

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC

VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



PHẠM THỊ NGỌC MAI

**NGHIÊN CỨU HÓA HỌC, HOẠT TÍNH SINH HỌC CỦA LOÀI
ELSHOLTZIA WINITIANA CRAIB. VÀ XÂY DỰNG CHỈ TIÊU HOÁ LÝ ĐẶC TRƯNG
CHO SẢN PHẨM “MẬT ONG BẠC HÀ HÀ GIANG”**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hoá học các hợp chất thiên nhiên

Mã số: 9.44.01.17

Hà Nội – Năm 2025

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. Người hướng dẫn 1: TS. Cầm Thị Ính – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam
2. Người hướng dẫn 2: GS.TS. Trần Đình Thắng – Trường Đại học Công nghiệp Thành phố Hồ Chí Minh

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

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 ... giờ ... , ngày ... tháng ... năm ...

Có thể tìm hiểu luận án tại:

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

DANH MỤC CÁC BÀI BÁO ĐÃ XUẤT BẢN LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

BÀI BÁO QUỐC TẾ:

1. “Optimization of The Essential Oils Extraction Process from Dong Van Marjoram (*E. winitiana* var. *dongvanensis* Phuong.) by Using Microwave Assisted Hydrodistillation and Its Bioactivities against Some Cancer Cell Lines and Bacteria”; *Natural Product Communications*; Volume 16(10): 1–8.
2. “Compositional Comparison of Essential Oils Extracted from Flowers and Aerial Parts of *Elsholtzia winitiana* var. *dongvanensis* Phuong Harvested in Ha Giang Province, Vietnam”; *Asian Journal of Chemistry*; Vol. 32; No. 10(2020); 2438-2442.

BÀI BÁO TRONG NƯỚC:

3. “Các hợp chất triterpenoid từ phần trên mặt đất cây Bạc Hà Đồng Văn (*Elsholtzia winitiana* var. *dongvanensis* Phuong) ở vùng Cao nguyên đá Đồng Văn, tỉnh Hà Giang; *Tuyển tập Hội thảo nghiên cứu và phát triển các sản phẩm tự nhiên lần thứ 7 (RDNP 2020)*; Thành phố Hồ Chí Minh, 5-6 tháng 12, 2020; tr. 69-74.
4. “Các hợp chất Flavonoid từ phần trên mặt đất cây Bạc Hà Đồng Văn (*Elsholtzia winitiana* var. *dongvanensis* Phuong)”; *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, tập 26, số 1/2021, tr. 108-111.
5. “Những hợp chất Flavonoid từ hoa cây Bạc Hà Đồng Văn (*Elsholtzia winitiana* var. *dongvanensis* Phuong) ở Việt Nam”; *Tạp chí phân tích Hóa, Lý và Sinh học*, tập 26, số 3A/2021, tr. 54-57.

GIẢI PHÁP HỮU ÍCH:

“PHƯƠNG PHÁP TRUY XUẤT NGUỒN GỐC MẬT ONG SỬ DỤNG CHỈ DẤU HÓA HỌC” -
Được chấp nhận đơn hợp lệ tháng 12/2022

MỞ ĐẦU

1. Tính cấp thiết của luận án

Cao nguyên đá Đồng Văn – cao nguyên đá hùng vĩ nhất ở Việt Nam, mang trong mình những giá trị mọi mặt về: địa chất, địa mạo, cảnh quan - thẩm mỹ, văn hóa lịch sử và nguồn tài nguyên thiên nhiên... Là một trong những vùng đá vôi đặc biệt của cả nước, nằm ở độ cao 1000 – 1700m so với mặt nước biển, cao nguyên đá Đồng Văn thực sự có sức thu hút đặc biệt đối với du khách và những nhà nghiên cứu bởi những dấu ấn tiêu biểu về lịch sử phát triển, các di sản địa chất, địa mạo có tính chất độc đáo mang tầm cỡ khu vực và quốc tế. Bên cạnh đó, thiên nhiên đã ban tặng cho Cao nguyên đá Đồng Văn nhiều cảnh quan hùng vĩ, những danh lam thắng cảnh đặc sắc, hệ sinh thái đa dạng phong phú và đặc hữu, bao gồm trong số đó nhiều nhóm động thực vật quý hiếm. Đặc biệt hơn, điều kiện tự nhiên ở vùng Cao nguyên đá Đồng Văn lại rất thuận lợi với nghề sản xuất mật ong – một sản phẩm địa phương nổi tiếng đã được Cục sở hữu trí tuệ cấp Giấy chứng nhận đăng kí chỉ dẫn địa lý.

Mật ong vùng cao nguyên đá Đồng Văn được loài ong chủ yếu hút mật từ hoa của một loài cây mọc hoang dại nở rộ từ tháng 7 đến tháng 12 (đồng bào thường hay gọi là cây bạc hà đá) – tên khoa học là *Elsholtzia winitiana* Craib.. Đây là loài thực vật hầu như chỉ tìm thấy trên vùng cao nguyên đá Đồng Văn, tỉnh Hà Giang. Chúng tôi cho rằng, đây chính là nguồn gốc làm nên những tính chất quý báu của mật ong vùng cao nguyên đá Đồng Văn, một sản phẩm không những có lợi cho sức khỏe mà còn có nhiều đặc tính biệt được quý. Loài cây nguồn mật nơi đây đáp ứng được các điều kiện nhất định để tạo nên hương vị ngọt mát dịu, màu sắc từ vàng đỏ đến vàng chanh, không bị đổi màu theo thời gian đặc biệt duy nhất chỉ có ở mật ong vùng Cao nguyên đá Đồng Văn.

Xuất phát từ cơ sở trên, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu sâu hơn về thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của loài cây nguồn mật (cây bạc hà đá - *Elsholtzia winitiana* Craib.), tìm hiểu mối liên hệ hóa học giữa mật ong và loài cây nguồn mật, đánh giá giá trị loài cây nguồn mật và sản phẩm mật ong đặc thù của vùng Cao nguyên đá Đồng Văn là rất cần thiết và có ý nghĩa về mặt khoa học cũng như thực tiễn. Vì vậy, chúng tôi đã lựa chọn loài *Elsholtzia winitiana* Craib. làm đối tượng nghiên cứu cho đề tài: ***“Nghiên cứu hóa học, hoạt tính sinh học của loài *Elsholtzia winitiana* Craib. và xây dựng chỉ tiêu hoá lý đặc trưng cho sản phẩm “mật ong bạc hà Hà Giang”***.

2. Mục tiêu của luận án

- Nghiên cứu hoá học và hoạt tính sinh học của loài *Elsholtzia winitiana* Craib. trên vùng cao nguyên đá Đồng Văn, tỉnh Hà Giang
- Nghiên cứu mối tương quan giữa loài cây nguồn mật (*Elsholtzia winitiana* Craib.) và sản phẩm mật ong bạc hà Hà Giang
- Xây dựng một số chỉ tiêu hoá lý đặc trưng cho sản phẩm “mật ong bạc hà Hà Giang”.

3. Nội dung của luận án

- Phân tích thành phần hoá học và đánh giá hoạt tính sinh học tinh dầu của loài *Elsholtzia winitiana* Craib.
- Nghiên cứu thành phần hóa học căn chiết ethyl acetate của phần hoa bạc hà
- Nghiên cứu thành phần hóa học căn chiết ethyl acetate của phần thân – lá
- Xây dựng một số chỉ tiêu hóa lý đặc trưng cho mật ong bạc hà Hà Giang, xác định liên kết chỉ dấu hóa học giữa mật ong bạc hà Hà Giang và cây nguồn mật chính *Elsholtzia winitiana* Craib.

4. Cơ sở khoa học và thực tiễn của đề tài

- Đánh giá tính khoa học và thực tiễn thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của cây nguồn mật (*Elsholtzia winitiana* Craib.) và sản phẩm mật ong bạc hà Hà Giang có giá trị khai thác thương phẩm qua các số liệu phân tích thành phần hóa học và thử nghiệm sàng lọc sinh học.
- Tăng cường sự hợp tác quốc tế trong nghiên cứu, tăng công bố trên các tạp chí quốc tế có uy tín.
- Cung cấp nguồn nguyên liệu nuôi trồng, phân tích thành phần hóa học, đánh giá hoạt tính sinh học, định hướng khai thác nguồn nguyên liệu này phục vụ trong ngành y dược và mỹ phẩm.
- Cung cấp cơ sở khoa học trong việc truy xuất nguồn gốc mật ong bằng chỉ dấu hóa học áp dụng với sản phẩm mật ong bạc hà Hà Giang và xây dựng một số chỉ tiêu hóa lý đặc trưng.

5. Những đóng góp mới của luận án

- Là nghiên cứu đầu tiên khảo sát toàn diện tinh dầu phần thân lá và hoa loài *Elsholtzia winitiana* Craib.
- Luận án đã xây dựng được khung phân tích tích hợp (HS-SPME/GC-MS, Raman, TLC/HPTLC) để xác thực nguồn gốc mật ong dựa trên chỉ dấu hoá học, có khả năng triển khai ở cấp độ phòng thí nghiệm.
- Luận án đã thiết lập được ma trận marker cây ↔ mật ong, liên kết hợp chất đặc trưng của thực vật nguồn mật với hồ sơ hoá học của mật ong (đỉnh GC-MS, tín hiệu Raman, bản đồ TLC) và xác định ngưỡng phát hiện thực nghiệm.
- Luận án đã chuẩn hóa được một số tiêu chí thẩm định phương pháp (LOD/LOQ, độ lặp lại, độ thu hồi) nhằm

bảo đảm độ tin cậy, khả năng tái lập và so sánh.

- Bước đầu xây dựng SOP sàng lọc – khẳng định, đồng thời đề xuất bộ tiêu chí phục vụ quản lý chỉ dẫn địa lý/ chứng nhận chất lượng góp phần phòng chống gian lận nguồn gốc cho sản phẩm mật ong bạc hà Hà Giang.

6. Cấu trúc của luận án

Luận án gồm 140 trang đánh máy với 4 sơ đồ, 33 bảng, 15 hình. Phân bổ cụ thể như sau: Mở đầu 03 trang, tổng quan 41 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 20 trang, kết quả và thảo luận 64 trang, kết luận và kiến nghị 03 trang, danh mục các công trình đã công bố 01 trang, tài liệu tham khảo 08 trang

NỘI DUNG CHÍNH CỦA LUẬN ÁN

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

Bao gồm sáu phần: Phần 1. Bối cảnh và ý nghĩa của nghiên cứu; Phần 2. Sơ lược về chi *Elsholtzia*; Phần 3. Thành phần hóa học của chi *Elsholtzia*; Phần 4. Hoạt tính sinh học; Phần 5. Tổng quan về loài Kinh giới dày (*Elsholtzia winitiana* Craib.); Phần 6. Tổng quan về mật ong.

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Loài *Elsholtzia winitiana* Craib. tên thường gọi là Bạc hà đá (Kinh giới dày) thu tại huyện Đồng Văn, tỉnh Hà Giang vào tháng 11 năm 2019 và được TS. Nguyễn Quốc Bình (Bảo tàng thiên nhiên Việt Nam - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam) xác định tên khoa học, tiêu bản lưu tại Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tất cả các mẫu mật ong thường được thu thập từ các nhà sản xuất chính gốc tại một số địa phương trong nước. Trong đó, 9 mẫu mật ong bạc hà được thu thập tại các điểm thu mật ở huyện Đồng Văn, Mèo Vạc, Quản Bạ thuộc vùng Cao nguyên đá Đồng Văn, tỉnh Hà Giang vào các thời điểm khác nhau trong năm 2022.

2.2. Phương pháp nghiên cứu.

2.2.1. Phương pháp xử lý và chiết mẫu

Các mẫu thực vật sau khi thu hái được thái nhỏ, phơi trong bóng mát, sấy khô ở nhiệt độ 50oC đến khối lượng không đổi, sau đó đem nghiền nhỏ. Mẫu được ngâm chiết 3 lần trong dung môi methanol có kết hợp siêu âm và gia nhiệt ở nhiệt độ 50oC, mỗi lần chiết cách nhau 2 ngày. Dịch tổng thu được đem cất loại dung môi dưới áp suất giảm, nhiệt độ nhỏ hơn 50oC thu được cao tổng methanol. Tiếp đó, cao methanol được chiết phân bố lần lượt với các dung môi có độ phân cực tăng dần n-hexane, ethyl acetate, butanol và nước. Loại bỏ dung môi dưới áp suất thấp thu được cặn n-hexane, cặn ethyl acetate, cặn butanol và cặn nước tương ứng.

2.2.2. Phương pháp phân lập các hợp chất từ mẫu cây

Việc phân tích và phân tách các thành phần từ dịch chiết của cây được thực hiện bằng các phương pháp sắc ký khác nhau như sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký cột thường (CC) với pha tĩnh là silica gel (Merck), sắc ký cột pha đảo với pha tĩnh là YMC RP 18 (Merck), diaion, sắc ký rây phân tử với pha tĩnh là sephadex LH-20 (Merck) và sắc ký lỏng HPLC điều chế.

