ của bài thuốc, thì chưa được nghiên cứu nhiều theo hướng tác dụng bảo vệ gan. Các công trình nghiên cứu về hai loài dược liệu này cho đến nay chỉ tập trung chủ yếu vào thành phần hóa học mà chưa nghiên cứu liên quan đến tác dụng bảo vệ gan.

Hiện nay có hai loài dược liệu cùng tên Bàn tay ma là Bàn tay ma đỏ (*Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleumer) và Bàn tay ma trắng (*Heliciopsis terminalis* (Kurz.) Sleumer) đang được dùng chữa bệnh về gan trong dân gian. Hình thái hai loài dược liệu này khá tương đồng nhau, tỷ lệ nhận biết, phân biệt được hai loại dược liệu này trong dân gian còn thấp nên việc dùng lẫn lộn giữa hai loại dược liệu này vẫn đang diễn ra. Nếu không chứng minh được các dược liệu này có tác dụng bảo vệ gan thì việc dùng như vậy có thể không những không chữa được bệnh mà còn có nguy cơ ảnh hưởng đến sức khỏe người bệnh.

Để làm sáng tỏ tác dụng bảo vệ gan của vị thuốc Bàn tay ma cũng như vai trò của nó trong bài thuốc “Bàn tay ma”, tôi thực hiện đề tài **“Nghiên cứu phân tích thành phần, cấu trúc hóa học và định lượng hợp chất có tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma”**.

2. Mục tiêu nghiên cứu của luận án

(i) Xác định được thành phần hóa học và cấu trúc của các hợp chất hữu cơ được phân lập từ hai loài Bàn tay ma bằng các phương pháp phân tích hóa lý hiện đại;

(ii) Đánh giá được tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma;

(iii) Xây dựng được quy trình định tính và định lượng được chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma có độ chính xác và độ tin cậy cao nhằm có thể áp dụng quy trình này trong thực tế.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về hai loài dược liệu *H. lobata* và *H. terminalis*

Hai loài *Heliciopsis terminalis* (Kurz) Sleumer và *Heliciopsis lobata* (Merr.) Sleumer là hai loài đặc hữu thuộc chi *Heliciopsis* Sleumer (họ Protaceae) mọc ở Việt Nam. Hai loài là *H. terminalis* và *H. lobata* được gọi với nhiều tên khác nhau. Gần đây, tên gọi Bàn tay ma được sử dụng phổ biến nhất. Sở dĩ có tên gọi là “Bàn tay ma” vì theo truyền thuyết của người Tày (Cao Bằng, Bắc Kạn), cây mọc ở các rừng thiêng, nơi an táng người chết, lá cây xẻ thùy như những bàn tay không lồ, canh giữ nơi an nghỉ của những người đã khuất. Hình thái hai loài này tương đối giống nhau, nên việc phân biệt hai loài này trong nhân dân vẫn còn nhiều khó khăn.

Trong thực tế, vì cả hai loài *H. lobata* và *H. terminalis* cùng được sử dụng làm thuốc và dùng chung tên gọi Bàn tay ma. Gần đây, nhiều nơi đã nhận ra sự khác nhau giữa hai loài này và qua đặc điểm về thực vật đặt tên cho hai loài với tên gọi dân gian khác nhau là Bàn tay mà đỏ và Bàn tay ma trắng tương ứng. Đặc điểm thực vật của hai loài này trong nhiều tài liệu vẫn chưa thống nhất mô tả để phân biệt chúng, tác dụng điều trị của hai loài vẫn chưa được chứng minh.

Việc phân biệt hai loài này cả về đặc điểm thực vật và tác dụng điều trị là cần thiết. Trong nghiên cứu gần đây của PGS.TS. Trần Văn Ôn và cộng sự tại Trường đại học Dược Hà Nội, hai loài dược liệu này đã được giám định thực vật và các tác giả đã chỉ ra một số đặc điểm quan trọng để nhận biết và phân biệt hai loài này là dược liệu Bàn tay ma đỏ có lông che chở ở thân, ngọn và lá, trong khi bộ phận này tiêu biến ở dược liệu Bàn tay ma trắng.

Nhóm chức đặc trưng nhất của hai loài chính là polyphenol, được thể hiện qua sự xuất hiện phản ứng hóa học đặc trưng của các nhóm phenyl glycosid. Tuy nhiên, chưa thấy sự trùng lặp về các chất đã công bố của các tác giả khác trong hai loài này.

Các kết quả công bố cho thấy cây Bàn tay ma trắng có nhóm chất chủ yếu là phenyl glycoside và macrocyclic glycoside. Một số hợp chất trong nhóm này có tác dụng tăng cường khả năng dung nạp glucose. Còn cây Bàn tay ma đỏ có nhóm chất chính cũng là phenyl glycoside, nhưng điển hình là các dẫn xuất arbutin. Tác dụng sinh học của các chất phân lập từ dược liệu Bàn tay ma đỏ chưa được công bố nhiều, hầu hết chỉ là tác dụng liên quan đến khả năng chống oxy hóa.

Cần có thêm các nghiên cứu về tác dụng bảo vệ gan cũng như xác định các thành phần hóa học liên quan đến tác dụng bảo vệ gan để đánh giá hiệu quả sử dụng của hai loài này trong dân gian.

1.2. Một số phương pháp đánh giá tác dụng bảo vệ gan

Tác dụng bảo vệ gan *in vivo* thường được tiến hành trên mô hình chuột cống hoặc chuột nhắt gây độc gan bằng CCl₄ hoặc paracetamol ở liều cao. Khả năng bảo vệ gan được đánh giá thông qua hình ảnh gan đại thể, vi thể và các chỉ số enzyme gan ALT, AST; ngoài ra còn có các chỉ số TBARs, GSH.

Trên mô hình *in vitro*, tác dụng bảo vệ gan đánh giá thông qua một số tác dụng liên quan đến cơ chế bảo vệ gan như chống oxy hóa (TBARs, DPPH), chống viêm, đặc biệt là khả năng bảo vệ tế bào gan dưới các tác nhân gây độc như CCl_4 hoặc paracetamol.

