

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”**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

HÀ NỘI - NĂM 2025

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”

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Ngành: Hóa học các hợp chất thiên nhiên

Mã số: 9.44.01.17

Xác nhận của Học viện
Khoa học và Công nghệ

Người hướng dẫn 1
(Ký, ghi rõ họ tên)

Người hướng dẫn 2
(Ký, ghi rõ họ tên)

HÀ NỘI - 2025

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "**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”**" là công trình nghiên cứu của chính mình dưới sự hướng dẫn khoa học của tập thể hướng dẫn. Luận án sử dụng thông tin trích dẫn từ nhiều nguồn tham khảo khác nhau và các thông tin trích dẫn được ghi rõ nguồn gốc. Các kết quả nghiên cứu của tôi được công bố chung với các tác giả khác đã được sự nhất trí của đồng tác giả khi đưa vào luận án. Các số liệu, kết quả được trình bày trong luận án là hoàn toàn trung thực và chưa từng được công bố trong bất kỳ một công trình nào khác ngoài các công trình công bố của tác giả. Luận án được hoàn thành trong thời gian tôi làm nghiên cứu sinh tại Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

Tác giả luận án

Phạm Thị Ngọc Mai

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành tại Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, có sự hỗ trợ kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học và công nghệ cấp Bộ Giáo dục và đào tạo, mã số: B2019-TNA-06. Trong quá trình nghiên cứu, tôi đã nhận được sự giúp đỡ quý báu của các Thầy cô, những nhà khoa học trong và ngoài nước cũng như các đồng nghiệp, bạn bè và gia đình.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc, sự cảm phục và kính trọng nhất tới TS. Cầm Thị Ính và GS.TS. Trần Đình Thắng là những người Thầy cô đã hướng dẫn tận tình, chu đáo và tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp đỡ tôi trong thời gian thực hiện luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn ban lãnh đạo Học viện Khoa học và Công nghệ đã tạo mọi điều kiện trong thời gian tôi thực hiện luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo cùng tập thể cán bộ Viện hóa học các Hợp chất thiên nhiên đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình làm thực nghiệm và hoàn thành luận án.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban Giám Hiệu trường Đại học Nông Lâm - Đại học Thái Nguyên, Ban Chủ nhiệm khoa Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, bộ môn Công nghệ Thực phẩm đã tạo điều kiện, chia sẻ và động viên trong suốt thời gian tôi thực hiện luận án.

Cuối cùng, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới gia đình, bạn bè và người thân đã luôn quan tâm, động viên, khích lệ tôi trong suốt quá trình nghiên cứu.

Tôi xin trân trọng cảm ơn!

Hà Nội, ngày tháng năm 2025

Tác giả luận án

Phạm Thị Ngọc Mai

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC	iii
DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT	vii
DANH MỤC SƠ ĐỒ	ix
DANH MỤC BẢNG BIỂU	x
DANH MỤC HÌNH VẼ	xii
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN.....	4
1.1. Bối cảnh và ý nghĩa của nghiên cứu	4
1.2. Sơ lược về chi <i>Elsholtzia</i>	5
1.3. Thành phần hóa học của chi <i>Elsholtzia</i>	10
1.3.1. Nhóm các hợp chất flavonoid và phenolic	13
1.3.2. Nhóm các hợp chất terpenoid, steroid, phenolic và các hợp chất khác	22
1.3.3. Thành phần hóa học của tinh dầu (các hợp chất dễ bay hơi)	26
1.4. Hoạt tính sinh học	27
1.4.1. Hoạt tính kháng virus.....	29
1.4.2. Hoạt tính kháng khuẩn.....	30
1.4.3 Hoạt tính chống viêm	31
1.4.4. Hoạt tính chống oxy hóa	32
1.4.5. Bảo vệ thiếu máu cục bộ cơ tim	33
1.4.6. Các hoạt tính khác	33
1.5. Tổng quan về loài kinh giới dày (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.).....	34
1.5.1. Giới thiệu chung.....	34
1.5.2. Tình hình nghiên cứu về loài kinh giới dày (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.)	36
1.6. Tổng quan về mật ong.....	37
1.6.1. Giới thiệu về mật ong	37
1.6.2. Tình hình nghiên cứu mật ong Bạc Hà vùng Cao nguyên đá Đồng Văn tỉnh Hà Giang	41

CHƯƠNG 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	45
2.1. ĐỐI TƯỢNG NGHIÊN CỨU	45
2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	46
2.2.1. Phương pháp xử lý và chiết mẫu.....	46
2.2.2. Phương pháp phân lập các hợp chất	46
2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học	47
2.2.4. Phương pháp chiết tách và phân tích thành phần hoá học trong tinh dầu	48
2.2.4.1. Phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước dùng bộ cất tinh dầu vi lượng.....	48
2.2.4.2. Phương pháp chưng cất tinh dầu bằng lôi cuốn hơi nước có sự hỗ trợ của vi sóng.....	48
2.2.4.3. Phương pháp phân tích thành phần hóa học tinh dầu	49
2.2.5. Phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học.....	50
2.2.5.1. Phương pháp đánh giá hoạt tính gây độc tế bào theo phương pháp MTT	50
2.2.5.2. Phương pháp đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định.....	51
2.2.5.3. Đánh giá khả năng chống oxy hóa bằng phương pháp thu gom gốc tự do DPPH	52
2.2.6. Phương pháp phân tích thành phần mật ong	54
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)	54
2.2.6.2. Phương pháp phân tích phổ Raman để xác định tính chất đặc thù của mật ong bạc hà Hà Giang.....	54
2.3. THỰC NGHIỆM	55
2.3.1. Phân lập các hợp chất từ phần hoa của cây bạc hà đá (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.).....	55
2.3.1.1. Dịch chiết từ hoa của cây bạc hà đá (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.).....	55
2.3.1.2. Phân lập các hợp chất từ hoa của cây bạc hà đá (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.).....	55
2.3.2. Phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất cây bạc hà đá (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.).....	58
2.3.2.1. Dịch chiết từ phần trên mặt đất cây bạc hà đá (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.).....	58
2.3.2.2. Phân lập các hợp chất từ phần trên mặt đất cây bạc hà đá (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.).....	59
2.3.3. Nghiên cứu thành phần, hàm lượng và hoạt tính sinh học của tinh dầu loài <i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.	64

2.3.3.1. Nghiên cứu thành phần và hàm lượng của tinh dầu	64
2.3.3.2. Phân lập tinh dầu bằng phương pháp sắc ký cột.....	64
2.3.3.3. Thử hoạt tính sinh học của tinh dầu	64
2.3.4. Nghiên cứu quang phổ Raman để xác định tính chất đặc thù của mật ong bạc hà Hà Giang	64
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	65
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 <i>Elsholtzia winitiana Craib</i>	65
3.1.1. Kết quả thu nhận tinh dầu và một số chỉ số hóa lý của các tinh dầu	65
3.1.2. Kết quả nhận biết các thành phần hoá học trong các mẫu tinh dầu	66
3.1.3. Kết quả phân tích thành phần hoá học các mẫu tinh dầu	73
3.1.4. Kết quả phân lập tinh dầu bằng phương pháp sắc ký cột	78
3.1.5. Kết quả đánh giá hoạt tính sinh học của tinh dầu.....	80
3.1.5.1. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các tinh dầu	80
3.1.5.2. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của tinh dầu thân-lá	81
3.1.5.3. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng tế bào của tinh dầu thân-lá	81
3.2. Kết quả nghiên cứu thành phần hóa học các cặn chiết ethyl acetate của phần hoa	81
3.2.1. Xác định cấu trúc các hợp chất được phân lập từ cặn chiết ethyl acetate	81
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	101
3.4. Liên kết chỉ dấu hoá học giữa mật ong Bạc Hà Hà Giang và cây nguồn mật chính <i>Elsholtzia winitiana Craib</i>	115
3.4.1. Đánh giá chất lượng và thành phần của mật ong BHHG.....	116
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.....	116
3.4.1.2. Kết quả phân tích thành phần các hợp chất dễ bay hơi có trong Mật ong bạc hà Hà Giang	116
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.	119
3.4.1.4. Kết quả Phát hiện sự có mặt của một số hợp chất thuộc nhóm flavonoid bằng phương pháp phổ Raman.	120
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	121
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	123

3.5. Bước đầu xây dựng chỉ dấu hóa học đa lớp và bảng chỉ tiêu hóa lý đặc trưng cho sản phẩm “mật ong bạc hà Hà Giang”	125
3.5.1. Bước đầu xây dựng chỉ dấu hóa học đa lớp cho Mật ong BHHG	125
3.5.2. Xây dựng chỉ tiêu hoá lý đặc trưng cho sản phẩm “mật ong bạc hà Hà Giang”	127
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ.....	129
KẾT LUẬN	129
KIẾN NGHỊ.....	131
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	132

DANH MỤC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
Các phương pháp sắc ký		
CC	Column Chromatography	Sắc ký cột thường
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
TLC	Thin Layer Chromatography	Sắc ký bản mỏng
Các phương pháp phổ		
^1H -NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân proton
^{13}C -NMR	Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy	Phổ cộng hưởng từ hạt nhân carbon 13
APCI-MS	Atmospheric Pressure Chemical Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển
CD	Circular Dichroism Spectroscopy	Phổ nhị sắc tròn
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ tương tác hai chiều ^1H - ^1H
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer	Phổ DEPT
ESI-MS	Electron Spray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối ion hóa phun mù điện tử
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HR-ESI-MS	High Resolution - Electron Spray Ionization - Mass Spectrometry	Phổ khối phân giải cao ion hóa phun mù điện tử
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
J (Hz)	Interactive constant in Hz	Hằng số tương tác tính bằng Hz
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ NOESY

Kí hiệu	Tiếng Anh	Tiếng Việt
ESI-MS	Electron Spray Ionization Mass Spectra	Phổ khối lượng ion hóa phun mù điện tử
δ (ppm)	(ppm = part per million)	Độ dịch chuyển hóa học tính bằng phần triệu
Các dòng tế bào		
Hep-G2	Human hepatoma	Ung thư gan
Lu-1	Human bronchogenic carcinoma	Ung thư phổi
MCF-7	Human breast Adenocarcinoma	Ung thư vú
Các kí hiệu khác		
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50%	Nồng độ ức chế 50%
LD ₅₀	Lethal Dose 50	Liều độc cấp tính
ED ₅₀	Effective Dose at 50%	Liều gây chết hiệu quả
MIC	<i>Inhibitory Concentration</i>	Nồng độ ức chế tối thiểu
SI	Selectivity Index	Độ chọn lọc, được tính bằng tỉ số IC ₅₀ /MIC
TMS	Tetramethyl Silan	Chất chuẩn nội
NCI	Nitonal Cancer Institute	Viện Ung thư Quốc gia Hoa kỳ
δ_H	Proton chemical shift	Độ chuyển dịch hóa học của proton
δ_C	Carbon chemical shift	Độ chuyển dịch hóa học của cacbon

DANH MỤC SƠ ĐỒ

Sơ đồ 2.1. Sơ đồ thu nhận dịch chiết từ phần hoa của cây bạc hà đá (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.)	55
Sơ đồ 2.2. Sơ đồ phân lập căn ethyl acetate của phần hoa cây bạc hà đá (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.)	56
Sơ đồ 2.3. Sơ đồ thu nhận dịch chiết phần trên mặt đất cây bạc hà đá (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.).....	58
Sơ đồ 2.4. Sơ đồ phân lập cao ethyl acetate phần trên mặt đất cây bạc hà đá (<i>Elsholtzia winitiana</i> Craib.).....	63

DANH MỤC BẢNG BIỂU

Bảng 1.1. Phân loại chi <i>Elsholtzia</i>	5
Bảng 1.2. Các hợp chất được phân lập từ mỗi loài thuộc chi <i>Elsholtzia</i> [4]	10
Bảng 1.3. Các hợp chất flavonoid được phân lập từ chi <i>Elsholtzia</i> [3]	14
Bảng 1.4. Hoạt tính sinh học của một số loài thuộc chi <i>Elsholtzia</i>	27
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 <i>Elsholtzia winitiana</i> Craib. bằng ppTT và ppVS.....	66
Bảng 3.2. Các cấu tử được tìm thấy trong tinh dầu hoa và tinh dầu thân-lá của loài kinh giới dày <i>E. winitiana</i> Craib. thu được bằng ppTT và bằng ppVS	67
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 <i>E. winitiana</i> Craib. thu được bằng ppTT và bằng ppVS	73
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.....	75
Bảng 3.5. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của Rosefuran Epoxide.....	79
Bảng 3.6. Kết quả đánh giá HCO trên hệ DPPH của các mẫu tinh dầu	80
Bảng 3.7. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của tinh dầu thân-lá loài <i>E. winitiana</i>	81
Bảng 3.8. Số liệu phổ của hợp chất EWE4 (Apigenin)	82
Bảng 3.9. Số liệu phổ của hợp chất EG12.1	84
Bảng 3.10. Số liệu phổ của EWF8	86
Bảng 3.11. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của Kaempferol (HG4.1)	88
Bảng 3.12. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của Rutin.....	90
Bảng 3.13. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của HG17 (Protocatechuic acid)	91
Bảng 3.14. Số liệu phổ của HG33.....	92
Bảng 3.15. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất EWFE262.....	94
Bảng 3.16. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của Hesperidin.....	96
Bảng 3.17. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của DBH1 (Oleanolic acid).....	97
Bảng 3.18. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của HC20 (Betulinic acid)	100
Bảng 3.19. Số liệu phổ của EWW6.....	102

Bảng 3.20. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của Negletein.....	103
Bảng 3.21. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của EWE27.....	106
Bảng 3.22. Số liệu phổ của EWB3.2.....	107
Bảng 3.23. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của Uvaol.....	109
Bảng 3.24. Số liệu phổ của EWE15.....	111
Bảng 3.25. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của β -Sitosterol.....	114
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.	116
Bảng 3.27. Thành phần hóa học các hợp chất bay hơi trong mật ong Bạc hà Hà Giang xác định bằng GC-MS.....	117
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.....	119
Bảng 3.29. Bảng mức chỉ tiêu cơ bản đặc trưng cho chất lượng mật ong bạc hà Hà Giang.....	127

DANH MỤC HÌNH VẼ

Hình 1.1. Hình ảnh các loài thuộc chi <i>Elsholtzia</i> ở Việt Nam	10
Hình 1.2. Cơ chế chống viêm của một số hợp chất terpenoid và flavonoid đã được phân lập từ các loài thuộc chi <i>Elsholtzia</i>	32
Hình 2.1. Ảnh của mẫu <i>Elsholtzia winitiana</i> Craib. nghiên cứu	45
Hình 2.2. Ảnh của mẫu mật ong bạc hà Hà Giang nghiên cứu.....	45
Hình 2.3. Hệ thống chưng cất tinh dầu vi lượng.....	49
Hình 2.4. Hệ thống chưng tinh dầu có sự hỗ trợ của vi sóng.....	49
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 <i>E. winitiana</i> Craib.	68
Hình 3.2. Sơ đồ phân mảnh của Rosefuran epoxide.	69
Hình 3.3. Sơ đồ phân mảnh của hợp chất unknown 1	70
Hình 3.4. Sơ đồ phân mảnh của hợp chất unknown 2	70
Hình 3.5. Sơ đồ phân mảnh của hợp chất unknown 3	71
Hình 3.6. Sơ đồ phân mảnh của hợp chất unknown 4	71
Hình 3.7. Sơ đồ phân mảnh của hợp chất unknown 5	72
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 (<i>E. winitiana</i> Craib.)	72
Hình 3.9. Phổ Raman của mật ong Bạc hà Hà Giang	121

MỞ ĐẦU

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 dược 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”.**

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”.

Nội dung của luận án:

1. Phân tích thành phần hoá học và đánh giá hoạt tính sinh học tinh dầu của loài *Elsholtzia winitiana* Craib.
2. Nghiên cứu thành phần hóa học cận chiết ethyl acetate của phần hoa bạc hà
3. Nghiên cứu thành phần hóa học cận chiết ethyl acetate của phần thân – lá
4. 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.

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.

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.

Chương 1. TỔNG QUAN

1.1. Bối cảnh và ý nghĩa của nghiên cứu

Trong thập niên gần đây, xác thực nguồn gốc và đánh giá chất lượng sản phẩm nông sản–thực phẩm dựa trên dấu ấn hoá học (chemical fingerprints) trở thành hướng tiếp cận chủ đạo nhằm bảo vệ người tiêu dùng, nâng cao giá trị sản phẩm địa phương và hỗ trợ quản lý chỉ dẫn địa lý. Với mật ong đặc sản gắn với một loài thực vật nguồn mật cụ thể, yêu cầu nhận diện chính xác “nguồn thực vật–địa lý” càng trở nên cấp thiết trước bối cảnh rủi ro pha trộn, gian lận thương mại và suy giảm niềm tin thị trường.

Chi *Elsholtzia* (Lamiaceae) là nhóm thực vật giàu hợp chất thứ cấp (flavonoid, phenolic, terpenoid và cấu tử bay hơi của tinh dầu), có tiềm năng tạo ra marker hoá học đặc trưng truyền dẫn từ cây sang mật ong thông qua hoạt động lấy mật của ong. *Elsholtzia winitiana* - đối tượng trọng tâm của đề tài - vừa có ý nghĩa học thuật (kho tàng các hoạt chất hoá học tự nhiên còn chưa được khai thác đầy đủ), vừa có ý nghĩa ứng dụng khi liên quan đến các sản phẩm mật ong đặc sản ở vùng miền núi đá vôi phía Bắc.

Ở góc độ quản lý và thị trường, mật ong gắn với loài nguồn mật đặc hữu là hạng mục có giá trị gia tăng cao, nhưng cũng dễ bị mạo danh nguồn gốc do thiếu một khung kiểm chứng “nhanh, tin cậy, khả chuyển giao” tại tuyến địa phương. Các cách làm truyền thống (cảm quan, chỉ tiêu hoá lý cơ bản) chưa đủ để đánh giá khi đối diện các kịch bản pha trộn tinh vi hoặc thay thế nguồn mật.

Về phương pháp, các kỹ thuật hiện đại như HS-SPME/GC-MS (hồ sơ hợp chất bay hơi), phổ Raman (fingerprint quang phổ nhanh) và TLC/HPTLC (phân nhóm cấu tử không bay hơi) đã chứng tỏ hiệu lực trong phân tích chỉ dấu hoá học của thực vật và thực phẩm. Tuy nhiên, khoảng trống còn tồn tại ở (i) tích hợp liên thông các kỹ thuật này thành khung phân tích thống nhất, (ii) thiết lập ma trận marker cây ↔ mật ong có thể tái lập, và (iii) chuẩn hoá tiêu chí thẩm định phương pháp (LOD/LOQ, độ lặp lại, độ thu hồi) để bảo đảm so sánh và ứng dụng thực tế.

Nghiên cứu này được thiết kế nhằm lấp đầy các khoảng trống nêu trên: (1) xây dựng khung phân tích tích hợp kết hợp HS-SPME/GC-MS, Raman và TLC/HPTLC để xác thực nguồn gốc mật ong theo dấu ấn hoá học; (2) thiết lập và kiểm chứng ma trận marker liên kết hồ sơ hoá học của *E. winitiana* với mật ong thu

thập tại vùng nghiên cứu; và (3) chuẩn hoá tiêu chí thẩm định phương pháp, đồng thời đề xuất SOP có khả năng triển khai ở tuyến địa phương.

Ý nghĩa khoa học của nghiên cứu là (i) cung cấp một khuôn khổ phương pháp luận liên thông đa-kỹ thuật cho bài toán xác thực nguồn gốc dựa trên hoá học tự nhiên; (ii) đóng góp bộ dữ liệu tham chiếu (peaks GC-MS chủ chốt, tín hiệu Raman, bản đồ TLC) cho thư viện dấu vân tay; và (iii) củng cố cầu nối cây nguồn mật ↔ sản phẩm mật ong ở cấp độ marker, góp phần phát triển lĩnh vực “hoá sinh–phân tích trong nhận diện nguồn gốc thực phẩm”.

Ý nghĩa thực tiễn ở khung phân tích và SOP đề xuất có thể áp dụng cho hoạt động giám sát chất lượng, chống gian lận nguồn gốc, hỗ trợ xây dựng/duy trì chỉ dẫn địa lý, và tạo nền tảng cho chuỗi cung ứng minh bạch của sản phẩm mật ong đặc sản. Về dài hạn, kết quả giúp nâng chuẩn kiểm soát chất lượng tại địa phương, gia tăng giá trị thương mại và niềm tin thị trường cho sản phẩm.

1.2. Sơ lược về chi *Elsholtzia*

Chi Kinh giới (danh pháp khoa học: *Elsholtzia*) là một chi thực vật quan trọng thuộc họ Lamiaceae (họ Hoa môi). Hầu hết các loài trong chi này là cây thân thảo hàng năm hoặc lâu năm với khoảng 42 loài được công nhận trên thế giới. Chúng được phân bố phổ biến ở các nước Đông Á, Châu Phi, Bắc Mỹ và Châu Âu và tính đa dạng của loài chủ yếu tập trung ở Đông Á và Châu Phi, với một số ít phân bố ở châu Mỹ và châu Âu [1]. Tại Việt Nam có khoảng 7 loài, với tên gọi có chứa cụm từ kinh giới. Ở Trung Quốc có tới 33 loài, trong đó tỉnh Vân Nam có khu vực phân bố phong phú và rộng rãi của chi này, với 26 loài và 11 giống được phát hiện.

Bảng 1.1. Phân loại chi *Elsholtzia*

Chi Kinh giới	
Phân loại khoa học	
Giới (<i>regnum</i>)	Plantae
Bộ (<i>ordo</i>)	Lamiales
Họ (<i>familia</i>)	Lamiaceae
Phân họ (<i>subfamilia</i>)	Nepetoideae
Tông (<i>tribus</i>)	Elsholtzieae
Chi (<i>genus</i>)	<i>Elsholtzia</i> WILLD., 1790

Các loài thuộc chi *Elsholtzia* chủ yếu là thực vật có mùi thơm, trong đó có nhiều loài cho tinh dầu và là nguồn nguyên liệu cung cấp tinh dầu. Nhiều loài trong dân gian được sử dụng làm thuốc, trà thảo mộc, thực phẩm, gia vị, đồ uống, nước hoa, mỹ phẩm, hương liệu và nguồn sản xuất mật ong [2]. Trong y học dân gian, phần lớn các loài thuộc chi *Elsholtzia* được sử dụng để trị cảm lạnh, sốt, rối loạn tiêu hoá, tiêu chảy, giải độc v.v... chúng thường được sử dụng bằng thuốc sắc, xông hơi hoặc ăn sống.

Chi *Elsholtzia* từ lâu đã được sử dụng rộng rãi ở Trung Quốc như một loại thuốc dân gian để cải thiện các triệu chứng như cảm lạnh, sốt và viêm phổi. Ngoài ra, một số loài trong chi này thường được sử dụng làm thuốc lâm sàng. Ví dụ, “Huangshi Cold Tablet” là một loại thuốc được cấp bằng sáng chế OTC của Trung Quốc để điều trị cảm lạnh, viêm họng, viêm amidan, viêm phế quản, ho, v.v. Nó được làm từ tám nguyên liệu thực vật, trong đó *E. penduliflora*, loài cây đặc hữu của Vân Nam là nguyên liệu chính. Ngoài ra, *E. ciliata* còn được gọi là “cây ma hoàng Trung Quốc vào mùa hè”, và nó là loại thuốc vua trong một toa thuốc cổ xưa nổi tiếng có tên là “Xin-Jia-Xiang-Ru-Yin” được dùng để điều trị hội chứng lạnh vào mùa hè kể từ thời nhà Thanh [3].

Một số loài *Elsholtzia* được sử dụng như một phương thuốc cảm lạnh: *E. ciliata*, *E. myosurus*, *E. densa*, *E. densa* var. *calycocarpa*, *E. splendens*, *E. cyprianii* var. *angustifolia*, *E. blanda*, *E. communis*, *E. cypriani*, *E. penduliflora*, *E. rugulosa*, *E. feddei* và *E. strobilifera*. Hai trong số các loài này thì loài *E. ciliata* và *E. myosurus*, cũng thường được sử dụng như là phương thuốc cho điều trị ho.

Một số loài *Elsholtzia* được dùng làm phương thuốc cho chống viêm và giảm đau, chẳng hạn như *E. rugulosa*, *E. penduliflora*, *E. blanda*, *E. bodinieri*, *E. stauntoni*, *E. frnomsa* var. *frnomsa*, *E. myosurus*, *E. densa*, và *E. ciliata*.

Các loài thực vật thuộc chi *Elsholtzia* được biết đến với nhiều công dụng khác nhau và có giá trị dược liệu cao. Nhiều hợp chất phân lập từ chúng được xác định là các thành phần có hoạt tính như flavonoid, terpenoid, các thành phần dễ bay hơi, v.v., có hoạt tính sinh học quan trọng. Các nghiên cứu dược lý hiện đại đã xác nhận rằng thực vật của chi có nhiều tác dụng dược lý bao gồm kháng virus, chống viêm, kháng khuẩn, chống oxy hóa, chống dị ứng, chống khối u, hoạt động giảm đau và chống thiếu máu cơ tim [4, 5]. Ngoài ra, hầu hết các loài đều chứa tinh dầu dễ bay hơi, đã được phát triển làm hương liệu thực phẩm, trà thảo dược, gia vị, đồ uống và

mỹ phẩm [6]. Với sự bùng phát của virus COVID-19 vào năm 2019, virus lây nhiễm bệnh đã trở thành mối quan tâm toàn cầu, việc nghiên cứu và phát triển các thuốc kháng virus xuất hiện. Các nghiên cứu về thực vật tự nhiên đã mang lại nguồn cảm hứng cho việc phát triển các loại thuốc chống virus. Do chúng ít tác dụng phụ, nhiều mục tiêu và ít kháng thuốc, thực vật tự nhiên có tiềm năng lớn trong việc phát triển thuốc kháng virus. Hơn nữa nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng thực vật thuộc chi *Elsholtzia* có lợi ích chống virus và chống viêm. Các nghiên cứu trước đây cũng nhận thấy loài *E. penduliflora* có tác dụng ức chế tốt đối với bệnh viêm phổi nặng do virus gây ra.

Bên cạnh dùng trong điều trị cảm lạnh và sốt, loài *E. rugulosa* còn được dùng như một phương thuốc chữa chứng khó tiêu, đau bụng, viêm dạ dày ruột, kiết lỵ, chảy máu cam, ho ra máu, đau bụng sau sinh, vết thương chảy máu, thối rữa, v.v. Ngoài ra *E. blanda* cũng có sẵn cho viêm gan, kiết lỵ, viêm vôi trứng, viêm amidan, đau răng, viêm dạ dày ruột cấp tính, viêm bề thận cấp tính và mãn tính. Loài *E. penduliflora* thường được dùng làm thuốc chữa bệnh than, nhiễm trùng vết thương, cúm, viêm màng não do dịch, viêm họng, viêm amidan, viêm phổi, viêm phế quản, sốt rét. Loài *E. cypriani* var. *cypriani* được sử dụng như là một phương thuốc cho bệnh sốt xuất huyết. Loài *E. bodinieri* được dùng làm thuốc chữa đau đầu và đau cơ thể, đau họng, đau răng, khó tiêu, kiết lỵ, đau mắt, viêm kết mạc cấp tính, gây mê và viêm gan. Về tác dụng và cách sử dụng của loài *E. heterophylla* cũng được dùng gần giống với loài *E. bodinieri*.

Loài *Elsholtzia splendens* cũng được sử dụng cho đau đầu, đau bụng, nôn mửa, tiêu chảy, bệnh về da. Loài *E. ciliata* var. *ciliata* được sử dụng như một phương thuốc cho viêm dạ dày ruột cấp tính, đau bụng, nôn mửa và tiêu chảy, say nắng vào mùa hè và mùa thu, đau đầu và sốt, hen suyễn và đổ mồ hôi, dịch tả, viêm da, chảy máu cam, chứng hôi miệng, v.v. Loài *E. communis* cũng được dùng làm thuốc chữa đau đầu, khó tiêu. Loài *E. strobilifera* được sử dụng như một phương thuốc để gây ra mồ hôi để làm giảm hội chứng bên ngoài, và loài *E. kachinensis* được sử dụng như một loại rau.

Một ứng dụng quan trọng khác của các loài thực vật này là khả năng phục hồi đất bị ô nhiễm bởi kim loại nặng. Ngày càng có nhiều công trình nghiên cứu đang tập trung vào khả năng phục hồi đất của các loài thuộc chi *Elsholtzia*. Một trong những nghiên cứu đó là loài *E. splendens* (*E. haichowensis*), có khả năng tích

lũy đồng (Cu) bởi chúng phân bố rộng rãi trong chất thải khai thác mỏ đồng và đất bị ô nhiễm đồng ở Trung Quốc [4].

Tại Việt Nam, có khoảng 7 loài với tên gọi có chứa cụm từ kinh giới. Các loài thuộc chi Kinh giới có mặt ở Việt Nam bao gồm các loài sau:

- *Elsholtzia blanda* – kinh giới rừng, chùa dù, tứ phương hao.
- *Elsholtzia ciliata* – kinh giới, hương nhu.
- *Elsholtzia communis* – kinh giới bông, kinh giới hoa bông, cát long thảo.
- *Elsholtzia penduliflora* – kinh giới rủ, kinh giới hoa rủ, chùa dù, đại hoàng dược.
- *Elsholtzia pilosa* – kinh giới lông, hương nhu lông dài.
- *Elsholtzia rugulosa* – kinh giới sần, kinh giới nhám, kinh giới gân nổi, dã bặt tử.
- *Elsholtzia winitiana* – kinh giới đất, kinh giới dày, kinh giới lông trắng, hương nhu trắng.



Elsholtzia blanda

(ảnh tiêu bản từ nguồn)

[Elsholtzia blanda \(Benth.\) Benth. | Plants of the World Online | Kew Science](#)



Elsholtzia ciliata

(ảnh từ nguồn)

[Elsholtzia ciliata \(Thunb.\) Hyl. | Plants of the World Online | Kew Science](#)



Elsholtzia communis

(ảnh tiêu bản từ nguồn)

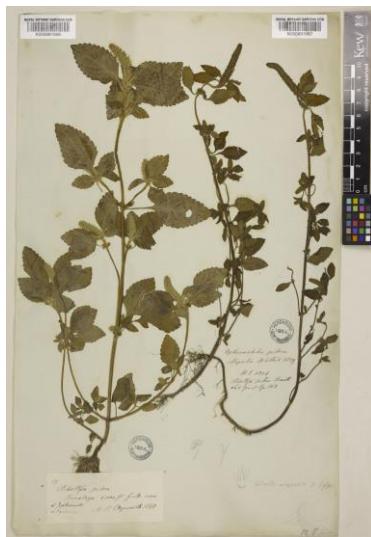
[Elsholtzia communis \(Collett & Hemsl.\) Dunn | Plants of the World Online | Kew Science](#)



Elsholtzia penduliflora

(ảnh từ nguồn)

[Elsholtzia penduliflora W. W. Smith-Chùa rù \(tracuuduoclieu.vn\)](#)



Elsholtzia pilosa

(ảnh tiêu bản từ nguồn)

[Elsholtzia pilosa \(Benth.\) Benth. | Plants of the World Online | Kew Science](#)



Elsholtzia rugulosa

(ảnh từ nguồn)

[Elsholtzia rugulosa Hemsl-Kinh giới nhãn \(tracuuduoclieu.vn\)](#)



Elsholtzia winitiana

(ảnh tiêu bản từ nguồn)

[Elsholtzia winitiana Craib](#) | [Plants of the World Online](#) | [Kew Science](#)

Hình 1.1. Hình ảnh các loài thuộc chi *Elsholtzia* ở Việt Nam

1.3. Thành phần hóa học của chi *Elsholtzia*

Các nhà nghiên cứu đã sử dụng nhiều phương pháp khác nhau để tách chiết, phân lập và xác định đặc tính và định danh để nghiên cứu thành phần hoá học của chi *Elsholtzia*. Đến nay đã có khoảng 221 hợp chất đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Elsholtzia* và có hơn 1008 hợp chất dễ bay hơi của các loài thuộc chi này. Thành phần hóa học của chúng gồm các nhóm chất chính là các flavonoid, coumarin, lignanoid, triterpenoid, steroid, acid béo và tinh dầu. Các nghiên cứu cho thấy flavonoid và các flavonoid-glycoside là thành phần chính trong chi *Elsholtzia* [3, 4]. Bảng dưới đây tổng kết các hợp chất đã được phân lập từ mỗi loài thuộc chi *Elsholtzia*.

Bảng 1.2. Các hợp chất được phân lập từ mỗi loài thuộc chi *Elsholtzia* [4]

TT	Loài	Các hợp chất
1.	<i>E. bodinieri</i>	<u>Flavonoid:</u> 5,7-dihydroxyflavone; acacetin; apigenin; apigenin 7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside; luteolin; glucoluteolin; tricetin, luteolin 7- <i>O</i> - (6''-feruloyl) - β -D-glucopyranoside;

TT	Loài	Các hợp chất
		luteolin 7-<i>O</i>- [6"- (3"-hydroxy-4"-methoxy cinnamoyl)]-β-D- glucopyranoside; quercetin; kaempferol; kaempferol 3-<i>O</i>-rutinnoside; rutin; eriodictyol; eridodictyol 7-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside; eriodictyol 7-<i>O</i>- (6"-feruloyl) -β-D-glucopyranoside; eriodictyol 7-<i>O</i>-[6"- (3"-hydroxy-4"-methoxy cinnamoyl)]-β-D- glucopyranoside; amentoflavone, (+)-catechin; epi-gallocatechin <u>Phenylpropanoids</u>: 5-(3"-methylbutyl)-8-methoxyfuranocoumarin; 6-hydroxy-5,7-dimethoxycoumarin <u>Triterpenoid</u>: caffeic acid; rosmarinic acid, hederagenin; 4-allyl-2, 6-dimethoxyphenol 1-<i>O</i>-β-D-glucoside; oleanolic acid; dodecandral 3-<i>O</i>-β-D-xylopyranoside; hederagenin 3-<i>O</i>-β-D-xylopyranoside; bodinierin C; ciwuJianoside C, mazusaponin I; 2,3,19-trihydroxy urs-12-en-28-oic acid, bodinioside A; bodinioside B; hypadienic acid; ludongnin 5; sandaracopimar-15-en-8b, 12β-diol, (+) -hinokioln; 6-hydroxy-(-)-hardwickiic acid 2'-<i>O</i>-β-D-glucopyranosylbenzyl ester; 6,7-dihydroxy-(-)-hardwickiic acid 2'-<i>O</i>-β-D-glucopyranosylbenzyl ester; dictamnocide G; 3β,5α,11,12,13-pentahydroxy-eudesm-4(15)-ene 3-<i>O</i>-β-D- apiofuranosyl-(1$\rightarrow$4)-α-L-rhamnopyranosyl-(1$\rightarrow$3) -β-D- glucopyranoside; integrifoside A; bodinierin
2.	<i>E. blanda</i>	<u>Flavonoid</u>: 5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone; 5,6-dihydroxy-7-methoxyflavone-6-<i>O</i>-[α-L-rhanmopyranosyl(1$\rightarrow$2)-β-D-fucopyranosyl] glycoside; luteolin; luteolin 5-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside; luteolin 3'-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside; glucoluteolin; luteolin 7-<i>O</i>-β-D-galactoside; isoatragalin; sifanghaoine I; sifanghaoine II, sifanghaoine III; 5,2'-dimethoxy-6,7-methylenedioxy flavanone <u>Triterpenoid</u>: friedeli

TT	Loài	Các hợp chất
3.	<i>E. ciliata</i>	<u>Flavonoid</u>: 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavone; 5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone; negletein; acacetin; acacetin 7-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside; luteolin; kumatakenin; 5-hydroxy-6-methylflavanone 7-<i>O</i>-α-D-galactoside; 5-hydroxy-7, 4'-dimethoxyflavanonol; (+)-catechin <u>Triterpenoid</u>: caffeic acid; ursolic acid, corosolic acid, stearyl ferulate, 2,3,19-trihydroxy urs-12-en-28-oic acid
4.	<i>E. cristata</i>	<u>Flavonoid</u>: 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone-7-<i>O</i>-rutinoside; apigenin; apigenin 7-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside; glucoluteolin
5.	<i>E. densa</i>	<u>Flavonoid</u>: 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone-7-<i>O</i>-rutinoside; acacetin; kaempferol 3-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside; quercetin 3-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside; 3"-hydroxy-4", 5"-dimethoxyfuranoflavone; 3",4",5"-trimethoxyfuranoflavone; 5-hydroxy-3'-methoxyflavanone-7-<i>O</i>-rutinoside; 5-hydroxy-7, 4'-dimethoxyflavanonol <u>Phenylpropanoids</u>: 5-(3"-methylbutyl)-8-methoxyfuranocoumarin; 5-(3"-hydroxy-3-methylbutyl)-8-methoxyfuranocoumarin; 5-(3", 3"-dimethylallyl)-8-methoxyfuranocoumarin, 9-<i>O</i>-isopropyl-4-methoxypsoralen
6.	<i>E. eriostachya</i>	<u>Flavonoid</u>: 5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone-7-<i>O</i>-rutinoside; luteolin 5-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside; glucoluteolin; morin 7-<i>O</i>-β-D-glucopyranoside; hyperoside; isoskuranetin 7-<i>O</i>-β-D-neohesperidoside <u>Lignan</u>: 3-hydroxyarctiin; aretigenin
7.	<i>E. ianthina</i>	<u>Flavonoid</u>: kaempferol <u>Lignan</u>: saussurenoside <u>Triterpenoid</u>: oleanolic acid
8.	<i>E.</i>	<u>Flavonoid</u>: 4',5-dihydroxy-7-methoxyflavone; 5-hydroxy-

TT	Loài	Các hợp chất
	<i>rugulosa</i>	4',6,7-trimethoxyflavone; acacetin 7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside; apigenin; apigenin 4'- <i>O</i> - α -D-glucopyranoside; apigenin 7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside; apiin; luteolin; luteolin 3'- <i>O</i> - β -D-glucuronide; glucoluteolin; 5,6-dihydroxy-3',4',7,8-tetramethoxyflavone; luteolin 7- <i>O</i> - (6"-acetyl) - β -D-glucopyranoside; luteolin 3'- <i>O</i> - β -D-glucuronide-6"-methylester; 7,4'-dimethoxy kaempferol; quercetin; kaempferol; quercetin 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside; quercetin 3- <i>O</i> - β -D-glucuronide-6"-methylester; 5,7,3', 4'-tetrahydroxy-8-prenylflavone; 5,7,3',4'-tetrahydroxy-5'-C-prenylflavone 7- <i>O</i> - β -D-glucoside <u>Triterpenoid:</u> caffeic acid; rosmarinic acid, maslinic acid; oleanolic acid, ursolic acid, corosolic acid; betulinic acid
9.	<i>E. stauntonii</i>	<u>Flavonoid:</u> 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavone; 5,7-dimethoxyl-4'-hydroxyflavone; 5,7,3',6'-tetrahydroxy-8,2'-dimethoxyflavone; 5-hydroxy-7,5'-dimethoxy-6,8-dimethyl-3' 4'-methylenedioxy flavone; quercetin 3- <i>O</i> - β -D-gal (6 $\rightarrow$ 1) - α -L-rha; isorhartmetin 3- <i>O</i> -rutinoside; muxiangrine III; 5-hydroxy-7-methoxy-8-methyl-3', 4'-methylenedioxy-5'- (3-methyl-but-2-enyl)-3',4'-methylenedioxy flavone; muxiangrine I; muxiangrine II; 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanonol; iso-formononetin 4'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside <u>Phenylpropanoids:</u> 5-(3"-methylbutyl)-8-methoxyfuranocoumarin
10.	<i>E. splendens</i>	<u>Flavonoid:</u> 5-hydroxy-6,7-dimethoxyflavone; 5,6-dihydroxy-7,8-dimethoxyflavone, 5-hydroxy-7,8-dimethoxyflavone

1.3.1. Nhóm các hợp chất flavonoid và phenolic

Các hợp chất flavonoid luôn được đánh giá là những chất có tác dụng sinh

học thú vị. Từ chi *Elsholtzia*, có hơn 90 hợp chất thuộc nhóm flavonoid đã được phân lập và được ghi nhận là nhóm hợp chất nhiều nhất trong tất cả các chất chuyển hóa thứ cấp có nguồn gốc từ chi này [3]. Bộ khung chủ yếu của chúng là flavones, flavanones, prenyl-flavones, furanoflavones, pyran flavonoids và isoflavones. Ngoài ra các nhóm thế của chúng chủ yếu là phenolic hydroxyl, methoxy, butyryloxy, isopentenyl, subunitdioxy, methyl... Các flavonoid glycosides trong chi đều là oxygen glycosides. Aglycones của chúng bao gồm chrysin, apigenin, luteolin, kaempferol, quercetin, rhamnetin, rhamnan citrin, và các glycones bao gồm D-glucose, D-galactose, L-rhamnose, D-xylose [7]. Dưới đây là danh sách các hợp chất flavonoid đã được phân lập từ chi *Elsholtzia*.

Bảng 1.3. Các hợp chất flavonoid được phân lập từ chi *Elsholtzia* [3]

Tên chất	Từ các loài
5-hydroxy-6, 7-dimethoxyflavone	<i>E. splendens</i> , <i>E. stauntonii</i> , <i>E. blanda</i> , <i>E. ciliata</i>
5, 6-dihydroxy-7, 8-dimethoxyflavone	<i>E. splendens</i>
5-hydroxy-7, 8-dimethoxyflavone	<i>E. splendens</i> , <i>E. blanda</i> <i>E. ciliata</i>
5, 7-dihydroxyflavone	<i>E. bodinieri</i>
negletein	<i>E. ciliata</i>
5, 6-dihydroxy-7-methoxyflavone -6-O- [α -L-rhammopyranosyl (1→2) - β -D-fucopyranosyl] glycoside	<i>E. blanda</i>
4', 5-dihydroxy-7-methoxyflavone	<i>E. rugulosa</i>
5-hydroxy-4', 6, 7-trimethoxyflavone	<i>E. rugulosa</i>
acacetin	<i>E. densa</i> , <i>E. bodinieri</i> , <i>E. ciliata</i>
5, 7-dihydroxy-4'-methoxyflavone-7-O-rutinoside	<i>E. densa</i> , <i>E. cristata</i> , <i>E. eriostachya</i>
acacetin 7-O- β -D-glucopyranoside	<i>E. ciliata</i> , <i>E. rugulosa</i>

apigenin	<i>E. bodinieri</i> , <i>E. ciliata</i> <i>E. rugulosa</i> , <i>E. cristata</i>
apigenin 4'- <i>O</i> - α -D-glucopyranoside	<i>E. rugulosa</i>
apigenin 7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>E. bodinieri</i> , <i>E. rugulosa</i> , <i>E. cristata</i>
apiin	<i>E. rugulosa</i>
luteolin	<i>E. bodinieri</i> , <i>E. rugulosa</i> , <i>E. ciliata</i> , <i>E. blanda</i>
luteolin 5- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>E. blanda</i> , <i>E. eriostachya</i>
luteolin 3'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>E. blanda</i>
luteolin 3'- <i>O</i> - β -D- glucuronide	<i>E. rugulosa</i>
glucoluteolin	<i>E. bodinieri</i> , <i>E. eriostachya</i> , <i>E. rugulosa</i> , <i>E. blanda</i> , <i>E. cristata</i>
luteolin 7- <i>O</i> - β -D-galactoside	<i>E. blanda</i>
5, 7-dimethoxyl-4'-hydroxyflavone	<i>E. stauntonii</i>
5, 7, 3', 6'-tetrahydroxy-8, 2'-dimethoxyflavone	<i>E. stauntonii</i>
5, 6-dihydroxy-3', 4', 7, 8-tetramethoxyflavone	<i>E. rugulosa</i>
5-hydroxy-7, 5'-dimethoxy-6, 8-dimethyl-3', 4'-methylenedioxy flavone	<i>E. stauntonii</i>
tricin	<i>E. bodinieri</i>
luteolin 7- <i>O</i> - (6"-acetyl) - β -D-glucopyranoside	<i>E. rugulosa</i>
luteolin 7- <i>O</i> - (6"-feruloyl) - β -D-glucopyranoside	<i>E. bodinieri</i>
luteolin 7- <i>O</i> - [6"- (3'''-hydroxy-4'''-methoxy cinnamoyl)] - β -D- glucopyranoside	<i>E. bodinieri</i>
luteolin 3'- <i>O</i> - β -D-glucuronide-6"-methylester	<i>E. rugulosa</i>
kumatakenin	<i>E. ciliata</i>
7, 4'-dimethoxy kaempferol	<i>E. rugulosa</i>

quercetin	<i>E. rugulosa</i>
	<i>E. bodinieri</i>
kaempferol	<i>E. rugulosa</i> , <i>E. bodinieri</i> , <i>E. ianthina</i>
morin 7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>E. eriostachya</i>
kaempferol 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>E. densa</i>
isoatragalin	<i>E. blanda</i>
kaempferol 3- <i>O</i> -rutinnoside	<i>E. bodinieri</i>
quercetin 3- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>E. densa</i> , <i>E. rugulosa</i>
rutin	<i>E. bodinieri</i>
hyperoside	<i>E. eriostachya</i>
quercetin 3- <i>O</i> - β -D-gal (6 $\rightarrow$ 1) - α -L-rha	<i>E. stauntonii</i>
isorhartmetin 3- <i>O</i> -rutinoside	<i>E. stauntonii</i>
quercetin 3- <i>O</i> - β -D-glucuronide-6"-methylester	<i>E. rugulosa</i>
5, 7, 3', 4'-tetrahydroxy-8-prenylflavone	<i>E. rugulosa</i>
5, 7, 3', 4'-tetrahydroxy-5'-C-prenylflavone 7- <i>O</i> - β -D-glucoside	<i>E. rugulosa</i>
muxiangrine III	<i>E. stauntonii</i>
5-hydroxy-7-methoxy-8-methyl-3', 4'-methylenedioxy-5'- (3-methyl-but-2-enyl) -3', 4'-methylenedioxy flavone	<i>E. stauntonii</i>
3"-hydroxy-4", 5"-dimethoxyfuranoflavone	<i>E. densa</i>
3", 4", 5"-trimethoxyfuranoflavone	<i>E. densa</i>
muxiangrine I	<i>E. stauntonii</i>
muxiangrine II	<i>E. stauntonii</i>
sifanghaoine I	<i>E. blanda</i>
sifanghaoine II	<i>E. blanda</i>

sifanghaoine III	<i>E. blanda</i>
eriodictyol	<i>E. bodinieri</i>
5-hydroxy-6-methylflavanone 7- <i>O</i> - α -D-galacoside	<i>E. ciliata</i>
eridodictyol 7- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>E. bodinieri</i>
eriodictyol 7- <i>O</i> - (6'''-feruloyl) - β -D-glucopyranoside	<i>E. bodinieri</i>
eriodictyol 7- <i>O</i> - [6''- (3'''-hydroxy-4'''-methoxy cinnamoyl)] - β -D- glucopyranoside	<i>E. bodinieri</i>
isokuranetin 7- <i>O</i> - β -D-neohesperidoside	<i>E. eriostachya</i>
5-hydroxy-3'-methoxyflavanone-7- <i>O</i> -rutinoside	<i>E. densa</i>
5, 2'-dimethoxy-6, 7-methylenedioxy flavanone	<i>E. blanda</i>
5-hydroxy-7, 4'-dimethoxyflavanonol	<i>E. stauntonii</i> , <i>E. ciliata</i> , <i>E. densa</i>
iso-formononetin 4'- <i>O</i> - β -D-glucopyranoside	<i>E. stauntonii</i>
amentoflavone	<i>E. bodinieri</i>
(+) –catechin	<i>E. bodinieri</i> , <i>E. ciliata</i>
epi-gallocatechin	<i>E. bodinieri</i>

Có 30 hợp chất có khung flavon (ký hiệu **1** đến **30**), trong đó các nhóm gắn với khung flavon có thể là các nhóm hydroxy, methoxy hoặc các nhóm glycosyl, các nhóm thế có chứa oxy thường gắn vào vị trí C-3, C-5 và C-7 tuy nhiên cũng có thể nhóm hydroxy, methoxy hoặc glycosyl gắn với C-6 như ở các hợp chất 1, 2, 5, 6, 8. Mười bốn hợp chất có khung flavonol (**31** đến **44**), trong đó tại vị trí C-3 thường là các nhóm hydroxy hoặc glycosyl có thể là glucopyranosyl, galactosyl hoặc rhamnopyranosyl. Bốn hợp chất dạng prenyl-flavonoid (**45- 48**) có nhóm **prenyl** (3-methylbut-2-en-1-yl) gắn với C-8 (**45**) hoặc C-5'. Hai hợp chất dạng methoxyfuranoflavone là 3''-hydroxy-4'', 5''-dimethoxyfuranoflavone (**49**) và 3'', 4'', 5''-trimethoxyfuranoflavone (**50**) cũng đã được phân lập từ chi này.

Các hợp chất có từ **51** đến **55** đều được đặc trưng là hợp chất gem-

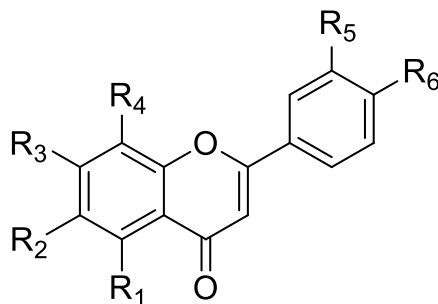
dimethylchromene và một hydroxyl gắn vào C-3' và C-4' của vòng B. Hợp chất 5'-dihydroxy-7-acetoxyl-6,8,3",3"-tetramethylpyran-(3',4') flavon (**53**) và 5,5'-dihydroxy-7- (α -methyl) butyroxyl-6,8,3",3"-tetramethylpyran-(3', 4') flavone (**54**) có cấu trúc tương tự nhau. Sự phân biệt là **53** được liên kết bởi một nhóm acetate ở vị trí C-7, trong khi **54** được liên kết bởi một phân tử butyroxyl (α -methyl). Một methylenedioxy được thay thế vị trí C-6 và C-7 trong 5,5'-dihydroxy-6,7-methylenedioxy-8,3",3"-trimethylpyran- (3',4')flavone (**55**).

Tám flavanon (**56- 63**) và một flavanonol (**64**) được tìm thấy trong chi này. Hợp chất **58-62** có nhóm glycosyl gắn ở vị trí C-7. Hợp chất **59** có nhóm feruloyl được gắn vào vị trí glucosyl C-6"; hợp chất **60** là một đồng phân của **59** với các nhóm -OCH₃ và -OH ở vị trí C-3''' và C-4'''.

Hợp chất **69-73** là các furanocoumarin, các hợp chất **69- 72** chứa một nhóm prenyl hoặc dẫn xuất prenyl ở vị trí C-5 và nhóm methoxy ở vị trí C-8.

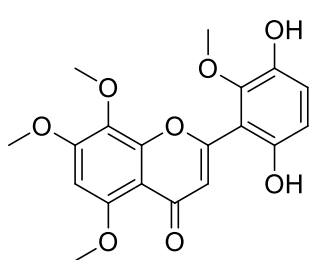
Chỉ có ba hợp chất dạng lignanolides được tìm thấy trong chi này đó là 3-hydroxyarctiin (**75**), arctigenin (**76**) và saussurenoside (**77**).

Cấu trúc của các hợp chất được mô tả ở hình sau:

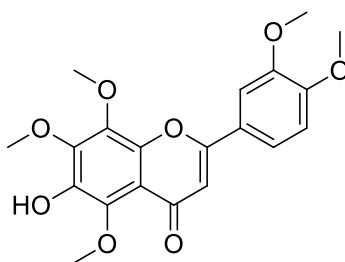


No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
1	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H
2	OH	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H
3	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
4	OH	H	OH	H	H	H
5	OH	OH	OCH ₃	H	H	H
6	OH	<i>O</i> - β -D-fuc (2-1) α -L-rha	OCH ₃	H	H	H
7	OH	H	OCH ₃	H	H	OH
8	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃
9	OH	H	OH	H	H	OCH ₃

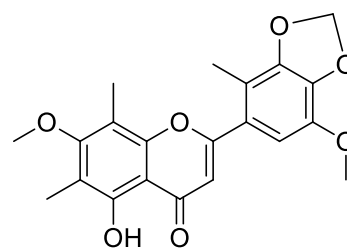
10	OH	H	<i>O</i> -β-D-glc (6-1) α-L-rha	H	H	OCH ₃
11	OH	H	<i>O</i> -β-D-glc	H	H	OCH ₃
12	OH	H	OH	H	H	OCH ₃
13	OH	H	OH	H	H	<i>O</i> -α-D-gal
14	OH	H	<i>O</i> -β-D-glc	H	H	OH
15	OH	H	<i>O</i> -β-D-glc (2-1) β-D-api	H	H	OCH ₃
16	OH	H	OH	H	OH	OH
17	<i>O</i> -β-D-glc	H	OH	H	OH	OH
18	OH	H	OH	H	<i>O</i> -β-D-glc	OH
19	OH	H	OH	H	<i>O</i> -β-D-glcA	OH
20	OH	H	<i>O</i> -β-D-glc	H	OH	OH
21	OH	H	<i>O</i> -β-D-gal	H	OH	OH
22	OCH ₃	H	OCH ₃	H	H	OH



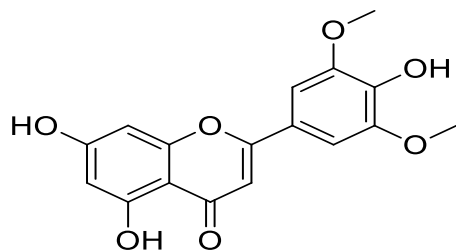
23



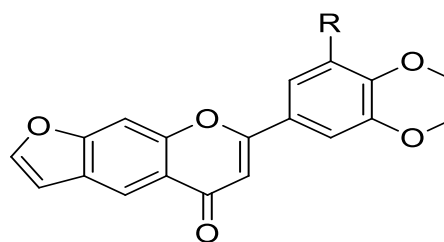
24

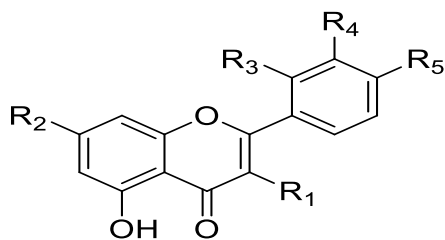


25

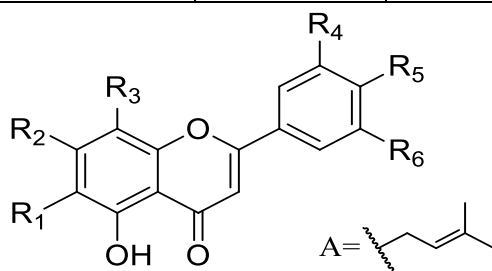


26

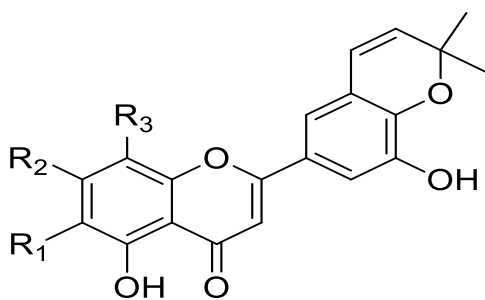
49 R= OH 50 R= OCH₃



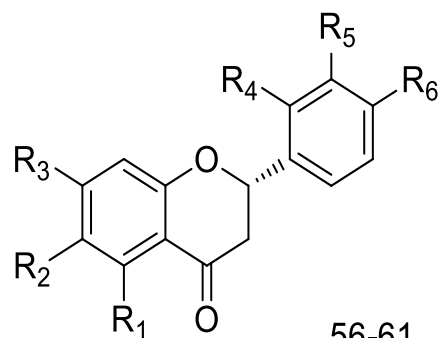
No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
31	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH
32	OH	OCH ₃	H	H	OCH ₃
33	OH	OH	H	OH	OH
34	OH	OH	H	H	OH
35	OH	<i>O</i> -β-D-glc	OH	H	OH
36	<i>O</i> -β-D-glc	OH	H	H	OH
37	<i>O</i> -α-D-glc	OH	H	H	OH
38	<i>O</i> -β-D-glc (6-1) α-L-rha	OH	H	H	OH
39	<i>O</i> -β-D-glc	OH	H	OH	OH
40	<i>O</i> -β-D-glc (6-1) α-L-rha	OH	H	OH	OH
41	<i>O</i> -β-D-gal	OH	H	OH	OH
42	<i>O</i> -β-D-gal (6-1) α-L-rha	OH	H	OH	OH
43	<i>O</i> -β-D-glc (6-1) α-L-rha	OH	H	H	OH



No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
45	H	OH	A	OH	OH	H
46	H	<i>O</i> -β-D-glc	H	OH	OH	A
47	CH ₃	OCH ₃	CH ₃	OH	OH	A
48	H	OCH ₃	CH ₃	O-CH ₂ -O		A

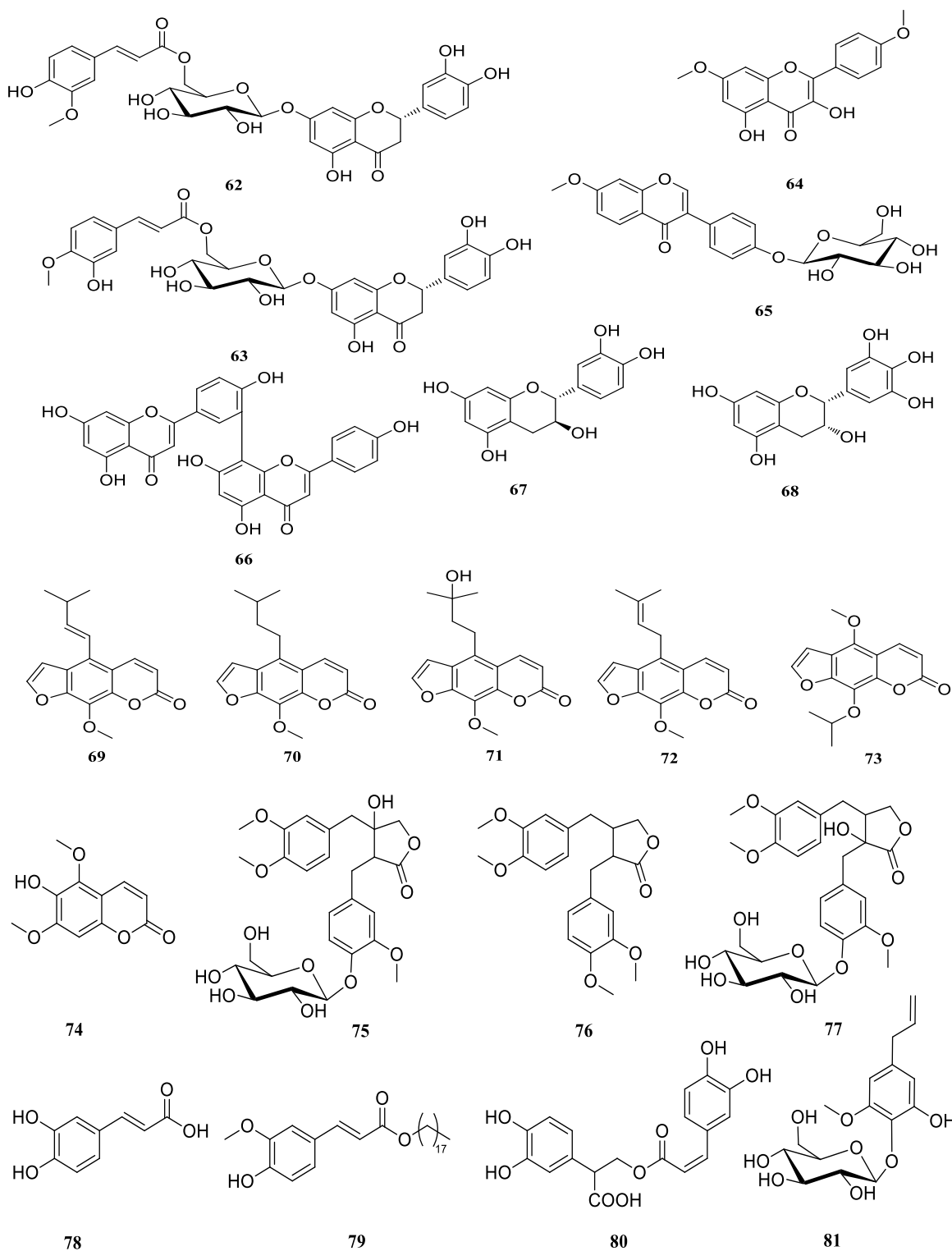


51-55



56-61

No.	R ₁	R ₂		R ₃		
51	CH ₃	OCH ₃		CH ₃		
52	CH ₃	OCH ₃		H		
53	CH ₃	OOCCH ₃		CH ₃		
54	CH ₃	COCH(CH ₃)CH ₂ CH ₃		CH ₃		
55	O-CH ₂ -O			CH ₃		
No.	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
56	OH	H	OH	H	OH	OH
57	OH	CH ₃	<i>O</i> -α-D-glc	H	H	H
58	OH	H	<i>O</i> -β-D-glc	H	OH	OH
59	OH	H	<i>O</i> -β-D-glc (2-1) α-L-rha	H	H	OCH ₃
60	OH	H	<i>O</i> -β-D-glc (2-1) α-L-rha	H	OCH ₃	H
61	OCH ₃	O-CH ₂ -O		OCH ₃	H	H



1.3.2. Nhóm các hợp chất terpenoid, steroid, phenolic và các hợp chất khác

Các hợp chất triterpenoid cũng được tìm thấy trong nhiều loài thuộc chi này [3, 4]. Các hợp chất triterpene khung oleanane (**82-89**) cho thấy nhóm glycosyl được liên kết với C-28 ($-\text{COO}-$) của axit 23-hydroxyechinocystic bằng liên kết ester như trong trường hợp của các hợp chất **87- 89**. Vị trí C-3 được gắn với một

caffeoyl trong hợp chất **87** và liên kết với một arabinosyl trong **88** và **89** tương ứng. Ba triterpen khung ursane bao gồm axit ursolic (**90**), axit corosolic (**91**) và axit 2 α ,3 β ,19 α -trihydroxyurs-12-en-28-oic (**92**) cũng thấy khá phổ biến trong các loài thuộc chi *Elsholtzia*. Đặc biệt khi hai hợp chất khung unusual glycopyranosides 18,19-seoursane là bodiniosides A (**93**) và B (**94**) được tìm thấy cũng cho ta biết sự có mặt của cấu trúc của các dạng hợp chất này có trong thành phần các hợp chất flavonoid được phân lập từ họ Lamiaceae.

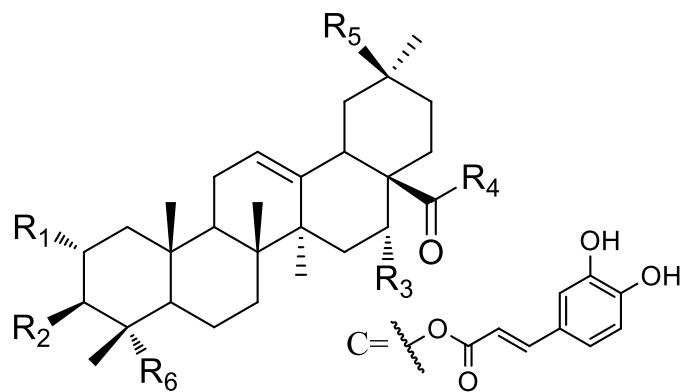
Các hợp chất **98-102** là các diterpenoid như ludongnin 5 (**98**) là một diterpenoid tetracyclic kaurane, được kết nối với một γ -lactonic ở vị trí C6-C19. Hợp chất sandaracopimar-15-en-8 β ,12 β -diol (**99**) là một pimarane diterpenoid ba vòng. Một diterpenoid loại abietane là (+)- hinokiol (**100**) là một diterpenoid có cấu trúc khá nhỏ có trong thực vật. Hai hợp chất glycopyranoside axit hardwickiic là 6-hydroxy (-)-axit hardwickiic 2'-O- β -D-glucopyranosylbenzyl este (**101**) và 6,7-dihydroxy(-)- hardwickiic axit 2'-O- β -D-glucopyranosylbenzyl este (**102**) là hai chất thuộc kiểu clerodane diterpenoids.

Ba hợp chất sesquiterpene glycopyranoside là dictamnocide G (**103**), 3 β , 5 α , 11,12,13-pentahydroxy-eudesm-4(15)-ene 3-O- β -D-apiofuranosyl- (1-4) - α -L-rhamnopyranosyl- (1-3) - β -D-glycopyranoside (**104**) và integrifoside A (**105**).

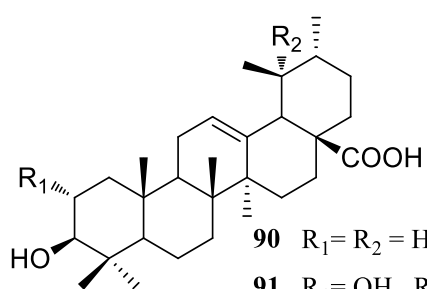
Cho đến nay, trong chi này chỉ mới thấy có một monoterpenoid là 2,6-dimethyl-8-hydroxyl-2,6-octadienic axit-8- O - β -D-glucoside (**106**).