2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học

Sử dụng các phương pháp phổ hiện đại đồng thời kết hợp phân tích, tra cứu tài liệu tham khảo để xác định cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được. Các thiết bị và phương pháp sử dụng gồm:

- Điểm nóng chảy (Mp): Điểm nóng chảy được đo trên máy Kofler-microhotstage của Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

- Phổ khối lượng (MS): Phổ khối ion hóa bụi electron (ESI-MS) được đo trên máy AGILENT 1100 LC-MSD ion Trap spectrometer. Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS được đo trên máy GILENT 6550 iFunnel Q - TOF LC/MS system

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): Phổ NMR được đo trên máy Bruker avance 500 MHz (chất nội chuẩn là TMS). Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng bao gồm: Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: ¹H-NMR, ¹³C-NMR và DEPT. Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC, HMBC, COSY, NOESY, ROESY. Dung môi được sử dụng bao gồm: DMSO-*d*₆, CD₃OD, CDCl₃. Việc lựa chọn dung môi đo phụ thuộc vào bản chất của từng mẫu, theo nguyên tắc dung môi phải hòa tan hoàn toàn mẫu đo.

2.2.4. Phương pháp chiết tách và phân tích thành phần hoá học trong tinh dầu

2.2.4.1. Phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước dùng bộ cất tinh dầu vi lượng

2.2.4.2. Phương pháp chưng cất tinh dầu bằng lôi cuốn hơi nước có sự hỗ trợ của vi sóng

2.2.4.3. Phương pháp phân tích thành phần hóa học tinh dầu

Phân tích thành phần hoá học các loại tinh dầu được thực hiện trên thiết bị sắc ký khí GC Agilent Technologies HP7890A nối ghép với detector khối phổ (MS) Agilent Technologies HP5975C và detector ion hoá ngọn lửa (FID). Thiết bị của Viện Hoá học các Hợp chất thiên nhiên, VAST.

Điều kiện sắc ký khí nối ghép detector khối phổ (GC-MSD): Cột mao quản HP5-MS (60 m x 0,25 mm x 0,25

μm), khí mang: He. Inlet: 250°C, chia dòng 100:1, inject volume: 1 μl , chương trình nhiệt độ (60°C – 240°C, tăng 4°C / phút), năng lượng ion hoá 70 eV, quét mảnh từ 35–450 m/z.

Điều kiện sắc ký khí nối ghép detector ion hoá ngọn lửa (GC-FID): Cột mao quản HP5-MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm), khí mang: He. Inlet: 250°C, chia dòng 100:1, inject volume: 1 μl , chương trình nhiệt độ (60°C – 240°C, tăng 4°C / phút), khí make up N_2 , khí đốt O_2 và H_2 .

Chỉ số khoá thời gian lưu (Retention index – RI): Được sử dụng để quy đổi thời gian lưu giữ thành hằng số không phụ thuộc vào các điều kiện sắc ký. Mẫu hỗn hợp chuẩn C7-C30 được phân tích trong điều kiện sắc ký khí nối ghép khối phổ (GC-MSD), điều kiện phân tích giống như mẫu tinh dầu. Chỉ số RI của một chất là thời gian lưu được nội suy từ các ankan liền kề thực hiện trên phần mềm Massfinder 4.0.

Cách tiến hành phân tích: Tinh dầu được pha loãng 3% trong MeOH, sau đó bơm vào bộ phận inlet, tại đây tinh dầu được hoá hơi và được đưa vào cột sắc ký. Quá trình hấp phụ và giải hấp xảy ra trên cột sắc ký, các chất được giải hấp ra dựa vào nhiệt độ bay hơi, chất có nhiệt độ bay hơi thấp giải hấp ra trước, chất có nhiệt độ bay hơi cao giải hấp ra sau. Khi các chất ra khỏi cột sắc ký tiếp tục được đưa đến detector khối phổ (MS) hoặc detector ion hoá ngọn lửa (FID).

Nhận diện thành phần các chất trong tinh dầu: So sánh khối phổ của các chất thu được bằng sắc ký nối ghép detector khối phổ (GC-MSD) với thư viện phổ HPCH1607, W09N08, NIST chemistry WebBook và kết hợp với chỉ số khoá thời gian lưu (Retention index – RI).

Định lượng các chất trong tinh dầu: Dựa vào diện tích pic của các chất thu được bằng sắc ký khí nối ghép detector ion hoá ngọn lửa (GC-FID). Hàm lượng (%) của một chất trong tinh dầu là phần trăm diện tích pic của chất đó so với tổng diện tích các chất bay hơi.

2.2.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học

2.2.5.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào theo phương pháp MTT

❖ Nguyên liệu

Dòng tế bào: Hep-G2 (Hepatocellular carcinoma - TB ung thư gan); A549 (Human lung adenocarcinoma epithelial cells - TB ung thư phổi); PC-3 (Human Prostate Adenocarcinoma – TB ung thư tuyến tiền liệt).

Môi trường nuôi cấy tế bào: Tế bào được nuôi cấy ở 37°C, CO_2 5% trong môi trường phù hợp: DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium, Sigma-Aldrich, USA) hoặc RPMI 1640 (ThermoFisher, Waltham, CHLB Đức) có bổ sung L-glutamine 2mM, kháng sinh (Penicillin + Streptomycin sulfate) và huyết thanh bê 5-10%, MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfo-phenyl)-2H-tetrazolium).

❖ Phương pháp tiến hành

Sử dụng phương pháp so màu MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) để đánh giá ảnh hưởng của các chất lên sự sống sót của các tế bào ung thư bao gồm HepG2, PC3 và A549 nêu trên. Dịch tế bào sau đó được nhỏ lên phiên vi lượng 96 giếng (1.5 x 10⁵ tế bào/giếng), ủ với các mẫu thử ở dải nồng độ từ 100→6,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ đối với mẫu cao chiết hoặc 50→1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (μM) đối với chất tinh sạch, mỗi nồng độ lặp lại 3 lần. Ellipticine hoặc Paclitaxel (Taxol) trong DMSO được dùng làm chất chuẩn dương tính (+). Sản phẩm chuyển hóa dạng tinh thể formazan được hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) và đo mật độ quang ở $\lambda = 540/720 \text{ nm}$ trên thiết bị Infinite F50 (Tecan, Männedorf, Thụy Sĩ).

Khả năng ức chế sự tăng sinh tế bào ung thư ở nồng độ nhất định của chất thử tính theo % so với đối chứng được tính theo công thức.

2.2.5.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định

Hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định được tiến hành để đánh giá hoạt tính kháng sinh của các mẫu chiết được thực hiện trên phiên vi lượng 96 giếng (96-well microtiter plate) theo phương pháp hiện đại của McKane & Kandel (1996). Các thử nghiệm được thực hiện tại Viện Hóa học các hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

2.2.6. Phương pháp phân tích thành phần mật ong

2.2.6.1. Phân tích một số chỉ tiêu hóa lý đánh giá chất lượng mật ong bạc hà Hà Giang (Tiêu chuẩn Dược điển IV)

Các chỉ tiêu định lượng	Các chỉ tiêu định tính
Chỉ số acid (mili đương lượng/kg)	Tạp chất

Đường khử tự do (%)	Tinh bột và dextrin
Hàm lượng thủy phần (%)	Saccarin
Hàm lượng tro sulfat(%)	Đường tráo nhân tạo
Hàm lượng HMF (ppm)	Sulfat
	Clohydrit
	Vết rỉ sắt

2.2.6.2. Phương pháp phân tích phổ Raman để xác định tính chất đặc thù của mật ong bạc hà Hà Giang.

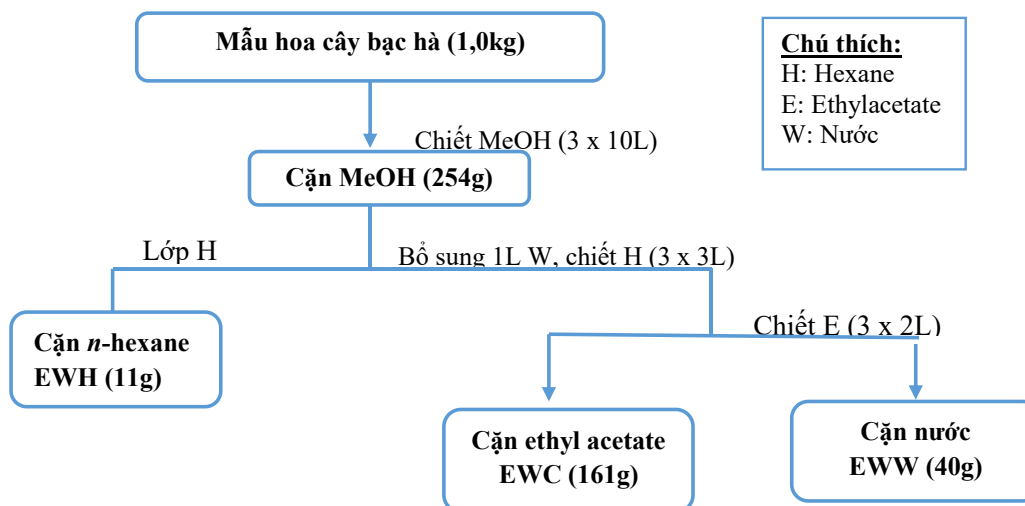
Các kết quả phân tích phổ Raman đã được thu ở nhiệt độ phòng bằng cách sử dụng Spectrometer Raman JASCO NRS-3300 với một bộ cảm biến CCD và ánh sáng kích thích tại bước sóng 785 nm từ laser diode. Để ghi lại các phổ trong khoảng từ 300–1500 cm^{-1} , thiết bị sử dụng ống kính Olympus UMPLFL 20X, khe hở 0.1×6 mm, lưới phân tán 600 l/mm, và số sóng tâm tại 1150 cm^{-1} . Mỗi phổ được thu thập với thời gian chiếu sáng là 100 giây và tối thiểu ba lần quét, dữ liệu sau đó được phân tích bằng phần mềm OriginPro 2017. Quy trình tiền xử lý áp dụng cho tất cả các phổ Raman, bao gồm việc chuẩn hóa dữ liệu bằng OriginPro 2017.

2.3. Thực nghiệm

Phần thực nghiệm được thực hiện như trong phương pháp đã nêu ở nội dung trước.

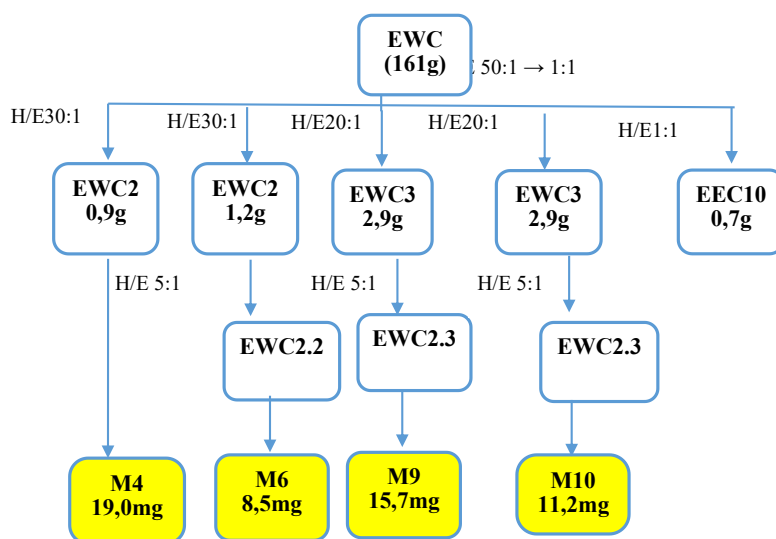
2.3.1. Phân lập các hợp chất từ phần hoa của cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.)

2.3.1.1. Dịch chiết từ hoa của cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.)



Sơ đồ 2.1. Sơ đồ thu nhận dịch chiết từ phần hoa của cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.)

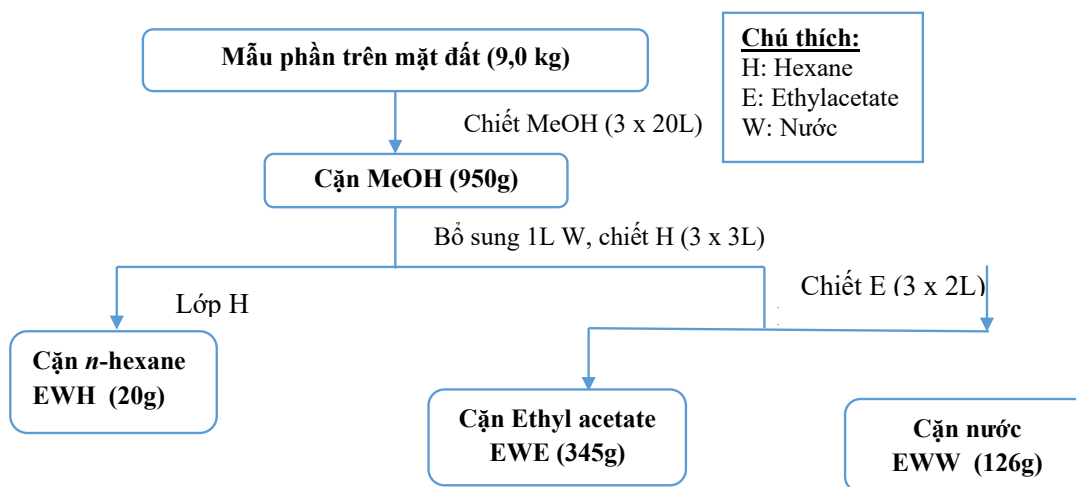
1.3.1.2. Phân lập các hợp chất từ hoa của cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.)