Các dược liệu hoặc các chất có tác dụng bảo vệ gan cũng sẽ được đánh giá độ an toàn trên mô hình độc tính cấp *in vivo*; độc tính tế bào liên quan.

1.3 Chất đánh dấu của dược liệu

Theo Tổ chức Y tế thế giới, chất đánh dấu hóa học của dược liệu là những chất đối chiếu mà được xác định thành phần về mặt hóa học của dược liệu ấy. Các tiêu chí của chất được lựa chọn là chất đánh dấu hóa học của một dược liệu sẽ gồm:

- + Là thành phần có hàm lượng đủ lớn trong dược liệu;
- + Nếu là chất đánh dấu định lượng thì phải có tác dụng đặc trưng cho tác dụng điều trị của dược liệu;
- + Nếu là chất đánh dấu định tính dược liệu thì phải đặc trưng cho dược liệu đó hoặc loài của dược liệu đó. Nếu chất đánh dấu vừa là định tính, vừa là định lượng sẽ phù hợp nhất, còn nếu không thì có thể chọn chất đánh dấu đặc trưng hơn để định tính.
- + Các chất đánh dấu hóa học nên là chất mà có khả năng đánh giá được bằng các phương pháp thông thường như TLC, HPTLC, HPLC, hoặc GC.
- + Các chất đánh dấu khác nhau có thể được lựa chọn cho cùng một dược liệu khi nó được chuẩn bị bằng các cách khác nhau hoặc theo tác dụng điều trị khác nhau của dược liệu ấy.
- + Chất đánh dấu cho một dược liệu có thể là một chất hoặc một nhóm chất đặc trưng của dược liệu.

Các chất đánh dấu của dược liệu sẽ được xây dựng phương pháp định tính, định lượng thích hợp. Các phương pháp này phải được thẩm định đầy đủ theo các hướng dẫn của ICH, AOAC international.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Phần gỗ (thân và cành) của Dược liệu Bàn tay ma trắng và dược liệu Bàn tay ma đỏ được thu hái tại huyện Bạch Thông, tỉnh Bắc Kạn vào năm 2019 và 2021; phơi khô, nghiền nhỏ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Áp dụng các phương pháp phân tích hóa lý hiện đại để xác định cấu trúc của một số hợp chất hóa học từ hai loài Bàn tay ma

Phương pháp sử dụng là siêu âm dược liệu và methanol với tỷ lệ dược liệu – dung môi là 1 : 3 ở nhiệt độ không quá 50 °C. Chiết lặp lại 03 lần, gom dung dịch sau siêu âm để cô quay loại dung môi để thu được cao chiết methanol.

Cao chiết methanol sau đó được thêm nước tạo thành hỗn dịch trong pha nước, hỗn dịch này được lần lượt chiết với các dung môi ít phân cực như n-hexan, dichloromethane và ethyl acetate. Bay hơi dung môi ở các phân đoạn dung môi để thu được cao chiết ở các pha.

Cao chiết được ở các phân đoạn được phân lập và tinh chế trên các hệ sắc ký kết hợp pha thường và pha đảo (gồm cả sắc ký cột và sắc ký lỏng điều chế). Các phân đoạn được phát hiện bằng sắc ký lớp mỏng (TLC) hoặc sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC).

Các hợp chất sau khi được tinh chế đến độ tinh khiết thích hợp, được đo phổ khối, phổ cộng hưởng từ hạt nhân, phổ CD, phổ IR để xác định cấu trúc. Cấu trúc của các chất được xác định từ các tài liệu tham khảo hoặc từ các dữ liệu phổ thu được.

2.2.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma

2.2.2.1. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của cao chiết nước hai loài Bàn tay ma

Mẫu dược liệu (thân và cành) của hai loài Bàn tay ma trắng và đỏ được nghiền nhỏ, xác định độ ẩm, chiết với nước sôi 3 lần, gộp dịch chiết và cô quay chân không để thu được cao chiết đặc và dùng để thử tác dụng bảo vệ gan ở các liều cao tương ứng với liều 60 g; 120 g và 240 g dược liệu cho người/ngày. Chuột thử nghiệm chủng Swiss. albino, gây độc gan bằng paracetamol, chứng dương là Loganin.

Các thông số đánh giá gồm hình ảnh đại phẫu gan, chỉ số men gan ALT, AST; khả năng chống oxy hóa TBARS.

2.2.2.2. Đánh giá hoạt tính bảo vệ tế bào gan trên mô hình *in vitro*

Trên mô hình *in vitro*, tác dụng bảo vệ tế bào gan của các chất được phân lập từ dược liệu được thử nghiệm trên dòng tế bào ung thư gan HepG2 khi gây độc bằng CCl₄. Chứng dương là quercetin.

2.2.2.3. Đánh giá tác dụng chống oxy hóa

Tác dụng chống oxy hóa được đánh giá dựa trên khả năng quét gốc tự do DPPH và chống lại các tác động CCl₄.

2.2.2.4. Xác định khả năng chống viêm

Khả năng chống viêm được thực hiện trên các mẫu đã xác định được là có tác dụng bảo vệ gan và có độ an toàn cao trên mô hình *in vitro*. Phép thử này được thực hiện trên mô hình gây độc dòng tế bào đại thực bào RAW264.7. Thông số đánh giá là sự ức chế sản sinh NO và khả năng phục hồi các chỉ số cytokin IL-6, IL-10 và TNF- α .

2.2.2.5. Xác định độc tính tế bào trên mô hình *in vitro*

Phương pháp đánh giá độc tính tế bào được thực hiện bằng cách cho chất nghiên cứu tiếp xúc với tế bào thử nghiệm là dòng tế bào gốc

thận ở phôi người (human embryonic kidney cells) với mã là HEK-293A. Độc tính xác định qua lượng tế bào còn sống bằng nhuộm Sulforhodamin B.

2.2.2.6. *Xác định độc tính cấp của cao chiết nước hai loài*

Độc tính cấp được đánh giá theo quy định hiện hành của Bộ Y tế và tác giả Đỗ Trung Đàm.

