

MỞ ĐẦU

Tính cấp thiết của luận án

Ngày nay khi xã hội ngày càng phát triển, xu hướng sử dụng nguồn dược liệu tự nhiên nói chung, đặc biệt là các hợp chất thiên nhiên có nguồn gốc từ thực vật để phòng và chữa bệnh đang trở thành mối quan tâm hàng đầu không chỉ của ngành dược ở nước ta mà còn của các nước trên thế giới.

Bạch truật (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) là một trong 8 loài thuộc chi *Atractylodes* thuộc họ Cúc Asteraceae. Đây là một loại thảo mộc lâu năm được biết đến nhiều nhất ở Đông Á, đặc biệt là ở Trung Quốc. Hiện nay, Bạch truật được trồng khá phổ biến một số tỉnh miền núi phía Bắc ở Việt Nam. Đánh giá hóa thực vật đã chỉ ra rằng trong Bạch truật có chứa các hợp chất với các hoạt tính sinh học lý thú có tiềm năng cho việc nghiên cứu phát triển thuốc. Tuy nhiên, chỉ một số ít hợp chất này đã được thử nghiệm hoạt tính sinh học và cấu trúc tương ứng của chúng chưa được xác định đầy đủ. Ngoài ra, việc kiểm soát chất lượng của Bạch truật chưa được nghiên cứu kỹ lưỡng và thiếu đánh giá dược lý quan trọng về mối quan hệ của chúng với việc sử dụng Bạch truật theo y học cổ truyền. Để góp phần vào việc làm giàu thêm cơ sở dữ liệu khoa học về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài Bạch truật trồng tại Việt Nam, chúng tôi đề xuất đề tài “**Nghiên cứu thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài Bạch truật (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) thuộc họ Cúc (Asteraceae)**”. Kết quả nghiên cứu này sẽ là một trong những đóng góp vào kho tàng hóa học hợp chất thiên nhiên.

Mục tiêu của luận án:

Nghiên cứu thành phần hoá học và đánh giá một số hoạt tính sinh học *in vivo* của cao chiết và hợp chất phân lập được của loài Bạch truật (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) thuộc họ Cúc (Asteraceae) thu hái ở Việt Nam. So sánh sự thay đổi một số giữa các mẫu Bạch truật phiên và các mẫu Bạch truật chế biến theo phương pháp trong y học cổ truyền bằng phương pháp HPLC-DAD.

Nội dung của luận án bao gồm:

- Phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ củ Bạch truật.

- Đánh giá hoạt tính sinh học của các dịch chiết và hợp chất phân lập được từ củ Bạch truật.

- Ứng dụng phương pháp metabolomics để đánh giá sự thay đổi một số thành phần hoá học trong củ Bạch truật chế biến theo phương pháp y học cổ truyền.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN NGHIÊN CỨU

1.1. Tổng quan về loài Bạch truật

1.1.1. Giới thiệu về thực vật loài bạch truật

Bạch truật có tên khoa học là *Atractylodes macrocephala* Koidz. thuộc chi Thương truật (*Atractylodes*), bộ Cúc (Asterales), họ Cúc (Asteraceae) thuộc lớp Hai lá mầm (Eudicots), ngành Thực vật hạt kín (Angiospermatophyta). Cây có nguồn gốc từ Trung Quốc. Hiện nay, Bạch truật được trồng nhiều tỉnh miền núi phía Bắc nước ta.

Mô tả thực vật: cây ưa khí hậu khô mát, phát triển nhanh chóng ở nhiệt độ 22-28°C. Thân thẳng, đơn độc hoặc chia nhánh ở phần trên, phần dưới thân hóa gỗ, chiều cao trung bình khoảng 30-80 cm. Lá mọc cách, cuống lá phần dưới của thân dài, phần trên cuống ngắn, gốc của lá rộng. Phiến lá thường xẻ sâu ra 3 thùy, có răng cưa. Hoa phát triển và kết tụ thành chùm ở đỉnh thân. Tràng hoa có màu tím đỏ, nhụy dạng sợi chỉ dài ra bên ngoài. Tràng có hình ống, phần trên đỏ tím, phần dưới màu trắng. Quả Bạch truật thuôn, dẹt và có màu xám. Phần củ đóng vai trò là thành phần dược liệu chính, dùng làm thuốc.

1.1.2. Ứng dụng của loài Bạch truật trong y học cổ truyền

Ngoài công dụng điều chỉnh hệ tiêu hóa, hệ miễn dịch, hệ tiết niệu, nó còn có nhiều tác dụng dược lý như chống ung thư, chống viêm, chống lão hóa, chống oxy hóa, điều trị loãng xương, bảo vệ thần kinh và điều hòa miễn dịch. Phần củ Bạch truật được sử dụng trong hơn 835 chế phẩm và là một phần không thể thiếu trong hơn 4340 đơn thuốc cổ điển để điều trị các bệnh mãn tính trong y học cổ truyền Trung Quốc. Nó còn được gọi là “Baizhu” trong tiếng Trung Quốc, được ghi nhận trong dược liệu Shennong vào

thời Đông Hán, và sau đó được mô tả trong các sách y học cổ truyền khác của Trung Quốc. Bên cạnh đó, Bạch truật còn là một vị trong bài thuốc cổ truyền Trung Quốc Fangji Huangqi Tang (FHT) để điều trị viêm cầu thận mạn tính, phù tim và viêm khớp dạng thấp đã được thử nghiệm lâm sàng ở Trung Quốc.

Ở Nhật Bản, Bạch truật được dùng làm thuốc lợi tiểu và điều trị một số bệnh viêm loét, xuất huyết niêm mạc dạ dày. Ngày nay, nhân dân Nhật Bản dùng Bạch truật để tăng cường tiêu hóa, lợi tiểu, chữa đau mình mẩy, ho, đờm nhiều, buồn nôn, di mộng tinh, kiết lỵ.

Trong y học cổ truyền Hàn Quốc, Bạch truật thường được sử dụng trong lâm sàng để điều trị các bệnh về đường tiêu hóa, đau bụng, tiêu chảy, phù nề, béo phì và ra nhiều mồ hôi. Nó là một trong những thành phần chính của các loại thuốc truyền thống của Hàn Quốc như Soamsan và Boyangwhanotang, từ lâu đã được sử dụng để làm phòng chống ung thư và ngăn ngừa các bệnh mãn tính.

Ở Việt Nam, Bạch truật là một trong những vị thuốc có trong các bài thuốc nam được sử dụng để chữa viêm dạ dày cấp và mãn tính ở dạng uống, trị phong thấp, sỏi ngửa ngáy, bệnh tiêu chảy, kiết lỵ lâu ngày không khỏi. Bạch truật kết hợp với các thảo dược khác có tác dụng trị một số bệnh về gan, giúp an thai.