Sơ đồ 2.2. Sơ đồ phân lập cặn ethyl acetate của phần hoa cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.)

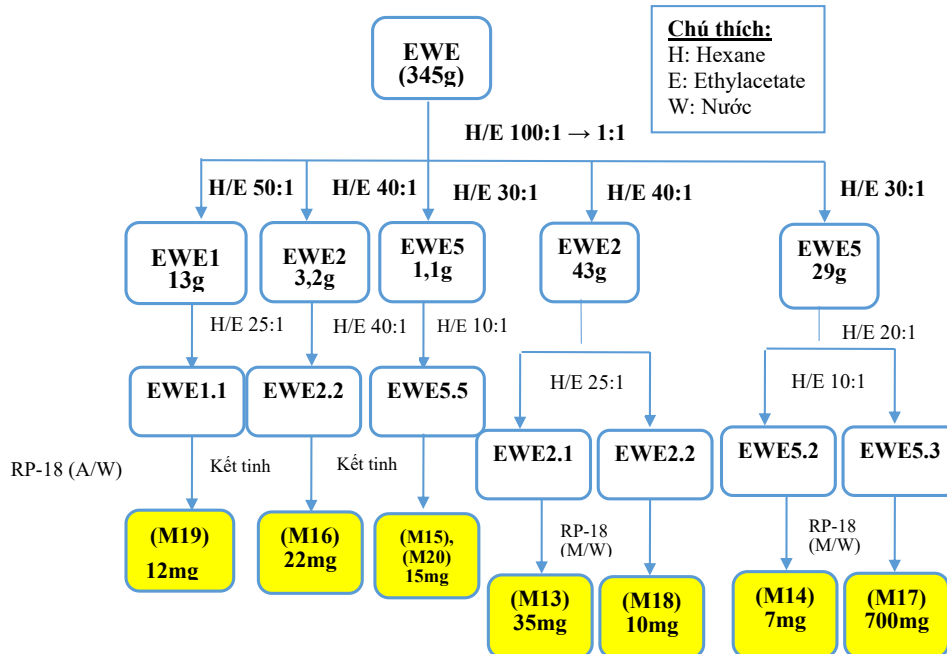
2.3.2. Phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.)

2.3.2.1. Dịch chiết từ phần trên mặt đất cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.)



Sơ đồ 2.3. Sơ đồ thu nhận dịch chiết phần trên mặt đất cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.)

2.3.2.2. Phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.)



Sơ đồ 2.4. Sơ đồ phân lập cao ethyl acetate phần trên mặt đất cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.)

2.3.3. Nghiên cứu thành phần, hàm lượng và hoạt tính sinh học của tinh dầu loài *Elsholtzia winitiana* Craib.

2.3.3.1. Nghiên cứu thành phần và hàm lượng của tinh dầu

Tiến hành định lượng và nhận dạng các cấu tử trong tinh dầu theo phương pháp trình bày 2.2.4. Kết quả được thể hiện trong mục 4.1.

2.3.3.2. Phân lập tinh dầu bằng phương pháp sắc ký cột

Nhằm thu nhận cấu tử nhiều nhất trong tinh dầu loài *Elsholtzia winitiana* Craib. là Rosefuran epoxide, chúng tôi tiến hành sắc ký cột mẫu tinh dầu thân-lá được chưng cất bằng phương pháp thường quy.

Đưa 1,1g tinh dầu (thân-lá) lên cột Silica gel pha thường có cỡ hạt là 0,040 - 0,063 mm (240-430 mesh), hệ dung môi hexan-ethyl acetate : 9-1 (v/v) thu nhận được một chất sạch dạng lỏng, hợp chất được ký hiệu là TD1. Cấu trúc của TD1 được làm sáng tỏ bởi hằng số vật lý và phổ 1D, 2D.

2.3.3.3. Thử hoạt tính sinh học của tinh dầu

Mẫu tinh dầu thu được thử nghiệm hoạt tính chống oxy hoá, hoạt tính kháng VSVKĐ, gây độc tế bào trên 5 dòng tế bào MCF7, HepG2, Hela, HGC-27, A549 theo mô tả trong mục 2.2.5.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả thu nhận tinh dầu, phân tích thành phần hoá học và đánh giá hoạt tính sinh học tinh dầu của loài *Elsholtzia winitiana* Craib.

3.1.1. Kết quả thu nhận tinh dầu và một số chỉ số hóa lý của các tinh dầu

Cả 4 mẫu tinh dầu thu được bằng hai phương pháp đều nhẹ hơn nước, có màu vàng nhạt và có mùi thơm đặc trưng của loài (gần giống mùi của tinh dầu hoa hồng). Tinh dầu thu được từ phần hoa có màu nhạt hơn tinh dầu thu được từ phần thân lá. Hiệu suất tinh dầu và các chỉ số hóa lý, gồm tỉ trọng (d^{25}), chỉ số khúc xạ (n_D^{25}), và góc quay cực riêng (α_D^{25}) của các mẫu tinh dầu được trình bày trên Bảng 3.1.

Bảng 3.1. Hiệu suất thu nhận tinh dầu và một số chỉ số hóa lý của tinh dầu thu nhận từ mẫu hoa và mẫu thân-lá của loài *Elsholtzia winitiana* Craib. bằng ppTT và ppVS

STT	Kết quả thực nghiệm	Tinh dầu Hoa		Tinh dầu Thân-lá	
		ppTT	ppVS	ppTT	ppVS
1	Hiệu suất tinh dầu (%), kl/kl	1.150	0.910	0.770	0.610
2	Tỉ trọng (d^{25})	0.882	0.879	0.875	0.877
3	Chỉ số khúc xạ (n_D^{25})	1.450	1.451	1.480	1.455
4	Góc quay cực riêng (α_D^{25})	85°45'	85°42'	85°48'	85°44'

3.1.2. Kết quả nhận biết các thành phần hoá học trong các mẫu tinh dầu

Kết quả phân tích tinh dầu từ mẫu hoa và mẫu thân-lá được thu nhận bằng phương pháp chưng cất lôi nước (ppTT) và phương pháp chưng cất có kèm sự hỗ trợ của vi sóng (ppVS) được ghi nhận ở Bảng 3.2 và Bảng 3.3 (Sắc ký đồ có trong phụ lục kết quả phân tích 04 mẫu tinh dầu). Bảng 3.2 cho biết thành phần cấu tử của mỗi mẫu tinh dầu, chỉ số thời gian lưu (RI), công thức phân tử (CTPT), khối lượng phân tử (KLPT) và các peak đặc trưng trên phổ khối lượng EI-MS của chúng.

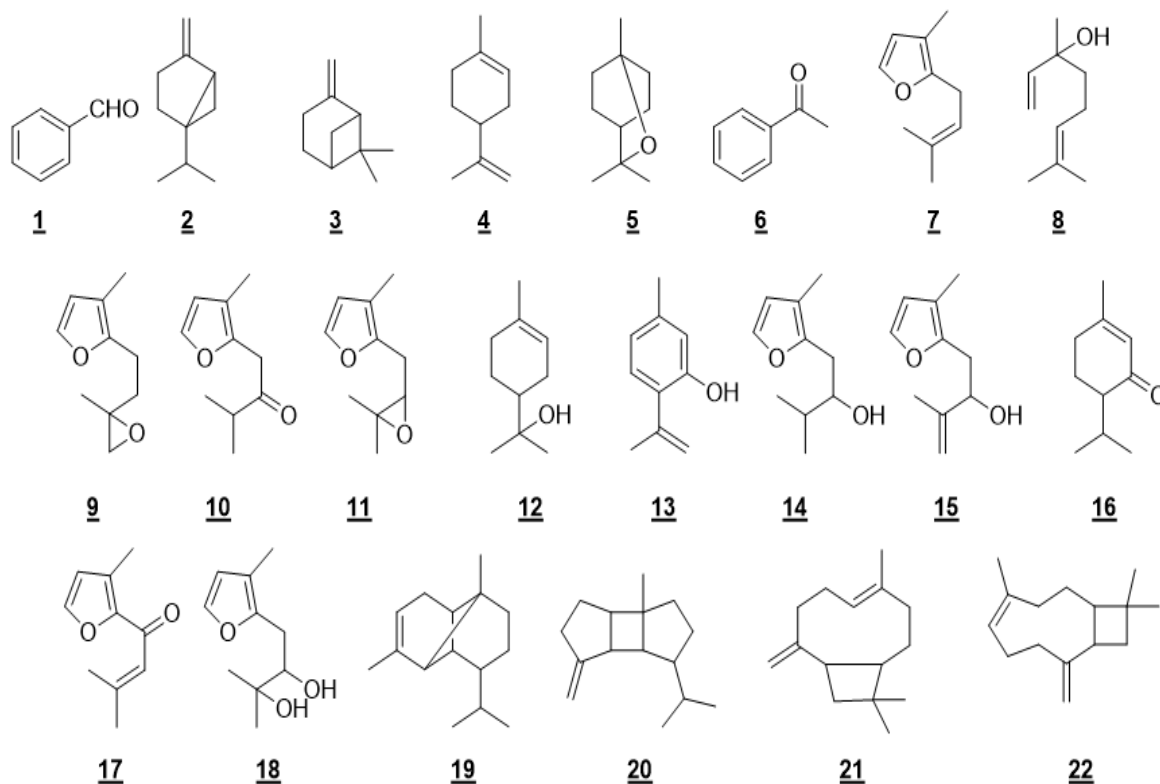
Bảng 3.2. Các cấu tử được tìm thấy trong tinh dầu hoa và tinh dầu thân-lá của loài kinh giới dày

***E. winitiana* Craib. thu được bằng ppTT và bằng ppVS**

TT	Tên cấu tử	RI	CTPT	KLPT	Phổ khối lượng
1	Benzaldehyde	967	C ₇ H ₆ O	106	
2	Sabinene	979	C ₁₀ H ₁₆	136	
3	β -Pinene	985	C ₁₀ H ₁₆	136	
4	Limonene	1034	C ₁₀ H ₁₆	136	
5	1,8-Cineole	1038	C ₁₀ H ₁₈ O	154	
6	Acetophenone	1074	C ₈ H ₈ O	120	
7	Rosefuran	1100	C ₁₀ H ₁₄ O	150	150 (100%, M ⁺), 135 (80), 91 (30)
8	Linalool	1103	C ₁₀ H ₁₈ O	154	
9	Unknown 1 (95, 166, RI 1161)	1161	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166	166 (10%, M ⁺), 95 (100), 82 (10)
10	Unknown 2 (95, 166, RI 1175)	1175	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166	166 (20%, M ⁺), 95 (100), 71 (25)
11	Rosefuran epoxide	1181	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166	166 (15%, M ⁺), 151 (5), 95 (100)
12	α -Terpineol	1200	C ₁₀ H ₁₈ O	154	
13	8,9-Dehydrothymol	1206	C ₁₀ H ₁₂ O	148	
14	Unknown 3 (96, 168, RI 1213)	1214	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	168 (10%, M ⁺), 96 (100), 81 (30)
15	Unknown 4 (95, 166, RI 1222)	1222	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166	166 (2%, M ⁺), 95 (100), 81 (15)
16	Piperitone	1265	C ₁₀ H ₁₆ O	152	
17	Dehydroelsholtzia ketone	1310	C ₁₀ H ₁₂ O ₂	164	164 (60%, M ⁺), 136 (75), 121 (100)
18	Unknown 5 (95, 184, RI 1336)	1336	C ₁₀ H ₁₆ O ₃	184	184 (10%, M ⁺), 95 (100), 82 (30)
19	α -Copaene	1389	C ₁₅ H ₂₄	204	
20	β -Bourbonene	1400	C ₁₅ H ₂₄	204	
21	(E)- β -Caryophyllene	1437	C ₁₅ H ₂₄	204	
22	(Z)- β -Caryophyllene	1437	C ₁₅ H ₂₄	204	
23	α -Humulene	1471	C ₁₅ H ₂₄	204	
24	γ -Muurolene	1490	C ₁₅ H ₂₄	204	
25	Germacrene D	1498	C ₁₅ H ₂₄	204	
26	β -Selinene	1504	C ₁₅ H ₂₄	204	
27	Bicyclogermacrene	1513	C ₁₅ H ₂₄	204	
28	γ -Cadinene	1530	C ₁₅ H ₂₄	204	
29	δ -Cadinene	1536	C ₁₅ H ₂₄	204	
30	Scapanol	1594	C ₁₅ H ₂₆ O	222	
31	Caryophyllene oxide	1605	C ₁₅ H ₂₄ O	220	

TT	Tên cấu tử	RI	CTPT	KLPT	Phổ khối lượng
32	Humulene epoxide II	1631	C ₁₅ H ₂₄ O	220	
33	α -Cadinol	1674	C ₁₅ H ₂₆ O	222	

Kết quả phân tích đã ghi nhận được 33 cấu tử, trong đó đã nhận biết được cấu trúc của 28 hợp chất nhờ so sánh phổ khối lượng EI-MS và chỉ số thời gian lưu (RI) của chúng (với các thư viện phổ hiện có), năm hợp chất còn lại (**unknown 1** đến **unknown 5**) chưa nhận biết được bằng phương pháp so sánh phổ thư viện và chỉ số RI trên máy. Công thức cấu tạo của các hợp chất nêu trên được trình bày ở Hình 3.1 dưới đây.

