

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ



ĐINH THỊ TÚ

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, TINH CHẾ CURCUMIN VÀ BÁN
TỔNG HỢP CÁC DẪN XUẤT CỦA NÓ THEO ĐỊNH HƯỚNG
HOẠT TÍNH SINH HỌC *in vitro* VÀ *in silico* TỪ CÂY NGHỆ
VÀNG *Curcuma longa* L. VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

Hóa học các hợp chất thiên nhiên

Mã số: 9.44.01.17

HÀ NỘI - 2026

BỘ GIÁO DỤC
VÀ ĐÀO TẠO

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC
VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

HỌC VIỆN KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

ĐINH THỊ TÚ

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP, TINH CHẾ CURCUMIN VÀ BÁN
TỔNG HỢP CÁC DẪN XUẤT CỦA NÓ THEO ĐỊNH HƯỚNG
HOẠT TÍNH SINH HỌC *in vitro* VÀ *in silico* TỪ CÂY NGHỆ
VÀNG *Curcuma longa* L. VIỆT NAM**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ KHOA HỌC VẬT CHẤT

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)

PGS.TS. Phạm Minh Quân PGS.TS. Ngô Kim Chi

HÀ NỘI - 2026

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án: "Nghiên cứu phân lập, tinh chế curcumin và bán tổng hợp các dẫn xuất của nó theo định hướng hoạt tính sinh học *in vitro* và *in silico* từ cây nghệ vàng *Curcuma longa* L. Việt Nam" 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 2026

Tác giả luận án

(Ký và ghi rõ họ tên)

Đinh Thị Tú

LỜI CẢM ƠN

Luận án này được hoàn thành tại Viện Hóa học các Hợp chất thiên nhiên (nay là Viện Hoá học), Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong quá trình nghiên cứu, tác giả 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 và kính trọng nhất tới PGS.TS. Phạm Minh Quân và PGS.TS. Ngô Kim Chi là những người Thầy 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 GS.TS. Phạm Quốc Long đã luôn hỗ trợ tôi trong quá trình thực nghiệm cũng như đóng góp quý báu, giúp đỡ trong quá trình thực hiện và hoàn thiện 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 (nay là Viện Hoá học) đã nhiệt tình giúp đỡ và tạo mọi điều kiện cho tôi trong quá trình làm thực nghiệm và hoàn thành 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!

Tác giả luận án

(Ký và ghi rõ họ tên)

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ KÝ 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		
¹ H-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 ¹ H- ¹ H
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer	Phổ DEPT
ESI-MS	Electron Spray Ionization Mass Spectrometry	Phổ khối ion hóa phun mù điện tử
HR-ESI-MS	High Resolution - Electron Spray Ionization - Mass Spectrometry	Phổ khối phân giải cao ion hóa phun mù điện tử
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ tương tác dị hạt nhân qua nhiều liên kết
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ tương tác dị hạt nhân qua một liên kết
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy	Phổ NOESY
<i>J</i> (Hz)	Interactive constant in Hz	Hằng số tương tác tính bằng Hz
δ (ppm)	(ppm = part per million)	Độ dịch chuyển hóa học tính bằng phần triệu
Các dòng tế bào		
HeLa	Cervical cancer cells	Ung thư cổ tử cung

Hep-G2	Human hepatoma	Ung thư gan
HGC-27	Human Stomach carcinoma cell	Ung thư dạ dày
MCF-7	Human breast adenocarcinoma cells	Ung thư vú
RAW264.7		Đại thực bào chuột
Các curcuminoid		
CUR	(hoặc curcumin I)	Curcumin
DMC	(hoặc curcumin II)	Demethoxycurcumin
BDMC	(hoặc curcumin III)	Bisdemethoxycurcumin
Các kí hiệu khác		
CDK	Cyclin dependent kinase	Nhóm protein kinase serine/threonine
DFT	Density Functional Theory	Hóa học tính toán lượng tử
ED ₅₀	Effective Dose at 50%	Liều gây chết hiệu quả
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50%	Nồng độ ức chế 50%
LD ₅₀	Lethal Dose 50	Liều độc cấp tính
MIC	Inhibitory Concentration	Nồng độ ức chế tối thiểu
MD	Molecular Dynamics	Mô phỏng động lực học phân tử
NCE	New Chemical Entities	Thực thể hóa học mới
NCI	Nitional Cancer Institute	Viện Ung thư Quốc gia Hoa kỳ
TMS	Tetrametyl Silan	Chất chuẩn nội
SI	Selectivity Index	Độ chọn lọc, được tính bằng tỉ số IC ₅₀ /MIC
δ_H	Proton chemical shift	Độ chuyển dịch hóa học của proton
δ_C	Carbon chemical shift	Độ chuyển dịch hóa học của cacbon

Ghi chú: Tên các hợp chất, lớp chất, nhóm thế, chức hóa học được viết theo nguyên bản Tiếng Anh để đảm bảo tính thống nhất và chính xác.

MỤC LỤC

LỜI CẢM ƠN

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CÁC CHỮ KÝ VIẾT TẮT

MỞ ĐẦU	1
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN	6
1.1. Tổng quan về các thực vật chi Nghệ (<i>Curcuma L.</i>)	6
1.1.1. Đa dạng sinh học và vị trí trong y học cổ truyền	6
1.1.2. Giá trị dinh dưỡng và dược thực phẩm	6
1.1.3. Ứng dụng dược lý đặc hiệu của các loài đại diện	7
1.1.4. Tầm quan trọng kinh tế và văn hóa trên toàn cầu	8
1.1.5. Cơ sở hoạt tính từ thành phần hóa thực vật	8
1.2. Tổng quan về cây nghệ vàng (<i>Curcuma longa</i>)	9
1.2.1. Đặc điểm thực vật và công dụng.....	9
1.2.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới.....	12
1.2.3. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam	15
1.2.4. Tuyển trùng ký sinh trên cây dược liệu và cây nghệ vàng	16
1.2.5. Thành phần hóa học của thân rễ nghệ vàng.....	19
1.2.6. Hoạt tính sinh học	25
1.3. Cấu trúc hóa học và tính chất lý hóa của hệ curcuminoid	28
1.3.1. Đặc điểm cấu trúc phân tử và hiệu ứng nhóm thế	28
1.3.2. Cân bằng hỗ biến và tính chất điện tử.....	30
1.3.3. Nhiệt động học và độ bền cấu trúc	31
1.4. Bán tổng hợp dẫn xuất curcuminoid	33
1.4.1. Tổng hợp toàn phần để chủ động nguồn nguyên liệu	33
1.4.2. Chiến lược bán tổng hợp và biến đổi cấu trúc	33
1.4.3. Cấu trúc, hoạt tính của zerumbone và tiềm năng lai hóa với curcumin	36
1.5. Tổng quan lĩnh vực mô phỏng <i>in silico</i> trong nghiên cứu curcuminoid ..	40
1.5.1. Ứng dụng Hóa học tính toán lượng tử trong giải mã cơ chế chống oxy hóa.....	40
1.5.2. Sàng lọc ảo molecular docking tương tác thuốc đích	42
1.5.3. Mô phỏng động lực học phân tử (MD simulation)	44

CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU VÀ THỰC NGHIỆM	46
2.1. Đối tượng nghiên cứu	46
2.2. Phương pháp chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hoá học curcuminoid.....	46
2.2.1. Phương pháp xử lý và chiết mẫu	46
2.2.2. Phương pháp phân tích, phân lập các hợp chất.....	47
2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học	47
2.2.4. Phân lập các hợp chất curcuminoid từ củ nghệ	48
2.3. Phương pháp bán tổng hợp tạo các dẫn xuất curcumin	49
2.3.1. Tạo các dẫn xuất curcumin-zerumbone	49
2.3.2. Tạo các dẫn xuất di-propargyl curcumin	51
2.4. Các phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học <i>in vitro</i>.....	52
2.4.1. Thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa (Phương pháp DPPH).....	52
2.4.2. Thử nghiệm hoạt tính kháng viêm <i>in vitro</i> (Ức chế sản sinh NO)....	53
2.4.3. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào <i>in vitro</i> (Phương pháp MTT).53	
2.4.4. Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm <i>in vitro</i> (Xác định MIC)	54
2.5. Phương pháp phân lập và định danh tuyến trùng.....	55
2.5.1. Phương pháp phân lập	55
2.5.2. Đặc điểm hình thái	55
2.5.3. Đặc điểm sinh học phân tử.....	56
2.5.4. Phân tích thành phần của nghệ liên quan đến nhiễm tuyến trùng.57	
2.6. Phương pháp nghiên cứu mô phỏng <i>in silico</i>	58
2.6.1. Mô phỏng dự đoán hoạt tính dọn dẹp gốc tự do HOO· [142, 143]	58
2.6.2. Mô phỏng dự đoán cơ chế hoạt tính chống viêm [143, 144]	59
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	63
3.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất curcuminoid	63
3.1.1. Hợp chất curcumin (CUR).....	63
3.1.2. Hợp chất demethoxycurcumin (DMC)	64
3.1.3. Hợp chất bisdemethoxycurcumin (BDMC).....	66
3.2. Tuyến trùng mới <i>Scutellonema curcumae</i> sp. n. (Nematoda: Hoplolaimidae) và tác động của nó đến thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của nghệ	68

3.2.1. Phân loại học, đặc điểm phân tử và sinh thái của loài <i>Scutellonema curcumae</i> sp. n.	68
3.2.2. Sự biến đổi hàm lượng curcuminoid do ảnh hưởng từ tuyến trùng	73
3.3. Bán tổng hợp các dẫn xuất curcumin phân lập từ củ nghệ	77
3.3.1. Bán tổng hợp curcumin-zerumbone.....	78
3.3.2. Bán tổng hợp di-propargyl curcumin.....	80
3.3.3. Đánh giá hoạt tính chống viêm của các dẫn xuất curcumin	82
3.3.4. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các dẫn xuất curcumin.....	84
3.3.5. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của các dẫn xuất curcumin	86
3.4. Mô phỏng dự đoán hoạt tính quét gốc tự do HOO• của curcuminoid	88
3.5. Mô phỏng dự đoán cơ chế ức chế tiềm năng đối với phức hợp protein TLR4/MD-2 của curcuminoid	102
3.5.1. Mô phỏng lắp ghép phân tử	102
3.5.2. Nghiên cứu mô phỏng động lực học phân tử	104
3.5.3. Đánh giá theo quy tắc Lipinski và ADMET	106
3.5.4. Hoạt tính kháng viêm <i>in vitro</i>	107
KẾT LUẬN.....	110
KIẾN NGHỊ.....	112
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	114
TÀI LIỆU THAM KHẢO	115

DANH MỤC BẢNG

<i>Bảng 1.2.</i> Các hợp chất phân lập được từ <i>C. longa</i>	21
<i>Bảng 1.3.</i> Các hợp chất khác phân lập được từ <i>C. longa</i>	24
<i>Bảng 3.1.</i> Bảng dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của CUR	64
<i>Bảng 3.2.</i> Bảng dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của DMC	65
<i>Bảng 3.3.</i> Bảng dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của BDMC.....	66
<i>Bảng 3.4.</i> Tính chất lý hóa của đất, loại đất và mật độ quần thể tuyến trùng tại các khu vực trồng nghệ (<i>C. longa</i>) ở Kon Tum, Việt Nam	73
<i>Bảng 3.5.</i> Thành phần hóa thực vật và hoạt tính sinh học của thân rễ nghệ liên quan đến sự nhiễm tuyến trùng.....	74
<i>Bảng 3.6.</i> Phân tích hồi quy tuyến tính ảnh hưởng của mật độ <i>Scutellonema curcumae</i> sp. n. (trong rễ và đất) đến thành phần hóa học và hoạt tính sinh học	75
<i>Bảng 3.7.</i> Hoạt tính ức chế sản sinh NO và tỷ lệ sống sót của tế bào RAW 264.7 khi xử lý với curcumin và các dẫn xuất.....	83
<i>Bảng 3.8.</i> Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) của curcumin và các dẫn xuất tổng hợp trên 5 dòng tế bào ung thư	84
<i>Bảng 3.9.</i> Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của curcumin và các dẫn xuất, nồng độ mẫu.....	87
<i>Bảng 3.10.</i> Các thông số nhiệt hóa nội tại (BDE, PA và IP) của các tautomer diketone và keto-enol thuộc CUR và BDMC trong môi trường nước và PEA (đơn vị: kJ mol^{-1})	93
<i>Bảng 3.11.</i> Thông số động học và nhiệt động học của phản ứng giữa gốc $\text{HOO}\cdot$ và các dạng tồn tại của tautomer keto-enol CUR trong môi trường nước và PEA tại 298 K	96
<i>Bảng 3.12.</i> Thông số động học và nhiệt động học của phản ứng giữa gốc $\text{HOO}\cdot$ và các dạng tồn tại của tautomer keto-enol BDMC trong môi trường nước và PEA tại 298 K	98

<i>Bảng 3.13.</i> Hằng số tốc độ biểu kiến (k_{app}), hằng số tốc độ hiệu chỉnh phân số mol (k_{MF}) và tỷ lệ phân nhánh (Γ) tổng thể của CUR và BDMC trong môi trường nước và PEA tại 298 K	101
<i>Bảng 3.14.</i> Phân tích cấu hình electron tự nhiên (NEC) của nguyên tử hydrogen (H), trung tâm cho (DH) và trung tâm nhận (AH) tại trạng thái chuyển tiếp của các phản ứng tách hydrogen ưu thế trong nước	101
<i>Bảng 3.15.</i> Năng lượng liên kết tự do và các amino acid của phức hợp TLR4/MD-2 tham gia liên kết với curcuminoid.....	102
<i>Bảng 3.16.</i> Chỉ số ADMET và dự đoán độc tính của các chất tiềm năng	107
<i>Bảng 3.17.</i> Khả năng ức chế sản xuất NO của các curcuminoid	108

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cây nghệ vàng (<i>C. longa</i>)	10
Hình 1.2. Cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập được từ <i>C. longa</i>	21
Hình 1.3. Cấu trúc hóa học các hợp chất khác phân lập được từ <i>C. longa</i>	24
Hình 1.4. Cấu trúc khung 1,7-diarylheptanoid và vị trí nhóm mang màu đặc trưng	29
Hình 1.5. So sánh cấu trúc hóa học và sự phân bố nhóm thế methoxy của ba dẫn xuất chính: CUR, DMC và BDMC	30
Hình 1.6. Cân bằng hồ biến keto-enol và cơ chế bền hóa cấu trúc dạng enol thông qua liên kết hydro nội phân tử	31
Hình 1.7. Cấu trúc hóa học của zerumbone	37
Hình 2.1. Mẫu củ nghệ (<i>C. longa</i> L.)	46
Hình 2.2. Sơ đồ thu nhận các dịch chiết từ củ nghệ	49
Hình 3.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H→C) của CUR	63
Hình 3.2. Cấu trúc hóa học của DMC	65
Hình 3.3. Cấu trúc hóa học của BDMC	66
Hình 3.4. Các cá thể cái của loài <i>Scutellonema curcumae</i> sp. n. từ Việt Nam.	69
Hình 3.5. Cây phát sinh chủng loại Bayes được xây dựng sử dụng các trình tự ITS của các loài <i>Scutellonema</i> theo mô hình GTR+G+I. Trình tự của loài <i>Scutellonema curcumae</i> sp. n. được biểu thị bằng chữ in đậm và màu đỏ	70
Hình 3.6. Cây phát sinh chủng loại Bayes được xây dựng sử dụng các trình tự D2-D3 của các loài <i>Scutellonema</i> theo mô hình GTR+G+I. Trình tự của loài <i>Scutellonema curcumae</i> sp. n. được biểu thị bằng chữ in đậm và màu đỏ	71
Hình 3.7. Cây phát sinh chủng loại Bayes được xây dựng sử dụng các trình tự COI của các loài <i>Scutellonema</i> theo mô hình GTR+G+I. Trình tự của loài <i>Scutellonema curcumae</i> sp. n. được biểu thị bằng chữ in đậm và màu đỏ.	72
Hình 3.8. Tổng hợp các dẫn xuất curcumin-zerumbone	78

<i>Hình 3.9.</i> Tổng hợp các dẫn xuất curcumin-zerumbone giai đoạn 1	79
<i>Hình 3.10.</i> Tổng hợp các dẫn xuất curcumin-zerumbone giai đoạn 2	79
<i>Hình 3.11.</i> Tổng hợp dẫn xuất di-propargyl curcumin	81
<i>Hình 3.12.</i> Cấu trúc hình học tối ưu, orbital biên (HOMO, LUMO) và bản đồ thế điện tĩnh (ESP) của các tautomer diketone và keto–enol thuộc CUR (A) và BDMC (B) trong môi trường nước.	92
<i>Hình 3.13.</i> Giảm đồ enthalpy tương đối hiệu chỉnh năng lượng điểm không (ZPE) tại 0 K (ΔH_{0K}) của các quá trình tách hydrogen (Abs) và cộng gốc (Add) giữa CUR và gốc tự do HOO• trong môi trường nước và PEA.	94
<i>Hình 3.14.</i> Giảm đồ enthalpy tương đối hiệu chỉnh năng lượng điểm không (ZPE) tại 0 K (ΔH_{0K}) của các quá trình tách hydrogen (Abs) và cộng gốc (Add) giữa BDMC và gốc tự do HOO• trong môi trường nước và PEA.	95
<i>Hình 3.15.</i> Diễn biến mật độ spin, điện tích NPA của trung tâm cho (DH), hydrogen chuyển dịch (H), trung tâm nhận (AH) dọc theo tọa độ phản ứng nội tại (IRC) và hình ảnh orbital SOMO tại trạng thái chuyển tiếp (TS) của các phản ứng PCET ưu thế trong pha nước.	100
<i>Hình 3.16.</i> Cấu hình liên kết giữa CUR và BDMC với phức hợp protein TLR4/MD-2 dự đoán bởi AutoDock4. (A) Hình ảnh liên kết của các hợp chất nghiên cứu với bề mặt protein TLR4, liền kề với bề mặt tiếp xúc của chúng với protein MD-2: CUR-màu đỏ, BDMC-màu vàng; (B) Cấu hình liên kết của CUR; (C) Cấu hình liên kết của BDMC.	103
<i>Hình 3.17.</i> Biến thiên RMSD theo thời gian tính cho toàn bộ nguyên tử của TLR4/MD-2 với CUR (A) và BDMC (B) qua 3 lần mô phỏng MD độc lập trong thời gian 50ns.	105
<i>Hình 3.18.</i> Cấu hình liên kết được tinh chỉnh bằng MD giữa CUR (A) và BDMC (B) với phức hợp TLR4/MD-2 thu được bằng phương pháp phân cụm từ các ảnh chụp ở trạng thái cân bằng của phức hệ với ngưỡng cắt 0.2 nm.	106

MỞ ĐẦU

Mặc dù đã là đối tượng của hàng nghìn công bố khoa học trong ba thập kỷ qua, curcumin là hoạt chất polyphenol chính từ thân rễ cây nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) vẫn chưa thể trở thành một dược chất lâm sàng thực thụ. Nghịch lý này bắt nguồn từ sinh khả dụng đường uống cực thấp của hợp chất, một hạn chế đã được xác nhận qua nhiều thử nghiệm lâm sàng giai đoạn I-II [1, 2]. Đồng thời, trong khi curcumin (CUR) nhận được sự quan tâm áp đảo, thì hệ curcuminoid trong tự nhiên thực chất là một phức hợp gồm ba hợp chất có cấu trúc liên quan: CUR, demethoxycurcumin (DMC) và bisdemethoxycurcumin (BDMC) trong đó vai trò sinh học riêng biệt của từng thành phần, vẫn chưa được làm rõ [3, 4].