1.2. Tình hình nghiên cứu về loài Bạch truật

1.2.1. Các nghiên cứu về thành phần hoá học loài Bạch truật

Đã có 79 hợp chất được phân lập từ phần củ Bạch truật với thành phần hóa học vô cùng phong phú với nhiều lớp chất như benzoquinone, coumarin, flavonoid, flavonoid glycoside, phenylpropanoid, polyacetylene, polysaccharide, sesquiterpenoid, steroid, triterpenoid và nhiều hợp chất khác. Trong đó, sesquiterpenoid, polyacetylene và polysaccharide là những thành phần có hoạt tính sinh học chủ yếu của Bạch truật.

1.2.2. Các nghiên cứu về hoạt tính sinh học loài bạch truật

Atractylodes macrocephala Koidz. là một loại thảo mộc lâu năm được chứng minh có thành phần hoá học phong phú với nhiều hoạt tính sinh học lý thú như hoạt tính kháng viêm, chống oxy hóa, gây độc tế bào, tác dụng bảo vệ thần kinh, bảo vệ gan, chống béo phì...

Ngoài ra, các dịch chiết của Bạch truật còn có nhiều hoạt tính có giá trị khác như kháng nấm, kháng khuẩn, hạ đường huyết.

1.2.3. Một số nghiên cứu trong nước về loài Bạch truật

Ở Việt Nam cho đến nay mới chỉ có một vài công trình nghiên cứu về tinh dầu và tác dụng dược lý của cao chiết loài Bạch truật. Chưa có công trình nghiên cứu công bố về quy trình phân tích định lượng thành phần hóa học củ loài Bạch truật.

1.3. Một số nghiên cứu về thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của củ Bạch truật được chế biến theo các phương pháp y học cổ truyền

Các công trình nghiên cứu về củ Bạch truật chế biến theo phương pháp y học cổ truyền chủ yếu tập trung vào nghiên cứu sự thay đổi hàm lượng các chất giữa Bạch truật phiến và Bạch truật sau khi chế biến theo các phương pháp y học cổ truyền như sao với cám mật, sao với hoàng thổ. Các nghiên cứu cho thấy sau khi xử lý, đặc tính và công dụng của Bạch truật tăng lên và độc tính và tác dụng phụ có thể giảm đi.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Mẫu củ Bạch truật (*Atractylodes macrocephala* Koidz.) được thu hái tại xã Quyết Tiến, huyện Quán Bạ, tỉnh Hà Giang vào cuối tháng 5 năm 2021. Tên khoa học được xác định bởi TS. Nguyễn Thế Cường, Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu tiêu bản Hà Giang 06 được lưu giữ tại Trung tâm Nghiên cứu nông dược, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ cao.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp chế biến mẫu củ Bạch truật theo y học cổ truyền

Phương pháp chế biến bài thuốc cổ truyền được thực hiện theo Hướng dẫn của Bộ Y tế Việt Nam về phương pháp chế biến bài thuốc cổ truyền (2017)

2.2.2. Phương pháp phân lập các hợp chất

Kết hợp các phương pháp sắc ký bao gồm: sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột (CC).

2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hoá học các hợp chất

Sử dụng các phương pháp phổ hiện đại bao gồm phổ khối lượng (ESI-MS), phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS), phổ cộng hưởng từ nhân (NMR) 1 chiều và 2 chiều, độ quay cực ($[\alpha]_D$), HPLC.

2.2.4. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

- Hoạt tính quét gốc tự do DPPH được tiến hành theo phương pháp của Williams và cộng sự.

- Hoạt tính kháng viêm được đánh giá thông qua tác dụng ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW264.7 bị kích thích bởi LPS

- Hoạt tính gây độc tế bào ung thư được xác định bằng phương pháp MTT

2.2.5. Phương pháp phân tích và định lượng

Hàm lượng các hợp chất được xác định bằng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao (HPLC). Việc thu thập dữ liệu được xử lý bởi Microsoft Excel 2016 (Microsoft Corporation, USA). Thống kê tiêu chuẩn hóa và đa biến được tiến hành trong phần mềm thống kê R (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

2.2.6. Phương pháp phân tích định tính

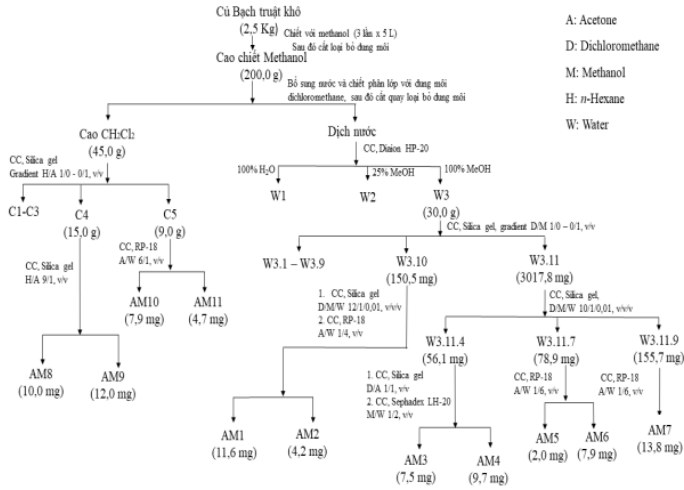
Sự có mặt của 1 số hợp chất phân lập từ củ Bạch trượng sao cảm mật được xác định bằng phương pháp HPLC trên thiết bị HPLC-DAD Agilent 1100

CHƯƠNG 3. THỰC NGHIỆM VÀ KẾT QUẢ

3.1. Phân lập các hợp chất

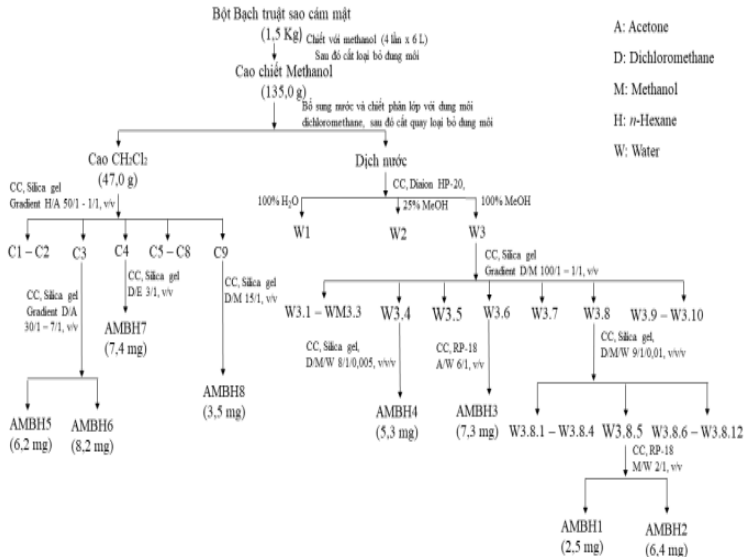
3.1.1. Phân lập các hợp chất từ mẫu củ Bạch trượng

Bằng các phương pháp sắc ký đã phân lập được 11 hợp chất theo sơ đồ sau:



3.1.2. Phân lập các hợp chất từ mẫu củ Bạch trượng sao căm mật

Bằng các phương pháp sắc ký đã phân lập được 8 hợp chất theo sơ đồ sau



3.2. Thông số vật lý và dữ liệu phổ của các hợp chất phân lập được

13 hợp chất phân lập được từ củ Bạch truật và củ Bạch truật sao cốm mật được trình bày các thông số vật lý như dạng tồn tại, màu sắc, độ quay cực riêng và các dữ liệu phổ khối lượng, phổ khối lượng phân giải cao (HR-ESI-MS), công thức phân tử, khối lượng phân tử (M).