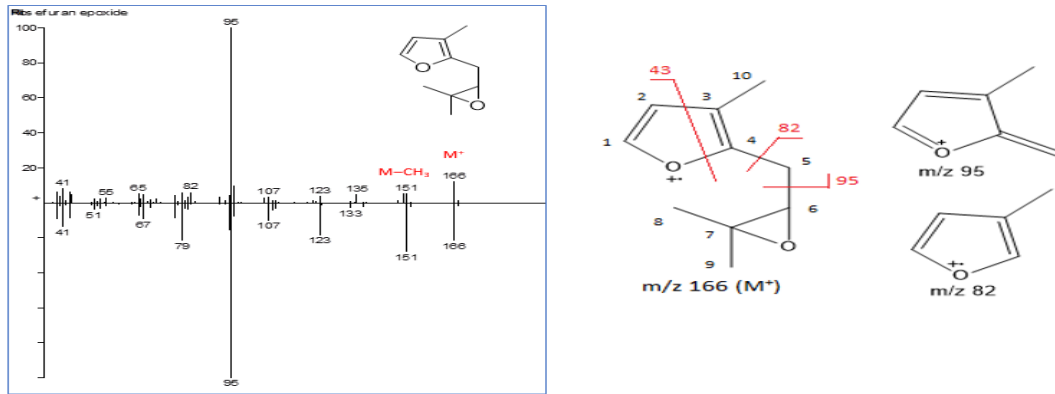


*(**9**, **10**, **14**, **15**, và **18** là cấu trúc dự đoán cho các chất **Unknown 1-5**).

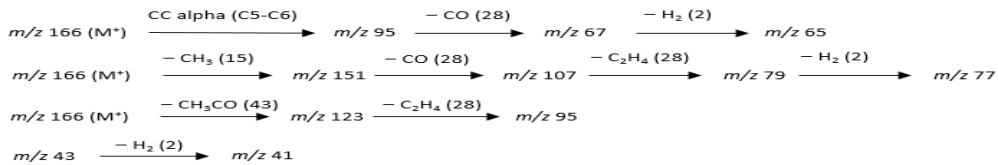
Hình 3.1. Công thức cấu tạo của các hợp chất được nhận biết có trong tinh dầu của hoa và thân-lá của loài kinh giới dày *E. winitiana* Craib.

Trong số các hợp chất đã được nhận biết, các hợp chất thuộc nhóm furanoid monoterpene là Rosefuran (**7**), Rosefuran epoxide (**11**) và Dehydro*Elsholtzia* ketone (**17**) là các thành phần chính và đặc trưng cho các mẫu tinh dầu này; trong đó Rosefuran epoxide (**11**) là chất có hàm lượng cao nhất trong mọi mẫu tinh dầu (44,86% – 69,56%).

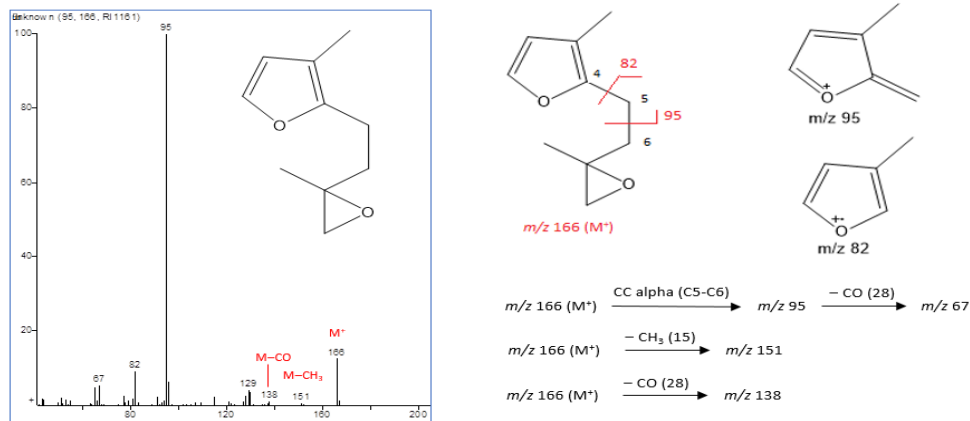
So sánh phổ khối lượng của các hợp chất chưa biết (**unknown 1 - unknown 5**) với phổ của các furanoid monoterpene tìm thấy trong các mẫu tinh dầu, nhất là so với phổ của Rosefuran epoxide (**11**), nhận thấy chúng có sự tương đồng khá rõ rệt ở các peak đặc trưng (peak phân tử và peak cơ sở) cũng như ở sơ đồ phân mảnh. Trên cơ sở đó đã tiến hành phân tích phổ khối lượng của chúng và đưa ra các cấu trúc dự đoán của **unknown 1 - unknown 5** dựa trên các tài liệu tham khảo về phổ khối lượng EI-MS của các hợp chất có chứa nhân furan [93, 94, 95, 96, 97, 98, 99] cũng như các qui tắc phân mảnh của phổ khối lượng EI-MS [95]; vì vậy, đề xuất một sơ đồ phân mảnh cho Rosefuran epoxide (**11**) như ở Hình 3.2



Rosefuran epoxide (11, RI 1181): $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$, KLPT 166



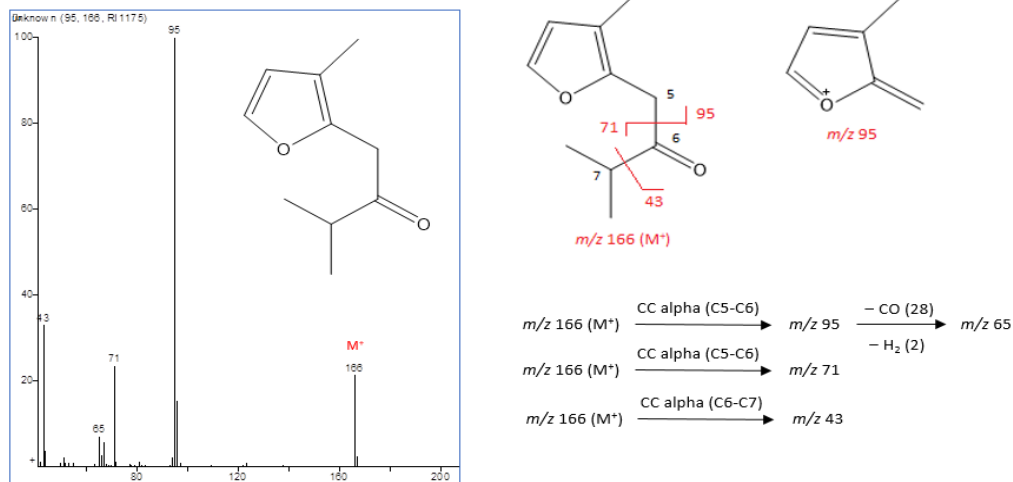
Hình 3.2. Sơ đồ phân mảnh của Rosefuran epoxide.
(Vị trí của carbon theo cách đánh số cho khung monoterpene acyclic)



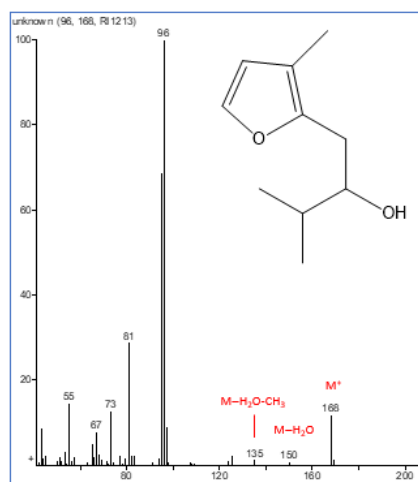
Unknown 1 (RI 1161): $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$, KLPT 166

Hình 3.3. Sơ đồ phân mảnh của hợp chất unknown 1

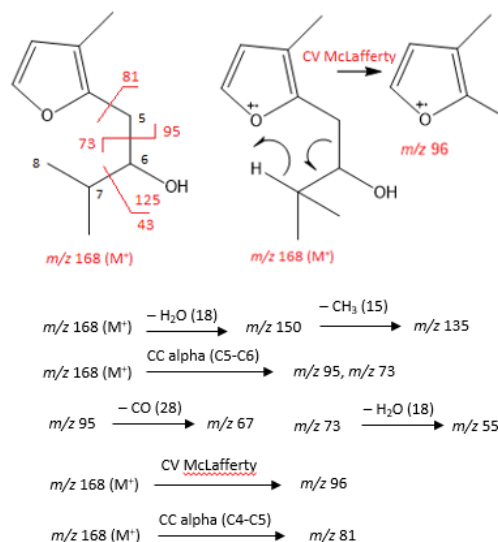
Unknown 2 (RI 1175): $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{O}_2$, KLPT 166



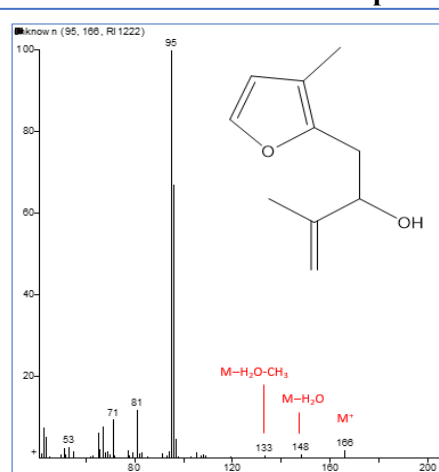
Hình 3.4. Sơ đồ phân mảnh của hợp chất unknown 2



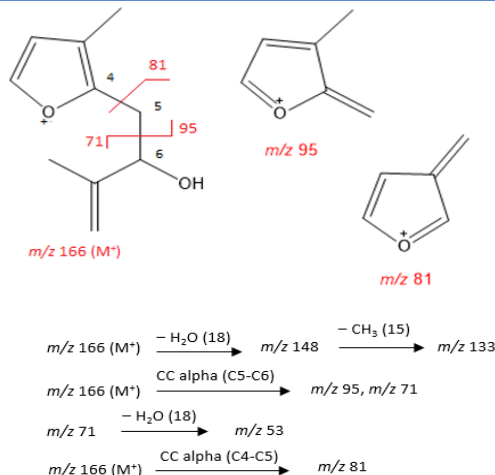
Unknown 3 (RI 1213): $C_{10}H_{16}O_2$, KLPT 168



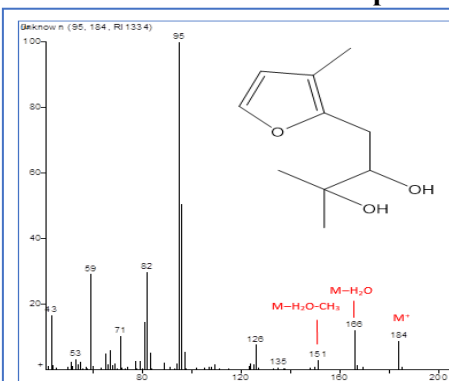
Hình 3.5. Sơ đồ phân mảnh của hợp chất unknown 3



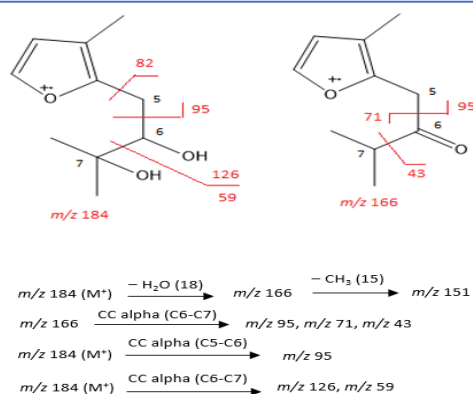
Unknown 4 (RI 1222): $C_{10}H_{14}O_2$, KLPT 166