2.2.3. *Xây dựng phương pháp định tính, định lượng chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma*

Chất đánh dấu được xác định theo hướng dẫn của EMA, bao gồm các tiêu chí: là chất chính, đại diện cho mẫu nghiên cứu; là chất có hoạt tính bảo vệ gan và có độ an toàn tương đối cao; khả thi để định tính và định lượng bằng các phương pháp thường quy.

Trong nền dược liệu phức tạp, chất đánh dấu dự kiến sẽ được định tính và định lượng bằng phương pháp HPLC. Thảm định theo các tiêu chí hướng dẫn của AOAC, gồm: Độ đặc hiệu, độ thích hợp hệ thống, độ tuyến tính, giới hạn định lượng, độ đúng và độ lặp lại.

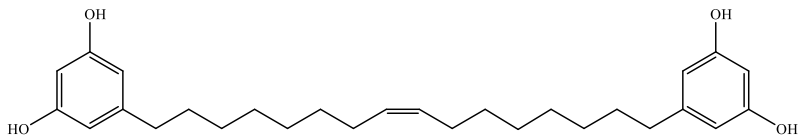
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. **Phân lập các chất từ dược liệu hai loài dược liệu Bàn tay ma**

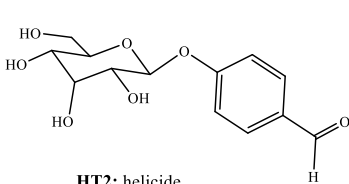
Các chất tinh khiết sau khi phân lập, tinh chế được kiểm tra hình thái, xác định các thông số phổ HR-ESI-MS và NMR để xác định cấu trúc.

3.1.1. *Các chất được phân lập từ dược liệu Bàn tay ma trắng*

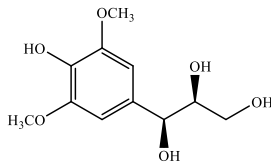
Nghiên cứu này đã xác định được 10 hợp chất từ loài *H. terminalis*. Trong đó có một hợp chất mới (**HT9**, đặt tên là helitermioside) và 09 hợp chất đã biết, nhưng đây là các hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Heliciopsis* Sleum.



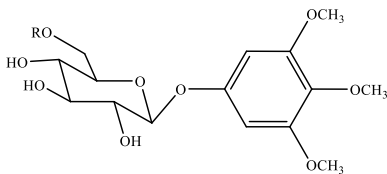
HT1: (Z)-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol)



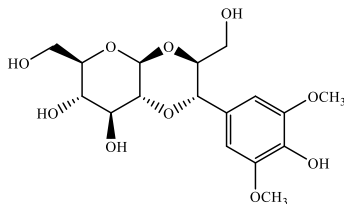
HT2: helicide



HT3: threo-syringylglycerol



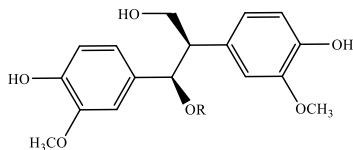
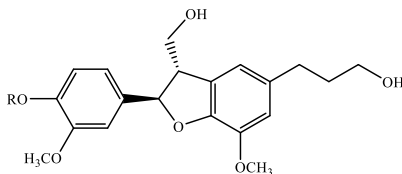
HT5 (R=H): 3,4,5-trimethoxyphenyl- β -D-glucopyranoside



HT4: ficuscarpanoside B

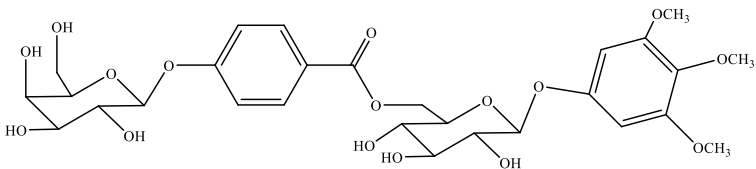
HT7 (R = Ara(f)): rhyncoside C

HT8 (R=Api): 3,4,5-trimethoxyphenyl- β -D-apiofuranosyl-(1''-6')- β -D-glucopyranoside



HT6 (R=Glu): hovetrichoside A

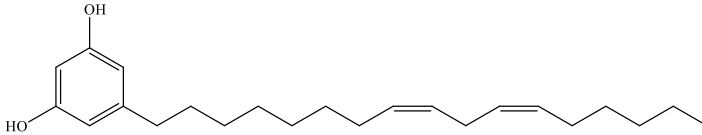
HT10: 7*R*, 8*S*-dihydrodehydrodiconeferyl alcohol 4-*O*- β -D-glucopyranoside



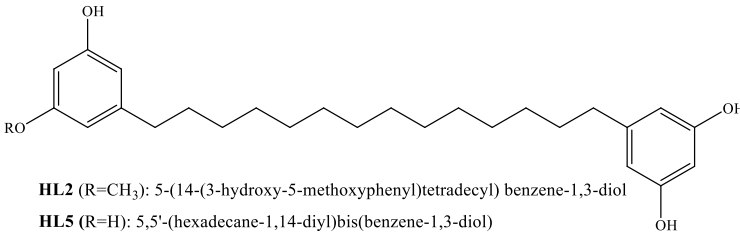
HT9: helitermioside

3.1.2. Các chất được phân lập từ dược liệu Bàn tay ma đỏ

Nghiên cứu này đã xác định được 14 hợp chất từ loài *H. lobata*. Trong đó có một hợp chất mới (**HL12**, đặt lên là helilobatoside A) và 13 hợp chất đã biết, nhưng đây là các hợp chất lần đầu tiên phân lập được từ chi *Heliciopsis* Sleum. Trong 13 hợp chất đã biết có hợp chất HL6 trùng với hợp chất HT1 ở cây Bàn tay ma trắng. Các chất này bao gồm:

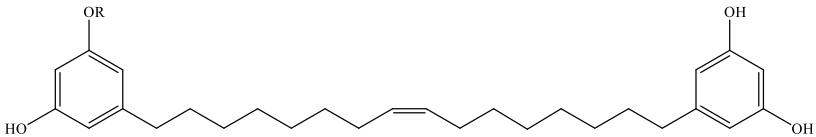


HL1: (8'Z,11'Z)-5-(heptadeca-8',11'-dienyl)benzene-1,3-diol



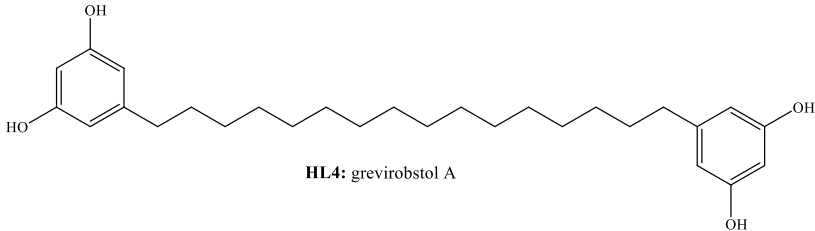
HL2 (R=CH₃): 5-(14-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)tetradecyl) benzene-1,3-diol

HL5 (R=H): 5,5'-(hexadecane-1,14-diyl)bis(benzene-1,3-diol)

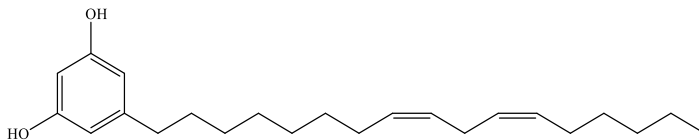


HL3 (R=CH₃): (Z)-5-(16-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)hexadec-8-en-1-yl)

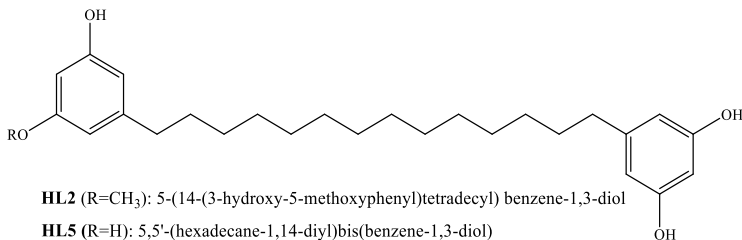
HL6 (R=H): (Z)-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol)



HL4: grevirobstol A

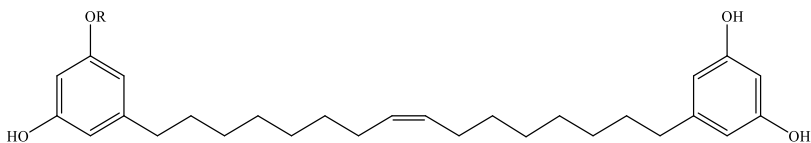


HL1: (8'Z,11'Z)-5-(heptadeca-8',11'-dienyl)benzene-1,3-diol



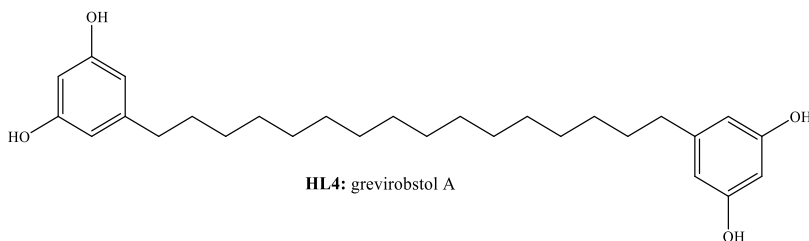
HL2 (R=CH₃): 5-(14-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)tetradecyl)benzene-1,3-diol

HL5 (R=H): 5,5'-(hexadecane-1,14-diy)bis(benzene-1,3-diol)



HL3 (R=CH₃): (Z)-5-(16-(3-hydroxy-5-methoxyphenyl)hexadec-8-en-1-yl)

HL6 (R=H): (Z)-5,5'-(hexadec-8-ene-1,16-diy)bis(benzene-1,3-diol)



HL4: grevirobstol A

3.2. Đánh giá tác dụng bảo vệ gan của các dược liệu Bàn tay ma

Các dược liệu được đánh giá tác dụng bảo vệ gan độc lập trên mô hình *in vivo*, đồng thời các chất đã được phân lập từ hai loài cũng được sàng lọc tác dụng này trên mô hình *in vitro*. Các chất có tác dụng tốt và đặc trưng cho dược liệu sẽ được lựa chọn làm chất đánh dấu.

3.2.1. Tác dụng bảo vệ gan của hai loài dược liệu Bàn tay ma trên mô hình in vivo

Sau quá trình thí nghiệm, chuột ở lô sinh lý, lô chứng dương và lô uống cao chiết dược liệu Bàn tay ma đồ liều 2 (tương đương 120 g dược liệu/người/ngày) không có chuột chết. Lượng chuột chết ở lô chứng bệnh lý là 30 %; lượng chuột chết ở lô uống cao chiết Bàn tay ma trắng thì chết ít hơn lô bệnh. Tuy nhiên ở liều 3 (tương đương 240 g dược liệu/người/ngày) thì chuột chết tới 50 %).

Các thông số chỉ được đánh giá trên lượng chuột sống ở các lô thí nghiệm.

Lượng enzyme gan ALT và AST ở lô chuột uống silymarin (Loganin), cao chiết nước của dược liệu Bàn tay ma đồ đều giảm có ý nghĩa so với chứng âm. Liều 1 và liều 2 của cao chiết nước Bàn tay ma đồ cho tác dụng tốt nhất. Dược liệu Bàn tay ma trắng hầu như không có tác dụng làm giảm các enzyme gan này. Kết quả tương tự cũng được nhận thấy trên giá trị TBARs và hình ảnh quan sát đại thể gan chuột.

Có thể thấy rằng cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đồ có tác dụng bảo vệ gan tương đối tốt, còn cao chiết dược liệu Bàn tay ma trắng chưa thể hiện tác dụng bảo vệ gan ở các liều đã thí nghiệm.