Chỉ có ba hợp chất (**107 -109**) có chứa nguyên tử nitơ là prunasin (**107**) và amygdalin (**108**) là các glycoside cyanogenic. Ba hợp chất dạng glycosides maltol là maltol 3-O- β -D-glucopyranoside (**110**), maltol 6'-O- β -D-apiofuranosyl- β -D-glucopyranoside (**111**) và maltol 6'-O-(5-O-p-coumaroyl)- β -D-apiofuranosyl- β -D-glucopyranoside (**112**). Hợp chất **112** liên kết với một cinnamoyl cũng được phân loại trong nhóm C6-C3. Bốn phytosterol (**113- 116**) và một dẫn xuất hydroxyl hóa của stilbene, *trans* -3,4,3',5'-tetrahydroxy-4'-metyl-stilbene 4-O- β -D-xylopyranosyl- (1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glucopyranoside (**130**) cũng đã tìm thấy.

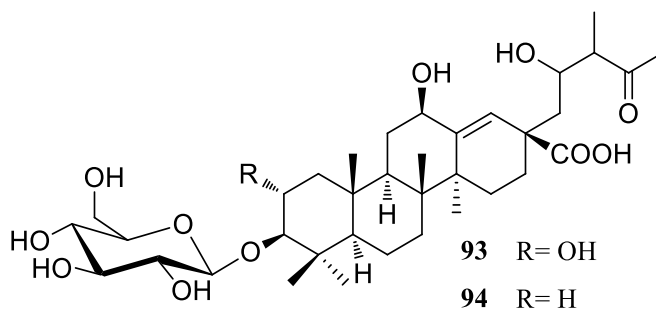
Dưới đây là cấu trúc của các hợp chất:



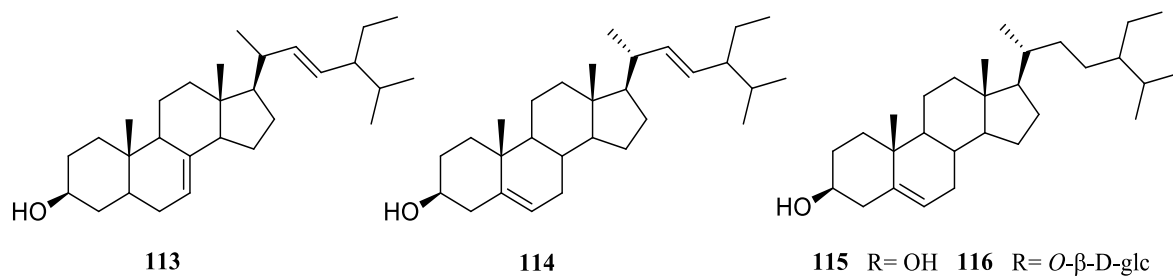
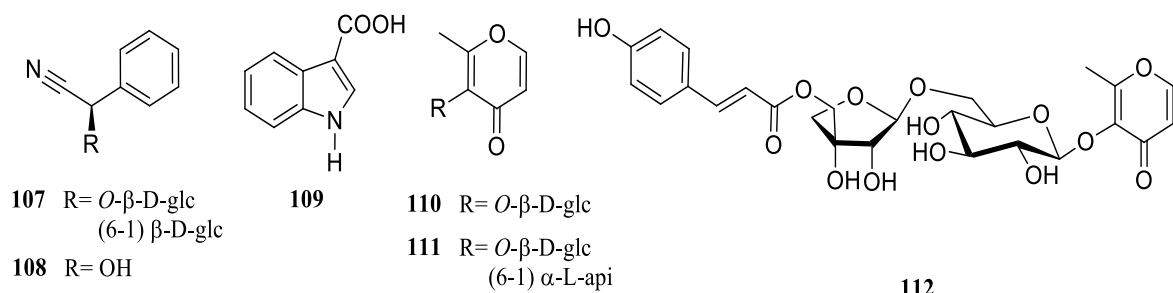
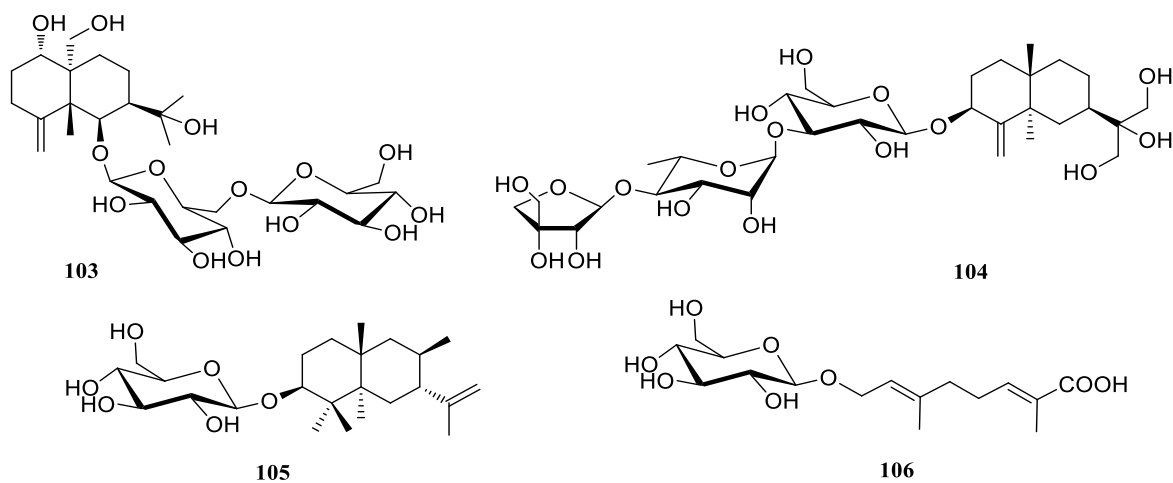
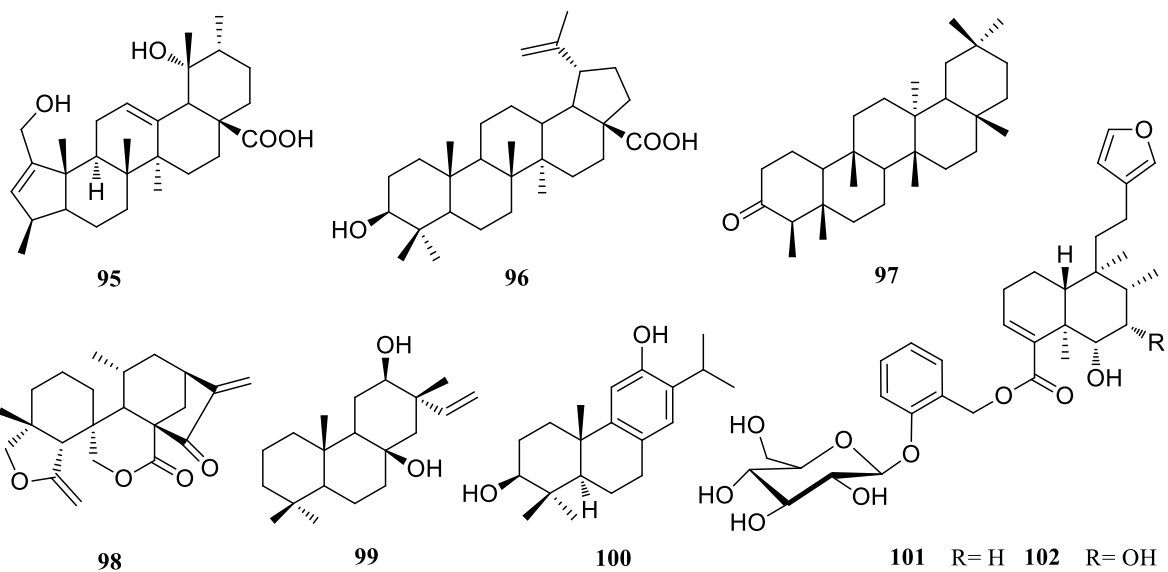
No.	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
82	H	OH	H	OH	CH ₃	CH ₃
83	OH	OH	H	OH	CH ₃	CH ₃
84	H	OH	H	OH	CH ₃	CH ₂ OH
85	H	<i>O</i> - β -D-xyl	H	OH	CHO	CH ₃
86	H	<i>O</i> - β -D-xyl	H	OH	CH ₃	CH ₂ OH
87	OH	C	OH	<i>O</i> - β -D-glc (6-1) β -D-glc (4-1) α -L-rha	CH ₃	CH ₂ OH
88	H	<i>O</i> - α -L-ara	H	<i>O</i> - β -D-glc (6-1) β -D-glc (4-1) α -L-rha	CH ₃	CH ₂ OH
89	H	<i>O</i> - α -L-ara	H	<i>O</i> - β -D-glc (6-1) β -D-glc	CH ₃	CH ₃

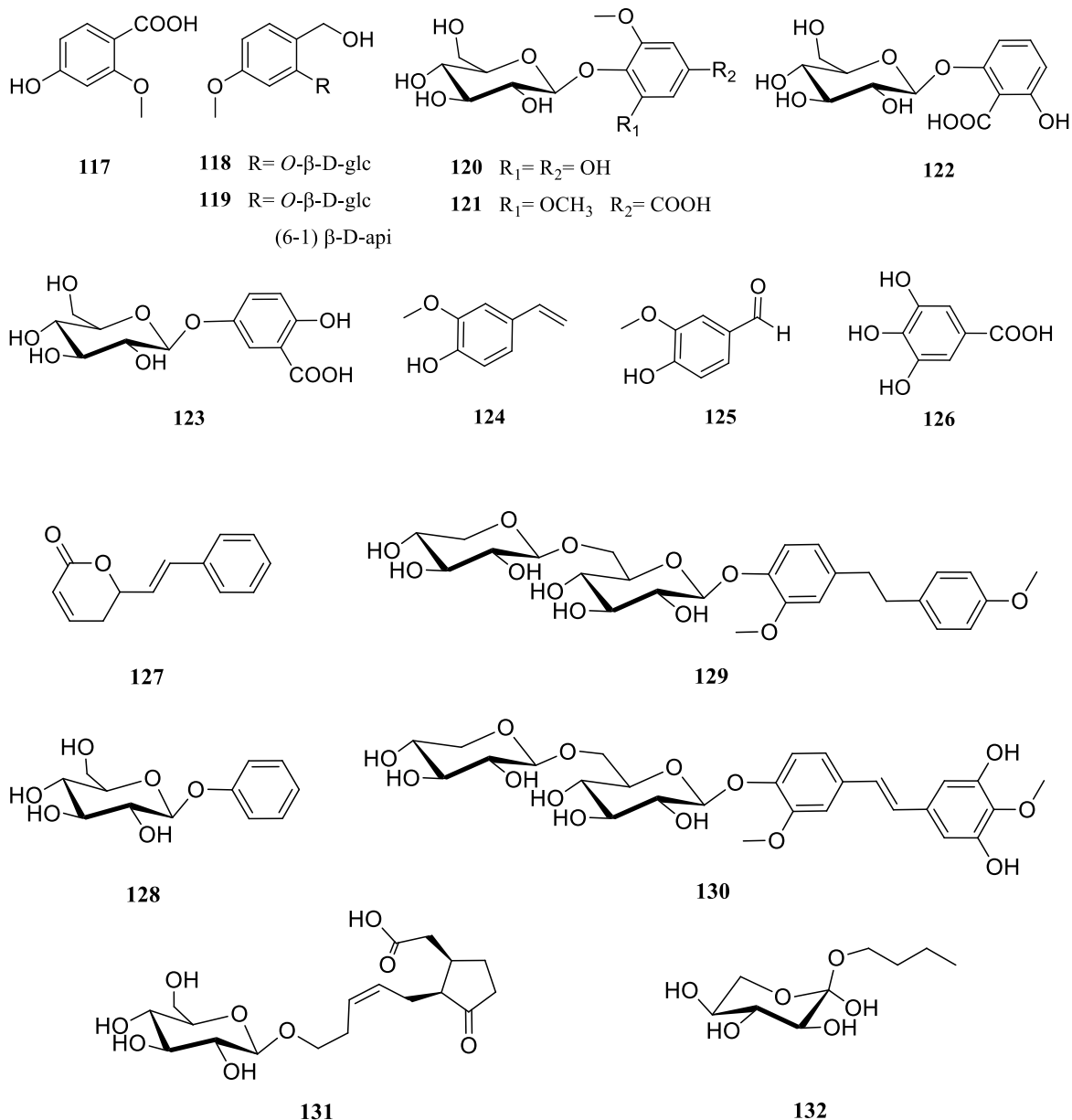


- 90** $R_1 = R_2 = H$
91 $R_1 = OH$ $R_2 = OH$
92 $R_1 = R_2 = OH$



- 93** $R = OH$
94 $R = H$





1.3.3. Thành phần hóa học của tinh dầu (các hợp chất dễ bay hơi)

Các loài trong chi *Elsholtzia* là các loại thảo mộc thơm nói chung, vì chúng chứa tinh dầu. Các loại tinh dầu đã được phát triển và ứng dụng làm thuốc, gia vị thực phẩm và còn là nguồn gốc của tạo thành mật ong [2]. Nhiều nhà khoa học và dược lý ngày càng quan tâm đến các thành phần dễ bay hơi và các hoạt tính sinh học của các loài thuộc chi này.

Các bộ phận (trừ rễ) của các loài thuộc chi *Elsholtzia* cho mùi thơm dễ chịu bởi chúng chứa hàm lượng tinh dầu khá lớn. Cho tới năm 2022, đã có 1008 thành phần dễ bay hơi có trong tinh dầu của các loài thuộc chi này đã được nhật biết bằng kỹ thuật sắc ký khí khối phổ (GC-MS) [3]. Trong đó có các hợp chất terpenoid

chiếm ưu thế với 583 terpenoid, 221 hợp chất aliphatic, 130 hợp chất thơm, 33 thành phần có chứa lưu huỳnh và nitơ; các terpenoid chủ yếu thuộc nhóm monoterpen, sesquiterpen. Danh mục thành phần các hợp chất có trong phần phụ lục.

Các thành phần thường thấy có mặt trong tinh dầu của nhiều loài là: 1,8-cineole, linalool, limonene, *Elsholtzia* ketone, α -pinene, β -pinene, camphene, sapinene, myrcene, α -terpinene, α -terpineol, γ -terpinene, β -caryophyllene, caryophyllene oxide, humulene, geracrene D, eucalyptol, pathulenol, β -cadinene, thymol, eugenol, p-cymene, acetophenone; chúng có mặt trong tinh dầu của 25 loài. Đặc biệt hai hợp chất α -pinene và β -pinene là hai chất có ý nghĩa nhất, được phát hiện và xác định trong 15 loài trong chi [3]. Acetophenone, caryophyllen oxit, carvacrol, benzaldehyde, β -caryophyllene, α -phellandrene và α -terpineol cũng là những chất chính có trong tinh dầu. Tuy nhiên tùy theo từng loài, môi trường phát triển, thời gian thu hoạch, phương pháp chiết xuất và phương pháp phân tích sẽ ảnh hưởng tới hàm lượng và chất lượng của tinh dầu. Ví dụ, hợp chất α -pinen trong loài *E. blanda* lên tới 4,84% khi thu hái ở tỉnh Vân Nam (TQ) và giảm xuống 1,43% khi thu hái ở tỉnh Tứ Xuyên, Trung Quốc [4].

Nghiên cứu gần đây đã báo cáo rằng các thành phần dễ bay hơi gây ức chế mạnh mẽ chống lại hệ thần kinh trung ương và có tác dụng giảm đau hiệu quả [5], tác dụng kháng khuẩn [4].

1.4. Hoạt tính sinh học

Hoạt tính sinh học của các loài trong chi này cho thấy phổ hoạt tính khá rộng. Với các phần căn chiết và các chất sạch được phân lập từ các loài thuộc chi này đã được nghiên cứu, đánh giá các hoạt tính như kháng virus, kháng khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa và bảo vệ thiếu máu cục bộ cơ tim,... Các nhà nghiên cứu ngày càng quan tâm đến các hoạt tính của các loài trong chi này.

Bảng 1.4. Hoạt tính sinh học của một số loài thuộc chi *Elsholtzia*

Loài	Phần	Hoạt tính sinh học	TLTK
<i>E. argyi</i> H.L'ev	-	Kháng khuẩn, chống ăn mòn	[8]
<i>E. blanda</i> (Benth.) Benth	Toàn bộ	Tăng cường hệ thống miễn dịch, kháng khuẩn, kết ly, viêm thận, viêm	[9]; [10]; [11]

		gan, viêm họng, viêm ruột cấp tính	
	Lá	Tiêu chảy, tình trạng ngứa, bong gân	[12]; [13]; [14]
	Tinh dầu	Sốt, dịch tả, bệnh ngoài da, viêm nhiễm	[15], [16]
	Hoa	Thiếu máu cơ tim	[17]
<i>E. bodinieri</i> Vaniot	Toàn bộ	HCV, cholesterol cao, khó tiêu, chống oxy hóa, ho, nhức đầu, viêm họng, sốt, viêm gan, đau răng, tiêu chảy, đau mắt	[18]; [19]; [20]; [7]; [21]; [22]
	Lá và thân	Viêm thanh quản	[23]
	Rễ	Kháng khuẩn	[24]
<i>E. capituligera</i> C. Y.Wu	Toàn bộ	Chất chống oxy hóa, kháng khuẩn, viêm, sốt, nhức đầu, tiêu chảy, phù nề, bệnh ngoài da, bệnh đường tiêu hóa, muỗi đốt	[25]; [26]; [27]; [28]
<i>E. ciliata</i> (Thunb.) Hyl.	Toàn bộ	Viêm, đau, cầm máu	[29]
	Tinh dầu	Nhiễm khuẩn, đau, an thần, co thắt, cúm	[30]; [31]; [32].
<i>E. communis</i> (Collett & Hemsl.) Diels	Lá	Kháng virus, kháng khuẩn, chống viêm, chống oxy hóa, bảo vệ cơ tim khỏi thiếu máu cục bộ	[33]
<i>E. cyprianii</i> (Pavol.) C.Y. Wu & S.Chow	Trên mặt đất	Chống oxy hóa, kìm khuẩn	[34]
<i>E. densa</i> Benth.	Lá	Kháng khuẩn, kháng virus	[35]
	Lá và hạt	Bỏng, vết cắt, bệnh ngoài da, tiêu chảy, nhiễm giun	[36]
<i>E. eriocalyx</i> C.Y. Wu & S.C. Huang	Toàn bộ	Kháng khuẩn; Chữa lành các rối loạn vết thương, da và đờm	[37]

<i>E. eriostachya</i> (Benth.) Benth	Toàn bộ	Loại bỏ ký sinh trùng đường ruột, rong kinh và các bệnh gây bệnh trong tử cung	[38]; [39]
<i>E. flava</i> Benth.	Lá	Côn trùng cắn	[40]
	Hoa	Bệnh ngoài da, tiêu chảy, đau bụng	[40]
	Hạt	Ho, viêm phế quản	[41]
<i>E. fruticosa</i> (D. Don) Rehder	Hoa	Các vấn đề về da, giải độc	[27]
	Rễ		[16]
	Hạt	Thuốc giảm đau thần kinh tọa	[42]
<i>E. penduliflora</i> W.W.Sm.	Toàn bộ	Viêm phế quản, cúm, ung thư, ức chế sản sinh NO	[18], [43]
<i>E. pilosa</i> (Benth.) Benth.	Chồi	Kháng khuẩn	[35]
<i>E. rugulosa</i> Hemsl	Toàn bộ	Kháng khuẩn, nhức đầu, sốt, đau bụng, nôn mửa, tiêu chảy, phù nề, inchacao	[44]; [45]
	Lá	Cúm, ung thư, viêm hầu họng	[5]; [23]
<i>E. splendens</i> Nakai ex F. Maek.	Tinh dầu	Chống oxy hoá Kháng khuẩn, đau nhức, thuốc an thần	[4]; [30]
	Toàn bộ	Chống oxy hóa, viêm, trầm cảm, lo âu, bất ổn (tiền kinh nguyệt)	[46]; [47], [48]
	Hoa	Chống oxy hoá, bảo vệ gan	[49]
<i>E. strobilifera</i> (Benth.) Benth.	Toàn bộ	Làm lành vết thương, vết bầm tím	[42]; [50]
<i>E. winitiana</i> Craib	Lá	Ung thư, ngộ độc thực phẩm, chó cắn, sỏi, nhức đầu, cảm lạnh	[14]; [51]

1.4.1. Hoạt tính kháng virus

Bệnh cảm cúm cùng với sự bùng phát của Covid-19 đã làm cho các nhà khoa học ngày càng quan tâm về cách ngăn ngừa và điều trị các bệnh do virus. Nguồn thực vật từ tự nhiên đã cho thấy tiềm năng của nguồn thuốc điều trị virus hoặc

nguồn con kháng lại virus. Cặn chiết ethyl acetate và các hợp chất apigenin, apiin, luteolin, galuteolin, luteolin 3'-glucuronyl, methyl ester của loài *E. rugulosa* thể hiện ức chế đáng kể chống lại các neuraminidases (Nas) ba loại virus cúm điển hình A/PR/8/34 (H1N1), A/Tế Nam/15/90 (H3N2) và B/Giang Tô/10/2003. Chúng ức chế các NAs ở nồng độ ức chế tối thiểu (IC₅₀) từ 7,81 µg/mL đến 28,49µg/mL. Đặc biệt là hợp chất apigenin và luteolin thể hiện hoạt tính mạnh đối với virus H₃N₂, với giá trị IC₅₀ tương ứng là 1,43 và 2,06 µg/mL. Khả năng kháng virus của apigenin cao hơn 3 lần so với chất đối chứng dương là ribavirin, luteolin có khả năng kháng virus tương tự với apigenin [4]. Các loài *E. bodinieri* và *E. blanda* chứa nhiều luteolin và các dẫn xuất của nó [8]. Hàm lượng của luteolin lên đến 16,0 mg/g trong lá của loài *E. blanda* [4].

Quercetin và các dẫn xuất của nó đã tìm thấy ở nhiều loài trong chi *Elsholtzia*, chúng có tác dụng ức chế đối với IAV, ví dụ như ức chế NS3 (protease huyết thanh) ức chế sự dung hợp tế bào virus, ức chế sự nhân lên của virus, ngăn chặn hạt virus thụ thể, ức chế phản ứng viêm,... Keampferol cũng đã được chiết xuất từ nhiều loài trong chi này cho thấy có khả năng ức chế virus H9N2 và chống viêm bằng cách giảm mức độ của TNF-α, IL-1β, IL-6 thông qua con đường NF-kB và MAPK. Chrysin (phân lập từ *E. bodinieri*) có khả năng kháng virus bằng cách tăng quá trình phosphorin hóa mTOR .

Thực nghiệm *invitro*, tinh dầu từ loài *E. densa* cho thấy khả năng chất ức chế đáng kể các virus cúm A và Orphan của châu Á, ngoài ra nó có thể trì hoãn sự xuất hiện triệu chứng từ 72-96 giờ sau khi bị nhiễm virus. Tinh dầu của loài *E. densa* cho thấy sự ức chế chống virus H₃N₂ (một loại virus cúm A) và biểu hiện điều trị hiệu quả đáng kể đối với virus cúm ở phổi chuột khi chuột khi dùng với liều tinh dầu là 100 mg/kg thể trọng [4].

1.4.2. Hoạt tính kháng khuẩn

Thực nghiệm cho thấy các hợp chất luteolin, quercetin và ludongnin 5 được phân lập từ rễ của loài *E. bodinieri* [4] có hoạt tính ức chế các khuẩn *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* và *Escherichia coli* ở các mức độ khác nhau. Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) của hợp chất ludongnin 5 thể hiện kháng 3 khuẩn trên lần lượt là 5, 10 và 80µg/mL. Hợp chất luteolin thể hiện kháng khuẩn

E. coli và *S. aureus* với giá trị MIC tương ứng là 50 và 40µg/mL. Hợp chất quercetin thể hiện kháng khuẩn *S. aureus* và *B. subtilis* với giá trị MIC là tương ứng 60 và 90µg/mL [4].

Cặn chiết ethanol của loài *E. blanda* và loài *E. rugulosa* thể hiện hoạt tính ức chế đáng kể đối với khuẩn tụ cầu vàng *S. aureus* với giá trị MIC tương ứng là 1,32 và 1,43 mg/mL [4].

Tinh dầu từ một số loài *Elsholtzia* có cho thấy hoạt tính kháng khuẩn rộng, chống lại một số vi khuẩn thường dẫn đến nhiễm trùng đường hô hấp ở con người, chẳng hạn như *Staphylococcus aureus*, *Bacillus typhi*, trực khuẩn *Aeruginosus*, *Diplococcus intracellu laris* [7, 8]. Bên cạnh đó, tinh dầu hoặc nước sắc từ một số loài *Elsholtzia* cũng cho thấy hoạt tính kháng khuẩn chống lại các vi khuẩn như: *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus epidermidis*, *beta streptococcus*, *Bacterium paratyphosum B*, *Bacillus typhi murium*, *Bacillus dysenteriae*, *Bacillus diphtheriae*, *Bacillus meningitidis purulentae*, *Bacillus proteus*, *anthrax Bacillus*, *Neisseria intracellularis*

Tinh dầu của loài *E. splendens* được ghi nhận chống lại vi khuẩn *P. acnes* và *S. epidermidis* (các vi khuẩn liên quan đến sự hình thành mụn trứng cá) với nồng độ ức chế tối thiểu của tinh dầu chống lại khuẩn *P. acnes* là 0,31 µL/mL [4].

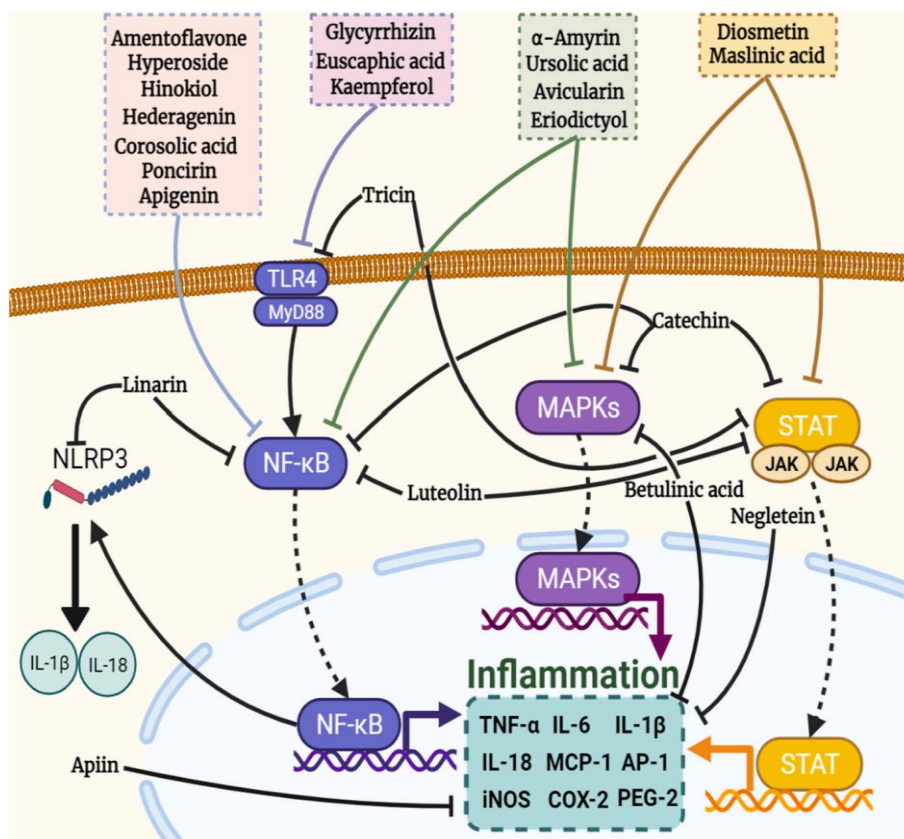
1.4.3 Hoạt tính chống viêm

Cặn chiết ethanol (75%) của loài *E. splendens* (phần cây trên mặt đất, bỏ rễ) ức chế đáng kể tình trạng viêm cấp tính (phù tai chuột do kích ứng dầu) và viêm dưới da (phù nề tai do este phorbol). Cặn metanol của *E. densa* đã được minh chứng khả năng điều chỉnh giảm mức độ của các cytokine gây viêm như TNF-α, IL-1β, IL-6 ở chuột bị viêm cấp và mãn tính. *E. splendens* ức chế đáng kể sản sinh PGE2 bằng cách cyclooxygenase-2 xử lý các tế bào RAW 264,7 được xử lý lipopolysaccharide. Do đó, người ta tin rằng sự ức chế chống lại cyclooxygenase-2 có lẽ là một trong những cơ chế chống viêm [48].

Các loài trong chi *Elsholtzia* thường chứa luteolin (một flavon chứa nhiều nhóm hydroxyl có thể thay thế) có hoạt tính kháng viêm. Luteolin có thể ức chế sự sản sinh NO và tạo ra các cytokine gây viêm khác, như TNF-α, IL-1β, IL-6, NF-κB

[26]. Vì vậy, các hợp chất flavon hydroxyl và các dẫn xuất của nó là một trong những lý do để giải thích hoạt động chống viêm cho các loài thuộc chi *Elsholtzia*.

Dưới đây, một số hợp chất đã được phân lập từ chi *Elsholtzia* đã được đánh giá về hoạt tính sinh học theo cơ chế chống viêm.



Hình 1.2. Cơ chế chống viêm của một số hợp chất terpenoid và flavonoid đã được phân lập từ các loài thuộc chi *Elsholtzia*

1.4.4. Hoạt tính chống oxy hóa

Phân chiết của loài *E. rugulosa* và *E. bodinieri* (phần cây trên mặt đất) biểu hiện hoạt tính chống oxy hóa và góp phần làm sáng tỏ lý do vì sao loài *E. rugulosa* có tác dụng chống lão hóa [44, 45]. Hoa của loài *E. rugulosa* rất giàu các hợp chất flavonoid với nồng độ lên đến 0,2352 mg/ml. Các flavonoid có tác dụng “bắt” gốc tự do $\text{OH}^\cdot$ và $\text{O}_2^\cdot$, với khả năng bao vây gốc tự do của 2 căn chiết của 2 loài trên là 30,8 và 40,5% [5]. Trong chi *Elsholtzia* có nhiều loài chứa polyphenol với hàm lượng lớn (các hợp chất polyphenol, đặc biệt là các flavonoid luôn được đánh giá cao trong tác dụng chống viêm và bao vây các gốc tự do) do đó có tác dụng chống oxy hóa tốt [3].

1.4.5. Bảo vệ thiếu máu cục bộ cơ tim

Cận chiết flavon tổng từ loài *E. blanda* (TFEB) có thể cải thiện sự phục hồi chức năng cơ tim, và giữ cho tim khỏi tổn thương do thiếu máu cục bộ do tắc nghẽn mạch vành (thực nghiệm trên chó Beagle). Hiệu quả đã đạt được bằng cách ức chế creatin kinase-MB huyết thanh (CK-MB) và malondialdehyde (MDA), cùng với sự giảm huyết áp trung bình (MAP), kháng mạch vành (CVR)...[34]. Các TFEB làm giảm kích thước vùng nhồi máu trong nhồi máu cơ tim (AMI) bằng cách ngăn chặn gây chết tế bào máu cơ tim thông qua điều chế Bcl-2, nhưng cũng có thể làm giảm thiếu máu cục bộ cơ tim [33]. Luteolin 7-*O*-D-glucopyranoside có thể bảo vệ tổn thương oxy hóa các tế bào gốc cơ tim ở chuột (thực nghiệm trên sợi cơ tạo thành cơ tim) và các tác dụng có lợi có thể liên quan đến đặc tính chống oxy hóa và giảm quá tải canxi nội bào [34].

1.4.6. Các hoạt tính khác

Ngoài ra các cận chiết và các hợp chất được phân lập từ chi *Elsholtzia* còn có các hoạt tính đáng chú ý khác như các hợp chất apigenin và luteolin thể hiện tác dụng chống lại bệnh Alzheimer trên mô hình tế bào. Apigenin có tác dụng bảo vệ nội mô mạch máu ở não chuột (CMEC) chống lại protein amyloid- β peptide 25–35 (A β _{25–35}) (một peptide liên quan cơ bản tới bệnh Alzheimer). Luteolin có tác dụng bảo vệ thần kinh thông qua cơ chế làm giảm bài tiết amyloid- β , điều hòa sự mất cân bằng oxy hóa khử và làm giảm sự chết theo chu trình [3, 4]. Cận chiết từ loài *E. splendens* có tác dụng giảm đau gây ra bởi acid acetic với mức liều 400mg/kg thể trọng [30]. Một nghiên cứu khác chỉ ra rằng dịch chiết loài *E. splendens* làm giảm triệu chứng đau ở hội chứng tiền kinh nguyệt; cận chiết của loài này làm giảm lipid máu bằng cách giảm cholesterol lipoprotein mức thấp (LDL) [4, 30]. Ngoài ra cận chiết *E. bodinieri* còn có tác dụng hạ lipid máu bằng cách làm giảm cholesterol tổng (trên chuột) [7, 19]

Kết luận: Đánh giá về các hoạt tính sinh học của các hợp chất đã được phân lập cho thấy các hợp chất flavonoid và terpenoid là những hợp chất quan trọng trong mối quan hệ thể hiện hoạt tính và hợp chất. Các flavonoid và mono flavonoid được chiết xuất từ chi này thể hiện hoạt tính kháng virus và chống viêm rõ rệt. Các

triterpenoid vòng năm cho thấy ưu điểm trong hoạt tính kháng virus và một số monoterpenoid thể hiện hoạt tính chống viêm.

Hoạt tính sinh học chủ đạo của chi này là kháng virus, kháng khuẩn và kháng viêm nên các loài trong chi *Elsholtzia* có lợi thế trong việc điều trị các bệnh về viêm nhiễm. Về khả năng diệt virus, các loài trong chi này có nhiều “đích”, “mục tiêu” ảnh hưởng đến “quá trình phát triển của vòng đời” của virus với phổ kháng virus rộng. Trong tinh dầu thành phần chủ yếu là các monoterpenoid và sesquiterpen. Đã có một số thành phần trong tinh dầu được ghi nhận có khả năng kháng virus, kháng khuẩn; tuy nhiên cần những nghiên cứu sâu hơn để giúp khẳng định cụ thể.

1.5. Tổng quan về loài kinh giới dày (*Elsholtzia winitiana* Craib.)

1.5.1. Giới thiệu chung

Loài kinh giới dày *Elsholtzia winitiana* Craib. thuộc họ Hoa môi (*Lamiaceae*, cũng gọi là họ Bạc hà) là cây bản địa của Việt Nam, phân bố ở các tỉnh Kon Tum, Gia Lai, Lâm Đồng, Hà Giang, Lào Cai, cũng phân bố ở Thái Lan, Lào và một số tỉnh phía nam Trung Quốc giáp với Việt Nam [52, 53, 54].

Loài *E. winitiana* được Craib mô tả lần đầu vào năm 1918 trên mẫu vật do nhà thực vật học Thái Lan Phya Winit Wanandorn thu thập. Năm 1981, GS. Vũ Xuân Phương công bố đã phát hiện và xác định một thứ mới thuộc loài kinh giới dày tại Đồng Văn (Hà Giang) và đặt tên là *Elsholtzia winitiana* var. *dongvanensis*

Phuong [54, 55]. Tuy nhiên đến nay giới chuyên môn quốc tế vẫn coi tên này chỉ là một tên đồng nghĩa của *Elsholtzia winitiana* Craib. [56].

Ở Việt Nam, loài *E. winitiana* có nhiều tên thường gọi, gồm kinh giới dày, kinh giới đất [52], kinh giới đại, kinh giới núi, hương nhu xạ [53] và kinh giới lông trắng. Đồng bào ta ở Hà Giang lại gọi nó là “bạc hà” hoặc “bạc hà đá”, vì thế mật ong có nguồn gốc từ hoa của loài *E. winitiana* mọc hoang dại ở Hà Giang, đặc biệt ở vùng cao nguyên đá Đồng Văn, có tên là “Mật ong bạc hà”. Trong luận văn này chúng tôi thống nhất sử dụng tên gọi “Kinh giới dày *E. winitiana*” và giữ nguyên tên thương phẩm “Mật ong bạc hà Hà Giang”.

Võ Văn Chi (2003) [52] mô tả hình thái, sinh trưởng, sinh thái và công dụng của loài kinh giới dày *E. winitiana* của Việt Nam như sau: “Cây thảo mọc thành bụi cao 1-1,7 m, có lông mịn dày màu trắng, thân vuông hay gần tròn. Lá mọc đối chéo chữ thập; phiến hình trứng – ngọn giáo, dài 4-9 cm, rộng 1,5-3,5 cm, đầu nhọn, gốc hình nêm, mép xẻ răng cưa, có lông dày ở cả hai mặt; gân bên 6-7 đôi, cuống lá dài 7-17 mm. Cụm hoa dạng bông ở ngọn cành, các bông dài 4-9 cm, rộng 5-6 mm, mọc đối nhau. Lá bắc hình ngọn giáo, dài 2,5-3 mm, có lông. Đài hoa hình chuông dài 1-1,5 mm, có lông và điểm tuyến ở phía ngoài; 5 thùy nhọn gần bằng nhau; tràng màu trắng ngà, dài 2-3 mm, có lông, 2 môi; môi trên 2 thùy xẻ nông, môi dưới 3 thùy với thùy giữa lớn hơn và có đỉnh tròn; nhị 4, hơi thò; bầu nhẵn, vòi nhụy xẻ đôi. Quả hình bầu dục màu nâu. Cây ưa sáng và ẩm, thường gặp ở sườn đồi, bãi hoang, ven đường, ở độ cao trên 600 m. Ra hoa tháng 10-12, có quả từ tháng 12 đến tháng 3 năm sau. Cây có tinh dầu, được dùng chữa cảm cúm, nhức đầu, cảm phong thấp co cứng, không có mồ hôi, chân tay tê buốt.



Hình 1.3. Loài Kinh giới dày *E. winitiana* Craib.

Kinh giới dày *E. winitiana* Craib. mới chỉ được sử dụng trong phạm vi y học dân gian để chữa cảm cúm ở một số nước ở khu vực Đông Nam Á, gồm Việt Nam, Thái Lan, và Nam Trung Quốc. Đặc biệt đối với cộng đồng dân tộc Akha ở Thái Lan và Nam Trung Quốc, ngoài công dụng làm rau ăn và cây gia vị, kinh giới dày *E. winitiana* Craib. còn được sử dụng để làm dịu vết thương do chó cắn, chữa ngộ độc thực phẩm và làm giảm các triệu chứng của ung thư [57, 58, 59].

1.5.2. Tình hình nghiên cứu về loài kinh giới dày (*Elsholtzia winitiana* Craib.)

Khác với 20 loài cây thuộc chi *Elsholtzia* khác (như *E. blanda*, *E. ciliata*, *E. densa*, vv...), ngoài các nghiên cứu ở Việt Nam, loài kinh giới dày *E. winitiana* Craib. hoàn toàn chưa được thế giới quan tâm nghiên cứu về hóa học [4].

Sau đây là các công trình nghiên cứu đã được thực hiện trên kinh giới dày *E. winitiana* Craib. của Việt Nam mà chúng tôi tìm được:

Nghiên cứu đầu tiên về thành phần hóa học của tinh dầu cây *E. winitiana* được công bố năm 1997 bởi Nguyễn Thị Tâm, Casanova và cộng sự với tiêu đề bằng tiếng Pháp “*Elsholtzia sauvage (Elsholtzia winitiana* Craib.) une plante à huile essentielle riche en cinéole” (*Elsholtzia winitiana* Craib., một cây tinh dầu giàu cineole) [60]. Các thành phần chính được tìm thấy gồm cineole (65,6%), beta-pinene (5%), para-cymene (4,7%), gamma-terpinene (3,9%), sabinene (2,5%), alpha-pinene (1,8%), myrcene (1,7%), và alpha-terpinene (%).

Năm 2003, trong cuốn “Tài nguyên thực vật có tinh dầu ở Việt Nam, Tập II” Lã Đình Mối và cộng sự cho biết về tinh dầu của kinh giới dày *E. winitiana* như sau: “Thân và lá chứa tinh dầu, hàm lượng 0,8-1,3% (so với khối lượng tươi). Tinh dầu nhẹ hơn nước, từ không màu tới vàng nhạt. Đã nhận dạng được 14 hợp chất có trong tinh dầu với các hợp chất chính là citral a (34,84%), citral b (30,08%) và limonen (12,54%). Ngoài ra trong tinh dầu kinh giới dày còn có các hợp chất α , β -pinen, camphen, α -terpinen, linalool, camphor, terpinen-4-ol, α -terpineol, α -cubeben, β -caryophyllen, α -humulen và nerolidol... Trong thực tế, hàm lượng citral trong tinh dầu biến động khá lớn (từ 55% đến 75%), chúng phụ thuộc vào thời kỳ thu hoạch và chất lượng của nguyên liệu” [53].

Dominique Lesueura, Ange Bighellia và cộng sự (2007) [61] đã nghiên cứu so sánh thành phần hóa học của 6 mẫu tinh dầu thu nhận từ các bộ phận trên mặt đất của loài *Elsholtzia blanda*, *E. penduliflora* và *E. winitiana* thu hoạch tại 2 tỉnh Sơn La và Lào Cai của Việt Nam được khảo sát bằng GC, kết hợp với các chỉ số lưu giữ (RI), GC/MS và ^{13}C NMR. Linalool là thành phần chính (75,2 và 56,8%) trong hai mẫu tinh dầu *E. blanda*, trong khi hai mẫu tinh dầu *E. penduliflora* chiếm ưu thế bởi 1,8-cineole (62,7 và 65,5%). Ngược lại, hai mẫu tinh dầu của *E. winitiana* thể hiện

các thành phần khác nhau, rosefuran (56,0%) và dehydro*Elsholtzia* ketone (22,8%) là thành phần chính của một mẫu, trong khi mẫu thứ hai chủ yếu là *Elsholtzia* ketone (87,5%).

Hoàng Đình Hòa và Nguyễn Văn Lợi (2017) [62] đã nghiên cứu thành phần hóa học loài *Elsholtzia winitiana* Craib. thu ở Bắc Quang (Hà Giang). Kết quả phân tích GC-MS đã xác định được 41 cấu tử, trong đó có 19 hydrocacbon và 22 cấu tử là dẫn xuất của hydrocacbon chiếm tổng 97,83% tổng thành phần. Các thành phần chính của tinh dầu bao gồm citral (11,25%), nerylacetate (7,02%), octanol (4,65%), linalool (4,61%).

Tất cả các công trình nghiên cứu nêu trên đều có đối tượng nghiên cứu là tinh dầu, các thành phần hóa học khác còn chưa được đề cập tới.

1.6. Tổng quan về mật ong

1.6.1. Giới thiệu về mật ong

Theo nội dung trong chỉ thị của châu Âu 2001/110/EC liên quan tới mật ong [63Error! Reference source not found.], nó được định nghĩa như một loại chất ngọt tự nhiên được sản xuất bởi loài ong (*Apis mellifera*) từ phần hoa của các loại thực vật hoặc từ sự tiết ra của các bộ phận sống của thực vật, những phần mà ong có thể thu nhận và chuyển đổi bằng việc kết hợp với các chất cụ thể của chúng, ngưng đọng, tách nước, lưu trữ trong các tổ ong để tiếp tục hoàn thiện và đạt đến độ bão hòa của mật ong. Định nghĩa của mật ong, theo như Codex Alimentarius, bao gồm cả mật ong được sản xuất bởi những loài ong mật khác [64].

Những con ong làm ra mật từ phần hoa mà chúng thu thập từ các loại hoa khác nhau (mật phấn hoặc mật từ dịch) hoặc từ sự bài tiết của các loại côn trùng hút phấn (Hemi - ptera) trên các phần sống của thực vật hoặc từ sự tiết ra của các bộ phận thực vật. Màu sắc, mùi hương và độ cô đặc của mật ong đều phụ thuộc vào việc ong sử dụng những loại hoa nào. Ong thường chỉ đi tìm phấn trong vùng bán kính 3 km quanh tổ, mặc dù chúng có thể đi xa hơn rất nhiều (lên tới 14 km) và khoảng cách kiếm ăn trong vòng 5 km là điều thường xảy ra [65]. Vì vậy, các tính chất của mật ong được liên kết chặt chẽ với các loài thực vật và khu vực địa lý mà ong hoạt động kiếm ăn, nơi mà chúng bắt đầu làm tổ bởi vì các tính chất của đất đai và khí hậu cũng quyết định và ảnh hưởng tới các loại hoa sinh mật.

Nghề nuôi và thu thập mật ong đã có từ ít nhất 4500 năm trước. Trong các thời đại trước đây, mật ong từng là một chất tạo ngọt phổ biến và cũng là loại thuốc được ưa chuộng [66, 67]. Ngày nay, mật ong không có các tính chất được cho là quý từ thời cổ xưa. Tuy vậy, mật ong được công nhận như một loại thực phẩm giàu năng lượng với nhiều thành phần dinh dưỡng, có khả năng phục hồi và phòng tránh bệnh [68, 69]. Mật ong còn được phát hiện ra rằng chúng chứa các hoạt chất với khả năng chống oxy hóa mạnh mẽ, bao gồm acid phenolic và các flavonoid (từng được gọi là vitamin P), các enzyme (glucose oxidase và catalase), acid ascorbic (vitamin C), protein và carotenoid (chất chống oxy hóa) [70, 71]. Hơn nữa, mật ong còn ức chế sự phát triển của các vi sinh vật và nấm mốc [72, 72, 73]. Hiệu ứng kháng viêm và kháng đột biến gen cũng là các lợi ích sinh lý khác liên quan tới mật ong [74, 75]. Các ưu điểm khác của mật ong cũng được áp dụng bởi một số loại thuốc đặc biệt liên quan đến các loại thuốc thay thế và bổ sung. Ngoài ra, mật ong cũng là một nguyên liệu trong rất nhiều sản phẩm (các loại bánh nướng, bánh kẹo, mứt, các loại mứt phết, ngũ cốc ăn sáng, đồ uống, sản phẩm từ sữa, ...), thường được sử dụng thay thế đường hoặc chất bảo quản tự nhiên cho các thực phẩm được sản xuất [76]. Gần đây, một ứng dụng khác của mật ong tự nhiên, đó là ức chế sự ăn mòn đã và đang được nghiên cứu [77, 78].

Ngành công nghiệp nuôi ong có những ảnh hưởng kinh tế nhất định thông qua các tác động trực tiếp (giá trị của sản xuất), gián tiếp (thụ phấn cho thực vật...). Thị trường mật ong hiện nay bao gồm tới 150 nước, và giá trị của việc sản xuất mật ong được ước tính lên tới hàng tỉ Euro. Vào 2010, nước sản xuất mật ong dẫn đầu, Trung Quốc, đã sản xuất tới 398000 tấn mật, hai nước sản xuất đứng thứ 2 và 3, Thổ Nhĩ Kỳ và Mỹ, cũng đã tạo ra được tương ứng 81115 và 79788 tấn [79]. Những nước sản xuất tương đối lớn khác bao gồm Ukraina, Argentina, Mexico, Nga và Brazil. Tại Châu Âu, Pháp, Tây Ban Nha, Hy Lạp và Italia là những nước sản xuất mật ong chính. Tuy nhiên, Liên Minh Châu Âu vẫn đang phụ thuộc vào việc nhập khẩu mật ong nhằm đáp ứng được nhu cầu tiêu dùng, bởi lẽ nhu cầu sử dụng mật ong tính trên một đầu người mỗi năm được cho là lớn nhất thế giới đặc biệt tại các nước Trung Âu. Tại Áo, Đức và Thụy Sĩ, nhu cầu tiêu dùng hàng năm của một đầu người đã vượt quá 1 kg mật [76].

Sự toàn cầu hóa của các thị trường thực phẩm với cách đơn giản trong việc vận chuyển hàng hóa xuyên quốc gia và lực địa có nghĩa là những người tiêu dùng đang ngày càng quan tâm nhiều hơn về xuất xứ của thực phẩm mà họ sử dụng. Có một mối

quan hệ chặt chẽ giữa nguồn gốc của mật ong và chất lượng. Người tiêu dùng đang ngày càng trở nên chú ý tới nguồn gốc địa lý, bởi vì đó là một nhân tố thiết yếu liên quan đến tính thật giả.

Công việc kiểm soát chất lượng mật ong có 2 mục đích chủ yếu: Nhằm xác định tính xác thực trong sản xuất mật ong (hoặc để phát hiện ra sự làm giả hoặc lừa đảo tiềm tàng), và nhằm quyết định tính xác thực theo như những miêu tả [80]. Theo phương diện sản xuất, chất lượng của mật ong có thể được biểu thị bởi những chỉ số vật lý và hóa học cụ thể. Hàm lượng đường (fructose, glucose và saccarose), độ ẩm và các acid amin cũng có thể biểu thị tính xác thực và độ an toàn của sản phẩm mật ong. Việc kiểm soát hàm lượng hydroxymethylfurfural (HMF) và hoạt động của enzyme chỉ ra tính tự nhiên của mật ong và đồng thời chỉ ra rằng mật chưa bị ảnh hưởng bởi các biện pháp xử lý nhiệt trong bảo quản và lưu trữ [76]. HMF là một hợp chất thu được từ quá trình phân hủy của fructose, quá trình này được hình thành một cách chậm rãi và tự nhiên trong khi bảo quản nhưng lại bị đẩy nhanh hơn rất nhiều khi có tác dụng nhiệt. Các enzyme bị phá hủy bởi nhiệt (trên 35°C) hoặc việc bảo quản tại nơi có nhiệt độ quá cao. Vì vậy, mật độ enzyme thấp có thể cho thấy rằng mật ong đã bị làm nóng. Tuy nhiên, cũng phải xem xét và chú ý đến việc nhiều loại mật ong có mật độ enzyme thấp một cách tự nhiên. Các loại enzyme trong mật ong có thể được kể đến là diastase (amylase), invertase và glucose oxidase [70]. Hoạt động của enzyme diastase thường được sử dụng như một tiêu chuẩn bổ sung của thang đo chỉ tiêu chất lượng và độ tươi mới. Một giới hạn chất lượng khác là hàm lượng ẩm, thứ phụ thuộc vào mức độ của quá trình tạo ra mật ong. Hàm lượng nước cũng là một nhân tố chính của chất lượng mật ong. Sản phẩm có hàm lượng nước cao làm cho mật ong dễ bị ảnh hưởng tới sự lên men, tạo ra một sản phẩm với mức độ cao của các men chết, ethanol, butanediol và glycerol [80], tạo ra vị không ngon cho sản phẩm mật ong. Những tiêu chuẩn khác liên quan đến chất lượng mật ong có thể kể đến là độ chua (độ acid), tính dẫn điện, khả năng oxy hóa khử.

Những thành phần giới hạn của sản phẩm tự nhiên được định nghĩa theo tiêu chuẩn quốc tế bởi Ủy ban Codex Alimentarius [64], nhưng tại nhiều nước, nhiều luật và nguyên tắc hạn chế mà việc công bố được dự tính tại các nước này phải xem xét [63, 82, 82, 83]. Tính xác thực và chất lượng của mật ong phải được đảm bảo bởi các tiêu chuẩn hợp pháp, đồng thời phục vụ và bảo vệ người tiêu dùng. Mật ong phải chứa ít nhất có thể các chất hữu cơ và vô cơ lạ trong thành phần. Đồng thời

phải hoàn toàn cấm việc thêm vào các nguyên liệu thực phẩm, bao gồm cả phụ gia. Hơn nữa, Liên minh Châu Âu cũng yêu cầu rằng mật ong không chứa dư lượng các chất hóa học, kháng sinh và các chất thải khác. Luật cụ thể bảo vệ những người tiêu dùng khỏi sự phơi nhiễm đối với các chất thải có hại tiềm tàng của thuốc chăn nuôi, thuốc bảo vệ thực vật và các chất làm ô nhiễm môi trường trong thức ăn có nguồn gốc từ động vật. Các chất thải có khả năng hiện diện trong mật ong là do việc sử dụng các chất để xử lý các bệnh của ong mật, trong quá trình sản xuất mật ong, hoặc từ ô nhiễm môi trường.

Có một số giới hạn của Châu Âu về dư lượng tối đa (MRLs) cho các chất hoạt động có tính dược lý trong mật ong [84]. Các loại thuốc kháng khuẩn không được phép dùng để xử lý với ong mật, do không có giới hạn nào liên quan được xác minh cho mật ong. Có những tiêu chuẩn nghiêm ngặt nhất bởi các nước không thuộc Châu Âu như Mỹ, Canada, Trung Quốc,... cho phép sử dụng một số thuốc bảo vệ thực vật hoặc thuốc chăn nuôi hóa học cho việc điều trị các căn bệnh nhiễm khuẩn của ong [85]. Điều này tiềm ẩn nguy cơ gia tăng những vấn đề của mật ong nhập khẩu. Tuy nhiên, Liên minh Châu Âu đã thành lập các cấp độ giới hạn khác liên quan đến sử dụng thuốc hóa học trong mật ong [86]. Những điều luật và giới hạn này gây khó khăn trong việc kinh doanh hàng hóa của các nhà xuất khẩu tiềm năng, nhưng đồng tạo cơ hội và thị trường cho các sản phẩm hàng hóa chất lượng cao. Đội ngũ kiểm soát thực phẩm chất lượng của Châu Âu thông qua phép đo lường để đảm bảo việc vệ sinh và an toàn thực phẩm, đảm bảo các điều lệ về nhãn mác, những nguyên tắc về sức khỏe thực vật và chăm sóc động vật, kiểm soát các chất thải hóa học và các phụ gia thực phẩm. Tóm lại, chất lượng hàng hóa cần được miêu tả một cách hữu ích như một tập hợp các đặc tính, bao gồm an toàn thực phẩm (các mầm bệnh, dư lượng kháng sinh), giá trị dinh dưỡng, các quy trình xử lý (chăm sóc động vật, tác động của môi trường) và các loại thuộc tính khác. Tính xác thực của các đặc tính đảm bảo chất lượng và giá trị kinh tế, cũng như rất nhiều các tính chất khác của mật ong. Các nhãn hiệu trên mật có thể được bổ sung bởi các thông tin liên quan đến nguồn gốc thực vật, nguồn gốc địa lý hoặc các tiêu chuẩn cụ thể khác. Cùng với đó, nguồn gốc tại quốc gia nơi mà mật được thu hoạch cũng phải được chỉ thị trên nhãn hiệu [87]. Tính thật giả của nguồn gốc thực vật của mật ong cần đảm bảo không chỉ chất lượng mà còn là giá trị kinh tế và các tính chất khác. Xác định nguồn gốc một cách chính xác là điều cực kỳ quan trọng. Các nhà sản xuất và người tiêu dùng đặc biệt quan tâm đến nhãn hiệu chính xác, nguồn gốc, khả

năng tìm kiếm và sự thiếu của các chất tạp pha (tính thật giả theo như việc gán nhãn và miêu tả). Mặc dù có nhiều phương pháp hữu hiệu và mạnh mẽ để chứng minh các tạp chất trong mật ong [88], liên quan đến nguồn gốc thực vật và chất lượng mật ong, tuy nhiên các phương pháp phân tích nhanh chóng, đáng tin cậy và tiết kiệm, đồng thời có thể áp dụng cho việc xác thực mật ong cần phải được phát triển.

1.6.2. Tình hình nghiên cứu mật ong Bạc Hà vùng Cao nguyên đá Đồng Văn tỉnh Hà Giang

Việt Nam là quốc gia có truyền thống nuôi ong, kể từ thế kỷ 17, trong đó có 5 loài ong mật bản địa. Trong những năm 1930, một số loài ong đã được người Pháp đưa sang nuôi thử nghiệm nhưng không thành công. Trong thập niên những năm 1960, ong mật được nhập khẩu từ Hồng Kong đã thích nghi với điều kiện khí hậu ở miền Nam Việt Nam. Sau đó, ong mật được nhập khẩu từ Châu Âu gồm Nga, Bulgaria, Cuba, Áo, Đức, Italia, New Zealand để đáp ứng nhu cầu phát triển nghề nuôi ong. Ngày nay mật ong được sản xuất từ 1,1 triệu đàn ong có nguồn gốc từ Châu Âu, 400 ngàn đàn ong có nguồn gốc Châu Á. Hiện tại mật ong của Việt Nam được khai thác dưới hai hình thức là khai thác từ các tổ ong thiên nhiên và nuôi ong mật. Khai thác mật ong ở môi trường thiên nhiên (hay còn gọi là săn mật ong) là hình thức phổ biến ở nhiều quốc gia trong khu vực Đông Nam Á. Trong suốt những năm từ thế kỷ 19 đến đầu thế kỷ 20, mật ong tự nhiên được lấy chủ yếu từ các tổ ong khổng lồ trong rừng ngập mặn tại các tỉnh phía Nam Việt Nam. Hiện nay hình thức khai thác này vẫn còn tồn tại nhưng ít hơn so với thời gian trước do các quy định về cải thiện, bảo vệ rừng và bảo vệ đàn ong. Mặc dù năng suất thấp ở mức 2-4kg/tổ/năm nhưng được tiêu thụ rất tốt ở thị trường nội địa [89].

Phần lớn mật ong của Việt Nam là mật ong đa hoa (ong hút mật từ nhiều loại hoa khác nhau). Ngoài ra, còn có nhiều loại mật ong đơn hoa khác như mật ong cà phê, nhãn, táo, vải, bạc hà, cao su, hạt điều [90]... Tuy nhiên, những sản phẩm này chỉ có số lượng nhỏ. Màu sắc của mật ong phụ thuộc vào nguồn gốc và độ tuổi của sản phẩm. Nhìn chung, màu sắc của mật ong Việt Nam dao động từ màu hổ phách nhạt đến màu hổ phách thường, nhưng phổ biến nhất là mật ong có màu hổ phách nhạt. Thông thường mật ong cao su và keo (là các loại mật được lấy từ loài ong hút mật hoa của cây cao su và cây keo) có màu sắc đậm hơn so với các sản phẩm mật

ong hoa thông thường. Màu sắc của mật ong keo dao động từ màu hổ phách nhạt cho đến màu hổ phách đậm. Mật ong keo của các tỉnh phía Bắc Việt Nam thường có màu hổ phách nhạt. Màu sắc của mật ong keo thường đậm hơn các loại mật ong khác. Các loại mật ong đơn hoa (ong chỉ hút mật từ một loại hoa duy nhất), đặc biệt là mật ong bạc hà và mật ong nhãn được các chuyên gia đánh giá là những loại mật ong tốt nhất nhờ vào mùi hương của chúng. Mật ong bạc hà có nguồn gốc từ Hà Giang (phía Bắc Việt Nam). Ngoài mật ong bạc hà, không có số liệu cụ thể nào nói về tính vật lý và hóa học của các loại mật ong đơn hoa của Việt Nam, ngay cả đối với sản phẩm mật ong nhãn [90].

Chăn nuôi ong hiện nay đang là đối tượng được ưu tiên trong tái cơ cấu ngành chăn nuôi. Theo số liệu báo cáo của Cục Chăn nuôi, ước tính hiện nay nước ta có khoảng gần 1,2 triệu đàn ong gồm các giống ong Ý và ong nội, trong đó số đàn ong nội chiếm 16,6%, ong ngoại chiếm 83,3%, tập trung chủ yếu ở miền núi phía Bắc (khoảng 343 nghìn đàn) và Tây Nguyên (khoảng 357 nghìn đàn) [91]. Tổng sản lượng mật ong năm 2016 đạt 47 nghìn tấn. Theo số liệu thống kê, Việt Nam hiện đang đứng thứ 6 thế giới và thứ 2 châu Á về xuất khẩu mật ong với 90% sản lượng mật ong hàng năm của Việt Nam được xuất khẩu. Trong đó xuất khẩu sang thị trường Hoa Kỳ 90-95%. Việt Nam là quốc gia có sản lượng mật ong xuất khẩu lớn nhất sang thị trường Hoa Kỳ. Còn lại 5-10% xuất khẩu sang thị trường Châu Âu.

Tại Hà Giang, nghề nuôi ong nội lấy mật chủ yếu tập trung ở 4 huyện vùng cao núi đá (Quản Bạ, Yên Minh, Đồng Văn và Mèo Vạc) với trên 25 nghìn đàn, tổng sản lượng 4,5 tấn mật/năm. Từ năm 2013, khi thương hiệu mật ong bạc hà được Cục Sở hữu trí tuệ cấp chứng nhận chỉ dẫn địa lý “Mèo Vạc”, sản lượng và giá trị được nâng lên rõ rệt, giá mật ong tăng lên gấp đôi (500.000 đồng/lít). Ngày 24/10/2016 Chủ tịch UBND tỉnh đã ký quyết định về việc ban hành Quy chế Quản lý và sử dụng Chỉ dẫn địa lý “Mèo Vạc” cho sản phẩm mật ong bạc hà tỉnh Hà Giang. Chỉ dẫn địa lý (CDĐL) là một cách tiếp cận nghiên cứu - phát triển để bảo tồn và nâng cao giá trị kinh tế của hàng nông sản có chất lượng đặc thù do các điều kiện tự nhiên và con người của khu vực địa lý đó quyết định. Chất lượng đặc thù của sản phẩm chỉ được duy trì nếu sản xuất trong vùng địa lý đó, nếu sản xuất ở

nơi khác sẽ bị thay đổi (hoặc do yếu tố tự nhiên, hoặc do kỹ thuật sản xuất). Sản phẩm được bảo hộ sẽ được độc quyền sử dụng tên địa danh, tài sản công, làm công cụ tiếp cận bất cứ thị trường nào, chống lại sự cạnh tranh không lành mạnh, bảo vệ quyền lợi chính đáng của người sản xuất. Người tiêu dùng được chỉ dẫn sản phẩm có nguồn gốc xuất xứ, có tiêu chuẩn chất lượng rõ ràng, bảo đảm an toàn thực phẩm... CDĐL là cách tiếp cận mới trong việc bảo tồn đa dạng sinh học, các kiến thức bản địa và ứng phó với biến đổi khí hậu. Mặt khác, CDĐL còn là công cụ giúp xóa đói giảm nghèo, phát triển kinh tế - xã hội của những vùng khó khăn, dựa vào lợi thế tiểu sinh thái theo hướng thị trường. Mật ong bạc hà là sản phẩm có giá trị kinh tế cao, góp phần đa dạng hóa sinh kế của đồng bào các dân tộc thiểu số của Cao nguyên đá Đồng Văn. Hiện nay đã có 8 hợp tác xã và doanh nghiệp được cấp quyền sử dụng chỉ dẫn địa lý và tem điện tử thông minh truy xuất nguồn gốc. Sản phẩm mật ong bạc hà đã khẳng định được vị thế vững chắc đối với người tiêu dùng, nghề nuôi ong đã trở thành định hướng sản xuất hàng hóa của vùng giúp xóa đói giảm nghèo và làm giàu cho người dân [92].

Trước những vấn nạn như hàng giả, hàng nhái, sản phẩm chứa chất cấm, độc hại gây ảnh hưởng tiêu cực đến sức khỏe người tiêu dùng... vấn đề truy xuất nguồn gốc (TXNG) đang thực sự trở nên cấp bách và nhận được sự quan tâm của toàn xã hội. Xu hướng công khai, minh bạch về thông tin sản phẩm đã và đang được các nước áp dụng thông qua các hình thức Truy xuất nguồn gốc (TXNG). Đây được xem như là một trong những công cụ quan trọng nhằm bảo vệ người tiêu dùng. Việc TXNG sản phẩm sẽ giúp người tiêu dùng hiểu rõ và tìm kiếm được toàn bộ các dữ liệu của sản phẩm từ quá trình sản xuất cho đến khi cung ứng ra thị trường. Hiện tại đây chưa phải là quy định bắt buộc, nhưng trước yêu cầu về sự minh bạch, công khai thông tin, nhất là đối với mặt hàng thực phẩm thì nhu cầu truy xuất sẽ ngày càng lớn, và trở thành yêu cầu tất yếu trong xã hội...

Tính đến thời điểm hiện tại đã có nhiều nghiên cứu về việc Xây dựng chỉ dẫn địa lý Mèo Vạc cho sản phẩm mật ong bạc hà của tỉnh Hà Giang. Đại diện là kết quả nghiên cứu trong 3 năm (2009-2011) của Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Hệ thống Nông nghiệp, Viện Cây Lương thực và Cây Thực phẩm. Các nội dung nghiên cứu chính tập trung vào việc xây dựng cơ sở khoa học và thực tiễn phục vụ

cho việc đăng ký chỉ dẫn địa lý “Mèo Vạc” cho sản phẩm mật ong bạc hà, cụ thể: Nghiên cứu danh tiếng của sản phẩm, Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng đặc thù của sản phẩm, Nghiên cứu các yếu tố con người tạo nên chất lượng đặc thù của sản phẩm, Xác định đặc tính sinh vật học của giống ong và cây nguồn mật bạc hà, Xây dựng bản đồ khu vực địa lý mang chỉ dẫn địa lý “Mèo Vạc”. Tuy nhiên các nghiên cứu này chỉ có tính chất định tính, dựa trên các yếu tố về cơ sở khoa học và thực tiễn áp dụng cho việc xây dựng chỉ dẫn địa lý sản phẩm mật ong bạc hà Vùng Cao nguyên đá Đồng Văn Hà Giang. Chính vì vậy nó còn nhiều hạn chế, 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” sẽ tập trung vào nghiên cứu các yếu tố mang tính chất định lượng nhằm chỉ ra nguồn gốc của sản phẩm mật ong Bạc Hà - Đồng Văn - Hà Giang.

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.



Hình 2.1. Ảnh của mẫu *Elsholtzia winitiana* Craib. nghiên cứu

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.