Hình 3.6. Sơ đồ phân mảnh của hợp chất unknown 4

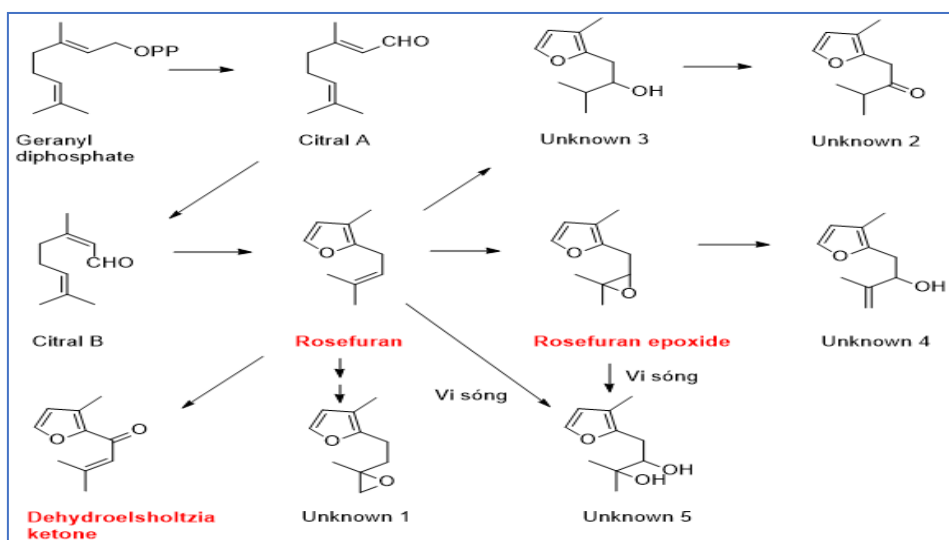


Unknown 5 (RI 1334): $C_{10}H_{16}O_3$, KLPT 184



Hình 3.7. Sơ đồ phân mảnh của hợp chất unknown 5

Như vậy, các chất chưa biết *unknown 1* đến *unknown 5* đều được dự đoán là các furanoid monoterpene với khung cơ bản của Rosefuran epoxide (2-alkyl-3-methyl-furan). Các chất *unknown 1* đến *unknown 4* là các hợp chất tự nhiên, được tạo thành nhờ quá trình sinh tổng hợp của bản thân cây bạc hà đã *E. winitiana*. Riêng chất *unknown 5* chỉ có mặt trong các tinh dầu thu được bằng phương pháp chưng cất có sự trợ giúp của vi sóng, điều đó gợi ý có một sự chuyển hóa thứ cấp đã xảy ra trong quá trình chưng cất có hỗ trợ vi sóng.



Hình 3.8. Giả thiết về sự hình thành và mối tương quan của các furanoid monoterpene tìm thấy trong tinh dầu của cây bạc hà đá (*E. winitiana* Craib.)

Dựa trên các dự đoán từ các tài liệu tham khảo [100, 101, 102, 103] về quá trình sinh tổng hợp của các hợp chất furanoid monoterpene, giả thiết sơ đồ về sự hình thành và mối tương quan của các furanoid monoterpene trong tinh dầu của cây bạc hà đá *Elsholtzia winitiana* Craib. như sơ đồ ở Hình 3.8

3.1.3. Kết quả phân tích thành phần hoá học các mẫu tinh dầu

Thành phần và hàm lượng tương đối (tính theo % FID) của các cấu tử trong tinh dầu hoa và tinh dầu thân-lá *Elsholtzia winitiana* Craib. thu bằng phương pháp truyền thống (ppTT) và vi sóng hỗ trợ (ppVS) được trình bày tại Bảng 3.3. Ở cả hai bộ phận, monoterpenes chứa oxy là nhóm chiếm ưu thế, trong đó furanoid monoterpenes đóng góp phần lớn diện tích đỉnh. Hai cấu tử trội là Rosefuran epoxide và Rosefuran.

Bảng 3.3. Kết quả phân tích GC-MS về hàm lượng các cấu tử có trong tinh dầu của hoa và thân-lá của loài *E. winitiana* Craib. thu được bằng ppTT và bằng ppVS

TT	Tên cấu tử	Tinh dầu Hoa		Tinh dầu Thân-lá	
		ppTT	ppVS	ppTT	ppVS
	Benzaldehyde	0.97	-	2.10	-
	Sabinene	0.11	-	0.16	-
	β -Pinene	0.20	-	0.24	-
	Limonene	0.70	-	0.52	-
	Cineole 1,8	0.36	-	0.24	-
	Acetophenone	0.36	-	0.40	-
	Rosefuran	12.47	4.28	1.77	1.22
	Linalool	0.39	0.20	0.40	0.28
	<i>unknown 1</i> (95, 166, RI 1161)	1.10	-	-	-
	<i>unknown 2</i> (95, 166, RI 1175)	3.50	2.43	1.75	1.71
	Rosefuran epoxide	63.17	56.13	69.56	44.86
	α -Terpineol <a->	0.15	0.16	0.22	0.14
	8,9-dehydrothymol	0.17	-	-	-
	<i>unknown 3</i> (96, 168, RI 1213)	4.61	5.28	4.60	4.29
	<i>Unknown 4</i> (95, 184, RI 1222)	2.06	1.19	-	-
	Piperitone	0.18	0.23	0.17	0.18
	Dehydroelsholtzia ketone	0.26	-	0.21	0.24
	<i>Unknown 5</i> (95, 184, RI 1336)	-	18.06	-	26.65
	α -Copaene	-	-	0.17	0.37
	β -Bourbonene	-	-	0.12	0.16
	β -Caryophyllene <E->	6.74	-	11.12	-
	Caryophyllene <Z>	-	6.99	-	10.80
	α -Humulene	0.80	0.85	1.29	1.34
	γ -Muurolene	-	-	-	0.31
	Germacrene D	1.19	1.49	1.74	2.56

TT	Tên cấu tử	Tinh dầu Hoa		Tinh dầu Thân-lá	
		ppTT	ppVS	ppTT	ppVS
	β -Selinene	-	-	-	0.19
	Bicyclogermacrene	0.19	0.19	0.28	0.69
	γ -Cadinene	-	-	-	0.16
	δ -Cadinene	-	-	0.10	0.47
	Scapanol	-	-	-	0.20
	Caryophyllene oxide	0.31	0.59	1.43	1.21
	Humulene Epoxide II	-	-	0.13	-
	α -Cadinol	-	-	-	0.15
Tổng số		99.99	98.07	98.72	98.60
	<i>Monoterpene hydrocarbon</i>	1.01	-	0.92	-
	<i>Monoterpene chứa oxi</i>	88.42	87.96	78.92	79.57
	<i>Furanoid monoterpene</i>	87.17	87.37	77.89	78.97
	<i>Sesquiterpene hydrocarbon</i>	8.92	9.52	14.82	17.05
	<i>Sesquiterpene chứa oxi</i>	0.31	0.59	1.56	1.56
	<i>Hợp chất có nhân benzene đơn giản</i>	1.33	-	2.5	-

Các kết quả thu được cho thấy, nhóm chất chủ yếu của cả tinh dầu hoa và tinh dầu thân-lá của loài *E. winitiana* thu được ở Hà Giang là nhóm các hợp chất monoterpene chứa oxi chiếm 88.42% (ppTT) và 78.92% (ppVS), trong đó các thành phần chính là các furanoid monoterpene (87.17% và 77.89%) gồm Rosefuran epoxide (**11**, 63.17% và 69.56%), Rosefuran (**7**, 12.47% và 1.77%), Dehydro*Elsholtzia* ketone (**17**, 0.26% và 0.21%) và các hợp chất *unknown 1* (**9**, 1.1% và 0%), *unknown 2* (**10**, 3.5% và 1.75%), *unknown 3* (**14**, 4.61% và 4.60%), *unknown 4* (**15**, 2.06% và 0%).

Đối với phương pháp chưng cất truyền thống, so hàm lượng giữa tinh dầu hoa và tinh dầu thân-lá thấy có vượt trội về tổng hàm lượng các furanoid monoterpene (87,17% và 77,89%), hàm lượng Rosefuran (12,47% và 1,77%); nhưng hàm lượng Rosefuran epoxide ở tinh dầu hoa lại thấp hơn ở tinh dầu thân-lá (63,17% và 69,56%).

Trong mẫu khảo sát trước đây vào năm 2015, đã phân tích thành phần của tinh dầu phần hoa và tinh dầu phần thân-lá được thu từ loài *Elsholtzia winitiana* Craib. mọc ở huyện Đồng Văn (Hà Giang). Kết quả thu được về cấu tử và hàm lượng các cấu tử khá phù hợp với kết quả trình bày ở phần trên, đặc biệt là về hàm lượng Rosefuran và Rosefuran epoxide cũng như về sự khác biệt về hàm lượng của chúng giữa tinh dầu hoa và thân-lá (Bảng 3.4). Điều này gợi ý về sự ổn định của quá trình tích lũy, hình thành tinh dầu trong các bộ phận của loài *Elsholtzia winitiana* Craib. mọc ở huyện Đồng Văn - Hà Giang.

Bảng 3.4. Hàm lượng Rosefuran và Rosefuran epoxide có trong mẫu tinh dầu hoa và tinh dầu thân-lá thu hái năm 2015 và 2019

Mẫu	Thu hái 2019		Thu hái 2015	
	<i>Rosefuran</i>	<i>Rosefuran epoxide</i>	<i>Rosefuran</i>	<i>Rosefuran epoxide</i>
Hoa	12.47	63.17	15.49	67.34
Thân-lá	1.77	69.56	3.50	76.31

* Kết quả phân tích GC-MS của tinh dầu mẫu thu hái 2015 xem tại phụ lục

3.1.4. Kết quả phân lập tinh dầu bằng phương pháp sắc ký cột

Nhằm thu nhận cấu tử nhiều nhất trong tinh dầu loài *E. winitiana* là hợp chất Rosefuran epoxide bằng phương pháp đơn giản nhất, tiến hành sắc ký cột mẫu tinh dầu thân-lá được chưng cất bằng phương pháp thường quy. Mô tả quá trình phân lập tại Chương 3, mục 3.3.2. Cấu trúc của TD1 được làm sáng tỏ bởi hằng số vật lý và phổ 1D-, 2D-NMR.

❖ Hợp chất 1 (Rosefuran epoxide, TD1)

❖ Hợp chất 1 (Rosefuran epoxide, TD1)

Dạng lỏng không màu, $[\alpha]_D^{25} - 3.8^0$ (CDCl₃, *c* 0,021)

Phổ 1H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) cho thấy hai proton olefinic tại δ H 7.25 (1H, d, *J* = 1.5 Hz) và δ H 6.18 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), đặc trưng cho vòng furan.

Ngoài ra, tín hiệu tại δ H 2.96 (1H, d, *J* = 1.5 Hz), 2.91 (1H, d, *J* = 5.5 Hz), và 2.70 (1H, dd, *J* = 6.0 Hz) cho thấy tương quan từ nhóm methylene liên kết với hệ vòng.

Ba nhóm methyl thể hiện tại δ H 1.96 (3H, s), 1.38 (3H, s), và 1.32 (3H, s).

Phổ ^{13}C -NMR (CDCl_3 , 125 MHz), DEPT và HSQC ghi nhận 10 tín hiệu carbon đặc trưng cấu trúc terpenoid, bao gồm:

- δC 62.3 (C-3) và 58.6 (C-2): hai carbon của vòng oxirane (epoxide).
- δC 146.9, 115.3, 112.9, 140.6: các carbon của vòng furan.
- δC 26.4 (C-4): methylene liên kết vòng.
- δC 24.7, 18.8, 9.8: ba carbon methyl ở các vị trí khác nhau.

Tương quan HMBC tại δH 1.23/ δC 58.5, δH 1.38/ δC 58.5 ppm xác định nhóm dimethyloxirane thế tại C-2.

Tương quan δH 2.91, 2.71/ δC 146.8 và 115.2 (furan), δC 62.2 và 58.5 (epoxide) xác nhận kết nối qua nhóm $-\text{CH}_2-$ giữa furan và epoxide.

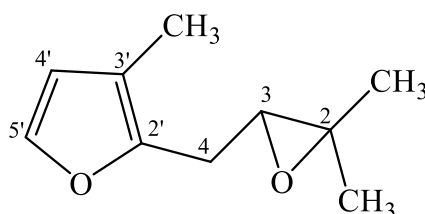
Tín hiệu NOESY bổ sung hỗ trợ làm rõ cấu trúc không gian.