3.2.2. Tác dụng bảo vệ tế bào gan của các hợp chất phân lập từ loài Bàn tay ma trắng (*H. terminalis*) và loài Bàn tay ma đỏ (*H. lobata*)

Nhìn chung, các chất phân lập được từ dược liệu Bàn tay ma trắng tuy ít độc tính với tế bào gan HepG2, nhưng hầu như không có tác dụng bảo vệ dòng tế bào này dưới tác động gây độc của CCl₄; trong khi đó, một số chất phân lập phân cực phân lập từ dược liệu Bàn tay ma đỏ có tác dụng bảo vệ tế bào gan, mặc dù một số chất ít phân cực của dược liệu phân lập từ dược liệu này lại gây độc dòng tế bào thử nghiệm.

Như vậy, sau quá trình sàng lọc tác dụng bảo vệ gan trên mô hình *in vivo* và *in vitro* có thể khẳng định rằng dược liệu Bàn tay ma trắng chưa thể hiện tác dụng bảo vệ gan, còn dược liệu Bàn tay ma đỏ thể hiện tác dụng bảo vệ gan tương đối tốt.

Dược liệu bàn tay ma trắng và các chất phân lập từ dược liệu này sẽ không tiếp tục nghiên cứu nữa. Trong các hợp chất phân lập được từ hai dược liệu này, chỉ có hợp chất HL11 là thể hiện tác dụng bảo vệ gan tốt nhất với $EC_{50} = 95,68 \mu\text{g/ml}$.

Ở thí nghiệm đánh giá tác dụng chống oxy hóa, hợp chất HL11 có tác dụng quét gốc tự do DPPH tương đương acid ascorbic, đồng thời cũng đã thể hiện tác dụng chống lại quá trình peroxyd hóa lipid, IC_{50} cho hai mô hình tương ứng là $6,07 \pm 0,17 \mu\text{g/ml}$ và $89,55 \pm 8,26 \mu\text{g/ml}$. Các tác dụng này phù hợp với khả năng chống oxy hóa của cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ đã nghiên cứu.

Mẫu HL11 không gây độc cho tế bào đại thực bào RAW 264.7. Mẫu HL11 có khả năng ức chế tế bào đại thực bào sinh NO với IC_{50} là $76,49 \pm 2,46 \mu\text{g/ml}$. Ở nồng độ $20 \mu\text{g/ml}$ và $100 \mu\text{g/ml}$, hợp chất HL11 có khả năng làm giảm khả năng sản sinh IL-6 và tăng sản sinh IL-10, đồng thời làm tăng sinh TNF- α . Các tác động này thể hiện rõ rệt ở thời điểm 24 giờ thí nghiệm và giảm đi rất nhiều sau 48 giờ.

3.2.3. Đánh giá độc tính của dược liệu Bàn tay ma đỏ

3.2.3.1. Độc tính cấp của cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ

Liều cao nhất có thể cho chuột uống là $32,60 \text{ g cao/kg}$ thể trọng chuột (cao gấp 14 lần liều cao nhất thử tác dụng bảo vệ gan), cao chiết chưa thể hiện độc tính cấp. Có thể thấy rằng liều LD_0 (nếu có) chắc chắn sẽ lớn hơn hoặc bằng $32,60 \text{ g/kg}$ tính theo khối lượng cao chiết trên thể trọng chuột thử nghiệm.

3.2.3.2. *Đánh giá độc tính tế bào thường của hợp chất một số hợp chất phân lập từ pha nước của dược liệu Bàn tay ma đở*

Độc tính được đánh giá trên dòng tế bào HEK-293A, các mẫu thử nghiệm là mẫu nằm trong pha nước của dược liệu Bàn tay ma đở (từ HL9 – HL14).

Các mẫu HL11, HL13 và HL14 cho thấy khả năng gây độc dòng tế bào lành HEK-293A với giá trị IC_{50} trong khoảng nồng độ 16,58 – 68,29 $\mu\text{g/mL}$; các mẫu còn lại chưa thể hiện hoạt tính gây độc ở nồng độ nghiên cứu.

Theo tiêu chuẩn của Viện ung thư quốc gia Hoa Kỳ (NCI), căn chiết được coi có hoạt tính tốt với $IC_{50} \leq 20 \mu\text{g/mL}$, còn chất tinh khiết được coi có hoạt tính gây độc mạnh khi $IC_{50} \leq 5 \mu\text{M}$. Trong các mẫu nghiên cứu, mẫu HL11 có khả năng gây độc tế bào mạnh nhất với IC_{50} là $16,58 \pm 1,986 \mu\text{g/mL}$, tương ứng với $49,94 \pm 5,98 \mu\text{M}$. Nồng độ giá trị này vẫn lớn hơn nhiều so với giá trị tham chiếu, do đó hợp chất HL11, HL13 và HL14 có độc tính với tế bào thường nhưng ở mức độ chưa cao.

3.3. **Xây dựng quy trình định tính và định lượng chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma**

3.3.1. **Lựa chọn chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan từ dược liệu Bàn tay ma đở**

Hợp chất HL11 (3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside) là hợp chất được phân lập ra với lượng nhiều nhất từ pha nước của dược liệu Bàn tay ma đở. Cao chiết nước của dược liệu Bàn tay ma đở cũng chứa lượng khá lớn hợp chất này so với trong dược liệu. Hợp chất HL11 có tác dụng bảo vệ tế bào gan ở nồng độ thích hợp, nằm trong khoảng nghiên cứu, cơ chế bảo vệ gan liên quan đến khả năng chống viêm, chống oxy hóa. Ở nồng độ cao, hợp chất HL11 có gây độc tế bào gan và tế bào thường. Trong khi đó các hợp

chất HL9, HL10, HL12, HL13 và HL14 từ pha nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ mặc dù có tác dụng bảo vệ gan rất kém nhưng đều rất ít độc tính ở nồng độ cao nhất đã thử nghiệm trên dòng tế bào HepG2.