Nghệ vàng là một trong những dược liệu được sử dụng phổ biến nhất tại Việt Nam, với bề dày ứng dụng trong y học cổ truyền cho các mục đích kháng viêm, kháng khuẩn, kháng nấm, chống oxy hóa, bảo vệ gan và hỗ trợ tiêu hóa [5, 6]. Trong bối cảnh xu hướng nghiên cứu và phát triển các hoạt chất sinh học từ dược liệu truyền thống đang được thúc đẩy mạnh mẽ trên toàn cầu [7], việc khai thác khoa học nguồn curcuminoid Việt Nam đòi hỏi một cách tiếp cận hệ thống hơn, không chỉ dừng ở CUR mà cần mở rộng sang toàn bộ hệ phức hợp, điển hình là BDMC có thành phần có hàm lượng thấp nhất nhưng đang bộc lộ những đặc tính sinh học đáng chú ý.

Phần lớn các nghiên cứu trước đây và các chế phẩm thương mại hiện hành đều tập trung khai thác CUR hoặc sử dụng hỗn hợp curcuminoid chưa phân tách, dẫn đến việc chưa có đánh giá so sánh có hệ thống về hoạt tính sinh học của từng thành phần riêng biệt trên cùng một bộ thử nghiệm [1, 2]. BDMC, mặc dù chỉ chiếm khoảng 2 - 5% tổng curcuminoid [3, 4], gần đây đã thu hút sự chú ý khi các dữ liệu mới cho thấy hợp chất này sở hữu ưu thế riêng: BDMC thể hiện khả năng cảm ứng apoptosis chọn lọc trên các dòng tế bào ung thư thông qua con đường Smad và Akt, đồng thời được đánh giá là có tiềm năng kháng u đáng chú ý trên nhiều mô hình thực nghiệm [8, 9]. Kết quả mô phỏng phân tử kết hợp thực nghiệm đã chỉ ra BDMC có tiềm năng ức chế enzyme iNOS và tương tác với phức hợp tín hiệu TLR4/MD-2 với ái lực cao hơn so với CUR và DMC [10]. Tuy nhiên, các dữ liệu này còn rời rạc và chưa được xác nhận trên một hệ thống đánh giá đầy đủ.

Song song với vấn đề đánh giá chưa đầy đủ các thành phần, bản thân CUR, hợp chất được nghiên cứu nhiều nhất, cũng đối mặt với những rào cản nghiêm trọng trên con đường phát triển thành dược chất. Sinh khả dụng đường uống cực thấp của CUR bắt nguồn từ hai vùng cấu trúc yếu điểm trên phân tử: (i) hệ liên hợp β -diketone ở trung tâm dễ bị cắt mạch theo cơ chế retro-aldol ở pH kiềm và bị khử bởi enzyme chuyển hóa pha I (tạo dihydro-, tetrahydro-, hexahydrocurcumin); (ii) các nhóm hydroxyl (-OH) phenolic trên vòng thơm là đích tấn công của enzyme chuyển hóa pha II (glucuronid hóa, sulfat hóa), khiến thuốc bị đào thải nhanh chóng [11, 12]. Thực trạng này là động lực chính thúc đẩy các nghiên cứu bán tổng hợp nhằm biến đổi cấu trúc curcumin theo hướng khắc phục yếu điểm dược động học.

Một khía cạnh thực tiễn không thể tách rời trong nghiên cứu về curcuminoid là vấn đề chất lượng nguồn nguyên liệu. Trong quá trình khảo sát các vùng trồng nghệ tại Việt Nam nhằm lựa chọn nguồn nguyên liệu cho nghiên cứu, chúng tôi nhận thấy tình trạng nhiễm tuyến trùng ký sinh rễ (plant-parasitic nematodes) phổ biến trên các ruộng nghệ. Tại Việt Nam, thành phần loài tuyến trùng ký sinh trên rễ nghệ vàng chưa được điều tra có hệ thống và mối quan hệ giữa mức độ nhiễm tuyến trùng với hàm lượng từng thành phần curcuminoid riêng biệt (CUR, DMC, BDMC) chưa được khảo sát. Đây là nghiên cứu mang tính liên ngành giữa bảo vệ thực vật và hóa học dược liệu, nhưng có ý nghĩa trực tiếp đối với việc kiểm soát chất lượng nguồn nguyên liệu phục vụ chiết xuất và bán tổng hợp.

Để đánh giá toàn diện hoạt tính sinh học của các curcuminoid tinh khiết và các dẫn xuất bán tổng hợp, luận án kết hợp hai phương pháp tiếp cận bổ sung cho nhau: thử nghiệm *in vitro* và mô phỏng *in silico*. Các thử nghiệm *in vitro* cung cấp dữ liệu thực nghiệm về hiệu lực sinh học (chống oxy hóa, kháng viêm, gây độc tế bào ung thư, kháng vi sinh vật), trong khi mô phỏng docking phân tử và động lực học phân tử (molecular dynamics, MD) cho phép khảo sát cơ chế tương tác ở cấp độ nguyên tử giữa các hợp chất với đích phân tử cụ thể. Sự kết hợp này tạo nên bộ dữ liệu đa chiều cho phép phân tích quan hệ cấu trúc - hoạt tính (SAR) một cách có hệ thống.

Xuất phát từ các mục tiêu nghiên cứu trên, luận án được thực hiện với đề tài: "**Nghiên cứu phân lập, tinh chế curcumin và bán tổng hợp các dẫn xuất**

của nó theo định hướng hoạt tính sinh học in vitro và in silico từ cây nghệ vàng Curcuma longa L. Việt Nam"

Nội dung nghiên cứu:

Luận án tập trung nghiên cứu đi sâu đánh giá các hoạt tính cấp độ phân tử: chống oxy hóa, kháng viêm, kháng ung thư, kháng vi sinh vật, tuyến trùng... của các dạng cụ thể curcuminoid qua 5 nội dung chính sau:

1. Xây dựng quy trình phân lập, tách chiết riêng biệt các dạng curcuminoid (CUR, DMC và BDMC) từ nguyên liệu củ nghệ vàng *Curcuma longa* L. Việt Nam.
2. Đánh giá mối tương quan giữa mật độ tuyến trùng với hàm lượng và hoạt tính sinh học curcuminoid.
3. Bán tổng hợp và xác nhận cấu trúc các dẫn xuất mới: dẫn xuất lai hóa curcumin-zerumbone (curcumin-monozerumbone và curcumin-biszerumbone) và dẫn xuất di-propargyl curcumin và tìm hiểu hoạt tính sinh học của chúng.
4. Sàng lọc nghiên cứu cơ chế tác dụng các hoạt tính sinh học chính của ba curcuminoid tinh khiết (CUR, DMC và BDMC) thông qua mô phỏng *in silico* kết hợp thử nghiệm *in vitro*.
 - Hoạt tính chống oxy hóa (thông qua thử nghiệm DPPH và ABTS).
 - Hoạt tính kháng viêm và ức chế enzyme NOX (NADPH-oxidase)

Các đóng góp mới của Luận án:

1. Lần đầu phát hiện loài tuyến trùng mới *Scutellonema curcumae* sp. n. trên rễ nghệ vàng Việt Nam. Đã định lượng được: mẫu có mật độ nhiễm thấp cho hàm lượng bisdemethoxycurcumin tăng 3,5 lần so với mẫu nhiễm mật độ tuyến trùng cao nhất và hoạt tính chống oxy hóa cải thiện rõ rệt (SC_{50} giảm từ 43,62 xuống 13,85 $\mu\text{g/mL}$).

2. Bán tổng hợp thành công dẫn xuất lai hóa curcumin-monozerumbone (4) giúp tăng tính thân dầu (ClogP từ 3,72 lên 6,51) và mang lại hoạt tính sinh học cải thiện như kháng viêm: Tăng gấp 3,8 lần so với curcumin; độc tế bào ung thư gan (Hep-G2): Tăng gấp 2,5 lần; kháng vi sinh vật: Phổ tác dụng mở rộng, ức chế 6/8 chủng (curcumin chỉ đạt 2/8).

3. Kết hợp tính toán lượng tử (lý thuyết phiếm hàm mật độ) với mô phỏng lắp ghép phân tử và động lực học phân tử để làm rõ cơ chế tác dụng ở cấp độ phân tử. Tính toán lượng tử chỉ ra bisdemethoxycurcumin có hằng số tốc độ quét gốc HOO• trong môi trường lipid cao gấp 20 lần so với curcumin, chủ yếu qua cơ chế chuyển nguyên tử hydro. Mô phỏng động lực học phân tử khẳng định bisdemethoxycurcumin tạo phức hợp bền vững hơn với protein TLR4/MD-2 (năng lượng liên kết -9,73 so với -9,29 kcal/mol), nhất quán với kết quả ức chế nitric oxide thực nghiệm.

Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của luận án

Cơ sở và ý nghĩa khoa học:

Luận án cung cấp cơ sở khoa học vững chắc về tác động của áp lực sinh học (biotic stress) lên quá trình sinh tổng hợp các hợp chất thứ cấp ở thực vật. Đây là công trình đầu tiên tại Việt Nam công bố sự phát hiện loài tuyến trùng mới (*Scutellonema curcumae* sp. n.) và làm rõ cơ chế làm suy giảm hàm lượng bisdemethoxycurcumin (BDMC), từ đó chứng minh mối tương quan nghịch biến giữa mật độ tuyến trùng và chất lượng dược lý của củ nghệ.

Dựa trên nguyên lý "lai hóa phân tử" (molecular hybridization), luận án đã xây dựng được cơ sở khoa học cho việc biến đổi cấu trúc curcumin nhằm khắc phục các nhược điểm về độ ổn định và sinh khả dụng. Việc kết hợp phương pháp mô phỏng tính toán (*in silico*) và thực nghiệm sinh học (*in vitro*) đã làm sáng tỏ mối liên quan giữa cấu trúc và tác dụng sinh học (SAR), giải thích rõ cơ chế tương tác ở cấp độ phân tử của các dẫn xuất mới so với chất gốc.

Ý nghĩa thực tiễn:

Kết quả của luận án làm thay đổi quan điểm trong canh tác cây dược liệu: việc quản lý tuyến trùng không chỉ đơn thuần để bảo vệ năng suất (yield protection) mà còn là chiến lược can thiệp thiết yếu nhằm tối ưu hóa và bảo đảm hàm lượng hoạt chất curcuminoid (đặc biệt là BDMC) đạt chuẩn cho nguyên liệu y dược.

Các dẫn xuất lai hóa bán tổng hợp (điển hình như dẫn xuất Curcumin-Monozerumbone) thể hiện hoạt tính kháng viêm và gây độc tế bào (trên dòng HepG2 và A549) vượt trội so với curcumin nguyên bản. Đây là nguồn dữ liệu thực nghiệm quan trọng, cung cấp các "chất dẫn đường" (lead compounds) đầy

tiềm năng cho các nghiên cứu tiền lâm sàng nhằm phát triển các thuốc điều trị ung thư và kháng viêm thế hệ mới.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN

1.1. Tổng quan về các thực vật chi Nghệ (*Curcuma* L.)

1.1.1. Đa dạng sinh học và vị trí trong y học cổ truyền

Chi Nghệ (*Curcuma* L.) là một trong những chi lớn và quan trọng nhất thuộc họ Gừng (Zingiberaceae), gồm khoảng 80 - 100 loài thực vật thân thảo lâu năm có hệ thống thân rễ phát triển mạnh. Các loài thuộc chi *Curcuma* phân bố rộng khắp các vùng sinh thái nhiệt đới và cận nhiệt đới, trải dài từ Ấn Độ, Đông Nam Á đến khu vực Châu Á - Thái Bình Dương. Tại đây, chúng không chỉ sinh trưởng dưới dạng hoang dã mà còn được thuần hóa và canh tác quy mô lớn để phục vụ đời sống con người [13, 14].

Trong lịch sử y dược học, chi *Curcuma* giữ vị trí trung tâm trong các hệ thống y học cổ truyền lâu đời như Ayurveda (Ấn Độ), y học cổ truyền Trung Hoa và các nền y học bản địa Đông Nam Á. Thân rễ từ xa xưa đã được khai thác đa mục đích, vừa là chất chỉ thị màu tự nhiên, gia vị, chất bảo quản thực phẩm thiết yếu, vừa là dược liệu quý để điều trị đa dạng các bệnh lý như rối loạn tiêu hóa, bệnh gan mật, hô hấp và các tổn thương ngoài da [14].

Dưới nghiên cứu của khoa học hiện đại, các nghiên cứu hóa thực vật đã xác định thân rễ *Curcuma* là nguồn cung cấp đa dạng các chất chuyển hóa thứ cấp có giá trị, điển hình là nhóm diarylheptanoid (curcuminoid) và các hợp chất sesquiterpenoid trong tinh dầu. Những thành phần này đã được chứng minh qua thực nghiệm là sở hữu phổ hoạt tính sinh học rộng, bao gồm khả năng chống oxy hóa mạnh, kháng viêm, kháng khuẩn, kháng virus và tiềm năng ức chế tế bào ung thư. Sự kết hợp giữa kinh nghiệm dân gian và nghiên cứu khoa học thực nghiệm đã thúc đẩy sự quan tâm sâu sắc đối với việc phát triển các chế phẩm dược liệu từ chi thực vật này [13, 14].

1.1.2. Giá trị dinh dưỡng và dược thực phẩm

Bên cạnh vai trò là cây thuốc, các loài *Curcuma* còn được xem là nguồn thực phẩm chức năng tự nhiên giàu giá trị. Phân tích thành phần dinh dưỡng cho thấy thân rễ, và trong một số trường hợp là rễ củ và cụm hoa, là nguồn cung

cấp đáng kể carbohydrate, protein, tinh bột, chất béo, cùng các vi chất thiết yếu như khoáng chất và vitamin. Chính sự kết hợp độc đáo giữa giá trị dinh dưỡng và dược tính đã cho phép sử dụng các loài này như một liệu pháp thực trị (dùng thực phẩm để trị bệnh), hỗ trợ hiệu quả trong việc thanh lọc máu, cải thiện sức khỏe làn da, và kiểm soát các bệnh lý mãn tính như tiểu đường, loét dạ dày, gan mật và viêm khớp [15]. Củ của các loài như *Curcuma angustifolia*, *Curcuma leucorrhiza* và *Curcuma caulina* chứa hàm lượng tinh bột nghệ cao, được sử dụng, chế biến thành bột nghệ thực phẩm [16, 17].

1.1.3. Ứng dụng dược lý đặc hiệu của các loài đại diện

Sự đa dạng về thành phần hóa học giữa các loài đã tạo nên những ứng dụng điều trị chuyên biệt trong y học dân gian các nước:

Nhóm điều trị tiêu hóa và da liễu: Các loài như *C. aeruginosa*, *Curcuma caesia*, *Curcuma mangga* và *Curcuma zedoaria* được sử dụng phổ biến như các phương thuốc đầu tay cho các rối loạn tiêu hóa phức tạp (kiết lỵ, khó tiêu, loét dạ dày), các bệnh lý gan mật (gan và lá lách to), cũng như các tổn thương ngoài da (mụn nhọt, ghẻ lở, nhiễm trùng và bầm tím) [16].

Gừng xoài (*Curcuma amada*): loài này được ứng dụng như một chất hạ sốt, thuốc bổ kích thích tiêu hóa (carminative), lợi tiểu và nhuận tràng. Hơn nữa, *C. amada* còn chứng tỏ hiệu quả trong việc kiểm soát các bệnh lý hô hấp (hen suyễn, viêm phế quản) và các tình trạng viêm do chấn thương [18].

Nghệ lá hẹp (*Curcuma angustifolia*): ngoài giá trị dinh dưỡng, loài này sở hữu đặc tính làm mát và phục hồi mô. Trong y học bản địa, bột củ *C. angustifolia* được dùng đắp ngoài để thúc đẩy quá trình liền xương gãy và giảm sưng tấy, đồng thời dùng đường uống để trị các bệnh đường tiết niệu như tiểu khó và lậu [19, 20].

Nghệ rừng (*Curcuma aromatica*): Được biết đến rộng rãi trong y học cổ truyền Thái Lan và Trung Quốc, loài này được đánh giá cao về khả năng hoạt huyết (điều trị tắc máu), giải độc (trị nọc rắn) và thúc đẩy lành vết thương. Các nghiên cứu hiện đại còn phát hiện tiềm năng của *C. aromatica* trong việc ức

ché sự phát triển tế bào ung thư, điều hòa huyết áp và đường huyết, cũng như tác dụng diệt côn trùng [21, 22].