Hình 2.2. Ảnh của mẫu mật ong bạc hà Hà Giang nghiên cứu

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.2.1. Phương pháp xử lý và chiết mẫu

Các mẫu thực vật sau khi thu hái đều được xử lý theo phương pháp chung như sau:

Các mẫu thực vật sau khi thu hái được thái nhỏ, phơi trong bóng mát, sấy khô ở nhiệt độ 50°C 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 50°C, mỗi lần chiết cách nhau 2 ngày. Dịch tổng thu được đem cất loại dung môi dưới áp suất giảm, nhiệt độ nhỏ hơn 50°C 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

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.

Sắc ký lớp mỏng (TLC): dùng để khảo sát thành phần được thực hiện trên bản mỏng tráng sẵn DC-Alufolien 60 F254 (0,25 mm; Merck) và RP-18 F254S (0,25 mm; Merck). Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254nm và 365nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch vanilin - H₂SO₄ 10% trong ethanol.

Sắc ký lớp mỏng điều chế (PTLC): thực hiện trên bản mỏng chứa sẵn silica gel 60G F254, kích cỡ 20 x 20 cm (0,25 mm; Merck). Dung môi triển khai là hỗn hợp một số dung môi thông dụng như *n*-hexane, chloroform, ethyl axetat, axeton, methanol, nước, acid fomic,... Phát hiện chất bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254 nm và 365nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch vanillin H₂SO₄ 10%, hơi nóng để phát hiện vết chất, ghép lại bản mỏng như cũ để xác định vùng chất, sau đó cạo lớp silica gel có chất, giải hấp phụ và tinh chế lại bằng cách kết tinh trong dung môi

thích hợp.

Sắc ký cột (CC): Sắc ký cột thường với pha tĩnh là silica gel 60, cỡ hạt 0,040 - 0,063 mm (230 - 400 mesh) của Merck, dung môi rửa giải chủ yếu là loại phân tích, công nghiệp. Sắc ký cột ray phân tử với pha tĩnh là sephadex LH-20. Sắc ký cột pha đảo sử dụng loại YMC RP-18 có cỡ hạt là 30-50 μm (Fujisilica Chemical Ltd.); Diaion HP-20 (Misubishi Chem.Ind.Co., Ltd.). Các vết chất được phát hiện bằng đèn tử ngoại ở hai bước sóng 254nm và 365nm và sử dụng thuốc thử là H_2SO_4 10% trong ethanol hoặc Dragendorff.

Sắc kí lỏng điều chế HPLC: sử dụng hệ máy Agilent 1290, với điều kiện sắc kí: cột J'sphere (ODS H-80, 250 x 20 mm), tốc độ dòng 3.0 ml/phút, detector UV-Vis/DAD với các hệ dung môi khác nhau.

2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học

Phương pháp chung để xác định cấu trúc hóa học các hợp chất là sự kết hợp xác định giữa các thông số vật lý, các dữ liệu phổ thu được kết hợp tài liệu tham khảo. Các thiết bị và phương pháp sử dụng bao gồm:

Phổ khối lượng (MS): Phổ khối (phun mù điện tử) ESI-MS được đo trên máy Agilent 1200 TRAP. Phổ khối lượng phân giải cao HR-ESI-MS đo trên máy FT-ICR-Mass spectrophotometer tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR): đo trên máy Bruker avance 500 MHz. Chất chuẩn nội là TMS (Tetramethyl Silan) tại Viện Hoá học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Các kỹ thuật phổ cộng hưởng từ hạt nhân được sử dụng bao gồm:

- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân một chiều: ^1H -NMR, ^{13}C -NMR và DEPT
- Phổ cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều: HSQC, HMBC, COSY và NOESY.
- Dung môi được sử dụng bao gồm các dung môi $\text{DMSO}-d_6$, CD_3OD và CDCl_3 . 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.

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

Độ quay cực ($[\alpha]_D$): đo trên máy JASCO DIP-1000 KUY của Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

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

Lấy 200g thân lá hoặc hoa của mẫu nghiên cứu đã được cắt nhỏ cho vào bình cầu có dung tích 2 lít. Nước cất được thêm vào sao cho tổng lượng nước và nguyên liệu không vượt quá 85% dung tích bình cầu.

Sau khi cho nguyên liệu vào bình, lắp bình cầu với bộ chưng cất tinh dầu, vặn chặt các nút khóa, khớp nối, mở nước làm lạnh vào hệ thống sinh hàn và tiến hành chưng cất. Khi hỗn hợp trong bình cầu sôi điều chỉnh giảm tốc độ gia nhiệt để giữ áp suất ổn định sao cho hỗn hợp nước ngưng tụ (gồm tinh dầu và nước ngưng tụ) chảy ra đều và liên tục. Chú ý lượng nước còn lại trong bình chưng cất, cho thêm nước cất nếu thấy cạn. Chưng cất trong 3-4 giờ cho đến khi hết tinh dầu thì kết thúc. Lưu lượng nước làm lạnh đưa vào thiết bị ngưng tụ được khống chế để hỗn hợp nước ngưng chảy ra có nhiệt độ không quá 40°C. Vì nếu cao hơn, lượng tinh dầu bay hơi và hòa tan trong nước ngưng tụ lớn làm tiêu hao tinh dầu.

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

Mẫu được rửa sạch, cắt thành những mảnh với kích thước phù hợp. Lấy 200 g mẫu (thân lá hoặc hoa) sau khi đã xử lý được cân bằng cân điện tử. Chuyển toàn bộ lượng mẫu trên vào bình cầu dung tích 2 lít. Sau đó thêm vào bình cầu một lượng nước thích hợp. Thời gian tách chiết khoảng 60 phút, công suất lò vi sóng 450W. Lắp bộ chưng cất, bật nước sinh hàn, cắm lò vi sóng.

Chú ý đảm bảo dòng nước trong sinh hàn luôn được cấp liên tục.

Quá trình chưng cất được diễn ra cho đến khi lượng tinh dầu trong nguyên liệu không ra thêm được nữa thì tiến hành chiết tinh dầu thô ra nhờ bộ phận chiết.

Trong quá trình chưng cất, hỗn hợp tinh dầu và nước được ngưng tụ trong ống chia vạch. Nước và tinh dầu có tỉ trọng khác nhau nên sẽ phân lớp trong ống (nước nặng hơn sẽ ở phía dưới còn tinh dầu nhẹ hơn sẽ nằm trên).

Sau đó, cho tinh dầu thô vào lọ thủy tinh tối màu và tiến hành làm khan bằng Na_2SO_4 khoảng 1 giờ rồi dùng pipet hút tinh dầu cho vào lọ đựng tinh dầu, đậy nút kín và bảo quản trong tủ lạnh ở nhiệt độ 4°C trước khi đem phân tích.



Hình 2.3. Hệ thống chưng cất tinh dầu vi lượng



Hình 2.4. Hệ thống chưng cất tinh dầu 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 μ m), khí mang: He. Inlet: 250°C, chia dòng 100:1, inject volume: 1 μ l, chương trình nhiệt độ (60°C – 240°C, tăng 4°C / phút), năng lượng ion hoá 70Ev, 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 μ m), khí mang: He. Inlet: 250°C, chia dòng 100:1, inject volume: 1 μ l, chương trình nhiệt độ (60°C – 240°C, tăng 4°C / phút), khí make up N₂, khí đốt O₂ và H₂.

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, CO₂ 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-sulphophenyl)-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→6,25µg/ml đối với mẫu cao chiết hoặc 50→1µg/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 $\lambda = 540/720$ 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.

❖ Các chủng vi sinh vật kiểm định

+Vi khuẩn Gr (-): *Escherichia coli* (ATCC 25922)

Pseudomonas aeruginosa (ATCC 25923)

+Vi khuẩn Gr (+): *Bacillus subtilis* (ATCC 11774)

Staphylococcus aureus subsp. *aureus* (ATCC 11632)

+Nấm sợi: *Aspergillus niger* (439)

Fusarium oxysporum (M42)

+Nấm men: *Candida albicans* (ATCC 7754)

Saccharomyces cerevisiae (SH 20)

❖ Chứng dương tính:

+ Streptomycin cho vi khuẩn Gr (+)

- + Tetracyclin cho vi khuẩn Gr (-)
 - + Nystatin hoặc Amphotericin B cho nấm sợi và nấm men.
- Kháng sinh pha trong DMSO 100% với nồng độ thích hợp.

❖ Chứng âm tính:

Vi sinh vật kiểm định không trộn kháng sinh và chất thử.

- + Môi trường duy trì và bảo tồn giống: Saboraud Dextrose Broth (SDB-Sigma) cho nấm men và nấm mốc. Trypcase Soya Broth (TSB-Sigma) cho vi khuẩn.
- + Môi trường thí nghiệm: Eugon Broth (Difco, Mỹ) cho vi khuẩn, Mycophil (Difco, Mỹ) cho nấm.

❖ Tiến hành thí nghiệm

- + Các chủng kiểm định được hoạt hóa và pha loãng theo tiêu chuẩn McFarland 0,5 rồi tiến hành thí nghiệm.
- + Các phiên thí nghiệm trong tủ ấm 37°C/24 giờ cho vi khuẩn và 30°C/48 giờ đối với nấm sợi và nấm men.

❖ Tính kết quả

- + *Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC-Minimum Inhibitory Concentration) của mẫu:*

Các mẫu được pha loãng theo các thang nồng độ thấp dần, để tính nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) là nồng độ mà ở đó vi sinh vật bị ức chế gần như hoàn toàn.

2.2.5.3. Đánh giá khả năng chống oxy hóa bằng phương pháp thu gom gốc tự do DPPH

Nguyên tắc: 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) là chất tạo ra gốc tự do được dùng để sàng lọc tác dụng chống oxy hóa của các chất nghiên cứu. DPPH có màu tím đậm, hấp thụ cực đại ở bước sóng 517 nm. Khi cho các chất thử nghiệm vào hỗn hợp này, nếu chất có khả năng làm trung hoà hoặc bao vây các gốc tự do sẽ làm giảm cường độ hấp phụ ánh sáng của các gốc tự do DPPH. Hoạt tính chống oxy hóa thể hiện qua việc làm giảm màu của DPPH, được xác định bằng cách đo quang phổ ở bước sóng $\lambda = 517$ nm (màu của dung dịch phản ứng sẽ chuyển dần từ tím sang vàng nhạt).

Thực nghiệm:

- Chuẩn bị thuốc thử và mẫu thử:

Dung dịch DPPH: Pha dung dịch DPPH 0,1 mM trong methanol bằng cách hoà tan 3,943 mg DPPH với methanol định mức lên 10 ml được DPPH nồng độ 1mM, sau đó pha loãng 10 lần sẽ được dung dịch DPPH 0,1 Mm. Pha xong dùng ngay và đựng trong chai thủy tinh màu

Mẫu thử: Pha tinh dầu bằng methanol ở nồng độ 100ppm, 200ppm, 500ppm, 1000ppm. Chọn axit ascorbic làm đối chứng dương. Tiến hành quy trình thử nghiệm:

Mẫu thử	Dung dịch thử (ml)	Dung dịch MeOH (ml)	Dung dịch DPPH (ml)
Mẫu trắng	0	4	0
Mẫu đối chứng âm	0	3,5	0,5
Mẫu thử	0,5	3	0,5

Hỗn hợp sau khi pha để trong tối, ở nhiệt độ phòng 30 phút. Sau đó đem đo quang ở bước sóng 517 nm.

Hoạt tính chống oxy hoá SC (%) được tính theo công thức:

$$SC (\%) = (OD_c - OD_t) / OD_c * 100$$

Trong đó:

SC (%): phần trăm ức chế gốc tự do DPPH

OD_c: Mật độ quang của dung dịch DPPH và MeOH

OD_t: Mật độ quang của dung dịch DPPH và mẫu thử

Giá trị hoạt động SC% >50% với nồng độ 200ppm đối với mẫu tinh dầu tinh chất thì được coi là có biểu hiện hoạt tính.

IC₅₀:

- Định nghĩa: IC₅₀ là một giá trị dùng để đánh giá khả năng ức chế mạnh hoặc yếu của mẫu khảo sát. IC₅₀ được định nghĩa là nồng độ (mg/ml) của mẫu có thể ức chế 50% gốc tự do, tế bào hoặc enzyme. Mẫu có hoạt tính càng cao thì giá trị IC₅₀ sẽ càng thấp.

* Cách xác định IC₅₀:

Từ nồng độ mẫu và SC (%) bằng phần mềm Excel, lập phương trình hồi quy có dạng $y = ax + b$ thể hiện mối tương quan giữa SC (%) (y) và nồng độ (x)

Từ đó suy ra giá trị IC_{50} .

Giá trị IC_{50} càng thấp tương ứng với SC càng cao và ngược lại.

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 $300\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$, thiết bị sử dụng ống kính Olympus UMPLFL 20X, khe hở $0.1 \times 6\text{ mm}$, 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.

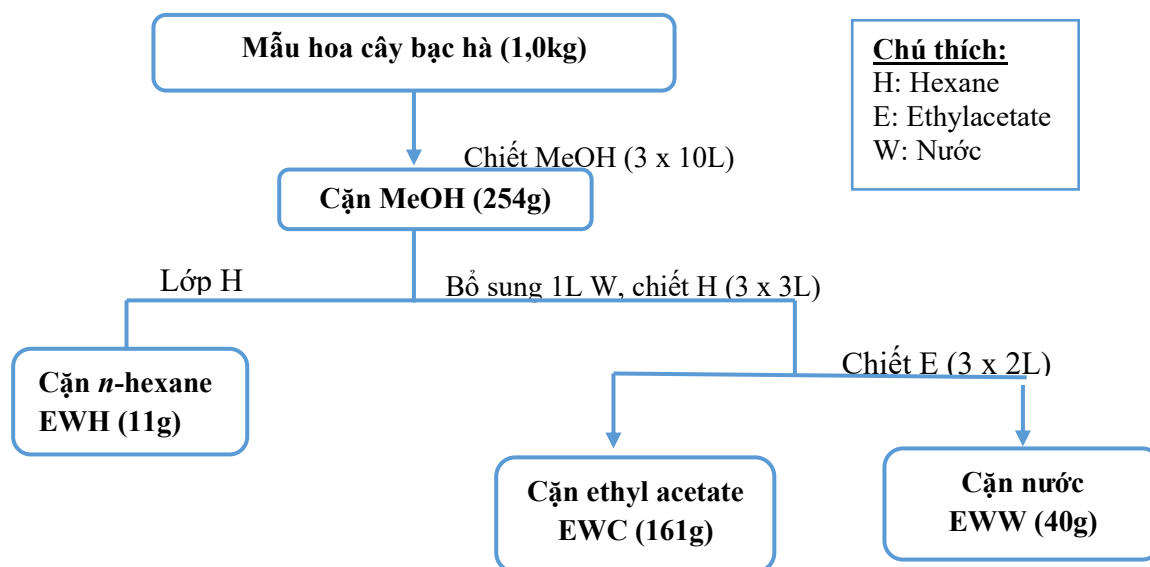
2.3. THỰC NGHIỆM

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.*)

Mẫu hoa của cây bạc hà đá được làm sạch, phơi khô có khối lượng 1,0 kg chiết với sự hỗ trợ bởi sóng siêu âm với metanol (10L x 3 x 2h) ở 60°C, cất thu hồi dung môi dưới áp suất giảm thu được cao màu nâu (254g). Dịch chiết metanol được chiết lần lượt với hexan, etyl acetate, và butanol, thu được các cao hexan (11g), etyl axetat (161g), butanol (33g), và phần tan trong nước (40g).

Việc thu nhận các dịch chiết từ hoa của cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana Craib.*) như trong sơ đồ 2.1:



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

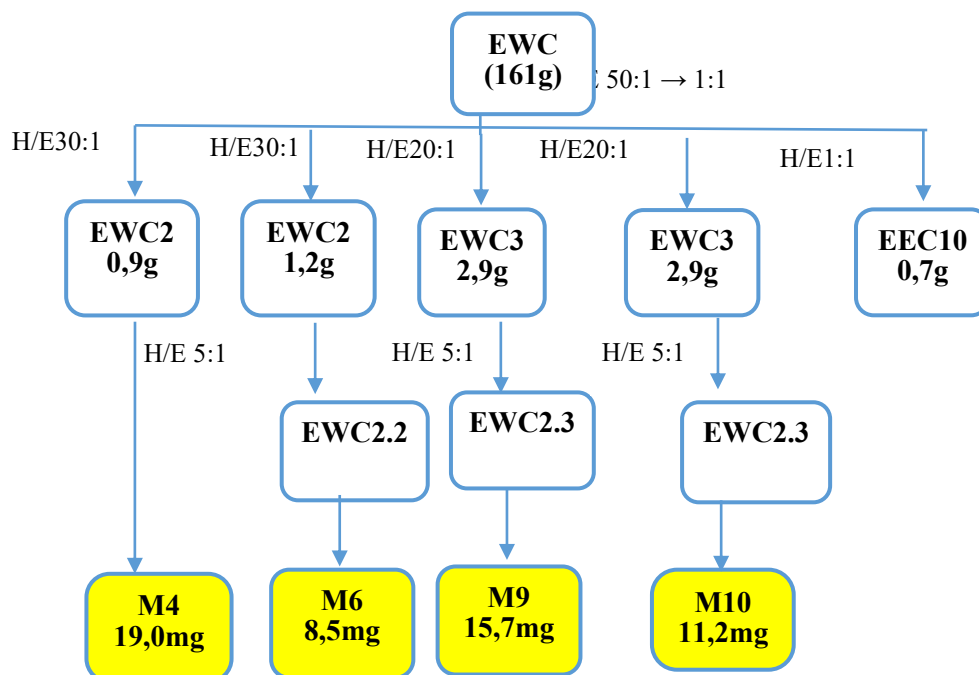
2.3.1.2. Phân lập các hợp chất từ hoa của cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana Craib.*)

Cận chiết ethyl acetat của cây bạc hà đá (Elsholtzia winitiana Craib.)

Cao ethyl acetat được tiến hành sắc ký cột silica gel (8x80 cm) với dung môi rửa giải cloroform:metanol (CHCl_3 :MeOH) (50:1, 30:1, 10:1, 5:1) thu được 10 phân đoạn chính. Phân đoạn 2 được sắc ký cột trên silica gel (3x80 cm) với hệ dung môi rửa giải CHCl_3 :MeOH (20:1) thu được chất 4 và 6. Phân đoạn 3 (2,9g) được phân tách bằng sắc ký cột silicagel (5x80cm) với hệ dung môi rửa giải CHCl_3 :MeOH

(15:1) và sau đó làm sạch bằng Sephadex LH-20 thu được chất 9, 10.

Quá trình phân lập chi tiết được trình bày trong sơ đồ 2.2



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

❖ Hợp chất 2 (Apigenin)

Chất bột màu vàng; ESI-MS m/z : 271 $[M+H]^+$; 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 6,78 (1H, s, H-3), 6,20 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 6,49 (1H, d, $J = 2,00$ Hz, H-8), 7,93 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, H-2', H-6'), 6,93 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, H-3', H-5'), 12,96 (1H, s, 5-OH), 10,83 (1H, s, 7-OH), 10,35 (1H, s, 4'-OH); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) δ (ppm): 102,8 (C-3), 181,7 (C-4), 161,4 (C-5), 98,8 (C-6), 163,7 (C-7), 93,9 (C-8), 157,3 (C-9), 103,7 (C-10), 121,2 (C-1'), 128,4 (C-2', 6'), 115,9 (C-3', 5'), 161,1 (C-4').

❖ **Hợp chất 4 (Quercetin):** Chất rắn màu vàng, đ.n.c. 314-315°C; ESI-MS m/z 303 $[M+H]^+$, 1H -NMR (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm): 12,48 (1H, s, OH-5), 10,76 (1H, s, OH-7), 9,56 (1H, s, OH-3), 9,33 (1H, s, OH-3'), 9,33 (1H, s, OH-4'), 7,66 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-2'), 7,53 (1H, dd, $J = 2,0, 8,0$ Hz, H-6'), 6,87 (1H, d, $J = 8,5$ Hz, H-5'), 6,17 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-6), 6,39 (1H, d, $J = 2,0$ Hz, H-8). ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ (ppm): 176,0 (C-4), 164,1 (C-7), 160,9 (C-5), 156,3 (C-9), 147,9 (C-2), 147,0 (C-4'), 145,2 (C-3'), 135,9 (C-3), 122,1 (C-1'), 120,2 (C-6'), 115,8 (C-5'), 115,2 (C-2'), 103,2 (C-10), 98,4 (C-6), 93,5 (C-8).

❖ **Hợp chất 6 (Rutin):** Chất rắn màu vàng, đ.n.c. 190°C; ESI-MS m/z 611 $[M+H]^+$; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm): 7.59 (1H, dd, $J = 9.0, 2.1$ Hz, H-6'), 7.54 (1H, d, $J = 2.1$ Hz, H-2'), 6.85 (1H, d, $J = 9.0$ Hz, H-5'), 6.40 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8), 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 5.32 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, H-1''), 4.39 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-1'''), 3.83–3.35 (10H, m, H-2''-6ab'' và 2'''-5'''), 0.99 (3H, d, $J = 6.2$). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ (ppm): 178.2 (C-4), 164.3 (C-7), 161.5 (C-5), 157.1 (C-9), 156.7 (C-2), 148.7 (C-4'), 145.6 (C-3'), 134.1 (C-3), 121.9 (C-1'), 122.0 (C-6'), 116.5 (C-5'), 116.1 (C-2'), 104.2 (C-10), 101.4 (C-1''), 101.0 (C-1'''), 98.9 (C-6), 93.9 (C-8), 76.7 (C-3''), 76.7 (C-5''), 74.9 (C-2''), 72.7 (C-4''), 71.4 (C-4'''), 71.2 (C-3'''), 70.8 (C-2'''), 68.5 (C-5'''), 67.3 (C-6''), 18.0 (C-6''').

❖ **Hợp chất 9 ((+)-catechin):** Chất rắn màu trắng, ESI-MS (m/z): 291 $[M+H]^+$, $^1\text{H-NMR}$ (CD $_3$ OD, 500 MHz) δ : 6.79 (1 H, d, $J=2.0$ Hz, H-2'), 6.72 (1 H, d, $J=8.4$ Hz, H-5'), 6.67 (1 H, dd, $J=8.4, 2.0$ Hz, H-6'), 5.89 (1 H, d, $J=2.4$ Hz, H-8), 5.82 (1 H, d, $J=2.4$ Hz, H-6), 4.53 (1 H, d, $J=7.2$ Hz, H-2), 3.94 (1 H, ddd, $J=8.0, 7.2, 5.6$ Hz, H-3), 2.80 (1 H, dd, $J=16.4, 5.6$ Hz, H-4a), 2.46 (1H, ddd, $J=16.4, 8.0, 2.0$ Hz, H-4b). $^{13}\text{C-NMR}$ (CD $_3$ OD, 125 MHz) δ (ppm): 157.6 (C-7), 157.1 (C-5), 156.7 (C-8a), 145.7 (C-4'), 145.6 (C-3'), 132.3 (C-1'), 120.1 (C-6''), 115.7 (C-5'), 115.3 (C-2'), 100.7 (C-4a), 96.2 (C-6), 95.5 (C-8), 82.8 (C-2), 68.4 (C-3), 28.8 (C-4).

❖ **Hợp chất 10 (Hesperidin):** Chất rắn màu trắng; $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 500 MHz) δ (ppm): 12.01 (1H, s, 5-OH), 9.12 (1H, s, 3'-OH), 6.91 (3H, m, H-2',5',6'), 6.14 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-8), 6.12 (1H, d, $J=2.1$ Hz, H-6), 5.50 (1H, dd, $J=12.1, 3.3$ Hz, H-2), 4.97 (1H, d, $J=7.3$ Hz, H-1''), 4.53 (1H, s, H-1'''), 3.77 (3H, s, 4'-OCH $_3$), 3.25 (1H, m, H-3b), 2.78 (1H, dd, $J=17.1, 3.3$ Hz, H-3a), 1.08 (3H, d, $J=6.2$ Hz, H-6'''); $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 125 MHz) δ (ppm): 197.3 (C-4), 165.4 (C-7), 163.4 (C-5), 162.8 (C-9), 148.2 (C-4'), 146.7 (C-3'), 131.4 (C-1'), 118.2 (C-6'), 114.5 (C-2'), 112.3 (C-5'), 103.6 (C-10), 100.9 (C-1'''), 99.65 (C-1''), 96.62 (C-6), 95.79 (C-8), 78.12 (C-2), 75.74 (C-3''), 75.30 (C-5''), 72.98 (C-2''), 71.83 (C-4'''), 70.25 (C-4''), 69.95 (C-2'''), 69.32 (C-3'''), 68.11 (C-5'''), 65.69 (C-6''), 55.91 (OCH $_3$), 42.02 (C-3), 18.11 (C-6''').

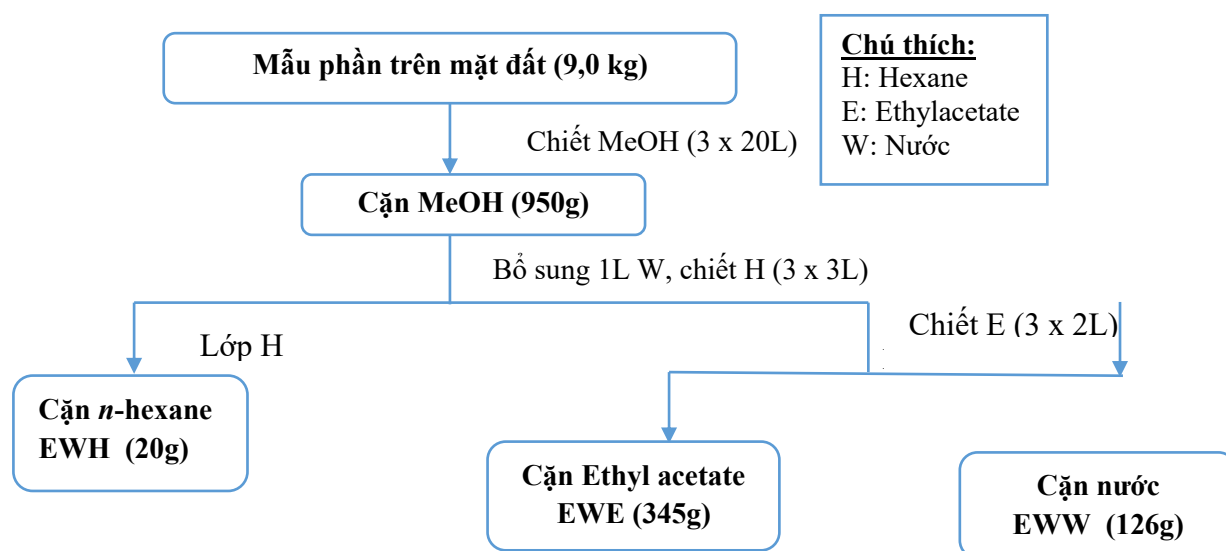
❖ **Hợp chất 12 (Betulinic acid):** Chất bột màu trắng, đ.n.c: 280-2820C; IR $\square$ maxKBr cm $^{-1}$: 3410 (OH), 3055, 2361, 1756; EI-MS: m/z 456 $[M]^+$; $^1\text{H-NMR}$

(500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4,75 (1H, d, J = 2,0 Hz, H -29a); 4,62 (1H, d, J = 2,0 Hz, H-29b); 3,22 (1H, m, H-3); 1,97 (3H, s, H-30); 1,26 (3H, s, H-23); 1,09 (3H, s, H-27); 1,06 (3H, s, H-25); 1,01 (3H, s, H-26); 0,83 (3H, s, H-24). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 180,3 (C-28); 150,3 (C-20); 109,7 (C-29); 78,8 (C-3); 56,3 (C-17); 55,3 (C-5); 50,5 (C-9); 49,3 (C-19); 46,7 (C-18); 42,4 (C-14); 40,7 (C-8); 38,7 (C-1); 38,4 (C-4); 38,4(C-13); 37,2 (C-10); 37,0 (C-22); 34,2 (C-7); 32,1 (C-16); 30,5 (C-15); 29,7 (C-21); 27,9 (C-23); 27,4 (C-2); 25,5 (C-12); 20,8 (C-11); 19,4 (C-30); 18,3 (C-6); 16,1 (C-26); 16,0 (C-25); 15,3 (C-24); 14,7 (C-27).

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.)

Phần trên mặt đất cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.) (9,0 kg) được tiến hành ngâm chiết siêu âm với methanol (3x20L), sau đó tiến hành cô quay chân không thu được 950g cao chiết. Cao chiết được phân bố trong nước, sau đó chiết lần lượt với các dung môi hexane, ethyl acetate, butanol thu được các cao tương ứng hexane (EWH, 20g), ethyl acetate (EWE, 345g) và dịch chiết nước (EWW, 126g). Việc thu nhận các dịch chiết từ phần trên mặt đất cây bạc hà đá (*Elsholtzia winitiana* Craib.) được tóm tắt trong sơ đồ 2.3.



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.)*

Cặn chiết ethyl acetate

Cao EWE (345g) tiến hành sắc ký cột với hệ dung môi rửa giải hexan/ethyl acetate (gradient nồng độ từ 100/1 – 0/1, v/v) thu được bảy phân đoạn (EWE1-7). Phân đoạn EWE1 (13g) tiếp tục triển khai sắc ký cột với hệ dung môi hexan/ethyl acetate (25:1, 15:1; 10:1, v:v) thu được 6 phân đoạn nhỏ (EWE1.1-EWE1.6). Phân đoạn EWE1.1 được phân tách trên cột nhồi silica gel pha thường với hệ dung môi hexan/ethyl acetate (1/1) thu được 3 phân đoạn (EW1.1.1-EW1.1.3). EW1.1.2 được phân tách trên cột RP-18 với hệ dung môi acetone/nước thu được hợp chất 19 - M19 (12mg).

Phân đoạn EWE2 (43g) tiếp tục triển khai sắc ký cột với hệ dung môi hexan/ethyl acetate (25:1, 15:1; 10:1, v:v) thu được 6 phân đoạn nhỏ (EWE2.1-EWE2.6). Hợp chất 13 – M2 (35mg) thu được từ phân đoạn EWE2.1 (0.3g) bằng sắc ký cột RP-18 hệ dung môi methanol/water (9:1, v:v). Phân đoạn EWE2.2 (2g) triển khai sắc ký cột với hệ dung môi hexan/ethyl acetate (25:1, 15:1; 10:1, v:v) thu được 3 phân đoạn nhỏ (EWE 2.2.1-EWE2.2.3). Phân đoạn EWE 2.2.1 tiến hành sắc ký Sephadex LH-20 với hệ dung môi methanol/water (1/1, v/v) thu được hợp chất 18 – M18 (10 mg). Phân đoạn EWE2.2.2 (0.2g) tiến hành sắc ký Sephadex LH-20 với hệ dung môi methanol/water (1/1, v/v) thu được hợp chất 16 – M16 (22mg).

Phân đoạn EWE5 (29g) tiếp tục triển khai sắc ký cột với hệ dung môi cloroform/methanol (20:1,10:1, v:v) thu được 5 phân đoạn nhỏ (EWE 5.1-5.5). Phân đoạn EWE5.2 (1.2g) tiếp tục tiến hành sắc ký cột RP-18 với hệ dung môi rửa giải methanol/water (3/1, v/v) thu được hợp chất 14 – M14 (7mg). Phân đoạn EWE5.3 (3.2g) tiếp tục tiến hành sắc ký cột RP-18 với hệ dung môi rửa giải methanol/water (3/1, v/v) thu được hợp chất 17 – M17 (700 mg). Phân đoạn EWE5.5 tiếp tục sắc ký cột silicagel với hệ dung môi cloroform/methanol (7:1, v:v) thu được hợp chất 15 – M15 (15mg). Phân đoạn EWE5.5 tiếp tục sắc ký cột silicagel với hệ dung môi cloroform/methanol (7:1, v :v) thu được hợp chất 20 – M20 (25 mg).

Quá trình phân lập chi tiết được trình bày trong sơ đồ 2.4

❖ Hợp chất Lupeol (EWE15)

Phân đoạn EWC1 (13g) tiếp tục triển khai sắc ký cột với hệ dung môi hexan/ethyl acetate (25:1, 15:1; 10:1, v:v) thu được 6 phân đoạn nhỏ (EWC 1.1-EWC1.6). Phân đoạn EWC1.1 được phân tách trên cột nhồi silica gel pha thường với hệ dung môi hexan/ethyl acetate (1/1) thu được 3 phân đoạn (EW1.1.1-EW1.1.3). EW1.1.2 được phân tách trên cột RP-18 với hệ dung môi acetone/nước thu được **hợp chất 19 (12mg)**.

Tinh thể màu trắng, đ.n.c 215-216°C; MS m/z $[M+H-18]^+$: 409. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 4,69 (1H, *d*, $J=2$, H-29); 4,56 (1H, *s*, H-29); 3,19 (1H, *dd*, $J=5,0$, 11 Hz, H-3); 2,38 (1H, *m*, H-18); 1,92 (1H, *m*, H-21); 1,9 (1H, *m*, H-15); 1,89 (1H, *m*, H-2); 1,68 (1H, *m*, H-1); 1,68 (3H, *s*, H-30); 1,66 (1H, *m*, H-13); 1,61 (1H, *m*, H-2); 1,61 (1H, *m*, H-15); 1,51 (2H, *m*, H-6); 1,51 (2H, *m*, H-7); 1,51 (1H, *m*, H-16); 1,40 (1H, *m*, H-16); 1,40 (1H, *m*, H-22); 1,36 (1H, *s*, H-19); 1,33 (1H, *m*, H-21); 1,30 (1H, *m*, H-11); 1,26 (1H, *s*, H-9); 1,21 (1H, *m*, H-22); 1,21 (1H, *m*, H-11); 1,07 (1H, *m*, H-12); 1,03 (3H, *s*, H-26), 0,97 (3H, *s*, H-23), 0,95 (3H, *s*, H-27), 0,90 (1H, *m*, H-1), 0,83 (3H, *s*, H-25); 0,79 (3H, *s*, H-28); 0,76 (3H, *s*, H-24); 0,68 (1H, *d*, $J=9,5$ Hz, H-5). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 151 (C-20); 109,3 (C-29); 79,0 (C-3); 55,4 (C-5); 50,5 (C-9); 48,4 (C-19); 48,0 (C-18); 43,0 (C-17); 42,9 (C-14); 40,9 (C-8); 40,0 (C-22); 38,9 (C-4); 38,8 (C-1); 38,1 (C-13); 37,2 (C-10); 35,6 (C-16); 34,3 (C-7); 29,9 (C-21); 28,0 (C-23); 27,5 (C-2); 27,5 (C-15); 25,2 (C-12); 21,0 (C-11); 19,3 (C-30); 18,4 (C-6); 18,0 (C-28); 16,1 (C-25); 16,0 (C-26); 15,4 (C-24); 14,6 (C-27).

❖ Hợp chất oroxylin A (EWW6)

Phân đoạn EWC2 (43g) tiếp tục triển khai sắc ký cột với hệ dung môi hexan/ethyl acetate (25:1, 15:1; 10:1, v:v) thu được 6 phân đoạn nhỏ (EWC 2.1-EWC2.6). **Hợp chất 13** (35mg) thu được từ phân đoạn EWC2.1 (0.3g) bằng sắc ký cột RP18 hệ dung môi methanol/water (9:1, v:v).

Chất rắn màu vàng, đ.n.c: 195-196°C. Phổ ESI-MS m/z : 285 $[M+H]^+$. Phổ $^1\text{H-NMR}$ 500 MHz ($\text{DMSO}-d_6$) (δ ppm): 13,48 (1H, *s*, 5-OH); 8,76 (1H, *s*, 7-OH); 8,09 (2H, *dd*, $J=1,0$; 8,0 Hz, H-2', H-6'); 7,61 (3H, *m*, H-3', H-4', H-5'); 6,97 (1H, *s*, H-8); 6,94 (1H, *s*, H-3) và 3,93 (3H, *s*, OCH_3). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) (δ ppm): 182,3 (C-4), 163,1 (C-7), 154,6 (C-5), 149,8 (C-9), 146,1 (C-2), 132,0 (C-3), 130,8 (C-1'), 130,1 (C-4'), 129,1 (C-3', 5'), 126,3 (C-3', 6'), 105,3 (C-10), 104,7 (C-6), 91,3 (C-8), 56,3 (C-11).

❖ Hợp chất Uvavol (EWE48)

Phân đoạn EWC2 (43g) tiếp tục triển khai sắc ký cột với hệ dung môi hexan/ethyl acetate (25:1, 15:1; 10:1, v:v) thu được 6 phân đoạn nhỏ (EWC2.1-EWC2.6). Phân đoạn EWC2.2 (2g) triển khai sắc ký cột với hệ dung môi hexan/ethyl acetate (25:1, 15:1; 10:1, v:v) thu được 3 phân đoạn nhỏ (EWC 2.2.1-EWC2.2.3). Phân đoạn EWC 2.2.1 tiến hành sắc ký Sephadex LH-20 với hệ dung môi methanol/water (1/1, v/v) thu được **hợp chất 18** (10 mg).

Chất bột màu trắng, đ.n.c: 230-233°C; ESI-MS: m/z 725 442 ($M+10$); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, CD_3OD) δ (ppm): 5,14 (1H, *t*, $J = 3,0$ Hz, H - 12); 3,54 (1H, *d*, $J = 11,0$ Hz, H-28a); 3,23 (1H, *dd*, $J = 11,0, 5,0$ Hz, H-3); 3,19 (1H, *d*, $J = 11,0$ Hz, H-28b); 1,10 (3H, *s*, H-27); 0,99 (3H, *s*, H-24); 0,98 (3H, *s*, H-26); 0,94 (3H, *s*, H-25); 0,93 (3H, *d*, $J = 5,2$ Hz, H-30); 0,80 (3H, *d*, $J = 5,5$ Hz, H-29), 0,79 (3H, *s*, H-23). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 138,7 (C-13), 125,1 (C-12), 79,0 (C-3), 69,7 (C-28); 55,3 (C-5); 54,0 (C-18); 47,7 (C-9); 42,1 (C-14); 40,0 (C-8); 39,5 (C-20); 39,4 (C-19); 38,8 (C-1); 38,0 (C-4); 36,9 (C-10); 36,9 (C-17); 32,8 (C-7); 30,8 (C-21); 30,6 (C-15); 30,5 (C-22); 28,1 (C-23); 27,3 (C-2); 23,4 (C-11); 23,3 (C-27); 22,6 (C-16); 21,3 (C-30); 18,3 (C-6); 17,3 (C-29); 16,8 (C-26); 15,7 (C-25); 15,6 (C-24).

❖ Hợp chất tricin (EWE27)

Phân đoạn EWC2 (43g) tiếp tục triển khai sắc ký cột với hệ dung môi hexan/ethyl acetate (25:1, 15:1; 10:1, v:v) thu được 6 phân đoạn nhỏ (EWC 2.1-EWC2.6). Phân đoạn EWC2.2 (0.2g) tiến hành sắc ký Sephadex LH-20 với hệ dung môi methanol/water (1/1, v/v) thu được **hợp chất 16**. Chất bột màu vàng nhạt, đ.n.c. 296-298°C; $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 500 MHz) (δ ppm): 13,00 (1H, *s*, 5-OH), 10,80 (1H, *s*, 4'-OH), 9,31 (1H, *s*, 7-OH), 7,32 (2H, *s*, H-2' và H-6'), 6,97 (1H, *s*, H-3), 6,55 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-8), 6,20 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-6), 3,88 (6H, *s*, 3'-OCH₃ và 5'-OCH₃); $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 125 MHz) (δ ppm): 181,8 (C-4), 164,1 (C-7), 163,6 (C-2), 161,4 (C-9), 157,3 (C-5), 148,2 (C-3' và C-5'), 139,9 (C-4'), 120,4 (C-1'), 104,4 (C-2' và -6'), 103,7 (C-10), 103,6 (C-3), 98,8 (C-6), 94,2 (C-8), 56,4 (2C, 3'-OCH₃ và 5'-OCH₃).

❖ Hợp chất negletein (EWE3)

Phân đoạn EWC5 (29g) tiếp tục triển khai sắc ký cột với hệ dung môi cloroform/methanol (20:1,10:1, v:v) thu được 5 phân đoạn nhỏ (EWC 5.1-5.5). Phân đoạn EWC5.2 (1.2g) tiếp tục tiến hành sắc ký cột RP-18 với hệ dung môi rửa

giải methanol/water (3/1, v/v) thu được **hợp chất 14** (7mg). Chất rắn màu vàng, đ.n.c 235-237°C. ESI-MS m/z : 285 $[M+H]^+$, 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) (δ ppm): 12,49 (s, OH-5), 8,76 (s, OH-6), 8,09 (*dd*, $J=8,0, 1,6$ Hz, H-2' và H-6'), 6,99 (s, H-3), 6,97 (s, H-8), 7,62 (m, H-3', H-4' và H-5') và 3,93 (3H, s, OCH₃-7). ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) (δ ppm): 182,3 (C-4), 163,1 (C-2), 154,6 (C-7), 149,8 (C-9), 146,1 (C-5), 131,9 (C-4'), 130,8 (C-6), 130,1 (C-1'), 129,1 (C-3',5'), 126,3 (C-2',6'), 105,3 (C-10), 104,6 (C-3), 91,3 (C-8), 56,3 (C-11).

❖ Hợp chất Acid ursolic (EWB3.2)

Phân đoạn EWC5 (29g) tiếp tục triển khai sắc ký cột với hệ dung môi cloroform/methanol (20:1,10:1, v:v) thu được 5 phân đoạn nhỏ (EWC 5.1-5.5). Phân đoạn EWC5.3 (3.2g) tiếp tục tiến hành sắc ký cột RP-18 với hệ dung môi rửa giải methanol/water (3/1, v/v) thu được **hợp chất 17** (700 mg).

Chất bột màu trắng; đ.n.c. 285-288 °C; EI-MS m/z 456 $[M]^+$; Phổ 1H -NMR (CDCl₃ & CD₃OD) (δ ppm): 3,21 (1H, *dd*, $J=5,5, 10,5$ Hz, H-3); 5,24 (1H, *br s*, H-12); 2,20 (1H, *d*, $J=11$ Hz, H-18); 1,09 (3H, *s*, H-23); 0,78 (3H, *s*, H-24); 0,98 (3H, *s*, H-25); 0,85 (3H, *s*, H-26); 0,93 (2x3H, *s*, H-27, H-30); 0,81 (3H, *s*, H-29); Phổ ^{13}C -NMR (CDCl₃ & CD₃OD) (δ ppm): 180,7 (C-28); 138,1 (C-13); 125,5 (C-12); 78,9 (C-3); 55,2 (C-5); 52,7 (C-18); 47,7 (C-17); 47,5 (C-9); 42,0 (C-14); 39,4 (C-8); 39,0 (C-19); 38,8 (C-20); 38,7 (C-4); 38,6 (C-1); 36,7 (C-22); 36,9 (C-10); 33,0 (C-7); 30,6 (C-21); 28,0 (C-23); 27,9 (C-15); 26,9 (C-2); 24,1 (C-16); 23,5 (C-27); 23,2 (C-11); 21,1 (C-30); 18,3 (C-6); 16,9 (C-26); 16,8 (C-29); 15,5 (C-24); 15,4 (C-25)

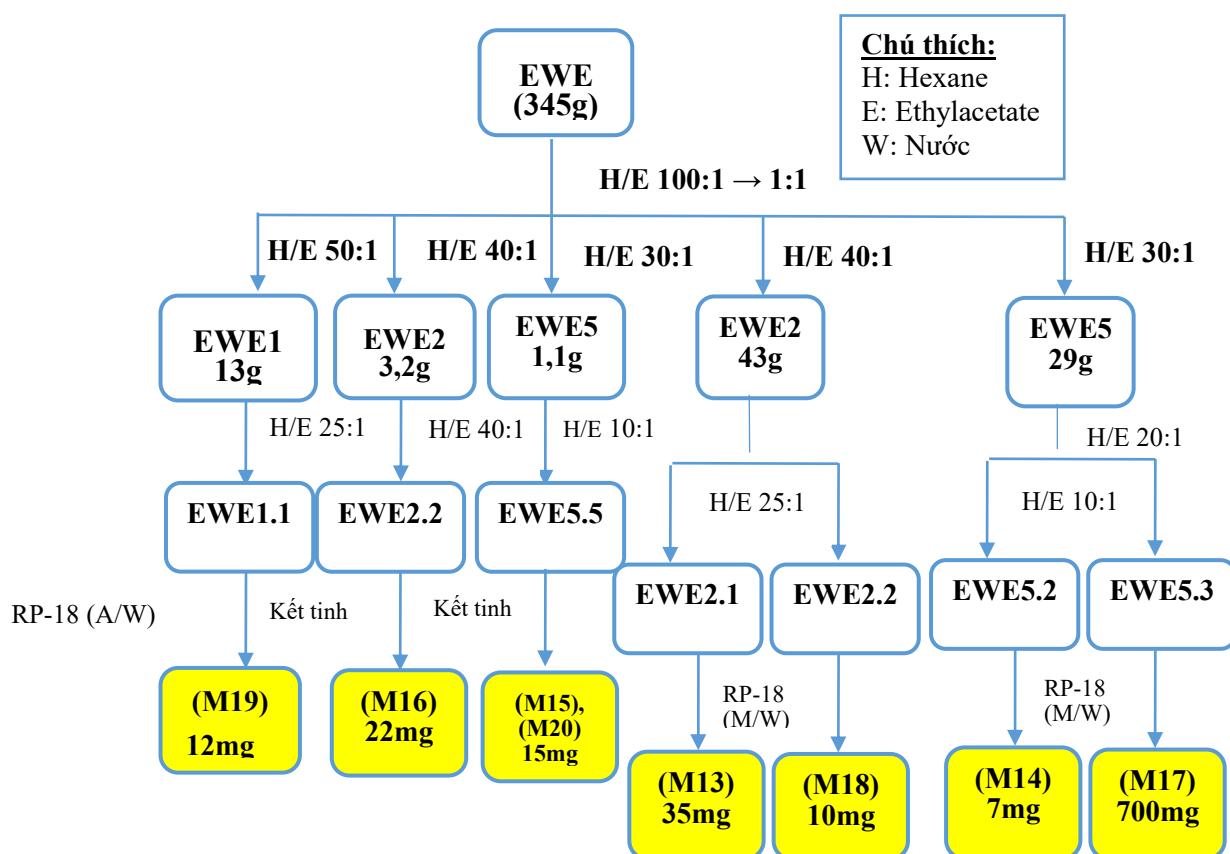
❖ Hợp chất apigenin (EWE4)

Phân đoạn EWC5 (29g) tiếp tục triển khai sắc ký cột với hệ dung môi cloroform/methanol (20:1,10:1, v:v) thu được 5 phân đoạn nhỏ (EWC 5.1-5.5). Phân đoạn EWC5.5 tiếp tục sắc ký cột silicagel với hệ dung môi cloroform/methanol (7:1, v:v) thu được **hợp chất 15** (15mg). Chất bột màu vàng; ESI-MS m/z : 271 $[M+H]^+$; 1H -NMR (500 MHz, DMSO- d_6) (δ ppm): 6,78 (1H, *s*, H-3), 6,20 (1H, *d*, $J = 2,0$ Hz, H-6), 6,49 (1H, *d*, $J = 2,00$ Hz, H-8), 7,93 (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-2', H-6'), 6,93 (2H, *d*, $J = 8,0$ Hz, H-3', H-5'), 12,96 (1H, *s*, 5-OH), 10,83 (1H, *s*, 7-OH), 10,35 (1H, *s*, 4'-OH); ^{13}C -NMR (125 MHz, DMSO- d_6) (δ ppm): 102,8 (C-3), 181,7 (C-4), 161,4 (C-5), 98,8 (C-6), 163,7 (C-7), 93,9 (C-8), 157,3 (C-9), 103,7 (C-10), 121,2 (C-1'), 128,4 (C-2',6'), 115,9 (C-3',5'), 161,1 (C-4').

❖ Hợp chất acid betulinic (EWE87)

Phân đoạn EWC5 (29g) tiếp tục triển khai sắc ký cột với hệ dung môi cloroform/methanol (20:1,10:1, v:v) thu được 5 phân đoạn nhỏ (EWC 5.1-5.5). Phân đoạn EWC5.5 tiếp tục sắc ký cột silicagel với hệ dung môi cloroform/methanol (7:1, v :v) thu được **hợp chất 20** (25 mg).

Chất bột màu trắng, đ.n.c: 280-282⁰C; IR_{v_{max}}^{KBr}cm⁻¹: 3410 (OH), 3055, 2361, 1756; EI-MS: *m/z* 456 [M]⁺; ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 4,75 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H -29a); 4,62 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz, H-29b); 3,22 (1H, *m*, H-3); 1,97 (3H, *s*, H-30); 1,26 (3H, *s*, H-23); 1,09 (3H, *s*, H-27); 1,06 (3H, *s*, H-25); 1,01 (3H, *s*, H-26); 0,83 (3H, *s*, H-24). ¹³C-NMR (125 MHz, CDCl₃) δ (ppm): 180,3 (C-28); 150,3 (C-20); 109,7 (C-29); 78,8 (C-3); 56,3 (C-17); 55,3 (C-5); 50,5 (C-9); 49,3 (C-19); 46,7 (C-18); 42,4 (C-14); 40,7 (C-8); 38,7 (C-1); 38,4 (C-4); 38,4(C-13); 37,2 (C-10); 37,0 (C-22); 34,2 (C-7); 32,1 (C-16); 30,5 (C-15); 29,7 (C-21); 27,9 (C-23); 27,4 (C-2); 25,5 (C-12); 20,8 (C-11); 19,4 (C-30); 18,3 (C-6); 16,1 (C-26); 16,0 (C-25); 15,3 (C-24); 14,7 (C-27).



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 VSVKD, gây độc tế bào trên 5 dòng tế bào MCF7, HepG2, Hela, HGC-27, A549 theo mô tả trong mục 2.2.5.

2.3.4. Nghiên cứu quang phổ Raman để xác định tính chất đặc thù của mật ong bạc hà Hà Giang

Tất cả các mẫu mật ong bạc hà được thu thập tại Hà Giang vào các thời điểm khác nhau trong năm 2022 để đảm bảo sự đa dạng và phản ánh đầy đủ về điều kiện môi trường và thời tiết trong quá trình nghiên cứu, cũng như đảm bảo tính đa dạng và độ biểu diễn đầy đủ trong tập mẫu nghiên cứu khi thực hiện các phân tích phổ Raman theo phương pháp mô tả ở mục 2.2.6.2.

Mẫu mật ong được pha loãng bằng nước với tỷ lệ 50% bằng cách hòa tan 1 g mật ong trong 1 mL nước cất hai lần. Các mẫu đã được khuấy đều bằng máy khuấy Vortex trong 1 phút để đảm bảo tính đồng nhất của dung dịch, và sau đó được đo phổ Raman ngay lập tức. Các thí nghiệm được thực hiện ít nhất ba lần, ở các khoảng thời gian khác nhau, trên các dung dịch chuẩn bị mới của mật ong, ở ít nhất ba điểm cho mỗi mẫu, nhằm đảm bảo độ chính xác của phương pháp.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Mẫu được thu hái vào tháng 11 năm 2019 tại Đồng Văn - Hà Giang. Mẫu được giám định bởi TS Nguyễn Quốc Bình - Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Mẫu thực vật được xác định tên khoa học của loài là *Elsholtzia winitiana* Craib.

Mẫu sau thu hái được loại bỏ tạp chất và chia làm hai phần, một phần được chưng cất tinh dầu và phần còn lại được phơi khô trong bóng râm dùng để điều chế các phần cận chiết.

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.

Mẫu cây tươi được phân tách riêng phần hoa và phần thân-cành-lá (gọi tắt là phần thân-lá). Với 200g mẫu phần hoa hoặc 200g mẫu phần thân - lá được thu nhận tinh dầu bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước bằng bộ cất Clevenger với bình cầu thủy tinh 2 lit (đây là phương pháp chưng cất tinh dầu cơ bản - truyền thống, ký hiệu cho phương pháp là ppTT).

Cũng với mỗi lượng mẫu như trên - với mục tiêu đánh giá hiệu quả và chất lượng của quá trình thu nhận tinh dầu loài *Elsholtzia winitiana* Craib. - thử nghiệm áp dụng phương pháp chưng cất có kèm sự hỗ trợ của vi sóng (sau đây gọi tắt là phương pháp vi sóng, ký hiệu phương pháp là ppVS). Chi tiết về các phương pháp này được mô tả tại Chương 3, mục 3.1. Hiệu suất thu nhận tinh dầu của mỗi lần được tính bằng phần trăm khối lượng tinh dầu trên khối lượng mẫu tươi.

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'

Từ Bảng 3.1 cho thấy chiết xuất tinh dầu bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước cho hiệu suất thu nhận tinh dầu cao hơn chiết xuất tinh dầu bằng hơi nước có hỗ trợ vi sóng. Cụ thể là đối với mẫu hoa, ppTT cho hiệu suất là 1.15% còn ppVS là 0.91%; còn đối với mẫu thân-lá, ppTT cho hiệu suất là 0.77% và 0.61%. Sự giảm về hiệu suất có thể là dưới tác dụng của vi sóng (800 W), nước trong tế bào mẫu bị nóng lên, áp suất bên trong gia tăng nhanh chóng làm cho các tuyến tinh dầu bị vỡ ra và tinh dầu được giải phóng ra ngoài rất nhanh và ồ ạt gây thất thoát về hiệu suất.

Các mẫu tinh dầu được làm khan bằng Na_2SO_4 và phân tích thành phần, hàm lượng các cấu tử bằng phương pháp sắc ký khí kết hợp phổ khối (GC-MS).

Cấu trúc của các chất được nhận biết nhờ so sánh phổ khối lượng EI-MS và chỉ số thời gian lưu (RI) của chúng với các thư viện phổ hiện có. Hàm lượng của các chất trong tinh dầu được xác định bằng phương pháp sắc ký khí có detector ion hóa ngọn lửa (phương pháp GC-FID).

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

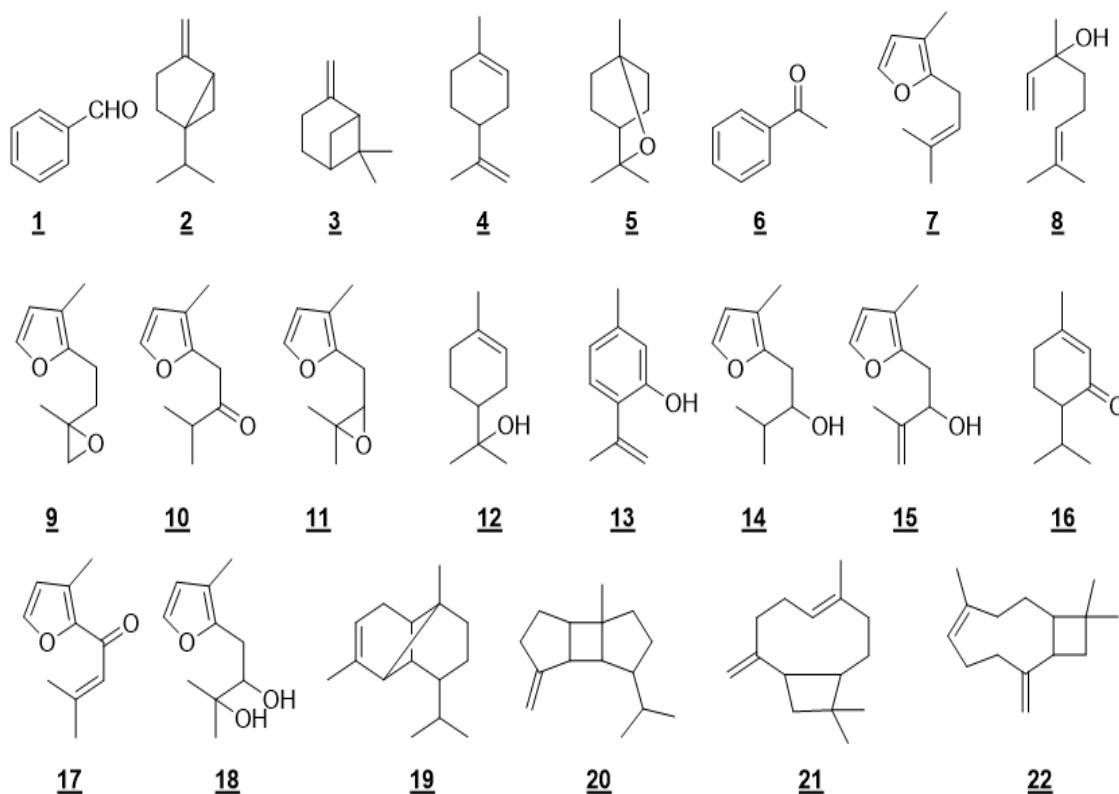
Kết quả phân tích tinh dầu từ mẫu hoa và mẫu thân-lá được thu nhận bằng phương pháp chưng cất lôi cuốn nước (ppTT) và phương pháp chưng cất có kèm sự hỗ trợ của vi sóng (ppVS) được ghi nhận ở Bảng 3.2 và Bảng 3.3 (Sắc ký đồ có trong phụ lục kết quả phân tích 04 mẫu tinh dầu). Bảng 3.2 cho biết thành 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	<i>Unknown 1 (95, 166, RI 1161)</i>	1161	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166	166 (10%, M ⁺), 95 (100), 82 (10)
10	<i>Unknown 2 (95, 166, RI 1175)</i>	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	<i>Unknown 3 (96, 168, RI 1213)</i>	1214	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168	168 (10%, M ⁺), 96 (100), 81 (30)
15	<i>Unknown 4 (95, 166, RI 1222)</i>	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	<i>Unknown 5 (95, 184, RI 1336)</i>	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	

TT	Tên cấu tử	RI	CTPT	KLPT	Phổ khối lượng
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	
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.

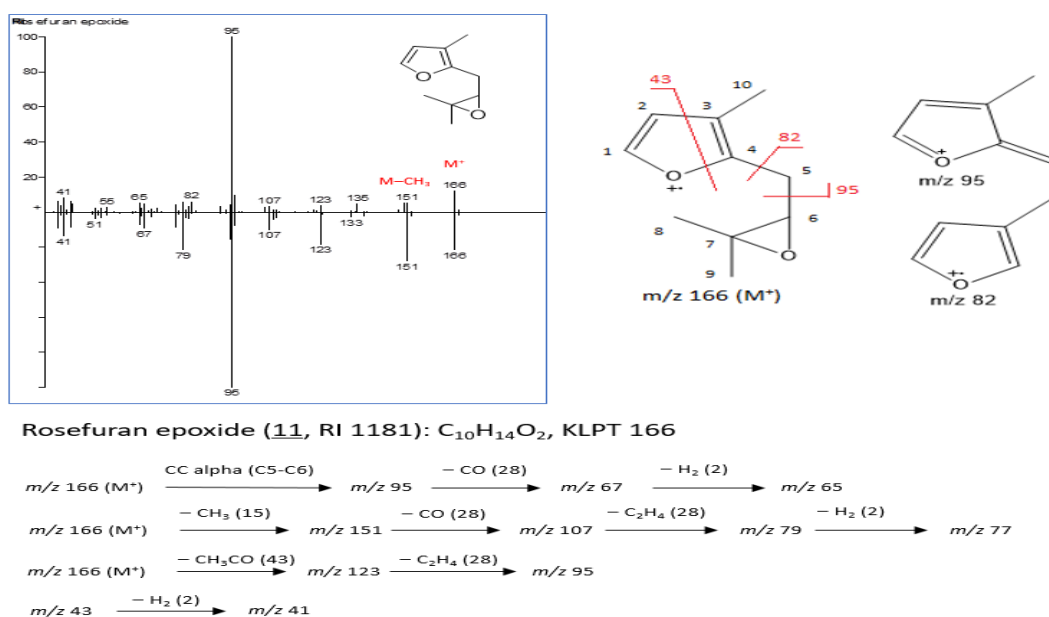


*(**9**, **10**, **14**, **15**, và **18** là cấu trúc dự đoán cho các chất **Unknown 1-5**).

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

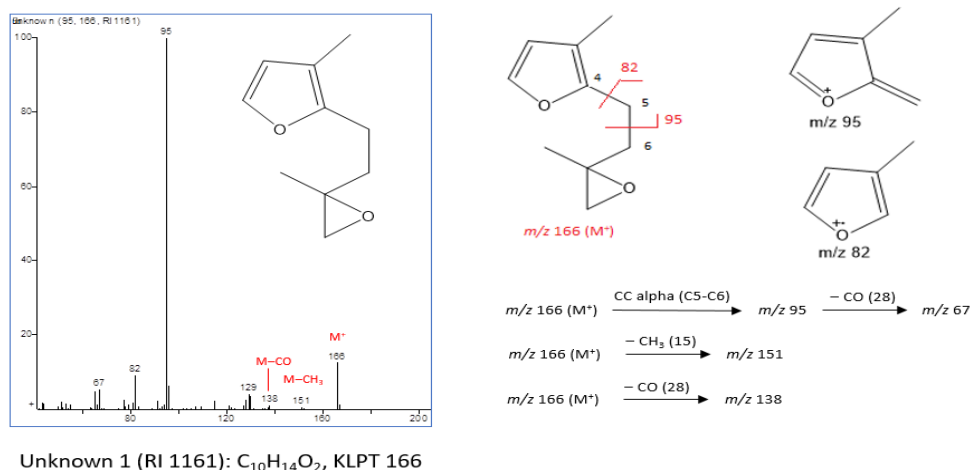


Hình 3.2. Sơ đồ phân mảnh của Rosefuran epoxide.

(Vị trí của carbon theo cách đánh số cho khung monoterpene acyclic)

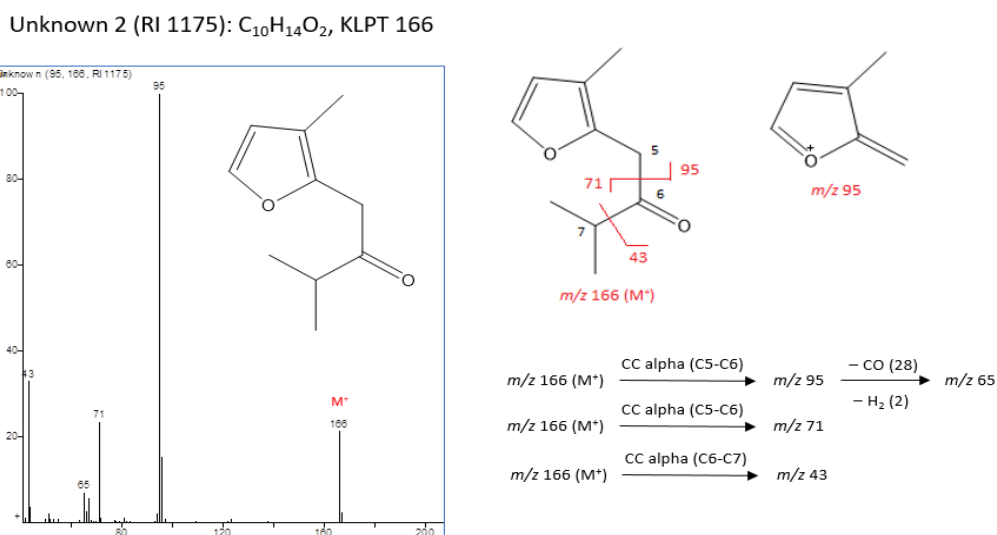
Các peak đặc trưng trên phổ khối lượng của Rosefuran epoxide là các peak ở m/z 166 (Peak phân tử, khá mạnh), ở m/z 95 (peak cơ sở) và ở m/z 151 (M-CH₃). Cơ chế phân mảnh đặc trưng của Rosefuran epoxide là sự chia cắt *alpha* giữa C5 và C6 tạo ra mảnh m/z 95, sự chia cắt *alpha* giữa C4 và C5 tạo ra mảnh m/z 82. Các cơ chế phân mảnh đặc trưng khác là sự mất đi các gốc CH₃ (15) và C=O (28).

Phổ khối lượng của chất **unknown 1** gần như trùng lặp với phổ khối lượng của Rosefuran epoxide. Cấu trúc dự đoán và sơ đồ phân mảnh của chất **unknown 1** được trình bày trên Hình 3.3, trong đó cấu trúc của **unknown 1** chỉ khác cấu trúc của Rosefuran epoxide ở vị trí của nhóm epoxide (giữa C7 và C9 thay vì giữa C6 và C7). Cũng như Rosefuran epoxide, phổ khối lượng của **unknown 1** đặc trưng bởi các peak ở m/z 166, m/z 95 và m/z 82.



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

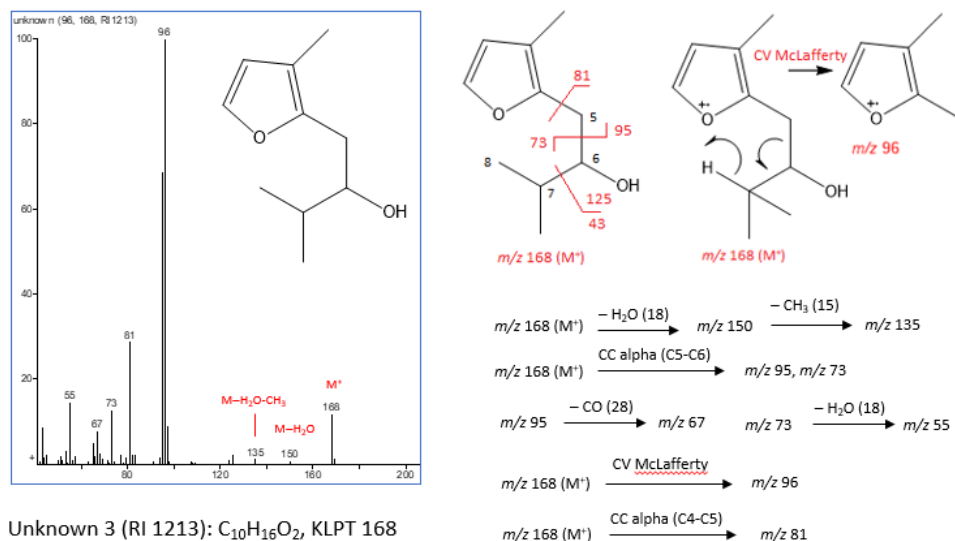
Phổ khối lượng của chất **unknown 2** (Hình 3.4) có peak phân tử cũng ở m/z 166, tương ứng với công thức phân tử $C_{10}H_{14}O_2$. Peak cơ sở ở m/z 95 và các peak ở m/z 71, và m/z 43 là sản phẩm của sự chia cắt *alpha* giữa C5 - C6 và giữa C6 - C7, gợi ý sự có mặt của một nhóm C=O ở vị trí C6.