Như vậy có thể khẳng định rằng hợp chất HL11 chính là hợp chất đặc trưng cho tác dụng bảo vệ gan của dược liệu Bàn tay ma đỏ. Ngoài ra, hợp chất HL11 có vòng thơm và hấp thụ quang phổ UV ở cực đại khoảng 278 nm, đây cũng là hợp chất khá phân cực có thể phân tích bởi phương pháp HPLC nên khả thi để định lượng trong dược liệu. Đây chính là hợp chất được lựa chọn làm chất đánh dấu định hướng tác dụng bảo vệ gan cho dược liệu Bàn tay ma đỏ.

3.3.2. Xây dựng qui trình định tính 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma

Phương pháp định tính hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ là phương pháp HPLC, đánh giá sự xuất hiện của hợp chất thông qua thời gian lưu tương đối của pic mẫu thử và mẫu chuẩn.

Thẩm định phương pháp định tính hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong dược liệu được trình bày ở phần thẩm định độ đặc hiệu của phương pháp định lượng.

3.3.3. Xây dựng qui trình định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma

Tiến hành lấy khoảng 5 mg mẫu HL11 sau khi sấy cho vào các ống nghiệm riêng biệt thích hợp, thêm các thể tích tăng dần của các dung môi nghiên cứu, siêu âm 30 phút. Kết quả cho thấy hỗn hợp ethanol – nước với tỷ lệ 50 – 50 có khả năng hòa tan mẫu chất nghiên cứu tốt nhất. Hỗn hợp dung môi này sẽ được lựa chọn để làm dung môi chiết hợp chất HL11 từ mẫu dược liệu nghiên cứu, cũng như sẽ sử dụng làm dung môi để pha mẫu trong quá trình định lượng.

Sau khi nghiên cứu tính chất của hợp chất HL11, dự kiến chọn chương trình sắc ký lỏng pha đảo với pha tĩnh là cột C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m) và dung môi sẽ lựa chọn làm pha động là hệ dung môi acid H₃PO₄ 0,1 % và acetonitril với các chương trình pha động thích hợp.

Các hợp hợp chất HL9, HL10 và HL11 có cấu trúc tương tự nhau, và khi khảo sát, hợp chất HL10 và HL11 rửa giải gần nhau nhất nên hợp chất HL10 được lựa chọn làm chất đánh giá độ phân giải của hệ thống. Thể tích tiêm 5 μ l được lựa chọn để đảm bảo độ phân giải của các chất. Hợp chất HL10 và HL11 đều có độ hấp thụ cực đại khoảng 278 nm, bước sóng lựa chọn để phát hiện là 278 nm.

Mẫu được chuẩn bị bằng cách siêu âm được liệu với hỗn hợp ethanol 50 % trong nước. Sau khi khảo sát, thời gian thích hợp để siêu âm là 30 phút. Quá trình siêu âm được lặp lại 03 lần, gộp các dịch chiết để đảm bảo chiết hết HL11 trong được liệu. Tiến hành chiết thêm 03 lần nữa để kiểm tra lượng chất chiết ra thì kết quả cho thấy dịch chiết sau đó hàm lượng HL11 rất nhỏ. Vì HL11 không tan trong ethyl acetat, dùng dung môi này chiết dịch sau khi gộp và bay hơi ethanol. Theo đó đã loại được các tạp chất ít phân cực, đảm bảo an toàn cho cột sau khi phân tích cũng như giảm thời gian phân tích mẫu vì rửa tạp chất.

Sau khi khảo sát xây dựng phương pháp, qui trình định lượng HL11 đã xây dựng được như sau:

Phương pháp sắc ký lỏng (ĐDVN V, Phụ lục 5.3).

- *Điều kiện sắc ký:*

+ Cột C18 (250 x 4,6 mm; 5 μ m).

+ Pha động: kết hợp đồng thời hai dung dịch gồm acid phosphoric 0,1 % (dung dịch A) và acetonitril (dung dịch B) theo chương trình sau (Bảng 3.8):

Bảng 3.8. Chương trình pha động định lượng HL11 trong dược liệu Bàn tay ma đở

Thời gian (phút)	% dung dịch A	% dung dịch B
0	95,0 %	5,0 %
15	85,0 %	15,0 %
20	20,0 %	80,0 %
30	20,0 %	80,0 %
31	95,0 %	5,0 %
35	95,0 %	5,0 %

+ Tốc độ dòng: 1,0 ml/phút.

+ Detector: PDA đặt ở bước sóng 278 nm.

+ Thể tích tiêm: 5 μ l.

- *Chuẩn bị mẫu:*

+ Dung dịch chuẩn: Hòa tan và pha loãng mẫu chuẩn 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside trong ethanol 50 % để thu được các dung dịch có nồng độ chính xác khoảng 0,075 mg/ml.

+ Dung dịch đánh giá độ phân giải: Dung dịch chứa tachioside và 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside với nồng độ khoảng 0,5 mg/ml.

+ Mẫu thử: Cân chính xác khoảng 10 g bột dược liệu Bàn tay ma đở vào bình nón 200 ml. Thêm 100 ml ethanol 50 %, siêu âm 30 phút. Gạn lấy dịch chiết, tiếp tục thêm 100 ml ethanol 50 %, lặp lại quá trình trên thêm 2 lần. Gộp dịch chiết 3 lần, cô quay chân không ở 60 °C đến khi còn khoảng 20 ml. Chuyển vào bình chiết, tráng và thêm

nước vừa đủ khoảng 50 ml. Chiết 3 lần với ethyl acetate, loại phần ethyl acetate. Phần dịch pha nước được chuyển vào bình cô quay, tráng rửa bằng ethanol 50 %. Cô quay chân không đến cạn, để nguội. Thêm 5 ml ethanol 50 %, siêu âm 15 phút, chuyển dịch sau siêu âm vào bình định mức 25 ml. Lặp lại quá trình thêm 2 lần với cùng thể tích ethanol 50 %. Gộp dịch chiết vào bình định mức 25 ml, siêu âm thêm 15 phút. Để nguội, thêm ethanol 50 % đến vạch, lọc qua màng 0,45 μm thu được dung dịch thử.

Tiến hành sắc ký các dung dịch trên, ghi lại sắc ký đồ và thông số sắc ký.