Bảng 3.5. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của Rosefuran Epoxide

Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
2	58.6	58.49	-	-	Epoxide
3	62.3	62.18	2.96 (1H, m)	2.93 (1H, m)	Epoxide
4	26.4	26.29	2.91 (d, 5.5), 2.70 (dd, 4.0, 14.5)	2.91 (m), 2.66 (m)	CH_2
2'	146.9	146.80	-	-	Furan C
3'	115.3	115.21	-	-	Furan C
4'	112.9	112.80	6.18 (d, 1.5)	6.15 (d, 1.4)	Furan H
5'	140.6	140.57	7.25 (d, 1.5)	7.22 (d, 1.4)	Furan H
2- CH_3	24.7	24.60	1.32 (s)	1.32 (s)	Me
2- CH_3	18.8	18.73	1.38 (s)	1.38 (s)	Me
3'- CH_3	9.8	9.71	1.96 (s)	1.96 (s)	Me (furan)

^aĐo trong CDCl_3 , ^b500MHz, ^c125 MHz, ^d300MHz, ^f75 MHz

Từ hằng số vật lý, các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo khẳng định **TD1** có cấu trúc là Rosefuran epoxide.



Rosefuran epoxide

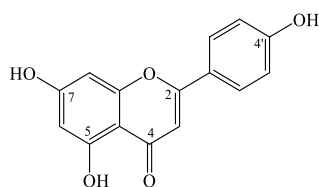
3.1.5. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của tinh dầu

Tinh dầu thu được bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn có hỗ trợ vi sóng được đánh giá về hoạt tính chống tăng sinh trên hai dòng tế bào ung thư (PC3 và A549), cũng như hoạt tính chống vi khuẩn trên tám chủng nấm, nấm men và vi khuẩn. Sự ức chế vừa phải đã được quan sát thấy đối với cả hai dòng tế bào được thử nghiệm, với giá trị IC_{50} là 23,9 $\mu\text{g/mL}$ (đối với PC3) và 56,2 $\mu\text{g/mL}$ (đối với A549) (giá trị tương ứng đối với paclitaxel 3,5 và 3,7 ng/mL). Tuy nhiên, tinh dầu cho thấy hoạt tính mạnh mẽ chống lại ba chủng vi khuẩn (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. vàng*) và một chủng nấm men (*S. cerevisiae*) với giá trị nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) dao động từ 50 đến 100 $\mu\text{g/mL}$ (Bảng 4.6). Nhìn chung, các số liệu này cho thấy tinh dầu bạc hà Đồng Văn chiết xuất bằng phương pháp MAHD có tiềm năng ứng dụng trong sinh học.

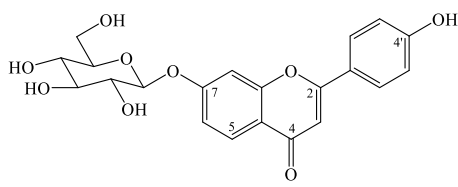
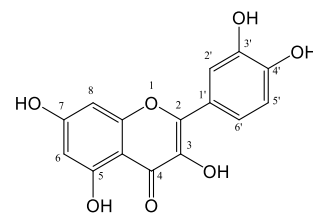
3.2. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học các cận chiết ethyl acetate của phần hoa

3.2.1. Xác định cấu trúc các hợp chất được phân lập từ cận chiết ethyl acetate

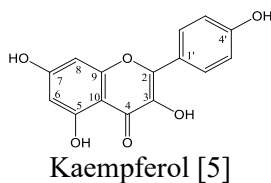
Từ cao methanol của hoa cây bạc hà Đồng Văn (*Elsholtzia winitiana* Craib.) bằng các phương pháp chiết, sắc ký, chúng tôi đã phân lập được 11 hợp chất, cấu trúc của các hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ.



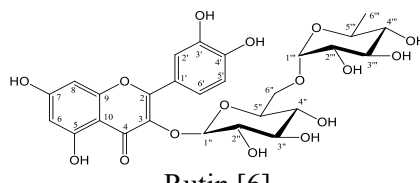
Apigenin [2]

Apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside [3]

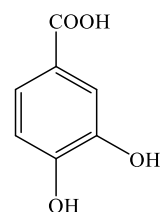
Quercetin [4]



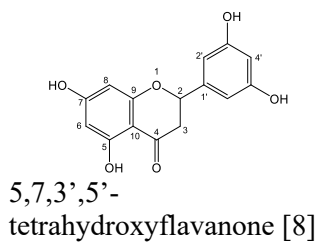
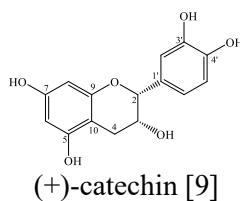
Kaempferol [5]



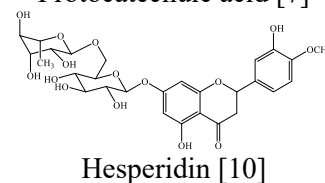
Rutin [6]



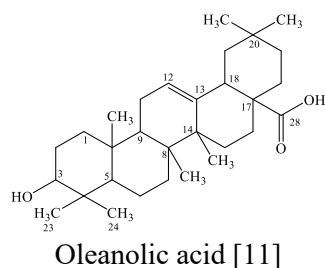
Protocatechuic acid [7]

5,7,3',5'-
tetrahydroxyflavanone [8]

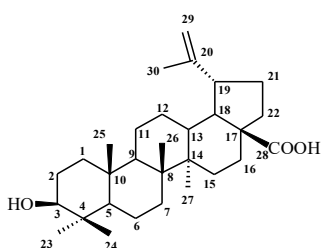
(+) -catechin [9]



Hesperidin [10]



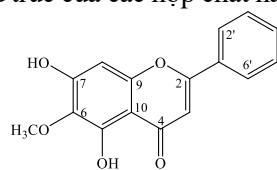
Oleanolic acid [11]



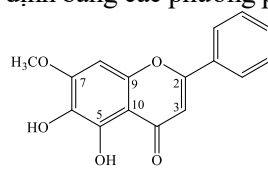
Betulinic acid [12]

3.3. Kết quả nghiên cứu thành phần, cấu trúc các hợp chất được phân lập từ cặn chiết ethyl acetate của phần thân - lá

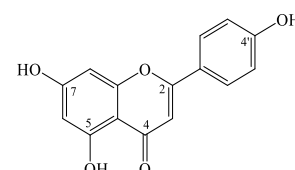
Từ cao methanol của thân lá, bằng các phương pháp sắc kí cột silica gel, chúng tôi đã phân lập được 9 hợp chất, cấu trúc của các hợp chất này được xác định bằng các phương pháp phổ.



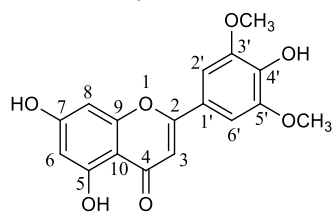
Oroxylin A [13]



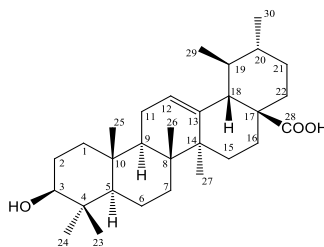
Negletein [14]



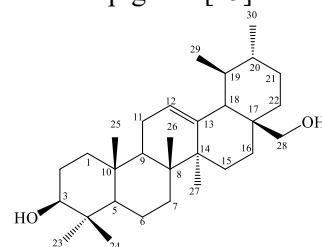
Apigenin [15]



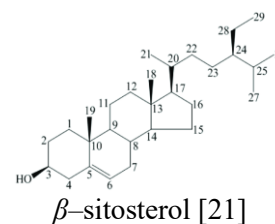
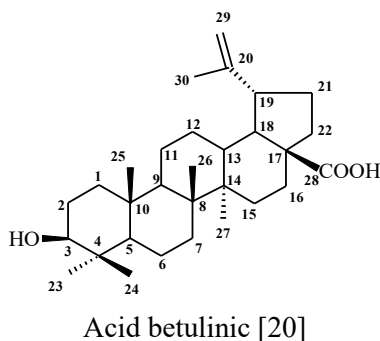
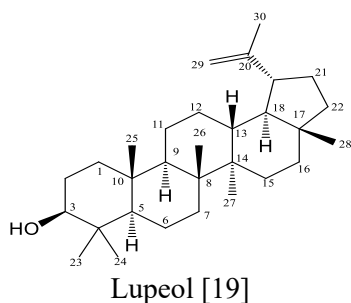
Tricin [16]



Ursolic acid [17]



Uvaol [18]



3.4. Liên kết chỉ dấu hoá học giữa mật ong Bạc Hà Hà Giang và cây nguồn mật chính *Elsholtzia winitiana* Craib.

3.4.1. Đánh giá chất lượng và thành phần của mật ong BHHG

3.4.1.1. Kết quả xác định một số chỉ tiêu chất lượng chính của Mật ong bạc hà Hà Giang theo các tiêu chuẩn hiện hành.

Kết quả trên Bảng 3.26 cho thấy Mật ong BHHG nguyên thủy có chất lượng vượt trội về hai chỉ tiêu quan trọng là hàm lượng đường khử (fructose và glucose tổng số rất cao) và hàm lượng HMF (hydroxymethylfufural rất thấp). Tuy nhiên chỉ tiêu về thủy phần có phần cao hơn mức qui định. Độ axit (meq/kg, mili đương lượng axit trên 1 kg) tuy chưa vượt ngưỡng của tiêu chuẩn Việt Nam và quốc tế (Codex Alimentarius), nhưng cũng cần chú ý để cải thiện.

Bảng 3.26. Kết quả xác định một số chỉ tiêu chất lượng chính của Mật ong bạc hà Hà Giang theo các tiêu chuẩn hiện hành.

TT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Min	Max	Avg	TCVN	TCXK
1	Hàm lượng nước	%	21,0	23,0	21,8	≤ 20	≤ 20
2	Fructose và glucose tổng số	%	70,5	75,2	73,4	≥ 60	≥ 65
3	Độ axit	meq/kg	37,6	48,7	40,9	≤ 50	
4	HMF	ppm	4,5	16,2	9,3	≤ 40	< 20

3.4.1.2. Kết quả phân tích thành phần các hợp chất dễ bay hơi có trong Mật ong bạc hà Hà Giang

Thành phần bay hơi trong các mẫu mật ong Bạc Hà (M1–M9) được xác định bằng GC–MS trên pha bay hơi cho thấy sự hiện diện ổn định của nhiều nhóm hợp chất dễ bay hơi. Bảng tổng hợp các hợp chất chính bao gồm hydrocarbon (octane, n-undecane, n-tetracosane, α -pinene), alcohol (1-penten-3-ol, 4-hexen-3-ol, nonanol, isoborneol, thymol/carvacrol), aldehyd (n-nonanal, n-decanal, benzeneacetaldehyde), keton (2-heptanone, damascenone, benzophenone), ester (butyl butyrate, hexyl butyrate, methyl salicylate, methyl dihydrojasmonate), và acid béo bay hơi chuỗi ngắn đến trung bình (propanoic acid, butyric acid, pentanoic acid, nonanoic acid, benzoic acid, benzeneacetic acid, 2-butenedioic acid, hexanedioic acid).

Trong số đó, α -pinene xuất hiện với hàm lượng tương đối đáng kể trong tất cả các mẫu (khoảng 2,03–6,08% với giá trị trung bình xấp xỉ 4,02%). Đây là một monoterpene thường gặp trong tinh dầu của nhiều loài thực vật thơm, bao gồm cả *E. winitiana*. Sự hiện diện ổn định của α -pinene trong mật ong Bạc Hà củng cố mối liên hệ giữa nguồn thực vật giàu terpenoid và hồ sơ hương đặc trưng của mật ong.

Tuy nhiên, trong điều kiện phân tích chiết dung môi thông thường áp dụng cho loạt mẫu M1–M9, ghi nhận tín hiệu của Rosefuran và Rosefuran epoxide ở mức thấp. Điều này có thể phản ánh hạn chế phương pháp: các furanoid monoterpene này rất dễ bay hơi và không bền trong môi trường nước – acid nhẹ của mật ong; đồng thời mức tồn dư của chúng trong mật ong thành phẩm có thể nằm ở ngưỡng thấp cho phương pháp chiết dung môi. Để truy dấu trực tiếp nhóm này, cần áp dụng headspace HS-SPME/GC–MS ngay trên mẫu mật ong tươi hoặc mẫu bảo quản tối thiểu, thay vì chỉ dựa vào chiết dung môi toàn phần.

Dựa trên dữ liệu về sự suy giảm Rosefuran/Rosefuran epoxide khi xử lý vi sóng và sự xuất hiện cấu tử Unknown-5, có cơ sở dự báo rằng trong mật ong đã ổn định thương phẩm, dấu vết còn sót lại không nhất thiết là Rosefuran epoxide nguyên dạng, mà có thể là sản phẩm chuyển hoá tương tự Unknown-5 (m/z 95/184; RI xấp xỉ 1330–1340). Vì vậy, bộ chỉ dấu hoá học cần tính cả các dẫn xuất chuyển hoá của furanoid monoterpene như chỉ dấu gián tiếp cho nguồn hoa *E. winitiana*.