1.1.4. Tầm quan trọng kinh tế và văn hóa trên toàn cầu

Chi *Curcuma* đã vượt ra khỏi biên giới thực vật học để trở thành một phần không thể thiếu trong văn hóa và kinh tế toàn cầu. Tại Nam Á (Ấn Độ, Sri Lanka, Nepal), nghệ là được sử dụng chính trong các món ăn và y học Ayurveda [23]. Tại Đông Nam Á, vai trò của chúng biến đổi đa dạng: là thành phần cốt lõi trong mỹ phẩm tự nhiên tại Thái Lan [24], chất sát trùng tại Malaysia [25] và nguyên liệu cho đồ uống giải khát tại Hàn Quốc và Nhật Bản [26, 27]. Ở Trung Quốc và nhiều quốc gia khác, củ nghệ còn đóng vai trò là cây nhuộm màu tự nhiên và chất bảo quản thực phẩm an toàn, thay thế cho các phụ gia tổng hợp. Các chiết xuất từ củ nghệ hiện đang được khai thác rộng rãi bởi ngành công nghiệp mỹ phẩm toàn cầu nhờ đặc tính dưỡng da và chống lão hóa [28, 29].

1.1.5. Cơ sở hoạt tính từ thành phần hóa thực vật

Hiệu quả trị liệu của chi *Curcuma* được củng cố vững chắc bởi nền tảng hóa thực vật phong phú. Các nghiên cứu sàng lọc trên khoảng 32 loài đã định danh được gần 720 hợp chất, tạo nên một thành phần hóa học đa dạng [30]. Trong đó, hai nhóm hợp chất chính đóng vai trò quyết định đến hoạt tính sinh học bao gồm:

Curcuminoid (diarylheptanoid) là nhóm hợp chất polyphenol đặc trưng của chi *curcuma*, bao gồm curcumin (CUR), demethoxycurcumin (DMC) và bisdemethoxycurcumin (BDMC). Mặc dù chỉ chiếm tỷ lệ nhỏ trong tổng khối lượng thân rễ (khoảng 2-5% khối lượng khô), nhóm curcuminoid chịu trách nhiệm chính cho các hoạt tính dược lý nổi bật nhất như chống oxy hóa, kháng viêm, gây độc tế bào ung thư, kháng khuẩn và kháng nấm [31]. Curcuminoid tập trung với hàm lượng cao nhất ở loài *C. longa*, đối tượng nghiên cứu chính của luận án này.

Sesquiterpenoid và tinh dầu sở hữu hơn 500 hợp chất terpenoid đã được xác định (bao gồm monoterpene, sesquiterpene và diterpene), nhóm này tạo nên mùi hương đặc trưng và đóng góp quan trọng vào hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm, diệt côn trùng và chống viêm [14, 32]. Đáng chú ý, zerumbone là một sesquiterpene đơn vòng phân lập chủ yếu từ *Zingiber zerumbet* nhưng cũng hiện diện trong một số loài *Curcuma* được thảo luận chi tiết trong mục 1.4 với tư cách là đối tác lai hóa phân tử với curcumin.

Bên cạnh đó, sự hiện diện của 102 diphenylalkaloid, flavonoid, tannin, saponin và các polysaccharide đã tạo nên tác dụng cộng hưởng, giúp dịch chiết toàn phần của các loài *Curcuma* thường có phổ tác dụng rộng và hiệu quả điều trị bền vững [14]. Sự đa dạng về thành phần hóa học giữa các loài dẫn đến sự khác biệt về hoạt tính, trong khi *C. longa* nổi bật nhờ hàm lượng curcuminoid cao, thì các loài như *C. aromatica*, *C. zedoaria*, *C. aeruginosa* lại được đánh giá cao về thành phần tinh dầu và sesquiterpene [31]. Sự phân hóa này là cơ sở để lựa chọn *C. longa* làm đối tượng nghiên cứu curcuminoid trong luận án.

1.2. Tổng quan về cây nghệ vàng (*Curcuma longa*)

1.2.1. Đặc điểm thực vật và công dụng

1.2.1.1. Đặc điểm thực vật và phân bố sinh thái

Nghệ vàng là một loài thực vật thân thảo lưu niên thuộc họ Gừng (*Zingiberaceae*), có tên khoa học là *Curcuma longa*. Trong nền y học cổ truyền bản địa Việt Nam, loài cây này còn được biết đến với nhiều tên gọi khác nhau tùy theo vùng miền và dân tộc, như khương hoàng, uất kim, hay các tên gọi của đồng bào dân tộc như co hem, co khăn mịn (tiếng Thái) và khinh lương (tiếng Tày) [33, 34].

Về nguồn gốc địa lý sinh học, *C. longa* xuất phát từ vùng nhiệt đới Tamil Nadu thuộc phía đông nam Ấn Độ. Nhờ khả năng thích nghi tốt, ngày nay nghệ vàng đã được di thực và canh tác rộng rãi tại nhiều quốc gia châu Á (Ấn Độ, Thái Lan, Việt Nam, Malaysia, Philippines, Hàn Quốc, Nhật Bản), các đảo thuộc Nam Thái Bình Dương, cũng như khu vực Đông và Tây Phi. Trong đó,

Ấn Độ vẫn là quốc gia sản xuất và xuất khẩu nghệ vàng chủ lực trên thế giới [35, 36]. Tại Việt Nam, nghệ vàng được trồng phổ biến ở nhiều tỉnh trên cả ba miền trong đó tập trung bao gồm vùng núi phía bắc và khu vực tây nguyên. Cây ưa đất toi xốp, giàu mùn, thoát nước tốt, thu hoạch củ sau 8-10 tháng trồng.

Về hình thái học, *C. longa* là cây thân thảo, cao trung bình khoảng 60 cm tính từ gốc. Hệ thống lá phát triển từ gốc, bẹ lá ốp vào nhau tạo thành thân giả, phiến lá màu xanh đậm với bề mặt bóng mượt. Cụm hoa mọc từ giữa túm lá, tạo thành chùy với màu sắc biến thiên từ trắng đến vàng nhạt. Đặc điểm quan trọng nhất của loài là hệ thống thân rễ phát triển mạnh thành củ, ngắn và dày. Củ nghệ có lớp vỏ ngoài màu nâu, bao bọc phần thịt bên trong có màu cam hoặc vàng sáng đặc trưng. Kích thước củ thường dài từ 5–8 cm, đường kính khoảng 2,5 cm, có hình dạng thuôn dần hoặc nhọn về phía cuối [34, 37].



Hình 1.1. Cây nghệ vàng (*C. longa*)

1.2.1.2. Công dụng trong y học cổ truyền

Trong nền y học cổ truyền Việt Nam, các bộ phận của cây nghệ được phân biệt thành hai vị thuốc riêng biệt với tính năng dược lý khác nhau:

Khương hoàng (thân rễ chính) thường có vị cay đắng, mùi thơm hắc, tính ấm. Vị thuốc này chuyên dùng để hành khí, phá huyết, thông kinh, chỉ thống (giảm đau) và kích thích lên da non (tiêu mủ). Khương hoàng được chỉ định trong điều trị kinh nguyệt không đều, bế kinh, huyết ứ, các chứng đau tức vùng ngực bụng, khó thở, chấn thương tụ máu, viêm loét dạ dày, mụn nhọt và phong thấp [37].

Uất kim (rễ củ/rễ phụ) có vị cay đắng pha chút ngọt, tính mát. Công năng chính là hành khí, giải uất, lương huyết và phá ú [34].

Trên bình diện quốc tế, nghệ vàng đóng vai trò trung tâm trong nhiều nền y học bản địa:

Tại Ấn Độ, *C. longa* đóng vai trò là trung tâm trong nền dược liệu y học Ayurveda như thuốc bổ, lọc máu, hỗ trợ tiêu hóa, hạ sốt và trị cảm lạnh (khi phối hợp với sữa nóng). Dịch ép nghệ tươi được dùng kháng ký sinh trùng ngoài da, trong khi dạng bột nhào đắp ngoài giúp trị loét, đau khớp và viêm tấy có mủ. Cao nước thân rễ còn được ứng dụng đặc hiệu cho các bệnh lý về mật [23].

Tại Trung Quốc, *C. longa* được xem là thuốc kích thích, giảm đau và cầm máu hiệu quả, được chỉ định trong các phác đồ điều trị loét dạ dày, xuất huyết tiêu hóa, huyết niệu. Dạng bột dùng ngoài giúp chữa trĩ, nấm tóc và các vết thương nhiễm trùng [38].

Tại Nepal và Đông Nam Á, dược liệu này được dùng rộng rãi để làm thuốc trung tiện, lọc máu, trị bong gân, giun sán và chống dị ứng. Tại các nước Đông Nam Á, nghệ được coi là dược liệu có giá trị, giúp bổ dạ dày, trị vàng da, bệnh gan, rối loạn kinh nguyệt và làm tan cục máu đông. Ngoài ra, tính kháng khuẩn và kháng nấm của nghệ còn được ứng dụng để trị các bệnh nhiễm trùng đường tiết niệu, viêm lợi, lao phổi và các bệnh ngoài da như ghẻ lở, phát ban [39, 40].

Tại Papua New Guinea, *C. longa* được dùng đơn giản nhưng hiệu quả để trị các chứng đau ngoài da, vết thâm tím và cảm sốt [41].

Diễn chung trong tất cả các nền y học cổ truyền là nghệ được sử dụng chủ yếu cho ba nhóm bệnh lý: rối loạn tiêu hóa và gan mật; viêm nhiễm và đau; tổn thương ngoài da, tương ứng với các hoạt tính kháng viêm, chống oxy hóa và kháng khuẩn mà khoa học hiện đại đã xác nhận.

1.2.2. Tình hình nghiên cứu trên thế giới

1.2.2.1 Lược sử nghiên cứu

Lịch sử nghiên cứu khoa học về *C. longa* trên thế giới bắt đầu từ thế kỷ 19 khi Vogel và Pelletier năm 1815 lần đầu tiên phân lập được phân đoạn vàng từ củ nghệ và đặt tên là curcumin [42]. Hơn một thế kỷ sau, cấu trúc hóa học của curcumin (diferuloylmethane) mới được xác định chính xác, đặt nền tảng cho nghiên cứu hiện đại [43]. Năm 1985, Kuttan và cộng sự công bố nghiên cứu tiên phong về hoạt tính kháng ung thư của curcumin, mở đầu cho làn sóng các nghiên cứu dược lý kéo dài đến ngày nay [35, 36].

Các nghiên cứu hóa học thế kỷ 20 đã xác nhận rằng hoạt tính của nghệ không đến từ một đơn chất, mà là sự đóng góp của hệ phức hợp curcuminoid gồm ba dẫn xuất diarylheptanoid chính là CUR chiếm tỷ lệ chủ đạo (khoảng 77%), DMC chiếm khoảng 17%, thiếu một nhóm methoxy, BDMC chiếm khoảng 3-6%, thiếu cả hai nhóm methoxy cùng hệ tinh dầu hỗ trợ [44]. Tuy nhiên, phần lớn các công trình công bố từ trước đến nay chủ yếu tập trung đánh giá CUR. Trong khi đó, hai thành phần đồng hành là DMC và BDMC lại ít được khảo sát độc lập về cả hoạt tính sinh học lẫn tiềm năng làm nguyên liệu bán tổng hợp. Sự thiếu hụt dữ liệu chuyên sâu về DMC và BDMC chính là một khoảng trống khoa học quan trọng, qua đó định hình nên mục tiêu trọng tâm của luận án này.

1.2.2.2 Hoạt tính sinh học

Các nghiên cứu *in vitro* và *in vivo* trên thế giới đã xây dựng nên một bức tranh toàn diện về dược lý curcuminoid. Dưới đây tổng hợp các nhóm hoạt tính chính có liên quan trực tiếp đến nội dung nghiên cứu của luận án:

Hoạt tính kháng ung thư: curcuminoid thể hiện hoạt tính gây độc tế bào ung thư tự nhiên mạnh trên nhiều dòng tế bào (gan, đại trực tràng, vú, tụy, bàng quang) thông qua cơ chế đa đích gồm kích hoạt apoptosis (qua con đường caspase và Smad/Akt), ức chế tăng sinh tế bào (ức chế NF-kB, cyclin D1), ức chế tạo mạch máu mới (angiogenesis) và ngăn chặn xâm lấn/di căn. Các thử

thử nghiệm lâm sàng tại Mỹ và Đài Loan trên ung thư tụy, đại trực tràng và bàng quang đã cho thấy kết quả khả quan về độ an toàn và hiệu quả kìm hãm khối u [45]. Một xu hướng nổi bật trong những năm gần đây là việc tách biệt và so sánh hoạt tính của ba dẫn xuất này. Trong khi CUR thường xuyên bị hạn chế bởi độ ổn định kém, thì BDMC lại đang ghi nhận tiềm năng nhờ cấu trúc bền vững hơn và khả năng tương tác đặc thù với một số đích tác dụng mà CUR không có. Đáng chú ý, BDMC gần đây được ghi nhận có khả năng cảm ứng apoptosis chọn lọc trên một số dòng tế bào ung thư gan với hiệu lực tương đương hoặc cao hơn CUR [46, 47].

Hoạt tính kháng viêm qua con đường TLR4/MD-2: curcuminoid ức chế phản ứng viêm thông qua nhiều cơ chế, trong đó được chú ý nhất là khả năng can thiệp vào con đường tín hiệu TLR4/MD-2 (Toll-like receptor 4/Myeloid differentiation factor 2). Bằng cách cạnh tranh vị trí gắn kết của lipopolysaccharide (LPS) trên phức hệ TLR4/MD-2, curcuminoid ngăn chặn việc kích hoạt dòng thác tín hiệu NF- κ B ngay từ đầu nguồn, dẫn đến giảm biểu hiện các cytokine tiền viêm (TNF- α , IL-1 β , IL-6) và enzyme gây viêm (iNOS, COX-2) [48]. Cơ chế này có ý nghĩa đặc biệt trong bối cảnh các bệnh viêm mãn tính và được khảo sát bằng mô phỏng docking phân tử.

Hoạt tính chống oxy hóa: với cấu trúc chứa hệ liên hợp β -diketone và nhóm -OH phenolic, curcuminoid hoạt động như chất quét gốc tự do hiệu quả (đặc biệt với gốc peroxy $\text{ROO}\cdot$ và hydroxyl $\text{HO}\cdot$) thông qua cơ chế chuyển nguyên tử hydrogen (HAT) [49, 50]. Hoạt tính chống oxy hóa phụ thuộc đáng kể vào cấu trúc, sự hiện diện hay vắng mặt của nhóm methoxy ảnh hưởng đến khả năng ổn định gốc phenoxyl sau khi nhường H, do đó CUR, DMC và BDMC có thể thể hiện hoạt tính chống oxy hóa khác nhau sẽ đánh giá qua thử nghiệm DPPH và ABTS.

Hoạt tính kháng vi sinh vật: curcuminoid đã được chứng minh có phổ kháng khuẩn rộng trên nhiều chủng vi khuẩn Gram dương (*S. aureus*, *B. subtilis*) và Gram âm (*E. coli*, *P. aeruginosa*), cùng hoạt tính kháng nấm trên

các chủng *Candida* và *Aspergillus* [31]. Ngoài ra, tiềm năng kháng virus (bao gồm HIV, HSV, influenza) cũng đã được ghi nhận trong một số nghiên cứu *in vitro*, mặc dù cơ chế chưa được làm rõ hoàn toàn và chưa có ứng dụng lâm sàng [50]. Cần lưu ý rằng phần lớn dữ liệu kháng vi sinh vật hiện có là từ CUR hoặc hỗn hợp curcuminoid; dữ liệu riêng biệt cho DMC và BDMC còn rất hạn chế.

1.2.2.3 Tổng hợp hóa học và bán tổng hợp

Bên cạnh chiết xuất từ nguồn tự nhiên, tổng hợp hóa học curcuminoid là hướng nghiên cứu quan trọng, đảm bảo nguồn nguyên liệu tinh khiết và ổn định cho các nghiên cứu dược lý và phát triển thuốc.

Tổng hợp toàn phần sử dụng phương pháp ngưng tụ aldol sử dụng phức chất Boron (do Pabon đề xuất năm 1964) hiện được coi là quy trình chuẩn mực nhất [51, 52]. Phức Boron giúp bảo vệ nhóm β -diketone, ngăn chặn các phản ứng phụ tại vị trí C-3, cho phép tổng hợp định hướng thành công cả 3 dẫn xuất CUR, DMC và BDMC với độ tinh khiết cao (>98%) [53]. Phương pháp này vẫn được coi là quy trình chuẩn trong các phòng thí nghiệm trên thế giới.

Bán tổng hợp và biến đổi cấu trúc nhằm khắc phục nhược điểm kém bền và khó tan của curcumin tự nhiên, các nhà hóa dược thế giới đã phát triển nhiều chiến lược biến đổi cấu trúc. Các hướng đi chính bao gồm: thay thế nhóm β -diketone kém bền bằng các dị vòng (pyrazole, isoxazole); tạo phức với ion kim loại chuyển tiếp (kẽm, đồng, ruthenium) hoặc ester hóa nhóm phenolic [54]. Các dẫn xuất bán tổng hợp này đã chứng minh hoạt tính kháng ung thư và kháng viêm cao gấp nhiều lần so với chất gốc [55, 56].

1.2.2.4 Ứng dụng công cụ tính toán

Sự phát triển của hóa tính toán đã mở ra hướng tiếp cận mới trong nghiên cứu curcuminoid. Các phương pháp mô phỏng docking phân tử cho phép dự đoán ái lực liên kết giữa curcuminoid với các đích phân tử (như TLR4/MD-2, COX-2, tubulin), trong khi mô phỏng động lực học phân tử (MD simulation) đánh giá độ bền của phức hệ thuốc-protein đích theo thời gian [10]. Phương pháp tính toán cũng được ứng dụng để sàng lọc ứng viên trước khi tiến hành

thực nghiệm tốn kém, và để giải thích cơ sở phân tử cho sự khác biệt hoạt tính giữa CUR, DMC và BDMC [10]. Phương pháp luận *in silico* được trình bày chi tiết trong mục sau.