- *Đánh giá kết quả:*

+ Độ thích hợp hệ thống: Độ phân giải của pic tachioside và pic 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside $\geq 1,5$.

+ Sắc ký đồ của mẫu thử phải cho pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside trên sắc ký đồ của mẫu chuẩn.

+ Hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside (% kl/kl) trong mẫu được liệu được tính như sau:

$$\text{HL (\%, kl/kl)} = \frac{C_{\text{chuẩn}} \times 25 \times 100 \times 100}{m_{\text{thử}} \times (100 - L)}$$

Trong đó: + Với L là độ ẩm của mẫu dược liệu (%)

+ $C_{\text{chuẩn}}$ là nồng độ mẫu chuẩn (mg/ml)

+ $m_{\text{thử}}$ là khối lượng dược liệu (mg)

3.3.4. Sơ bộ xác định hàm lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside trong mẫu HL11 đã tinh chế

Lấy lượng mẫu 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside (HL11) còn lại sau khi được phân lập và tinh chế từ dược liệu Bàn tay ma đở được nghiền mịn, sấy 24 giờ trong tủ sấy chân không có mặt P_2O_5 . Sau thời gian sấy, thu được 283 mg mẫu hợp chất HL11 để tiến hành thử nghiệm. Khi đó xem như nguyên liệu đã được sấy đến khối lượng không đổi và tồn tại dưới dạng khan. Hàm lượng chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside sẽ được đánh giá bằng phương pháp chuẩn hóa diện tích pic. Tính toán trên giá trị trung bình của 03 mẫu thử, hàm lượng của 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside trong mẫu HL11 sau khi điều chế là 96,4 % tính theo chế phẩm khan.

3.4.5. Thẩm định quy trình định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đở

Phương pháp định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đở sẽ được thẩm định theo hướng dẫn của AOAC international.

Tên chỉ tiêu	Yêu cầu	Kết quả
Độ đặc hiệu	+ Sắc ký đồ của dung dịch thử phải cho pic chính có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic hợp chất HL11. + Sắc ký đồ mẫu trắng không xuất hiện pic có thời gian lưu tương ứng với thời gian lưu của pic hợp chất HL11.	Đúng
Độ thích hợp hệ thống	+ Độ phân giải hai pic HL10 và HL11 $\geq 1,5$; + $RSD_{S_chu\grave{a}n}$ (n=6) $\leq 2,0$ %	+) Độ phân giải $R_S = 2,2$ +) $RSD_{S_chu\grave{a}n} = 0,65$ %
Độ tuyến tính	$R \geq 0,998$	Đạt ($R = 0,99995$)
Độ lặp lại	RSD hàm lượng mẫu thử (n = 6) $\leq 3,7$ %	Đạt ($RSD = 3,1$)
Độ đúng	Độ thu hồi từ 95 % đến 105 %	Đạt (97,1 % - 97,9 %)
Khoảng làm việc	Xác định dựa trên kết quả độ tuyến tính và độ đúng	0,0375 mg/ml - 0,15 mg/ml
Độ chính xác trung gian	RSD hàm lượng mẫu thử (n = 12) ≤ 6 %	Đạt (3,2 %)
Giới hạn định lượng	Xác định dựa vào thực nghiệm	0,66 $\mu\text{g/ml}$

3.3.6. Định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside trong cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ

Áp dụng phương pháp định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ đã xây dựng để định lượng hợp chất này trong cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ. Hàm lượng chất này trong cao chiết nước là 0,136 %, từ đó tính ra được hiệu suất chiết bằng phương pháp sắc thuốc truyền thống là khoảng 20 %.

KẾT LUẬN

4.1. Kết luận

Đây là công trình đầu tiên nghiên cứu song song về hai loài Bàn tay ma trồng tại Việt Nam nhằm xác định hợp chất có tác dụng bảo vệ gan của hai loài này bằng các phương pháp phân tích hóa lý, sinh học hiện đại. Từ đó xây dựng được phương pháp định tính và định lượng phù hợp giúp kiểm soát chất lượng dược liệu Bàn tay ma và các sản phẩm liên quan khi sử dụng trong nhân dân. Cụ thể, luận án thu được các kết quả chính như sau:

- **Về thành phần hóa học của hai dược liệu:** Đề tài lần đầu tiên phân lập được 10 hợp chất từ loài Bàn tay ma trắng (*H. terminalis*) và 14 hợp chất từ loài Bàn tay ma đỏ (*H. lobata*). Trong đó, hai loài có hợp chất chung là 5,5'-(hexadecane-1,16-diyl)bis(benzene-1,3-diol). Đặc biệt, trong các hợp chất đã phân lập, từ mỗi loài đã tìm được 01 hợp chất mới, được đặt tên là helitermioside (phân lập từ loài *H. terminalis*) và helobatoside A phân lập từ loài (*H. lobata*).

- **Về tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma:** Nghiên cứu cũng lần đầu tiên đánh giá tác dụng bảo vệ gan song song cả hai loài trên mô hình *in vivo* và *in vitro*. Qua đó, đã chứng minh được cả

cao chiết nước cũng như các chất đã phân lập từ loài Bàn tay ma trắng đều chưa thể hiện được tác dụng bảo vệ gan ở liều thí nghiệm, cao chiết nước dược liệu Bàn tay ma đỏ cho tác dụng bảo vệ gan tốt ở liều tương đương với liều 60 g và 120 g dược liệu cho người sử dụng trong ngày. Đồng thời từ các chất phân lập từ dược liệu này cũng sàng lọc ra được hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside (**HL11**) được phân lập từ loài Bàn tay ma đỏ là hợp chất chính và có tác dụng bảo vệ tế bào gan, chống viêm, chống oxy hóa. Tiếp đó, nghiên cứu này cũng đã chứng minh được cao chiết nước loài Bàn tay ma đỏ và một số hợp chất phân lập từ pha nước dược liệu này có độ an toàn tương đối cao. Kết quả này cung cấp minh chứng khoa học về tác dụng bảo vệ gan của hai loài Bàn tay ma đang được sử dụng tại Việt Nam, góp phần giúp các thầy thuốc và người dân sử dụng hai loài hiệu quả, đúng mục đích hơn.