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

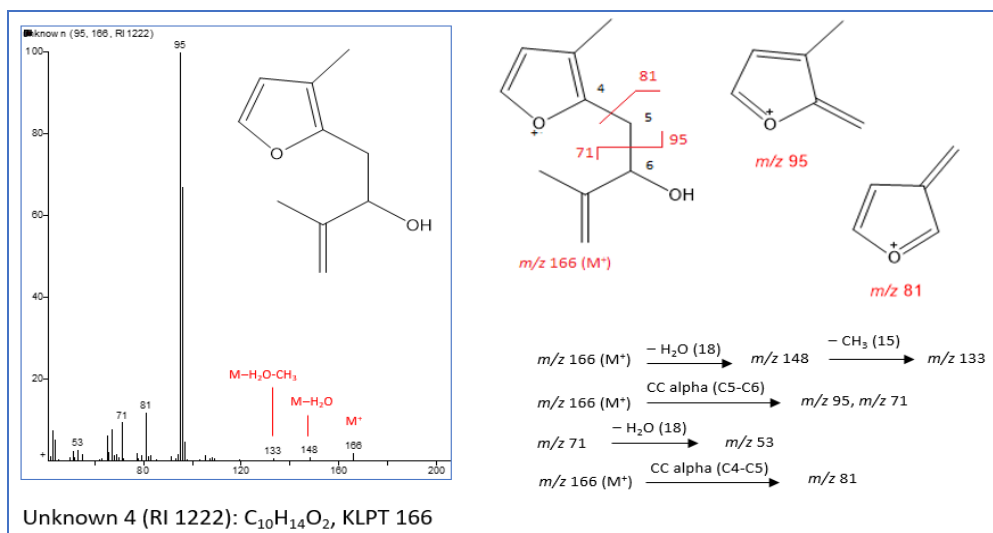
Khác với Rosefuran epoxide, phổ khối lượng của chất **unknown 3** (Hình 3.5) có peak phân tử ở m/z 168, tương ứng với công thức phân tử $C_{10}H_{16}O_2$. Peak M-

H₂O ở m/z 150 chứng minh sự có mặt của một nhóm chức OH. Mảnh ở m/z 96 hình thành do chuyển vị McLafferty gợi ý sự có mặt của một nguyên tử hydro ở vị trí C7. Cùng với đó, các mảnh ở m/z 95 và m/z 73 hình thành do chia cắt alpha ở vị trí giữa C5 và C6 gợi ý sự có mặt của nhóm OH ở vị trí C6.



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

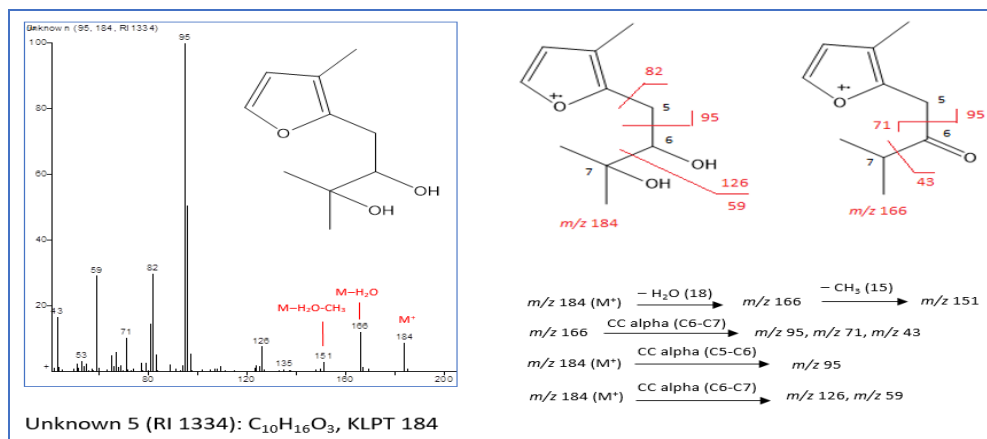
Phổ khối lượng của **unknown 4** có hình dạng rất tương đồng với phổ của **unknown 3**. Chúng khác biệt ở sự chuyển dịch của một số peak đặc trưng xuống hai đơn vị khối lượng, gợi ý sự có mặt của thêm một nối đôi trong cấu trúc của **unknown 3**. Phân tích sơ đồ phân mảnh của phổ khối dẫn tới đề xuất cấu trúc cho **unknown 4** ở Hình 3.6.



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

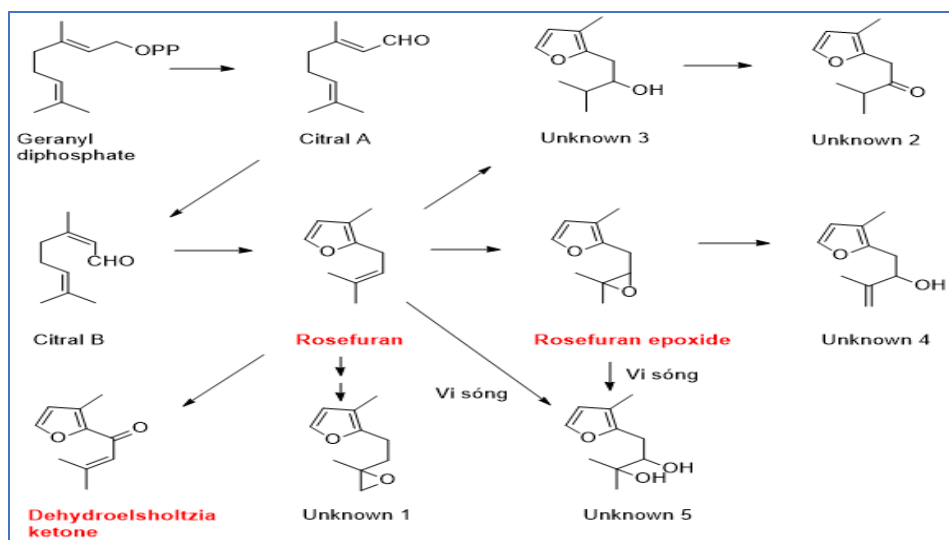
Peak phân tử của chất **unknown 5** xuất hiện ở m/z 184, tương ứng với công thức phân tử là C₁₀H₁₆O₃. Dựa trên sơ đồ phân mảnh, đề xuất cấu trúc cho chất

unknown 5 như biểu diễn trên Hình 3.7 với hai nhóm OH ở vị trí C6 và C7. Sau khi mất một phân tử H_2O từ nhóm OH ở vị trí C7 kèm theo chuyển vị enol-ketone, peak phân tử tạo thành mảnh m/z 166 có cấu trúc trùng với ion phân tử của chất **unknown 2**. Mảnh m/z 166 này cho các peak đặc trưng như trên phổ của chất **unknown 2**.



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 đá *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

T T	Tên cấu tử	Tinh dầu Hoa		Tinh dầu Thân-lá	
		ppTT	ppVS	ppTT	ppVS
1.	Benzaldehyde	0.97	-	2.10	-
2.	Sabinene	0.11	-	0.16	-
3.	β -Pinene	0.20	-	0.24	-
4.	Limonene	0.70	-	0.52	-
5.	Cineole 1,8	0.36	-	0.24	-
6.	Acetophenone	0.36	-	0.40	-
7.	Rosefuran	12.47	4.28	1.77	1.22
8.	Linalool	0.39	0.20	0.40	0.28
9.	<i>unknown 1 (95, 166, RI 1161)</i>	1.10	-	-	-
10.	<i>unknown 2 (95, 166, RI 1175)</i>	3.50	2.43	1.75	1.71
11.	Rosefuran epoxide	63.17	56.13	69.56	44.86
12.	α -Terpineol <a->	0.15	0.16	0.22	0.14
13.	8,9-dehydrothymol	0.17	-	-	-
14.	<i>unknown 3 (96, 168, RI 1213)</i>	4.61	5.28	4.60	4.29
15.	<i>Unknown 4 (95, 184, RI 1222)</i>	2.06	1.19	-	-
16.	Piperitone	0.18	0.23	0.17	0.18
17.	Dehydro <i>Elsholtzia</i> ketone	0.26	-	0.21	0.24

T T	Tên cấu tử	Tinh dầu Hoa		Tinh dầu Thân-lá	
		ppTT	ppVS	ppTT	ppVS
18.	<i>Unknown 5 (95, 184, RI 1336)</i>	-	18.06	-	26.65
19.	α -Copaene	-	-	0.17	0.37
20.	β -Bourbonene	-	-	0.12	0.16
21.	β -Caryophyllene <E->	6.74	-	11.12	-
22.	Caryophyllene <Z>	-	6.99	-	10.80
23.	α -Humulene	0.80	0.85	1.29	1.34
24.	γ -Muurokene	-	-	-	0.31
25.	Germacrene D	1.19	1.49	1.74	2.56
26.	β -Selinene	-	-	-	0.19
27.	Bicyclogermacrene	0.19	0.19	0.28	0.69
28.	γ -Cadinene	-	-	-	0.16
29.	δ -Cadinene	-	-	0.10	0.47
30.	Scapanol	-	-	-	0.20
31.	Caryophyllene oxide	0.31	0.59	1.43	1.21
32.	Humulene Epoxide II	-	-	0.13	-
33.	α -Cadinol	-	-	-	0.15
Tổng số		99.99	98.07	98.72	98.60
Tổng hợp theo nhóm cấu tử					
<i>Monoterpene hydrocarbon</i>		<i>1.01</i>	<i>-</i>	<i>0.92</i>	<i>-</i>
<i>Monoterpene chứa oxi</i>		<i>88.42</i>	<i>87.96</i>	<i>78.92</i>	<i>79.57</i>
<i>Furanoid monoterpene</i>		<i>87.17</i>	<i>87.37</i>	<i>77.89</i>	<i>78.97</i>
<i>Sesquiterpene hydrocarbon</i>		<i>8.92</i>	<i>9.52</i>	<i>14.82</i>	<i>17.05</i>
<i>Sesquiterpene chứa oxi</i>		<i>0.31</i>	<i>0.59</i>	<i>1.56</i>	<i>1.56</i>
<i>Hợp chất có nhân benzene đơn giản</i>		<i>1.33</i>	<i>-</i>	<i>2.5</i>	<i>-</i>

Các cấu tử trong tinh dầu chiếm tới 99.99%, 98.07%, 98.72% và 98.60% tổng số các peak xuất hiện trên sắc ký đồ, số liệu trên tương ứng với các tinh dầu của mẫu phân hoa chưng cất lôi cuốn hơi nước, tinh dầu của mẫu phân hoa chưng cất hỗ trợ bằng vi sóng, tinh dầu của mẫu phân thân-lá chưng cất lôi cuốn hơi nước và tinh dầu của mẫu phân thân-lá chưng cất hỗ trợ bằng vi sóng.

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

Loài *Elsholtzia winitiana* Craib. có phân bố khá hạn hẹp, chủ yếu được tìm thấy và sử dụng trong dân gian ở Thái Lan, Việt Nam và một số tỉnh phía nam Trung Quốc giáp giới với nước ta. Đến nay, mới có bốn công trình nghiên cứu sâu về thành phần hóa học của tinh dầu từ loài này và được thực hiện trên mẫu cây thu hái từ các vùng miền khác nhau của Việt Nam, điểm đặt biệt là không tìm thấy các công bố khoa học tương tự trên cây này ở các quốc gia khác.

Nghiên cứu đầu tiên (1997) về thành phần hóa học của tinh dầu cây *E.*

Winitiana bởi Nguyễn Thị Tâm, Casanova và cộng sự với tiêu đề bằng tiếng Pháp “*Elsholtzia sauvage (Elsholtzia winitiana Craib.) une plante à huile essentielle riche en cinéole*” (*Elsholtzia winitiana Craib.*, một cây tinh dầu giàu cineole) [60]. Các thành phần chính được tìm thấy gồm cineole (65.6%), β -pinene (5%), p -cymene (4.7%), γ -terpinene (3.9%), sabinene (2.5%), α -pinene (1.8%), myrcene (1.7%) và α -terpinene (%).

Năm 2007, Lesueur, Nguyễn Thị Tâm và cộng sự công bố kết quả nghiên cứu về tinh dầu của 2 mẫu gồm toàn bộ phần trên mặt đất của loài *E. winitiana*, một mẫu thu hái vào tháng 11-2002 tại Mộc Châu (Sơn La) và một mẫu thu hái vào tháng 8-2004 tại Sa Pa (Lào Cai) [61]. Có 3 chất thuộc nhóm furanoid monoterpene được tìm thấy gồm Rosefuran, *Elsholtzia* ketone và Dehydro*Elsholtzia* ketone. Giống kết quả mà chúng tôi thu được như nêu ở phần trên, chúng là nhóm chất có hàm lượng áp đảo trong cả hai mẫu (tổng các furanoid monoterpene của mẫu Mộc Châu là 91.4% và của mẫu Sa Pa là 79.9%). Điều khác biệt là mẫu ở Mộc Châu có thành phần furanoid monoterpene chính là *Elsholtzia* ketone (87.5%), còn mẫu Sa Pa có thành phần furanoid monoterpene chính là Rosefuran (56%). Rosefuran không được tìm thấy trong mẫu ở Mộc Châu.

Năm 2017, Hoàng Đình Hòa và Nguyễn Văn Lợi công bố kết quả nghiên cứu tinh dầu thu được từ loài *E. winitiana* thu ở huyện Bắc Quang tỉnh Hà Giang [62]. Chung cất 100 g nguyên liệu tươi, đã thu được 0.9 ml tinh dầu có tỉ trọng ở 20°C là 0.875, chỉ số khúc xạ là 1.452 và góc quay cực là 85°40'. Kết quả phân tích GC-MS cho thấy nhóm các monoterpene hydrocarbon chiếm 35.24%, nhóm các sesquiterpene hydrocarbon chiếm 8.84%, còn lại là các hợp chất chứa oxi chiếm 53.75% lượng tinh dầu. Các thành phần chứa oxi chính của tinh dầu là citral (11.25%), neryl acetate (7.02%), octanol (4.65%) và linalool (4.61%).

Các dữ liệu nêu trên cho thấy loài *E. winitiana* thu được ở các vị trí địa lý khác nhau của Việt Nam cho các mẫu tinh dầu với đặc trưng về thành phần hóa học khá là khác nhau, gợi ý về việc có thể tồn tại các dạng hóa học (chemotype) khác nhau của cùng một loài. Có thể tạm chia chúng thành 2 nhóm, một nhóm có các thành phần chính là các furanoid monoterpene và nhóm còn lại có các thành phần chính là các monoterpene không phải furanoid monoterpene. Nội trong mỗi nhóm cũng còn có thể phân biệt ra các quần thể có sự tích lũy cao về một thành phần cụ thể. Theo cách này, loài *E. winitiana* chúng tôi thu được ở huyện Đồng Văn tỉnh Hà Giang cũng như các mẫu do Lesueur và cs. thu được ở Mộc Châu và Sa Pa sẽ thuộc vào nhóm furanoid monoterpene, lần lượt với sự tích lũy cao của Rosefuran

epoxide, *Elsholtzia* ketone và Rosefuran. Các mẫu do Nguyễn Thị Tâm và cs. (chưa rõ nguồn gốc) cũng như mẫu do Hoàng Đình Hòa và cs. (thu được ở Bắc Quang) sẽ thuộc vào nhóm có các thành phần chính là các monoterpene không phải furanoid monoterpene với sự tích lũy cao của cineole cũng như của citral.

Rosefuran và Rosefuran epoxide là những cấu tử được tìm thấy ở các loài hoa hồng. Rosefuran được biết đến là thành phần tạo nên hương thơm đặc trưng của tinh dầu hoa hồng. Nó có ngưỡng mùi ở mức 200 ppb và chỉ chiếm 0.16% trong tinh dầu hoa hồng Bungari nhưng có ý nghĩa quyết định cho chất lượng của sản phẩm cao cấp này. Rosefuran còn được xác định là pheromone sinh dục cái của loài bọ ve. Rosefuran epoxide là dẫn xuất chuyển hóa của Rosefuran. Hiện nay Rosefuran epoxide còn chưa được nghiên cứu nhiều. Chính vì vậy, việc phát hiện Rosefuran và dẫn xuất epoxide của nó với hàm lượng cao trong tinh dầu thân-lá và hoa của loài *E. winitiana* mọc hoang dại tại vùng cao nguyên đá Đồng Văn tạo ra tiềm năng trong việc phát triển chọn lọc giống tốt cho phát triển nguồn nguyên liệu cho ngành hương liệu.

Kết quả trên Bảng 3.1 cho thấy phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước có vi sóng hỗ trợ có thể gia nhiệt nhanh, tiết kiệm được thời gian nhưng hiệu suất trích ly kém hơn so với phương pháp chưng cất lôi cuốn hơi nước thông thường. Cụ thể, hiệu suất trích ly bằng phương pháp vi sóng đối với mẫu tinh dầu hoa là 0,91%, mẫu tinh dầu thân-lá là 0.61%, đều thấp hơn hiệu suất trích ly bằng phương pháp truyền thống (đối với mẫu tinh dầu hoa là 1.15%, mẫu tinh dầu thân lá là 0.77%). Điều này có thể được lý giải rằng, dưới tác dụng của vi sóng, nước trong tế bào nóng lên, áp suất bên trong gia tăng nhanh chóng làm cho các tuyến tinh dầu bị vỡ ra, kết quả làm tăng nhanh quá trình tinh dầu được giải phóng ra ngoài và không kịp ngưng tụ, hoặc đã phân hủy các hợp chất đó [104]. Tuy nhiên có thể là hiệu quả của quá trình làm lạnh không đáp ứng được sự bùng nổ các chất bốc hơi này, dẫn đến một lượng tinh dầu nhất định bị thất thoát ra bên ngoài thiết bị. Sự vắng mặt của các chất dễ bay hơi (các chất **1** – **6** trên Bảng 3.2) trong thành phần của các tinh dầu vi sóng là gợi ý cho giả thiết này.

Các kết quả trên Bảng 3.2 còn cho thấy, trong trường hợp thu nhận tinh dầu của loài *E. winitiana*, việc áp dụng vi sóng để thúc đẩy quá trình chưng cất không những làm cho hiệu suất thu hồi tinh dầu giảm đi mà còn gây ra những biến đổi rõ rệt về thành phần hóa học của tinh dầu, đặc biệt với sự xuất hiện của hợp chất **unknown 5 (18)** vốn không được tìm thấy trong thành phần của tinh dầu thu được bằng phương pháp chưng cất thông thường. Có sự ảnh hưởng rõ ràng tới hàm lượng

các cấu tử trong tinh dầu bởi phương pháp chiết xuất. Cụ thể đối với mẫu hoa, phương pháp vi sóng đã làm giảm hàm lượng của Rosefuran từ 12.47% xuống còn 4.28% và làm giảm hàm lượng của Rosefuran epoxide từ 63.17% xuống còn 56.13%; thay vào đó, trong thành phần tinh dầu lại xuất hiện hợp chất **unknown 5** với hàm lượng 18.06%. Đối với mẫu thân-lá, phương pháp vi sóng đã làm giảm hàm lượng của Rosefuran từ 1.77% xuống còn 1.22% và làm giảm hàm lượng của Rosefuran epoxide từ 69.56% xuống còn 44.86%; thay vào đó, trong thành phần tinh dầu lại xuất hiện hợp chất **unknown 5** với hàm lượng 26.65%. Trong cả hai trường hợp, sự giảm hàm lượng của Rosefuran và Rosefuran epoxide tương đương với sự tăng hàm lượng của chất **unknown 5** đưa tới gợi ý cho giả thiết rằng dưới điều kiện vi sóng và nhiệt độ cao thì Rosefuran và đặc biệt là Rosefuran epoxide đã cộng hợp với nước để chuyển hóa thành chất **unknown 5** (Xem sơ đồ trên Hình 3.12).

Sự xuất hiện của (Z)- β -Caryophyllene thay vì (E)- β -Caryophyllene trong các mẫu vi sóng cũng gợi ý cho phản ứng đồng phân hóa của (E)- β -Caryophyllene dưới điều kiện vi sóng và nhiệt độ. Tuy nhiên giả thiết này còn cần được kiểm chứng thêm.

Những nghiên cứu trên cho thấy mỗi phương pháp thu nhận tinh dầu cho ta kết quả khá khác biệt biệt thú vị.

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)

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 13C-NMR (CDCl₃, 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 thể 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 $-CH_2-$ giữa furan và epoxide.

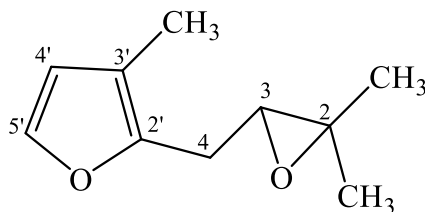
Tín hiệu NOESY bổ sung hỗ trợ làm rõ cấu trúc không gian.

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)

^a Đo trong $CDCl_3$, ^b 500MHz, ^c 125 MHz, ^d 300MHz, ^f 75 MHz

Từ các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu (Rosefuran epoxide, TLTK), cấu trúc TD1 được xác định là Rosefuran epoxide.



Rosefuran epoxide

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

3.1.5.1. Kết quả đánh giá hoạt tính chống oxy hóa của các tinh dầu

Đánh giá hoạt tính chống oxy hóa (04 mẫu tinh dầu) thông qua phản ứng bao vây gốc tự do DPPH được phân tích theo phương pháp mô tả ở mục 2.2.5.3. Hoạt tính chống oxy hóa được đánh giá thông qua giá trị hấp thụ ánh sáng của dịch thí nghiệm so với đối chứng khi đọc trên máy Elisa ở bước sóng 515nm. Kết quả trình bày ở bảng 3.6

Bảng 3.6. Kết quả đánh giá HTCO trên hệ DPPH của các mẫu tinh dầu

	Ký hiệu mẫu	Nồng độ đầu của mẫu thử ($\mu\text{g/ml}$)	Khả năng trung hòa gốc tự do (SC, %)	SC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
TT	Chứng (+) [axit ascorbic 5mM]	44	90,21 $\pm$ 0,25	11,3
	Chứng (-) [DPPH/EtOH+ DMSO]	-	0,0 $\pm$ 0,0	-
1	TD Thân-lá (ppTT)	200	20,77 $\pm$ 0,6	-
2	TD Thân-lá (ppVS)	200	5,56 $\pm$ 0,7	-
3	TD Hoa (ppTT)	200	11,64 $\pm$ 0,5	-
4	TD Hoa (ppVS)	200	9,60 $\pm$ 0,8	-

Các mẫu thử không biểu hiện hoạt tính chống oxy hóa trên hệ DPPH với nồng độ thí nghiệm là 200 $\mu\text{g/ml}$. Tuy nhiên kết quả đánh giá cũng cho thấy rằng tinh dầu được chưng cất bằng ppTT có khả năng trung hòa gốc tự do cao hơn tinh dầu được chưng cất bằng ppVS (so cùng nguyên liệu mẫu thu tinh dầu).

3.1.5.2. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của tinh dầu thân-lá

Đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định (02 mẫu tinh dầu) được thực hiện trên các phiên vi lượng 96 giếng (96-well microtiter plate) theo phương pháp của Vander Bergher and Vlietlinck (1991), và Mc Kane L., and Kandel (1996) [1AE]. Tiến hành thí nghiệm như mô tả ở phần thực nghiệm Mục 3.3. Kết quả được trình bày trên bảng 3.7.

Bảng 3.7. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của tinh dầu thân-lá loài *E. winitiana*

Tinh dầu thân-lá	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC: µg/ml)							
	Vi khuẩn Gr(-)		Vi khuẩn Gr(+)		Nấm mốc		Nấm men	
	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>B.subtilis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>A.niger</i>	<i>F.oxysporum</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.albicans</i>
ppTT	>200	>200	>200	>200	>200	200	>200	200
ppVS	50	>200	50	100	>200	>200	100	>200
Đối chứng	6.0	9.8	9.4	17.8	6.2	3.0	8.1	2.3

Kết quả thử nghiệm cho thấy tinh dầu phần thân-lá chung cất theo ppTT không thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định đối với 8 chủng vi sinh vật thử nghiệm, còn tinh dầu phần thân-lá thể hiện kháng 4 vi sinh vật kiểm định với mức yếu hoặc rất yếu.

3.1.5.3. Kết quả đánh giá hoạt tính kháng tế bào của tinh dầu thân-lá

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 IC₅₀ là 23,9 µg/mL (đối với PC3) và 56,2 µg/mL (đối với A549) (giá trị tương ứng đối với paclitaxel 3,5 và 3,7 ng/mL).

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

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

❖ Hợp chất 2 (apigenin, EWE4)

Hợp chất EWE4 dạng chất bột màu vàng nâu. Điểm nóng chảy: 347-348°C

Phổ khối lượng ESI-MS ghi nhận ion $[M+H]^+$ tại m/z 271, phù hợp với công thức phân tử $C_{15}H_{10}O_5$ và khối lượng phân tử 270 Da.

Phổ 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) cho thấy các tín hiệu proton đặc trưng như sau:

- δH 6.78 (1H, s, H-3): proton trên khung chromone.
- δH 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.49 (1H, d, $J = 2.5$ Hz, H-8): cặp proton vòng A có tương tác meta.
- δH 7.93 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-2', H-6'), 6.93 (2H, d, $J = 9.0$ Hz, H-3', H-5'): kiểu thế đối xứng ortho trên vòng B.
- δH 12.96 (1H, s, 5-OH), 10.83 (1H, s, 7-OH), 10.34 (1H, s, 4'-OH): nhóm hydroxyl phenolic.

Phổ ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) ghi nhận 15 tín hiệu carbon, bao gồm:

- δC 164.1 (C-2), 102.8 (C-3), 181.7 (C-4), 157.3 (C-5), 98.8 (C-6), 163.7 (C-7), 93.9 (C-8), 161.4 (C-9), 103.7 (C-10).
- δC 121.2 (C-1'), 128.4 (C-2', C-6'), 115.9 (C-3', C-5'), 161.1 (C-4').

Dữ liệu phổ HSQC, HMBC và DEPT xác nhận các mối liên kết proton-carbon và cấu trúc vòng flavone chuẩn.

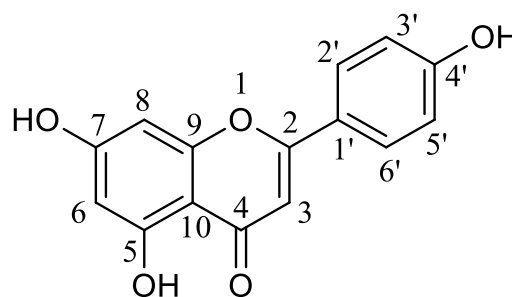
Bảng 3.8. Số liệu phổ của hợp chất EWE4 (Apigenin)

Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
2	164.1	164.1	-	-	C
3	102.8	102.3	6.78 (s)	6.78 (s)	CH
4	181.7	181.8	-	-	C=O
5	157.3	157.3	-	-	C-OH
6	98.8	98.8	6.20 (d, 2.0)	6.19 (d, 2.0)	CH
7	163.7	163.7	-	-	C-OH
8	93.9	93.9	6.49 (d, 2.5)	6.48 (d, 2.0)	CH
9	161.4	161.4	-	-	C

10	103.7	103.7	-	-	C
1'	121.2	121.1	-	-	C
2'	128.4	128.4	7.93 (d, 9.0)	7.92 (d, 8.8)	CH
3'	115.9	115.9	6.93 (d, 9.0)	6.92 (d, 8.8)	CH
4'	161.1	161.1	-	-	C-OH
5'	115.9	115.9	6.93 (d, 9.0)	6.92 (d, 8.8)	CH
6'	128.4	128.4	7.93 (d, 9.0)	7.92 (d, 8.8)	CH
5-OH	-	-	12.96 (s)	-	OH phenol
7-OH	-	-	10.83 (s)	-	OH phenol
4'-OH	-	-	10.34 (s)	-	OH phenol

Tổng hợp các dữ liệu trên, hợp chất được xác định là 4',5,7-trihydroxy-flavone hay còn được gọi là apigenin.

Apigenin là chất chống oxy hóa mạnh (hơn cả acid ascorbic) giúp bảo vệ ADN không bị hư hại do sự oxy hóa. [4d02] Apigenin có tác dụng ngăn cản sự phóng thích histamine và sự tạo thành H₂O₂ và là chất kháng viêm. Hợp chất này cũng đã được phân lập từ các loài E. bodinieri, E. ciliata, E. rugulosa, E. cristata.



Apigenin
(Gerritsen, 1995).

❖ Hợp chất 3 (Apigenin 7-O-β-D-glucopyranoside, EG12.1)

Hợp chất **EG12.1** dạng chất bột màu vàng nhạt. Điểm nóng chảy: 237-238°C.

Trên phổ ¹H-NMR, EG12.1 thể hiện bảy proton thơm tại δH 6.50 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.82 (1H, s, H-8), 6.65 (1H, s, H-3), 7.89 (2H, d, J = 8.5 Hz, H-2', H-6') và 6.95 (2H, d, J = 9.0 Hz, H-3', H-5'), đặc trưng cho phần aglycon của flavon với các nhóm thế ở vị trí 5,7 và 4'. Proton anomeric của phần đường xuất hiện tại

δH 5.09 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-1''), cùng với các proton khác từ H-2'' đến H-6'' nằm trong vùng δH 3.43–3.96 ppm.

Trên phổ ^{13}C -NMR (DEPT), xuất hiện các tín hiệu carbon phù hợp với cấu trúc của flavon (8 carbon không gắn với H, 7 carbon bậc ba) và phần đường glucose gồm 6 carbon. Tín hiệu tại δC 101.65 ppm tương ứng C-1'', cùng các carbon C-2'' đến C-6'' nằm trong khoảng δC 62.49 – 78.40 ppm.

Phổ HSQC cho thấy mối tương quan giữa các proton và carbon tương ứng trong phân đường, nổi bật là cặp H-1'' (δH 5.09) – C-1'' (δC 101.65).

Phổ HMBC tuy không ghi nhận tương tác trực tiếp giữa H-1'' và C-7, nhưng xuất hiện tương tác yếu giữa H-8 (δH 6.82 ppm) và C-1'' (δC 101.65 ppm), xác nhận phân đường gắn với aglycon tại vị trí C-7 thông qua liên kết O-glycoside.

Thủy phân EG12.1 bằng HCl 10%, so sánh với chuẩn cho thấy đường là D-glucose, với cấu hình β -D-glucopyranosyl được xác định nhờ hằng số J của proton anomeric.

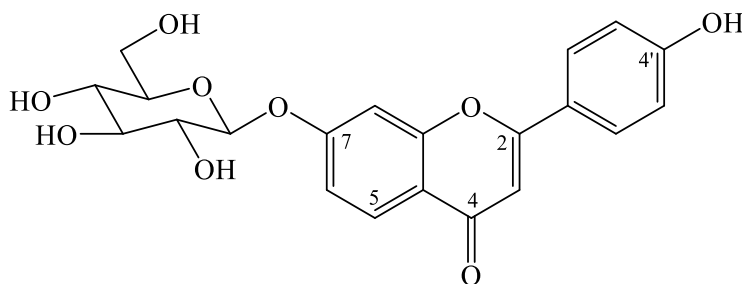
Bảng 3.9. Số liệu phổ của hợp chất EG12.1

C	δC (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δC^* (ppm)	δH^* (ppm)	Ghi chú
2	166.77	–	163.4	–	C-2 aromatic
3	104.15	6.65 (1H, s)	100.3	–	
4	184.07	–	182.5	–	C=O
4a	–	–	105.8	–	
5	162.91	–	164.7	–	
6	101.20	6.50 (1H, d, $J = 2.0$)	99.63	6.43 (d, $J \approx 2.2$)	
7	164.80	–	161.9	–	
8	96.10	6.82 (1H, s)	94.65	6.811 (d, $J = 2.2$)	
8a	–	–	156.94	–	
1'	123.09	–	120.81	–	

2',6'	129.63	7.89 (2H, d, J = 8.5)	128.55	7.939 (d, J $\approx$ 8.9)	
3',5'	117.05	6.95 (2H, d, J = 9.0)	116.02	6.924 (d, J $\approx$ 8.6)	
4'	162.87	–	161.6	–	
1''	101.65	5.09 (1H, d, J = 7.8)	99.9	5.030 (d, J $\approx$ 7.6)	H anomeric, β -glucose
2''	74.75	3.50 (1H, m)	73.5	3.228 (ddd, est.)	
3''	77.87	3.52 (1H, m)	77.6	3.272 (m)	
4''	71.30	3.43 (1H, m)	69.9	3.131 (m)	
5''	78.40	3.57 (1H, m)	76.9	3.528 (m)	
6''	62.49	3.75 (1H, dd); 3.96 (1H, dd)	63.5	–	Ha, Hb of CH ₂

^a Đo trong DMSO, ^b 500MHz, ^c 125MHz; ^d Đo trong MeOD, ^e 600MHz, ^f 150MHz

Từ các dữ liệu phổ và đối chiếu tài liệu tham khảo, hợp chất EG12.1 được xác định là Apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside.



Apigenin 7-O- β -D-glucopyranoside

❖ Hợp chất 4 (Quercetin, EWF8)

Hợp chất **EWF8** dạng chất rắn màu vàng. Điểm nóng chảy: 314-315°C.

Quercetin (EWF8) là flavonoid phổ biến có cấu trúc 3,5,7,3',4'-pentahydroxyflavone, tồn tại dưới dạng chất rắn màu vàng, điểm nóng chảy 314–315°C.

Phổ khối lượng ESI-MS cho thấy ion $[M+H]^+$ tại m/z 303, tương ứng với công thức phân tử C₁₅H₁₀O₇.

Phổ ¹H-NMR (CD₃OD, 500 MHz) ghi nhận các tín hiệu đặc trưng cho hệ flavonoid:

- Hai proton ở δH 6.21 (1H, s) và δH 6.41 (1H, s) thuộc vòng A (H-6 và H-8), cho thấy sự thể hydroxyl tại vị trí 5 và 7.

- Ba tín hiệu ở δH 7.75 (1H, s), 7.66 (1H, d, $J=2.0$ Hz), và 6.91 (1H, d, $J=8.5$ Hz) lần lượt ứng với H-2', H-6', H-5', gợi ý sự thể trên vòng B ở vị trí 3', 4', 5'.

Phổ ^{13}C -NMR (CD₃OD, 125 MHz) thể hiện 15 tín hiệu carbon, nằm trong khoảng δC 94.4 – 177.4 ppm, tương ứng với cấu trúc flavone có nhân C₆-C₃-C₆.

Tín hiệu carbon đặc trưng gồm: δC 177.4 (C-4, carbon carbonyl), δC 146.3 và 148.8 (C-2, C-4' – carbon liên kết với nhóm OH), δC 94.4 và 99.3 (C-8 và C-6 – tương ứng với proton H-8 và H-6), δC 116.0 – 121.7 (vòng B).

Bảng 3.10. Số liệu phổ của EWF8

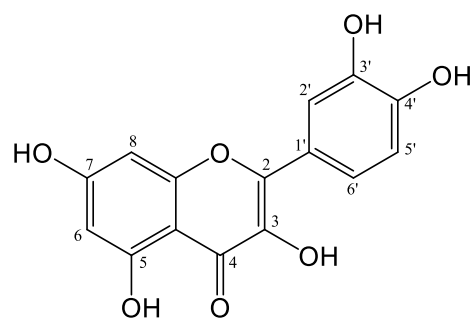
Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
2	146.3	147.5			C quaternary
3	137.2	136.4			C quaternary
4	177.4	176.5			C=O
5	162.5	161.4			C-OH
6	99.3	98.9	6.21 (s)	6.18 (d, $J=2.0$)	H-6
7	165.6	164.5			C-OH
8	94.4	94.0	6.41 (s)	6.40 (d, $J=2.0$)	H-8
9	158.3	156.8			C quaternary
10	104.5	103.7			C quaternary
1'	124.2	122.6			C quaternary
2'	116.0	115.8	7.75 (s)	7.67 (d, $J=2.2$)	H-2'
3'	146.2	145.7			C-OH
4'	148.8	148.4			C-OH
5'	116.3	116.3	6.91 (d,	6.89 (d,	H-5'

			J=8.5)	J=8.3)	
6'	121.7	120.7	7.66 (d, J=2.0)	7.53 (dd, J=8.6, 2.2)	H-6'

^aĐo trong MeOD, ^b500MHz, ^c125 MHz, ^d150MHz, ^f600 MHz

Các tương quan từ phổ DEPT, HSQC, HMBC và dữ liệu so sánh từ tài liệu (Adeyemi et al., 2010) khẳng định cấu trúc của EWF8 là Quercetin.

Quercetin có hoạt tính sinh học rất phong phú như chống oxy hoá [4d06], ức chế hoạt động của monoamin oxydaza ($IC_{50} 10,8 \pm 0,03$) [4d07], ức chế sự chuyển dạng lympho bào [4d08], ức chế sự hoạt động của các enzym iNOS, COX-2 và protein C hoạt hoá [4d09]. Quercetin là một trong các flavonoid có nhiều tiềm năng ứng dụng



Quercetin (EWF8)

❖ Hợp chất 5 (Kaempferol, HG4.1)

Hợp chất HG4.1 dạng bột màu vàng tươi. Điểm nóng chảy: 276-278°C.

Trên phổ khối lượng ESI-MS ghi nhận peak ion giả phân tử $[M+H]^+$ tại m/z 287 và $[M-H]^-$ tại m/z 285, phù hợp với công thức phân tử $C_{15}H_{10}O_6$, ứng với khối lượng phân tử 286 Da.

Trên phổ 1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz), HG4.1 thể hiện tín hiệu đặc trưng cho hệ flavonoid không glycoside:

- Hai tín hiệu tại δH 6.19 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6) và 6.39 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8) thuộc vòng A, mang nhóm hydroxyl tại vị trí 5 và 7.

- Ba tín hiệu ở vòng B gồm δH 7.38 (1H, dd, $J = 2.0, 9.0$ Hz, H-2',6') và δH 6.90 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-3',5'), phản ánh sự thế đối xứng tại vị trí 4'.

Trên phổ ^{13}C -NMR và DEPT (150 MHz), xuất hiện 15 nguyên tử carbon, gồm nhiều carbon bậc bốn không mang proton, đặc trưng của hệ flavon.

Trên phổ HSQC xác định được các tương ứng giữa proton và carbon: H-6

(δH 6.19) $\leftrightarrow$ C-6 (δC 99.2), H-8 (δH 6.39) $\leftrightarrow$ C-8 (δC 94.4), H-3'/5' (δH 6.90) $\leftrightarrow$ C-116.2, H-2'/6' (δH 7.38) $\leftrightarrow$ C-130.6.

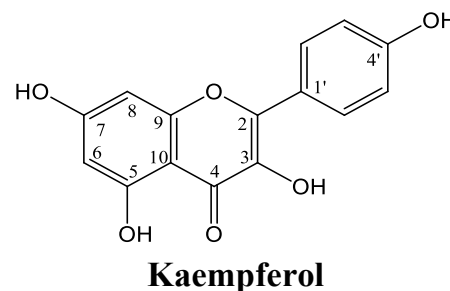
Phổ HMBC xác định được tương tác từ H-6 và H-8 đến các carbon C-5, C-7, C-9 và C-10, và từ các proton vòng B đến C-1' và C-4'.

Bảng 3.11. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của Kaempferol (HG4.1)

Vị trí	δH (ppm, J Hz)	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH^* (ppm)	Ghi chú
2	—	147.0	146.2	—	carbon aglycon vị trí 2
3	—	135.8	135.1	—	
4	—	176.0	175.1	—	nhóm C=O
5	—	160.9	160.0	—	hydroxyl hóa ở C-5
6	6.19 (d, J = 2.0)	103.2	102.7	6.21	proton α -meta với 5-OH
7	—	164.1	163.3	—	hydroxyl hóa ở C-7
8	6.39 (d, J = 2.0)	93.7	93.2	6.44	proton α -meta với 7-OH
9	—	156.4	155.6	—	
10	—	98.4	97.9	—	
1'	—	121.8	121.2	—	carbon nối vòng B
2'	8.09 (d, J $\approx$ 8.6)	129.6	129.0	8.37	proton ortho với 4'-OH
3'	6.92 (d, J $\approx$ 8.6)	115.6	115.0	6.92	
4'	—	159.3	158.5	—	hydroxyl hóa ở vị trí 4'
5'	6.92 (d, J $\approx$ 8.6)	115.6	115.0	6.92	
6'	8.09 (d, J $\approx$ 8.6)	129.6	129.0	7.96	proton đối xứng với 2'

Tổng hợp các dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo, HG4.1 được xác định là kaempferol (3,5,7,4'-tetrahydroxyflavone).

Kaempferol có hoạt tính chống oxy hoá [4d06] ức chế sự chuyển dạng lympho bào [4d08], ức chế sự hoạt động của các enzym iNOS, COX-2 [4d09], ức chế sự hình thành PGE₂ (IC₅₀: 19±4.1 µM) và NO (IC₅₀ = 5.2 ±3.1 µM) [4d11].



❖ Hợp chất 6 (Rutin, EWF88)

Hợp chất **EWF88** dạng chất rắn màu vàng. Điểm nóng chảy: 190°C.

Phổ khối lượng ESI-MS cho tín hiệu ion [M+H]⁺ tại m/z 611, phù hợp với công thức phân tử C₂₇H₃₀O₁₆, tương ứng với flavonol glycoside – cụ thể là quercetin 3-O-rutinoside.

Trên phổ ¹H-NMR (CD₃OD), xuất hiện các tín hiệu đặc trưng của hệ khung flavonoid:

- Vòng A: δH 6.24 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-6), 6.42 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-8), đặc trưng cho hệ 5,7-dihydroxyflavon.
- Vòng B: δH 7.69 (1H, d, J = 2.5 Hz, H-2'), 6.89 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-5'), 7.65 (1H, dd, J = 2.0, 8.0 Hz, H-6'), phù hợp với mẫu phân bố 3',4'-dihydroxy trên vòng B.

- Vùng đường:

- + H-1'' (Glc): δH 5.13 (1H, d, J = 8.0 Hz)
- + H-1''' (Rha): δH 4.54 (1H, d, J = 1.0 Hz)
- + H-6''' (CH₃-Rhamnose): δH 1.14 (3H, d, J = 6.5 Hz)
- + Các proton đường khác nằm trong vùng δH 3.25 – 3.81 (multiplet)

Trên phổ ¹³C-NMR (CD₃OD), có tổng cộng 27 tín hiệu carbon gồm:

- 15 carbon của khung flavonoid (aglycon quercetin)
- 6 carbon của glucose và 6 carbon của rhamnose
- Cacbon anomeric: C-1'' (δC 104.7), C-1''' (δC 102.4); CH₃ rhamnose (C-6''', δC 17.9)

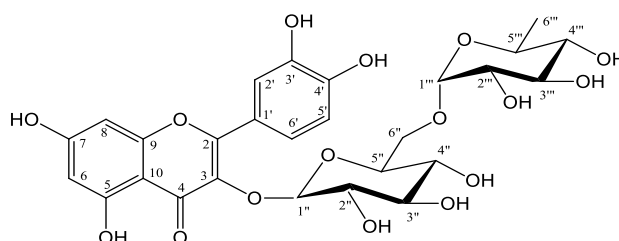
Trên phổ HSQC và HMBC có tương tác tương ứng:

- H-1'' ↔ C-1'', H-1''' ↔ C-1''', H-6''' ↔ C-6''', H-6, H-8 ↔ C-6, C-8...
- HMBC xác nhận mối liên kết giữa H-1'' và C-3 của aglycon, H-1''' và C-6''

Bảng 3.12. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của Rutin

Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
6	100.0	99.8	6.24 (d, 2.0)	6.19 (d, 2.2)	Vòng A
8	94.9	94.8	6.42 (d, 2.0)	6.37 (d, 2.2)	Vòng A
2'	117.7	115.9	7.69 (d, 2.5)	7.66 (d, 2.0)	Vòng B
5'	116.1	117.6	6.89 (d, 8.0)	6.86 (d, 8.4)	Vòng B
6'	123.6	122.9	7.65 (dd, 2.0, 8.0)	7.62 (dd, 8.4, 2.0)	Vòng B
1''	104.7	104.7	5.13 (d, 8.0)	5.08 (d, 7.6)	Glucose anomeric
1'''	102.4	102.2	4.54 (d, 1.0)	4.52 (d, 1.2)	Rhamnose anomeric
6'''	17.9	17.9	1.14 (d, 6.5)	1.12 (d, 6.0)	CH ₃ – Rhamnose

Tổng hợp các dữ liệu phổ trên, hợp chất được xác định là rutin (quercetin 3-O-rutinoside).

**Rutin**

❖ Hợp chất 7 (Protocatechuic acid, HG17)

Hợp chất **HG17** dạng tinh thể hình kim không màu. Đ.n.c: 201-202°C.

Phổ khối lượng ESI-MS ghi nhận ion giả phân tử $[\text{M}+\text{H}]^+$ tại m/z 155, tương ứng với công thức phân tử $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$ và khối lượng phân tử 154 Da.

Trên phổ ^1H -NMR (Acetone- d_6 , 600 MHz), hợp chất thể hiện ba proton thơm với các tín hiệu:

- δH 7.52 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-2)
- δH 7.74 (1H, dd, $J = 8.5, 1.8$ Hz, H-6)

- δH 6.88 (1H, d, $J = 8.5$ Hz, H-5)

→ phản ánh mẫu vòng thơm thế 1,3,4 với hai nhóm hydroxyl tại C-3 và C-4.

Phổ ^{13}C -NMR (150 MHz, Acetone- d_6) ghi nhận 7 tín hiệu carbon bao gồm:

- Ba carbon không mang proton: δC 145.5 (C-3), 150.7 (C-4), 123.5 (C-1)

- Ba carbon mang proton: δC 117.4 (C-2), 115.6 (C-5), 122.9 (C-6)

- Một carbon carbonyl của nhóm $-COOH$ tại δC 167.9 (C-7).

Phổ DEPT xác định có 3 carbon CH (C-2, C-5, C-6), 3 carbon bậc bốn và 1 carbon carbonyl.

Tín hiệu tương quan HSQC và HMBC khẳng định:

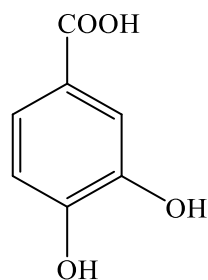
- H-2 $\leftrightarrow$ C-2, H-5 $\leftrightarrow$ C-5, H-6 $\leftrightarrow$ C-6 (HSQC)

- H-6 $\leftrightarrow$ C-4, C-7; H-5 $\leftrightarrow$ C-3, C-1; H-2 $\leftrightarrow$ C-1, C-3 (HMBC)

Bảng 3.13. Số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR của HG17 (Protocatechuic acid)

Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
1	123.5	123.2	-	-	Carbon nối COOH
2	117.4	117.6	7.52 (d, 1.8)	7.50 (d, 1.8)	CH – H-2
3	145.5	145.8	-	-	C-OH
4	150.7	150.3	-	-	C-OH
5	115.6	115.9	6.88 (d, 8.5)	6.87 (d, 8.4)	CH – H-5
6	122.9	122.6	7.74 (dd, 8.5, 1.8)	7.72 (dd, 8.4, 2.0)	CH – H-6
7	167.9	168.1	-	-	COOH (carbonyl)

Tổng hợp dữ liệu phổ trên, hợp chất HG17 được xác định là 3,4-dihydroxybenzoic acid (protocatechuic acid).



Protocatechuic acid

Protocatechuic acid có tác dụng chống viêm, chống oxy hóa, chống tăng đường huyết, kháng khuẩn, chống ung thư, chống lão hóa, chống athro-genic, chống khối u, chống hen suyễn, chống loét, chống co thắt và thần kinh.[4d14]

❖ **Hợp chất 8 (5,7,3',5'- tetrahydroxyflavanone, HG33)**

Hợp chất **HG33** dạng chất rắn màu trắng. Điểm nóng chảy: 264-266°C.

Phổ ¹H-NMR (MeOD, 600 MHz) cho thấy tám proton thơm đặc trưng cho cấu trúc flavonoid:

- Các tín hiệu ở δH 6.93 (1H, d, J = 0.6 Hz), 6.80 (1H, d, J = 1.2 Hz), 6.81 (1H, d, J = 0.6 Hz) ứng với các proton H-2', H-4', H-6' trên vòng B.

- Tín hiệu δH 5.30 (1H, dd, J = 3.0, 12.6 Hz) ứng với H-2;

- δH 5.90 (1H, d, J = 2.0 Hz) và 5.92 (1H, d, J = 2.0 Hz) lần lượt tương ứng với H-6 và H-8 trên vòng A.

- Hai tín hiệu tại δH 2.73 (dd, J = 3.0, 16.8 Hz) và 3.08 (dd, J = 12.6, 17.4 Hz) ứng với hai proton methylene ở C-3 cho thấy khung flavanone đặc trưng.

Phổ ¹³C-NMR (MeOD, 150 MHz) và DEPT xác định được tổng cộng 15 tín hiệu carbon:

- Một carbon carbonyl tại δC 197.7 (C-4),

- Một carbon mang nhóm hydroxyl δC 80.5 (C-2),

- Một carbon methylene δC 44.1 (C-3),

- Các tín hiệu khác nằm trong khoảng δC 96–168 ppm cho thấy sự hiện diện của nhiều carbon bậc bốn và carbon vòng thơm.

Phổ HSQC và HMBC hỗ trợ gán vị trí tín hiệu proton và carbon chính xác hơn.

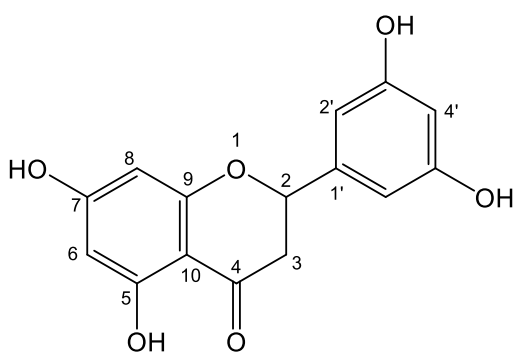
Bảng 3.14. Số liệu phổ của HG33

Vị trí	δC (ppm)	δH (ppm, J Hz)	Loại carbon	Ghi chú
2	80.5	5.30 (dd, J = 3.0, 12.6)	CH	Mang nhóm OH
3	44.1	3.08 (dd, J = 17.4, 12.6),	CH ₂	

		2.73 (dd, J = 3.0, 16.8)		
4	197.7	-	C=O	Carbonyl
5	168.3	-	Cq	Mang OH
6	97.0	5.90 (d, J = 2.0)	CH	
7	165.4	-	Cq	Mang OH
8	96.1	5.92 (d, J = 2.0)	CH	
9	164.8	-	Cq	
10	103.3	-	Cq	
1'	131.8	-	Cq	
2'	114.7	6.93 (d, J = 0.6)	CH	
3'	146.9	-	Cq	Mang OH
4'	116.2	6.81 (d, J = 0.6)	CH	
5'	146.5	-	Cq	Mang OH
6'	119.2	6.80 (d, J = 1.2)	CH	

^a Đo trong MeOD, ^b150MHz, ^c600 MHz, ^e Đo trong DMSO, ^f125MHz, ^g500 MHz.

Tổng hợp các dữ liệu phổ, hằng số J, điểm nóng chảy và đối chiếu với tài liệu tham khảo [4d15], hợp chất HG33 được xác định là 5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone..



5,7,3',5'- tetrahydroxyflavanone

5,7,3',5'-tetrahydroxyflavanone thể hiện hoạt tính chống oxy hóa với khả năng ức chế enzym tyrosinase với IC_{50} 0.423 mM và hoạt tính gây độc tế bào NCI-H187 (small cell lung cancer) với IC_{50} 29.97 μ g/ml [4d15]

❖ Hợp chất 9 ((+)-Catechin, EWFE262)

Hợp chất **EWFE262** là chất rắn màu trắng. $[\alpha]^{24}_D = +18$ (c 0,01, CH_3COCH_3).

Phổ khối lượng ESI-MS cho tín hiệu của peak ion $[M+H]^+$ tại m/z 291 tương ứng với công thức phân tử $C_{15}H_{14}O_6$.

Trên phổ ^1H -NMR cho tín hiệu là một flavonoid thể hiện bởi các proton aromatic của vòng B ở δ_{H} 6.89 (1H, s), 6.67 (2H, d, $J = 8.0$ Hz), 6.65 (1H, dd, $J = 8.0$ Hz) ứng với proton H-2', H-6', H-5'; tín hiệu ở δ_{H} 5.89 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 5.72 ppm (1H, d, $J = 2.0$ Hz) ứng với proton H-6, H-8 ở vòng A và bốn proton ở δ_{H} 4.73 (1H, s), 4.01 (1H, d, $J = 3.5$ Hz), 2.69 (1H, dd, $J = 16.5, 4.0$ Hz) và 2.47 ppm (1H, dd, $J = 17.0, 3.0$ Hz) gợi ý tới cấu trúc của hợp chất khung flavan-3-ol.

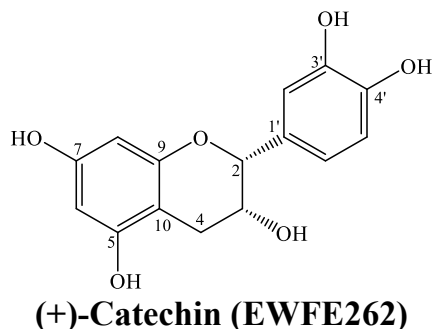
Phổ ^{13}C -NMR và DEPT cho tín hiệu của 15 nguyên tử carbon, trong đó có bảy carbon bậc bốn (không liên kết với hydro), bảy carbon methin và một carbon methylen. Số liệu phổ của EWFE262 có trong bảng 3.15.

Tương tác giữa các proton và carbon của hợp chất EWFE262 đã được ghi nhận bởi phổ 2 chiều HMBC và HSQC.

Bảng 3.15. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của hợp chất EWFE262

Vị trí	δC (ppm)	δH (ppm, J Hz)	Loại carbon	Ghi chú
2	78.1	4.73 (s)	CH	
3	94.9	4.03 (d, $J = 2.5$)	CH	
4	28.2	2.69 (dd, $J = 16.5, 4.0$), 2.47 (dd, $J = 17.0, 3.0$)	CH ₂	
5	156.5	-	Cq	Mang OH
6	95.2	5.89 (d, $J = 2.0$)	CH	
7	156.2	-	Cq	Mang OH
8	94.4	5.72 (d, $J = 2.0$)	CH	
9	155.8	-	Cq	
10	98.6	-	Cq	
1'	130.7	-	Cq	
2'	114.9	6.89 (s)	CH	
3'	144.4	-	Cq	Mang OH
4'	144.5	-	Cq	Mang OH
5'	114.8	6.67 (d, $J = 8.0$)	CH	
6'	118.0	6.67 (d, $J = 8.0$)	CH	

Từ hằng số vật lý, dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [4d18] giúp khẳng định cấu trúc của hợp chất EWFE262 là (+)-Catechin.



❖ **Hợp chất 10 (Hesperidin, EWFB113.119)**

EWFB113.119 có dạng chất rắn màu trắng. Điểm nóng chảy: 260-262⁰C.

Phổ khối lượng ESI-MS ghi nhận ion $[M+H]^+$ tại $m/z \sim 611$, phù hợp với công thức phân tử trên.

Trên phổ ¹H-NMR (DMSO-d₆, 600 MHz), các tín hiệu đặc trưng được ghi nhận như sau:

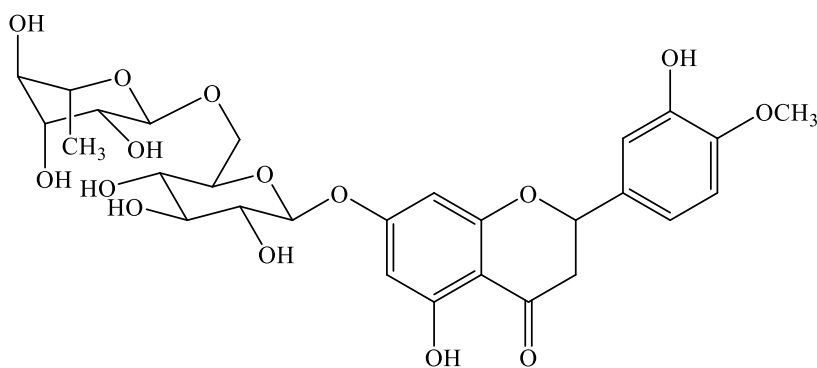
- Vòng C (flavanone): δ_H 5.49 (1H, dd, $J = 12.0, 3.0$ Hz, H-2), 3.13 (1H, m, H-3), 2.78 (2H, dd, $J = 17.0, 3.0$ Hz, H-3').
 - Vòng A: δ_H 6.12 (1H, brs, H-6), 6.14 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8).
 - Vòng B: δ_H 6.96 (1H, m, H-2'), 6.93 (1H, m, H-5'), 6.89 (1H, m, H-6').
 - Nhóm OH: δ_H 12.01 (1H, s, 5-OH), 9.08 (1H, s, 3'-OH).
 - Nhóm methoxy: δ_H 3.77 (3H, s, 4'-OCH₃).
 - Đường glucose (Glc) và rhamnose (Rha): δ_H 4.97 (1H, d, $J = 7.0$ Hz, H-1''), 4.52 (1H, brs, H-1'''), các proton còn lại của đường nằm trong khoảng 3.15–3.65 ppm.
 - CH₃ của Rhamnose: δ_H 1.08 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, H-6''').
- Phổ ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-d₆) ghi nhận 28 tín hiệu carbon:
- Các carbon thuộc khung flavanone: C-2 (78.3 ppm), C-3 (42.0 ppm), C-4 (197.0 ppm), các carbon vòng A, B trong khoảng 95–165 ppm.
 - Carbon đường: C-1'' (99.4 ppm), C-1''' (100.6 ppm) và các carbon đường khác trong khoảng 66–76 ppm.
 - Nhóm methoxy: δ_C 55.7 ppm.

Phổ HSQC, HMBC, COSY và DEPT xác nhận mối liên kết giữa phần aglycon và đường, khẳng định đường disaccharide (rutinoside) gắn ở vị trí C-7 thông qua C-1'' (Glc) và C-1''' (Rha).

Bảng 3.16. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của Hesperidin

Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
2	78.3	78.6	5.49 (dd, J = 12.0, 3.0)	5.50 (dd, J = 11.0, 5.0)	CH
3	42.0	42.2	3.13 (m); 2.78 (dd)	3.11; 2.78 (dd)	CH ₂
4	197.0	197.2	-	-	C=O
5	163.0	163.2	-	-	C-OH
6	96.4	96.5	6.12 (brs)	6.13 (d, 2.0)	CH
7	165.1	165.5	-	-	C-O-sugar
8	95.5	95.7	6.14 (d, 2.0)	6.14 (d, 2.0)	CH
9	162.5	162.7	-	-	C
10	103.3	103.5	-	-	C
2'	114.1	114.3	6.96 (m)	6.97 (d, 2.0)	CH
3'	146.4	146.6	-	-	C-OH
4'	147.9	148.1	-	-	C-OCH ₃
5'	112.0	112.2	6.93 (m)	6.88 (d, 8.0)	CH
6'	118.0	118.1	6.89 (m)	6.83 (dd, 8.0, 2.0)	CH
4'-OCH ₃	55.7	55.8	3.77 (s)	3.78 (s)	OCH ₃
1''	99.4	99.6	4.97 (d, 7.0)	4.97 (d, 7.2)	Glc - H-1
1'''	100.6	100.8	4.52 (brs)	4.54 (brs)	Rha - H-1
6'''	17.8	18.1	1.08 (d, 6.0)	1.09 (d, 6.0)	CH ₃ - Rhamnose
3'-OH	-	-	9.08 (s)	-	OH
5-OH	-	-	12.01 (s)	12.01 (brs)	OH

Tổng hợp các dữ liệu phổ, hợp chất được xác định là Hesperidin.



Hesperidin (EWF113.119)

Hợp chất hesperidin được nhiều nghiên cứu cho thấy hợp chất này có hoạt tính chống oxy hóa, chống viêm, ức chế sự tăng sinh và xâm lấn của tế bào ung thư, ngăn ngừa suy giảm nhận thức [17]

❖ **Hợp chất 11 (Oleanic acid, DBH1)**

Hợp chất **DBH1** dạng chất rắn màu trắng. Điểm nóng chảy: 310°C

Phổ HR-MS cho đỉnh tại m/z 491.3297 tương ứng với công thức phân tử $C_{30}H_{48}O_3$ ($M+H$)⁺.

Phổ 1H -NMR (MeOD, 500 MHz) ghi nhận các tín hiệu đặc trưng:

- δH 3.17 (1H, dd, $J = 4.5, 11.5$ Hz): proton tại vị trí C-3 gần nhóm OH.
- δH 5.25 (1H, t, $J = 3.5$ Hz): proton olefinic tại vị trí C-12.
- Các nhóm methyl thể hiện tín hiệu singlet trong khoảng 0.80–1.14 ppm.

Phổ ^{13}C -NMR (MeOD, 125 MHz) và DEPT xác định có 30 carbon bao gồm:

- δC 181.60 (C-28): carbon carbonyl của acid carboxylic.
- δC 79.72 (C-3): carbon mang nhóm OH.
- δC 126.91 và 139.64: hai carbon olefin tại C-12 và C-13.
- Ngoài ra là 7 methyl, 10 methylene, 5 methine và 8 carbon bậc bốn.

Phổ HSQC cho tương quan giữa H-3 (δH 3.17)/C-3 (δC 79.72) và H-12 (δH 5.25)/C-12 (δC 126.91), hỗ trợ cấu trúc urs-12-en-3 β -ol.

Bảng 3.17. Số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR của DBH1 (Oleanolic acid)

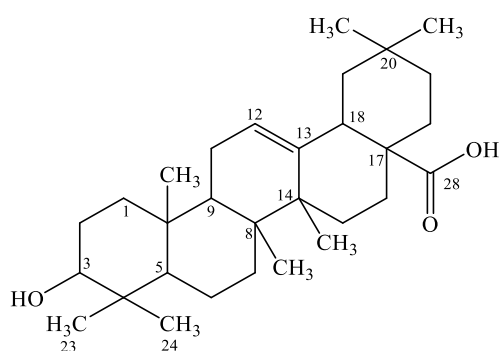
Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
1	38.11	38.7	1.69 (m)	1.70 (m)	
2	27.45	27.4	1.57 (m)	1.53 (m)	
3	79.72	79.0	3.17 (dd, 4.5,	3.20 (dd, 4.5,	CH-OH

			11.5)	11.5)	
4	39.84	38.9			
5	56.76	55.3	0.77 (d, J=9.0)	0.76 (d, J=9.0)	
6	19.49	18.3	1.57, 1.40 (m)	1.52, 1.41 (m)	
7	31.78	34.3	1.57, 1.40 (m)	1.52, 1.41 (m)	
8	40.80	40.7			
9	47.41	50.5		1.22 (m)	
10	39.84	47.2			
11	22.86	20.8	1.95 (ddd, 18.5, 11.0, 3.0)	1.95, 1.92 (dd)	
12	126.91	25.5	5.25 (t, J=3.5)	1.73, 1.06 (dd)	CH=CH
13	139.64	38.4		2.22 (ddd)	C=C
14	42.87	42.4			
15	27.91	29.7	2.05 (dd), 1.69 (dt)	1.56, 1.21 (m)	
16	24.37	32.1	1.95, 1.10 (m)	2.29, 1.42 (m)	
17	43.26	56.3			
18	40.80	49.3		1.64 (dd)	
19	45.22	46.9	1.62 (t), 1.11 (m)	3.02 (m)	
20	29.22	150.4			
21	34.35	30.5	1.69, 0.96 (m)	1.99, 1.41 (d)	
22	32.57	37.0	1.57, 1.40 (m)	1.51, 1.97 (m)	
23	28.78	27.9	0.99 (s)	0.99 (s)	CH ₃
24	16.37	15.3	0.80 (s)	0.77 (s)	CH ₃
25	16.02	16.1	1.00 (s)	1.00 (s)	CH ₃
26	17.64	16.0	0.91 (s)	0.94 (s)	CH ₃
27	25.33	14.7	1.14 (s)	1.00 (s)	CH ₃

28	181.60	179.8			COOH
29	24.10	109.7	0.87 (s)	4.75, 4.62 (brs)	CH ₃
30	21.56	19.4	0.98 (s)	1.70 (s)	CH ₃

^a Đo trong MeOD, ^b 500MHz, ^c 125 MHz, ^e Đo trong CDCl₃

So sánh với phổ của EWE87 (Betulinic acid) và tài liệu DOI:10.1039/C6AY02565J, hợp chất DBH1 được xác định là Oleanolic acid



Oleanolic acid

Oleanolic acid có hiệu quả trong việc bảo vệ chống lại tổn thương gan do hóa chất ở động vật thí nghiệm; cơ chế bảo vệ gan có thể liên quan đến việc ức chế hoạt hóa độc tố và tăng cường hệ thống miễn dịch của cơ thể. Nó cũng được công nhận có đặc tính chống viêm và hạ mỡ máu ở động vật thí nghiệm. Hợp chất này được ghi nhận tương đối không độc hại và đã được sử dụng trong mỹ phẩm và các sản phẩm y tế. Nhiều hợp chất là dẫn xuất của Oleanic acid cũng được nghiên cứu làm thuốc [4d20]

❖ Hợp chất 12 (EWE87, Betulinic acid)

Hợp chất EWE87 dạng chất bột màu vàng. Điểm nóng chảy: 280-282°C.