Song song với giá trị dược lý, vấn đề bảo vệ nguồn gen *C. longa* cũng được quan tâm lớn. Tại các vùng trồng nghệ lớn (Ấn Độ, Thái Lan), tuyến trùng ký sinh thực vật (thuộc giống *Meloidogyne*, *Pratylenchus*) được xác định là tác nhân chính gây sần sùi củ, thối rễ và làm thay đổi nghiêm trọng thành phần hóa học của cây [57, 58]. Tuy nhiên, sự đa dạng loài của tuyến trùng trên cây nghệ vẫn chưa được khám phá đầy đủ, đặt ra yêu cầu cần thiết về việc định danh và kiểm soát các loài dịch hại mới nổi này.

1.2.3. Tình hình nghiên cứu tại Việt Nam

Tại Việt Nam, nghệ vàng là một trong những dược liệu được có truyền thống sử dụng lâu đời, được ghi nhận trong các tài liệu y học cổ truyền kết hợp hiện đại.

Kế thừa tri thức của Tuệ Tĩnh và Hải Thượng Lãn Ông, nhân dân ta đã sử dụng nghệ (Khương hoàng, Uất kim) nhuận nhuyển để trị đau dạ dày, làm lành vết thương và phục hồi sức khỏe phụ nữ sau sinh [34, 37].

Trong hai thập kỷ gần đây, nghiên cứu về curcuminoid tại Việt Nam đã đạt được những kết quả đáng ghi nhận. Về công nghệ bào chế, các nhóm nghiên cứu trong nước đã làm chủ quy trình chiết xuất curcuminoid quy mô công nghiệp và phát triển thành công các dạng bào chế công nghệ cao như nano curcumin, phytosome, giúp gia tăng giá trị ứng dụng của cây nghệ Việt và giải quyết bài toán về độ tan của hoạt chất [59]. Về phân tích hóa học, phương pháp định lượng đồng thời ba curcuminoid bằng HPLC đã được xây dựng và áp dụng cho kiểm nghiệm chất lượng nguyên liệu [11]. Về đánh giá hoạt tính, curcumin và dịch chiết nghệ Việt Nam đã được khảo sát trên một số mô hình *in vitro*, bao gồm hoạt tính kháng khuẩn và hoạt tính chống oxy hóa [5, 6].

Mặc dù đã đạt được nhiều tiến bộ, nhưng các nghiên cứu về curcuminoid tại Việt Nam hiện nay vẫn còn tồn tại một số hạn chế nhất định. Cụ thể, các

công trình chủ yếu dừng lại ở quy mô chiết xuất thô hoặc tập trung vào CUR, trong khi việc ứng dụng kết hợp công cụ mô phỏng *in silico* để định hướng thiết kế dẫn xuất mới, cũng như đánh giá ảnh hưởng của các yếu tố sinh học (như tuyến trùng) đến chất lượng nguồn gen nghệ vàng, vẫn chưa được quan tâm và giải quyết triệt để. Phần lớn các nghiên cứu sử dụng hỗn hợp curcuminoid hoặc CUR thương mại; chưa có công trình phân lập riêng biệt cả ba curcuminoid (CUR, DMC, BDMC) từ nghệ Việt Nam để đánh giá, so sánh hoạt tính trên cùng bộ thử nghiệm, chưa có nghiên cứu bán tổng hợp dẫn xuất curcumin nào được thực hiện trên nguồn nguyên liệu Việt Nam, đặc biệt là dẫn xuất lai hóa curcumin-zerumbone, chưa có dữ liệu kết hợp *in vitro* và *in silico* cho hệ curcuminoid Việt Nam và thành phần loài tuyến trùng ký sinh rễ nghệ vàng tại Việt Nam và đánh giá ảnh hưởng của chúng đến chất lượng nguyên liệu cũng chưa được khảo sát.

1.2.4. Tuyến trùng ký sinh trên cây dược liệu và cây nghệ vàng

1.2.4.1. Tác hại của tuyến trùng ký sinh thực vật đối với cây dược liệu

Tuyến trùng ký sinh thực vật (Plant-parasitic nematodes) là một trong những nhóm dịch hại nguy hiểm nhất trong sản xuất nông nghiệp toàn cầu. Đối với nhóm cây dược liệu, tác động của tuyến trùng không chỉ dừng lại ở việc làm giảm năng suất sinh học (sinh khối) mà quan trọng hơn là làm suy giảm chất lượng dược liệu (hàm lượng hoạt chất) [60]. Đặc điểm chung của các nhóm tuyến trùng gây hại trên cây dược liệu bao gồm [61]:

Ký sinh bắt buộc, chúng sống trong đất hoặc trong mô thực vật, sử dụng kim hút (stylet) để chích hút dinh dưỡng từ tế bào rễ, làm cạn kiệt nguồn dự trữ của cây. Các chi phổ biến thường gặp bao gồm *Meloidogyne* (tuyến trùng sưng rễ), *Pratylenchus* (tuyến trùng tổn thương), *Rotylenchulus* (tuyến trùng thân) và *Scutellonema* (tuyến trùng xoắn). Chúng phát triển mạnh trong điều kiện khí hậu nhiệt đới, đất tơi xốp và độ ẩm cao, những điều kiện trùng khớp với vùng sinh thái trồng trọt của nhiều loại cây thuốc quý, trong đó có nghệ.

1.2.4.2. Đa dạng thành phần loài và đặc điểm gây hại của tuyến trùng trên cây nghệ vàng

Cây nghệ vàng có bộ phận dùng chính là thân rễ (củ) nằm dưới mặt đất. Đặc điểm hình thái này khiến nghệ trở thành ký chủ rất nhạy cảm với các loài dịch hại rễ, điển hình là tuyến trùng. Các nhóm tuyến trùng chính gây hại trên nghệ được phân loại theo kiểu ký sinh như sau [57, 62]:

Nhóm nội ký sinh cố định (*Sedentary endoparasites*) với điển hình là chi *Meloidogyne*. Ấu trùng xâm nhập vào rễ, kích thích tế bào rễ phân chia bất thường tạo thành các u sưng (galls), làm tắc nghẽn hệ thống mạch dẫn, cản trở sự vận chuyển nước và muối khoáng.

Nhóm nội ký sinh di chuyển (*Migratory endoparasites*) điển hình là chi *Pratylenchus* và *Radopholus*. Chúng di chuyển tự do trong mô vỏ rễ và thân ngầm, phá hủy tế bào, tạo ra các vết thương hoại tử màu nâu đen, dẫn đến thối rễ và củ.

Nhóm ngoại ký sinh (*Ectoparasites*) gồm các chi như *Scutellonema* và *Helicotylenchus*. Chúng không chui sâu vào trong rễ mà dùng kim hút tấn công từ bên ngoài lớp biểu bì, gây tổn thương đầu rễ, làm rễ kém phát triển, còi cọc.

1.2.4.3. Ảnh hưởng của tuyến trùng đến sinh lý và tích lũy hoạt chất

Tác hại của tuyến trùng đối với cây nghệ không chỉ là những tổn thương cơ học nhìn thấy bằng mắt thường, mà là những rối loạn sâu sắc trong quá trình trao đổi chất và tích lũy các chất chuyển hóa thứ cấp, cụ thể ở đây là hệ curcuminoid [63].

Rối loạn hấp thu dinh dưỡng và quang hợp hệ rễ bị tuyến trùng tấn công sẽ mất khả năng hấp thu nước và dinh dưỡng thiết yếu. Sự thiếu hụt dẫn đến ức chế quá trình quang hợp, làm giảm nguồn cacbon cần thiết để tổng hợp các hợp chất hữu cơ, từ đó làm giảm tổng lượng sinh khối và năng suất củ [64].

Các vết thương do tuyến trùng (các loài có kim hút lớn như *Scutellonema* hay *Meloidogyne*) tạo ra những cửa ngõ mở, tạo điều kiện thuận lợi cho các nấm đất gây bệnh (như *Fusarium*, *Pythium*, *Rhizoctonia*) xâm nhập. Sự kết hợp giữa tuyến trùng và nấm bệnh thường gây ra hiện tượng thối củ phức hợp, làm sụt giảm chất lượng nguyên liệu nhanh chóng và nghiêm trọng hơn nhiều so với khi cây chỉ nhiễm một loại dịch hại [65].

Về mặt sinh lý thực vật, sự tấn công của tuyến trùng gây ra stress sinh học (Biotic stress) [66]. Ở mức độ nhiễm nhẹ, cây có thể phản ứng bằng cách tăng nhẹ hàm lượng các chất phenolic (như một cơ chế tự vệ). Tuy nhiên, khi mật độ tuyến trùng cao (vượt ngưỡng gây hại), hệ thống phòng thủ của cây bị quá tải. Năng lượng và tài nguyên của cây bị chuyển hướng sang việc sửa chữa các mô bị tổn thương thay vì tổng hợp hoạt chất. Hậu quả là quá trình sinh tổng hợp các hợp chất curcuminoid bị ức chế, dẫn đến nguyên liệu thu hoạch có hàm lượng hoạt chất thấp, không đạt tiêu chuẩn để chiết xuất các curcuminoid [67].

Tóm lại, việc nghiên cứu tổng quan về tuyến trùng trên cây nghệ cho thấy đây là một yếu tố giới hạn quan trọng trong canh tác dược liệu. Kiểm soát tuyến trùng không chỉ là biện pháp bảo vệ năng suất nông học mà là yêu cầu bắt buộc để chuẩn hóa vùng nguyên liệu, đảm bảo thu được củ nghệ có hàm lượng hoạt chất cao và ổn định, phục vụ cho các nghiên cứu hóa thực vật và bào chế sau này. Nghiên cứu tập trung vào cây nghệ vàng (*Curcuma longa* L.), khẳng định giá trị dược lý cốt lõi nằm ở hệ phức hợp curcuminoid với ba dẫn xuất song hành là CUR, DMC và BDMC. Phân tích cấu trúc hóa học chỉ ra dù CUR chiếm hàm lượng cao nhất, nhưng chính BDMC (không chứa nhóm methoxy) mới sở hữu độ bền nhiệt động và khả năng kháng thủy phân mạnh hơn, mở ra hướng tái định vị vai trò của dẫn xuất này. Để khắc phục hạn chế về sinh khả dụng và tính đa đích, xu hướng nghiên cứu hiện đại chuyên dịch sang bán tổng hợp các dẫn xuất lai hóa (như kết hợp với zerumbone) và ứng

dụng công cụ tính toán *in silico* (DFT, docking, MD) để dự báo cơ chế chống oxy hóa và kháng viêm ở cấp độ phân tử trước khi thực nghiệm.

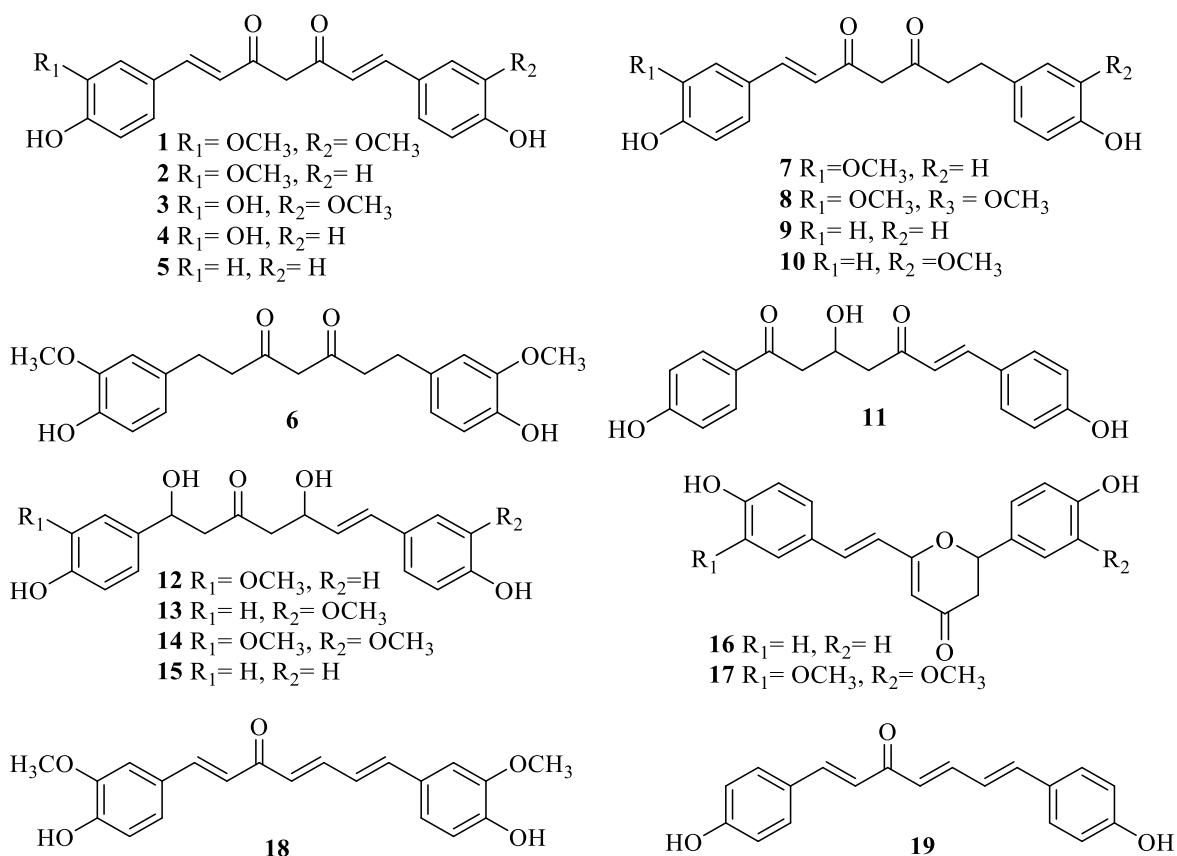
Tổng quan xác định tuyến trùng ký sinh là yếu tố sinh thái gây stress sinh học, làm suy giảm nghiêm trọng hàm lượng và chất lượng curcuminoid trong nguyên liệu. Đây chính là cơ sở thực tiễn để đề tài triển khai nghiên cứu toàn diện từ kiểm soát dịch hại, phân lập, bán tổng hợp đến giải mã cơ chế tác dụng nhằm phát triển sản phẩm chuyên biệt. Tổng quan tài liệu cho thấy giá trị dược lý của nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) nằm ở hệ phức hợp curcuminoid (CUR, DMC và BDMC). Trong đó, BDMC sở hữu độ bền nhiệt động, cấu trúc tinh thể chặt chẽ và khả năng kháng thủy phân mạnh hơn do cấu trúc không chứa nhóm thế methoxy. Để khắc phục hạn chế về sinh khả dụng của curcumin tự nhiên, chiến lược bán tổng hợp (lai hóa với zerumbone, ether hóa bằng gốc propargyl) kết hợp mô phỏng *in silico* (DFT, docking, MD) là hướng tiếp cận hiệu quả trong thiết kế phân tử thuốc. Đồng thời, các bằng chứng sinh thái cảnh báo sự đe dọa từ tuyến trùng ký sinh là tác nhân trực tiếp làm sụt giảm hàm lượng curcuminoid trên đồng ruộng. Những cơ sở lý luận này là tiền đề để luận án triển khai nghiên cứu toàn diện từ kiểm soát dịch hại, phân lập hoạt chất, bán tổng hợp dẫn xuất mới, đến giải mã cơ chế phân tử để phát triển và ứng dụng sau này.

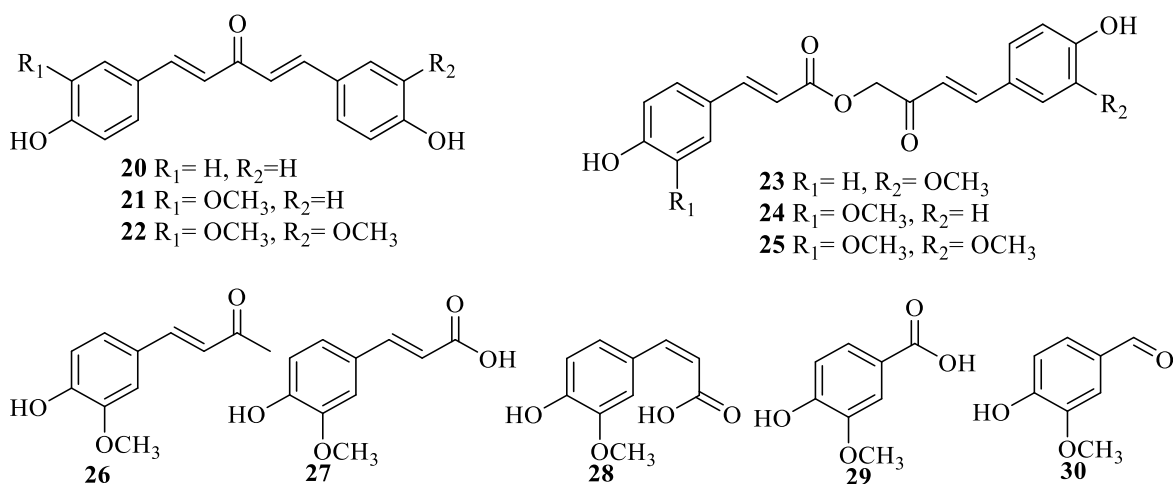
1.2.5. Thành phần hóa học của thân rễ nghệ vàng

Trong số 110 loài thuộc chi Nghệ (*Curcuma* L.), mới chỉ có khoảng 20 loài được nghiên cứu về mặt hóa thực vật. *Curcuma longa* là loài được nghiên cứu nhiều nhất về mặt hóa học trong chi *Curcuma*. Cho đến nay, hơn 235 hợp chất, chủ yếu là các hợp chất phenolic và terpenoid, đã được xác định, bao gồm các diarylheptanoid (trong đó có các chất thường được gọi là curcuminoid), diarylpentanoid, monoterpene, sesquiterpene, diterpene, triterpenoid, alkaloid, sterol, ...[68]. Tiêu biểu các hợp chất được thể hiện như hình 1.2 và bảng 1.2.