Bảng 3.27. Thành phần hóa học các hợp chất bay hơi trong mật ong Bạc hà Hà Giang xác định bằng GC-MS

TT	Hợp chất	Nhóm chất	Min	Max	Avg
(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)
1	Octane	Hydrocarbon	0,43	1,21	0,84
2	n-Undecane	Hydrocarbon	0,26	0,46	0,36
3	n-Tetracosane	Hydrocarbon	0,32	0,73	0,41
4	Alpha-pinene	Hydrocarbon	2,03	6,08	4,02
5	1-Penten-3-ol	Alcohol	0,38	0,5	0,43
6	4-Hexen-3-ol	Alcohol	3,01	6,33	4,47
7	Nonanol	Alcohol	1,45	10,45	5,87
8	Isoborneol	Alcohol	0,12	0,22	0,15
9	Thymol/carvacrol	Alcohol	0,27	0,3	0,37
10	n-Nonanal	Aldehyd	1,69	10,91	6,19
11	n-Decanal	Aldehyd	0,81	1,96	1,36
12	Benzeneacetaldehyde	Aldehyd	0,26	0,84	0,42
13	2-Heptanone	Keton	0,22	0,92	0,46
14	Damascenone	Keton	2,19	4,04	3,37
15	Benzophenone	Keton	0,33	0,61	0,43
16	Butyl butyrate	Ester	1,41	2,65	2,05
17	Hexyl butyrate	Ester	0,04	2,85	1,38
18	Methyl salicylate	Ester	1,36	1,46	1,41
19	Methyl dihydrojasmonate	Ester	0,64	1,16	0,88
20	Propanoic acid	Acid	0,58	2,31	1,8
21	Butyric acid	Acid	8,19	12,2	6,83
22	Pentanoic acid	Acid	5,06	7,28	6,34
23	Nonanoic acid	Acid	0,47	10,26	4,89
24	Benzoic acid	Acid	0,48	1,33	0,91
25	Benzeneacetic acid	Acid	0,6	0,78	0,72
26	2-Butenedioic acid	Acid	0,27	0,39	0,36
27	Hexanedioic acid	Acid	0,25	0,43	0,33
28	Rosefuran epoxide	Furanoid monoterpene	<0,05	0,80	0,30
29	Rosefuran	Furanoid monoterpene	<0,01	0,20	0,08
30	Unknown 5 (dẫn xuất Rosefuran epoxide)	Furanoid monoterpene chuyển hoá	<0,10	1,50	0,60

3.4.1.3. Kết quả Phát hiện sự có mặt của một số hợp chất thuộc nhóm flavonoid và acid phenolic bằng phương pháp sắc ký bản mỏng.

Khảo sát định tính về thành phần một số hợp chất có trong mật ong Bạc hà Hà Giang theo phương pháp phân tích sắc ký bản mỏng TLC. Sáu căn chiết ethyl acetat (EM1-EM6) của sáu mẫu mật ong thu nhận ở Hà Giang (M1-M6) được chạy sắc ký lớp mỏng cùng với chất chuẩn đã phân lập được hoặc có sẵn, hệ dung môi sau: n-Hexan:Ethyl acetate:Acid formic = 6:3:01 (v/v/v). Kết quả định tính có trong bảng 3.28

Bảng 3.28. Kết quả phân tích định tính một số chất thuộc nhóm Flavonoids và acid phenolic phổ biến trong mẫu mật ong bạc hà Hà Giang bằng TLC

Chất chuẩn định tính	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
Acid Gallic	-	-	+	+	-	-	+	+	+
Acid Ferulic	+	-	+	+	-	-	+	-	-
Acid Coumaric	-	-	-	-	+	-	+	+	-

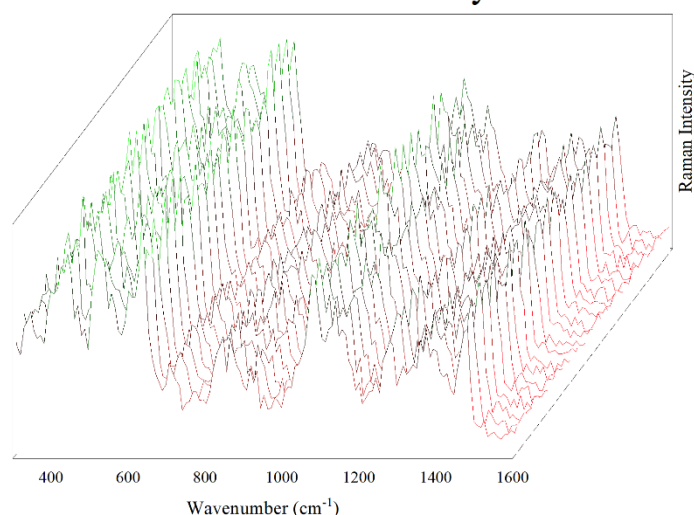
Quercetin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Acid Caffeic	-	+	+	-	-	+	+	-	+
Catechin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Luteolin	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Acid Phenylacetic	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Kaempferol	+	+	+	-	-	+	+	+	+

Ký hiệu (-) Không thể hiện, (+) Thể hiện

3.4.1.4. Kết quả Phát hiện sự có mặt của một số hợp chất thuộc nhóm flavonoid bằng phương pháp phổ Raman.

Phổ Raman của mật ong Bạc Hà cho phép ghi nhận nhanh 'dấu vân tay tổng thể' của mẫu mà không cần tách chiết. Các vùng Raman quan trọng quan sát được bao gồm: (i) vùng 1.000–1.200 cm^{-1} đặc trưng cho dao động C–C và C–O–C của đường khử (glucose, fructose) – đây là nền carbohydrate tự nhiên của mật ong; (ii) vùng khoảng 1.440–1.460 cm^{-1} phản ánh dao động biến dạng $-\text{CH}_2/-\text{CH}_3$ của các aldehyd/keton mạch thẳng và acid béo bay hơi chuỗi ngắn, phù hợp với sự hiện diện của nonanal, 2-heptanone, butyric acid, pentanoic acid... đã thấy trong GC–MS; (iii) vùng khoảng 1.600–1.620 cm^{-1} liên quan đến dao động C=C của khung thơm benzenoid, tương thích với sự hiện diện của benzeneacetaldehyde, benzophenone, methyl salicylate – các hợp chất quyết định mùi hoa-ngọt đặc trưng; và (iv) vùng khoảng 1.650–1.665 cm^{-1} , gắn với dao động C=C không bão hoà và khung isoprenyl/terpenoid, được xem là cửa sổ nhận tín hiệu tổng thể của nhóm furanoid monoterpene có nguồn gốc từ *E. winitiana*.

Mint honey



Hình 3.9. Phổ Raman của mật ong Bạc hà Hà Giang

Ý nghĩa của phổ Raman là khả năng sàng lọc nhanh: một mẫu mật ong thương mại nếu thiếu rõ rệt tín hiệu ở vùng thơm ($\sim 1.600 \text{ cm}^{-1}$) và vùng terpenoid ($\sim 1.650 \text{ cm}^{-1}$), trong khi vẫn thể hiện nền đường ở vùng 1.000–1.200 cm^{-1} , thì có thể nghi ngờ là sản phẩm bị pha loãng/pha trộn (ví dụ siro đường) thay vì mật ong Bạc Hà thật giàu hợp chất bay hơi có nguồn gốc thực vật dược liệu.

3.4.2. Đối sánh và xác định liên kết chỉ dấu hóa học giữa thành phần bay hơi của cây nguồn mật và mật ong BHHG

Thành phần bay hơi của cây nguồn mật (*Elsholtzia winitiana*) thể hiện một hồ sơ hóa học rất đặc trưng, trong đó nhóm furanoid monoterpene chiếm ưu thế áp đảo. Rosefuran epoxide đạt tới 63,17% trong tinh dầu hoa và 69,56% trong tinh dầu thân-lá (ppTT), trong khi Rosefuran chiếm 12,47% trong tinh dầu hoa nhưng chỉ còn ở mức 1,77% trong thân-lá. Khi chuyển sang phương pháp chưng cất có vi sóng hỗ trợ (ppVS), hàm lượng Rosefuran và Rosefuran epoxide đều giảm mạnh và xuất hiện hợp chất Unknown-5 (m/z 95/184; RI ~ 1336) với hàm lượng cao (đến 18,06% ở tinh dầu hoa và 26,65% ở tinh dầu thân-lá). Điều này chứng tỏ các furanoid monoterpene chủ chốt của cây có thể bị chuyển hoá thành sản phẩm thứ cấp trong điều kiện có nước và nhiệt.

Bộ thành phần bay hơi của mật ong Bạc Hà Hà Giang (BHHG) thu được bằng GC–MS trên pha bay hơi của các mẫu M1–M9 cho thấy các nhóm hợp chất chính gồm: hydrocarbon (octane, n-undecane, α -pinene...), alcohol (1-penten-3-ol, 4-hexen-3-ol, nonanol...), aldehyd (n-nonanal, n-decanal, benzeneacetaldehyde), keton (2-heptanone, damascenone, benzophenone), ester thơm (butyl butyrate, hexyl

butyrate, methyl salicylate, methyl dihydrojasmonate) và acid béo bay hơi chuỗi ngắn – trung bình (butyric acid, pentanoic acid, nonanoic acid, benzoic acid, benzeneacetic acid...). Trong số đó, α -pinene hiện diện ổn định với hàm lượng tương đối cao (khoảng 2,03–6,08%, trung bình xấp xỉ 4,02%), phản ánh đóng góp terpene từ nguồn thực vật thơm. Methyl salicylate, benzeneacetaldehyde và các aldehyd thơm khác quyết định mùi “hoa-mật” đặc trưng của mật ong vùng cao nguyên đá.

Việc đối sánh cho thấy ba điểm liên kết hóa học trực tiếp giữa cây nguồn mật và mật ong BHHG: (i) *Liên kết terpene / monoterpene*; (ii) *Liên kết benzenoid thơm*; (iii) *Liên kết furanoid monoterpene đặc hiệu nguồn mật*.

Nói cách khác: với pha bay hơi, bộ chỉ dấu liên kết cây → mật ong bao gồm (a) α -pinene và các monoterpene/terpenoid nền, (b) cụm benzenoid thơm (benzeneacetaldehyde, methyl salicylate...), và (c) dấu furanoid monoterpene đặc trưng – có thể tồn tại dưới dạng sản phẩm chuyển hóa (kiểu Unknown-5) thay vì epoxide nguyên thủy. Ba cụm chỉ dấu này là cơ sở khẳng định nguồn gốc sinh học của mật ong BHHG từ *E. winitiana*, và là nền cho thiết lập chuẩn đối sánh GC–MS headspace phục vụ xác thực lô mật ong thương mại.

3.4.3. Đối sánh và xác định liên kết chỉ dấu hóa học giữa thành phần không bay hơi của cây nguồn mật và mật ong BHHG

Cần chiết hoa của *Elsholtzia winitiana* cho thấy một tập hợp hợp chất thứ cấp không bay hơi có giá trị nhận dạng rất cao, bao gồm các flavonoid aglycone (Apigenin, Quercetin, Kaempferol), flavonoid glycoside (Apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside, Rutin, Hesperidin), polyphenol/flavan-3-ol [(+)-Catechin], acid phenolic (Protocatechuic acid) và các triterpenoid tự nhiên (Oleanolic acid, Betulinic acid). Đây là các cấu tử phân lập và mô tả cấu trúc bằng phổ NMR, nghĩa là chúng thực sự hiện diện trong nguyên liệu hoa – tức chính là vật chất mà ong tiếp xúc trực tiếp khi thu mật/phấn.

Những hợp chất này không bay hơi, nên không xuất hiện trong phân tích GC–MS pha bay hơi của mật ong. Thay vào đó, nhóm này tồn tại trong pha polyphenol của mật ong thật và chỉ lộ ra khi chiết polyphenol/phenolic fraction rồi phân tích bằng LC–MS hoặc HPLC-DAD. Đây là điểm khác biệt quan trọng: lớp hợp chất này không mô tả mùi, mà mô tả “chỉ dấu sinh học sâu” của nguồn thực vật.

Chính vì vậy lớp không bay hơi (flavonoid, polyphenol, triterpenoid) là “bằng chứng pháp lý” để bảo vệ chỉ dẫn địa lý mật ong Bạc Hà Hà Giang. Lớp này trả lời câu hỏi: “Ong đã thực sự hút từ đúng loài cây bản địa đó hay chưa?” trong khi lớp bay hơi chủ yếu trả lời câu hỏi: “Mùi và profile cảm quan của mật ong này có đúng kiểu mật ong Bạc Hà thật hay không?”. Hai lớp bổ sung nhau.