Phổ khối lượng (EI-MS) của hợp chất **EWE87** có pic ion m/z 456 [M]⁺, ứng với công thức C₃₀H₄₈O₃.

Phổ ¹H-NMR (CDCl₃), Các tín hiệu đặc trưng:

- δH 3.20 (1H, dd, J = 11.5, 5.0 Hz, H-3) — proton gần carbon mang nhóm –OH bậc hai.
- δH ~3.01–3.02 (1H, m, H-19).
- δH 0.95–0.99 (3H, s, H-23), 0.74–0.76 (3H, s, H-24), 0.80–0.83 (3H, s, H-25), 0.92–0.94 (3H, s, H-26), 0.96–0.99 (3H, s, H-27).
- δH 4.62–4.75 (2H, br s & d, J ≈ 2.0 Hz, H-29) và 1.69–1.70 (3H, s, H-30) — bộ tín hiệu isopropenyl.

Phổ ^{13}C -NMR (CDCl_3) và DEPT, các tín hiệu tiêu biểu: δC 79.0 (C-3), 180.3 (C-28), 150.3 (C-20), 109.7 (C-29), 19.4 (C-30); dải methyl C-23–C-27 ở δC 14.7–16.1. DEPT phân biệt CH_3 (C-23–27, C-30), CH_2 (C-19, C-29), CH (C-3...) và C bậc bốn (C-20, C-28...).

Phổ HSQC, tương quan: $\text{H-3} \leftrightarrow \text{C-3}$; $\text{H-29} \leftrightarrow \text{C-29}$; $\text{H-30} \leftrightarrow \text{C-30}$.

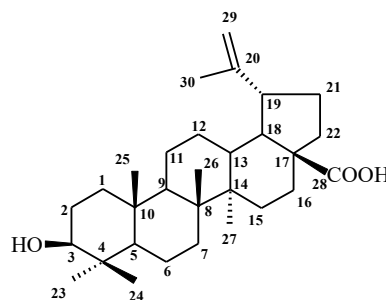
Phổ HMBC: $\text{H-3} \rightarrow \text{C-2, C-4, C-5}$; $\text{H-29} \rightarrow \text{C-20, C-30}$; $\text{H-30} \rightarrow \text{C-29, C-20}$; các Me (H-23/24/25) $\rightarrow$ carbon bậc bốn vùng vòng 4–5.

Bảng 3.18. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của HC20 (Betulinic acid)

Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
3	79.0		3.20 (dd, 11.5, 5.0)		CH–OH
19			3.01–3.02 (m)		
23	14.7–16.1		0.95–0.99 (s, 3H)		CH_3
24	14.7–16.1		0.74–0.76 (s, 3H)		CH_3
25	14.7–16.1		0.80–0.83 (s, 3H)		CH_3
26	14.7–16.1		0.92–0.94 (s, 3H)		CH_3
27	14.7–16.1		0.96–0.99 (s, 3H)		CH_3
28	180.3				COOH
29	109.7		4.75, 4.70 (br s & d, $J \approx 2.0$)		$=\text{CH}_2$
30	19.4		1.69–1.70 (s, 3H)		$\text{CH}_3\text{--C=}$
20	150.3				C=

Các dữ liệu ^1H , ^{13}C , DEPT, HSQC và HMBC trong CDCl_3 phù hợp với Betulinic acid (lup-20(29)-en-3 β -ol-28-oic). Bộ tín hiệu isopropenyl (C-29/C-30), carbonyl acid (C-28) và C-3 mang $-\text{OH}$ được xác nhận.

Betulinic acid có nhiều hoạt tính sinh học khác nhau như: ức chế tế bào HIV, kháng khuẩn, kháng viêm, chống sốt rét, chống oxy hóa.[4d22]. Hợp chất này cũng được phân lập từ loài E. rugulosa.



Betulinic acid

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

❖ Hợp chất 13 (Oroxylin A, EWW6)

Hợp chất **EWW6** dạng chất rắn màu vàng, nhiệt độ nóng chảy $195-196^\circ\text{C}$.

Phổ khối lượng (ESI-MS) cho pic $[\text{M}+\text{H}]^+$ có m/z 285, ứng với công thức phân tử $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$.

Phổ ^1H -NMR ($\text{DMSO}-d_6$, 600 MHz) cho thấy:

- δH 6.47 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.95 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8): cặp proton ở vòng A có tương tác meta.

- δH 7.93 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2', H-6'), 6.93 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', H-5'): tín hiệu đối xứng ortho ở vòng B.

- δH 6.79 (1H, s, H-3): proton trên khung chromone.

- δH 3.88 (3H, s): tín hiệu nhóm methoxy tại vị trí C-6.

- δH 12.91 (1H, s, 5-OH), 9.71 (1H, s, 7-OH): proton nhóm hydroxyl phenolic.

Phổ ^{13}C -NMR (150 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) ghi nhận 16 tín hiệu carbon, bao gồm:

- δC 163.2 (C-2), 103.7 (C-3), 181.1 (C-4), 156.3 (C-5), 98.9 (C-6), 163.9 (C-7), 93.5 (C-8), 157.7 (C-9), 102.9 (C-10).

- Vòng B: δC 123.3 (C-1'), 128.7 (C-2', C-6'), 115.6 (C-3', C-5'), 161.3 (C-4').

- Nhóm OCH_3 : δC 56.1.

Phổ DEPT, HSQC, HMBC xác nhận các tương quan proton-carbon, khẳng định cấu trúc flavone có 2 nhóm hydroxyl và 1 nhóm methoxy.

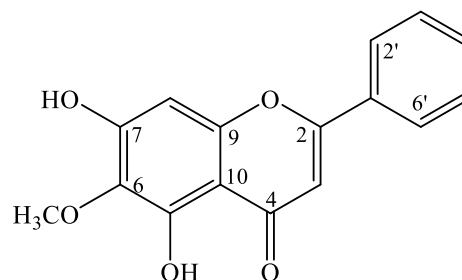
Bảng 3.19. Số liệu phổ của EWW6

Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
2	163.2	163.2	-	-	C
3	103.7	103.7	6.79 (s)	6.79 (s)	CH
4	181.1	181.1	-	-	C=O
5	156.3	156.3	-	-	C-OH
6	98.9	98.9	6.47 (d, 2.0)	6.47 (d, 2.0)	CH
6-OCH ₃	56.1	56.1	3.88 (s)	3.88 (s)	OCH ₃
7	163.9	163.9	-	-	C-OH
8	93.5	93.5	6.95 (d, 2.0)	6.95 (d, 2.0)	CH
9	157.7	157.7	-	-	C
10	102.9	102.9	-	-	C
1'	123.3	123.3	-	-	C
2'	128.7	128.7	7.93 (d, 8.8)	7.93 (d, 8.8)	CH
3'	115.6	115.6	6.93 (d, 8.8)	6.93 (d, 8.8)	CH
4'	161.3	161.3	-	-	C-OH
5'	115.6	115.6	6.93 (d, 8.8)	6.93 (d, 8.8)	CH
6'	128.7	128.7	7.93 (d, 8.8)	7.93 (d, 8.8)	CH
5-OH	-	-	12.91 (s)	-	OH phenol
7-OH	-	-	9.71 (s)	-	OH phenol

^a Đo trong DMSO, ^b500MHz, ^c125 MHz, ^e Đo trong CDCl₃

Tổng hợp các dữ liệu phổ, hợp chất được xác định là Oroxylin A.

Oroxylin A thể hiện hoạt tính chống viêm, giúp điều chỉnh các đường truyền tín hiệu quan trọng như NF- κ B, MAPK, ERK1/2, Wnt/ β -catenin, PTEN/PI3K/Akt và các phân tử tín hiệu như TNF- α , TGF- β , MMP, VEGF, interleukin, Bcl-2, caspase, HIF-1 α , protein EMT, Nrf-2. Nó đóng vai trò then chốt trong cơ chế phân tử của phòng ngừa và điều trị các bệnh mãn

**Oroxylin A (EWW6)**

tính. [4d24]

❖ Hợp chất 14 (Negletein, EWE3)

Hợp chất **EWE3** có dạng chất rắn màu vàng. Điểm nóng chảy: 235-237°C.

Phổ khối lượng ESI-MS cho pic ion giả phân tử $[M+H]^+$ 285 tương ứng với công thức phân tử $C_{16}H_{12}O_5$.

Phổ 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) ghi nhận các tín hiệu đặc trưng:

- δH 6.12 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.35 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8): cặp proton ở vòng A có tương tác meta.

- δH 6.89 (1H, s, H-3): proton trên nhân chromone.

- δH 6.96 (1H, s, H-6'), 6.64 (1H, s, H-3'), 6.85 (1H, s, H-5'): ba proton trên vòng B gợi ý kiểu thế 3',5',6'.

- Các tín hiệu OH: δH 9.80 (s, 5-OH), 9.12 (s, 7-OH), 8.60 (s, 4'-OH).

Phổ ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) cho thấy 15 tín hiệu carbon tương ứng với cấu trúc flavone:

- δC 178.2 (C-4): carbonyl của nhân chromone.

- δC 93.5 (C-6), 98.3 (C-8): vòng A.

- δC 100.5 (C-3), 146.7 (C-5), 160.2 (C-7), 164.9 (C-9): các carbon liên kết OH hoặc O-ether.

- δC 110.2 (C-6'), 105.7 (C-3'), 107.9 (C-5'), 151.6 (C-4'): vòng B.

Phổ HSQC, HMBC và DEPT xác nhận các tương quan H-C tương ứng và giúp gắn kết chính xác các nhóm chức.

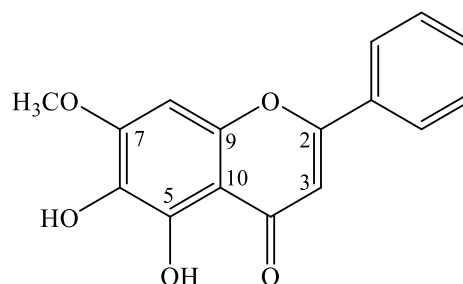
Bảng 3.20. Số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR của Negletein

Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
2	163.5	163.5	-	-	C
3	100.5	100.7	6.89 (s)	6.90 (s)	CH
4	178.2	178.3	-	-	C=O
5	146.7	146.8	-	-	C-OH
6	93.5	93.7	6.12 (d, 2.0)	6.14 (d, 2.0)	CH
7	160.2	160.3	-	-	C-OH

8	98.3	98.4	6.35 (d, 2.0)	6.37 (d, 2.1)	CH
9	164.9	165.0	-	-	C
10	105.3	105.4	-	-	C
1'	123.5	123.7	-	-	C
2'	145.2	145.2	-	-	C
3'	105.7	105.8	6.64 (s)	6.65 (s)	CH
4'	151.6	151.7	-	-	C-OH
5'	107.9	108.0	6.85 (s)	6.86 (s)	CH
6'	110.2	110.3	6.96 (s)	6.97 (s)	CH
5-OH	-	-	9.80 (s)	-	OH
7-OH	-	-	9.12 (s)	-	OH
4'-OH	-	-	8.60 (s)	-	OH

→ Tổng hợp các dữ liệu phổ, hợp chất được xác định là Negletein – một flavone có nhóm hydroxyl tại vị trí 5, 6, 7 và 3', 4'.

Negletein có hoạt tính đa dạng như chống oxy hóa, chống viêm và bảo vệ tế bào thần kinh. Ở nồng độ thấp Negletein có tác dụng điều hòa sự sống sót của các tế bào PC12 khi bị thiếu huyết thanh [4d26] (dòng tế bào PC12 là dòng tế bào phổ biến nhất để nghiên cứu về thần kinh học)



Negletein (EWE3)

❖ Hợp chất 15 (Apigenin)

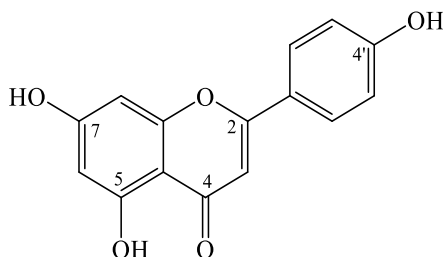
Chất bột màu vàng nâu.

Phổ của hợp chất **EWE4** có phổ khối lượng ESI-MS m/z : 271 $[M+H]^+$ tương ứng với công thức phân tử là $C_{15}H_{10}O_5$.

Trên phổ 1H -NMR xuất hiện bảy proton aromatic có cấu trúc đặc trưng cho hợp chất flavonoid cùng ba proton ở vùng trường thấp ở δ_H 10.34, 10.83, 12.90 ppm gợi ý cấu trúc phân tử có 3 nhóm hydroxy. Phổ ^{13}C -NMR và DEPT của hợp chất **EWE4** cho thấy tín hiệu đặc trưng của hợp chất flavonoid với sự có mặt của 15

carbon, trong đó tám carbon bậc bốn (không liên kết với hydro) và bảy carbon của nhóm methin. Số liệu phổ của EWE4 trùng khớp với số liệu phổ của hợp cấu trúc 4',5,7-trihydroxy-flavone (Apigenin)

Hằng số vật lý, số liệu phổ và tài liệu tham khảo khẳng định EWE4 có cấu trúc là Apigenin trùng khớp với dữ liệu Hợp chất 2.



Apigenin

❖ Hợp chất 16 (Tricin, EWE27)

Hợp chất **EWE27** là chất bột màu vàng. Đ. n. c: 296-298°C.

Phổ khối lượng ESI-MS ghi nhận ion $[M+H]^+$ tại m/z 331, tương ứng với công thức phân tử $C_{17}H_{14}O_7$ và khối lượng phân tử 330 Da.

Phổ 1H -NMR (DMSO- d_6 , 600 MHz) cho thấy các tín hiệu đặc trưng như sau:

- δH 6.97 (1H, s, H-3): proton duy nhất trên khung chromone.
- δH 6.20 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-6), 6.55 (1H, d, $J = 2.0$ Hz, H-8): cặp proton vòng A có tương tác meta.
- δH 7.32 (2H, s, H-2', H-6'): hai proton đối xứng ở vòng B (kiểu thế 3',5'-dimethoxy).
- δH 3.88 (6H, s): hai nhóm methoxy ở vị trí 3'- và 5'-OCH₃.
- δH 12.95 (1H, s), 10.80 (1H, s), 9.31 (1H, s): ba proton của nhóm hydroxyl phenolic tại vị trí 5, 7 và 4'.

Phổ ^{13}C -NMR (150 MHz, DMSO- d_6) ghi nhận 17 tín hiệu carbon, gồm:

- δC 103.6 (C-3), 181.8 (C-4), 161.4 (C-5), 98.8 (C-6), 163.6 (C-7), 94.2 (C-8), 157.3 (C-9), 103.7 (C-10).
- Vòng B: δC 120.4 (C-1'), 104.4 (C-2'/C-6'), 148.2 (C-3'/C-5'), 139.9 (C-4').
- Nhóm methoxy: δC 56.4 (3'-OCH₃, 5'-OCH₃).

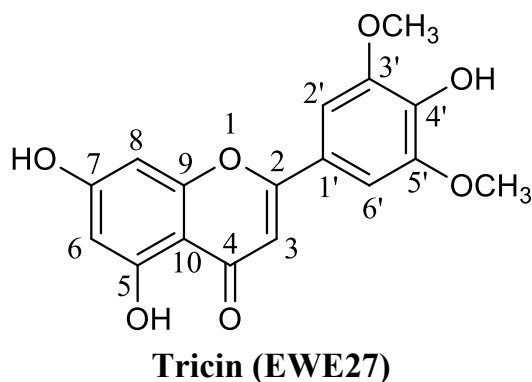
Phổ HSQC, HMBC, DEPT xác nhận đầy đủ các tương quan proton – carbon, chứng minh cấu trúc flavone có ba nhóm hydroxyl và hai nhóm methoxy.

Bảng 3.21. Số liệu phổ ^1H , ^{13}C -NMR của EWE27

Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
2	164.1	164.1	-	-	C
3	103.6	104.3	6.97 (s)	6.98 (s)	CH
4	181.8	181.8	-	-	C=O
5	161.4	161.4	-	-	C-OH
6	98.8	98.8	6.20 (d, 2.0)	6.21 (d, 2.0)	CH
7	163.6	163.6	-	-	C-OH
8	94.2	94.1	6.55 (d, 2.0)	6.56 (d, 2.0)	CH
9	157.3	157.3	-	-	C
10	103.7	103.5	-	-	C
1'	120.4	120.3	-	-	C
2'	104.4	103.7	7.32 (s)	7.33 (s)	CH
3'	148.2	148.4	-	-	C-OCH ₃
4'	139.9	139.8	-	-	C-OH
5'	148.2	148.4	-	-	C-OCH ₃
6'	104.4	103.7	7.32 (s)	7.33 (s)	CH
3'-OCH ₃	56.4	56.3	3.88 (s)	3.89 (s)	OCH ₃
5'-OCH ₃	56.4	56.3	3.88 (s)	3.89 (s)	OCH ₃
5-OH	-	-	12.95 (s)	12.96 (s)	OH phenol
4'-OH	-	-	9.31 (s)	9.32 (s)	OH phenol
7-OH	-	-	10.80 (s)	10.80 (s)	OH phenol

Tổng hợp các dữ liệu trên, hợp chất được xác định là. 5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-4H-chromen-4-one hay còn được gọi là tricin.

Tricin có tác dụng chống viêm tốt. Tác dụng bảo vệ của tricin chống lại rối loạn chức năng nội mô liên quan đến tình trạng viêm do lipopolysaccharide gây ra bằng cách ức chế sự kích hoạt các chất trung gian gây viêm như $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, MCP 1 bằng cách điều chỉnh các đường truyền tín hiệu $NF-\kappa B$ và MAPK. [4d28]



❖ **Hợp chất 17 (Ursolic acid, EWB3.2)**

Chất bột màu trắng. Điểm nóng chảy: 285-288⁰C.

Phổ ESI-MS của **EWB3.2** cho peak ion phân tử m/z 457 $[M+H]^+$ ứng với công thức phân tử của hợp chất là $C_{30}H_{48}O_3$.

Phổ 1H -NMR (CD_3OD , 500 MHz) thể hiện:

- δH 3.18 (1H, dd, $J = 11.0, 4.5$ Hz): proton tại vị trí C-3, liên kết với nhóm hydroxyl.

- δH 5.24 (1H, t, $J = 3.5$ Hz): proton olefinic tại C-12.

- δH 2.20 (1H, d, $J = 11.5$ Hz): tín hiệu methine tại C-18.

- δH 0.78 – 1.12 (21H, s): các tín hiệu methyl đặc trưng cho khung triterpen.

Phổ ^{13}C -NMR (CD_3OD , 125 MHz) ghi nhận 30 tín hiệu carbon phù hợp với cấu trúc ursan:

- δC 78.6 (C-3), 125.7 (C-12), 138.4 (C-13), 180.5 (C-28) là các carbon đặc trưng liên kết với OH, nối đôi, và nhóm COOH.

Phổ DEPT xác nhận các nhóm CH_3 , CH_2 và CH.

Từ phổ HSQC và HMBC, xác định được các tương quan trực tiếp và dài hạn giữa proton và carbon.

Bảng 3.22. Số liệu phổ của EWB3.2

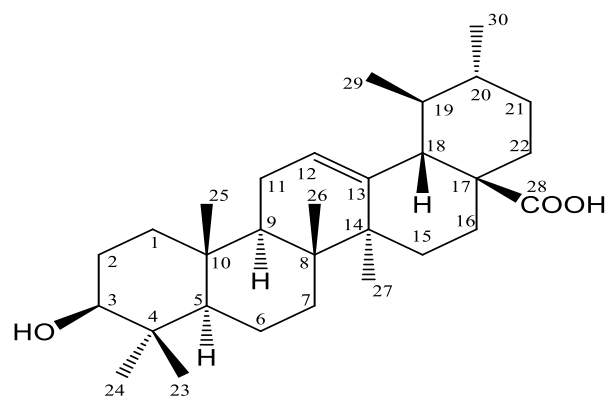
Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
1	38.7	39.9			
2	26.7	28.6			
3	78.6	78.6	3.18 (dd, $J=11.0, 4.5$)	3.49 (dd, $J=10.0, 6.0$)	CH-OH

4	38.9	39.5			
5	55.6	56.3			
6	18.3	19.3			
7	33.2	34.1			
8	39.6	40.0			
9	48.0	48.5			
10	37.0	37.9			
11	23.1	24.1			
12	125.7	126.1	5.24 (t, J=3.5)	5.52 (brs)	CH=CH
13	138.4	139.8			C=C
14	42.1	43.0			
15	27.7	29.2			
16	24.2	25.4			
17	48.3	48.5			
18	53.1	54.0	2.20 (d, J=11.5)	2.68 (d, J=11.0)	CH
19	39.2	40.4			
20	39.2	39.9			
21	30.6	31.5			
22	36.9	37.8			
23	28.1	29.3	1.12 (s)	1.27 (s)	CH ₃
24	15.3	17.1	0.78 (s)	0.91 (s)	CH ₃
25	15.0	16.2	0.97 (s)	1.08 (s)	CH ₃
26	16.7	18.0	0.96 (s)	1.05 (s)	CH ₃
27	23.3	24.4	0.98 (s)	1.25 (s)	CH ₃
28	180.5	180.4			COOH
29	16.6	17.9	0.89 (d, J=6.5)	1.03 (d, J=6.0)	CH ₃
30	20.6	21.9	0.85 (s)	0.98 (d, J=6.0)	CH ₃

^a Đo trong MeOD, ^b500MHz, ^c125 MHz, ^e Đo trong CDCl₃

Từ hằng số vật lý, số liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [4d29] đã khẳng định cấu trúc của **EWB3.2** là 3 β -3-hydroxy-urs-12-ene-28-oic acid hay còn có tên gọi là Ursolic acid.

Ursolic acid là chất tồn tại khá phổ biến trong thực vật và được phát hiện có nhiều hoạt tính sinh học lý thú như kháng viêm, kháng virus, chống oxi hóa, ngăn ngừa khối u và chữa bệnh thấp khớp. Hợp chất này cũng được phân lập từ loài *E. rugulosa*, *E. ciliata*.



Ursolic acid (EWB3.2)

❖ Hợp chất 18 (Uvaol, EWE48)

Chất bột màu trắng. Điểm nóng chảy: 174-175°C.

Phổ khối lượng (ESI-MS) của chất **EWE48** cho peak ion m/z 443 $[M+H]^+$, ứng với công thức $C_{30}H_{50}O_2$.

Phổ 1H -NMR ($CDCl_3$, 500 MHz) cho thấy tín hiệu đặc trưng như sau:

- δ_H 3.23 (1H, dd, $J=11.0, 5.0$ Hz) ứng với proton của nhóm OH ở vị trí C-3.
- δ_H 5.14 (1H, t, $J = 3.0$ Hz) là proton vinylic của nối đôi C12=C13.
- δ_H 0.79 – 1.14 (18H, s/d): các tín hiệu methyl đặc trưng cho hệ triterpen.
- δ_H 3.54 (1H, d, $J=11.0$ Hz) và 3.53 (1H, d, $J=10.0$ Hz): tín hiệu của nhóm methylene mang OH ở C-28.

Phổ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) ghi nhận 30 tín hiệu carbon phù hợp với cấu trúc ursan, trong đó có:

- δ_C 79.0 (C-3) và 69.9 (C-28): carbon bậc ba và bậc hai mang nhóm hydroxyl.
- δ_C 125.0 (C-12), 138.7 (C-13): hai carbon sp^2 đặc trưng cho nối đôi.

Các dữ liệu từ phổ DEPT, HSQC và HMBC xác nhận các tương quan proton – carbon và cấu trúc của Uvaol..

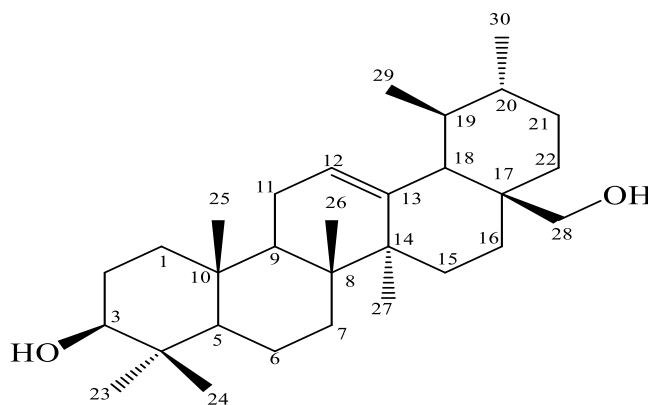
Bảng 3.23. Số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR của Uvaol

Vị trí	δ_C (ppm)	δ_C^* (ppm)	δ_H (ppm, J Hz)	δ_H^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
3	79.0	79.0	3.23 (dd, $J=11.0, 5.0$)	3.16 (ddt, $J=11.0, 6.0, 5.0$)	CH-OH

12	125.0	125.2	5.14 (t, J=3.0)	5.14 (t, J=7.5, 4.0)	CH=CH
23	28.1	28.1	1.00 (s)	0.99 (s)	CH ₃
24	15.7	15.6	0.79 (s)	0.79 (s)	CH ₃
25	15.6	15.5	0.98 (s)	0.98 (s)	CH ₃
26	16.8	16.7	0.80 (d, J=5.5)	0.84 (s)	CH ₃
27	23.3	23.3	1.10 (s)	1.14 (s)	CH ₃
28	69.9	69.9	3.54 (d, J=11.0), 3.53 (d, J=10.0)	3.19 (d, J=11.0), 3.56 (d, J=10.0)	CH ₂ OH
29	17.3	17.3	0.95 (s)	1.02 (s)	CH ₃
30	21.3	21.3	0.93 (s)	0.94 (s)	CH ₃

Từ hằng số vật lý, dữ liệu phổ và tài liệu tham khảo [4d30] khẳng định hợp chất **EWE48** có cấu trúc là 3 β , 28-dihydroxy-urs-12-ene hay còn được gọi là uvaol

Uvaol có khả năng ức chế sản sinh NO, giảm sản xuất ra các cytokine gây viêm (TNF- α , IL-6, IL-1 β) và các chất trung gian gây viêm. [4d31].



Uvaol (EWE48)

❖ Hợp chất 19 (Lupeol, EWE15)

Dạng tinh màu trắng. Điểm nóng chảy: 215-216°C.

Phổ ¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) cho thấy các tín hiệu đặc trưng như sau:

- δ H 3.19 (1H, dd, J=11.0, 4.5 Hz): proton tại vị trí C-3 (liên kết với nhóm hydroxyl).

- δ H 4.69 (1H, d, J=2.0 Hz), 4.56 (1H, s): hai proton olefinic thuộc nhóm methylene (-CH₂=) tại C-29.

- δ H 0.68 – 1.92 (khoảng 40H): các proton methylene, methine và nhóm methyl đặc trưng của bộ khung triterpen.

- δH 0.76 – 1.03 (18H, s): tín hiệu của sáu nhóm methyl.

Phổ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) ghi nhận 30 tín hiệu carbon, trong đó nổi bật:

- δC 79.0 (C-3): carbon gắn với nhóm OH.
- δC 109.3 (C-29), 151.0 (C-20): hai carbon olefinic của nối đôi nội phân tử.
- δC 14.5 – 48.4: các carbon mạch nhánh aliphatic đặc trưng.

Phổ DEPT cho thấy sự hiện diện của các carbon CH_3 , CH_2 và CH , trong khi phổ HSQC và HMBC hỗ trợ xác định các tương quan proton-carbon.

Bảng 3.24. Số liệu phổ của EWE15

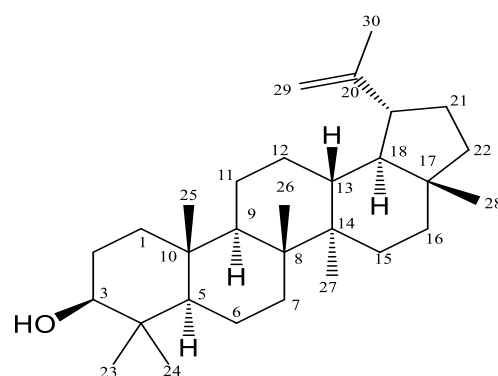
Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
1	38.8	38.7	1.68 (m)	0.90 (m)	
2	27.5	27.4	1.89 (m)	1.61 (m)	
3	79.0	78.8	3.19 (dd, J=11.0, 4.5)	3.25 (q, J=9.6)	CH-OH
4	38.9	38.3			
5	55.4	55.2	0.68 (d, J=9.5)		
6	18.4	18.3	1.51 (m)		
7	34.3	34.2	1.52 (m)		
8	40.9	40.9			
9	50.5	50.3	1.26 (s)		
10	37.2	37.1			
11	21.0	20.9	1.30 (m)	1.21 (m)	
12	25.2	25.1	1.68 (m)	1.07 (m)	
13	38.1	38.0	1.66 (m)		
14	42.9	42.8			
15	27.5	27.4	1.90 (m)	1.61 (m)	
16	35.6	35.5	1.51 (m)	1.40 (m)	
17	43.0	42.9			

18	48.0	48.2	2.38 (m)		
19	48.4	47.9	1.36 (s)		
20	151.0	150.6			C=C
21	29.9	29.8	1.92 (m)	1.33 (m)	
22	40.0	39.9	1.40 (m)	1.21 (m)	
23	28.0	28.0	0.97 (s)	0.98 (s)	CH ₃
24	15.4	15.4	0.76 (s)	0.75 (s)	CH ₃
25	16.1	16.1	0.83 (s)	0.83 (s)	CH ₃
26	16.0	15.9	1.03 (s)	1.03 (s)	CH ₃
27	14.6	14.5	0.95 (s)	0.95 (s)	CH ₃
28	18.0	18.0	0.79 (s)	0.78 (s)	CH ₃
29	109.3	109.2	4.69 (d, J=2.0), 4.56 (s)	4.62 (2H, d, J=6.0)	CH ₂ =
30	19.3	19.3	1.68 (s)	1.70 (s)	CH ₃

^a Đo trong MeOD, ^b 500MHz, ^c 125 MHz, ^e Đo trong CDCl₃

Từ hằng số vật lý, dữ liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [4d32] hợp chất **EWE15** được xác định là 3 β -hydroxylup-20(29)-en hay còn được gọi là lupeol.

Lupeol có tác dụng chống đa viêm với nhiều cơ chế như NF-kB, cFLIP, Fas, Kras, phosphatidylinositol-3-kinase. Đáng chú ý là lupeol ở liều điều trị không gây độc tính đến các tế bào mô bình thường và là đối tượng tiềm năng trong việc điều trị ung thư [4d33]



Lupeol (EWE15)

❖ Hợp chất 20 (Bentulinic acid, EWE87)

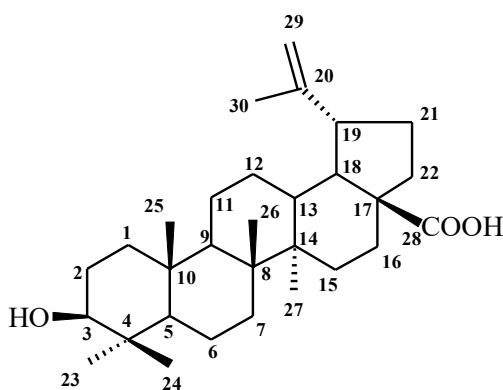
Chất bột màu vàng. Điểm nóng chảy: 280-282°C.

Phổ khối lượng (EI-MS) của hợp chất **EWE87** có pic ion m/z 456 [M]⁺ ứng với công thức C₃₀H₄₈O₃.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ gợi ý đến cấu trúc của hợp chất triterpenoid khá giống **EWE15** bởi cho thấy tín hiệu của 6 nhóm methyl ở δ_{H} 0.77, 0.83, 0.94, 0.98, 0.99 và 1.70 ppm. Tín hiệu đặc trưng của một proton ở δ_{H} 3.20 ppm (1H, dd, $J = 5.0, 11.5$ Hz) cho thấy proton này liên kết với C-3 (carbon bậc bốn) có nhóm hydroxy ở vị trí beta. một proton ở δ_{H} 3.01 ppm (1H. *m*). hai proton ở δ_{H} 4.62 (1H. *brs*) và 4.75 (1H. *brs*) cũng giúp khẳng định cấu trúc khung kiểu lupan của phân tử.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT cho thấy tín hiệu 30 carbon bao gồm sáu nhóm methy, mười một nhóm methilen, sáu nhóm methin và bảy carbon bậc 4 (không liên kết với hydro). Điểm khác biệt với **EWE15** là trên **EWE87** có tín hiệu của một quaternary carbon dịch chuyển về phía trường thấp ở δ_{C} 180.5 ppm (C-28) giúp khẳng định sự có mặt một nhóm carboxylic carbon trong phân tử. Số liệu phổ của **EWE87** trùng khớp với số liệu phổ của HG40 ở trên

Từ hằng số vật lý, số liệu phổ và so sánh với tài liệu tham khảo [4d34], hợp chất **EWE87** được xác định là Betulinic acid, hoàn toàn trùng khớp với Hợp chất 20



Betulinic Acid EWE87

❖ Hợp chất 21 (β -sitosterol)

Hợp chất dạng tinh thể hình kim màu trắng, có Điểm nóng chảy: 140-141°C, $[\alpha]_{\text{D}}^{22+3,5^\circ}$ ($c = 0,1$, CHCl_3). Phổ EI-MS cho *pic* ion phân tử ở m/z 414. Kết hợp với phổ NMR dự đoán chất có công thức phân tử là $\text{C}_{29}\text{H}_{50}\text{O}$.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 500 MHz) thể hiện đặc trưng của khung sterol:

- Hai tín hiệu singlet ứng với hai nhóm methyl góc: H3-18 (δ_{H} 1.01) và H3-19 (δ_{H} 0.68).
- Bốn tín hiệu doublet ứng với các nhóm methyl H3-21, H3-26, H3-27, và H3-29 trong vùng δ_{H} 0.81–0.93 ppm.

- Tín hiệu δH 3.51 (1H, m) tương ứng với H-3 trên carbon mang nhóm hydroxyl.

- Tín hiệu δH 5.32 (1H, dd, $J = 2.0, 5.0$ Hz) gán cho H-6, thuộc hệ nối đôi C5=C6.

Phổ ^{13}C -NMR ($CDCl_3$, 125 MHz) ghi nhận:

- δC 71.8 ppm (C-3): carbon mang nhóm hydroxyl.

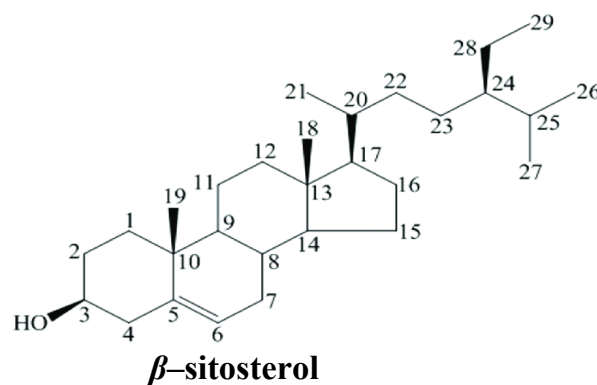
- δC 121.7 ppm (C-6) và 140.8 ppm (C-5): hai carbon nằm trong nối đôi.

- Các tín hiệu khác từ δC 11–50 ppm đại diện cho khung sterol chứa 29 carbon (methyl, methylene, methine và bậc bốn).

Bảng 3.25. Số liệu phổ 1H , ^{13}C -NMR của β -Sitosterol

Vị trí	δC (ppm)	δC^* (ppm)	δH (ppm, J Hz)	δH^* (ppm, J Hz)	Ghi chú
3	71.8	71.9	3.51 (m)	3.49 (m)	CH–OH
5	140.8	140.7			C=C
6	121.7	121.6	5.32 (dd, $J = 2.0, 5.0$)	5.30 (dd, $J = 2.0, 5.0$)	CH=CH
18-CH ₃	11.8	11.9	1.01 (s)	1.01 (s)	CH ₃ góc
19-CH ₃	19.3	19.2	0.68 (s)	0.68 (s)	CH ₃ góc
21-CH ₃	18.8	18.7	0.93 (d, $J=6.5$)	0.92 (d, $J=6.5$)	CH ₃
26-CH ₃	19.2	19.3	0.82 (d, $J=6.5$)	0.82 (d, $J=6.5$)	CH ₃
27-CH ₃	19.6	19.5	0.83 (d, $J=6.5$)	0.83 (d, $J=6.5$)	CH ₃
29-CH ₃	11.6	11.5	0.81 (d, $J=6.5$)	0.81 (d, $J=6.5$)	CH ₃

Kết hợp dữ liệu phổ NMR, MS, tính chất vật lý và so sánh với tài liệu tham khảo (Mabry và cs., 1970; Agrawal, 1989) và chất chuẩn, hợp chất 21 được xác định là β -sitosterol.



Các hợp chất phân lập từ hoa và thân-lá loài *E. winitiana* chủ yếu là các hợp chất flavonoid, phenolic và triterpenoid. Chúng khá tương quan với các lớp chất chính thuộc chi *Elsholtzia*.

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

Mật ong bạc hà Hà Giang (sau đây gọi tắt là Mật ong BHHG) là sản phẩm mật ong nổi tiếng ở Hà Giang, được đánh giá cao về chất lượng bởi mật được thu hoạch vào mùa hoa của loài Kinh giới dày *Elsholtzia winitiana* Craib. (tên địa phương là “bạc hà”) mọc hoang khắp nơi ở vùng cao nguyên đá. Với mục tiêu bước đầu xác định chất lượng và phát hiện chỉ dấu hóa học đặc trưng cho đặc sản Mật ong BHHG chúng tôi đã tiến hành thu thập 09 mẫu mật ong BHHG từ các nhà nuôi ong trên vùng cao nguyên đá Đồng Văn (kí hiệu từ M1 đến M9), các mẫu được sử dụng để thực hiện 3 nội dung nghiên cứu sau:

1. Đánh giá chất lượng và thành phần của mật ong BHHG
 - a. Xác định một số chỉ tiêu chất lượng chính của mật ong bạc hà theo các tiêu chuẩn hiện hành.
 - b. Phân tích thành phần các hợp chất dễ bay hơi bằng phương pháp GC-MS
 - c. Phát hiện sự có mặt của một số hợp chất thuộc nhóm flavonoid và acid phenolic bằng phương pháp sắc ký bản mỏng.
 - d. Phát hiện sự có mặt của một số hợp chất thuộc nhóm flavonoid bằng phương pháp phổ Raman.
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
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

Kết quả 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.

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 xác định một số chỉ tiêu chất lượng chính của Mật ong BHHG theo các tiêu chuẩn hiện hành được trình bày trên Bảng 3.26, trong đó các cột Min, Max, và Avg là các giá trị nhỏ nhất, lớn nhất và trung bình đo được, còn TCVN là tiêu chuẩn Việt Nam và TCXK là tiêu chuẩn xuất khẩu cho sản phẩm mật ong của Việt nam [1-4].

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 cũng có mối liên hệ giữa nguồn thực vật giàu terpenoid và hồ sơ hương đặc trưng của mật ong.

Nhóm aldehyd và benzenoid thơm (ví dụ benzeneacetaldehyde) cùng các hợp chất ester thơm như methyl salicylate đóng vai trò quan trọng trong mùi 'hoa-ngọt' – 'mật ong đặc sản'. Nhóm acid béo bay hơi chuỗi ngắn (butyric acid, pentanoic acid...) tạo nền cảm quan béo-ấm và hơi chua nhẹ đặc trưng của mật ong vùng núi đá vôi. Những hợp chất này vừa phản ánh hoạt động chuyển hoá của ong, vừa phản ánh nguồn hoa có mùi rõ.

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

TT	Hợp chất	Nhóm chất	Min	Max	Avg
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 cặn 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	+	+	+	-	-	+	+	+	+

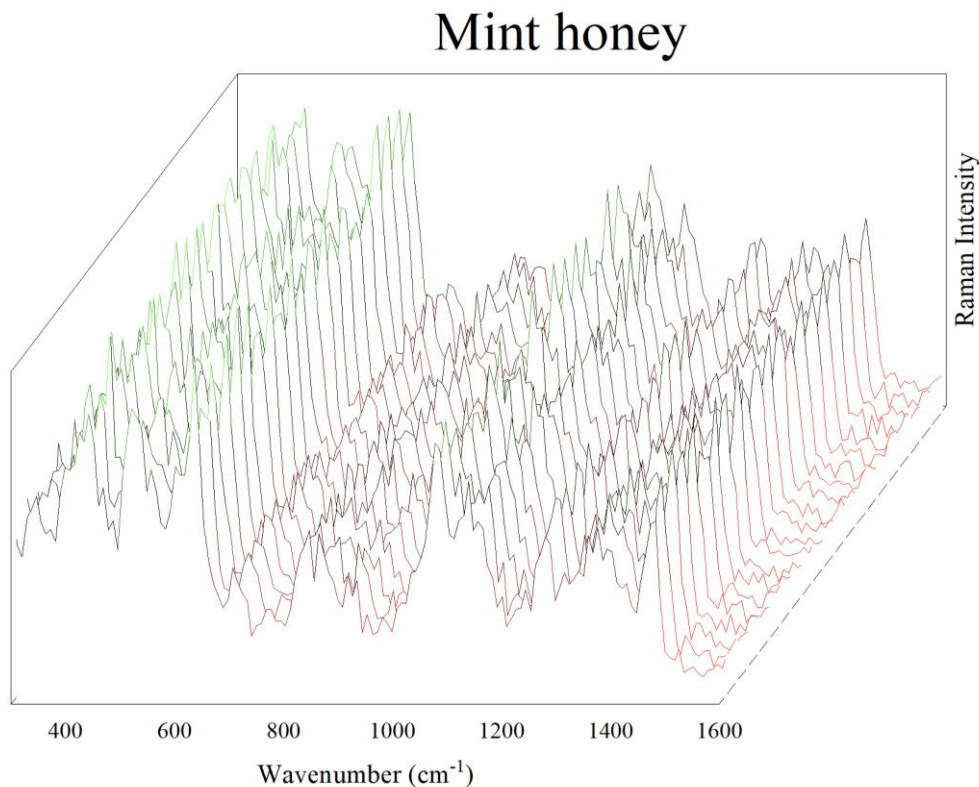
Ký hiệu (-) Không thể hiện, (+) Thể hiện

Từ bảng kết quả trên có thể nhận thấy trong các mẫu mật ong Bạc hà Hà Giang khảo sát có sự xuất hiện của một số chất thuộc nhóm Flavonoids và acid phenolic, trong đó có một số chất được tách chiết và phân lập từ phần hoa của cây nguồn mật (Quercetin, Catechin,...), đây cũng là căn cứ để đánh giá mối liên hệ giữa loài cây nguồn mật và mật ong bạc hà Hà Giang. Nhóm hợp chất này có ý nghĩa rất lớn ở góc độ chứng cứ pháp lý – khoa học: nếu mật ong thật có chứa dấu vết các flavonoid/triterpenoid trùng khớp với bộ hợp chất của hoa *E. winitiana*, thì đó là bằng chứng mạnh rằng ong đã thu mật/phấn từ loài cây này, chứ không phải từ nguồn hoa khác. Ngược lại, các mẫu pha siro đường hoặc mật ong giả thường không tái tạo được hồ sơ polyphenol-phytochemical đặc thù này.

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 $1.650\text{--}1.665\text{ cm}^{-1}$, gắn với dao động C=C không bão hoà và khung isopropenyl/terpenoid, được xem là cửa sổ nhận tín hiệu tổng thể của nhóm furanoid monoterpene có nguồn gốc từ *E. winitiana*.



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 $1.000\text{--}1.200\text{ cm}^{-1}$, 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: Các monoterpene như α -pinene, limonene, 1,8-cineole và (E)- β -caryophyllene xuất hiện trong tinh dầu của *E. winitiana*, đồng thời α -pinene được phát hiện lặp lại trong tất cả các mẫu mật ong ở mức phần trăm đáng kể. Như vậy, α -pinene đóng vai trò “chỉ dấu nền terpenoid” phản ánh sự chuyển dịch hợp chất bay hơi từ nguyên liệu hoa sang mật ong.

(ii) Liên kết benzenoid thơm: Tinh dầu hoa/thân-lá chứa các cấu tử thơm vòng benzen như benzaldehyde và acetophenone. Trong mật ong BHHG, xuất hiện benzeneacetaldehyde, benzophenone và methyl salicylate – các hợp chất thơm có nhân benzenoid, tạo mùi “hoa-ngọt”. Điều này chỉ ra rằng tín hiệu cảm quan “mùi hoa được liệu” của *E. winitiana* vẫn được in lên pha bay hơi của mật ong dưới dạng loạt aldehyd/keton thơm và ester thơm. Đây là chỉ dấu cảm quan-vùng, vì nhóm benzenoid thơm này là phần lớn tạo nên mùi đặc trưng của mật ong BHHG.

(iii) Liên kết furanoid monoterpene đặc hiệu nguồn mật: Rosefuran

epoxide và Rosefuran là những hợp chất chiếm ưu thế vượt trội trong tinh dầu hoa của *E. winitiana*, với tỉ lệ Rosefuran epoxide : Rosefuran khoảng 5:1 ở phần hoa. Đây là chỉ dấu hóa học rất riêng của cây nguồn mật ở Đồng Văn. Tuy chưa ghi nhận rõ hai hợp chất này bằng quy trình chiết dung môi áp dụng trên mật ong thương phẩm, điều này hợp lý về mặt kỹ thuật: (1) chúng cực kỳ dễ bay hơi và kém bền trong môi trường nước–acid nhẹ của mật ong; (2) chúng có thể bị chuyển hóa in situ trong quá trình ong chế biến mật và trong quá trình bảo quản sau thu hoạch. Bằng chứng trong thí nghiệm ppVS cho thấy Rosefuran epoxide suy giảm song song với sự hình thành Unknown-5. Từ đó suy ra rằng dạng còn tồn lưu trong mật ong thương phẩm có thể không phải chính Rosefuran epoxide, mà là sản phẩm chuyển hóa kiểu Unknown-5.

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

Cặn 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.

Sự liên kết hóa học giữa cặn chiết hoa và mật ong BHHG nằm ở chỗ:

- Các flavonoid aglycone (Apigenin, Quercetin, Kaempferol) và glycoside (Rutin, Hesperidin) là các marker thực vật đặc trưng; chúng thường được coi là chỉ thị nguồn thực vật – phần hoa trong nhiều nghiên cứu về truy xuất nguồn gốc mật ong đơn hoa nói chung.

- (+)-Catechin và Protocatechuic acid phản ánh nền polyphenol chống oxy hóa nội tại của loài thực vật nguồn mật.

- Oleanolic acid và Betulinic acid là triterpenoid tự nhiên có ý nghĩa được liệu; sự hiện diện của chúng trong cặn chiết hoa cho thấy cây nguồn mật không chỉ cung cấp đường (nectar) mà còn cung cấp các phân tử hoạt tính sinh học có thể được đồng vận chuyển vào mật ong dưới dạng vết. Đây là dấu hiệu mạnh mang tính “định danh sinh học”, vì các triterpen này không dễ có mặt trong siro pha đường hay mật ong giả công nghiệp.

Khi đối chiếu với mật ong BHHG, lớp hợp chất không bay hơi này chính là bằng chứng ở mức phân tử rằng ong thực sự tương tác với *E. winitiana*, chứ không chỉ “đứng gần”. Nếu các flavonoid/triterpenoid đặc trưng của hoa *E. winitiana* được phát hiện trong phân đoạn polyphenol/muối khô của mẫu mật ong, điều đó gần như khẳng định nguồn gốc sinh học và địa lý:

- Không chỉ mùi hương của cây in vào mật ong, mà cả bộ chuyển hóa thứ cấp đặc thù (flavonoid + triterpenoid) cũng in vào.

- Đây là lớp chỉ dấu rất khó làm giả bằng cách pha trộn siro đường hoặc pha hương liệu tổng hợp, vì muốn giả được thì phải bổ sung đúng các hợp chất polyphenol/triterpenoid tương ứng với cây nguồn mật – điều này vừa đắt, vừa dễ bị lộ khi đối chiếu định tính và định lượng.

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 bảng 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 1. Chỉ dấu bay hơi (GC–MS/headspace). “Mật ong này có đúng mùi – hồ sơ hợp chất dễ bay hơi của mật ong Bạc Hà Hà Giang thật hay không?”

Lớp này dựa trên các hợp chất dễ bay hơi thu được bằng GC–MS, gồm:

- Nhóm furanoid monoterpene đặc trưng cho *Elsholtzia winitiana*, với Rosefuran epoxide, Rosefuran và sản phẩm chuyển hoá kiểu Unknown-5 (m/z 95/184; RI ~1336). Nhóm này là chỉ dấu nguồn hoa, vì nó phản ánh trực tiếp chỉ dấu hóa học riêng của cây nguồn mật.
- Các monoterpene và sesquiterpene nền, đặc biệt α -pinene (tồn tại ổn định ở tất cả mẫu mật ong khảo sát với hàm lượng tương đối đáng kể), limonene, 1,8-cineole, (E)- β -caryophyllene. Đây là chỉ dấu “hương thơm thực vật” – chứng minh mật ong được hình thành trong điều kiện ong tiếp cận nguồn thực vật thơm chứ không phải siro đường.
- Nhóm benzenoid thơm (benzeneacetaldehyde, benzophenone, methyl salicylate...) là chỉ dấu cảm quan vùng: chúng giải thích mùi “hoa-ngọt / dược liệu / mật ong cao nguyên đá” đặc trưng của mật ong BHHG, và có giá trị phân biệt cảm quan-thị trường giữa mật ong thật và mật ong pha hương.

=> Lớp 1 trả lời bài toán nhận diện nhanh hồ sơ hương – thứ mà người tiêu dùng và cơ quan quản lý thường quan sát đầu tiên khi kiểm tra một lô hàng thương mại.

Lớp 2. Chỉ dấu không bay hơi (LC–MS/HPLC). “Ong có thực sự hút từ đúng cây bản địa hay không?”

Lớp này dựa trên nhóm hợp chất polyphenol, flavonoid và triterpenoid phân lập từ hoa *E. winitiana*: Apigenin, Quercetin, Kaempferol, Rutin, (+)-Catechin,

Hesperidin, Protocatechuic acid, cùng các triterpenoid như Oleanolic acid và Betulinic acid.

- Đây là chỉ dấu sinh học sâu, vì các chất này không phải hương liệu và không thể sinh ra chỉ bằng cách cô đặc siro đường.
- Nếu tìm lại được các hợp chất này (hoặc cặp dấu định tính/định lượng đặc trưng của chúng) trong phân đoạn polyphenol của mật ong BHHG bằng LC–MS/HPLC, thì đó là bằng chứng trực tiếp rằng đàn ong đã thu mật/phần từ *E. winitiana*.
- Lớp 2 có giá trị pháp lý. Nó dùng để chứng minh nguồn gốc sinh học – điều kiện cốt lõi để bảo vệ chỉ dẫn địa lý và chống gian lận thương mại.

=> Lớp 2 cho phép khẳng định mối quan hệ “ong ↔ loài cây đặc hữu vùng Đồng Văn” bằng chỉ dấu phân tử khó làm giả.

Lớp 3. Dấu vân tay (fingerprint) Raman. “Mẫu đang cầm trên tay có đáng tin để mang đi giám định sâu hay đã đáng nghi ngay từ đầu?”

Phổ Raman trực tiếp trên mẫu mật ong cho thấy đồng thời:

- Nền carbohydrate tự nhiên (vùng $\sim 1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$), giúp phân biệt mật ong thật với các chế phẩm siro công nghiệp bất thường.
- Dấu vết aldehyd/keton aliphatic và acid béo bay hơi (vùng $\sim 1440\text{--}1460\text{ cm}^{-1}$), tương thích với các acid chuỗi ngắn và keton quan sát bằng GC–MS.
- Dấu nhân thơm benzenoid (vùng $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$), ăn khớp với benzeneacetaldehyde, benzophenone, methyl salicylate – các thành phần mùi “hoa-ngọt” điển hình.
- Vùng dao động C=C không bão hòa/isopropenyl (khoảng $1650\text{--}1665\text{ cm}^{-1}$), gợi ý sự hiện diện của các terpenoid/furanoid monoterpene nguồn gốc *E. winitiana*.

Raman cho phép sàng lọc nhanh tại hiện trường, trước khi đầu tư phân tích sâu. Nếu mẫu thương mại không mang fingerprint Raman đúng kiểu mật ong Bạc Hà (thiếu vùng thơm $\sim 1600\text{ cm}^{-1}$, thiếu vùng terpenoid $\sim 1650\text{ cm}^{-1}$, chỉ còn lại nền đường), mẫu đó bị xếp vào nhóm nghi ngờ và không nên gắn nhãn “Bạc Hà Hà Giang” trước khi kiểm chứng lại bằng GC–MS/LC–MS.

=> Lớp 3 là lớp cảnh báo sớm, cực kỳ hữu dụng trong quản lý thực tế: kiểm

tra nhanh lô hàng thu mua, kiểm soát gian lận trên thị trường, và bảo vệ danh tiếng chỉ dẫn địa lý.

Tổng hợp ba lớp chỉ dấu

- Lớp bay hơi (GC–MS headspace): mô tả hồ sơ mùi và các cấu tử dễ bay hơi, bao gồm dầu 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 (ĐĐVN), 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
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	35 - 40

STT	Tên chỉ tiêu	Đơn vị	Mức đáp ứng
		lượng/kg)	
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 nền, 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 (¹H-NMR, ¹³C-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, monoterpene/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”.

4. 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.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN BÀI BÁO QUỐC TẾ:

1. **Phạm Thị Ngọc Mai**, Nguyen Thi Hong Van, Chu Quang Truyen, Tran Dinh Thang, Tran Quoc Toan, Pham Quoc Long, Cam Thi Inh, Dao Tan Phat, Tran Thien Hien, Tran Thi Kim Ngan (2020); “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.
2. Le Xuan Duy, **Phạm Thị Ngọc Mai**, Cam Thi Inh, Do Huu Nghi, Nguyen Thi Hong Van, Tran Dinh Thang, Lai Phuong Phuong Thao, Do Trung Sy, Nguyen Thanh Duong, Pham Quoc Long, Dao Tan Phat, Pham Tri Nhut, Tran Quoc Toan (2021); “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.

BÀI BÁO TRONG NƯỚC:

3. **Phạm Thị Ngọc Mai**, Nguyễn Tân Thành, Cẩm Thị Ính, Trần Đình Thắng (2020); “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. **Phạm Thị Ngọc Mai**, Nguyễn Văn Bình, Lương Hùng Tiến, Đinh Thị Kim Hoa, Lưu Hồng Sơn, Cẩm Thị Ính (2021); “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. **Phạm Thị Ngọc Mai**, Nguyễn Văn Bình, Lương Hùng Tiến, Đinh Thị Kim Hoa, Lưu Hồng Sơn, Cẩm Thị Ính (2021); “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.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chauhan, A., Venkatesha, K.T., Padalia, R.C., Singh, V.R., Verma, R.S., Chanotiya, C.S., 2019. Essential oil composition of leaves and inflorescences of *Elsholtzia densa* Benth. from western Himalaya. J. Essent. Oil Res. 31, 217–222
2. Nguyễn Tiến Bân (chủ biên) (2003), *Danh mục các loài thực vật Việt Nam*, Nhà xuất bản Nông nghiệp, Hà Nội
3. Shuqi Chen, Jixin Chen, Yifan Xu, Xinhua Wang, Jing Li (2022), *Elsholtzia*: A genus with antibacterial, antiviral, and anti-inflammatory advantages, Journal of Ethnopharmacology 297 (2022) 115549
4. Zhiqin Guo, Zizhen Liu, Xiaohong Wang, Weirui Liu, Rui Jiang, Ruiyang Cheng and Gaimei She (2012), *Elsholtzia*: phytochemistry and biological activities, Chemistry Central Journal, 6:147
5. Liu AL, Lee SMY, Wang YT, Du GH (2007), *Elsholtzia*: review traditional uses, chemistry and pharmacology, J. Chin. Pharm. Sci., 16:73–78,
6. Amit Chauhan et al. (2019), Essential oil composition of leaves and inflorescences of *Elsholtzia densa* Benth. from western Himalaya, *Journal of Essential Oil Research*, Volume 31, Issue 3
7. Zhong, J. (2013), Studies on the Chemical Constituents and Bioactivities of Two Medicinal Plants, *Kunming University of Science and Technology*
8. Peng, H., Yang, X. (2005), Volatile constituents in the flowers of *Elsholtzia argyl* and their variation: a possible utilization of plant resources after phytoremediation, J. Zhejiang Univ. Sci. B 6, 91.
9. Eckhard Wollenweber, James N. Roitman (2007), New reports on surface flavonoids from *Chamaebatiaria* (Rosaceae), *Dodonaea* (Sapindaceae), *Elsholtzia* (Lamiaceae), and *Silphium* (Asteraceae), Natural Product Communications 2, 1934578X0700200407.
10. Virendra Singh Rana et al (2012), *Elsholtzia blanda* Benth: New Citral-rich Chemotypes from India, Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants, Volume 18, Issue 2, 132-139.

11. Zhu, H.G., Chen, C.Y., Gang, L.H. (2013), The effect of total flavone extract of *Elsholtzia* blanda on nonspecific Immunity and humoral Immunity in normal mice, Strait. Pharm. J. 25, 24-25.
12. Uprety, Y., Poudel, R.C., Gurung, J., Chettri, N., Chaudhary, R.P., (2016), Traditional use and management of NTFPs in Kangchenjunga Landscape: implications for conservation and livelihoods. J. Ethnobiol. Ethnomed. 12, 1–59.
13. Sim, L.Y., Abd Rani, N.Z., Husain, K., (2019), Lamiaceae: an insight on their anti-allergic potential and its mechanisms of action. Front. Pharmacol. 10, 677.
14. Inta, A., Shengji, P., Balslev, H., Wangpakapattanawong, P., Trisonthi, C., (2008). A comparative study on medicinal plants used in Akha's traditional medicine in China and Thailand, cultural coherence or ecological divergence? J. Ethnopharmacol. 116, 508–517
15. Rana, V.S., Devi, L.R., Verdeguer, M., Blazquez, M.A., (2012). *Elsholtzia* blanda Benth: new citral-rich chemotypes from India. J. Herbs, Spices, Med. Plants 18, 132–139
16. Uprety, Y., Poudel, R.C., Gurung, J., Chettri, N., Chaudhary, R.P., (2016). Traditional use and management of NTFPs in Kangchenjunga Landscape: implications for conservation and livelihoods. J. Ethnobiol. Ethnomed. 12, 1–59.
17. Ling, H., Lou, Y., (2005). Total flavones from *Elsholtzia* blanda reduce infarct size during acute myocardial ischemia by inhibiting myocardial apoptosis in rats. J. Ethnopharmacol. 101, 169–175.
18. Lee, S., Xiao, C., Pei, S., (2008). Ethnobotanical survey of medicinal plants at periodic markets of Honghe Prefecture in Yunnan Province, SW China. J. Ethnopharmacol. 117, 362–377
19. Zhong, J., Feng, Y., Li, H., Xia, X., Li, R., 2016. A new flavonoid glycoside from *Elsholtzia* bodinieri. Nat. Prod. Res. 30, 2278–2284.
20. Sheng, L., Linyun, M., Mingfeng, W., Wei, J., Ganpeng, L., 2017. Comparative analysis of chemical composition of three *Elsholtzia* volatile oils. Nat. Prod. 13, 113–130
21. Wu, Y., Tang, Z., 2009. EXperimental study of pharmacodynamics of *Elsholtzia* bodinieri vaniot. Res Pract Chin Med 51–53.