Diarylheptanoid và diarylpentanoid: Hơn 300 diarylheptanoid đã được báo cáo trong họ Gừng (Zingiberaceae) và một số họ không có quan hệ họ hàng

gần. Các curcuminoid thuộc nhóm diarylheptanoid (hoặc diphenylheptanoid) có bộ khung aryl-C7-aryl (hợp chất **1** đến **19**). Những sắc tố màu vàng này thường được sử dụng làm chất tạo màu thực phẩm và chúng là các hợp chất có hoạt tính chính trong nghệ. Thành phần hóa học quan trọng nhất trong thân rễ nghệ là nhóm curcuminoid, chiếm hàm lượng khoảng 3-6% trọng lượng khô. Đây là hệ hợp chất polyphenolic bao gồm ba dẫn xuất chính tồn tại song hành: curcumin (**1**), demethoxycurcumin (**2**) và bisdemethoxycurcumin (**3**) [69]. Có ba diarylpentanoid (hoặc diphenylpentanoid) với chuỗi năm carbon nằm giữa hai nhóm phenyl (**20-22**). Phenylpropene và các hợp chất phenolic khác với sáu phenylpropene đơn phân (**23-28**), acid vanillic (**29**) và vanillin (**30**) đã được xác định trong *C. longa* [70, 71].





Hình 1.2. Cấu trúc hóa học các hợp chất phân lập được từ *C. longa*

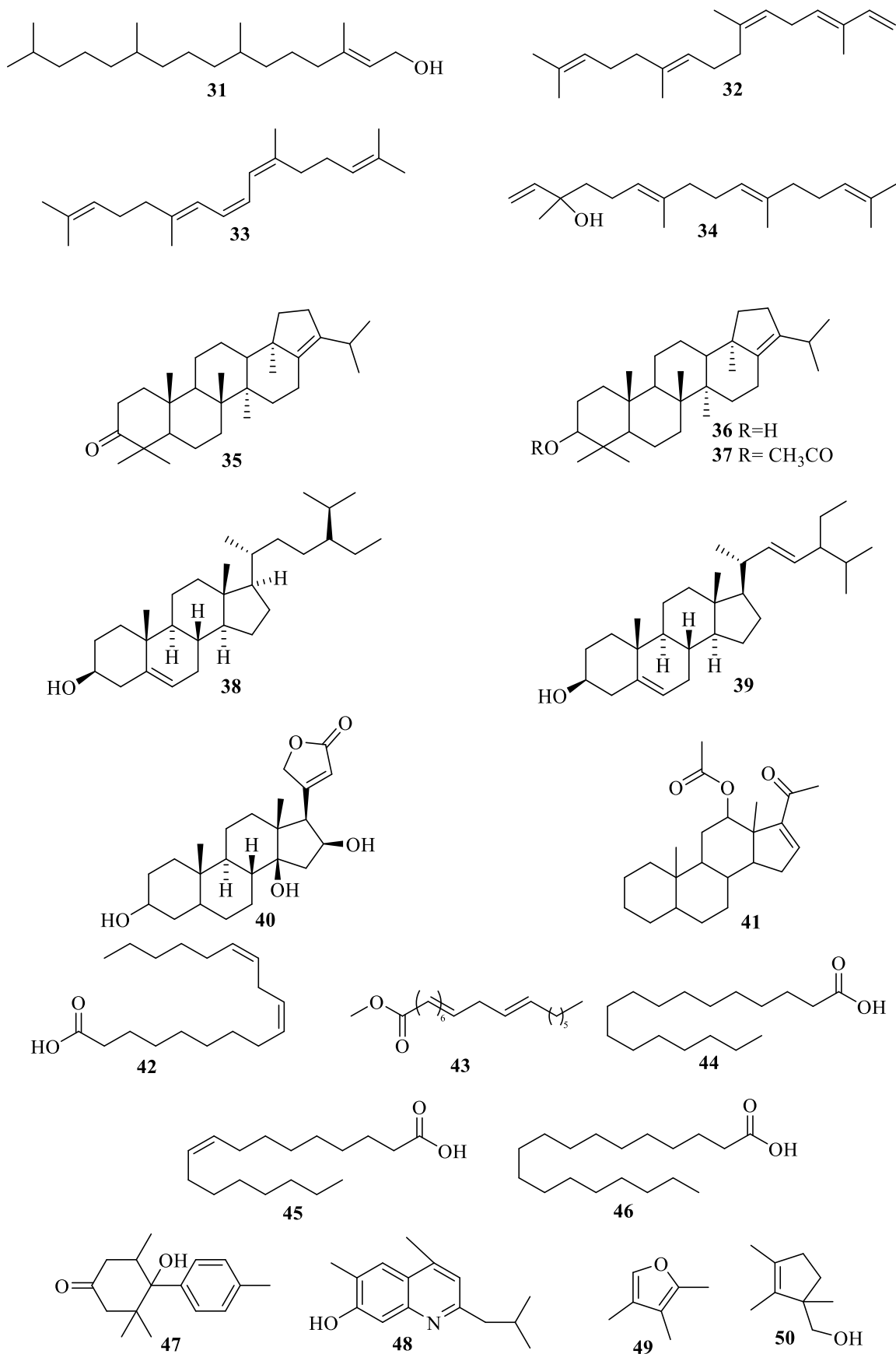
Bảng 1.2. Các hợp chất phân lập được từ *C. longa*

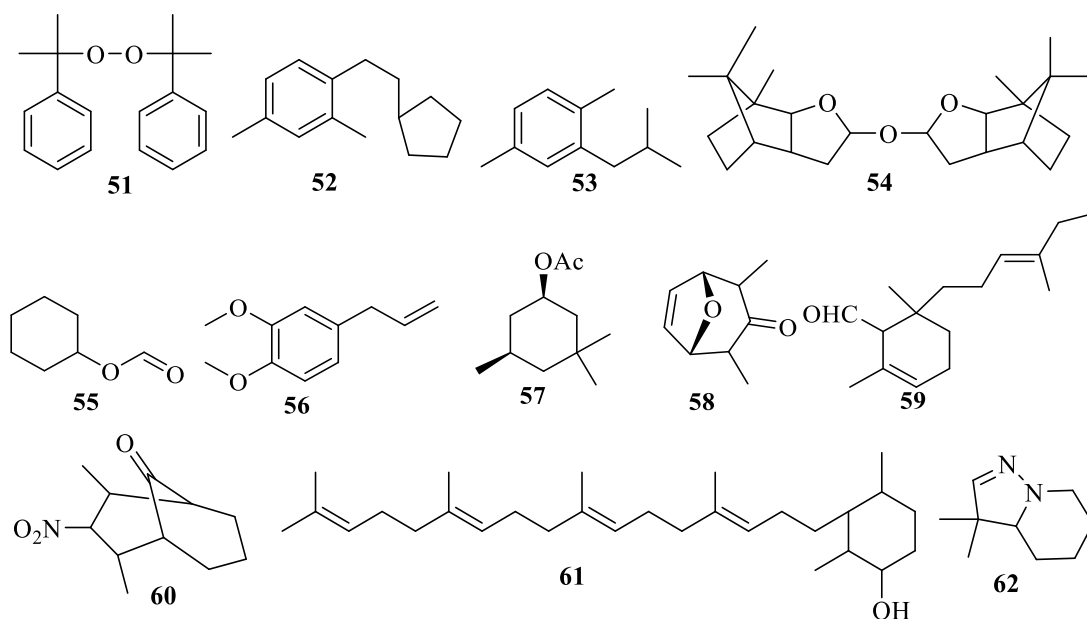
TT	Tên hợp chất	Nhóm chất
1	curcumin (CUR)	Diarylheptanoid
2	demethoxycurcumin (DMC)	Diarylheptanoid
3	1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(3, 4-dihydroxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione	Diarylheptanoid
4	1-(4-hydroxyphenyl)-7-(3, 4-dihydroxyphenyl)-1, 6-heptadiene-3, 5-dione	Diarylheptanoid
5	bisdemethoxycurcumin (BDMC)	Diarylheptanoid
6	tetrahydroxycurcumin	Diarylheptanoid
7	5-hydroxyl-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one	Diarylheptanoid
8	5-hydroxyl-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one	Diarylheptanoid
9	1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-1-heptene-3,5-dione	Diarylheptanoid
10	5-hydroxyl-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one	Diarylheptanoid
11	3-hydroxy-1,7-bis-(4-hydroxyphenyl)-6-heptene-1,5-dione	Diarylheptanoid
12	1,5-dihydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-7-(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one	Diarylheptanoid

TT	Tên hợp chất	Nhóm chất
13	1,5-dihydroxy-1-(4-hydroxyphenyl)-7-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one	Diarylheptanoid
14	1,5-dihydroxy-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one	Diarylheptanoid
15	1,5-dihydroxy-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene-3-one	Diarylheptanoid
16	1,5-epoxy-3-carbonyl-1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-4,6-heptadiene	Diarylheptanoid
17	cyclocurcumin	Diarylheptanoid
18	1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one	Diarylheptanoid
19	1,7-bis-(4-hydroxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one	Diarylheptanoid
20	1,5-bis(4-hydroxyphenyl)-penta-(1E,4E)-1,4-dien-3-one	Diarylheptanoid
21	1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-5-(4-hydroxyphenyl)-1,4-pentadiene-3-one	Diarylheptanoid
22	1,5-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-penta-(1E,4E)-1,4-dien-3-one	Diarylheptanoid
23	4''-(4'''-hydroxyphenyl)-2''-oxo-3''-butenyl-3-(4'-hydroxyphenyl-3'-methoxy)-propenoate	Phenylpropene
24	4''-(4'''-hydroxyphenyl-3-methoxy)-2''-oxo-3''-butenyl-3-(4'-hydroxyphenyl)-propenoate	Phenylpropene
25	calebin-A	Phenylpropene
26	(E)-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)but-3-en-2-one	Phenylpropene
27	(E)-ferulic acid	Phenylpropene
28	(Z)-ferulic acid	Phenylpropene
29	vanillic acid	Phenolic
30	vanillin	Phenolic

Cho đến nay, ít nhất 185 hợp chất terpene đã được phân lập hoặc phát hiện từ lá, hoa, rễ và thân rễ của *C. longa*, bao gồm gần 70 monoterpene, 110 sesquiterpene, 09 diterpene và 06 triterpenoid. Ngoài ra, 04 steroid 05 acid béo

mạch dài và 16 hợp chất khác đã được xác định từ *C. longa* [68]. Các hợp chất tiêu biểu được thể hiện như hình 1.3 và bảng 1.3.





Hình 1.3. Cấu trúc hóa học các hợp chất khác phân lập được từ *C. longa*

Bảng 1.3. Các hợp chất khác phân lập được từ *C. longa*

TT	Tên hợp chất
31	phytol
32	(E,E,E)-3,7,11,15-tetramethylhexadeca-1,3,6,10,14-pentaene
33	2,6,11,15-tetramethyl-hexadeca-2,6,8,10,14-pentaene
34	1,6,10,14-hexadecatetraen-3-ol,3,7,11,15-tetramethyl-, (E,E)-
35	hopenone I
36	hop-17(21)-en-3-ol
37	hop-17(21)-en-3-yl acetate
38	β -sitosterol
39	stigmasterol
40	gitoxigenin
41	20-oxopregn-16-en-12-yl acetate
42	linoleic acid
43	8,11-Octadecadienoic acid, methyl ester
44	palmitic acid (n-hexadecanoic acid)
45	oleic acid
46	stearic acid
47	curcuma-J
48	2-(2'-methyl-1'-propenyl)-4, 6-dimethyl-7-hydroxyquinoline
49	2,3,5-trimethylfuran

50	(1,2,3-trimethyl-cyclopent-2-enyl)-methanol
51	dicumyl peroxide
52	1-(3-cyclopentylpropyl)-2,4-dimethyl-benzene
53	1,4-dimethyl-2-(2-methylpropyl)-benzene
54	2,2'-oxybis[octahydro-7,8,8-trimethyl-4,7-methanobenzofuran
55	cyclohexyl formate
56	methyleugenol
57	3,3,5-trimethyl-cyclohexanol acetate
58	2,4-dimethyl-8-oxabicyclo[3.2.1]oct-6-en-3-one
59	2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)-2-cyclohexene-1-carboxaldehyde
60	bicyclo[3.3.1]nonan-9-one, 2,4-dimethyl-3-nitro- (exo)-
61	2,2,4-trimethyl-3-(3,8,12,16-tetramethyl-heptadeca-3,7,11,15-tetraenyl)-cyclohexanol
62	pyrazolo[1,5-a]pyridine, 3,3a,4,7-tetrahydro-3,3-dimethyl-, (3aS)

1.2.6. Hoạt tính sinh học

Hệ phức hợp curcuminoid trong *C. longa* được xem là một nhóm các hợp chất đa đích, có khả năng điều hòa hàng loạt con đường tín hiệu tế bào. Các nghiên cứu hiện đại đã hệ thống hóa các kinh nghiệm sử dụng trong dân gian thành các bằng chứng khoa học, trong đó nổi bật nhất là trực tác dụng gồm chống oxy hóa - kháng viêm - bảo vệ tế bào.

1.2.6.1. Hoạt tính chống oxy hóa và kháng viêm

Đây là hai hoạt tính sinh học cốt lõi, chi phối hầu hết các tác dụng dược lý khác của nghệ và là tiền đề cho các nghiên cứu mô phỏng phân tử (*in silico*) trong luận án này.

Curcuminoid thể hiện khả năng ức chế mạnh mẽ các chất trung gian gây viêm. Ở cấp độ phân tử, các dẫn xuất của nghệ (CUR, DMC và BDMC) hoạt động bằng cách ngăn chặn sự kích hoạt của yếu tố nhân NF- κ B, một yếu tố phiên mã đóng vai trò công tắc khởi động yếu tố phiên mã trung tâm trong việc khởi phát đáp ứng viêm [72]. Quá trình này giúp làm giảm sự biểu hiện của các enzyme gây viêm như COX-2, LOX và các cytokine (TNF- α , IL-1 β , IL-6) [73]. Các nghiên cứu gần đây còn gợi ý khả năng tương tác của curcuminoid với thụ

thể TLR4, mở ra hướng tiếp cận mới trong việc kiểm soát các bệnh lý viêm mãn tính ngay từ giai đoạn khởi phát tín hiệu [74].

Với hệ liên hợp β -diketon và nhóm phenol hydroxyl là yếu tố quyết định khả năng quét gốc tự do, curcuminoid đóng vai trò là chất quét gốc tự do (ROS scavenging) hiệu quả, các gốc nguy hiểm như peroxy và hydroxyl [75]. Bên cạnh việc trung hòa trực tiếp, hoạt chất này còn kích thích hệ thống enzyme bảo vệ nội sinh (như superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase), giúp bảo vệ cấu trúc DNA và màng tế bào khỏi tổn thương do stress oxy hóa [76].

1.2.6.2. Tác dụng trên hệ tiêu hóa và gan mật

Kế thừa tri thức y học cổ truyền, các nghiên cứu dược lý hiện đại đã xác nhận vai trò bảo vệ rõ rệt của nghệ đối với hệ tiêu hóa và gan mật.

Curcumin có tác dụng bảo vệ niêm mạc dạ dày thông qua việc tăng bài tiết chất nhầy (mucin) và bicarbonate, đồng thời ức chế sự bám dính của vi khuẩn *Helicobacter pylori* [77]. Đối với các bệnh lý viêm ruột (IBD) và hội chứng ruột kích thích (IBS), hoạt chất giúp cải thiện đáng kể các triệu chứng đau, đầy hơi và điều hòa nhu động ruột nhờ cơ chế chống co thắt và kháng viêm tại chỗ [78].

Curcuminoid thể hiện khả năng giải độc và bảo vệ tế bào gan trước các tác nhân gây hoại tử như paracetamol, hóa chất độc hại và aflatoxin [79]. Tác dụng lợi mật của nó giúp tăng bài tiết muối mật, giảm nồng độ cholesterol, hỗ trợ ngăn ngừa sỏi mật và cải thiện chức năng gan trong các trường hợp gan nhiễm mỡ hay xơ gan [80].

1.2.6.3. Tác dụng trên hệ chuyển hóa và tim mạch

Trong bối cảnh các bệnh rối loạn chuyển hóa ngày càng gia tăng, curcuminoid nổi lên như một tác nhân điều hòa đa năng. Hoạt chất giúp cải thiện độ nhạy của insulin và ức chế enzyme α -amylase tụy, từ đó kiểm soát hiệu quả mức đường huyết sau ăn [81, 82].

Thông qua việc cải thiện các chỉ số lipid máu (giảm LDL, tăng HDL) và ngăn chặn sự peroxid hóa lipid, curcuminoid giúp giảm thiểu nguy cơ xơ vữa

động mạch. Ngoài ra, khả năng ức chế ngưng tập tiểu cầu của nó góp phần quan trọng trong việc phòng ngừa huyết khối và các biến cố tim mạch [83].

1.2.6.4. Hoạt tính kháng vi sinh vật và cơ chế phòng vệ

Bên cạnh tác dụng trên cơ thể người, *C. longa* còn sở hữu một hàng rào hóa học mạnh để chống lại các tác nhân gây bệnh từ môi trường. Dịch chiết nghệ thể hiện phổ ức chế rộng trên nhiều chủng vi khuẩn Gram dương, Gram âm và các chủng nấm gây bệnh da liễu (*Trichophyton*, *Microsporum*) [84, 85].

Một đặc tính quý của curcumin là khả năng ức chế bơm P-glycoprotein, giúp tái lập độ nhạy cảm của các tế bào vi khuẩn hoặc ung thư đã kháng thuốc, nâng cao hiệu quả của các liệu pháp điều trị phối hợp [86]. Các đặc tính kháng khuẩn và kháng nấm này cũng gợi mở tiềm năng của cây nghệ trong việc đối phó với các loài ký sinh trùng thực vật.