3.3. Hoạt tính của hợp chất phân lập được

3.3.1. Kết quả thử hoạt tính quét gốc tự do DPPH

Kết quả thử hoạt tính quét gốc tự do DPPH thể hiện ở 2 bảng sau:

Bảng 3.1. Kết quả thử hoạt tính quét gốc tự do DPPH của các hợp chất phân lập từ củ Bạch truật và củ Bạch truật sao cốm mật

STT	Tên mẫu	IC ₅₀ (μM)	STT	Tên mẫu	IC ₅₀ (μM)
1	AM1	>100,00	8	AM8	>100,00
2	AM2	>100,00	9	AM9	>100,00
3	AM3	>100,00	10	AM10	>100,00
4	AM4	32,63 ± 2,78	11	AM11	17,64 ± 3,08
5	AM5	85,17 ± 2,56	12	AMBH1	74,41 ± 2,13
6	AM6	45,54 ± 3,82	13	AMBH5	56,76 ± 2,05
7	AM7	>100,00	ĐC	Ascorbic acid *	55,64 ± 4,37

Bảng 3.2. Kết quả thử hoạt tính quét gốc tự do DPPH của các cao chiết từ củ Bạch truật chế biến theo phương pháp cổ truyền

Tên mẫu	IC ₅₀ (μg/mL)
Cao chiết MeOH mẫu RA	>150,00
Cao chiết MeOH mẫu AL	115,74 ± 3,67
Cao chiết MeOH mẫu BH	>150,00
Cao chiết MeOH mẫu SO	101,43 ± 2,44
Ascorbic acid *	15,47 ± 1,78

* đối chứng dương

3.3.2. Kết quả thử hoạt tính ức chế sản sinh NO

Hoạt tính kháng viêm được đánh giá thông qua khả năng ức chế sản sinh NO trên dòng tế bào RAW264.7 thể hiện ở 2 bảng sau:

Bảng 3.3. Kết quả thử hoạt tính ức chế sản sinh NO của các hợp chất phân lập từ củ Bạch truật và củ Bạch truật sao cám mật

Tên chất	IC ₅₀ (μM) [#]	Tên chất	IC ₅₀ (μM) [#]
AM1	43,52 ± 4,08	AM8	78,48 ± 6,47
AM2	60,13 ± 5,78	AM9	48,94 ± 3,41
AM3	32,74 ± 3,22	AM10	86,14 ± 5,83
AM4	46,38 ± 4,47	AM11	42,71 ± 4,35
AM5	52,12 ± 4,85	AMBH1	>100
AM6	76,18 ± 5,75	AMBH5	>100
AM7	51,96 ± 5,81	Cardamonin *	2,14 ± 0,14

Bảng 3.4. Kết quả thử hoạt tính ức chế sản sinh NO của các mẫu cao chiết từ củ Bạch truật chế biến theo phương pháp cổ truyền

Tên mẫu	IC ₅₀ (μg/mL) [#]
Cao chiết MeOH mẫu RA	> 500
Cao chiết MeOH mẫu AL	377,16 ± 26,8
Cao chiết MeOH mẫu BH	> 500
Cao chiết MeOH mẫu SO	394,9 ± 44,3
* Cardamonin	0,78 ± 0,11

* đối chứng dương

% sống sót của tế bào ở mức trên 85% ở nồng độ 25 μM và 100 μM đối với tất cả các mẫu

3.3.3. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Kết quả đánh giá hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* trên 2 dòng tế bào ung thư ở người gồm ung thư phổi (A549) và ung thư máu (K562) được thể hiện qua bảng sau:

Bảng 3.5. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của các hợp chất phân lập từ củ Bạch truật và củ Bạch truật sao cám mật

Tên chất	IC ₅₀ (μM)		Tên chất	IC ₅₀ (μM)	
	A549	A549		A549	K562
AM1	67,6 ± 8,42	77,4 ± 5,59	AM8	28,56 ± 1,27	51,76 ± 3,45
AM2	54,3 ± 4,31	>100	AM9	>100	78,5 ± 4,29

AM3	62,5 ± 7,91	>100	AM10	>100	>100
AM4	>100	>100	AM11	>100	>100
AM5	>100	>100	AMBH1	>100	>100
AM6	>100	>100	AMBH5	>100	>100
AM7	>100	84,7 ± 6,13	Camptothecin*	0,76 ± 0,09	0,98 ± 0,11

Bảng 3.6. Kết quả thử hoạt tính gây độc tế bào của các cao chiết từ củ Bạch truật chế biến theo phương pháp cổ truyền

STT	Tên mẫu	IC ₅₀ (µg/mL)	
		A549	K562
1	Cao chiết MeOH mẫu RA	78,97 ± 6,45	>100
2	Cao chiết MeOH mẫu AL	64,57 ± 5,75	80,21 ± 7,16
3	Cao chiết MeOH mẫu BH	>100	>100
4	Cao chiết MeOH mẫu SO	77,45 ± 9,18	>100
	Camptothecin *	0,26 ± 0,03	0,34 ± 0,04

* đối chứng dương

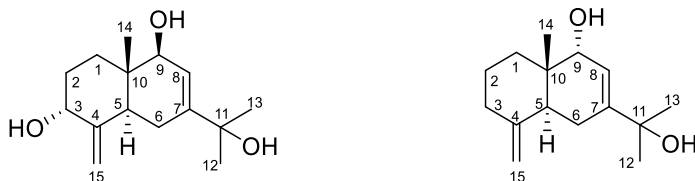
Bạch truật phiến (RA), Bạch truật ngâm chích rượu (AL), Bạch truật sao căm mật (BH), Bạch truật sao hoàng thổ (SO)