22. Zhang, J., Liu, W., Yan, H.P., Li, Y., Xue, C., 2007. Study on antioXidant activity of *Elsholtzia bodinieri* Vaniot and determination of microelementst. Food Sci. Technol. 32, 206–207 210
23. Sun, J., Xiong, Y., Li, Y., Yang, Q., Chen, Y., Jiang, M., Li, Y., Li, H., Bi, Z., Huang, X., 2020. Medicinal diet plants of the Yi in mile, yunnan, China. J. Ethnobiol. Ethnomed. 48
24. Hu, H., Wang, X., Liu, J., Cao, H., Jian, Y., 2006. The antibacterial components in the roots of *Elsholtzia bodinieri* Vaniot. J. Sichuan Univ. Nat. Sci. 913–917
25. Pudziuelyte, L., Liaudanskas, M., Jekabsone, A., Sadauskiene, I., Bernatoniene, J., 2020. *Elsholtzia ciliata* (thunb.) hyl. extracts from different plant parts: phenolic composition, antioXidant, and anti-inflammatory activities. Molecules 25, 1153
26. Kim, H., Yoo, J., Lee, H., Kwon, T.K., Shin, T., Kim, S., 2011. *Elsholtzia ciliata* inhibits mast cell-mediated allergic inflammation: role of calcium, p38 mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B. EXp. Biol. Med. 236, 1070–1077
27. Sheng, L., Linyun, M., Mingfeng, W., Wei, J., Ganpeng, L., 2017. Comparative analysis of chemical composition of three *Elsholtzia* volatile oils. Nat. Prod. 13, 113–130.
28. Xiang, L., 2018. Studies on the Chemical Constituents of Two *Elsholtzia* Plants. Kunming University of Science and Technology
29. Huang, Z., Cui, Z., 1991. Study on pharmacology of active components of *Elsholtzia ciliata*. J. Gansu Coll. Tradit. Chin. Med. 18–20
30. Wu, T., Zhou, Y., Zhou, S., Wang, X., 1992. A comparative study on the pharmacological effects of volatile oils from four *Elsholtzia*. J. Chin. Med. Mater. 36–38
31. Liu, Y., 1986. EXperimental researches of *Elsholtzia ciliata*: a review. Chin. J. Hosp. Pharm. 23–24
32. Cui, G., Dai, L., 1993. Observation on the effect of perfumed bud oil suspension spray on preventing influenza. Chin J School Doctor 87–88
33. Barua, C.C., Patowary, P., Purkayastha, A., Haloi, P., Bordoloi, M.J., 2017. Role of *Elsholtzia communis* in counteracting stress by modulating expression of hspa14, C/EBP homologous protein, nuclear factor (erythroid-derived 2)-like-2 factor, Caspase-3, and brain-derived neurotrophic factor in rat hippocampus. Indian J. Pharmacol. 49, 182

34. Gao, J., 2016. Study on Chemical Constituents and Biological Activities of *Elsholtzia Cyprianii* in Guizhou Province. Guizhou University
35. Carović-Stanko, K., Petek, M., Grdiša, M., Pintar, J., Bedeković, D., Satovic, Z., 2016. Medicinal plants of the family Lamiaceae as functional foods—a review. Czech J. Food Sci. 34, 377–390
36. Chauhan, A., Venkatesha, K.T., Padalia, R.C., Singh, V.R., Verma, R.S., Chanotiya, C.S., 2019. Essential oil composition of leaves and inflorescences of *Elsholtzia densa* Benth. from western Himalaya. J. Essent. Oil Res. 31, 217–222
37. Wangchuk, P., Namgay, K., Gayleg, K., Dorji, Y., 2016. Medicinal plants of Dagala region in Bhutan: their diversity, distribution, uses and economic potential. J. Ethnobiol. Ethnomed. 12, 1–19
38. Devi, U., Seth, M.K., Sharma, P., Rana, J.C., 2013. Study on ethnomedicinal plants of kibber wildlife sanctuary: a cold desert in trans Himalaya, India. J. Med. Plants Res. 7, 3400–3419
39. Kumar, V., 2020. The medicinal importance of few important plant species of lahaul and spiti (cold desert). Situated in the Western Himalayas 7, 375–377
40. Joshi, R.K., Satyal, P., Setzer, W.N., 2016. Himalayan aromatic medicinal plants: a review of their ethnopharmacology, volatile phytochemistry, and biological activities. Medicines 3, 6
41. Sun, J., Xiong, Y., Li, Y., Yang, Q., Chen, Y., Jiang, M., Li, Y., Li, H., Bi, Z., Huang, X., 2020. Medicinal diet plants of the Yi in mile, yunnan, China. J. Ethnobiol. Ethnomed. 48
42. Dun, D., 2013. Diversity of “Flora and Fauna of Uttarakhand”. ENVIS-Centre, India
43. Zhang, L., 2019a. Studies on the chemical constituents and bioactivities of two *Elsholtzia* plants. Kunming University of Science and Technology
44. Hu, R., Lin, C., Xu, W., Liu, Y., Long, C., 2020. Ethnobotanical study on medicinal plants used by Mulam people in Guangxi, China. J. Ethnobiol. Ethnomed. 16, 1–50
45. Wollenweber, E., Roitman, J.N., 2007. New reports on surface flavonoids from chamaebatiaria (rosaceae), dodonaea (sapindaceae), *Elsholtzia* (lamiaceae), and silphium (asteraceae). Nat. Prod. Commun. 2, 1934578X0700200407
46. Lee, J.S., Kim, G.H., Lee, H.G., 2013. Optimization of extraction conditions for *Elsholtzia splendens* and its antioxidant activity. J. Food Biochem. 37, 669–676

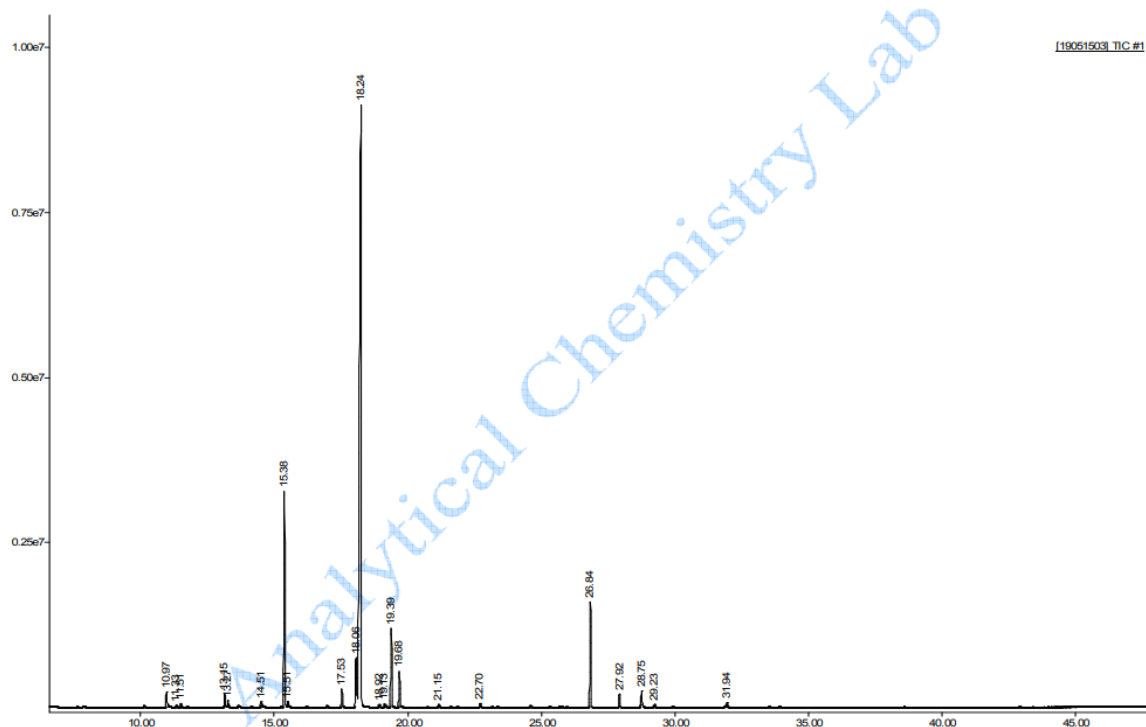
47. Chung, M., Kim, G., 2010. Effects of *Elsholtzia splendens* and *Cirsium japonicum* on premenstrual syndrome. *Nutr. Res. Pract.* 4, 290–294
48. Kim, D.W., Son, K.H., Chang, H.W., Bae, K., Kang, S.S., Kim, H.P., 2003. Anti-inflammatory activity of *Elsholtzia splendens*. *Arch Pharm. Res. (Seoul)* 26, 232–236
49. Choi, E., Kim, G., 2008. In vivo antioXidative characteristics of extracts from the aromatic herb *Elsholtzia splendens*. *Food Sci. Biotechnol.* 17, 1128–1130
50. Bhat, J.A., Kumar, M., Bussmann, R.W., 2013. Ecological status and traditional knowledge of medicinal plants in kedarnath wildlife sanctuary of garhwal Himalaya, India. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 9, 1–18
51. Sauerborn, J., 2012. Agrobiodiversity and its Use in Naban River Watershed National Nature Reserve: Implications for Bio-Cultural Diversity Conservation. Abdolbaset Ghorbani Dahane, Germany
52. Võ Văn Chi (2003), Từ điển thực vật thông dụng Tập I, NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
53. Lã Đình Mối (2002), Tài nguyên thực vật có tinh dầu ở Việt Nam, NXB Nông Nghiệp, Hà Nội
54. Vũ Xuân Phương (2000), Thực vật chí Việt Nam, 2. Họ Bạc hà – Lamiaceae Lindl.
55. Vũ Xuân Phương (1981), Tạp chí Sinh học 3(3)
56. <https://www.worldfloraonline.org/search?query=Elsholtzia+winitiana+var.+dongvanensis>. Truy cập 3-2024.
57. Kulaphisit, M., Pangnuchar, R., Saenjum, C., Wipasa, J., & Lithanatudom, P. (2023). From the ethnomedicinal plants in northern Indochina to the development of novel anti-cancer therapeutic agents. *Medicinal Chemistry Research*, 32(8), 1605-1632.
58. Inta A, Shengji P, Balslev H, Wangpakapattanawong P, Trisonthi C. A comparative study on medicinal plants used in Akha's traditional medicine in China and Thailand, cultural coherence or ecological divergence? *J Ethnopharmacol.* 2008; 116:508–17.
59. Paudel S, Rana RM, Paudel S, Giri PM, Chaudhary D. Review on medicinal plants used for treatment of dog bite. *World J Pharm Pharm Sci.* 2018; 7:498–510.
60. Tam NT, An HL, Casanova J. (1997) *Elsholtzia sauvage (Elsholtzia winitiana Craib.)* une plante à huile essentielle riche en cinéole. *Revue Phamaceutique*, 40-41.
61. Lesueur, D., Bighelli, A., Tam, N. T., Than, N. V., Dung, P. T. K., & Casanova, J. (2007). Combined analysis by GC (RI), GC/MS and ¹³C NMR spectroscopy of

- Elsholtzia* blanda, *E. penduliflora* and *E. winitiana* essential oils. Natural Product Communications, 2(8), 857-861.
62. Hoàng Đình Hòa-Nguyễn Văn Lợi (2017), Xác định các cấu tử hóa học và hoạt tính sinh học của tinh dầu cây kinh giới dày Hà Giang (*Elsholtzia winitiana* Craib), Tạp chí Khoa Học và Công nghệ, Đại học Bách khoa Hà Nội, Đại học Công nghiệp Hà Nội, tr. 127-131.
 63. EU Council. Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. Off J 2002;L10:47
 64. Codex Alimentarius. Draft revised standard for honey. Alinorm 2001;01/25:19
 65. Ratnieks FLW. How far do honey bees forage? Bee Improv 2000;6:10
 66. Cilliers L, Retief FP. Bees, honey and health in Antiquity. Akrotrion 2008;53:7
 67. Crane E. The world history of beekeeping and honey hunting. London: Duckworth; 1999
 68. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for nutrition and health: a review. J Am Coll Nutr 2008;27:677
 69. Lee DS, Sinno S, Khachemoune A. Honey and wound healing. An overview. Am J Clin Dermatol 2011;12:181
 70. Bogdanov S, Jurendic T, Sieber R, Gallmann P. Honey for nutrition and health: a review. J Am Coll Nutr 2008;27:677
 71. Ulusoy E, Kolayli S, Sarikaya AO. Antioxidant and antimicrobial activity of different floral origin honeys from Turkiye. J Food Biochem 2010;34:321
 72. Estevinho ML, Afonso SE, Feas X. Antifungal effect of lavender honey against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans*. J Food Sci Technol Mys 2011;48:640
 73. Feas X, Estevinho ML. A survey of the in vitro antifungal activity of heather (*Erica* Sp.) organic honey. J Med Food 2011;14:1284
 74. Bardy J, Slevin NJ, Mais KL, Molassiotis A. A systematic review of honey uses and its potential value within oncology care. J Clin Nurs 2008;17:2604
 75. Samarghandian S, Afshari JT, Davoodi S. Honey induces apoptosis in renal cell carcinoma. Pharmacogn Mag 2011;7:46
 76. Bradbear N. Bees and their role in forest livelihoods. Rome, Italy: FAO; 2009
 77. Dar MA. A review: plant extracts and oils as corrosion inhibitors in aggressive media. Ind Lubr Tribol 2011;63:227

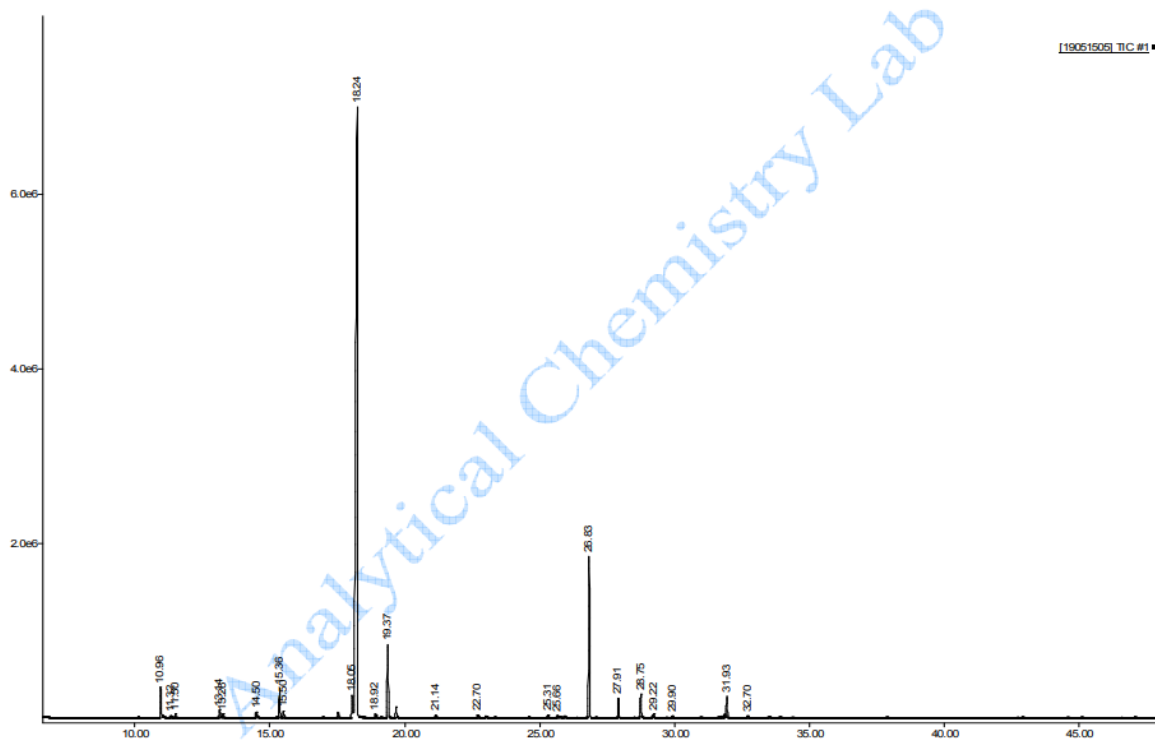
78. Wei AJ, Jiang HY, Zhang X, Zhao GQ. The experimental research on using honey to inhibit corrosion. *Adv Mater Res* 2011;233-235:689-92
79. FAO, FAOSTAT, FAO Statistical. www.fao.org [accessed September 2012].
80. Bogdanov S, Martin P. Honey authenticity: a review. *Mitt Lebensmitt Hyg* 2002;93:232.
81. Florida State. Rule 5 K-4.027 Standard of identity—honey. Notice 7351550; 2009. p. 1
82. U.K. The honey (England) Regulation 2003, U.K. Statutory Instruments; 2003. p. 1
83. USDA. United States Standards for grades of extracted Honey. *Fed Regist* 1985;50: FR 15861, 1
84. EU Commission. Regulation (EU) 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Off J* 2010;L15:1.
85. EU Commission. Imports of animals and food of animal origin from non-EU countries: provisions of guarantees (brochure), EAA; 2012
86. EU Parliament, EU Council. Regulation (EC) 396/2005 of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. *Off J* 2005;L70:1
87. EU Parliament, EU Council. Directive 2000/13/EC of 20 March 2000 on the approximation of the laws of the Member States relating to the labelling, presentation and advertising of foodstuffs. *Off J* 2010;L109:19
88. Bogdanov S, Lulmann C, Martin P, Von der Ohe W, Russmann H, Vorwohl G, et al. Honey quality, methods of analysis and international regulatory standards: review of the work of the International Honey Commission. *Mitt Lebensmitt Hyg* 1999;90:108
89. Đinh Quyết Tâm, “Ngành ong Việt Nam trong những năm qua và hướng phát triển”, Tuyển tập báo cáo Hội nghị ong toàn quốc lần thứ nhất,, Hà Nội.
90. Ngô Đắc Thắng (2002) Kỹ thuật nuôi ong nội địa, Nxb Nông nghiệp
91. Tuyết Hoa (2004), Sản xuất và xuất khẩu mật ong ở Đắk Lắk, đôi điều cần bàn, Công ty mật ong Đắk Lắk
92. Bùi Kim Đồng, Hoàng Hữu Nội, Lê Trường Giang (2012), Cơ sở khoa học của việc xây dựng chỉ dẫn địa lý cho mật ong bạc hà mèo vạc - Hà Giang. Tạp chí NN&PTNT, số 12/2012
93. Ismaya W. T., Rozeboom H. J., Weijn A., Mes J. J., Fusetti F., Wichers H. J. and Dijkstra B. W. - Crystal Structure of *Agaricus bisporus* Mushroom Tyrosinase:

- Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone, *Biochemistry* 50 (24) (2011) 5477-5486.
94. 30. Zhang Y., Zheng N., Hao P., Cao Y. and Zhong Y. - A molecular docking model of SARS-CoV S1 protein in complex with its receptor, human ACE2, *Comput. Biol. Chem.* 29 (3) (2005) 254-257.
 95. 31. Morris G. M., Huey R., Lindstrom W., Sanner M. F., Belew R. K., Goodsell D. S. and Olson A. J. - AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility, *J. Comput. Chem.* 30 (16) (2009) 2785-2791.
 96. Lal A., Mishra A. K. and Sahu K. K. - Novel coronavirus (2019-nCoV): Update on 3rd Coronavirus Outbreak of 21st Century, *QJM: An International Journal of Medicine* (2020).
 97. <https://chemicalize.com/welcome> Chemicalize.
 98. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.4.0, Schrodinger, LLC.
 99. Laskowski R. A. and Swindells M. B. - LigPlot+: Multiple Ligand-Protein Interaction Diagrams for Drug Discovery, *J. Chem. Inf. Model.* 51 (10) (2011) 2778-2786.
 100. Maestro S. R.-. - Schrödinger Release 2019-4: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2019, (2019).
 101. Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio Visualizer, v20.1.0.19295, San Diego: Dassault Systèmes, (2020).
 102. Cheng F., Li W., Zhou Y., Shen J., Wu Z., Liu G., Lee P. W. and Tang Y. admetSAR: A Comprehensive Source and Free Tool for Assessment of Chemical ADMET Properties, *J. Chem. Inf. Model.* 52 (11) (2012) 3099-3105.
 103. Association of Analytical Communities (AOAC) official methods of analysis method 998.12: C-4 plant sugars in honey, internal standard stable carbon isotope ratio method. AOAC Int. Gaithersburg MD (USA). 1999, Chap. 44, 27–30
 104. Tübtak Ume A. Simsek, M. Bilsel, A. C. Goren, 2012. ¹³C/ ¹²C pattern of honey from Turkey and determination of adulteration in commercially available honey samples using EA-IRMS. *Food Chemistry*, Volume 130, Issue 4, Pages 1115–1121
 105. Rogers, K.M., Somerton, K., Rogers, P., & Cox, J. (2010) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 2370–2374

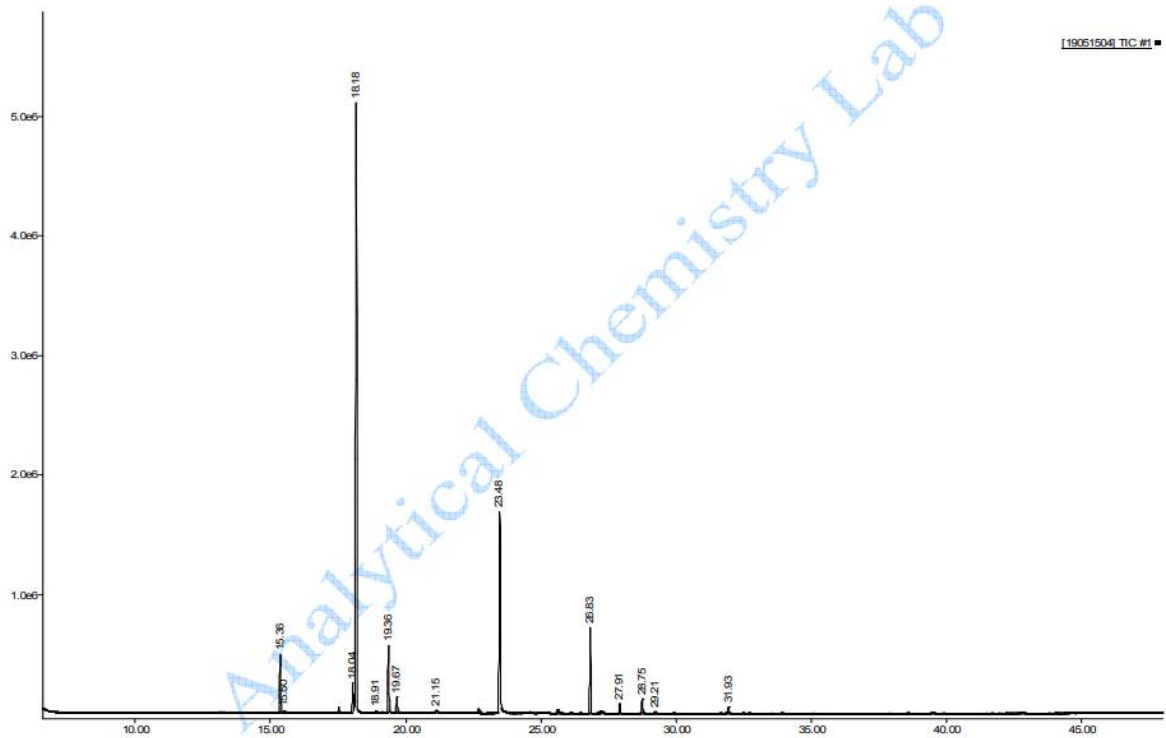
PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Tinh dầu loài *Elsholtzia winitiana* Craib

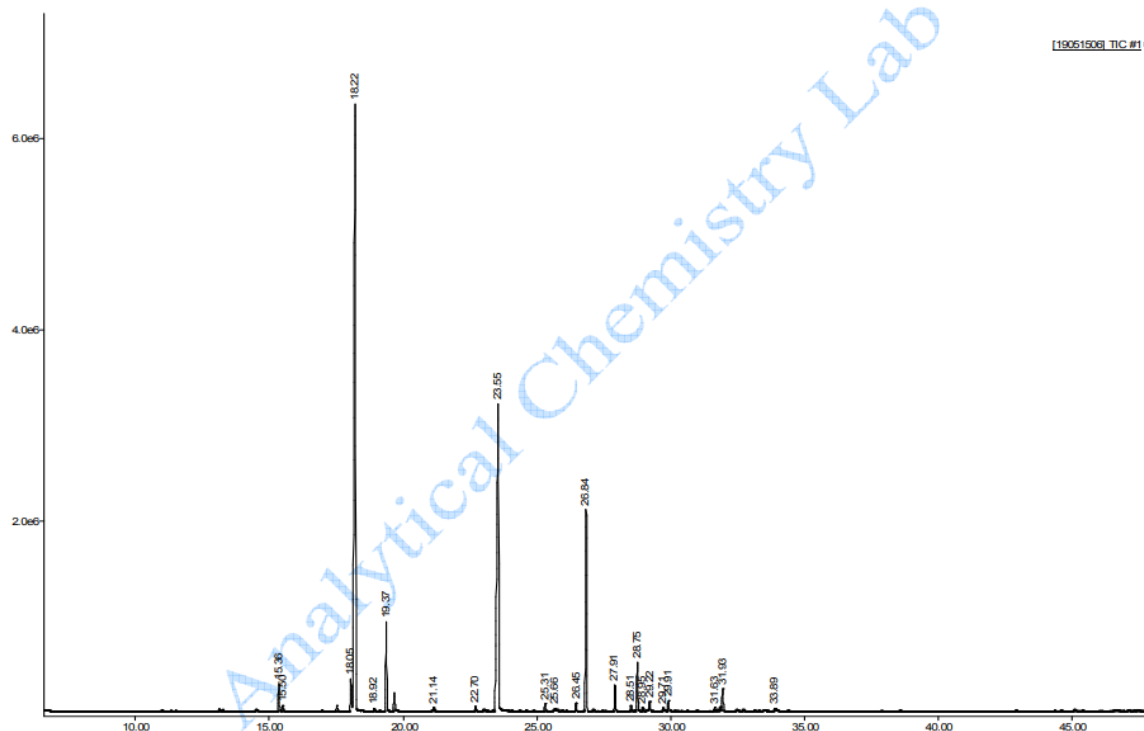
Phụ lục 1.1. Sắc ký đồ tinh dầu hoa loài *Elsholtzia winitiana* Craib chưng cất lôi cuốn hơi nước thu hái năm 2019



Phụ lục 1.2. Sắc ký đồ tinh dầu thân lá loài Elsholtzia winitiana Craib chưng cất lôi cuốn hơi nước thu hái năm 2019

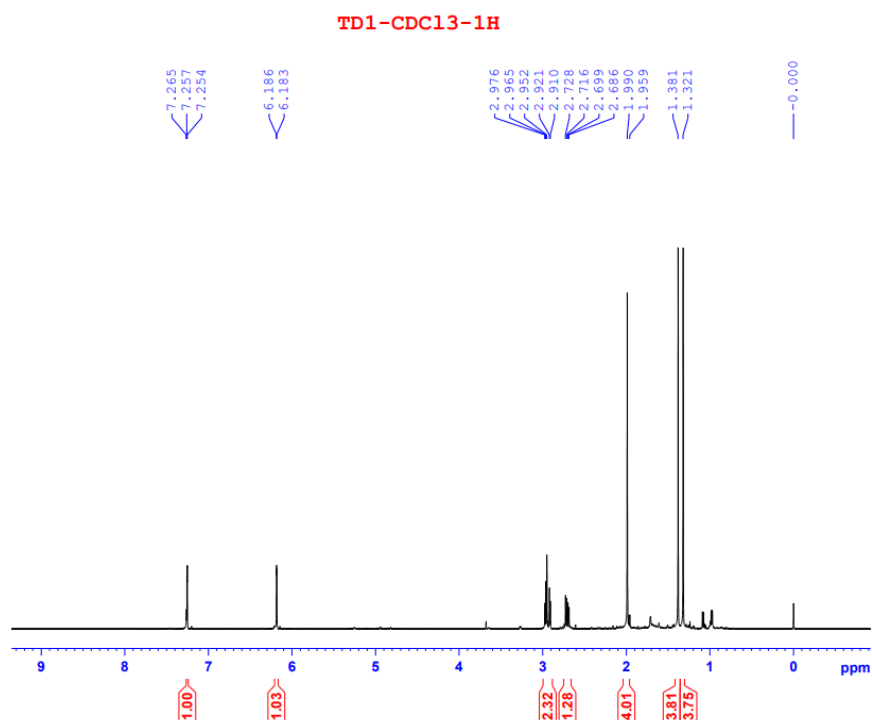


Phụ lục 1.3. Sắc ký đồ tinh dầu hoa loài Elsholtzia winitiana Craib chưng cất lôi cuốn hơi nước có hỗ trợ vi sóng thu hái năm 2019

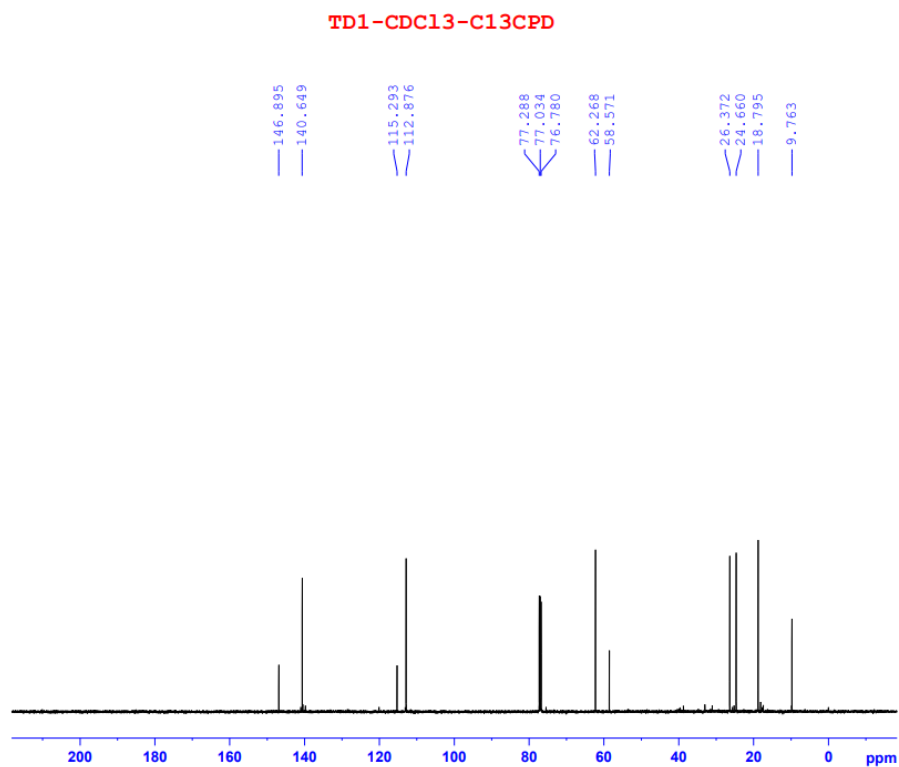


Phụ lục 1.4. Sắc ký đồ tinh dầu thân lá loài *Elsholtzia winitiana* Craib chưng cất lôi cuốn hơi nước có hỗ trợ vi sóng thu hái năm 2019

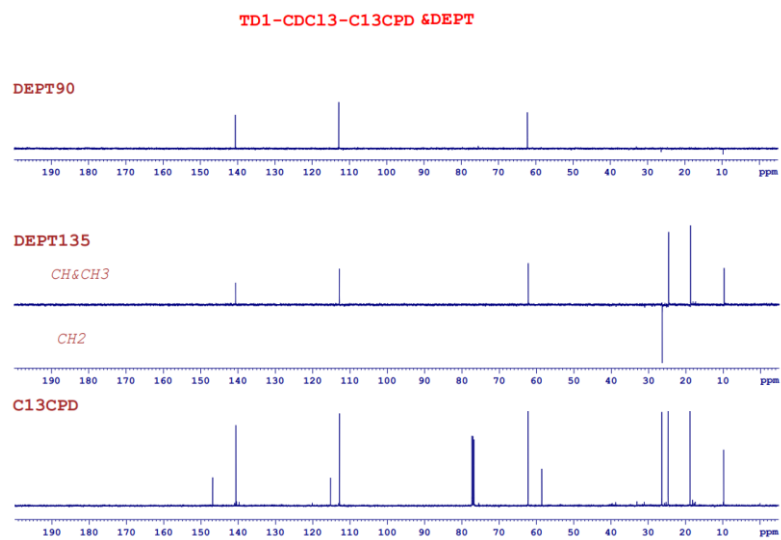
Phụ lục 2. Các phổ của rosefuran epoxide (TD1)



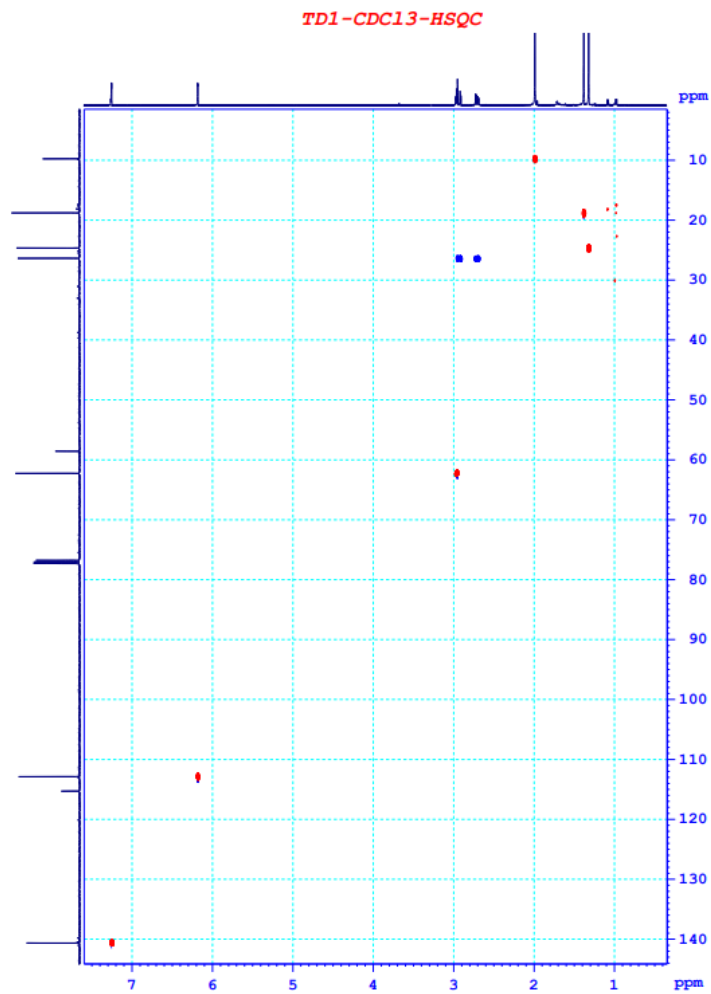
Phụ lục 2.1. Phổ ^1H -NMR của TD1



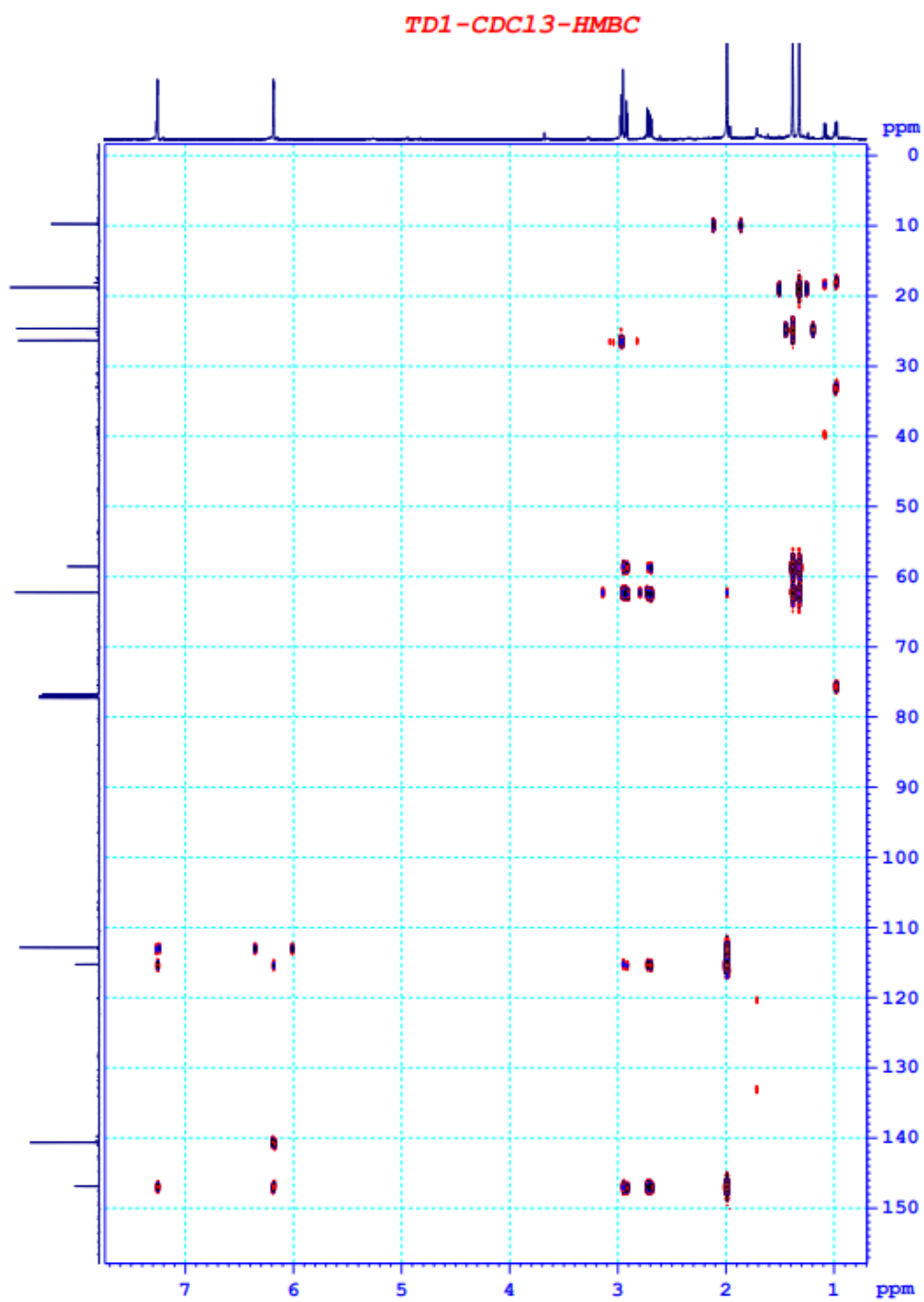
Phụ lục 2.2. Phổ ^{13}C -NMR của TD1



Phụ lục 2.3. Phổ DEPT của TD1



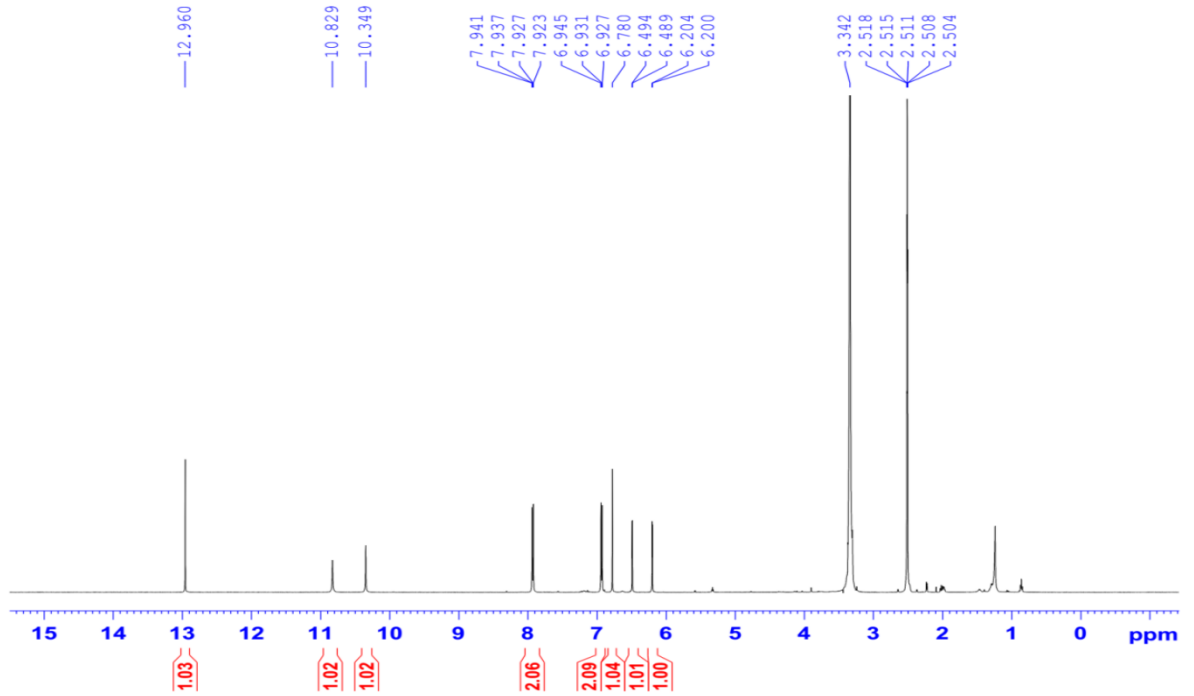
Phụ lục 2.4. Phổ HSQC của TD1



Phụ lục 2.5. Phổ HMBC của TD1

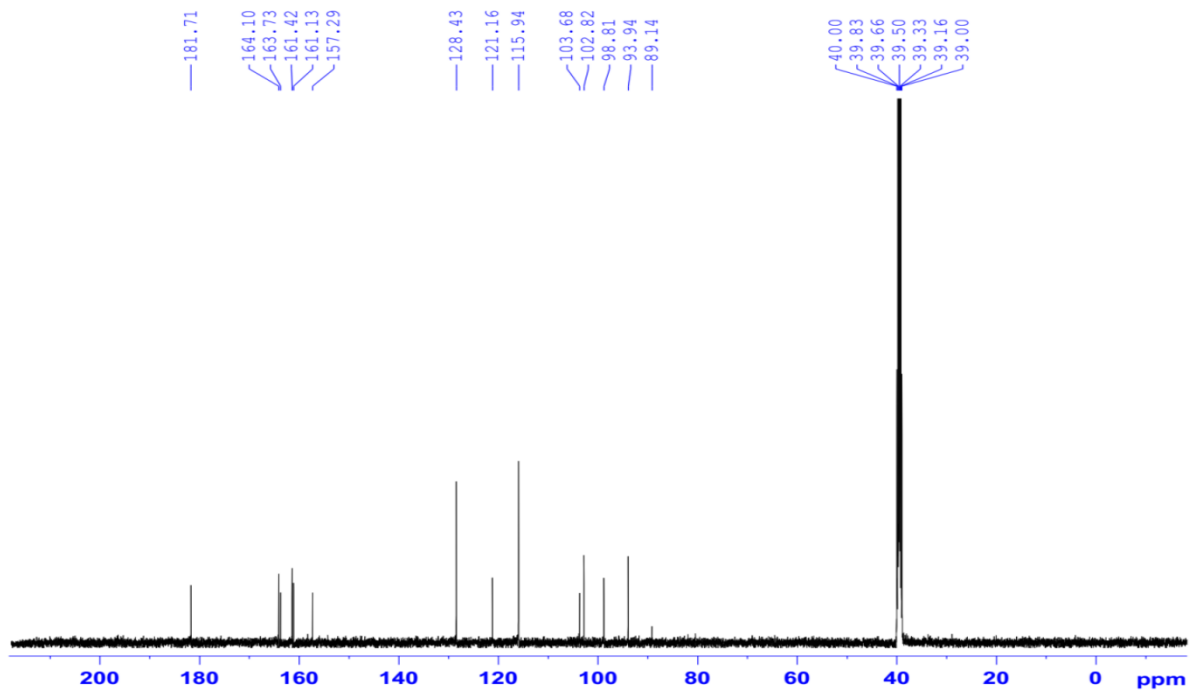
Phụ lục 1. Các phổ của apigenin (EW1)

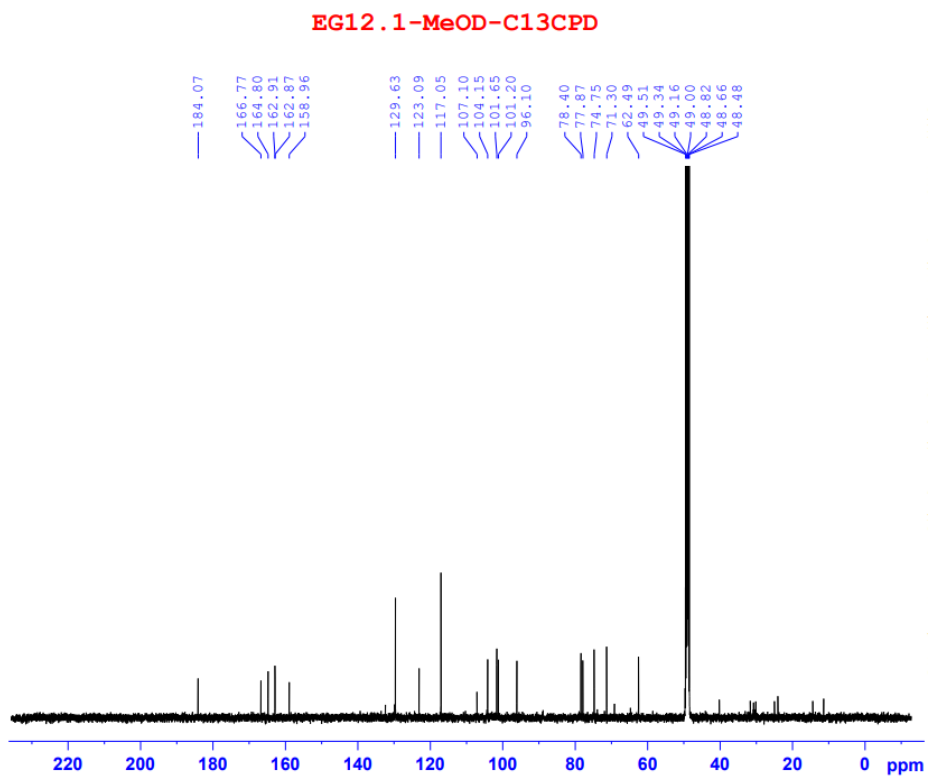
EW4-DMSO-1H



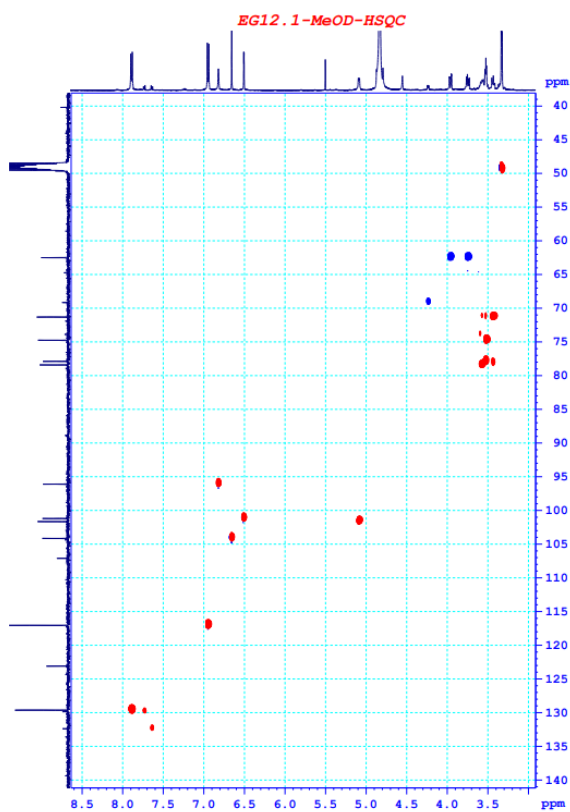
Phụ lục 1.1. Phổ ^1H -NMR của chất Apigenin

EW4-DMSO-C13CPD

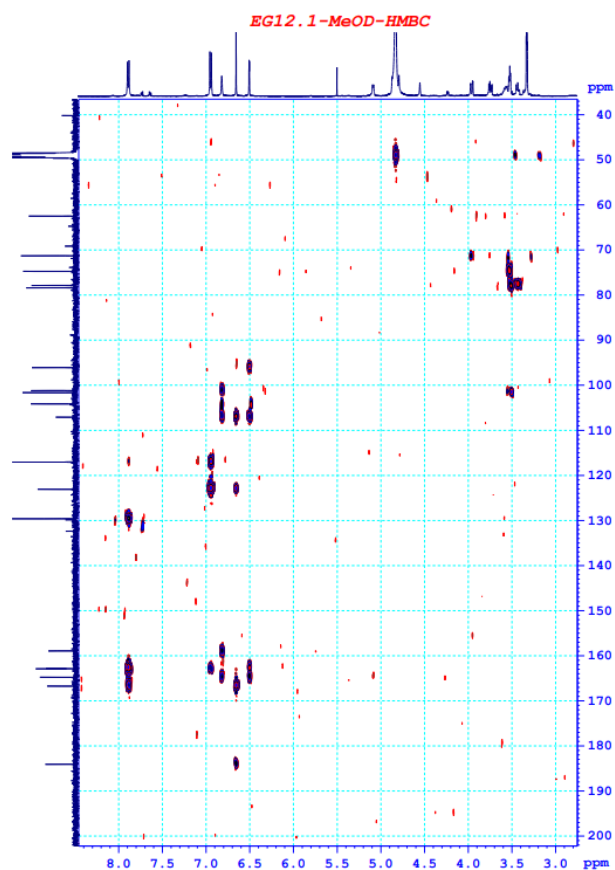




Phụ lục 2.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW2

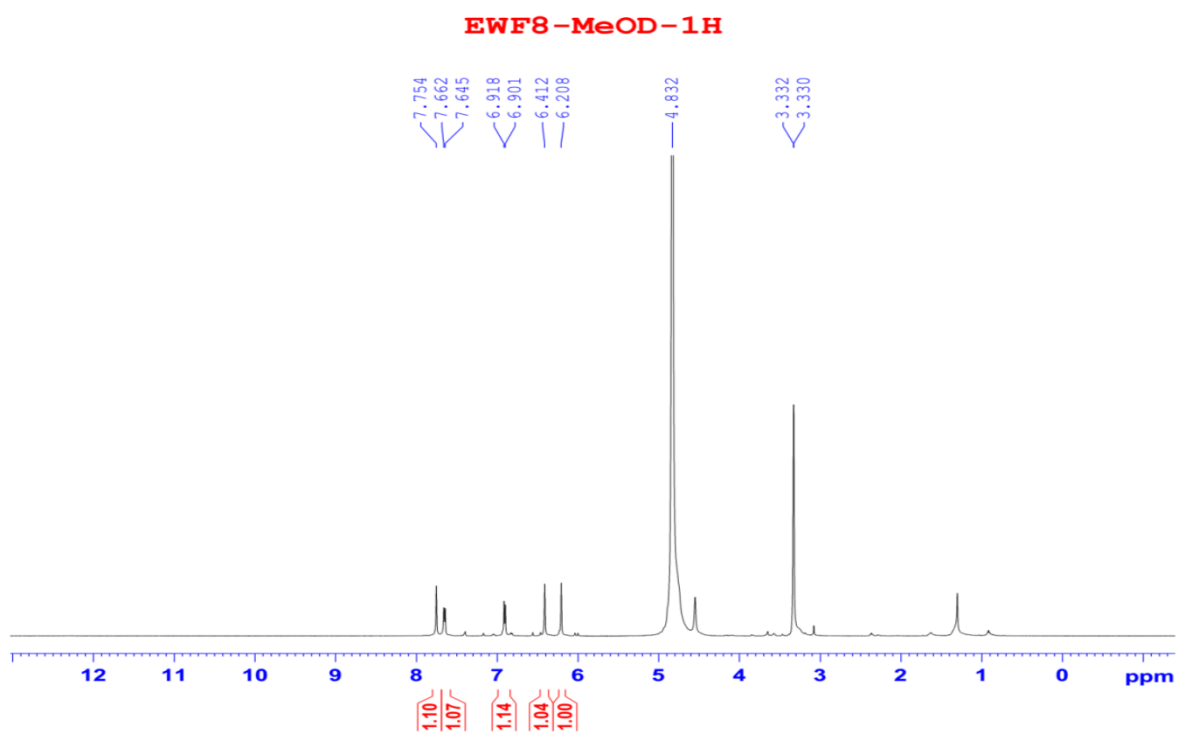


Phụ lục 2.3. Phổ HSQC của EW2

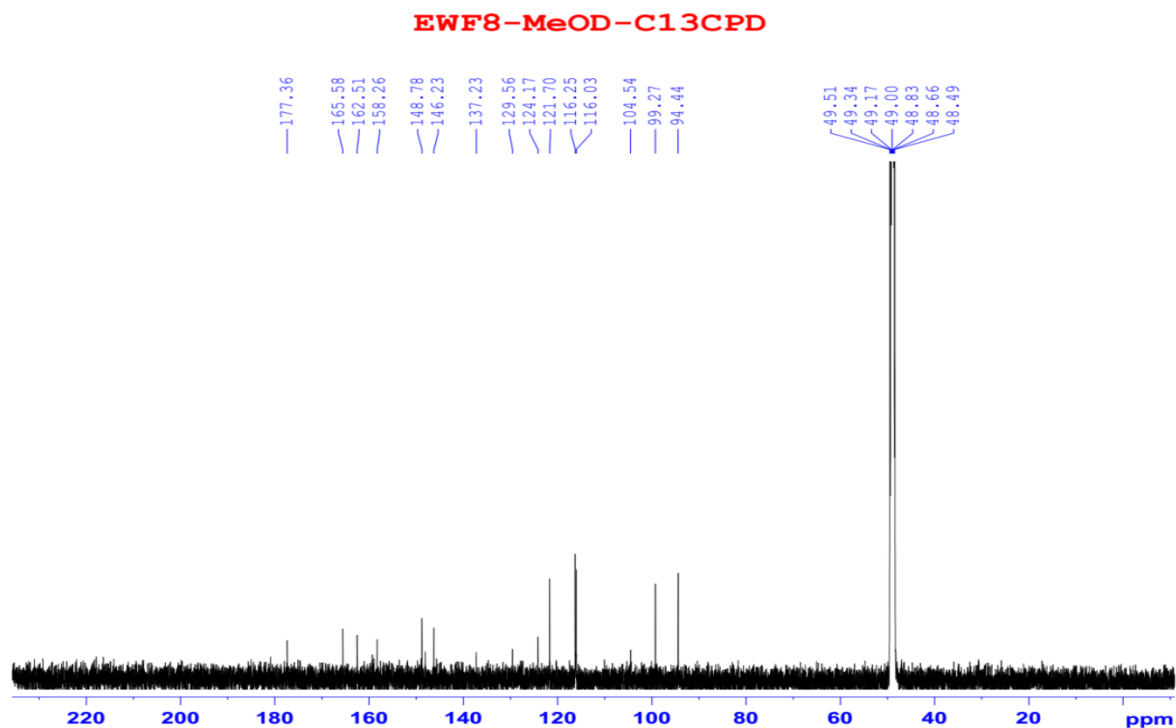


Phụ lục 2.4. Phổ HMBC của EW2

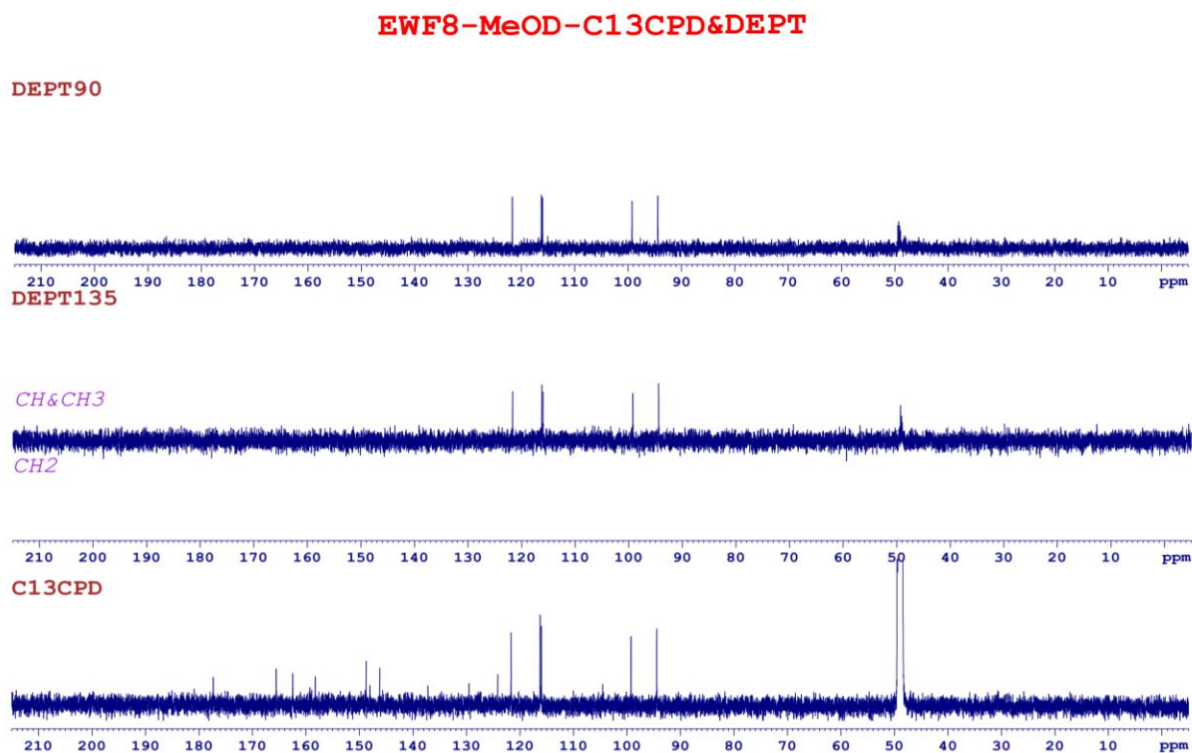
Phụ lục 3. Các phổ của quercetin (EW3)



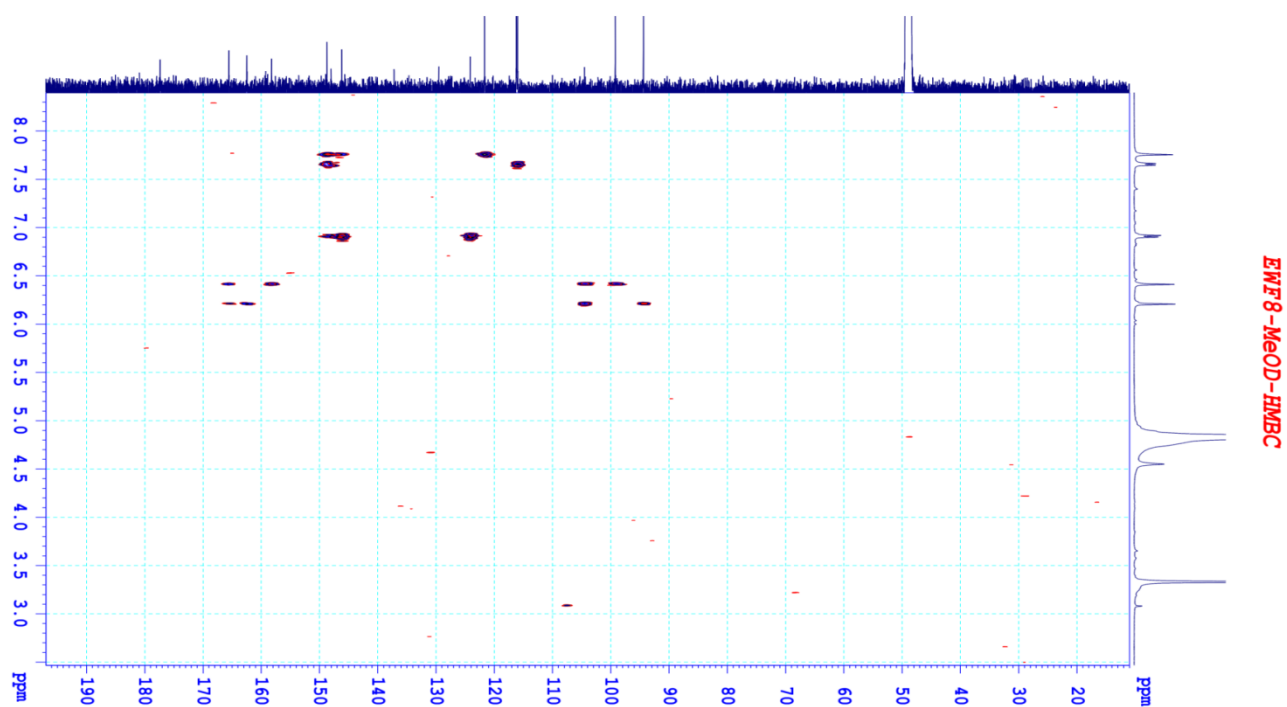
Phụ lục 3.1. Phổ ^1H -NMR của EW3



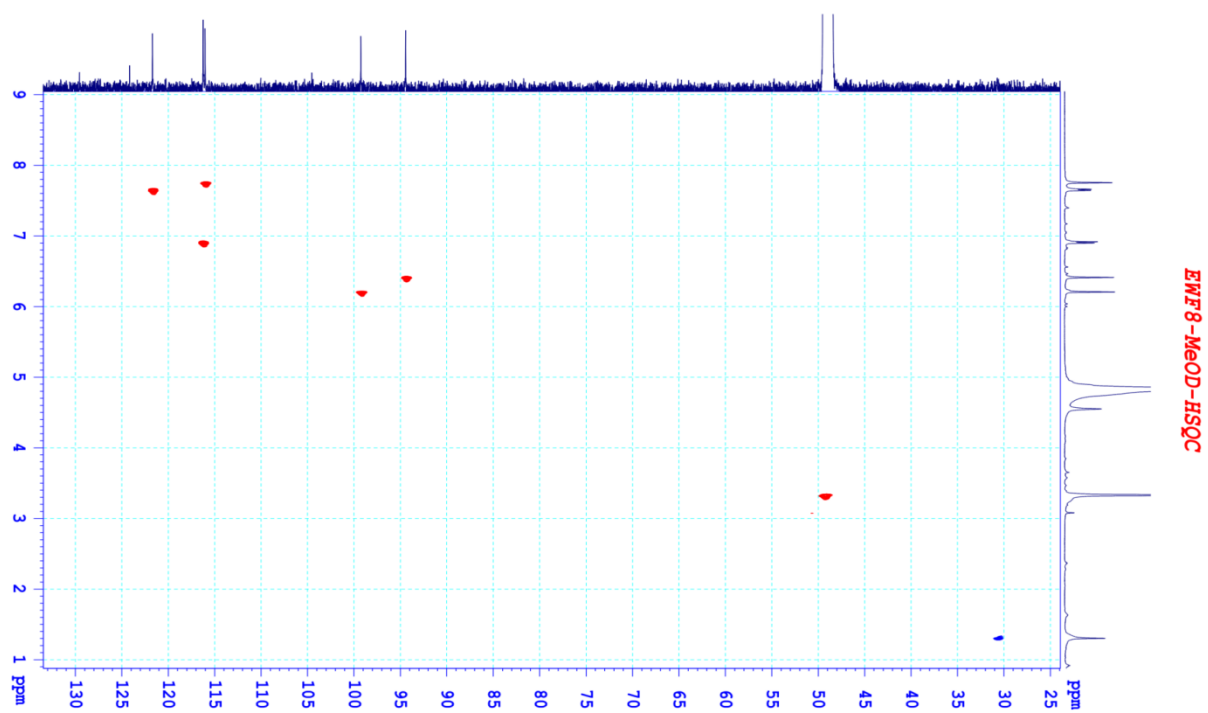
Phụ lục 3.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW3



Phụ lục 3.3. Phổ DEPT của EW3



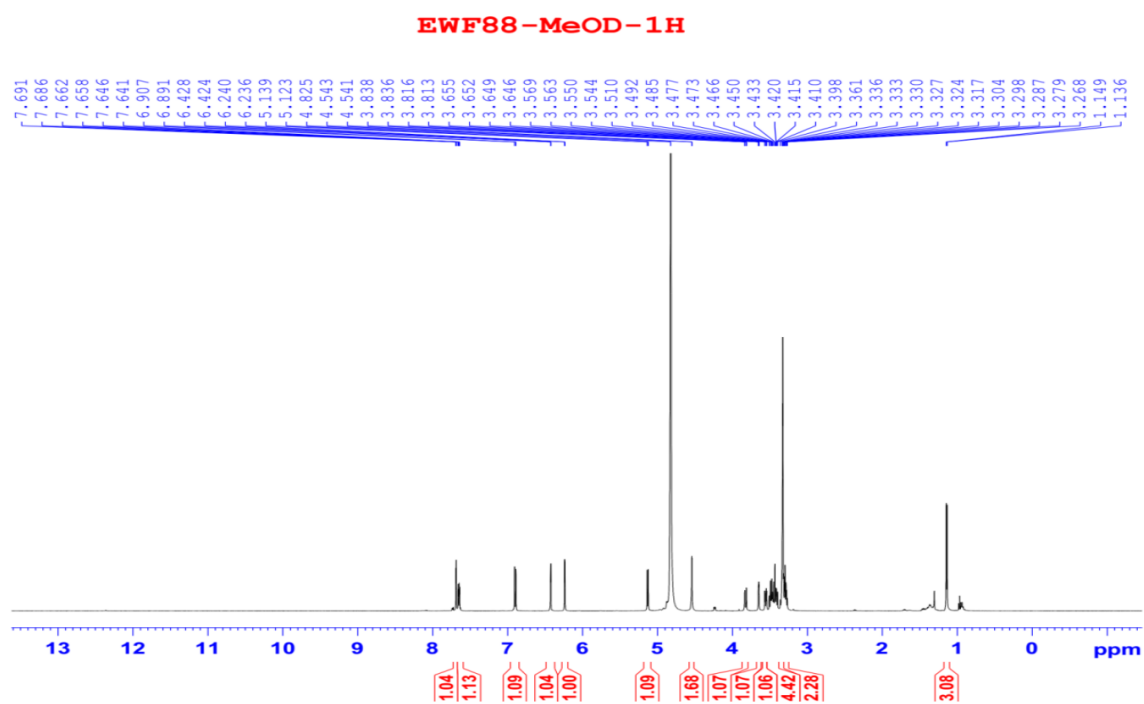
Phụ lục 3.4. Phổ HMBC của EW3



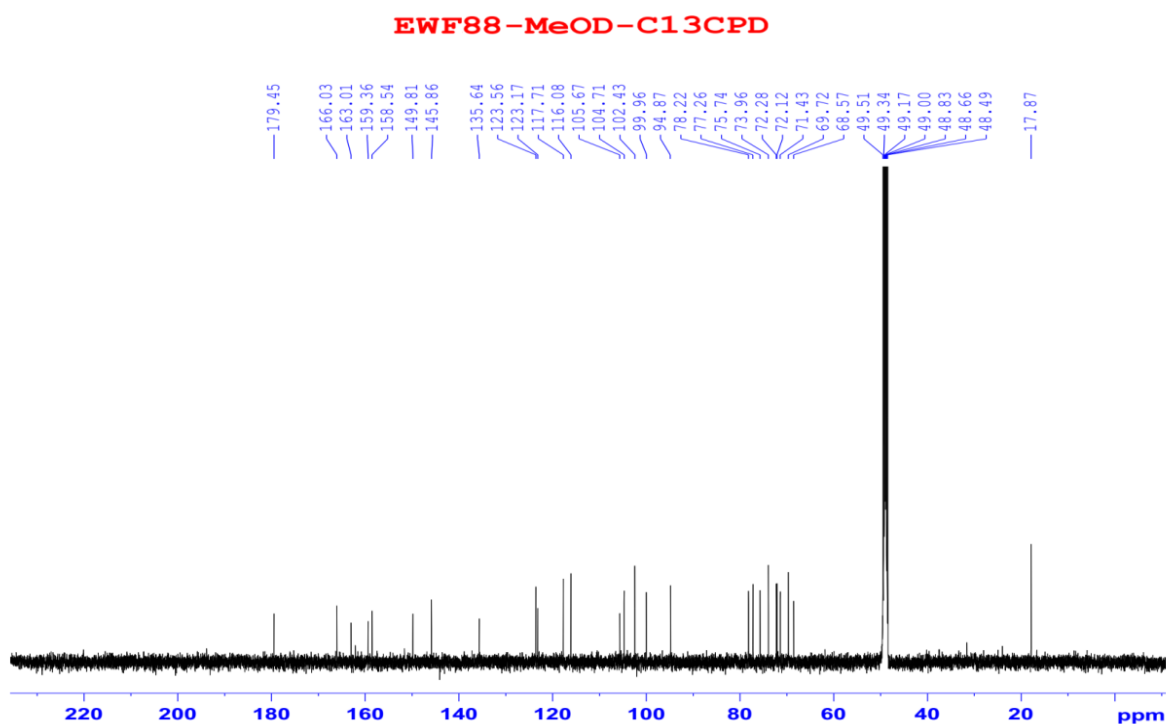
Phụ lục 3.5. Phổ HSQC của EW3

**Phụ lục 4. Các phổ của kaempferol (EW4)
(bổ sung)**

Phụ lục 5. Các phổ của rutin (EW5)