1.2.6.5. Các tác dụng khác và tính an toàn

Ngoài các nhóm tác dụng chính nêu trên, curcuminoid còn cho thấy tiềm năng trong việc bảo vệ hệ thần kinh (chống trầm cảm, ngăn ngừa thoái hóa thần kinh), hỗ trợ điều trị các bệnh lý hô hấp (hen suyễn, COPD) và an toàn khi sử dụng lâu dài [87, 88]. Các nghiên cứu độc tính học đã khẳng định *C. longa* không gây quái thai hay đột biến gen, đảm bảo tính an toàn cho việc phát triển các chế phẩm bảo vệ sức khỏe [89, 90].

1.2.6.6. So sánh hoạt tính giữa ba dạng curcuminoid và định hướng nghiên cứu

Mặc dù hỗn hợp curcuminoid tự nhiên đã được ứng dụng rộng rãi nhờ phổ tác dụng dược lý đa dạng, các nghiên cứu *in vitro* chuyên sâu trên thế giới hiện nay nhấn mạnh tầm quan trọng của việc đánh giá độc lập hoạt tính từng thành phần CUR, DMC và BDMC. Sự hiện diện hay vắng mặt của các nhóm methoxy (-OCH₃) trên vòng aryl ảnh hưởng quyết định đến hoạt lực sinh học của từng hợp chất. Đa số các công bố *in vitro* chỉ ra rằng, trong các thử nghiệm quét gốc tự do (chống oxy hóa), CUR thường thể hiện hoạt tính mạnh nhất. Điều này được giải thích là do hiệu ứng đẩy electron (+I, +M) của nhóm methoxy ở vị trí ortho so với nhóm hydroxyl phenol, làm tăng mật

độ electron trên nguyên tử oxy và qua đó tăng cường khả năng cho nguyên tử hydro [88-90].

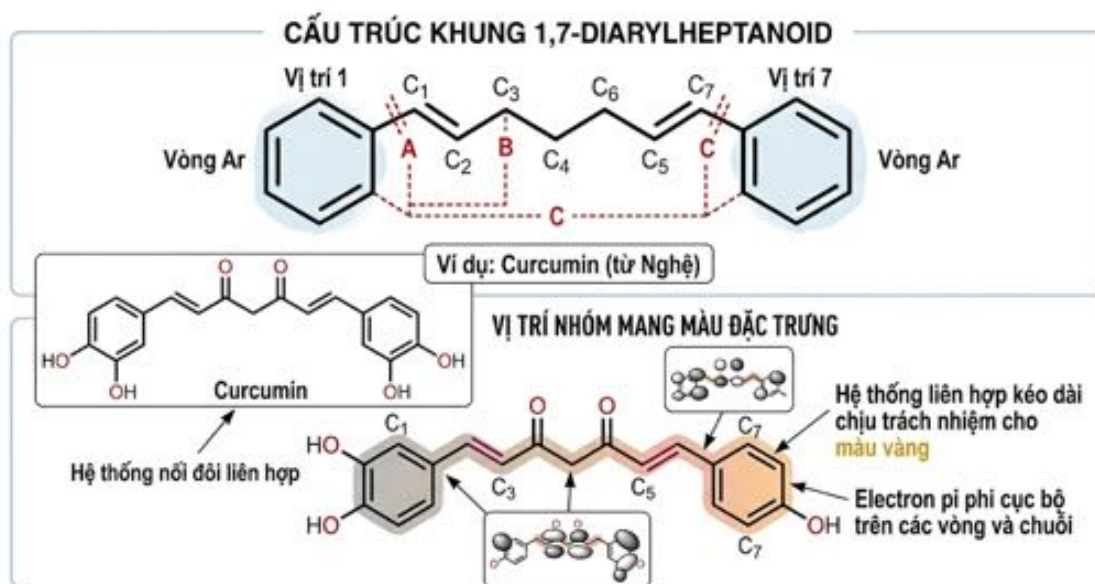
Tuy nhiên, đối với hoạt tính kháng viêm và gây độc tế bào ung thư (cytotoxic), hiệu quả của ba dạng curcuminoid có sự biến thiên đáng kể và không đồng nhất, phụ thuộc vào từng dòng tế bào đích. Một số nghiên cứu *in vitro* cho thấy BDMC, dù có khả năng chống oxy hóa kém hơn CUR, lại thể hiện sự ổn định hóa học cao hơn trong môi trường sinh lý và đôi khi cho tác dụng ức chế biểu hiện các enzyme viêm (như COX-2, iNOS) hoặc ức chế sự tăng sinh của một số dòng tế bào ung thư vượt trội hơn so với CUR [73, 74]. Sự khác biệt về phổ hoạt tính *in vitro* này đặt ra yêu cầu cấp thiết phải phân lập, tinh chế riêng biệt ba dạng curcuminoid để làm sáng tỏ cơ chế tác dụng ở cấp phân tử, từ đó cung cấp tiền đề vững chắc cho việc lựa chọn bộ khung cấu trúc phù hợp nhất trong định hướng bán tổng hợp các dẫn xuất mới có dược tính mạnh hơn.

1.3. Cấu trúc hóa học và tính chất lý hóa của hệ curcuminoid

Khác với các nghiên cứu định lượng thông thường tập trung vào tỷ lệ phân bố, việc nghiên cứu sâu bản chất hóa học và các đặc trưng lý hóa của hệ curcuminoid đóng vai trò tiên quyết trong việc giải thích cơ chế dược lý và độ bền của chúng. Hệ curcuminoid không đơn thuần là một hỗn hợp các chất màu, mà là một tập hợp các dẫn xuất diarylheptanoid có cấu trúc tương đồng nhưng sở hữu những khác biệt tinh tế về mặt điện tử và không gian, quyết định trực tiếp đến khả năng phản ứng và ái lực sinh học của từng thành phần.

1.3.1. Đặc điểm cấu trúc phân tử và hiệu ứng nhóm thế

Về mặt cấu trúc nền tảng, cả ba dẫn xuất chính (CUR, DMC và BDMC) đều được xây dựng trên khung 1,7-diarylheptanoid. Cấu trúc này bao gồm hai vòng thơm (aryl) ở hai đầu, được kết nối bởi một chuỗi mạch thẳng 7 carbon (heptane). Điểm đặc trưng của chuỗi mạch này là sự hiện diện của hệ liên hợp α,β -diketone không bão hòa (hệ heptadiene-3,5-dione). Đây chính là trung tâm phản ứng chịu trách nhiệm cho các tính chất quang học (màu vàng) và khả năng bắt gốc tự do của phân tử.



Hình 1.4. Cấu trúc khung 1,7-diarylheptanoid và vị trí nhóm mang màu đặc trưng

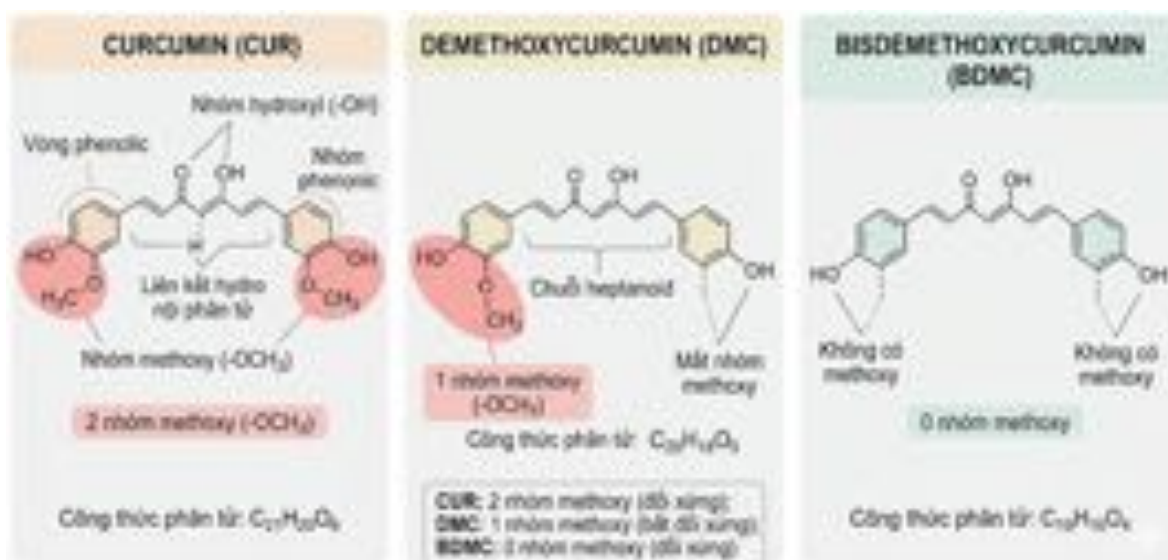
Tuy nhiên, sự phân hóa về tính chất lý hóa giữa ba dẫn xuất này bắt nguồn từ sự biến thiên của các nhóm thế trên vòng thơm, cụ thể là nhóm methoxy (-OCH₃) tại vị trí *ortho* so với nhóm hydroxyl (-OH) phenolic.

CUR sở hữu cấu trúc đối xứng tâm với hai nhóm methoxy hiện diện trên cả hai vòng thơm. Nhóm methoxy là nhóm đẩy electron mạnh (+I, +M), làm tăng mật độ điện tử trên vòng benzene và trên nguyên tử oxy của nhóm hydroxyl phenolic. Về mặt lý thuyết, điều này làm giảm năng lượng phân ly liên kết O-H, thuận lợi cho cơ chế tách hydro (HAT) trong phản ứng chống oxy hóa, nhưng đồng thời cũng làm tăng độ cồng kềnh không gian và tính kỵ nước của phân tử.

DMC là dạng cấu trúc bất đối xứng, lai giữa tính chất của CUR và BDMC khi chỉ còn giữ lại một nhóm methoxy trên một vòng thơm. Sự mất đối xứng này tạo ra sự phân bố điện tích không đồng đều trên hai đầu phân tử, ảnh hưởng đến moment lưỡng cực và khả năng tương tác với các thụ thể sinh học.

BDMC là dẫn xuất có cấu trúc tinh giản nhất, hoàn toàn không chứa nhóm methoxy trên cả hai vòng thơm. Sự vắng mặt của nhóm thế đẩy electron này dẫn đến hai hệ quả quan trọng: Thứ nhất, mật độ điện tử trên

vòng thơm thấp hơn so với CUR, làm thay đổi ái lực phản ứng với các tác nhân oxy hóa. Thứ hai, và quan trọng hơn, cấu trúc trở nên gọn gàng hơn, giảm thiểu các tương tác đẩy không gian, cho phép các phân tử BDMC xếp chồng chặt chẽ hơn trong trạng thái rắn.



Hình 1.5. So sánh cấu trúc hóa học và sự phân bố nhóm thế methoxy của ba dẫn xuất chính: CUR, DMC và BDMC

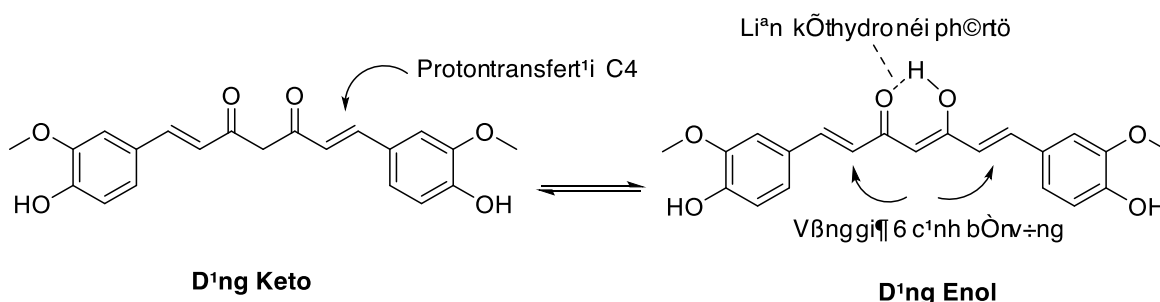
Trong nhiều tài liệu nghiên cứu quốc tế, ba thành phần chính của hệ curcuminoid thường được ký hiệu lần lượt là Curcumin I, Curcumin II và Curcumin III. Tuy nhiên, để đảm bảo tính thống nhất, chính xác về danh pháp hóa học và giúp người đọc dễ theo dõi, trong toàn bộ luận án này, tác giả thống nhất sử dụng hệ thống ký hiệu viết tắt tương đương là CUR (Curcumin, tương đương Curcumin I), DMC (Demethoxycurcumin, tương đương Curcumin II) và BDMC (Bisdemethoxycurcumin, tương đương Curcumin III).

1.3.2. Cân bằng hồ biến và tính chất điện tử

Một đặc tính hóa lý trung tâm chi phối khả năng phản ứng của hệ curcuminoid là sự tồn tại của cân bằng hồ biến (tautomerism) giữa dạng keto và dạng enol. Do sự hiện diện của nhóm methylene linh động (-CH₂-) nằm giữa hai nhóm carbonyl, proton tại vị trí C4 có thể dễ dàng di chuyển để tạo thành hệ liên hợp mới [91, 92].

Các nghiên cứu tinh thể học và phổ học đã chỉ ra rằng, trong pha rắn và trong dung dịch dung môi hữu cơ không phân cực, các curcuminoid tồn tại chủ yếu ở dạng enol. Nguyên nhân là do dạng enol được bền hóa bởi một liên kết hydro nội phân tử vững chắc giữa nhóm -OH enolic và nguyên tử oxy của nhóm carbonyl còn lại, tạo thành một vòng giả 6 cạnh bền vững. Cấu trúc này tạo nên một hệ electron π liên hợp phẳng trải dài toàn bộ phân tử, là cơ sở cho các đỉnh hấp thụ UV-Vis đặc trưng [93, 94].

Tuy nhiên, sự hiện diện của nhóm methoxy ảnh hưởng đáng kể đến hằng số cân bằng của quá trình này. Ở BDMC, do thiếu hiệu ứng đẩy electron từ nhóm methoxy vào hệ liên hợp, khả năng bền hóa dạng enol bị suy giảm so với CUR. Hệ quả là BDMC có xu hướng duy trì cấu trúc dạng keto hoặc có tỷ lệ dạng enol thấp hơn trong một số môi trường dung môi nhất định. Điều này mang ý nghĩa dược lý quan trọng vì dạng keto thường trơ hơn về mặt hóa học đối với các phản ứng oxy hóa cắt mạch, góp phần giải thích cho tính ổn định mạnh hơn của dẫn xuất này [95, 96].



Hình 1.6. Cân bằng hồ biến keto-enol và cơ chế bền hóa dạng enol thông qua liên kết hydro nội phân tử

1.3.3. Nhiệt động học và độ bền cấu trúc

Phân tích các thông số nhiệt động học cung cấp bằng chứng thuyết phục về sự khác biệt trong độ bền cấu trúc giữa các dẫn xuất, đặc biệt là sự bền hơn của BDMC.

Năng lượng mạng lưới tinh thể và nhiệt độ nóng chảy: một chỉ số vật lý phản ánh độ bền của liên kết giữa các phân tử là nhiệt độ nóng chảy. Dữ liệu thực nghiệm cho thấy một sự nhảy vọt về giá trị này: trong khi CUR và

DMC có điểm nóng chảy lần lượt là 184°C và 172°C, thì BDMC đạt mức cao mạnh hơn lên tới 222°C [97, 98]. Sự chênh lệch nhiệt độ lớn này (khoảng 40-50°C) không phải là ngẫu nhiên, mà phản ánh năng lượng mạng lưới tinh thể lớn hơn của BDMC. Cấu trúc không có nhóm methoxy giúp BDMC giảm thiểu cản trở lập thể, cho phép các phân tử đóng gói chặt chẽ hơn, tạo ra nhiều tương tác Van der Waals và liên kết hydro liên phân tử hơn, từ đó tạo nên một trạng thái rắn cực kỳ bền vững.

Độ bền hóa học và kháng thủy phân, hệ khung β -diketone của curcuminoid vốn rất nhạy cảm với môi trường kiềm và các tác nhân oxy hóa. Dưới tác dụng của pH kiềm ($\text{pH} > 7,0$), proton tại vị trí C4 (có tính acid yếu) dễ dàng bị tách ra, dẫn đến sự phân hủy phân tử thông qua phản ứng cắt mạch retro-aldol, tạo thành các sản phẩm như ferulic acid, vanillin và feruloylmethane, làm mất màu và mất hoạt tính dược lý [99, 100]. Tuy nhiên, các nghiên cứu so sánh độ bền đã xác lập một trật tự độ bền như sau : BDMC > DMC > CUR [101].

Trong môi trường kiềm mạnh hoặc tác nhân oxy hóa mạnh, sắc ký đồ của CUR thường xuất hiện dày đặc các đỉnh phụ của sản phẩm phân hủy [102]. Ngược lại, BDMC thể hiện sức đề kháng hóa học tốt hơn, bảo toàn được peak sắc ký chính với diện tích lớn hơn và ít tạp chất hơn [103]. Về độ bền quang hóa, BDMC cũng ít nhạy cảm hơn với bức xạ UV, hạn chế được quá trình quang oxy hóa tạo thành các gốc tự do phá hủy cấu trúc thuốc [104].

Tóm lại, mặc dù CUR là thành phần chính và có hoạt tính mạnh, nhưng chính sự phức tạp của các nhóm thế methoxy lại là làm giảm độ bền của nó. Ngược lại, BDMC với cấu trúc tối giản lại sở hữu những đặc tính lý hóa ưu việt, năng lượng liên kết cao, cấu trúc tinh thể bền vững và khả năng kháng lại các phản ứng phân hủy, biến nó trở thành hoạt chất tiềm năng cho việc phát triển các chế phẩm dược liệu đòi hỏi độ ổn định cao và thời gian bảo quản dài hạn.