CHƯƠNG 4. THẢO LUẬN VÀ KẾT QUẢ

4.1. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập được

4.1.1. Các hợp chất phân lập từ mẫu củ Bạch truật

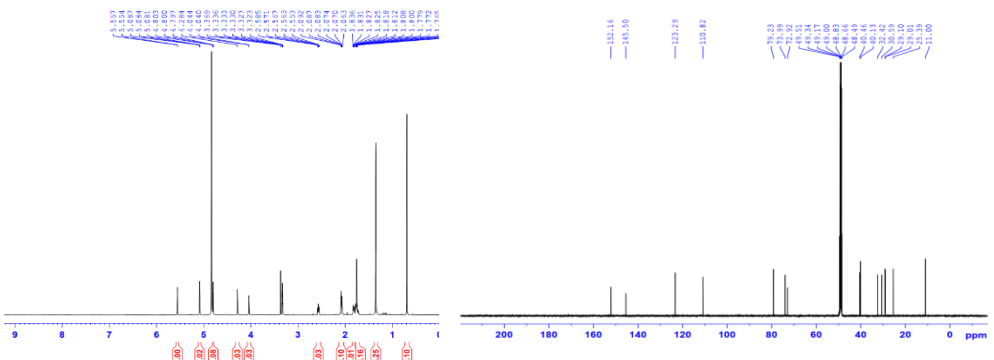
Hợp chất AM1: eudesma-4(15),7-diene-3α,9β,11-triol



Hình 4.1. Cấu trúc hoá học của hợp chất AM1 và hợp chất tham khảo

Hợp chất **AM1** phân lập được dưới dạng chất rắn, không màu. Từ phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS của hợp chất **AM1** thu được pic ion giả phân tử tại m/z 251,1645 $[M-H]^-$ (tính toán lý thuyết cho công thức $[C_{15}H_{23}O_3]^-$, 251,1647), kết hợp với dữ liệu phổ ^{13}C NMR cho phép xác định công thức phân tử của hợp chất **AM1** là $C_{15}H_{24}O_3$. Phổ 1H NMR của hợp chất **AM1** xuất hiện hai tín hiệu exomethylene tại δ_H 5,08 (1H, t, $J = 1,5$ Hz, H_a-15) và δ_H 4,80 (1H, t, $J = 1,5$ Hz, H_b-15) và một proton olefinic tại δ_H 5,55 (1H, d, $J = 1,5$ Hz, H-8), tín hiệu đặc trưng của khung eudesmane. Ngoài ra, phổ 1H NMR của hợp chất **AM1** còn xuất hiện hai proton oxymethine tại δ_H 4,28 (1H, br s, H-3) và δ_H 4,04 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-9) cùng với ba nhóm methyl tại δ_H 0,69 (3H, s, H-14), 1,34 (3H, s, H-13), 1,35 (3H, s, H-12).

Phổ ^{13}C NMR và phổ HSQC của **AM1** có sự xuất hiện của 15 tín hiệu carbon, trong đó có 4 carbon không liên kết với hydro (tại δ_C 152,1, 145,5, 40,4 và 72,9), ba nhóm methyl (tại δ_C 29,1, 29,0 và 11,0), bốn nhóm methylene (tại δ_C 32,4, 30,6, 25,4 và 110,8), bốn nhóm methine (tại δ_C 74,0, 40,1, 123,3 và 79,2). Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **AM1** cho thấy có sự tương đồng với dữ liệu của hợp chất eudesma-4(15),7-diene-9 α ,11-diol (Bảng 4.1), là hợp chất sesquiterpene có dạng khung eudesmane đã được phân lập từ loài *Atractylodes lancea* trong các nghiên cứu trước đây.



Hình 4.2. Phổ ^1H NMR và ^{13}C NMR của hợp chất **AM1**

Bảng 4.1. Số liệu phổ NMR của hợp chất **AM1** và hợp chất tham khảo

C	$^{\#}\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{C}}^{\text{a,b}}$	$\delta_{\text{H}}^{\text{a,c}}$ (độ bội, $J = \text{Hz}$)
1	78,9	32,4	1,78 m
2	31,5	30,6	1,83 m/1,77 m
3	34,2	74,0	4,28 s
4	148,7	152,1	-
5	41,9	40,1	2,56 dd (9,0, 2,0)
6	28,8	25,4	2,08 m
7	75,6	145,5	-
8	26,3	123,3	5,55 d (1,5)
9	32,1	79,2	4,04 d (2,0)
10	39,8	40,4	-
11	75,5	72,9	-
12	24,8	29,1	1,35 s
13	24,8	29,0	1,34 s
14	9,1	11,0	0,69 s
15	106,7	110,8	5,08 (t, 1,5, $\text{H}_{\text{a}}\text{-15}$) 4,80 (t, 1,5, $\text{H}_{\text{b}}\text{-15}$)

$^{\text{a}}\text{CD}_3\text{OD}$, $^{\text{b}}125 \text{ MHz}$, $^{\text{c}}500 \text{ MHz}$, $^{\#}\delta_{\text{C}}$: số liệu của 4(15)-eudesmene-1 β ,7,11-triol đo trong CDCl_3 , 100 MHz.

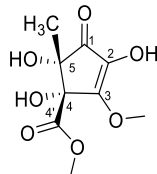
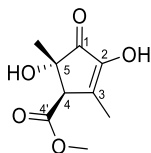
Phổ ^1H ^1H COSY của hợp chất **AM1** cho thấy tương tác của các proton gắn với hai carbon cạnh nhau của H-1 (δ_{H} 1,78)/ H-2 α (δ_{H} 1,83), H-2 β (δ_{H} 1,77)/ H-3 (δ_{H} 4,28), H-5 (δ_{H} 2,56)/ H-6 (δ_{H} 2,08) và H-8 (δ_{H} 5,55)/ H-9 (δ_{H} 4,04). Từ các phân tích dữ liệu phổ trên xác nhận hợp chất này là một sesquiterpene loại eudesmane. Phổ HMBC của hợp chất **AM1** cho thấy tương tác của H-15 α (δ_{H} 5,08) và H-15 β (δ_{H} 4,80) với C-3 (δ_{C} 74,0)/C-4 (δ_{C} 152,1)/C-5 (δ_{C} 40,1), và của H-12 (δ_{H} 1,35) cùng với H-13 (δ_{H} 1,34) với C-7 (δ_{C} 145,5), C-11 (δ_{C} 72,9) đã chứng minh sự gắn kết của nhóm exomethylene ($\text{CH}_2\text{-15}$) và propan-2-ol-2-yl tại C-4 và C-7 tương ứng. Bên cạnh đó, sự tương tác của H-14 (δ_{H} 0,69) với C-1 (δ_{C} 32,4)/C-5 (δ_{C} 40,1)/C-9 (δ_{C} 79,2) chứng minh nhóm methyl ($\text{CH}_3\text{-14}$) liên kết tại C-10. Dữ liệu phổ NMR của hợp chất **AM1** có nhiều hơn một nhóm hydroxyl (ở vị trí C-3) so với hợp chất eudesm-4(15),7-diene-9 α ,11-diol đã công bố.