- ***Xây dựng phương pháp định tính và định lượng chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan:*** Từ tác dụng bảo vệ gan của hai loài cũng như các thành phần hóa học đã phân lập được, nghiên cứu này đã sàng lọc được hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside để sử dụng làm chất đánh dấu có tác dụng bảo vệ gan của loài Bàn tay ma đỏ. Từ đó, đã xây dựng được phương pháp định tính và định lượng hợp chất **HL11** trong dược liệu Bàn tay ma đỏ bằng phương pháp HPLC detector DAD. Phương pháp định tính đã đáp ứng tất cả các yêu cầu theo hướng dẫn của ICH và AOAC international. Áp dụng phương pháp để kiểm tra hàm lượng **HL11** trong dược liệu Bàn tay ma đỏ và trong cao chiết nước của dược liệu Bàn tay ma đỏ, kết quả cho thấy trong dược liệu chứa khoảng 0,02 % và trong cao chiết chứa khoảng 0,136 % lượng **HL11** tính theo chế phẩm khan. Theo đó, phương pháp chiết nước sôi (sắc thuốc) truyền thống đạt khoảng 20 %

nếu tính theo hiệu suất chiết **HL11** từ dược liệu Bàn tay ma đỏ. Qua đây, nghiên cứu đã cung cấp thêm công cụ hữu hiệu cho công tác kiểm soát chất lượng của dược liệu Bàn tay ma cũng như các sản phẩm liên quan khi lưu hành trên thị trường.

4.2. Kiến nghị

- Kết quả luận án đã đưa ra các minh chứng khoa học chứng minh dược liệu Bàn tay ma trắng chưa thể hiện tác dụng bảo vệ gan, trong khi dược liệu Bàn tay ma đỏ thể hiện tác dụng bảo vệ gan tương đối tốt cả trên mô hình *in vivo* và *in vitro*. Do đó, cần lưu ý phân biệt hai dược liệu này khi sử dụng.

- Tiếp tục xây dựng tiêu chuẩn cơ sở cho dược liệu, cao chiết và thiết lập chất chuẩn 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranosid để sử dụng cho kiểm soát chất lượng dược liệu Bàn tay ma đỏ.

- Dược liệu Bàn tay ma đỏ có tác dụng bảo vệ gan, hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside rất đặc trưng cho các tác dụng bảo vệ gan cũng như tác dụng không mong muốn của dược liệu này. Cần tiếp tục nghiên cứu về độc tính của dược liệu Bàn tay ma đỏ và hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside để ứng dụng trong điều trị.

- Tiếp tục nghiên cứu phương án sử dụng hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside thay thế dược liệu Bàn tay ma đỏ.

- Nghiên cứu các phương pháp chiết để thu được cao với hiệu quả điều trị ổn định và hiệu quả kinh tế cao hơn dựa trên chất đánh dấu 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside. Chú ý cần đánh giá độc tính và điều chỉnh liều phù hợp khi thay đổi phương pháp chiết vì trong dược liệu này có một số chất gây độc.

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Lần đầu tiên đánh giá song song tác dụng bảo vệ gan của hai dược liệu Bàn tay ma trắng và Bàn tay ma đỏ (dược liệu là phần gỗ đã phơi khô của hai loài dược liệu này) và đã chứng minh được loài Bàn tay ma đỏ có tác dụng bảo vệ gan tốt, loài Bàn tay ma trắng chưa thể hiện tác dụng bảo vệ gan ở các liều thử nghiệm.

- Phân lập được 01 chất mới từ loài Bàn tay ma trắng, 01 chất mới từ loài Bàn tay ma đỏ. Đồng thời, 22 hợp chất đã biết khác cũng lần đầu tiên được phân lập từ chi *Heliciopsis* Sleum.

- Lần đầu tiên đánh giá và xác định được tác dụng bảo vệ gan của hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside, hợp chất này là chất đánh dấu hóa học định hướng tác dụng bảo vệ gan của dược liệu Bàn tay ma đỏ.

- Đã xây dựng được phương pháp mới, thông dụng để định tính, định lượng hợp chất 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1- β -D-glucopyranoside trong dược liệu Bàn tay ma đỏ phục vụ kiểm soát chất lượng dược liệu và các sản phẩm từ dược liệu Bàn tay ma đỏ.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ

1. Phan Minh Giang, Do Thi Thao, Nguyen Thi Nga, Bui Van Trung, Duong Hong Anh, and Pham Hung Viet, 2019, *Evaluation of the antioxidant, hepatoprotective, and anti-inflammatory activities of bisresorcinol isolated from trunk of Heliciopsis terminalis*, Pharmaceutical Chemistry Journal, 52(7).

2. Bui Van Trung, Do Thi Thao, Duong Hong Anh, Phan Van Kiem, and Pham Hung Viet, 2020, *Antioxidant and Hepatoprotective Activity of Phenyl Glycosides Isolated From Heliciopsis lobata*, Natural Product Communications, 15(8), pp. 1-7.

3. Bui Van Trung, Nguyen Thu Hang, Duong Hong Anh, Pham Hung Viet, 2022, *Evaluation of the Hepatoprotective Activity of the Wood of Heliciopsis lobata (Merr.) Sleumer*. VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences, 38(4).

4. Bui Van Trung, Duong Hong Anh, Pham Hung Viet, Phan Van Kiem, 2023, *Hepatoprotective and Antioxidant Activities of Phenolic Compounds from Heliciopsis terminalis*. Natural Product Communications, 18(5), pp. 1-4.

5. Bùi Văn Trung, Hà Thị Thu Thủy, Dương Hồng Anh, Phạm Hùng Việt, 2023, *Xây dựng qui trình định tính và định lượng 3,5-dimethoxy-4-hydroxy-1-β-D-glucopyranoside từ dược liệu Bàn tay ma đở (Heliciopsis lobata)*. Tạp chí Kiểm nghiệm thuốc, 21(80), tr. 21-27.