1.4. Bán tổng hợp dẫn xuất curcuminoid

Bán tổng hợp (semi-synthesis) là chiến lược sử dụng curcumin tự nhiên, thành phần chiếm 70-80% tổng curcuminoid, dễ phân lập với giá thành thấp làm nguyên liệu đầu, thực hiện các biến đổi hóa học có chọn lọc nhằm khắc phục các yếu điểm cấu trúc đã phân tích trong mục 1.3. Hai vùng mục tiêu chính trên phân tử curcumin bao gồm hệ β -diketone trung tâm (kém bền hóa học, bị cắt mạch retro-aldol và bị khử bởi enzyme pha I) và nhóm -OH phenolic trên vòng thơm (bị liên hợp nhanh bởi enzyme pha II) [55, 105]. Dưới đây tổng quan các chiến lược chính đã được công bố trong tài liệu.

1.4.1. Tổng hợp toàn phần để chủ động nguồn nguyên liệu

Trong nghiên cứu dược liệu, việc phân lập các đơn chất tinh khiết (gồm cả BDMC) thường tốn kém và hiệu suất thấp. Tổng hợp toàn phần đóng vai trò then chốt trong việc cung cấp nguồn nguyên liệu chuẩn và cho phép tiếp cận các dẫn xuất curcuminoid không đối xứng mà tự nhiên hiếm khi tổng hợp được [106, 107].

Phương pháp ngưng tụ Aldol của Pabon sử dụng boron trioxide (B_2O_3) để tạo phức với acetylacetone. Việc tạo phức này đóng vai trò bảo vệ vị trí carbon trung tâm (C4), giúp phản ứng ngưng tụ chỉ xảy ra tại hai nhóm methyl ở đầu mạch, từ đó tạo ra khung curcuminoid với độ tinh khiết cao (>98%) [108]. Đây là cơ sở quan trọng để các nhà nghiên cứu so sánh hoạt tính đối chứng giữa chất tự nhiên và chất tổng hợp.

1.4.2. Chiến lược bán tổng hợp và biến đổi cấu trúc

Bán tổng hợp tận dụng nguồn curcumin tự nhiên sẵn có, chi phí thấp để thực hiện các biến đổi hóa học nhắm vào hai vùng cấu trúc yếu điểm của phân tử.

a) Chiến lược bền hóa hệ β -diketone bằng dị vòng hóa

Hệ liên hợp 1,3- β -diketone ở trung tâm phân tử là vùng kém bền nhất (dễ bị cắt mạch retro-aldol ở pH kiềm) và đồng thời là vị trí chuyển hóa chính (bị khử thành tetrahydro- hoặc hexahydrocurcumin). Một hướng đi phổ biến

là chuyển hóa nhóm này thành các dị vòng bền vững hơn như pyrazole hoặc isoxazole. Phản ứng của curcumin với hydrazine (hoặc các dẫn xuất thế arylhydrazine) tạo dị vòng pyrazole hoặc isoxazole bền nhiệt động, hoàn toàn kháng lại retro-aldol và khử hóa enzyme. Các dẫn xuất curcumin-pyrazole hoặc curcumin-isoxazole đã được chứng minh duy trì hoặc tăng cường ái lực với vi ống tubulin, bền với retro-aldol, kháng lại khử hóa enzyme, và trong nhiều trường hợp duy trì hoặc tăng cường ái lực với các đích sinh học như tubulin và COX-2. Các dẫn xuất dị vòng này (ví dụ: curcumin-pyrazole) đã được chứng minh đã tổng hợp các dẫn xuất indole lấy cảm hứng từ curcumin và chứng minh hoạt tính ức chế sự trùng hợp tubulin trên nhiều dòng tế bào ung thư [55, 105].

Phức hợp difluoroboron được tạo phức hệ β -diketone với BF_2 cho các phức chất có tính chất quang học đặc biệt (huỳnh quang mạnh) và độ ổn định tăng. Alsalam và cộng sự (2026) đã tổng hợp và đánh giá *in silico* các phức difluoroboron curcumin analogue, thể hiện tiềm năng ức chế dòng tế bào leukemia K562 [99, 100].

Hạn chế chung của chiến lược biến đổi β -diketone là loại bỏ hoàn toàn hệ keto-enol, đồng nghĩa mất khả năng chelate ion kim loại và một số tương tác liên kết hydrogen nội phân tử, các đặc tính có vai trò trong cơ chế chống oxy hóa của curcumin [44]. Do đó, các dẫn xuất thu được thực chất là các pharmacophore mới cần đánh giá hoạt tính riêng biệt.

b) Biến đổi nhóm -OH phenolic

Hai nhóm -OH phenolic là đích tấn công chính của enzyme chuyển hóa pha II (glucuronid hóa, sulfat hóa) tại thành ruột và gan, gây đào thải nhanh curcumin [1, 2]. Chiến lược che chắn các nhóm -OH vừa bảo vệ phân tử khỏi liên hợp pha II, vừa bảo tồn nguyên vẹn hệ β -diketone. Tùy thuộc vào bản chất liên kết hóa học, chiến lược này chia thành hai nhánh có bản chất dược động học khác nhau.

Ester hóa - Chiến lược tiền thuốc (prodrug): Phản ứng ester hóa tạo liên kết ester (C-O-C=O) giữa nhóm -OH phenolic với acid hữu cơ. Liên

kết ester bị thủy phân bởi esterase nội sinh (carboxylesterase, paraoxonase), giải phóng curcumin tự do, đây là nguyên lý cốt lõi của chiến lược prodrug [109, 110]. Srivastava và cộng sự (2016) đã tổng hợp dẫn xuất ester curcumin-NSAID (liên hợp với ibuprofen, naproxen) và xác nhận cấu trúc bằng phổ nghiệm kết hợp phân tích DFT [109, 110]. Parvathy (2009) phát triển hướng ester hóa với acid amin (glycine, alanine), tạo dẫn xuất có độ tan trong nước cải thiện nhờ nhóm amin có thể proton hóa ở pH acid [99]. Ưu điểm của chiến lược ester hóa là khả năng giải phóng đúng hoạt chất gốc (curcumin). Hạn chế chính là liên kết ester có thể bị thủy phân sớm tại dạ dày hoặc huyết tương trước khi đến mô đích [109, 110].

Ether hóa - Tạo thực thể hóa học mới: Phản ứng ether hóa (thường qua phản ứng Williamson với alkyl halide trong điều kiện bazơ) tạo liên kết ether (C-O-C). Khác biệt căn bản với ester hóa, liên kết ether rất bền trong điều kiện sinh lý và không bị thủy phân bởi enzyme nội sinh phổ biến. Do đó, các dẫn xuất ether curcumin không phải là tiền thuốc (prodrug), không giải phóng curcumin tự do *in vivo* mà là các thực thể hóa học mới (new chemical entities, NCE) với hoạt tính sinh học riêng biệt cần được đánh giá độc lập [109, 110]. Ưu điểm của ether hóa bao gồm: che chắn hoàn toàn nhóm -OH khỏi enzyme pha II; tăng tính thân dầu (lipophilicity); độ ổn định hóa học cao [109, 110]. Trong số các nhóm alkyl được nghiên cứu (methyl, benzyl, allyl, propargyl...), gốc propargyl (-CH₂-C≡CH) nhận được sự chú ý nhờ chứa liên kết ba alkyne đầu mạch (terminal alkyne), tiền chất cho phản ứng click chemistry (azide-alkyne cycloaddition, CuAAC), một công cụ ghép nối hiệu quả trong hóa sinh hiện đại. Phản ứng đưa gốc propargyl vào curcumin được thực hiện thuận lợi qua phản ứng ether hóa Williamson với propargyl bromide, sử dụng K₂CO₃ trong dung môi phân cực phi proton.

Sự phân biệt rõ ràng giữa ester hóa (prodrug, thủy phân giải phóng CUR) và ether hóa (NCE, không giải phóng CUR) có ý nghĩa quan trọng trong diễn giải kết quả thực nghiệm: với dẫn xuất ester, hoạt tính *in vitro*

phản ánh hiệu quả của curcumin được giải phóng; trong khi với dẫn xuất ether, hoạt tính phản ánh khả năng tương tác riêng biệt của toàn bộ phân tử dẫn xuất với đích sinh học.

1.4.3. Cấu trúc, hoạt tính của zerumbone và tiềm năng lai hóa với curcumin

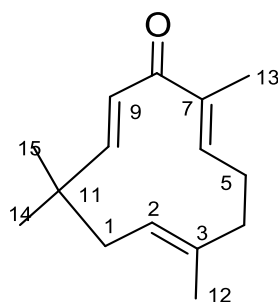
a) Nguyên lý lai hóa phân tử

Lai hóa phân tử (molecular hybridization) là chiến lược trong đó hai khung dược chất (pharmacophores) có hoạt tính sinh học khác nhau được ghép nối cộng hóa trị vào một cấu trúc duy nhất, tạo hợp chất lai có khả năng tương tác đồng thời với nhiều đích phân tử. So với liệu pháp phối hợp (dùng hai thuốc riêng biệt), hợp chất lai có ưu thế về dược động học (một phân tử, một profil ADME) và giảm nguy cơ tương tác thuốc-thuốc [54]. Trong lĩnh vực curcuminoid, chiến lược lai hóa đã được đề xuất với nhiều đối tác (coumarin, chalcone, thiazolidinedione, ferrocene...) nhưng việc lai hóa với một hoạt chất thiên nhiên cùng họ thực vật còn ít được khai thác [44].

b) Cấu trúc hóa học của zerumbone

Zerumbone ((2*E*,6*E*,10*E*)-2,6,9,9-tetramethylcycloundeca-2,6,10-trien-1-one, C₁₅H₂₂O, KLPT 218,33 g/mol) là một sesquiterpene đơn vòng (monocyclic sesquiterpene) phân lập chủ yếu từ thân rễ cây Gừng gió (*Zingiber zerumbet* (L.) Roscoe ex Sm.), một loài thuộc họ Zingiberaceae phân bố rộng rãi ở vùng nhiệt đới Đông Nam Á [111].

Về mặt cấu trúc, zerumbone sở hữu vòng carbocyclic 11 cạnh (khung humulane) chứa ba liên kết đôi và một nhóm carbonyl. Đặc điểm cấu trúc then chốt nhất là hệ α,β -enone liên hợp (liên kết đôi C2=C3 liên hợp với nhóm carbonyl C1=O). Hệ α,β -enone này hoạt động như một chất nhận Michael (Michael acceptor), có khả năng phản ứng cộng hợp 1,4 (Michael addition) với các nhóm nucleophilic mạnh trong tế bào, đặc biệt là nhóm thiol (-SH) trên cysteine của các protein đích. Đây là cơ chế tác dụng phân tử đặc trưng nhất phân biệt zerumbone với curcumin, hợp chất chủ yếu tương tác với đích sinh học thông qua các liên kết không cộng hóa trị [111].



Hình 1.7. Cấu trúc hóa học của zerumbone

c) Hoạt tính sinh học

Zerumbone đã được nghiên cứu rộng rãi về hoạt tính sinh học. Dưới đây là các nhóm hoạt tính chính có liên quan đến nội dung luận án:

Về hoạt tính kháng viêm, zerumbone ức chế phản ứng viêm thông qua nhiều con đường tín hiệu, trong đó nổi bật nhất là ức chế hoạt hóa NF- κ B. Theo tổng quan của Haque và cộng sự (2017), zerumbone ngăn chặn phosphoryl hóa và phân hủy I κ B α , dẫn đến ức chế sự chuyển vị NF- κ B vào nhân và giảm biểu hiện các gen tiền viêm bao gồm iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β và IL-6 [111]. Nghiên cứu chứng minh trực tiếp trên mô hình tổn thương gan cấp ở chuột rằng zerumbone phát huy tác dụng bảo vệ thông qua ức chế con đường TLR4/NF- κ B/COX-2, đồng thời giảm nồng độ TNF- α và IL-6 trong huyết thanh [112]. Phát hiện này có ý nghĩa đặc biệt trong bối cảnh luận án sử dụng mô phỏng docking phân tử trên phức hệ TLR4/MD-2 để khảo sát tương tác phân tử của curcuminoid.

Về hoạt tính gây độc tế bào ung thư, zerumbone thể hiện hoạt tính ức chế tăng sinh trên nhiều dòng tế bào ung thư (ví, cổ tử cung, gan, tụy, u thần kinh đệm) thông qua cơ chế đa đích: cảm ứng apoptosis qua con đường mitochondria (tăng Bax, giảm Bcl-2, hoạt hóa caspase-3 và PARP); ức chế chu kỳ tế bào; ức chế xâm lấn và di căn. Đặc điểm nổi bật là tính chọn lọc, hoạt tính trên tế bào ung thư cao hơn so với tế bào bình thường [113]. Tính chọn lọc này liên quan đến sự khác biệt về thế oxy hóa - khử giữa tế bào ung thư và tế bào bình thường [111].

Về hoạt tính kháng vi sinh vật, zerumbone là tác nhân kháng khuẩn tiềm năng đối với *Streptococcus mutans*, vi khuẩn gây sâu răng chính [114, 115]. Tuy nhiên, phổ kháng vi sinh vật của zerumbone nhìn chung hẹp hơn so với curcumin và cần được nghiên cứu thêm [111].

Về hoạt tính chống oxy hóa của zerumbone trên *in vivo*, thể hiện qua việc phục hồi hoạt tính enzyme SOD và GSH-Px, đồng thời giảm mức MDA (sản phẩm peroxy hóa lipid) trên mô hình chuột [112]. Zerumbone có khả năng hoạt hóa con đường Nrf2/ARE, dẫn đến tăng cường biểu hiện các enzyme chống oxy hóa nội sinh như HO-1 [111].

d) So sánh curcumin và zerumbone - cơ sở cho chiến lược lai hóa

Curcumin và zerumbone, mặc dù thuộc hai lớp hợp chất khác nhau (diarylheptanoid vs. sesquiterpene), chia sẻ một số đích phân tử chung, đặc biệt là NF- κ B nhưng tác động thông qua cơ chế phân tử khác nhau [111]:

Curcumin chủ yếu tương tác với đích sinh học chủ yếu qua *liên kết không cộng hóa trị* (liên kết hydrogen, tương tác kỵ nước, tương tác Van der Waals). Hệ β -diketone và nhóm -OH phenolic đóng vai trò chính trong các tương tác này.

Zerumbone chủ yếu tương tác qua *liên kết cộng hóa trị*, phản ứng Michael addition giữa hệ α,β -enone với nhóm thiol trên cysteine của protein đích (như I κ B kinase). Đây là tương tác không thuận nghịch hoặc chậm thuận nghịch [111].

Sự hỗ trợ về cơ chế tác dụng (non-covalent vs. covalent) trên cùng con đường tín hiệu là tiền đề lý thuyết cho giả thuyết: một dẫn xuất lai chứa đồng thời cả hai pharmacophore có thể tương tác với đích sinh học theo cách thức mới, kết hợp hai loại tương tác. Đặc biệt, zerumbone cũng đã được chứng minh ức chế con đường TLR4/NF- κ B/COX-2 [112], cùng con đường mà curcuminoid tương tác qua phức hợp TLR4/MD-2 tạo thêm cơ sở cho giả thuyết hỗ trợ.

e) Bằng chứng thực nghiệm về phối hợp curcumin-zerumbone

Nghiên cứu tác dụng phối hợp curcumin và zerumbone *dưới dạng hỗn hợp* (combination, chưa phải dẫn xuất lai cộng hóa trị) trên mô hình ung thư

đại trực tràng *in vivo* và *in vitro*. Kết quả cho thấy hỗn hợp curcumin+ zerumbone cải thiện khả năng ức chế yếu tố tăng sinh mạch máu VEGF-A và giảm tăng sinh tế bào ung thư so với khi sử dụng từng chất đơn lẻ [114, 115].

Phối hợp dạng hỗn hợp (combination) khi hai chất riêng biệt được dùng đồng thời; mỗi chất có profil dược động học riêng, tương tác độc lập với đích.

Dẫn xuất lai cộng hóa trị (molecular hybrid) khi hai pharmacophore được ghép nối thành một phân tử duy nhất; chia sẻ cùng profil ADME và có thể ảnh hưởng lẫn nhau về mặt lập thể và điện tử.

Hiệu ứng quan sát được trên hỗn hợp không thể suy luận trực tiếp cho dẫn xuất lai, và ngược lại. Đây là điểm cần được kiểm chứng bằng thực nghiệm riêng.

f) Thách thức còn tồn tại

Bên cạnh tiềm năng, một số thách thức cần được nhận diện khi đánh giá hướng lai hóa curcumin-zerumbone:

- Tính thân dầu cao, curcumin có $\log P \approx 3,0$ và zerumbone có $\log P \approx 3,9$. Dẫn xuất lai sẽ có $\log P$ dự kiến vượt 5 - ngưỡng trên của quy tắc Lipinski cho sinh khả dụng đường uống. Tuy nhiên, quy tắc Lipinski là hướng dẫn chứ không phải giới hạn tuyệt đối, và $\log P$ cao có thể là lợi thế nếu phát triển theo đường tiêm hoặc kết hợp với hệ phân phối nano.

- Hiệu ứng lập thể, vòng 11 cạnh của zerumbone có kích thước lớn và cấu hình không linh động. Khi gắn vào vị trí -OH phenolic trên curcumin, hiệu ứng cản trở lập thể có thể ảnh hưởng đến tốc độ và hiệu suất phản ứng ghép nối, cũng như khả năng tiếp cận đích sinh học của dẫn xuất lai.

- Bảo tồn hoạt tính hai pharmacophore, việc ghép nối cộng hóa trị có thể ảnh hưởng đến hình học phân tử, hạn chế khả năng tương tác của từng pharmacophore với đích riêng. Liệu hệ β -diketone của curcumin và hệ α,β -enone của zerumbone có còn duy trì ái lực với đích sinh học sau khi ghép nối hay không là câu hỏi cần thực nghiệm trả lời.

- Khoảng trống tài liệu, cho đến thời điểm thực hiện tổng quan này, chưa có công trình nào trong tài liệu công bố dẫn xuất lai curcumin-zerumbone được tổng hợp qua liên kết cộng hóa trị. Tất cả dữ liệu hiện có về phối hợp curcumin-zerumbone đều ở dạng hỗn hợp [114, 115].