Giá trị hằng số J rất nhỏ tại H-3 (br s) đặc trưng cho các tương tác proton *equatorial-axial* và *equatorial-equatorial* của H-2 với H-3. Bên cạnh đó, hằng số J của H-5 (dd, $J = 9,0, 2,0$ Hz) chứng minh tương tác của các proton ở vị trí *axial-axial* và *axial-equatorial* của H-5 và H-6. Ngoài ra, trên phổ NOESY xuất hiện tương tác giữa H-5 (δ_H 2,56) với H-9 (δ_H 4,04) nhưng không xuất hiện tương tác của H-5 và H-14 cho thấy cấu dạng *trans* của khung eudesmane. Tín hiệu cộng hưởng của H-14 tại (δ_H 0,69) chứng tỏ nhóm methyl của C-14 có cấu hình β tương tự như các hợp chất sesquiterpenes khung eudesmane từ các loài thuộc chi *Atractylodes*. Từ những phân tích dữ liệu phổ ở trên và so sánh với tài liệu tham khảo của hợp chất 4(15)-eudesmene-1 β ,7,11-triol tương tự đã công bố, có thể xác định hợp chất **AM1** là một hợp chất mới, được đặt tên là eudesma-4(15),7-diene-3 α ,9 β ,11-triol.

Từ củ Bạch truật phiên đã phân lập được 11 hợp chất, trong đó 2 hợp chất mới là **AM1** (eudesma-4(15),7-diene-3 α ,9 β ,11-triol), **AM2** (eudesma-4(15),7-diene-1 β ,3 α ,9 β ,11-tetraol) có khung eudesmane. Các hợp chất đã biết **AM3-AM11** thuộc các nhóm khung khác nhau.

4.1.2. Xác định cấu trúc các hợp chất phân lập từ mẫu củ Bạch truật sao căm mật

Hợp chất AMBH1: methyl (4R, 5S*)-2,5-dihydroxy-3,5-dimethyl-4-oxocyclopent-2-ene-1-carboxylate (hợp chất mới)*



AMBH1

(4*S*,5*S*)-2,4,5-trihydroxy-3-methoxy-4-methoxycarbonyl-5-methyl-2-cyclopenten-1-one

Hình 4.3. Cấu trúc hoá học của hợp chất **AMBH1** và hợp chất tham khảo

Hợp chất **AMBH1** thu được ở dạng dầu, màu vàng. Công thức phân tử $C_9H_{12}O_5$ xác định dựa trên dữ liệu phổ khối phân giải cao HR-ESI-MS với mảnh ion giả phân tử tại m/z 223,0578 $[M+Na]^+$, tương

cyclopenten-1-one có thể xác định cấu trúc phẳng của hợp chất **AMBH1**. Cấu hình tương đối tại vị trí C-4 và C-5 của **AMBH1** được xác định qua tương tác NOE giữa H-4 với proton của nhóm 5-CH₃ và tương tác NOE giữa proton của 5-OH và nhóm methoxy được thể hiện trên phổ ROESY. Nhóm 5-OH và nhóm carboxylate tại C-4 có cấu dạng *cis*- trong cấu trúc của hợp chất **AMBH1** có sự khác biệt so với hợp chất tham khảo khi hai nhóm thế này ở vị trí *trans*-. Sự sai khác cũng được thể hiện qua khác biệt về độ chuyển dịch hoá học của C-5 giữa hai hợp chất này (Bảng 4.2). Do đó, có thể xác định hợp chất **AMBH1** là methyl (4*R**, 5*S**)-2,5-dihydroxy-3,5-dimethyl-4-oxocyclopent-2-ene-1-carboxylate. Đây là một hợp chất mới, sinh ra trong quá trình sao tằm Bạch truyệt, lần đầu tiên được phát hiện.

Bảng 4.2. Số liệu phổ NMR của hợp chất **AMBH1**
và hợp chất tham khảo

C	[#] δ _C ^{a,b}	δ _C ^{a,b}	δ _H ^{a,c} độ bội (<i>J</i> = Hz)
1	197,95	201,1	-
2	132,96	138,5	-
3	157,68	149,5	-
4	81,97	-	3,56, s
5	78,15	-	-
3-CH ₃	-	13,0	1,92, d (1,2)
5-CH ₃	22,2	25,7	1,38 s
4'	171,13	170,9	-
4'-OCH ₃	52,06	51,9	3,65 s

^aAcetone-d₆, ^b150 MHz, ^c600 MHz, [#]δ_C: số liệu của hợp chất (4*S*,5*S*)-2,4,5-trihydroxy-3-methoxy-4-methoxycarbonyl-5-methyl-2-cyclopenten-1-one đo trong (CD₃)₂SO

Từ củ Bạch truyệt sao cảm mật đã xác định được cấu trúc của 8 hợp chất, trong đó có 1 hợp chất mới **AMBH1** (methyl (4*R**, 5*S**)-2,5-dihydroxy-3,5-dimethyl-4-oxocyclopent-2-ene-1-carboxylate). Các hợp chất đã biết **AMBH2** - **AMBH8**, trong đó 6 hợp chất giống với hợp chất đã phân lập được từ củ Bạch truyệt và một hợp chất khác là **AMBH5**

4.2. Đánh giá hoạt tính sinh học các hợp chất phân lập được

4.2.1. Hoạt tính quét gốc tự do DPPH

Các hợp chất **AM4-AM6**, **AM11**, **AMBH1**, **AMBH5** thể hiện hoạt tính chống oxy hoá DPPH với giá trị IC_{50} trong khoảng 17,64 – 85,17 μM , trong đó hợp chất **AM11** thể hiện hoạt tính tốt nhất với giá trị IC_{50} bằng $17,64 \pm 3,08 \mu\text{M}$ so với chất đối chứng dương. Các hợp chất còn lại thể hiện hoạt tính yếu đến không có hoạt tính. Các mẫu cao chiết methanol của Bạch truật chế biến theo các phương pháp y học cổ truyền được thử nghiệm đều cho hoạt tính yếu (mẫu **AL** và mẫu **SO**) hoặc không có hoạt tính (mẫu **RA** và mẫu **BH**).

4.2.2. Hoạt tính ức chế sản sinh NO

Sau khi các hợp chất được thử nghiệm ở các nồng độ khác nhau để xác định giá trị IC_{50} . Kết quả cho thấy, các hợp chất đều thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO trên tế bào RAW264.7 yếu với giá trị IC_{50} trong khoảng 32,74 - 86,14 μM , riêng 2 hợp chất **AMBH1** và **AMBH5** không thể hiện hoạt tính này. Các mẫu cao chiết tổng của Bạch truật thể hiện hoạt tính ở mức độ yếu (**AL** và **SO**) và không có hoạt tính (**RA** và **BH**)

4.2.3. Hoạt tính gây độc tế bào ung thư

Các hợp chất **AM1-AM3**, **AM8-AM10** đều thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở mức độ trung bình với dòng ung thư phổi với giá trị IC_{50} trong khoảng 28,56 – 67,6 μM và thể hiện khả năng gây độc yếu trên dòng ung thư máu với giá trị IC_{50} trong khoảng 51,76 – 84,7 μM . Các mẫu cao chiết MeOH của củ Bạch truật chế biến theo các phương pháp y học cổ truyền đều thể hiện khả năng gây độc ở mức độ yếu đến không có hoạt trên cả 2 dòng tế bào ung thư thử nghiệm.