Phụ lục 5.1. Phổ ^1H -NMR của EW5



Phụ lục 5.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW5

EWF88-MeOD-C13CPD&DEPT

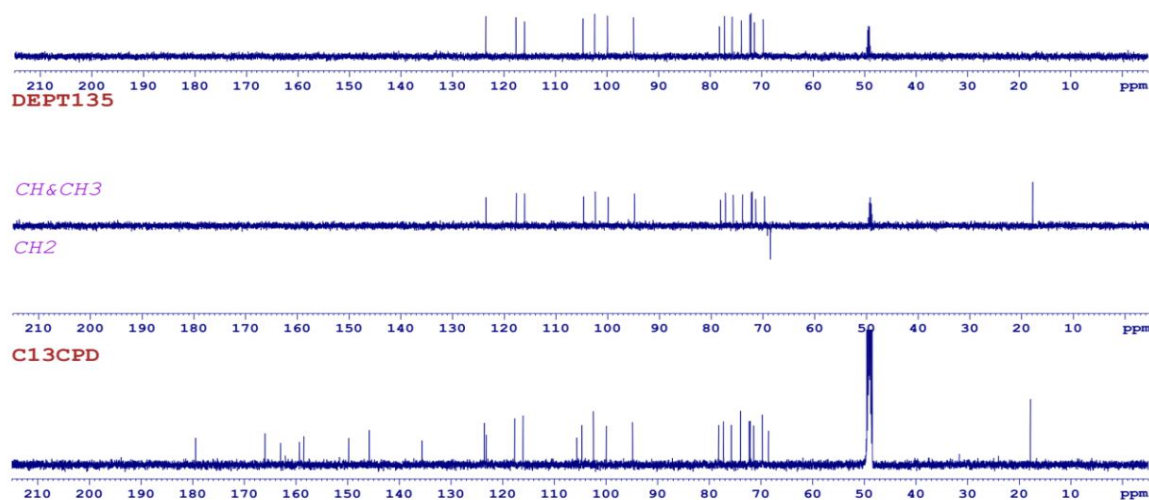
DEPT90

DEPT135

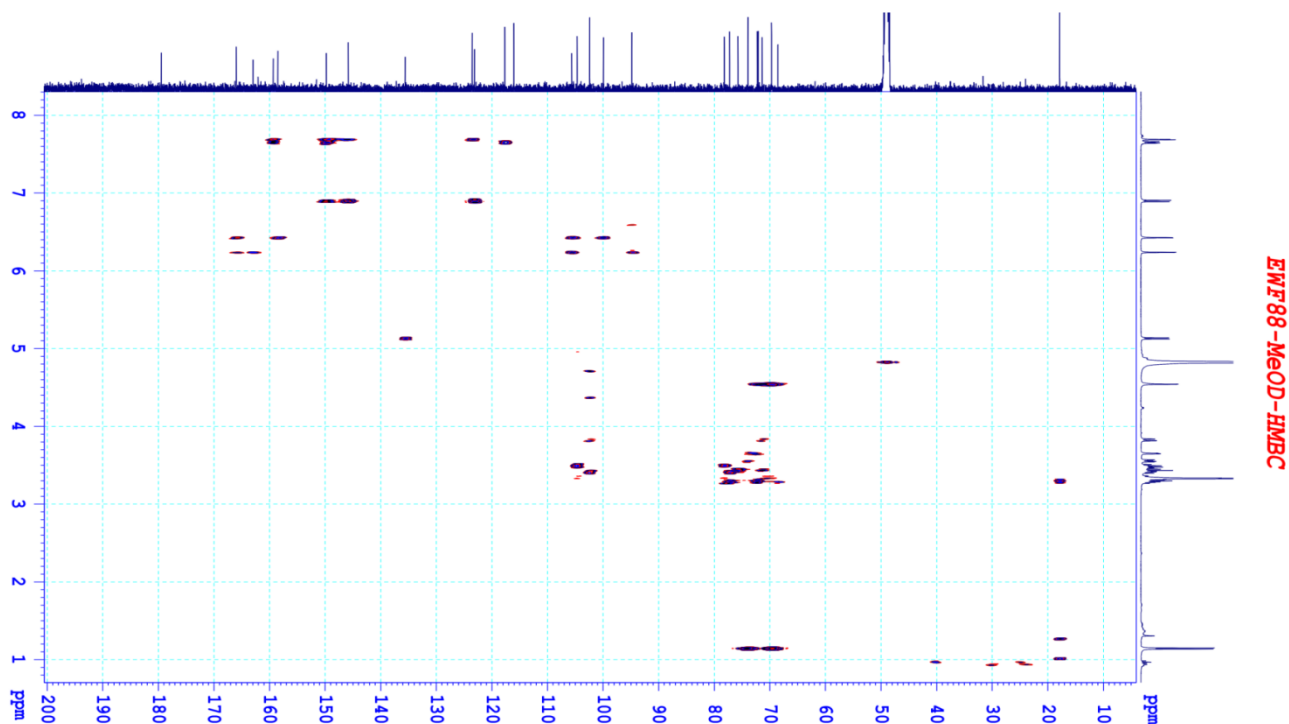
CH&CH3

CH2

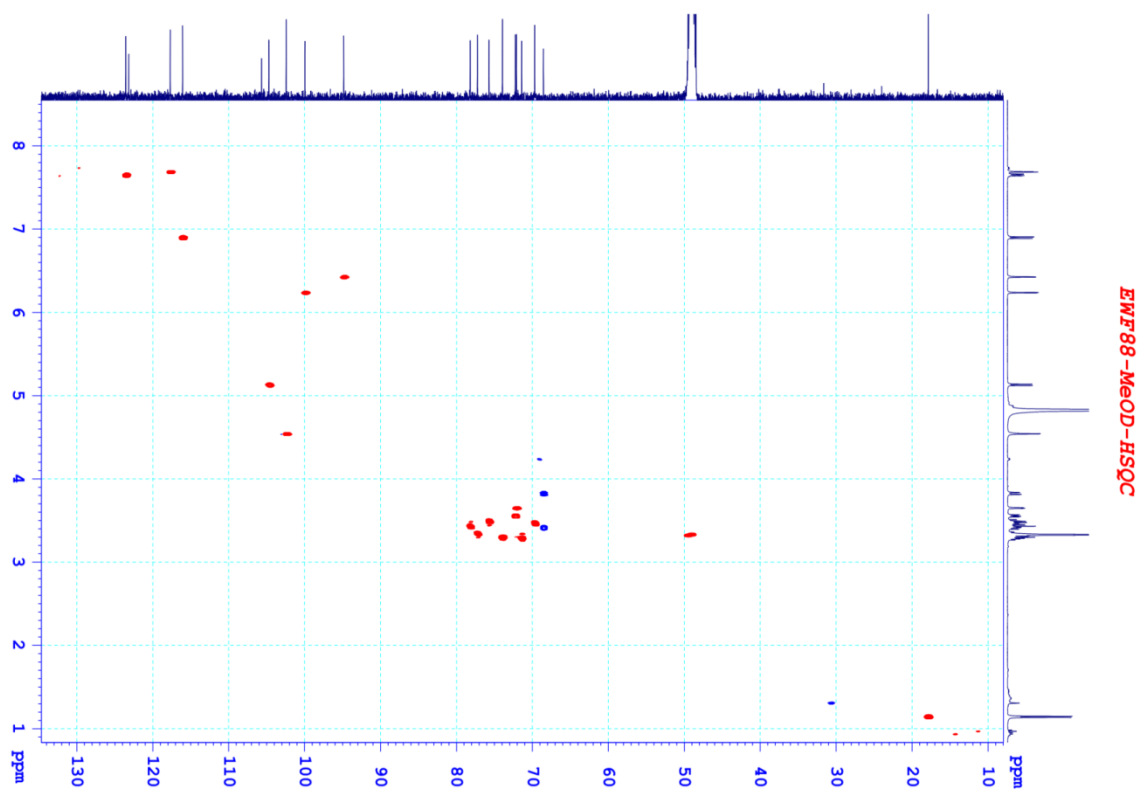
C13CPD



Phụ lục 5.3. Phổ DEPT của EW5

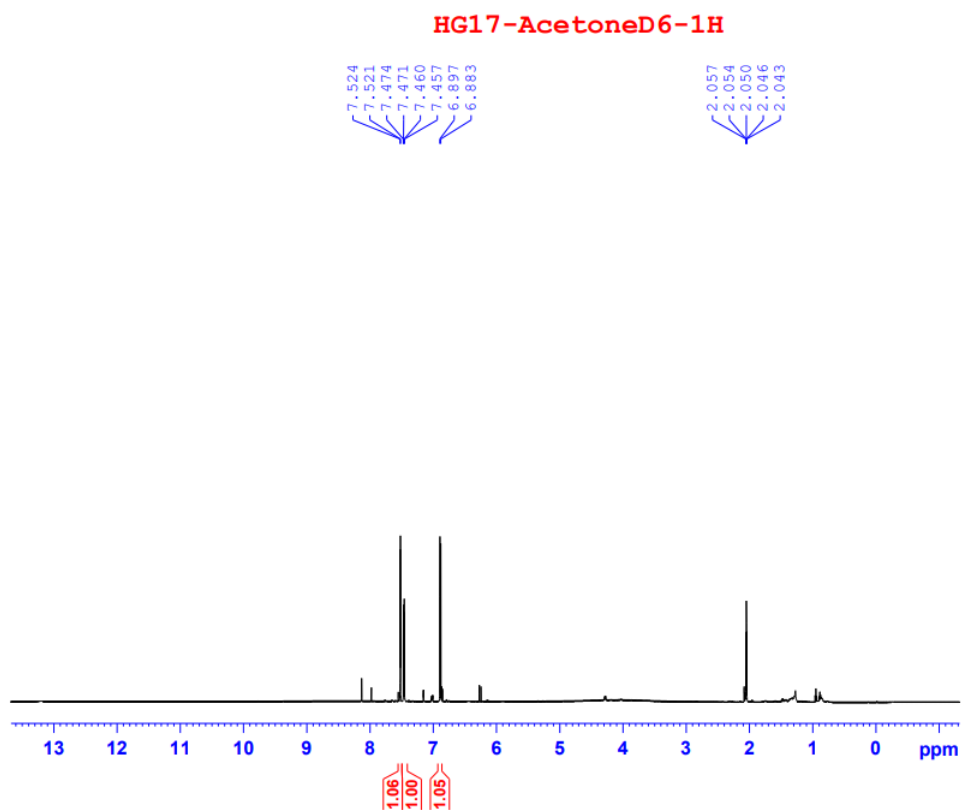


Phụ lục 5.4. Phổ HMBC của EW5



Phụ lục 5.5. Phổ HSQC của EW5

Phụ lục 6. Các phổ của protocatechuic acid (EW6)

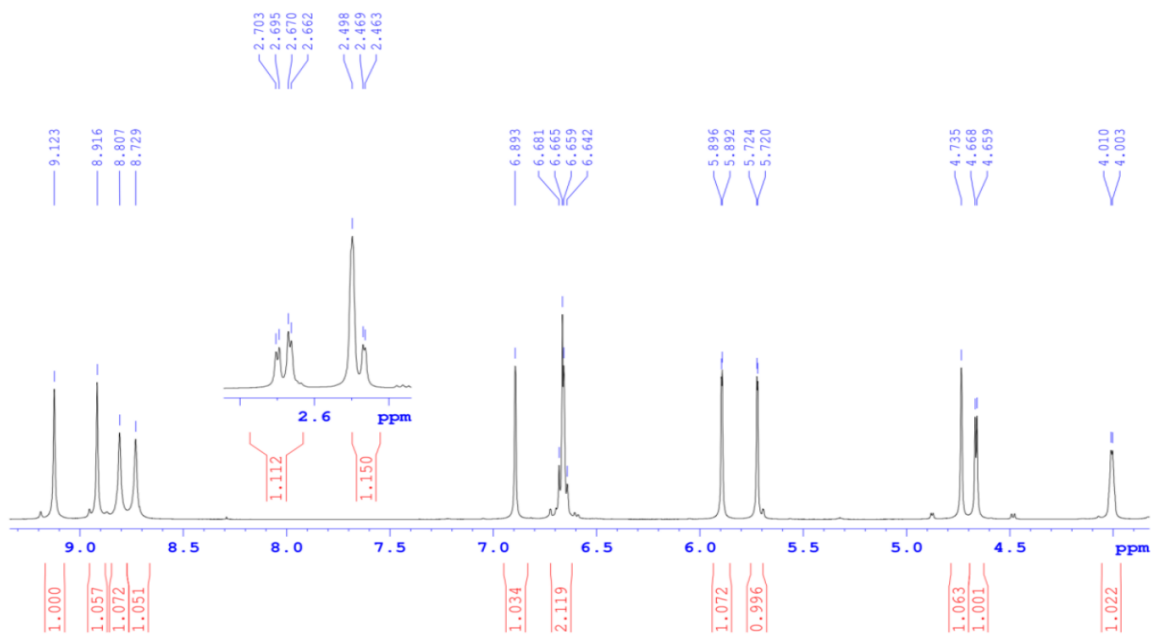


Phụ lục 6.1. Phổ ^1H -NMR của EW6

Phụ lục 7. Các phổ của 5,7,3',5'- tetrahydroxyflavanone (EW7)

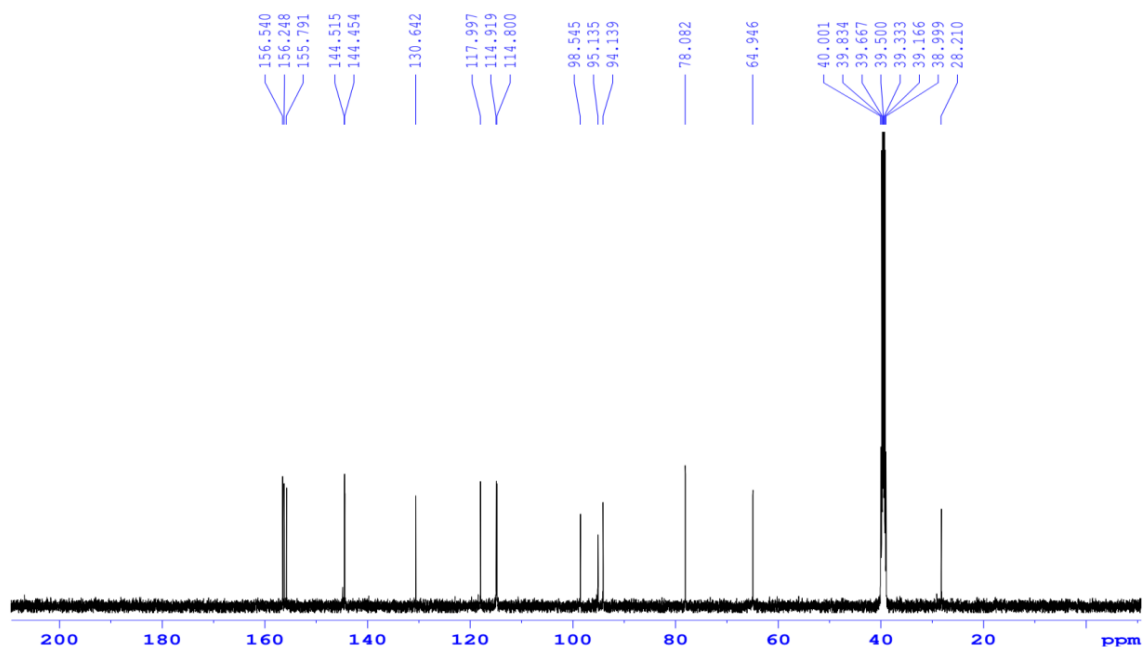
Phụ lục 8. Các phổ của (+)-catechin (EW8)

EWFE2 62-DMSO-1H



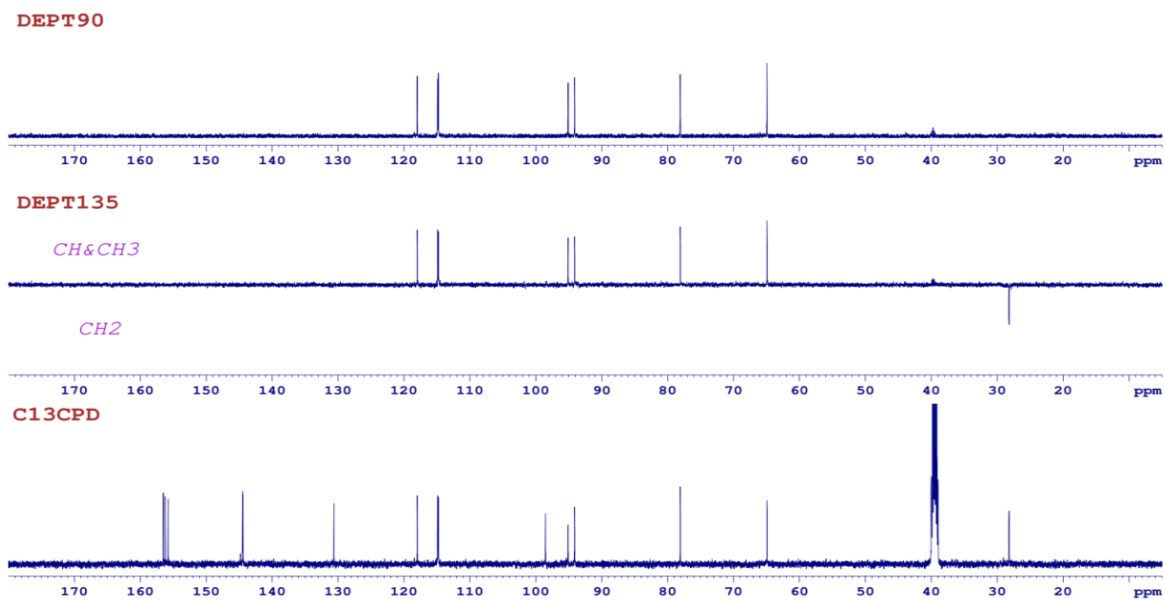
Phụ lục 8.1. Phổ ^1H -NMR của EW8

EWFE2 62-DMSO-C13CPD

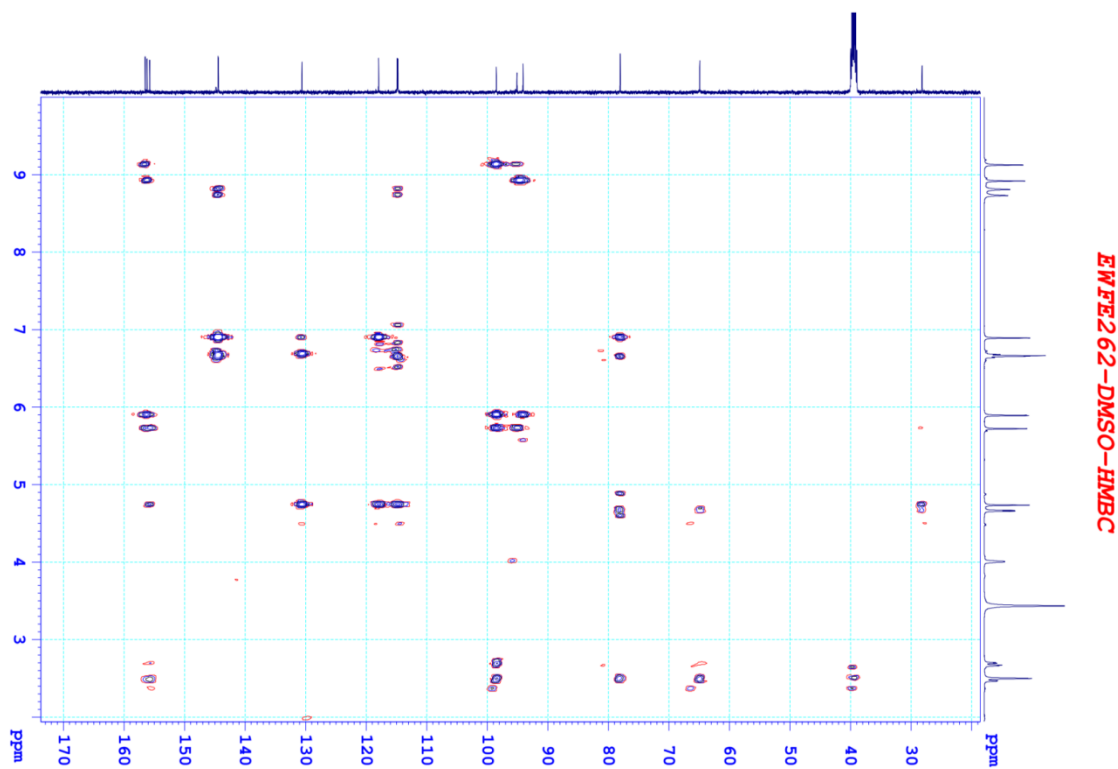


Phụ lục 8.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW8

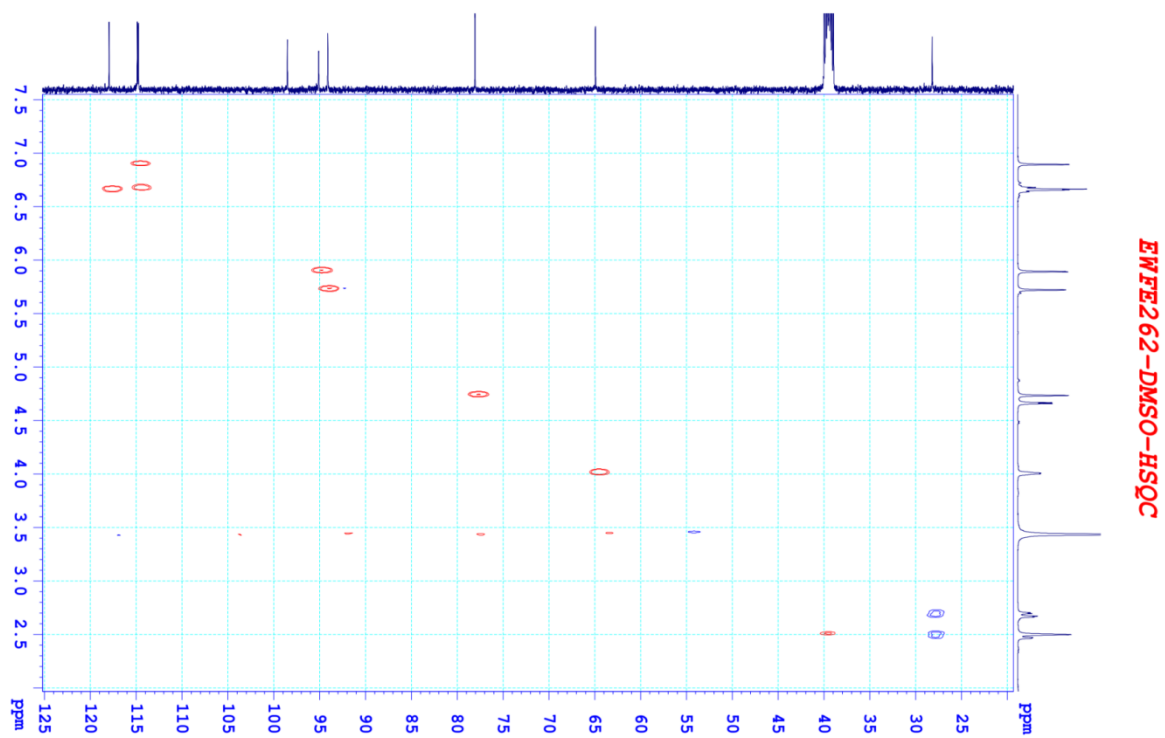
EWFE262-DMSO-C13CPD&DEPT



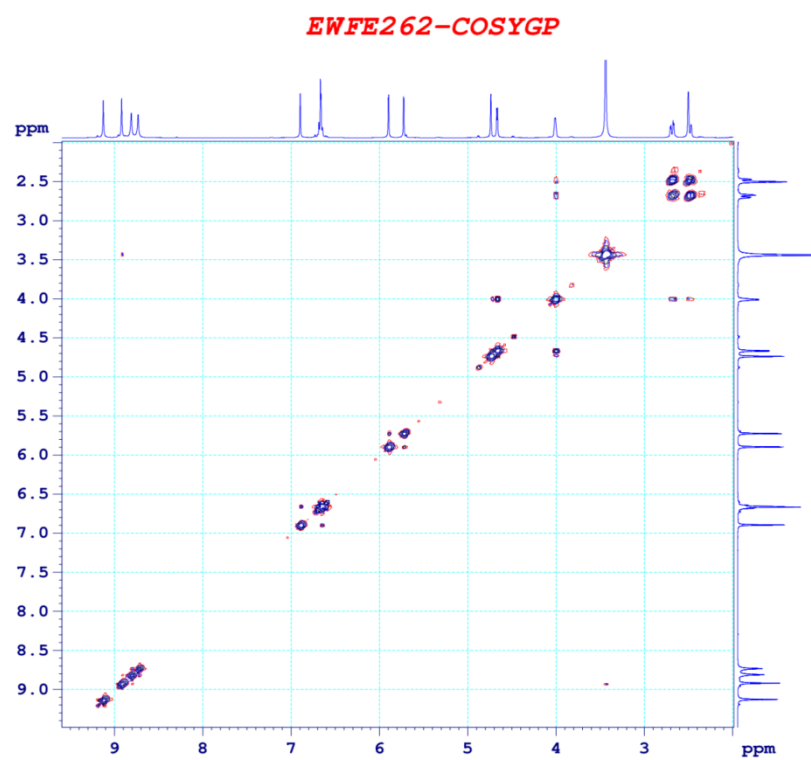
Phụ lục 8.3. Phổ DEPT của EW8



Phụ lục 8.4. Phổ HMBC của EW8

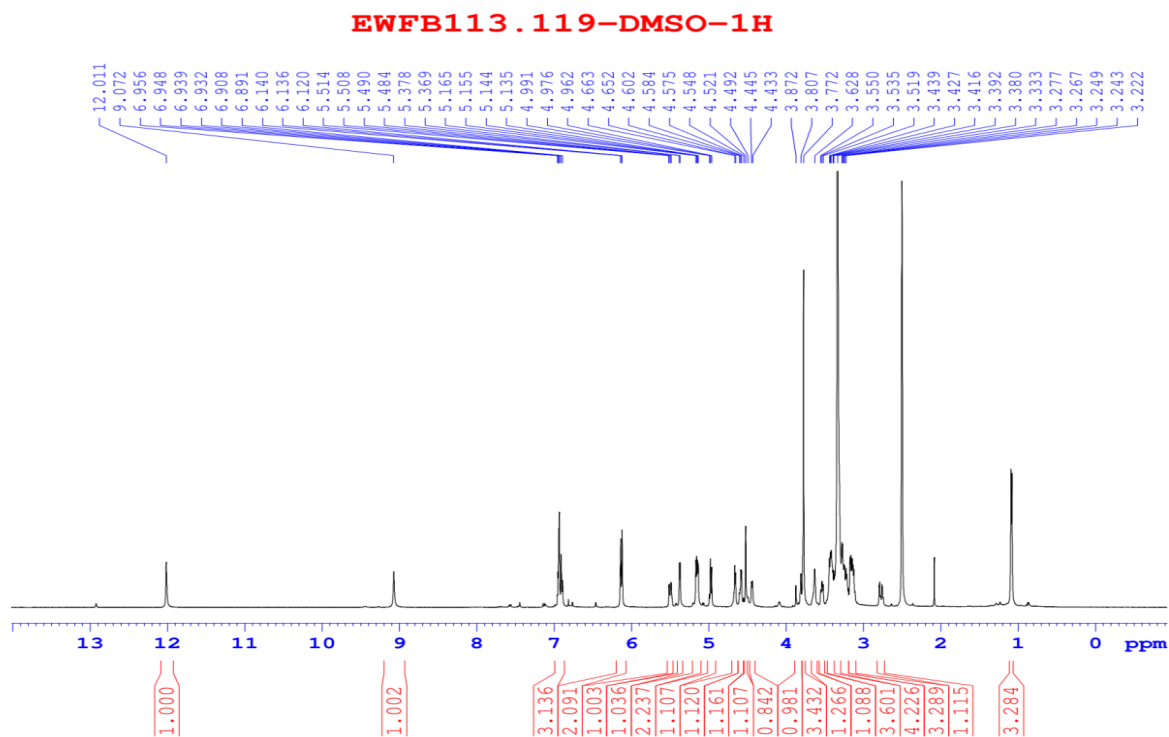


Phụ lục 8.5. Phổ HSQC của EW8

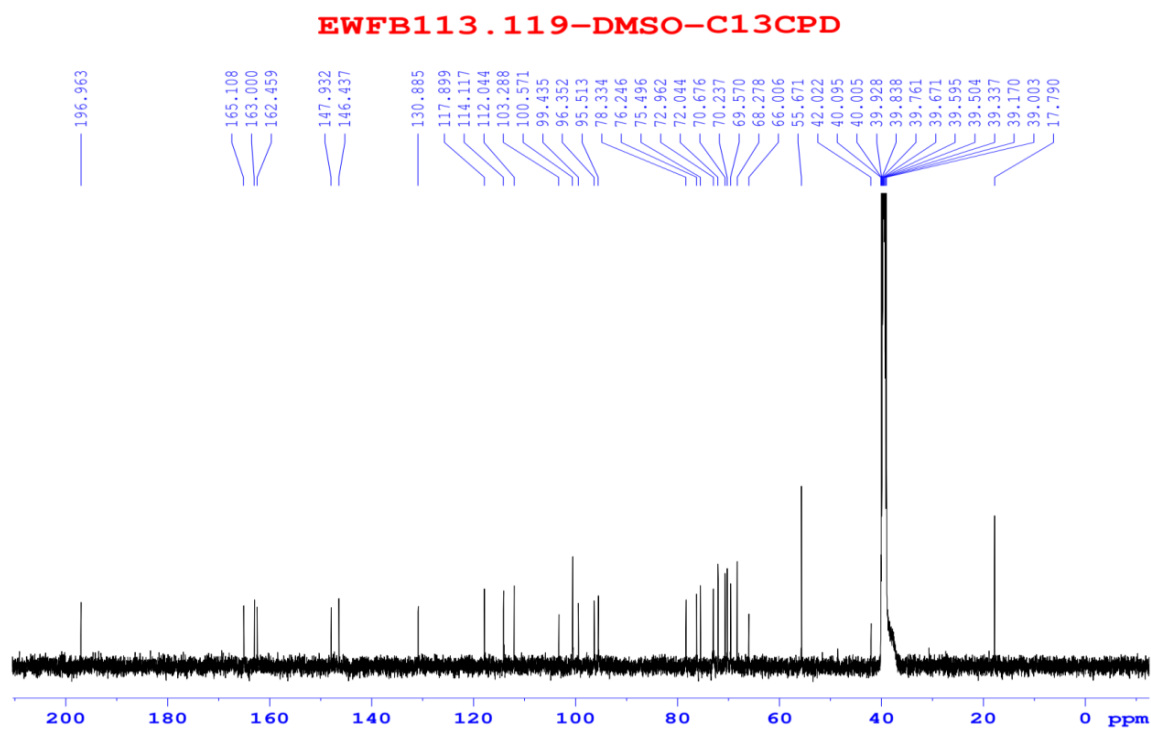


Phụ lục 8.6. Phổ COSY của EW8

Phụ lục 9. Các phổ của hesperidin (EW9)



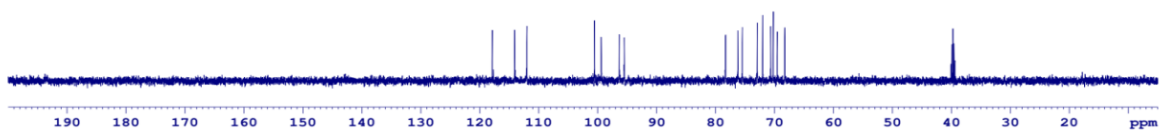
Phụ lục 9.1. Phổ ^1H -NMR của EW9



Phụ lục 9.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW9

EWFB113.119-DMSO-C13CPD&DEPT

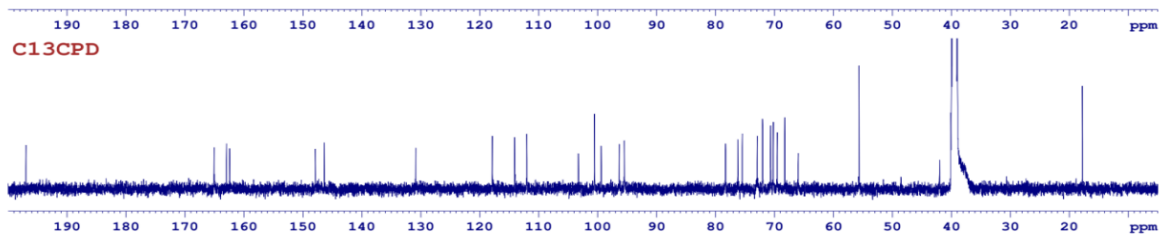
DEPT90



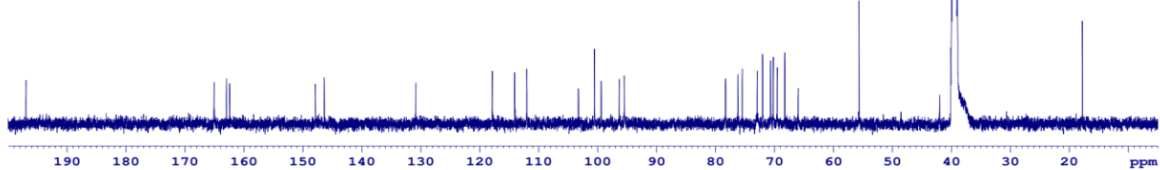
DEPT135

CH&CH3

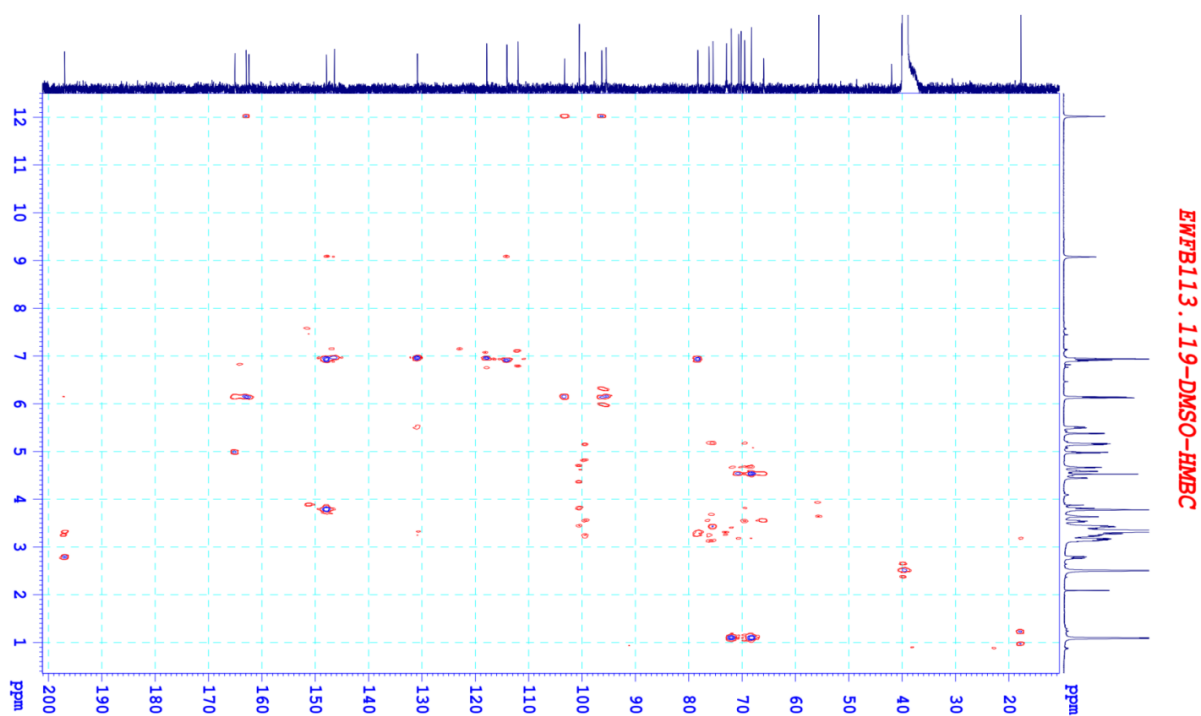
CH2



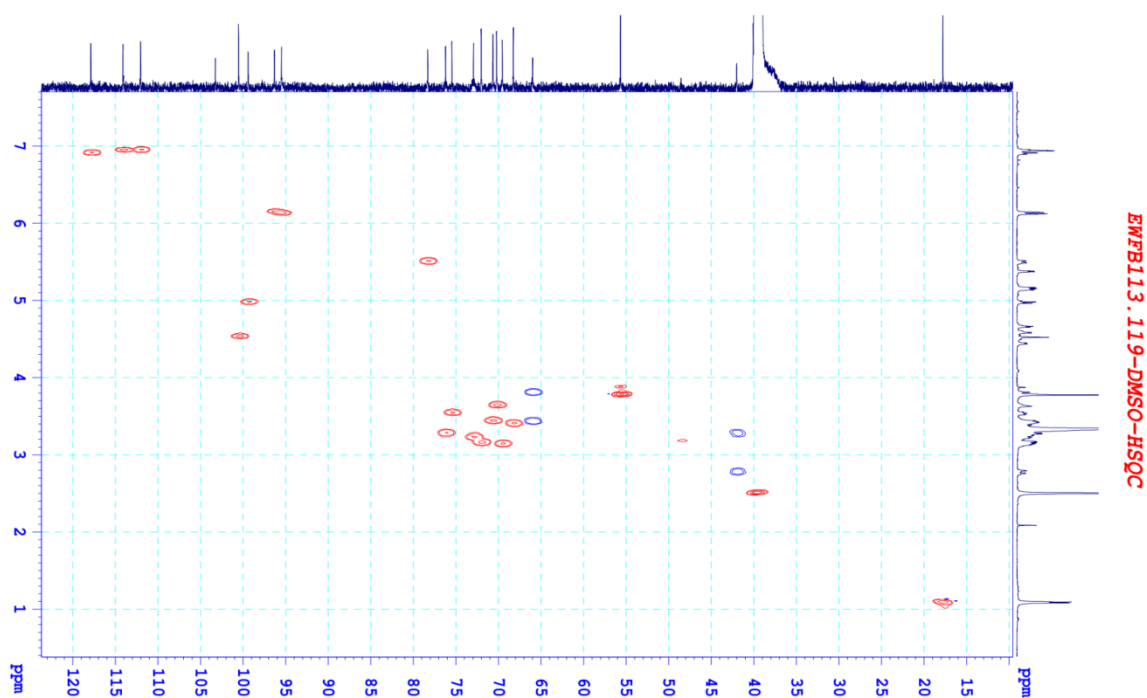
C13CPD



Phụ lục 9.3. Phổ DEPT của EW9

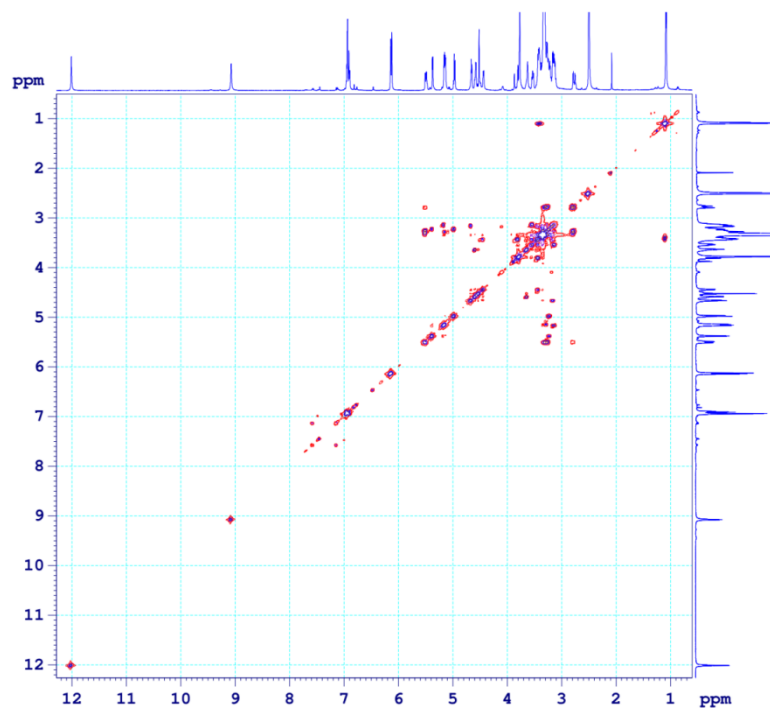


Phụ lục 9.4. Phổ HMBC của EW9



Phụ lục 9.5. Phổ HSQC của EW9

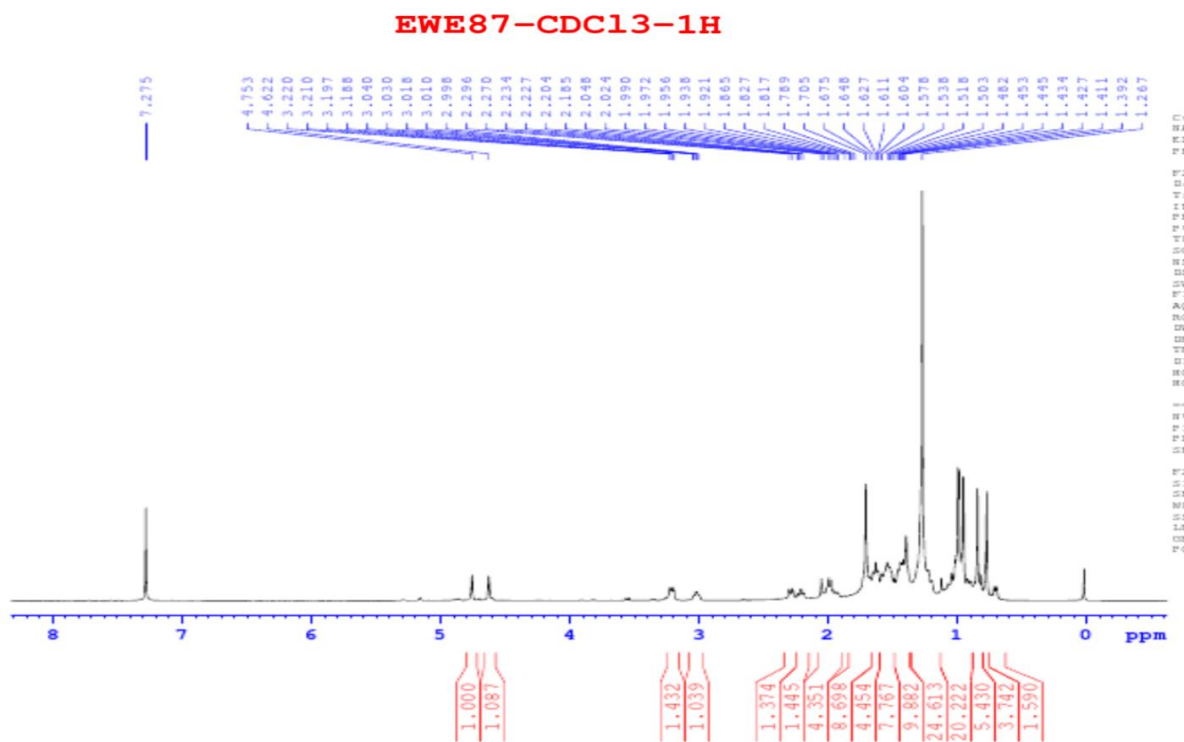
EWFB113.119-DMSO-COSYGP



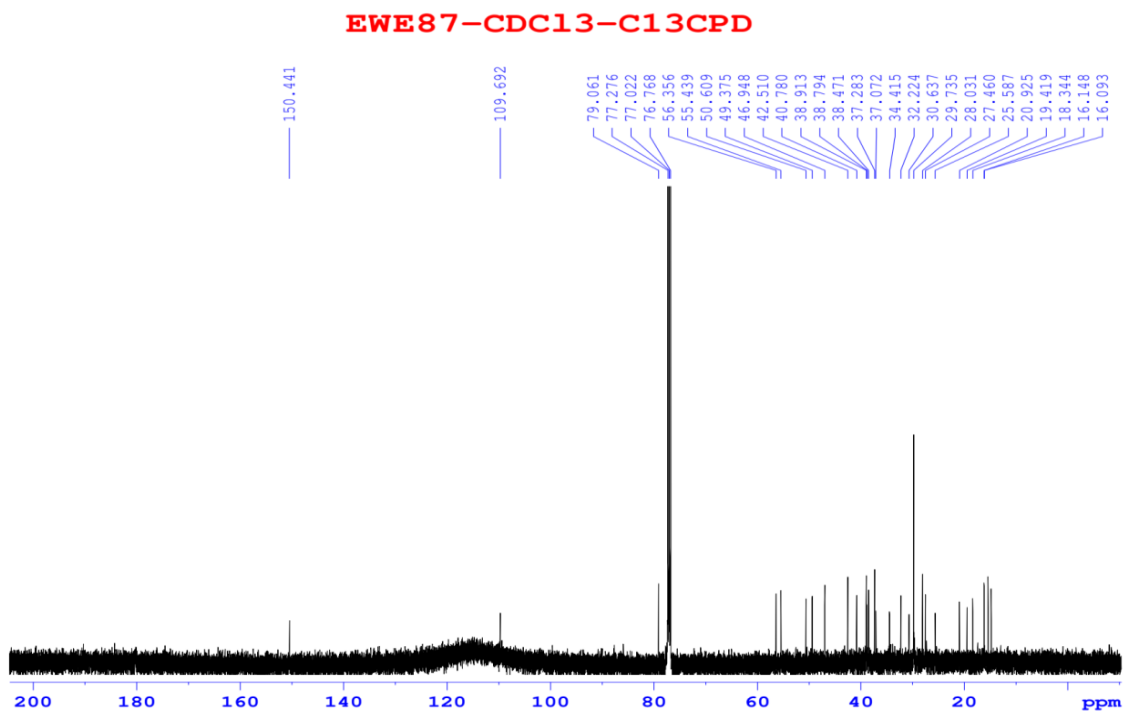
Phụ lục 9.6. Phổ COSY của EW9

Phụ lục 10. Các phổ của Oleanic acid (EW10)

Phụ lục 11. Các phổ của betulinic acid (EW11)



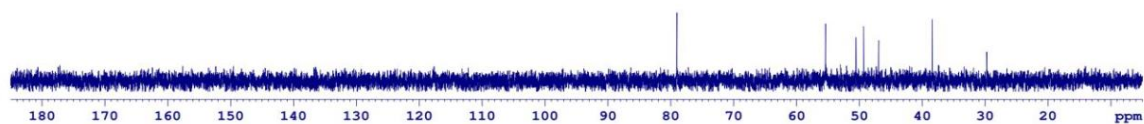
Phụ lục 11.1. Phổ ^1H -NMR của EW11



Phụ lục 11.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW11

EWE87-CDC13-C13CPD&DEPT

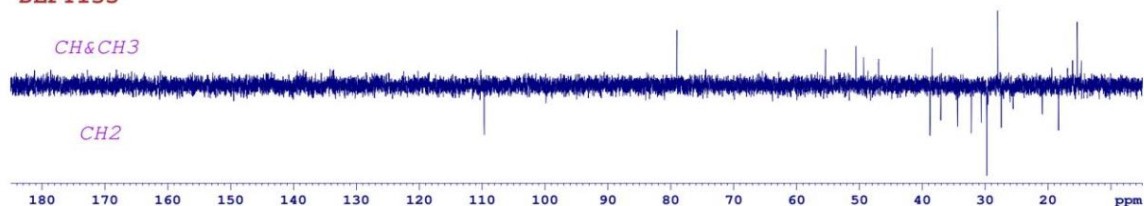
DEPT90



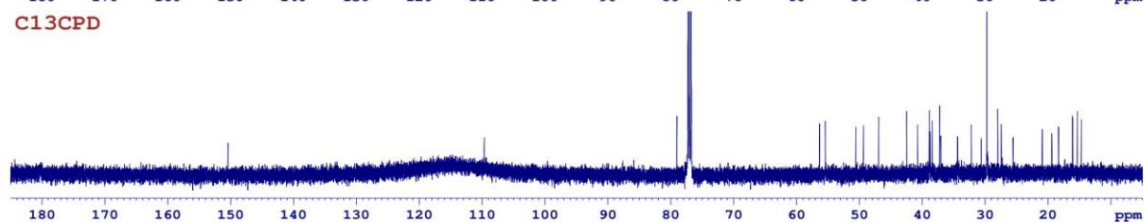
DEPT135

CH&CH3

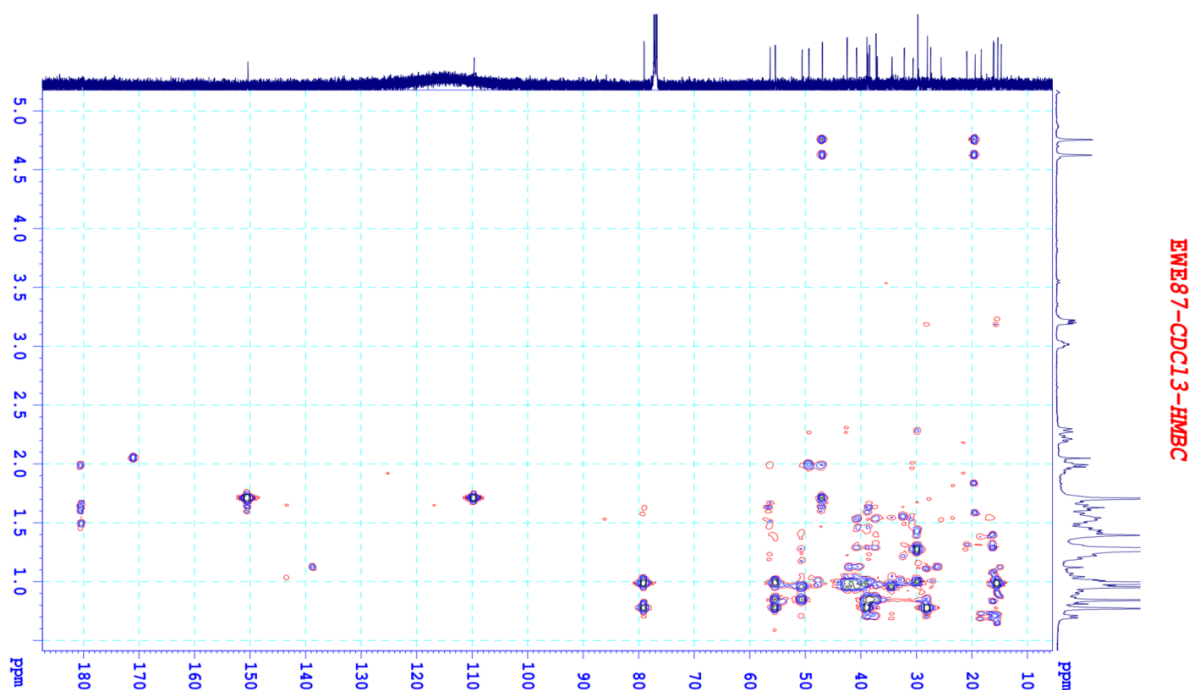
CH2

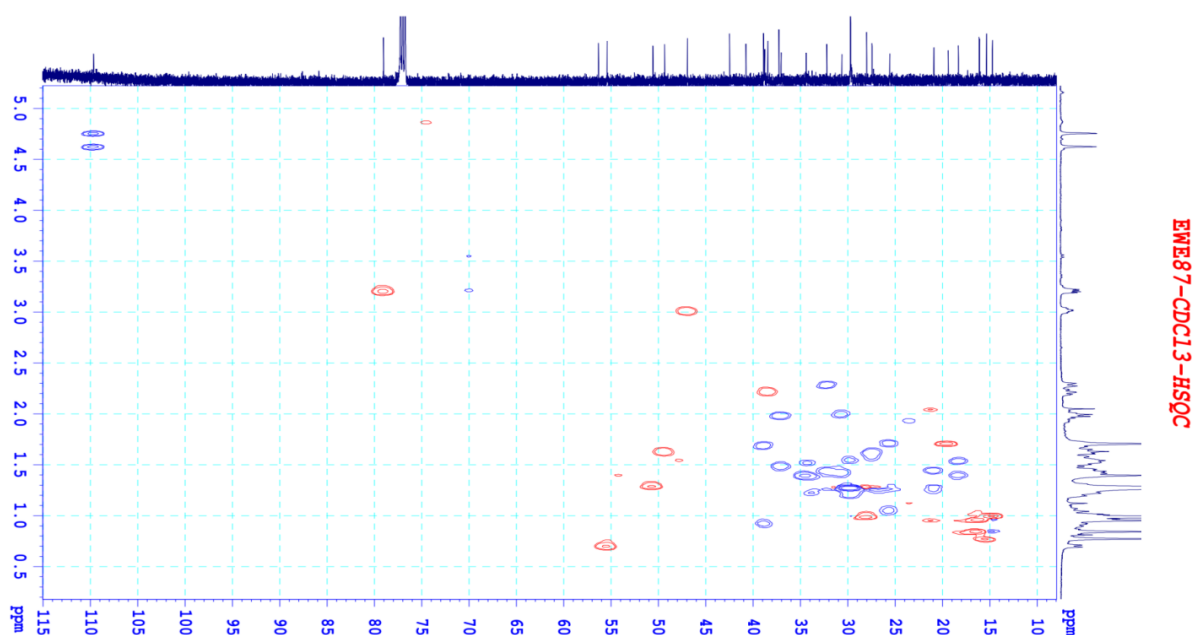


C13CPD

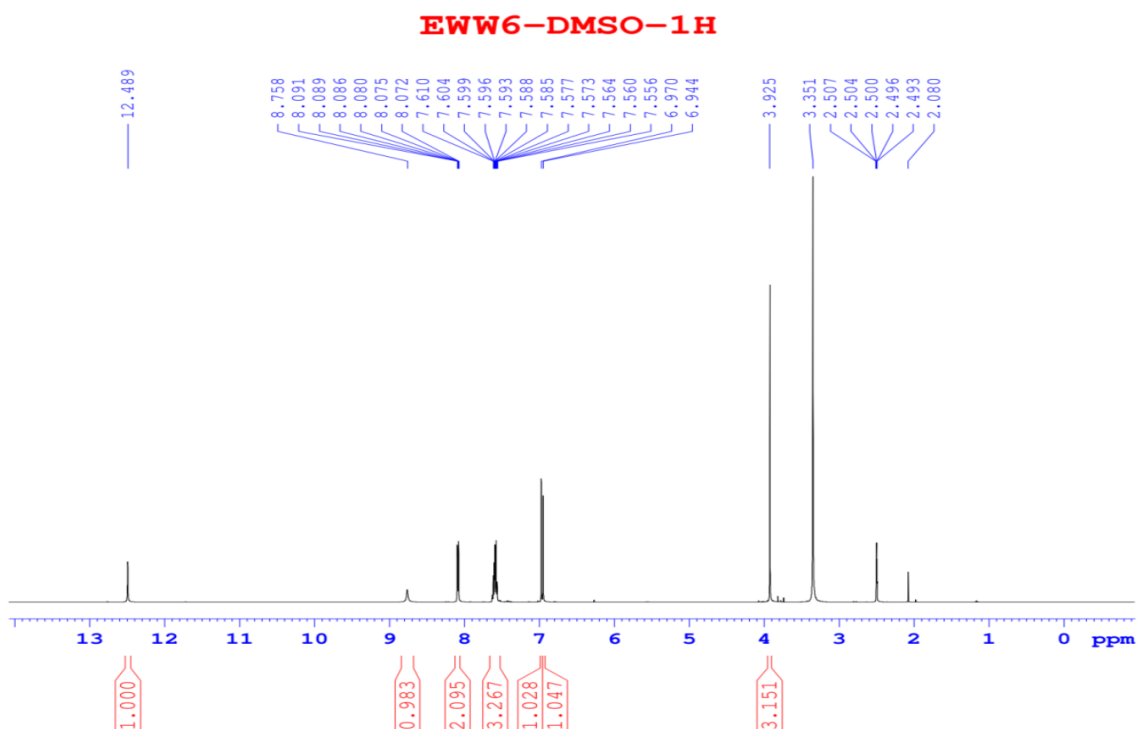


Phụ lục 11.3. Phổ DEPT của EW11

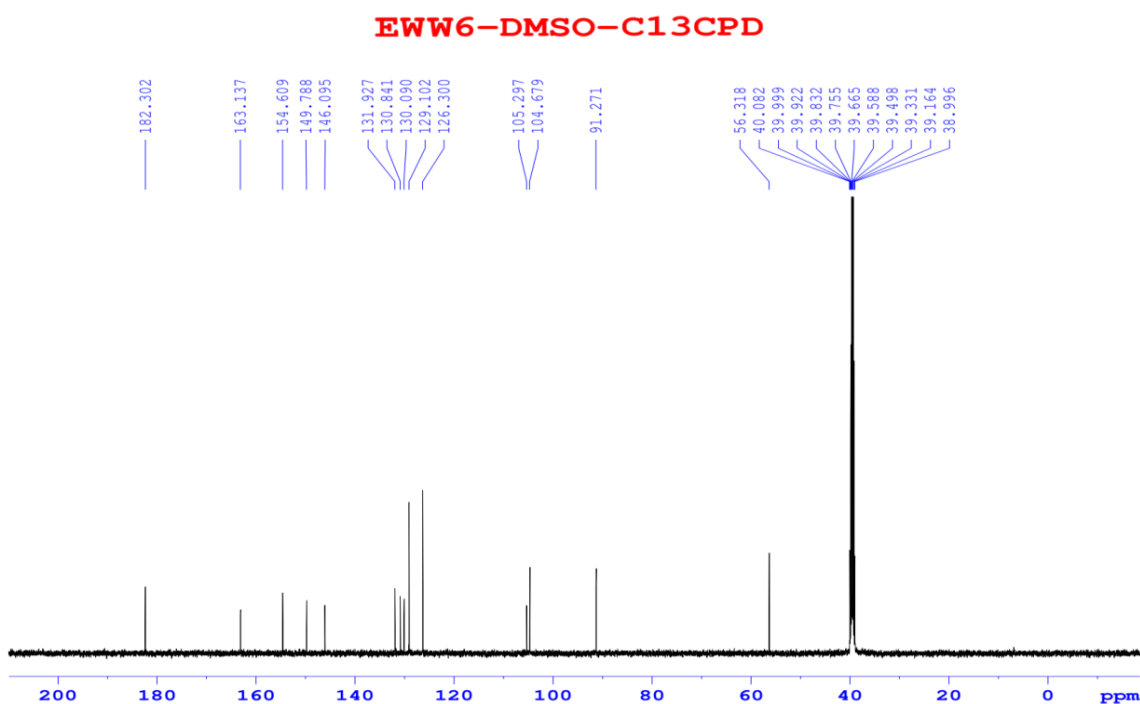


Phụ lục 11.4. Phổ HMBC của EW11*Phụ lục 11.5. Phổ HSQC của EW11*

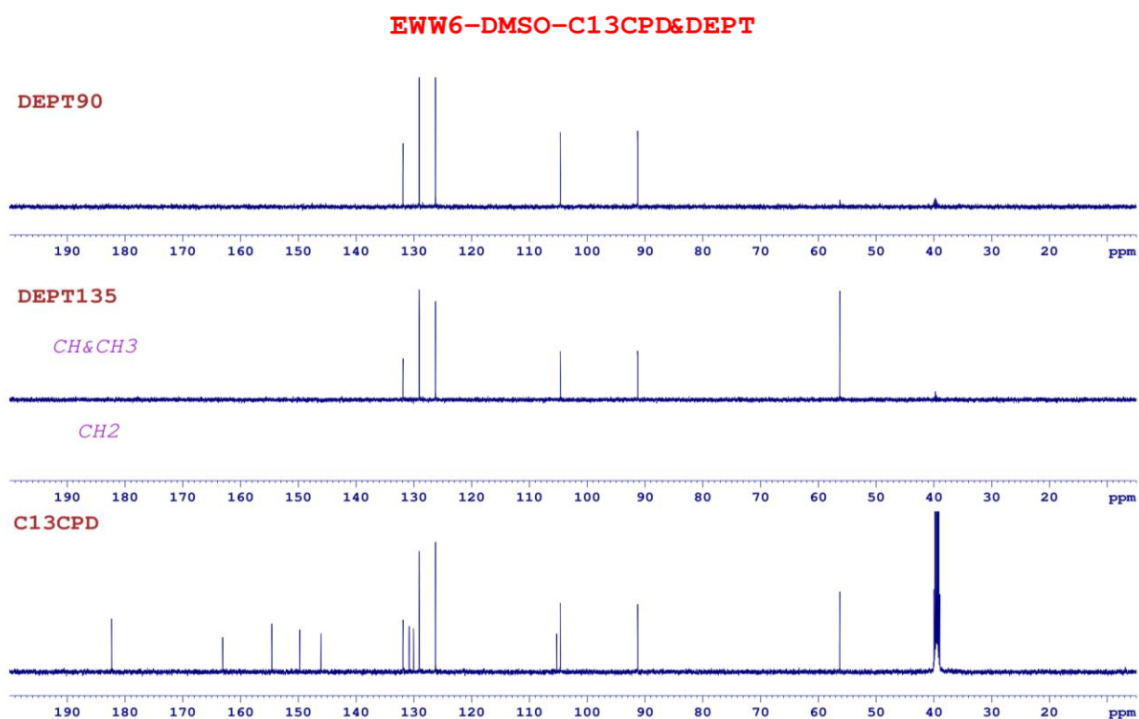
Phụ lục 12. Các phổ của oroxylin A (EW12)



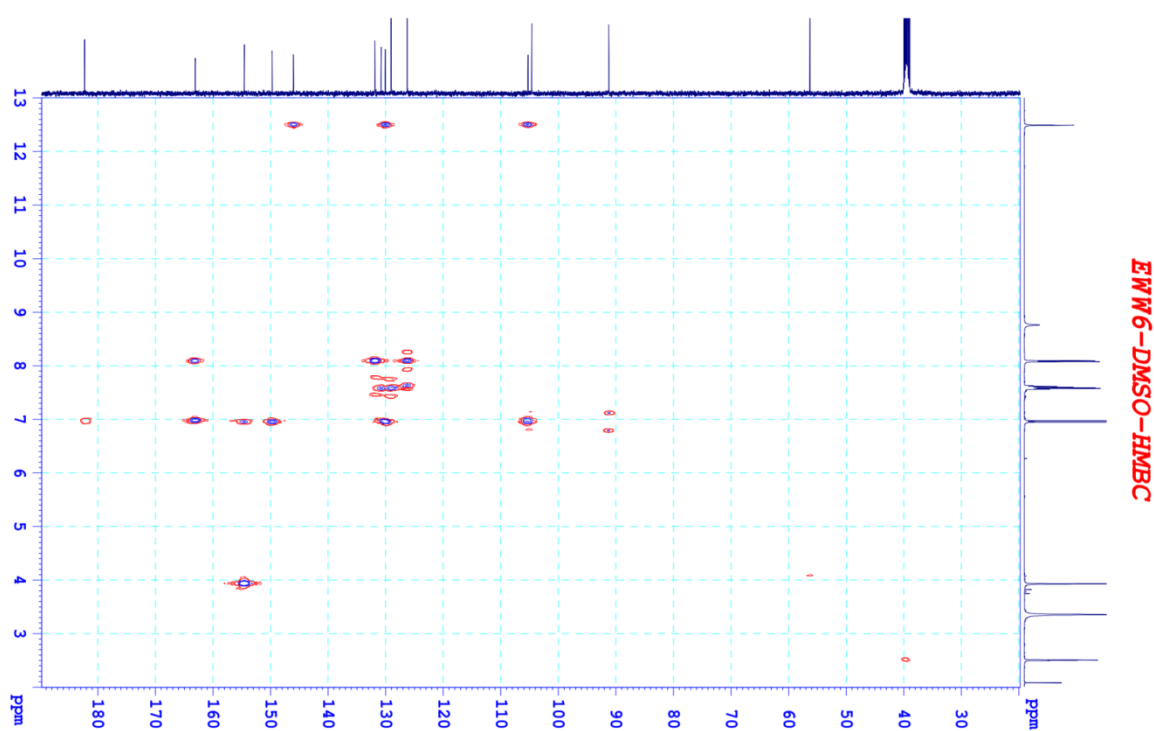
Phụ lục 12.1. Phổ ^1H -NMR của EW12



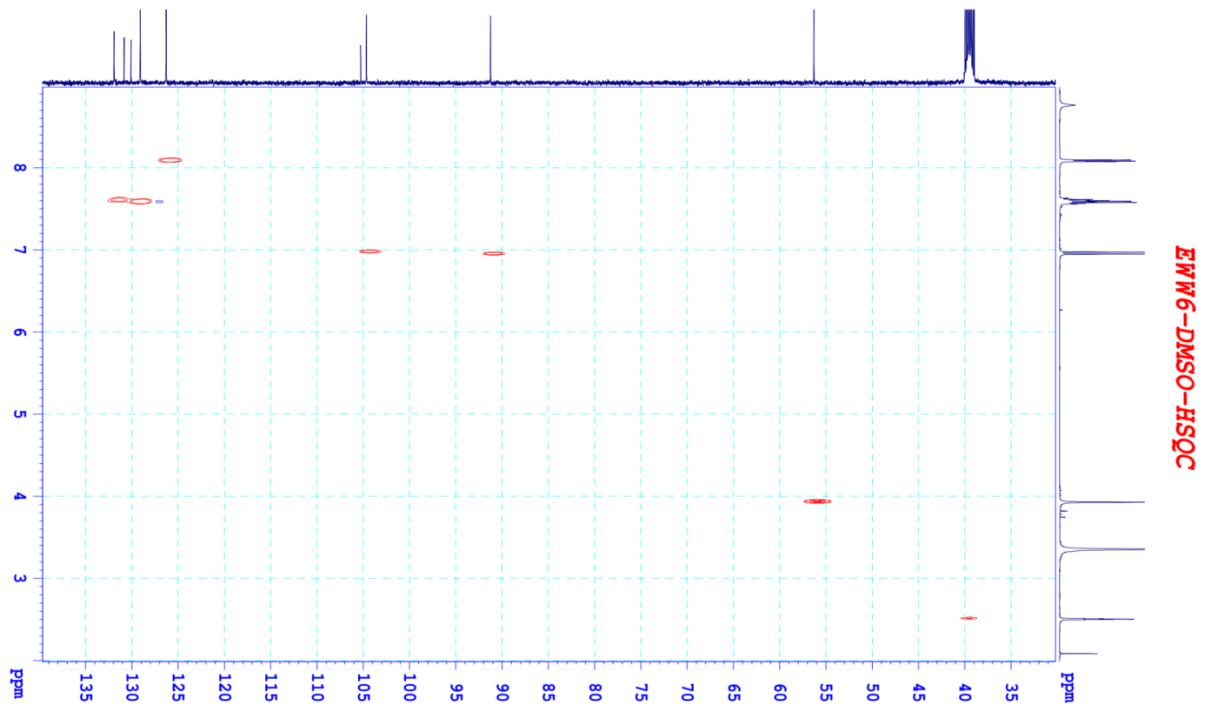
Phụ lục 12.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW12