3.5. Bước đầu xây dựng chỉ dấu hóa học đa lớp và bằng chỉ tiêu hóa lý đặc trưng cho sản phẩm “mật ong bạc hà Hà Giang”

3.5.1. Bước đầu xây dựng chỉ dấu hóa học đa lớp cho Mật ong BHHG

Kết quả phân tích tại Mục 4.4 được dùng để xây dựng hệ chỉ dấu hoá học đa lớp nhằm phục vụ xác thực nguồn gốc và truy xuất chỉ dẫn địa lý đối với mật ong BHHG.

Hệ chỉ dấu đề xuất bao gồm ba lớp bổ trợ nhau, tương ứng với ba câu hỏi khác nhau mà cơ quan quản lý, nhà khoa học và thị trường đều quan tâm:

- Lớp bay hơi (GC–MS headspace): mô tả hồ sơ mùi và các cấu tử dễ bay hơi, bao gồm dấu đặc hiệu nguồn hoa (furanoid monoterpene kiểu Rosefuran epoxide và sản phẩm chuyển hoá Unknown-5).
- Lớp không bay hơi (LC–MS/HPLC): mô tả bộ chuyển hóa thứ cấp đặc thù (flavonoid, polyphenol, triterpenoid) từ *E. winitiana*, đóng vai trò bằng chứng sinh học – pháp lý của nguồn gốc.
- Lớp Raman: fingerprint tổng thể để sàng lọc nhanh và phát hiện bất thường/pha trộn.

Ba lớp này gắn thẳng chuỗi: *cây nguồn mật* → *ong* → *mật ong thành phẩm*, và cung cấp một quy trình kiểm chứng theo hai bước:

1. Sàng lọc nhanh bằng Raman + đối chiếu hồ sơ bay hơi đặc trưng (GC–MS headspace).
2. Khẳng định nguồn gốc sinh học bằng truy vết polyphenol/flavonoid/triterpenoid đặc thù (LC–MS/HPLC).

Đây là khung kỹ thuật để xây dựng SOP kiểm định, chứng nhận, và bảo vệ chỉ dẫn địa lý “mật ong Bạc Hà Hà Giang”.

3.5.2. Xây dựng chỉ tiêu hoá lý đặc trưng cho sản phẩm “mật ong bạc hà Hà Giang”

Sau khi phân tích mẫu mật ong tiến hành đối chiếu theo tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam IV (ĐDVN), TCVN 5267-1:2008; CODEX STAN 12:1981, một số mức chỉ tiêu cơ bản đặc trưng cho chất lượng mật ong bạc hà Hà Giang:

Bảng 3.29. Bảng mức chỉ tiêu cơ bản đặc trưng cho chất lượng mật ong bạc hà Hà Giang

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Mức đáp ứng
1	Tạp chất	Định tính	Âm tính
2	Tinh bột và dextrin	Định tính	Âm tính
3	Saccarin	Định tính	Âm tính

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Mức đáp ứng
4	Đường tráo nhân tạo	Định tính	Âm tính
5	Sunfat	Định tính	Âm tính
6	Clorit	Định tính	Âm tính
7	Vết rỉ sắt	Định tính	Âm tính
8	Chỉ số acid	(mili đương lượng/kg)	35 - 40
9	Đường khử	(%)	≥ 70
10	Tỉ trọng	-	$\geq 1,38$
11	Thủy phân	(%)	< 20
12	Tro sunfat	(%)	0,10-0,12
13	HMF	(ppm)	< 40
14	Tổng số vi sinh vật	(CFU/mL)	< 1000
15	Cảm quan màu sắc	-	Trong, Vàng xanh đến vàng
16	Cảm quan mùi vị	-	Mùi thơm, vị ngọt mát, đặc trưng
17	Thành phần hóa học của các hợp chất bay hơi: Nhóm furanoid monoterpene đặc trưng và dẫn xuất; monoterpene và sesquiterpene nên, đặc biệt α -pinene, limonene, 1,8-cineole, (E)- β -caryophyllene; Nhóm benzenoid thơm (benzeneacetaldehyde, benzophenone, methyl salicylate...)	%	Có mặt
18	Một số hợp chất thuộc nhóm Flavonoids và acid phenolic (Quercetin, Catechin...)	Phổ Raman	Có tín hiệu các peak đặc trưng tại vùng 590 cm^{-1} , 1170 cm^{-1} và 1500 cm^{-1} , vùng thơm $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, vùng terpenoid $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$

Các mẫu mật ong được phân tích nếu đáp ứng được các chỉ tiêu trên thì có thể kết luận đạt chất lượng của các mẫu mật ong bạc hà Hà Giang.

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

KẾT LUẬN

Từ kết quả “Nghiên cứu hóa học, hoạt tính sinh học của loài *Elsholtzia winitiana* Craib. và xây dựng chỉ tiêu hoá lý đặc trưng cho sản phẩm “mật ong bạc hà Hà Giang”, chúng tôi thu được một số kết luận sau:

1. Luận án đã nghiên cứu một cách hệ thống loài *Elsholtzia winitiana* Craib. (cây bạc hà đá) thu hái tại Cao nguyên đá Đồng Văn, Hà Giang: thu nhận tinh dầu từ hoa và phần thân-lá bằng hai phương pháp (chưng cất lôi cuốn hơi nước thông thường và chưng cất có hỗ trợ vi sóng), phân tích định tính và định lượng thành phần bằng GC-MS, phân lập bằng sắc ký cột, và đánh giá hoạt tính sinh học. Kết quả cho thấy tinh dầu có hàm lượng cao các furanoid monoterpene như rosefuran, rosefuran epoxide và các dẫn xuất liên quan; đồng thời thể hiện một số hoạt tính sinh học đáng chú ý (chống oxy hóa, kháng vi sinh vật kiểm định). Những dữ liệu này góp phần mô tả đặc tính hoá học – sinh học cốt lõi của loài cây nguồn mật đặc hữu vùng Đồng Văn.

2. Từ các cặn chiết giàu phân cực (ethyl acetate) của hoa và thân-lá cây bạc hà đá, luận án đã phân lập và xác định cấu trúc nhiều hợp chất thuộc các nhóm flavonoid, polyphenol và triterpenoid bằng các kỹ thuật phổ hiện đại ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, DEPT, HSQC, HMBC, MS). Bộ hợp chất thu được bao gồm các flavonoid (quercetin, kaempferol, apigenin, rutin, (+)-catechin), các acid phenolic (protocatechuic acid), các triterpenoid pentacyclic và oleanane/lupane (axit oleanolic, axit ursolic, betulinic acid, lupeol, uvaol, v.v.). Bộ hợp chất này đại diện cho “dấu phân tử” bền vững, có khả năng truyền dấu từ thực vật nguồn mật sang sản phẩm mật ong qua quá trình ong thu mật/phấn.

3. Luận án đã khảo sát mật ong bạc hà Hà Giang nguyên bản (thu tại Đồng Văn). Về chất lượng cơ bản, mật ong đáp ứng và/hoặc vượt trội so với một số tiêu chí trong tiêu chuẩn Việt Nam và quốc tế (ví dụ: chỉ tiêu đường khử và HMF thuận lợi), nhưng cũng bộc lộ điểm cần kiểm soát là hàm lượng nước còn cao ở một số mẫu thực địa. Ở lớp hợp chất dễ bay hơi (headspace GC-MS), mật ong bạc hà ghi nhận tập hợp aldehyd, keton,

este mùi thơm, acid mạch ngắn, monotерpen/terpenoid và hydrocarbon đặc trưng cảm quan, phản ánh hồ sơ hương vị riêng của sản phẩm vùng Cao nguyên đá Đồng Văn. Đây là lớp chỉ dấu cảm quan – định danh nhanh cho lô hàng.

4. Luận án đã chứng minh được mối liên kết hoá học trực tiếp giữa cây nguồn mật và mật ong bạc hà Hà Giang thông qua hai tầng chỉ dấu:

- (i) tầng bay hơi: nhóm furanoid monoterpene đặc trưng của *E. winitiana* (ví dụ rosefuran, rosefuran epoxide và các chuyển hóa liên quan) cùng các thành phần thơm aldehyd/este/acid béo ngắn;
- (ii) tầng không bay hơi: sự hiện diện (ở mức phát hiện định tính) của flavonoid và polyphenol đặc trưng như quercetin, catechin, rutin... trong mật ong, trùng khớp với các hợp chất đã phân lập từ hoa/thân-lá của *E. winitiana*. Phân tích TLC/HPTLC và phổ Raman cho phép nhận diện các tín hiệu đặc trưng của các cấu tử thuộc nhóm flavonoid (ví dụ đỉnh Raman vùng $\sim 590\text{ cm}^{-1}$, 1170 cm^{-1} gắn với quercetin; vùng $\sim 1500\text{ cm}^{-1}$ gắn với dao động vòng thơm của catechin) ngay trong mẫu mật ong bạc hà.

Sự trùng khớp này là bằng chứng khoa học rằng hồ sơ hóa học của cây bạc hà đã được truyền vào sản phẩm mật ong Bạc Hà Hà Giang ở cả pha dễ bay hơi và pha không bay hơi.

5. Trên cơ sở đó, luận án đã xây dựng khung “chỉ dấu hoá học đa lớp” phục vụ xác thực nguồn gốc và truy xuất chỉ dẫn địa lý cho mật ong bạc hà Hà Giang, gồm:

Lớp chỉ dấu bay hơi (HS-SPME/GC-MS headspace) mô tả hồ sơ hương và bộ hợp chất dễ bay hơi đặc trưng vùng.

Lớp chỉ dấu không bay hơi (TLC/HPTLC, LC định tính) dựa trên bộ flavonoid/polyphenol/triterpenoid đặc trưng của *E. winitiana*.

Lớp “vân tay quang phổ” (fingerprint) Raman cho phép sàng lọc nhanh, không phá mẫu, hỗ trợ kiểm tra thực địa.

Ba lớp này tạo thành quy trình hai bước: (i) sàng lọc nhanh nhận dạng lô hàng và (ii) khẳng định nguồn gốc sinh học bằng marker đặc trưng của cây nguồn mật.

Từ đó, luận án bước đầu đề xuất một số chỉ tiêu hoá lý đặc trưng cho sản phẩm “mật ong bạc hà Hà Giang”, coi như cơ sở khoa học ban đầu để phục vụ quản lý chất lượng, chứng nhận chỉ dẫn địa lý và chống gian lận thương mại.

* **Tổng thể**, luận án không chỉ mô tả thành phần hoá học và hoạt tính sinh học của loài cây nguồn mật đặc hữu vùng Cao nguyên đá Đồng Văn, mà còn thiết kế được một khung kiểm chứng nguồn gốc dựa trên chỉ dấu hoá học đa lớp cho mật ong bạc hà Hà Giang – một bước tiến cần thiết để bảo vệ giá trị kinh tế và tính độc đáo địa lý của sản phẩm này.

KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục mở rộng tập mẫu theo không gian (nhiều điểm lấy mật khác nhau trong vùng Đồng Văn – Mèo Vạc – Quản Bạ) và theo thời gian/niên vụ để đánh giá độ ổn định theo mùa và theo năm của bộ chỉ dấu hoá học, đặc biệt là nhóm furanoid monoterpene (rosefuran, rosefuran epoxide và dẫn xuất chuyển hoá) và bộ flavonoid–polyphenol truyền từ cây bạc hà đá sang mật ong.

2. Chuẩn hoá và hoàn thiện các quy trình phân tích nhanh có thể chuyển giao cho tuyến địa phương/quản lý chất lượng: (i) HS-SPME/GC-MS headspace để đọc hồ sơ hợp chất bay hơi phục vụ nhận diện cảm quan–nguồn gốc lô hàng; (ii) TLC/HPTLC và phổ Raman để phát hiện nhanh các flavonoid/phenolic đặc trưng trong mật ong. Việc chuẩn hoá bao gồm thẩm định LOD/LOQ, độ lặp lại và độ thu hồi nhằm đảm bảo giá trị pháp lý, phục vụ thanh tra và chứng nhận chỉ dẫn địa lý.

3. Tiếp tục nghiên cứu cơ chế chuyển hoá từ hợp chất thứ cấp trong cây bạc hà đá sang mật ong, bao gồm biến đổi của rosefuran $\rightarrow$ rosefuran epoxide $\rightarrow$ các sản phẩm chuyển hóa khác trong điều kiện sinh học (ong thu mật, lên men tự nhiên) và trong quá trình xử lý/bảo quản sau thu hoạch. Làm rõ cơ chế này sẽ củng cố tính đặc hiệu của marker và giúp phân biệt mật ong bạc hà thật với sản phẩm pha trộn hay “ủ mùi”.

Tích hợp bộ chỉ dấu hoá học đa lớp (bay hơi – không bay hơi – Raman) vào bộ tiêu chí quản lý chất lượng và truy xuất nguồn gốc cho sản phẩm “mật ong bạc hà Hà Giang”, tiến tới hoàn thiện bộ chỉ tiêu hoá lý đặc trưng mang tính khuyến nghị quản lý và dùng làm căn cứ pháp lý khi đăng ký, duy trì và bảo vệ chỉ dẫn địa lý ở cấp tỉnh và quốc gia.