4.3. Phân tích và định lượng thành phần của các mẫu Bạch truật được chế biến theo các phương pháp y học cổ truyền

4.3.1. Tối ưu hóa điều kiện phân tích

Kết quả phân tích trên hệ thống HPLC-DAD với điều kiện phân tích đã được tối ưu hóa được biểu diễn trên sắc kí đồ phù hợp để phân tích đồng thời 6 chất tham chiếu là **AM4**, **AM5**, **AM8**, **AM9**, **AM10**, **AM11**. Đây là 6 hợp chất được phân lập được từ củ Bạch truật và Bạch truật sao cảm mật.

4.3.2. Thiết lập đường chuẩn, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)

Các giá trị được trình bày trong bảng dưới đây:

Bảng 4.3. Phương trình đường chuẩn, giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ) của các chất tham chiếu

Chất tham chiếu	Phương trình đường chuẩn	Hệ số tương quan R ²	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
AM4	$y = 6,4907x - 13,9640$	0,9996	0,2442	0,7399
AM5	$y = 5,8912x - 5,8315$	0,9997	0,3270	0,9909
AM8	$y = 30,5416x - 30,7566$	0,9995	0,0628	0,1902
AM9	$y = 27,8722x - 30,7026$	0,9997	0,1541	0,4671
AM10	$y = 12,1393x - 9,5048$	0,9996	0,5355	1,6227
AM11	$y = 1,1595x - 1,3971$	0,9990	0,8570	2,5969

Các phương pháp đều có hệ số tương quan R² > 0,999 và các giá trị LOD (trong khoảng từ 0,1 đến 0,9 µg/mL) và LOQ (từ 0,2 đến 2,6 µg/mL) ở mức rất thấp nên đảm bảo độ tuyến tính và độ nhạy để tiến hành định lượng.

4.3.3. Độ chụm và độ chính xác

Độ chụm (CV%) trong ngày và trong 3 ngày liên tiếp dao động trong khoảng 0,6 đến 7,8%. Độ chụm cao nhất đối với hợp chất AM11 tại nồng độ 5 µg/mL, lần lượt là 4,6% và 7,8%. Độ đúng của các chất phân bố trong khoảng 96,0% và 104,8% với sai số nhỏ hơn 6,0%. Từ bảng kết quả có thể thấy, phương pháp định lượng đã xây dựng có độ chụm và độ đúng ở trong giới hạn cho phép của FDA đảm bảo đánh giá đúng hàm lượng các chất tham chiếu trong các mẫu thử nghiệm.

Bảng 4.4. Độ chụm và độ đúng intra-day và inter-day của các chất tham chiếu

Tên	Nồng độ (µg/mL)	Độ chụm (n=6)		Độ đúng (n=6)	
		(CV%)		(% độ thu hồi ± sai số)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
AM4	5	3,9	3,6	100,4 ± 1,6	101,0 ± 2,6
	40	2,0	3,5	99,7 ± 0,6	99,6 ± 1,2
	100	0,8	1,1	99,5 ± 0,6	99,5 ± 0,6

Tên	Nồng độ ($\mu\text{g/mL}$)	Độ chụm (n=6)		Độ đúng (n=6)	
		(CV%)		(% độ thu hồi \pm sai số)	
		Intra-day	Inter-day	Intra-day	Inter-day
AM5	5	2,7	4,2	104,8 \pm 5,4	101,7 \pm 4,8
	40	2,0	1,9	98,5 \pm 3,1	100,3 \pm 3,1
	100	0,4	2,0	98,8 \pm 2,1	98,5 \pm 2,1
AM8	5	2,0	4,4	99,4 \pm 2,3	98,7 \pm 4,5
	40	1,6	2,3	99,1 \pm 1,4	99,6 \pm 3,3
	100	0,6	0,8	98,5 \pm 1,1	99,0 \pm 1,5
AM9	5	2,5	3,0	98,2 \pm 2,6	97,9 \pm 3,2
	40	2,5	2,3	98,1 \pm 1,7	97,5 \pm 2,9
	100	1,1	1,2	98,9 \pm 1,2	99,2 \pm 1,5
AM10	5	3,1	3,3	97,9 \pm 4,1	99,4 \pm 3,5
	40	2,2	1,9	98,6 \pm 1,7	97,0 \pm 3,4
	100	1,0	0,8	98,6 \pm 0,9	99,5 \pm 1,2
AM11	5	4,6	4,9	96,0 \pm 6,0	97,7 \pm 5,7
	40	3,3	3,4	97,4 \pm 1,9	98,4 \pm 2,0
	100	3,6	3,2	98,2 \pm 1,7	99,6 \pm 2,2

4.3.4. Kết quả định lượng và thống kê đa biến

Hàm lượng của AM4, AM5 và AM11 dao động trong khoảng 7,8 $\mu\text{g/g}$ và 88,6 $\mu\text{g/g}$ thì hàm lượng của các sesquiterpenes (AM8, AM9, AM10) dao động trong khoảng giá trị lớn hơn, từ 80,7 $\mu\text{g/g}$ đến 588,5 $\mu\text{g/g}$.

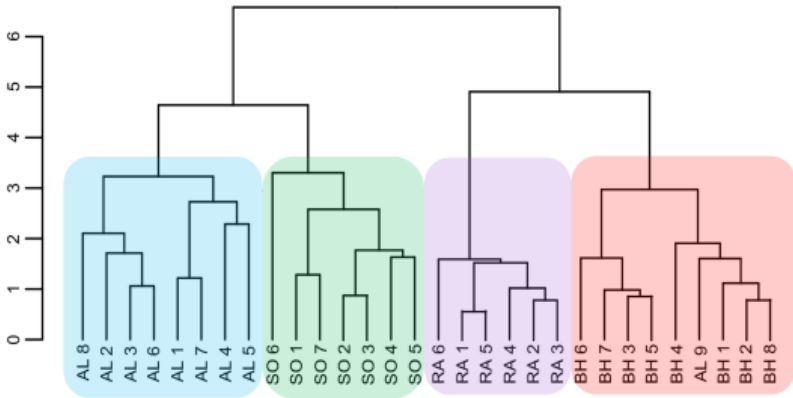
Bảng 4.5. Hàm lượng 6 chất tham chiếu trong các mẫu Bạch truật

Phương pháp chế biến	Tên mẫu	AM5	AM11	AM4	AM10	AM9	AM8
Bạch truật phiến khô	RA 1	8,5 \pm 0,7	28,0 \pm 2,8	16,3 \pm 1,8	184,9 \pm 18,1	118,7 \pm 11,2	97,5 \pm 11,6
	RA 2	11,0 \pm 1,1	43,1 \pm 3,0	18,6 \pm 2,2	196,5 \pm 15,1	132,6 \pm 15,6	110,3 \pm 11,8
	RA 3	8,3 \pm	42,6 \pm	12,6 \pm	220,5 \pm	139,1 \pm	121,8 \pm