Phụ lục 12.3. Phổ DEPT của EW12

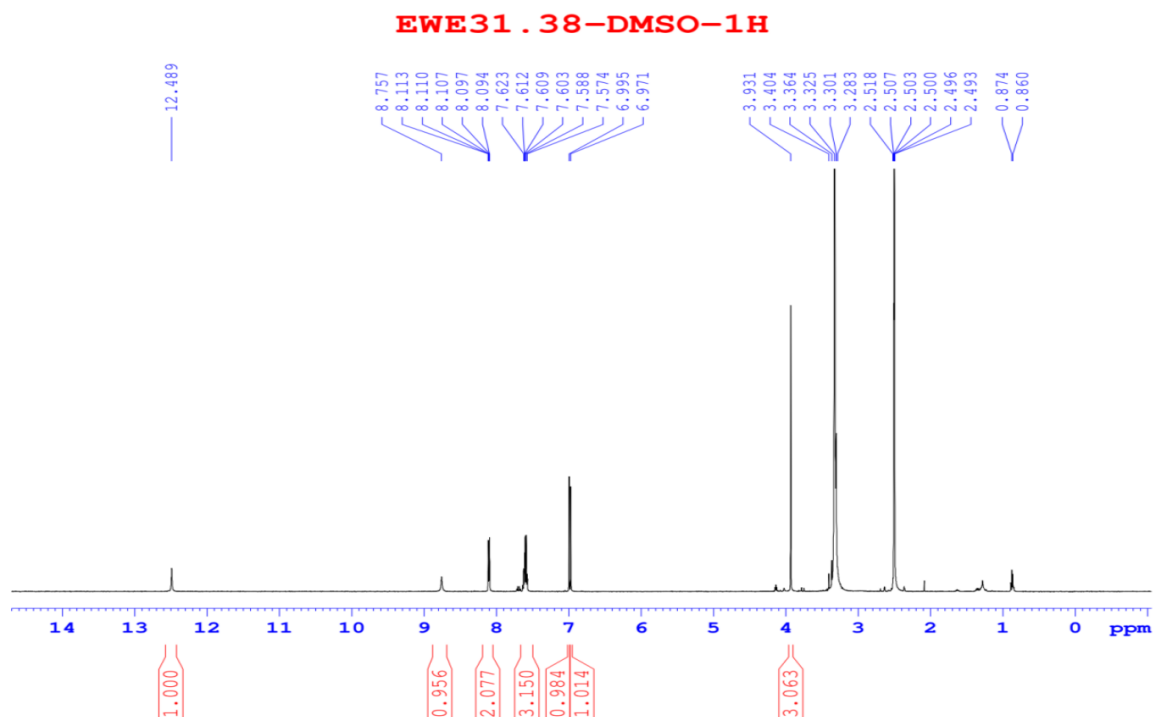


Phụ lục 12.4. Phổ HMBC của EW12

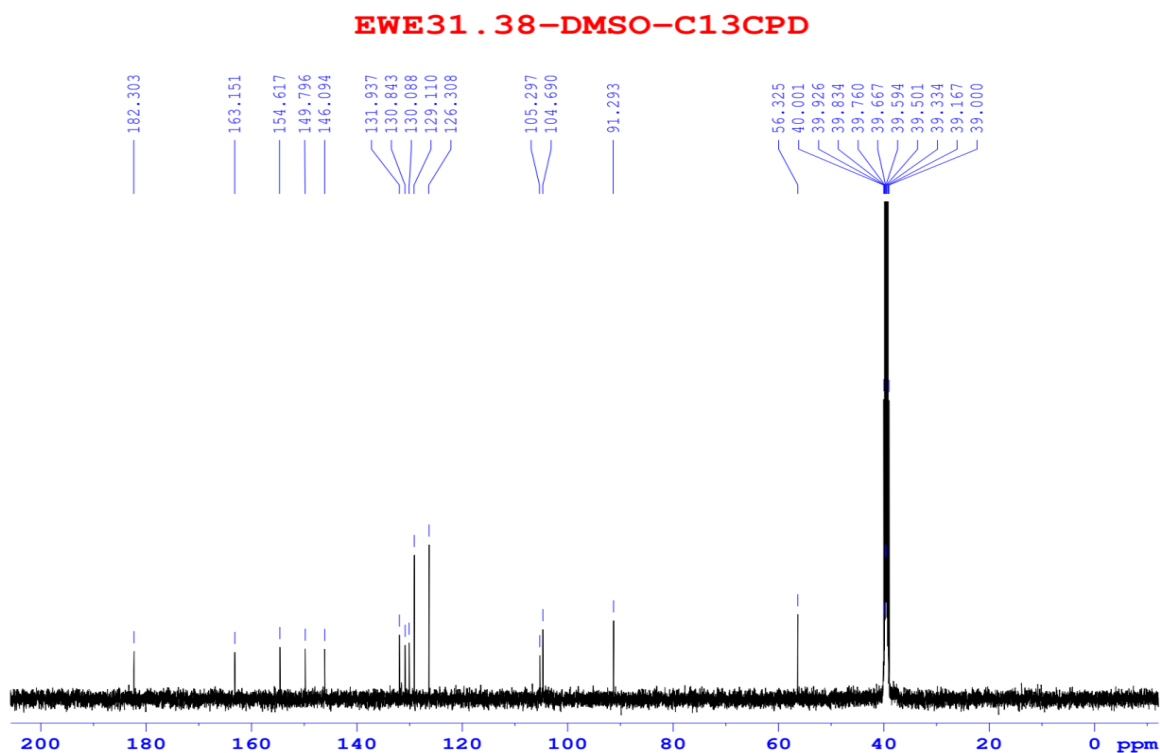


Phụ lục 12.5. Phổ HSQC của EW12

Phụ lục 13. Các phổ của negletein (EW13)

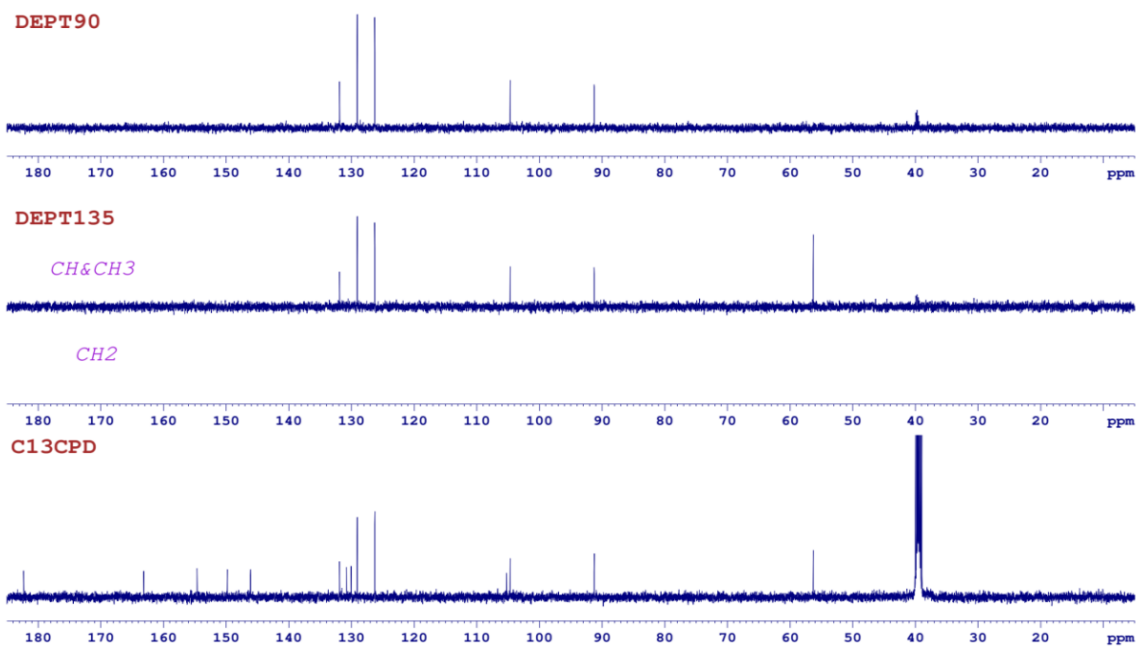


Phụ lục 13.1. Phổ ^1H -NMR của EW13

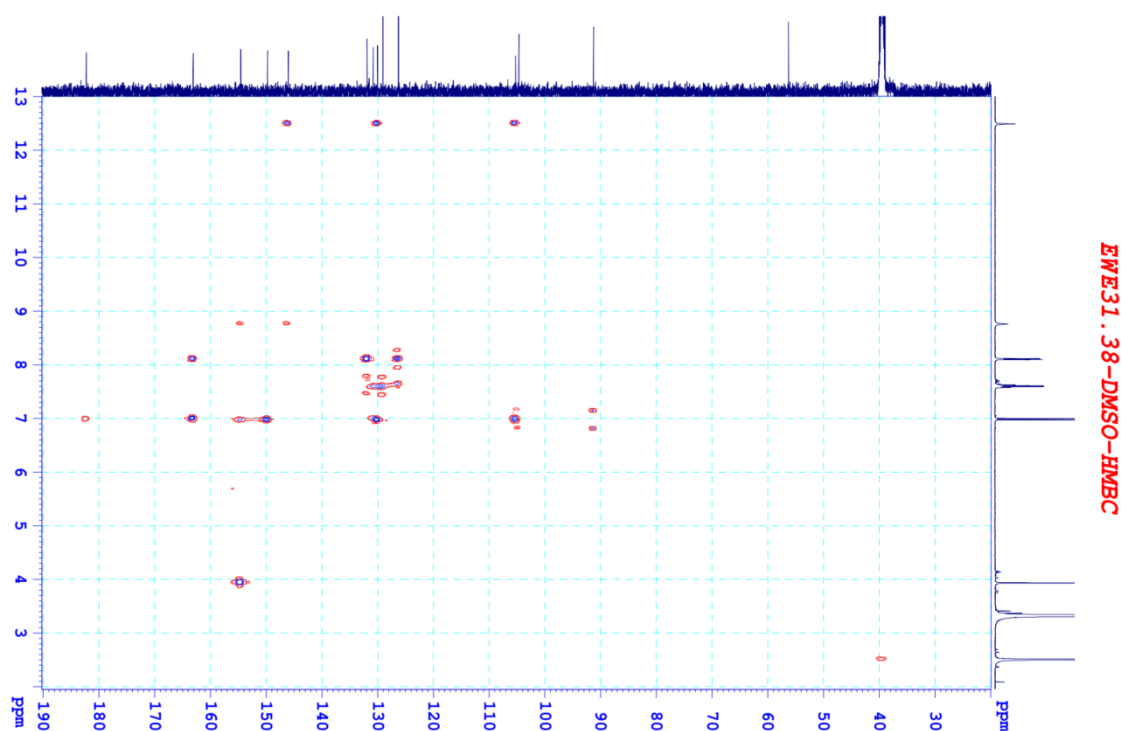


Phụ lục 13.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW13

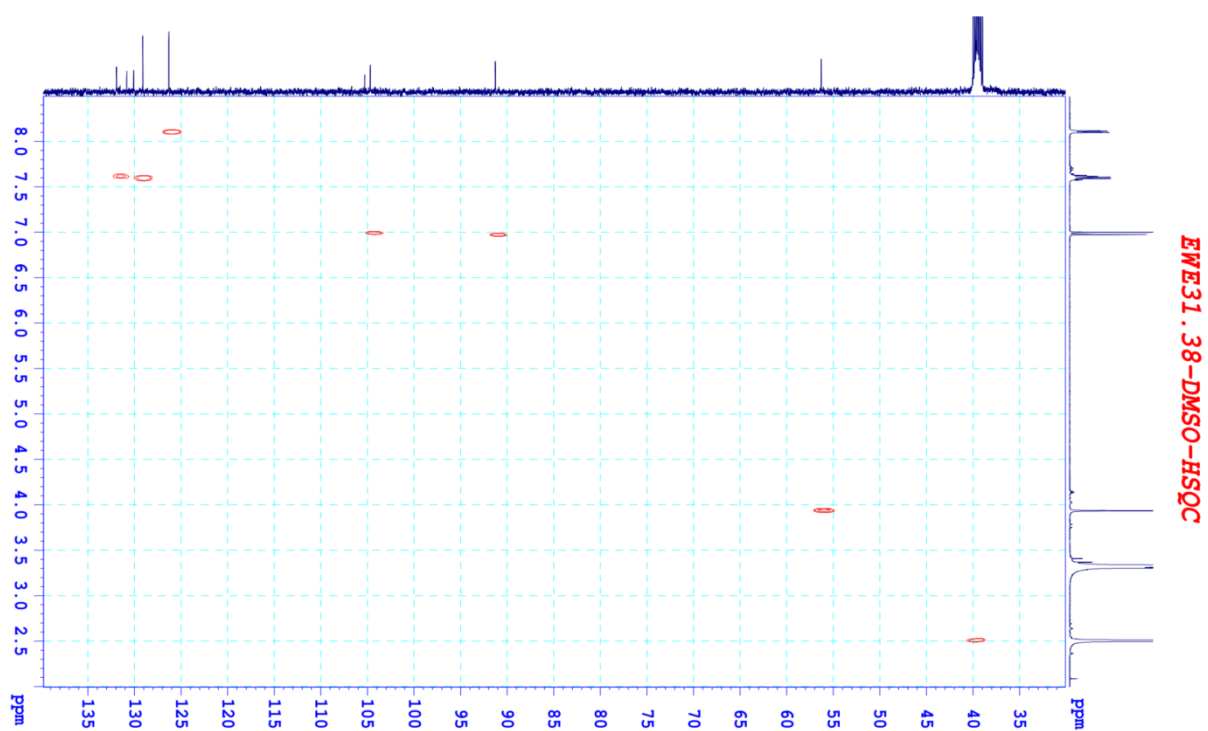
EWE31.38-DMSO-C13CPD&DEPT



Phụ lục 13.3. Phổ DEPT của EW13

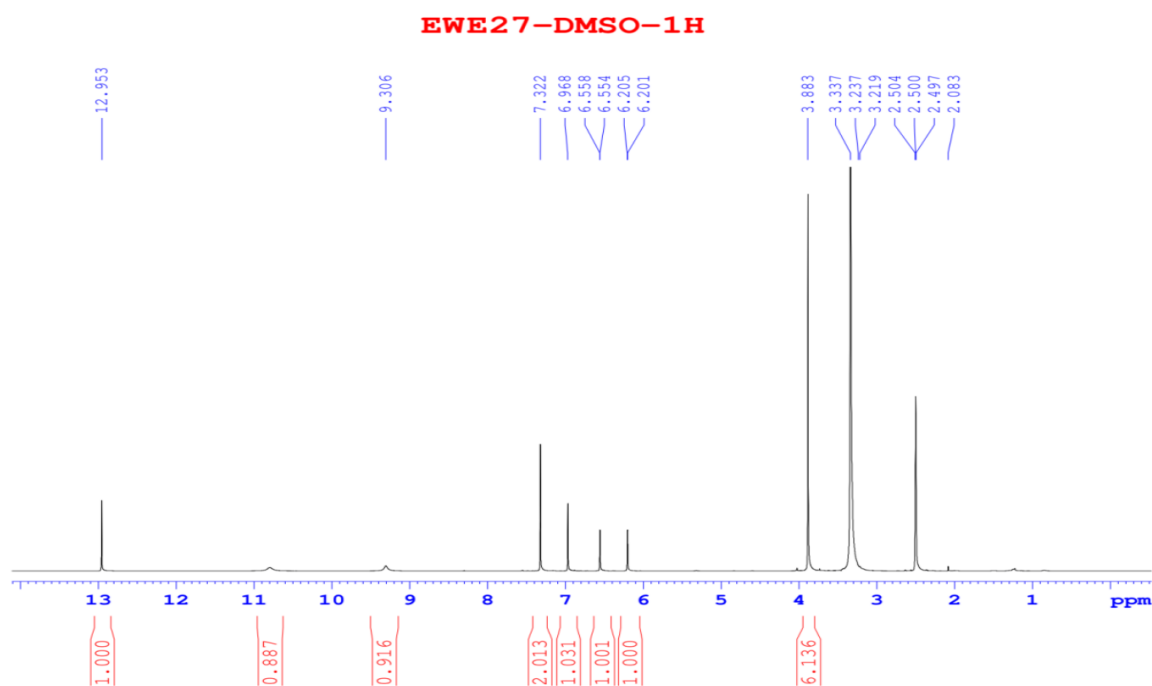


Phụ lục 13.4. Phổ HMBC của EW13

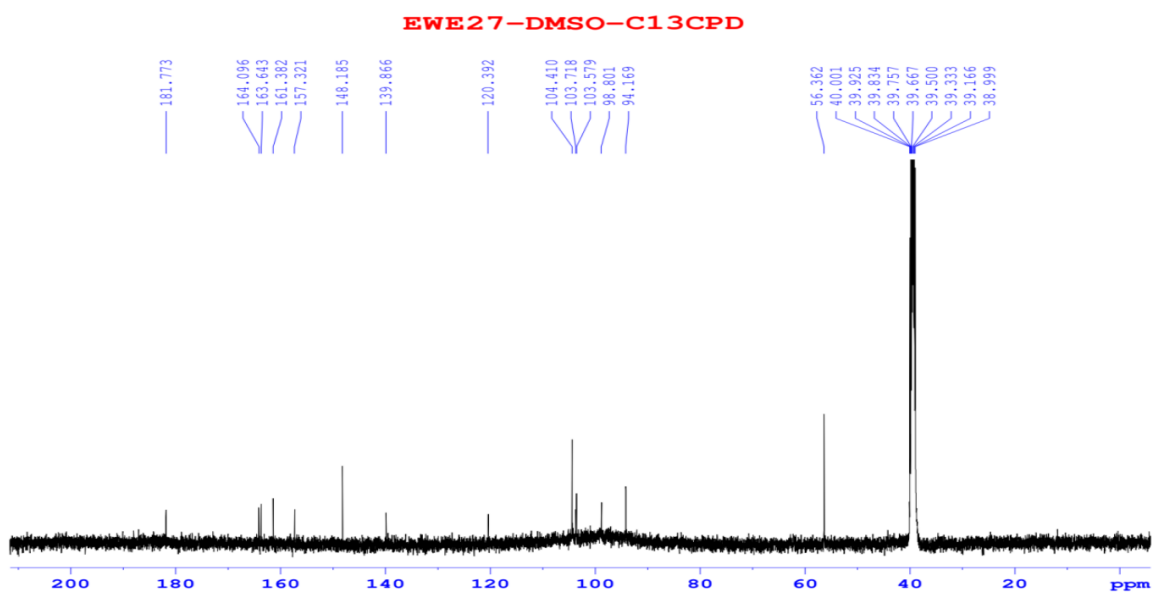


Phụ lục 13.5. Phổ HSQC của EW13

Phụ lục 14. Các phổ của tricin (EW15)



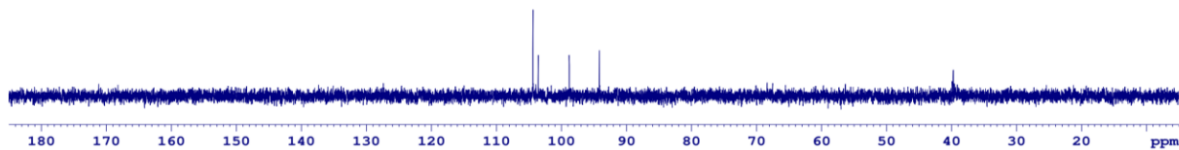
Phụ lục 14.1. Phổ ^1H -NMR của EW15



Phụ lục 14.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW15

EWE27-DMSO-C13CPD & DEPT

DEPT90



DEPT135

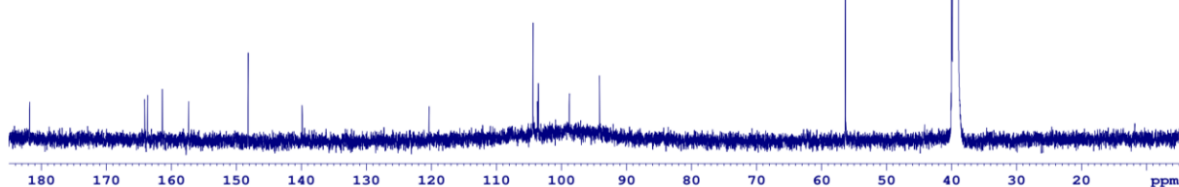
CH&CH3



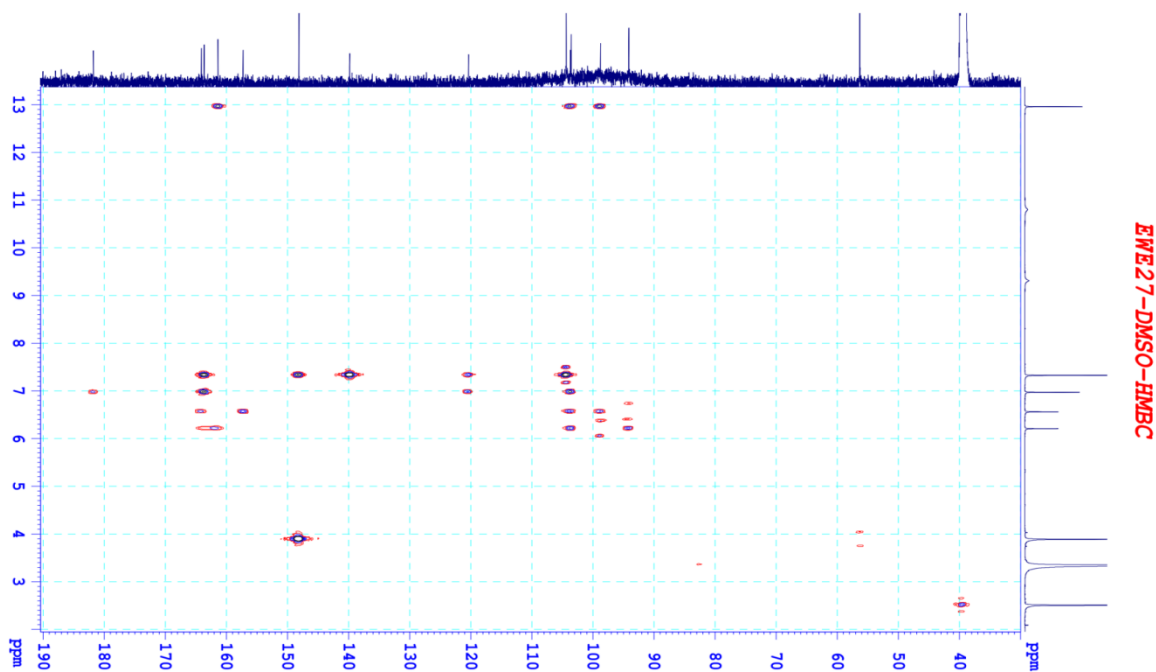
CH2



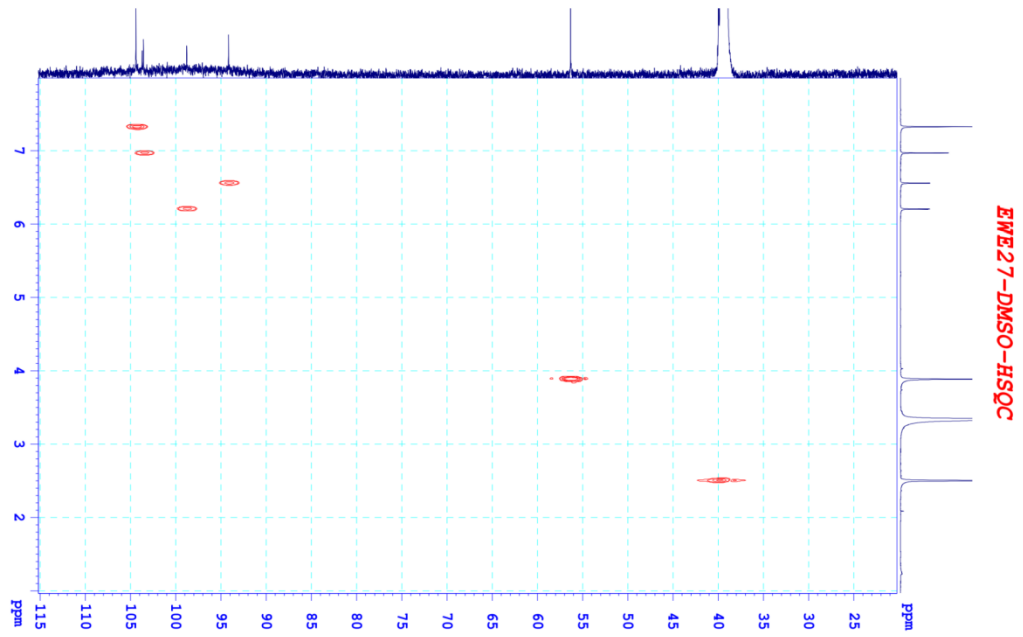
C13CPD



Phụ lục 14.3. Phổ DEPT của EW15

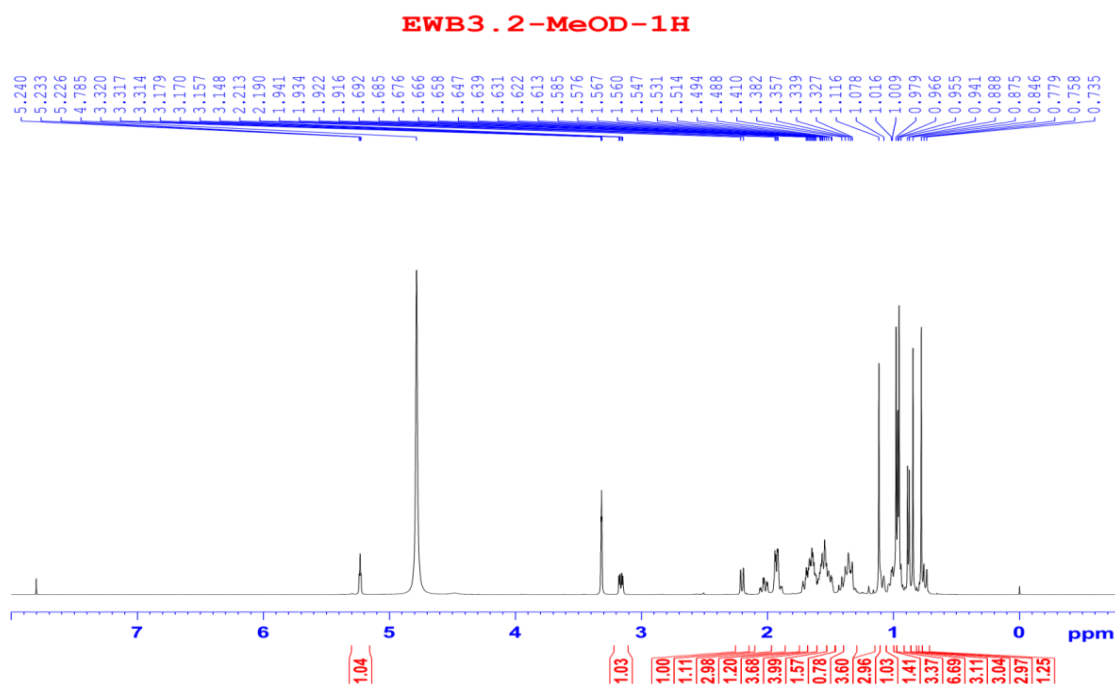


Phụ lục 14.4. Phổ HMBC của EW15

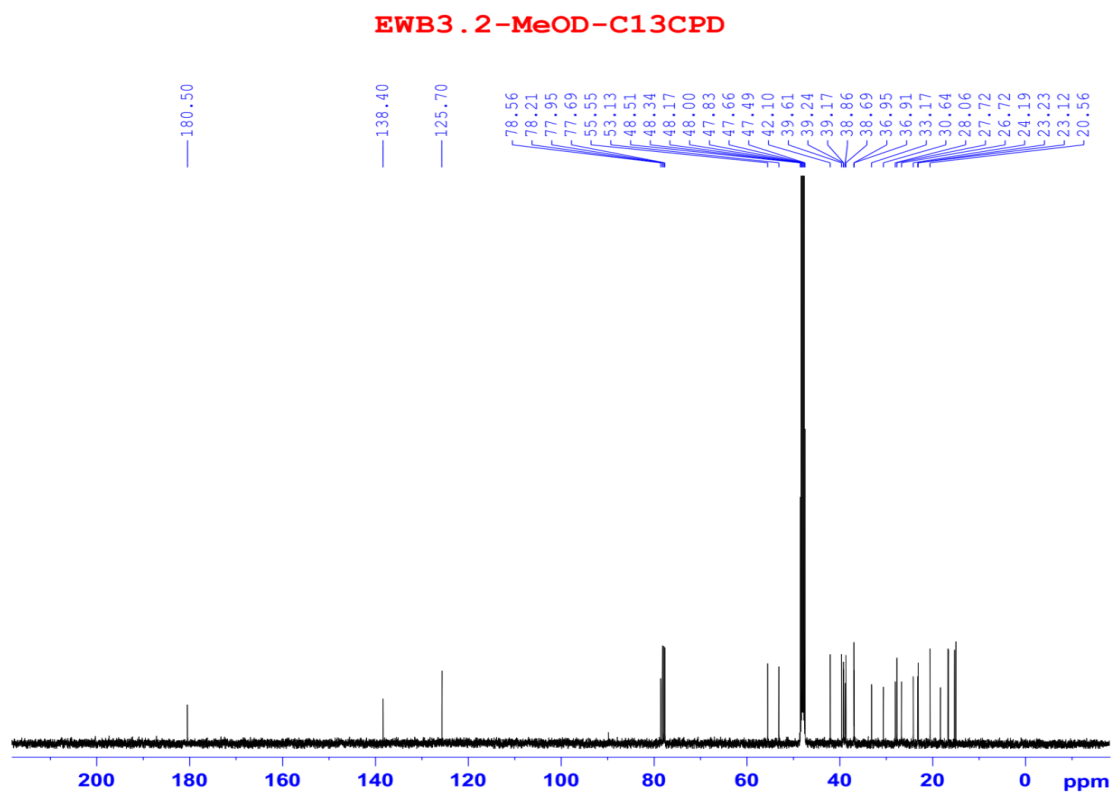


Phụ lục 14.5. Phổ HSQC của EW15

Phụ lục 15. Các phổ của chất ursolic acid (EW16)



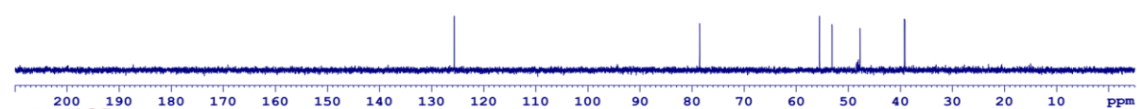
Phụ lục 15.1. Phổ ^1H -NMR của EW16



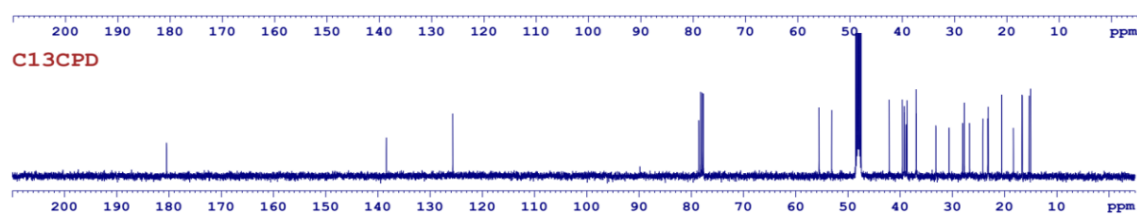
Phụ lục 15.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW16

EWB3.2-MeOD-C13CPD & DEPT

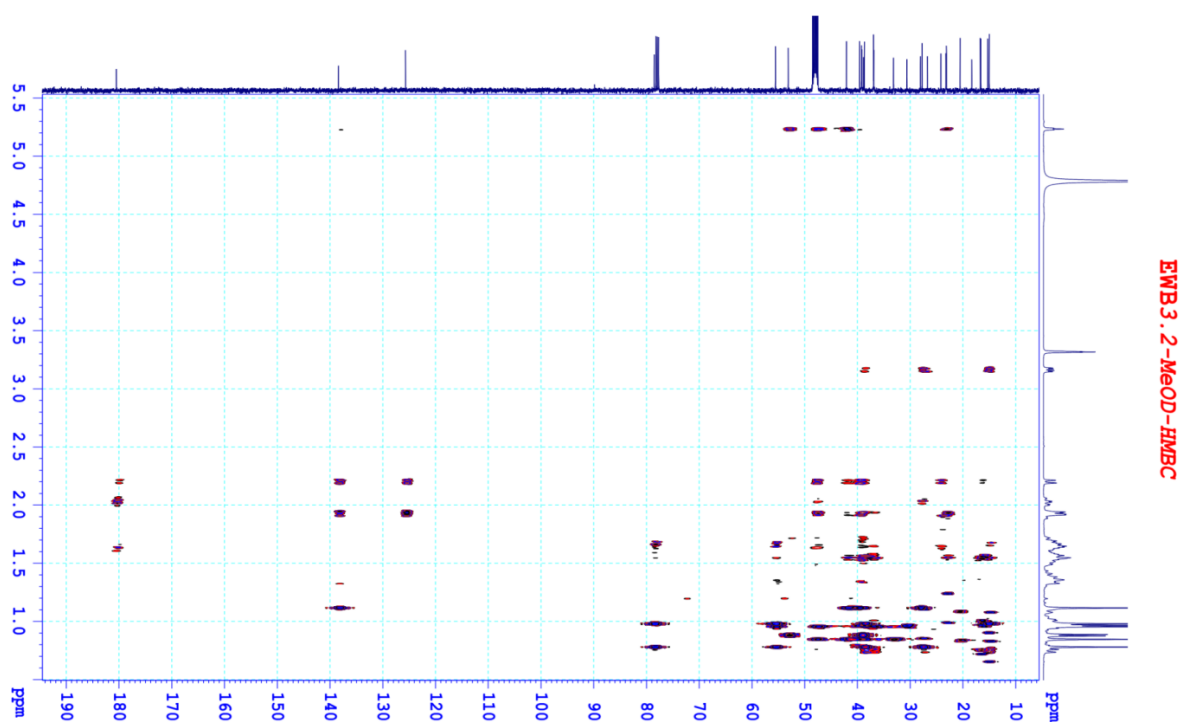
DEPT90



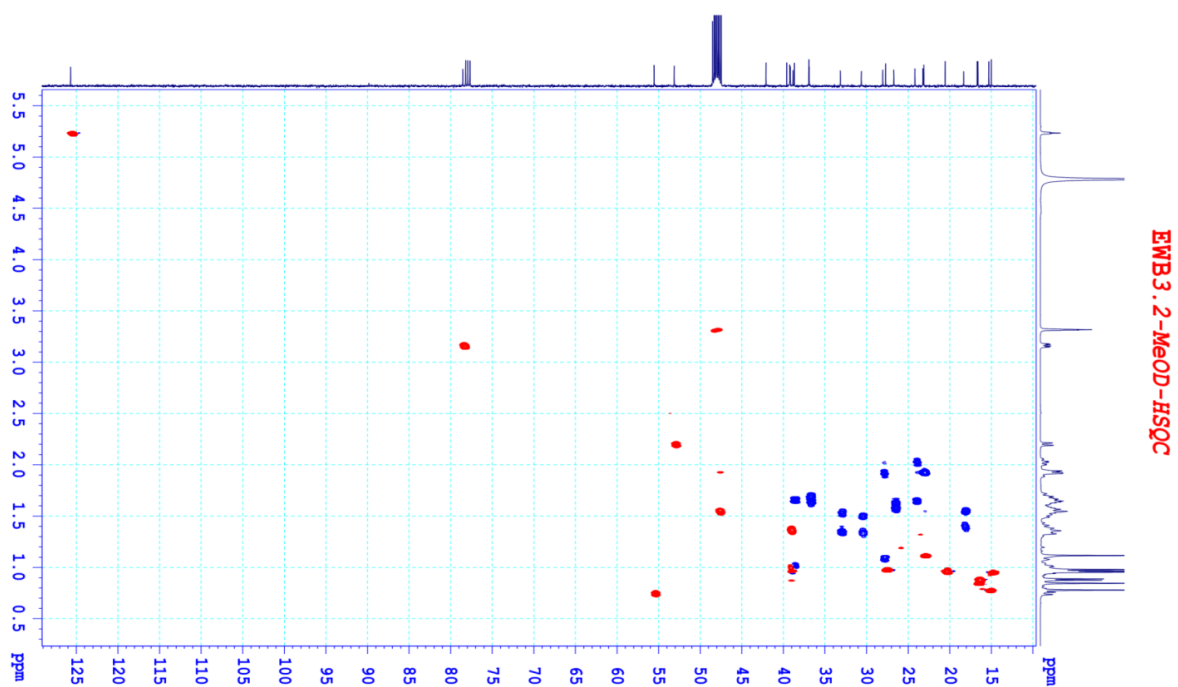
DEPT135



Phụ lục 15.3. Phổ DEPT của EW16

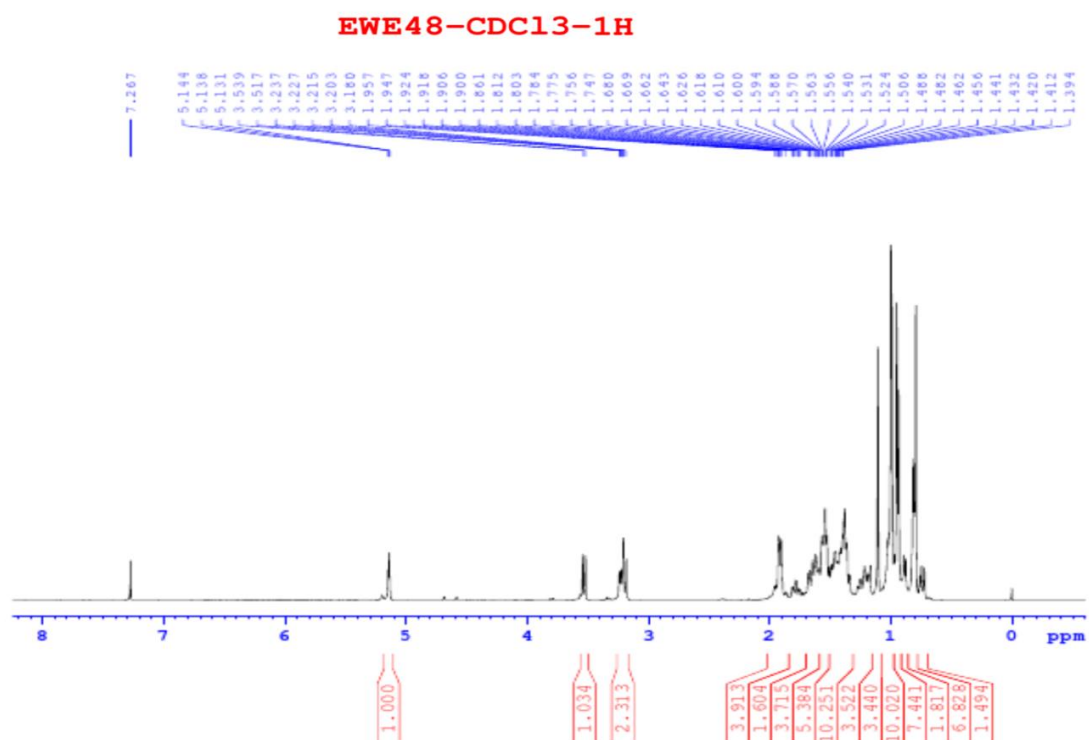


Phụ lục 15.4. Phổ HMBC của EW16

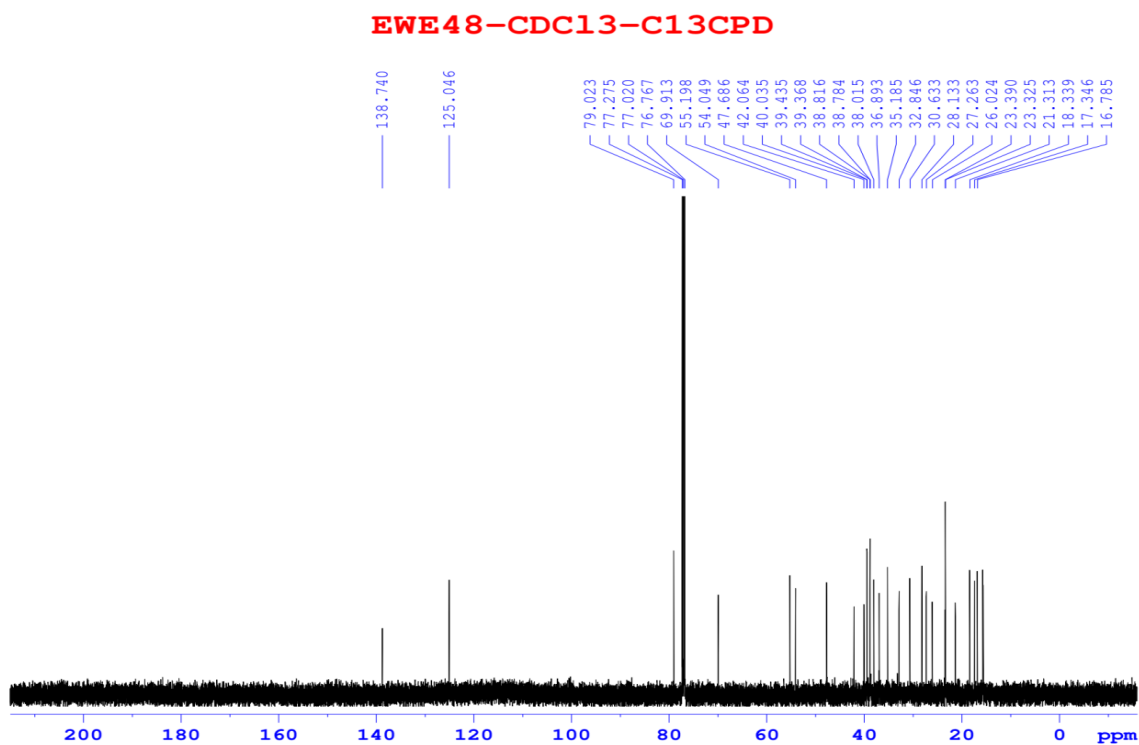


Phụ lục 15.5. Phổ HSQC của EW16

Phụ lục 16. Các phổ của uvaol (EW17)



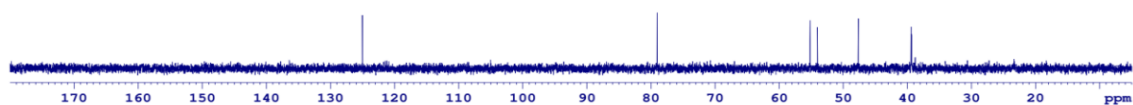
Phụ lục 16.1. Phổ ^1H -NMR của EW17



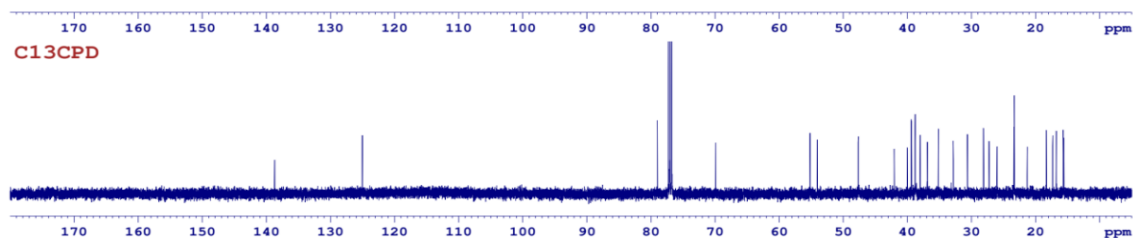
Phụ lục 16.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW17

EWE48-CDCl₃-C13CPD &DEPT

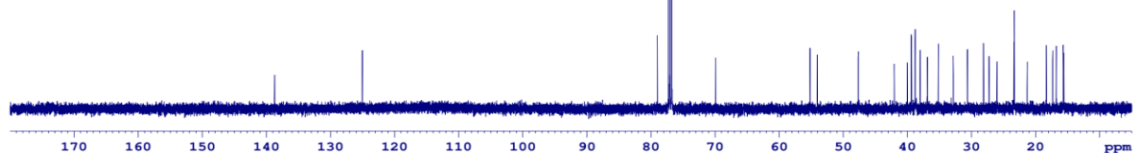
DEPT90



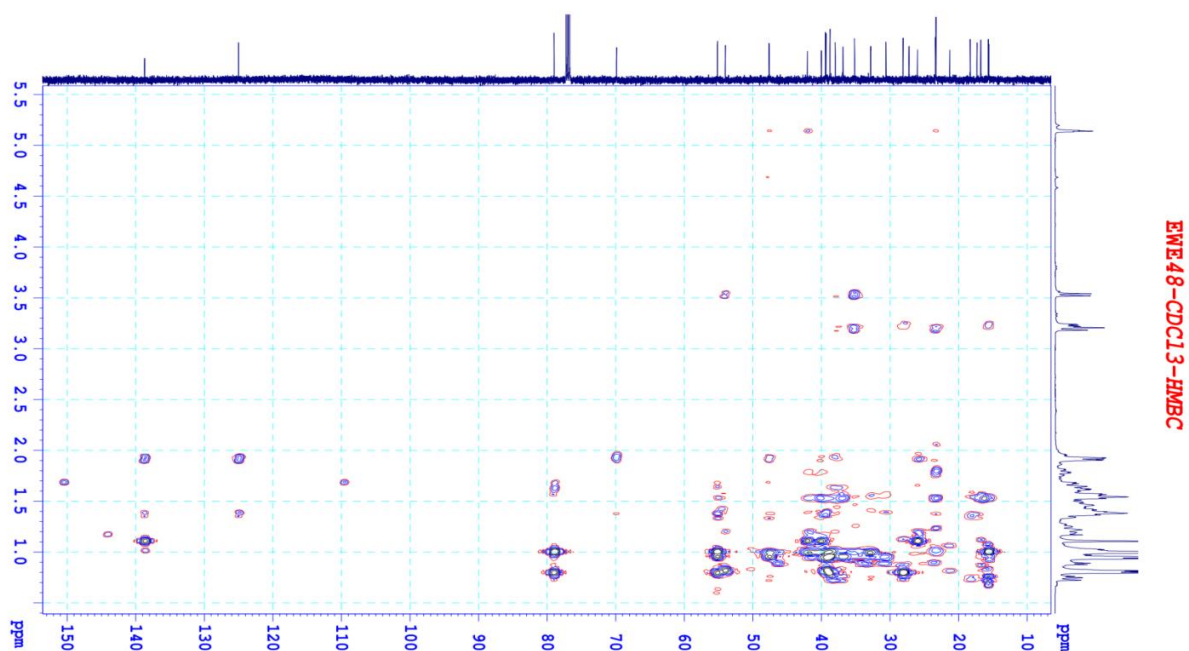
DEPT135

CH&CH₃CH₂

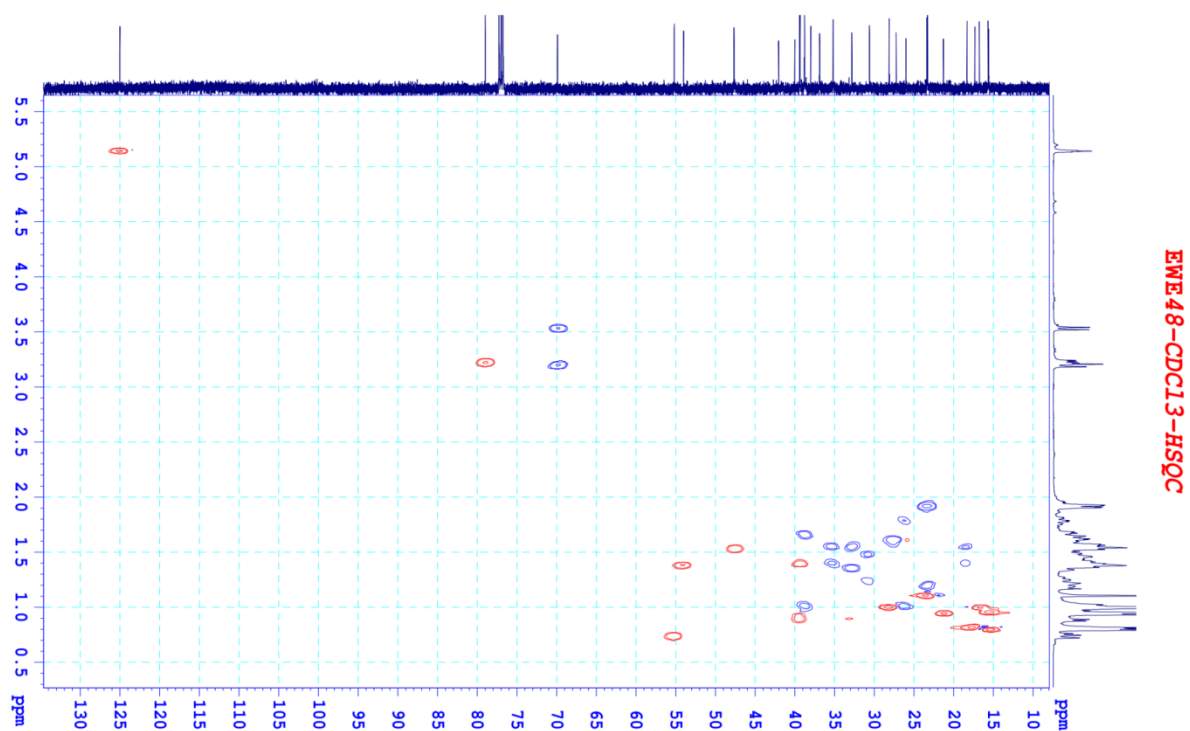
C13CPD



Phụ lục 16.3. Phổ DEPT của EW17

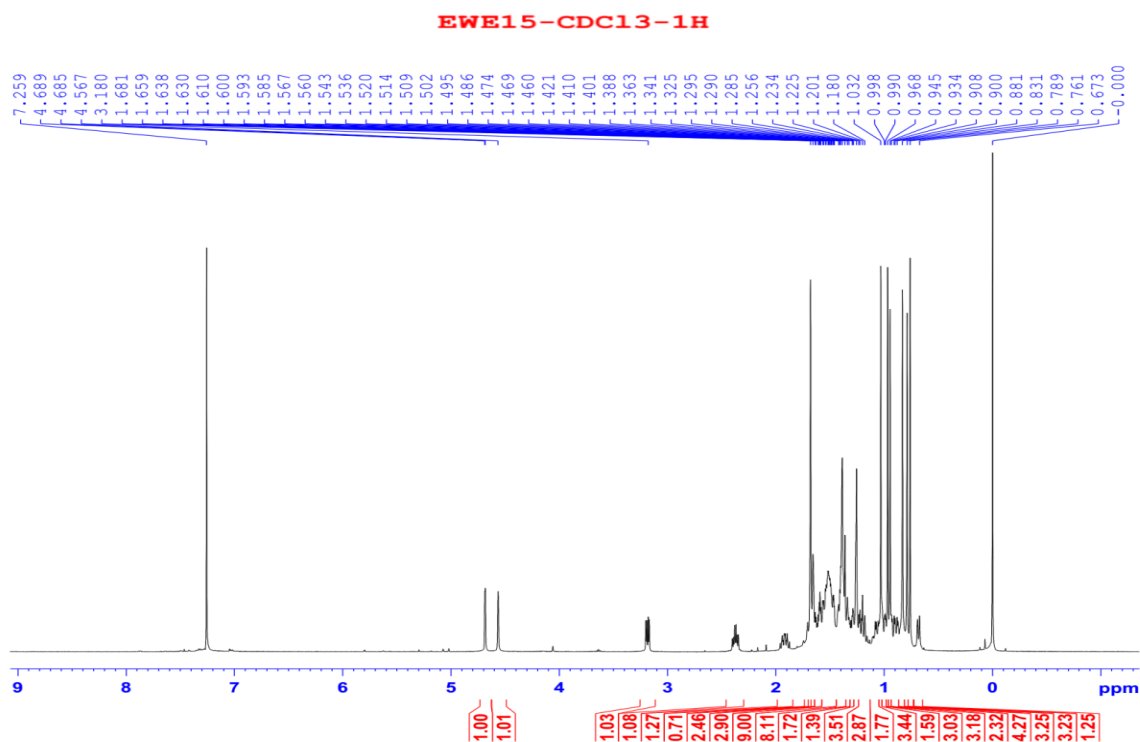


Phụ lục 16.4. Phổ HMBC của EW17

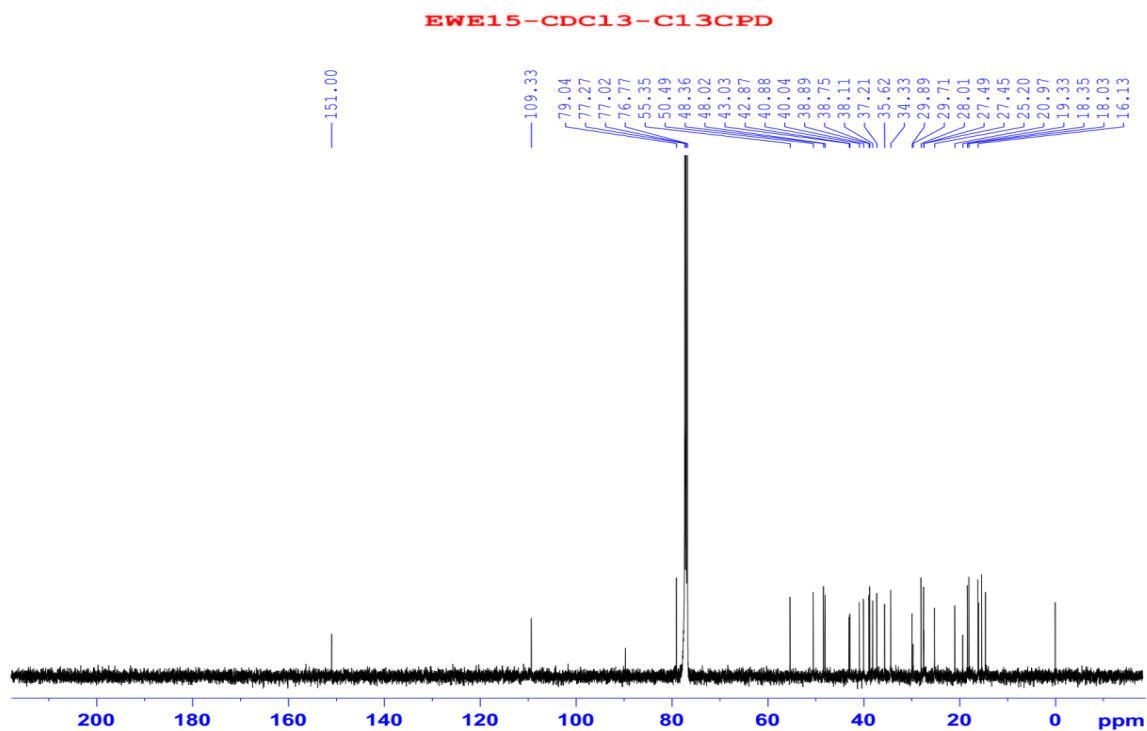


Phụ lục 16.5. Phổ HSQC của EW17

Phụ lục 17. Các phổ của lupeol (EW18)



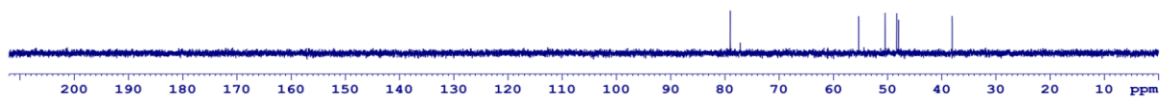
Phụ lục 17.1. Phổ ^1H -NMR của EW18



Phụ lục 17.2. Phổ ^{13}C -NMR của EW18

EWE15-CDC13-C13CPD&DEPT

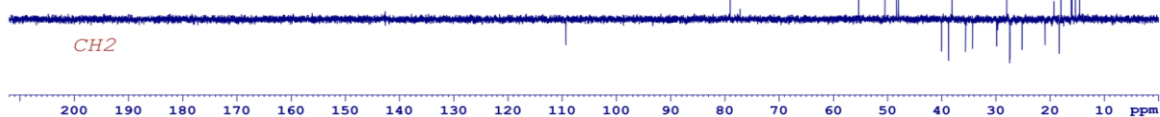
DEPT90



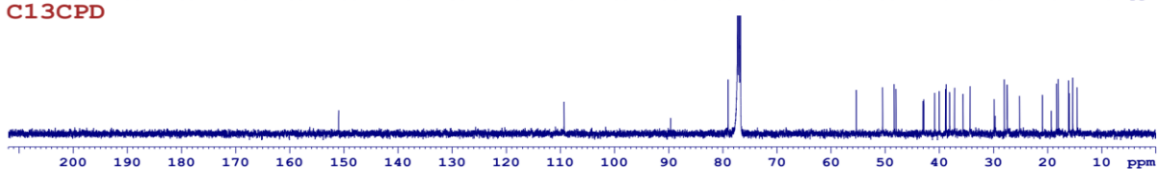
DEPT135

CH&CH3

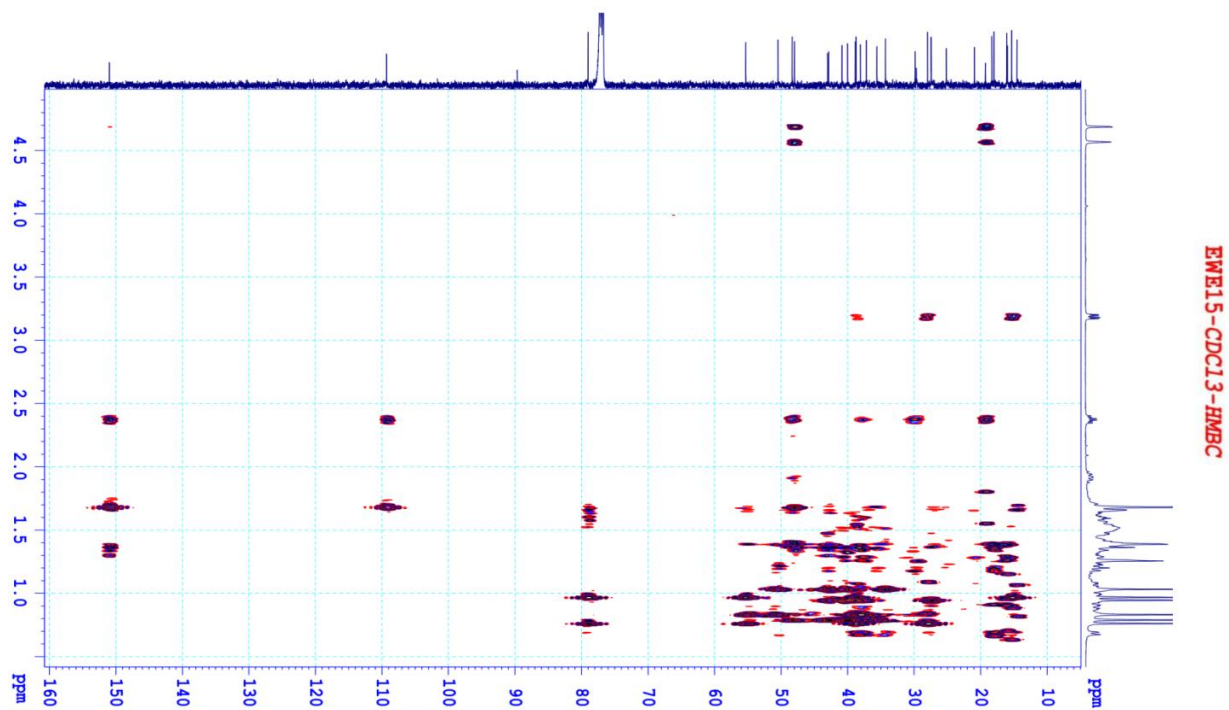
CH2



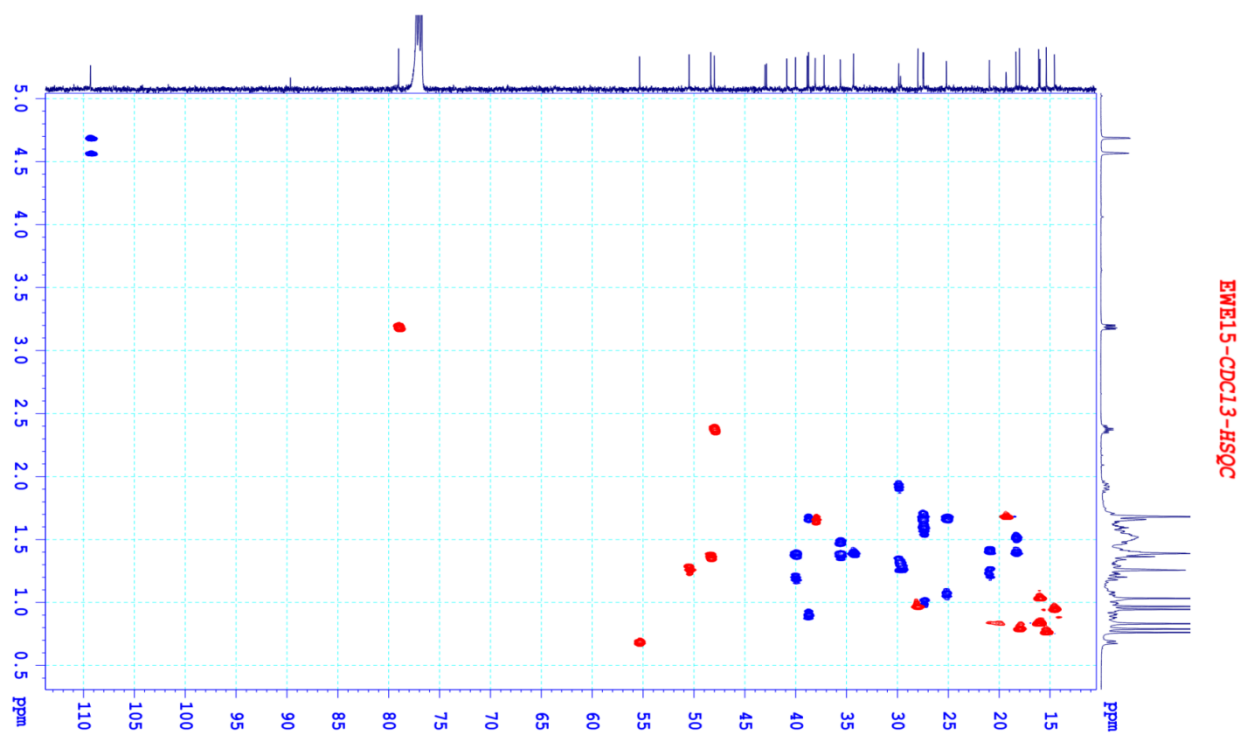
C13CPD



Phụ lục 17.3. Phổ DEPT của EW18

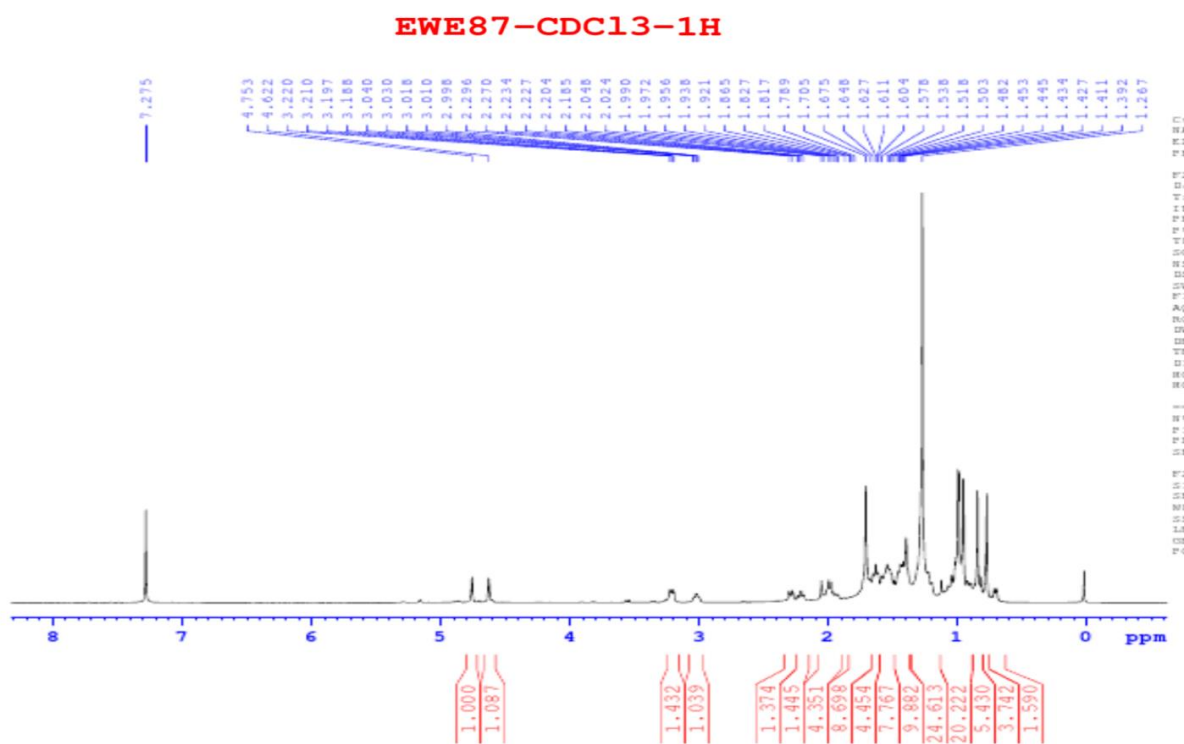


Phụ lục 17.4. Phổ HMBC của EW18



Phụ lục 17.5. Phổ HSQC của EW18

Phụ lục 18. Các phổ của betulinic acid



Phụ lục 18.1. Phổ ^1H -NMR của EW19