		0,6	3,5	1,3	26,5	15,5	13,5
	RA 4	11,6 ± 1,3	31,8 ± 3,6	14,9 ± 1,6	211,4 ± 25,1	167,3 ± 13,2	126,5 ± 9,9
	RA 5	7,8 ± 0,9	23,3 ± 2,5	13,2 ± 1,6	156,9 ± 18,1	112,3 ± 12,7	80,7 ± 7,2
	RA 6	10,3 ± 1,3	38,6 ± 3,9	24,7 ± 3,0	163,9 ± 13,8	128,5 ± 13,8	97,4 ±9,0
Bạch truyệt ngâm chích rượu	AL 1	35,0 ± 3,9	54,9 ± 6,1	20,5 ± 1,9	297,0 ± 22,2	240,2 ± 20,8	197,8 ± 14,9
	AL 2	62,7 ± 6,2	69,2 ± 7,3	36,4 ± 3,7	312,4 ± 22,2	221,1 ± 21,8	209,0 ± 19,3
	AL 3	53,6 ± 4,9	61,6 ± 5,5	32,8 ± 2,7	262,4 ± 23,6	149,2 ± 14,1	204,4 ± 25,4
	AL 4	40,6 ± 4,2	53,2 ± 6,4	25,9 ± 3,2	313,5 ± 27,6	191,5 ± 20,1	341,8 ± 35,1
	AL 5	36,0 ± 4,1	87,2 ± 8,7	30,0 ± 2,7	261,2 ± 26,9	251,5 ± 27,9	298,3 ± 21,9
	AL 6	55,9 ± 4,1	59,5 ± 5,8	37,0 ± 2,9	230,5 ± 25,7	190,4 ± 17,7	185,4 ± 16,7
	AL 7	41,2 ± 4,7	55,8 ± 6,4	20,4 ± 1,7	262,0 ± 32,1	274,8 ± 26,8	248,3 ± 18,8
	AL 8	34,1 ± 4,1	66,7 ± 5,0	34,1 ± 3,8	311,7 ± 33,3	227,0 ± 26,0	198,8 ± 20,7
	AL 9	40,7 ± 4,7	37,6 ± 3,8	39,4 ± 3,1	319,2 ± 24,9	191,9 ± 17,8	209,7 ± 19,0
Bạch truyệt sao hoàng thổ	SO 1	35,5 ± 3,5	80,5 ± 6,1	39,3 ± 3,5	489,7 ± 35,1	274,5 ± 26,0	185,4 ± 20,0
	SO 2	41,8 ± 4,2	70,7 ± 7,1	35,1 ± 2,6	495,7 ± 49,4	246,0 ± 21,3	150,4 ± 15,6
	SO 3	40,4 ± 4,0	74,5 ± 8,0	36,7 ± 3,0	545,6 ± 45,1	220,4 ± 26,2	121,4 ± 14,5

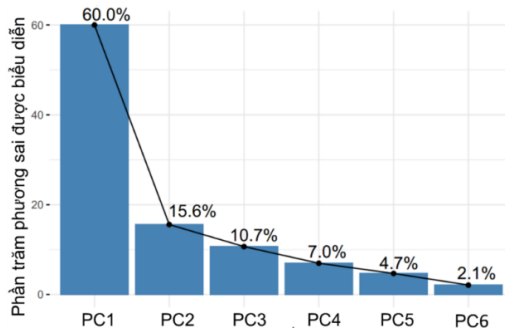
	SO 4	42,1 ± 5,1	88,7 ± 7,1	41,7 ± 3,2	395,1 ± 45,9	202,6 ± 23,4	149,3 ± 16,3
	SO 5	33,4 ± 2,6	79,5 ± 7,6	29,9 ± 2,2	388,5 ± 32,6	218,2 ± 22,1	124,4 ± 14,5
	SO 6	47,5 ± 3,4	58,5 ± 5,2	24,3 ± 1,8	588,5 ± 60,7	253,7 ± 22,1	182,1 ± 18,2
	SO 7	37,5 ± 3,2	80,5 ± 8,7	37,6 ± 2,8	369,0 ± 39,2	272,9 ± 27,4	219,2 ± 18,8
Bạch truyệt sao cám mật	BH 1	30,5 ± 2,8	31,6 ± 3,2	31,6 ± 3,1	361,9 ± 45,0	184,3 ± 19,6	184,3 ± 18,4
	BH 2	27,0 ± 3,1	38,8 ± 4,4	35,8 ± 3,9	351,8 ± 41,0	167,4 ± 17,4	150,0 ± 13,4
	BH 3	32,7 ± 3,3	29,7 ± 2,8	29,7 ± 2,4	303,8 ± 37,2	142,7 ± 16,8	135,7 ± 10,1
	BH 4	23,6 ± 2,5	39,5 ± 2,9	39,5 ± 3,3	244,4 ± 23,2	155,1 ± 13,2	143,3 ± 10,4
	BH 5	25,1 ± 2,2	28,6 ± 2,4	28,6 ± 2,9	358,3 ± 32,4	123,6 ± 14,9	119,2 ± 11,5
	BH 6	17,5 ± 1,6	25,2 ± 2,1	25,2 ± 2,9	325,2 ± 25,4	179,5 ± 21,9	170,6 ± 15,2
	BH 7	25,3 ± 2,0	25,0 ± 2,9	25,0 ± 2,4	268,1 ± 29,5	128,3 ± 16,0	110,9 ± 8,7
	BH 8	21,0 ± 2,5	38,1 ± 4,8	38,1 ± 3,4	365,4 ± 33,0	196,5 ± 21,0	165,1 ± 16,8

Trên sơ đồ cây HCA cho thấy các mẫu Bạch truyệt có thể được chia thành bốn nhóm riêng biệt tương ứng với bốn quy trình xử lý. Ngoại lệ duy nhất là mẫu **AL9**, thay vì nằm trong nhóm **AL**, lại được tìm thấy trong nhóm mẫu **BH**.



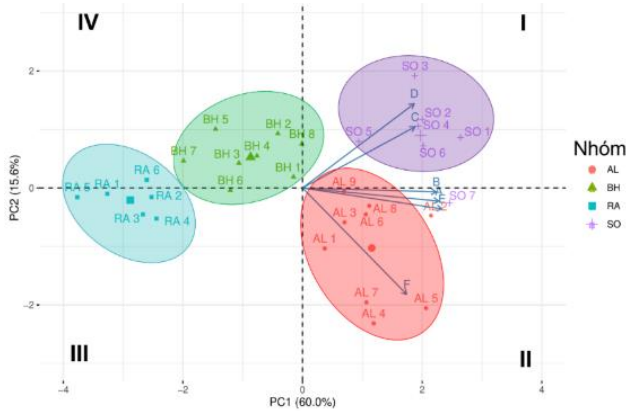
Hình 4.5. Biểu đồ cây của các mẫu Bạch truật dựa trên hàm lượng các chất chuyển hóa được định lượng.

Từ hình 4.6 cho thấy tổng tỉ lệ phần trăm phương sai được giải thích trên PC1 và PC2 đạt gần 80% nên có thể sử dụng hai PC này để biểu diễn và phân tích toàn bộ dữ liệu.



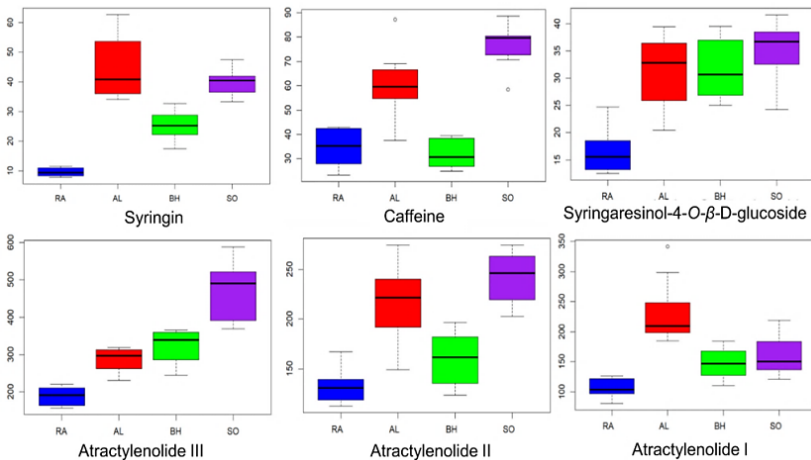
Hình 4.6. Biểu đồ sụt giảm phương sai của các thành phần chính

Từ hình 4.7 dưới đây cho thấy nhóm **BH** nằm ở góc phần tư IV, đối diện với vị trí góc phần tư II, của nhóm **AL** và vector đại diện là **AM8** (F). Do đó, **AM8** (F) được coi đồng thời là chất chỉ thị dương và chất chỉ thị âm của lần lượt các nhóm mẫu **AL** và **BH**.



Hình 4.7. Biểu đồ kép PCA của các mẫu Bạch trà với các chất tham chiếu

Biểu đồ Hình 4.8 cho thấy **AM4**, **AM5**, **AM11** có thể được sử dụng làm chất đánh dấu để phân biệt các mẫu Bạch trà phiên (**RA**) và Bạch trà chế biến bằng phương pháp ngâm chích rượu (**AL**), sao hoàng thổ (**SO**), sao cám mật (**BH**)



Hình 4.8. Biểu đồ hộp của hàm lượng các chất tham chiếu trong các nhóm mẫu Bạch trà

KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học

- Từ củ Bạch truật phiên đã phân lập và xác định được cấu trúc 11 hợp chất (**AM1-AM11**). Trong đó, 2 hợp chất mới **AM1** (eudesma-4(15),7-diene-3 α ,9 β ,11-triol), **AM2** (eudesma-4(15),7-diene-1 β ,3 α ,9 β ,11-tetraol) và 9 hợp chất đã biết (**AM3-AM11**).

- Từ củ Bạch truật được chế biến theo phương pháp y học cổ truyền là sao cám mật đã phân lập và xác định được 8 hợp chất. Trong đó, 2 hợp chất khác so với củ Bạch truật phiên là **AMBH1** (methyl (4*R**, 5*S**)-2,5-dihydroxy-3,5-dimethyl-4-oxocyclopent-2-ene-1-carboxylate) (chất mới), **AMBH5** (methyl (*E*)-4-[5-(hydroxymethyl) furan-2-yl]but-3-en-2-one) và 6 hợp chất giống với các hợp chất phân lập được từ mẫu Bạch truật phiên (**AM4, AM5, AM8-AM11**)

Kết quả nghiên cứu về hoạt tính sinh học

- Hoạt tính quét gốc tự do DPPH: **AM11** thể hiện hoạt tính quét gốc mạnh nhất với giá trị IC_{50} bằng $17,64 \pm 3,08 \mu M$. Các hợp chất còn lại thể hiện hoạt tính chống oxy hóa ở mức trung bình hoặc không thể hiện hoạt tính.

- Hoạt tính kháng viêm được đánh giá thông qua khả năng ức chế sản sinh NO trong đại thực bào RAW264.7 được kích thích bởi LPS: các hợp chất đều có hoạt tính yếu với giá trị IC_{50} trong khoảng 32,74 - 86,14 μM . Riêng 2 hợp chất **AMBH1** và **AMBH5** không thể hiện hoạt tính này.

- Hoạt tính gây độc tế bào ung thư trên dòng tế bào ung thư phổi (A549) và dòng tế bào ung thư máu (K562): **AM8** thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ở mức độ trung bình với giá trị $IC_{50} = 28,56 \pm 1,27 \mu M$ trên dòng tế bào A549. Các hợp chất còn lại thể hiện hoạt tính yếu đến không có hoạt tính trên 2 dòng tế bào ung thư này.

Ở cả 3 phương pháp thử nghiệm hoạt tính trên, các mẫu cao chiết MeOH của củ Bạch truật chế biến theo các phương pháp y học cổ truyền đều thể hiện hoạt tính yếu đến không có hoạt tính

Kết quả nghiên cứu về phân tích và định lượng các hợp chất trong các mẫu Bạch truật được chế biến theo y học cổ truyền

- Đã xây dựng phương pháp phân tích định lượng đồng thời 6 hoạt chất trong các mẫu Bạch truật bằng kỹ thuật HPLC-DAD.

- Đã phân biệt và xác định một số chất chỉ thị cho các mẫu Bạch truật được chế biến theo các phương pháp y học cổ truyền: **AM4**, **AM5**, **AM11** có thể được sử dụng làm chất đánh dấu để phân biệt các mẫu Bạch truật phiên (**RA**) và Bạch truật chế biến bằng phương pháp ngâm chích rượu (**AL**), sao hoàng thổ (**SO**), sao cám mật (**BH**).

NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Phân lập và xác định được 2 hợp chất mới từ củ Bạch truật phiên: **AM1** (eudesma-4(15),7-diene-3 α ,9 β ,11-triol) và **AM2** (eudesma-4(15),7-diene-1 β ,3 α ,9 β ,11-tetraol)

- Phân lập và xác định được 1 hợp chất mới từ củ Bạch truật sao cấm mật theo phương pháp y học cổ truyền là **AMBH1** (methyl (4*R**, 5*S**)-2,5-dihydroxy-3,5-dimethyl-4-oxocyclopent-2-ene-1-carboxylate)

- Đây là nghiên cứu đầu tiên về sự biến đổi của các hợp chất syringaresinol-4'-*O*- β -D-glucoside (**AM4**), syringing (**AM5**), atractylenolide I (**AM8**), atractylenolide II (**AM9**), atractylenolide III (**AM10**), caffeine (**AM11**) do phương pháp chế biến được liệu thường dùng (sao cấm mật, ngâm chích rượu, sao hoàng thổ) được kết hợp với phân tích thống kê đa biến để phân biệt và xác định các thành phần hóa học đặc trưng của các nhóm mẫu.