Tóm lại, zerumbone được đánh giá là ứng viên lai hóa phù hợp với curcumin do cùng họ thực vật Zingiberaceae; cùng sở hữu hoạt tính kháng viêm, kháng ung thư và chống oxy hóa đã được xác nhận trên nhiều mô hình [111-113]; cơ chế tác dụng bổ trợ với curcumin [111]; bằng chứng sơ bộ về tác dụng phối hợp trên mô hình ung thư [114, 115] và cùng can thiệp vào con đường TLR4/NF- κ B [112]. Chiến lược lai hóa cụ thể, vị trí ghép nối và quy trình tổng hợp được trình bày trong Chương 2.

1.5. Tổng quan lĩnh vực mô phỏng *in silico* trong nghiên cứu

Trong nghiên cứu phát triển thuốc hiện đại, các phương pháp tính toán *in silico* đóng vai trò ngày càng quan trọng, cho phép dự đoán tính chất phân tử, sàng lọc ứng viên và giải thích cơ chế tác dụng ở cấp độ nguyên tử trước khi tiến hành thực nghiệm [116]. Đối với hệ curcuminoid, các hợp chất đa đích với cơ chế hoạt động phức tạp, công cụ tính toán đã cung cấp những hiểu biết có giá trị mà thực nghiệm đơn thuần khó đạt được. Mục này tổng quan ba nhóm phương pháp *in silico* chính đã được ứng dụng trong nghiên cứu curcuminoid gồm hóa học tính toán lượng tử, mô phỏng lắp ghép phân tử, và mô phỏng động lực học phân tử.

1.5.1. Ứng dụng hóa học tính toán lượng tử trong giải mã cơ chế chống oxy hóa

Lý thuyết phiếm hàm mật độ (Density Functional Theory, DFT) là phương pháp cơ học lượng tử được sử dụng rộng rãi để nghiên cứu cấu trúc điện tử, độ bền nhiệt động và cơ chế phản ứng hóa học của các hợp chất hữu cơ [116]. Trong lĩnh vực curcuminoid, DFT đã được áp dụng để giải quyết hai vấn đề chính là cân bằng keto-enol và cơ chế chống oxy hóa.

a) Cân bằng keto-enol của curcuminoid

Curcuminoid tồn tại ở dạng cân bằng giữa hai đồng phân hỗ biến (tautomer) là dạng keto (1,3-diketone) và dạng enol (β -hydroxy- α,β -unsaturated ketone). Sử dụng phương pháp DFT/B3LYP để nghiên cứu cấu trúc điện tử của curcumin, xác nhận rằng dạng enol bền vững hơn dạng keto nhờ hệ liên kết hydrogen nội phân tử (O-H...O) và hệ electron π liên hợp mở rộng [91, 92]. Kết quả phân tích HOMO-LUMO cho thấy dạng enol có khoảng cách năng lượng HOMO-LUMO nhỏ hơn, tương ứng với khả năng phản ứng cao hơn [91, 92]. Khi tính đến hiệu ứng phân tán (dispersion), sự chênh lệch năng lượng giữa dạng enol và keto của curcumin còn rõ rệt hơn so với tính toán không bao gồm phân tán, nhấn mạnh tầm quan trọng của việc lựa chọn phương pháp tính toán phù hợp [93, 94].

b) So sánh cơ chế chống oxy hóa giữa các curcuminoid

Hoạt tính chống oxy hóa của curcuminoid được đánh giá thông qua khả năng quét gốc tự do, với ba cơ chế chính được đề xuất [117]:

Chuyển nguyên tử hydrogen (HAT - Hydrogen Atom Transfer): Phân tử chống oxy hóa nhường trực tiếp nguyên tử H (gồm cả proton và electron) cho gốc tự do. Thông số đánh giá: năng lượng phân ly liên kết (BDE).

Chuyển electron đơn lẻ - chuyển proton (SET-PT - Single Electron Transfer followed by Proton Transfer): Phân tử nhường electron trước, tạo cation radical, sau đó mất proton. Thông số gồm thế ion hóa (IP) và năng lượng phân ly proton (PDE).

Mất proton liên tiếp - chuyển electron (SPLET - Sequential Proton Loss Electron Transfer): Phân tử mất proton trước (tạo anion), sau đó anion nhường electron. Thông số gồm ái lực proton (PA) và enthalpy chuyển electron (ETE).

Hoạt tính chống oxy hóa của curcuminoid không chỉ phụ thuộc vào số lượng nhóm hydroxyl (-OH) mà còn bị chi phối bởi cấu trúc điện tử và môi trường dung môi. Các nghiên cứu DFT (Lý thuyết phiếm hàm mật độ) trên thế giới [118] đã đưa ra những kết luận quan trọng:

- Các tính toán năng lượng đã khẳng định dạng enol bền vững hơn dạng keto khoảng 5-10 kcal/mol nhờ hệ liên kết hydro nội phân tử và hệ electron π liên hợp. Đây là dạng có vai trò chính trong hoạt tính dọn gốc tự do [117].

- Các mô phỏng DFT đã làm sáng tỏ sự cạnh tranh giữa ba cơ chế chính là chuyển nguyên tử hydro (HAT), chuyển electron-proton đơn lẻ (SET-PT) và mất proton liên tiếp chuyển electron (SPLET) [117].

- Trong môi trường không phân cực (như lipid), cơ chế HAT chiếm ưu thế, với nhóm -OH phenolic là vị trí phản ứng chính. Trong môi trường phân cực (như nước, huyết tương), cơ chế SPLET trở nên thuận lợi hơn về mặt nhiệt động học [119].

- Các nghiên cứu so sánh giữa CUR và BDMC đã chỉ ra vai trò của nhóm methoxy (-OCH₃). Trong khi nhóm này giúp ổn định gốc tự do phenoxy của CUR thông qua hiệu ứng cộng hưởng, thì sự vắng mặt của nó ở BDMC lại làm giảm cản trở lập thể, cho phép tiếp cận tốt hơn với một số loại gốc tự do kích thước nhỏ. Tuy nhiên, các dữ liệu về động học phản ứng (kinetics) của BDMC vẫn còn ít được công bố so với CUR [119, 120].

1.5.2. Mô phỏng lắp ghép phân tử phân tích tương tác protein - phối tử

Mô phỏng lắp ghép phân tử (molecular docking) là phương pháp tính toán dự đoán cấu hình liên kết (dock pose) và ái lực liên kết (binding affinity) của một phối tử (ligand) với protein đích (receptor). Phương pháp này cho phép sàng lọc nhanh nhiều hợp chất trên cùng một đích, dự đoán năng lượng liên kết tự do (ΔG), và xác định các amino acid tham gia tương tác (liên kết hydrogen, tương tác kỵ nước, tương tác π - π ...) [116]. Trong nghiên cứu curcuminoid, mô phỏng docking phân tử đã được ứng dụng trên nhiều protein đích sinh học khác nhau:

a) Docking curcumin với phức hệ TLR4/MD-2

Phức hệ Toll-like receptor 4/Myeloid differentiation factor 2 (TLR4/MD-2) đóng vai trò trung tâm trong nhận diện lipopolysaccharide (LPS) và khởi phát dòng thác tín hiệu viêm. Nghiên cứu kết hợp docking

phân tử, mô phỏng động lực học phân tử và thực nghiệm để làm rõ cơ chế tương tác giữa curcumin với protein MD-2 [63]. Kết quả docking cho thấy curcumin gắn vào túi kỵ nước (hydrophobic pocket) của MD-2 - cùng vị trí gắn kết của LPS - thông qua các tương tác kỵ nước với các amino acid lót trong túi và liên kết hydrogen với chuỗi bên. Đặc biệt, nghiên cứu xác nhận curcumin tương tác với Cys133 trên MD-2, và thực nghiệm đột biến (mutagenesis) xác nhận vai trò thiết yếu của Cys133 trong liên kết curcumin - MD-2 [121]. Sự gắn kết của curcumin vào MD-2 ngăn cản quá trình nhị hợp hóa (dimerization) TLR4/MD-2/LPS, từ đó ức chế kích hoạt NF- κ B và giảm biểu hiện cytokine tiền viêm.

Đây là nghiên cứu *in silico* quan trọng nhất về tương tác curcumin-TLR4/MD-2 trong tài liệu, và kết quả đã được xác nhận bằng thực nghiệm (surface plasmon resonance, mutagenesis). Tuy nhiên, nghiên cứu chỉ thực hiện trên CUR - dữ liệu docking và MD cho DMC và BDMC trên cùng đích TLR4/MD-2 chưa được công bố, tạo nên khoảng trống mà luận án hướng đến.

b) Docking curcumin với các đích kháng ung thư và kháng tiểu đường

Ngoài TLR4/MD-2, curcumin và các curcuminoid đã được docking với nhiều đích phân tử khác. Docking curcumin với cyclin dependent kinase (CDK) - protein quan trọng trong điều hòa chu kỳ tế bào - cho thấy curcumin có ái lực liên kết với active site của CDK, gợi ý cơ chế ức chế tăng sinh tế bào ung thư ở cấp độ phân tử [122]. Sử dụng docking để đánh giá tương tác curcumin với các đích liên quan đến tiểu đường type 2 (α -glucosidase, α -amylase), xác nhận tiềm năng ức chế enzyme của curcumin trên các đích chuyển hóa carbohydrate [56].

Các nghiên cứu docking trên cho thấy tính đa đích (multi-target) của curcumin, khả năng tương tác với nhiều protein thuộc các con đường tín hiệu khác nhau. Tuy nhiên, một hạn chế phổ biến là phần lớn dữ liệu docking chỉ thực hiện trên CUR; dữ liệu so sánh đối chứng giữa CUR, DMC và BDMC trên cùng đích phân tử còn thiếu.

1.5.3. Mô phỏng động lực học phân tử (MD simulation)

Docking phân tử cung cấp bức tranh tĩnh về tương tác thuốc đích tại một thời điểm, nhưng không phản ánh được tính linh động của phức hợp trong điều kiện sinh lý. Mô phỏng động lực học phân tử (Molecular Dynamics, MD) khắc phục hạn chế này bằng cách mô phỏng chuyển động của toàn bộ hệ thống (protein + ligand + dung môi + ion) theo thời gian (thường 10-100 ns), dựa trên các phương trình cơ học Newton [116]. Kết quả MD cung cấp các thông số đánh giá độ bền phức hệ theo thời gian: RMSD (Root Mean Square Deviation, đánh giá sự ổn định cấu trúc tổng thể), RMSF (Root Mean Square Fluctuation, đánh giá tính linh động từng amino acid), số lượng liên kết hydrogen trung bình, và năng lượng liên kết tự do (qua phương pháp MM-PBSA hoặc MM-GBSA).

Các nghiên cứu thực hiện mô phỏng MD thời gian 20 ns trên phức hệ curcumin-MD-2, xác nhận rằng phức hệ duy trì ổn định trong suốt quá trình mô phỏng, với curcumin nằm gọn trong túi kỵ nước của MD-2 [121]. Tuy nhiên, một số nghiên cứu MD trên các đích khác nhận thấy phức hệ curcumin-protein đôi khi kém bền do cấu trúc phân tử curcumin có nhiều liên kết có thể quay tự do (rotatable bonds) trong chuỗi heptanoid, dẫn đến sự dao động lớn về cấu hình liên kết [116]. Quan sát này đặt ra câu hỏi liệu các dẫn xuất bán tổng hợp, đặc biệt dẫn xuất lai có kích thước lớn hơn và cấu trúc cứng hơn (như dẫn xuất zerumbone với vòng 11 cạnh), có thể cải thiện độ bền phức hợp với protein đích hay không.

Bên cạnh nghiên cứu cơ sở phân tử của các tác dụng chống oxy hóa và kháng viêm, các công cụ *in silico* hiện nay còn đóng vai trò quan trọng trong việc khắc phục nhược điểm của curcumin là độ hòa tan kém và sinh khả dụng thấp. Thông qua các mô hình dự đoán dược động học ADMET (hấp thu, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính), các phân tích *in silico* cho phép đánh giá nhanh các thông số hóa lý (như quy tắc Lipinski, diện tích bề mặt phân cực) của các hợp chất. Nhờ đó, các nhà nghiên cứu có thể định hướng thiết kế, can

thiếp vào các nhóm chức (như ether hóa, lai hóa) nhằm tối ưu hóa tính thân nước mà không làm mất đi hoạt tính sinh học chính. Đồng thời, trong lĩnh vực kháng ung thư, phương pháp docking phân tử (molecular docking) đang được ứng dụng mạnh mẽ để mô phỏng tương tác của curcumin và các dẫn xuất bán tổng hợp với các đích protein quan trọng của chu kỳ tế bào (như EGFR, VEGFR, hay các protein kinase). Kết quả từ *in silico* làm rõ cơ chế ức chế khối u ở cấp độ phân tử và giúp sàng lọc, dự đoán chính xác các cấu trúc dẫn xuất tiềm năng trước khi tiến hành thực nghiệm *in vitro*, tiết kiệm đáng kể thời gian và chi phí nghiên cứu.

Từ tổng quan tài liệu trên, có thể nhận diện các khoảng trống trong lĩnh vực mô phỏng *in silico* curcuminoid phân lớn các nghiên cứu DFT và docking chỉ thực hiện trên CUR hoặc trên một curcuminoid riêng lẻ. Dữ liệu so sánh đối chứng có hệ thống giữa ba curcuminoid (CUR, DMC, BDMC) trên cùng đích phân tử (đặc biệt TLR4/MD-2) bằng cả docking và mô phỏng MD còn thiếu [121]. Nghiên cứu DFT so sánh cơ chế chống oxy hóa giữa các curcuminoid mới bắt đầu được thực hiện, đối chiếu với thực nghiệm DPPH/ABTS còn hạn chế. Dữ liệu docking và MD cho các dẫn xuất bán tổng hợp mới (dẫn xuất ether, dẫn xuất lai curcumin-zerumbone) trên đích TLR4/MD-2 hoàn toàn chưa có trong tài liệu.

Sử dụng docking phân tử để dự đoán ái lực liên kết của cả ba curcuminoid tinh khiết và các dẫn xuất bán tổng hợp trên cùng đích TLR4/MD-2; sau đó sử dụng mô phỏng MD để đánh giá độ bền phức hệ thuốc–protein đích theo thời gian; đối chiếu kết quả *in silico* với dữ liệu thực nghiệm *in vitro* (kháng viêm, chống oxy hóa) nhằm đề xuất cơ chế tác dụng ở cấp độ phân tử. Phương pháp tính toán cụ thể (phần mềm, force field, thời gian mô phỏng, phương pháp phân tích) được trình bày trong Chương 2.

CHƯƠNG 2

ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các mẫu đất và củ nghệ (*C. longa* L.) đã được thu thập ngẫu nhiên tại Tu Mơ Rông, Kon Tum, vào tháng 10 năm 2024 và ở Ba Bể, Bắc Kạn vào tháng 10 năm 2024. Mẫu nghệ 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, mẫu được lưu giữ tại Phòng Hóa sinh Nông nghiệp và Tinh dầu, Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trong phạm vi luận án này, bộ phận được tập trung thu mẫu, phân tích hóa thực vật và chiết xuất là phần dưới mặt đất (thân rễ/củ) của cây nghệ vàng, nơi tích lũy hàm lượng curcuminoid cao nhất.



Hình 2.1. Mẫu củ nghệ (*C. longa* L.)

2.2. Phương pháp chiết xuất, phân lập và xác định cấu trúc hoá học curcuminoid [123-125]

2.2.1. Phương pháp xử lý và chiết mẫu

Mẫu sau khi thu hái được thái nhỏ, phơi trong bóng mát, sấy khô ở nhiệt độ 60 °C đến khối lượng không đổi, sau đó đem nghiền nhỏ. Mẫu được ngâm chiết 3 lần etanol trong thiết bị siêu âm ở nhiệt độ phòng. Dịch tổng thu được cất kiệt dung môi dưới áp suất giảm, nhiệt độ < 50 °C thu được cặn ethanol. Cặn ethanol được thêm nước và chiết với dung môi ethyl acetate. Sau khi cất loại dung môi thu được cao ethyl acetate và nước tương ứng.

2.2.2. Phương pháp phân tích, phân lập các hợp chất

Các loại dung môi để ngâm chiết mẫu sử dụng loại công nghiệp hoặc kỹ thuật, dung môi để phân tích và phân lập các hợp chất đều dùng loại tinh khiết (pure), khi dùng cho các loại sắc ký cột, sắc ký bản mỏng, sắc ký lớp mỏng điều chế phải sử dụng loại tinh khiết phân tích (PA).

Việc phân tích, phân tách các phân dịch chiết cây được thực hiện bằng các phương pháp sắc ký khác nhau: sắc ký lớp mỏng (TLC), sắc ký lớp mỏng điều chế (PTLC), 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) và sắc ký rây phân tử với pha tĩnh là sephadex LH-20 (Merck).

Sắc ký lớp mỏng (TLC): Sắc ký lớp mỏng 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 254 nm và 365 nm hoặc dùng thuốc thử là dung dịch vanilin - H₂SO₄ 5% trong methanol.

Sắc ký cột thường (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 rây 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 μ m.

2.2.3. Phương pháp xác định cấu trúc hóa học

Cấu trúc hóa học của các hợp chất phân lập được xác định dựa vào việc nghiên cứu các đặc trưng hóa lý (R_f trên bản mỏng, trạng thái, màu sắc, điểm nóng chảy) kết hợp với phân tích phổ NMR, MS của các chất và so sánh với dữ liệu trong tài liệu tham khảo. Các thiết bị hiện đại và phương pháp sử dụng để xác định cấu trúc hóa học các hợp chất được sử dụng:

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

Phổ khối lượng (MS): Phổ khối (phun mù điện tử) LC-ESI-MS được đo trên máy Agilent 1200 TRAP. Phổ khối 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 nhân (NMR): Phổ NMR đo trên máy Bruker Avance 500 và 600 MHz (Chất chuẩn nội là TMS), tại Viện Hóa học - Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Các kỹ thuật được sử dụng: cộng hưởng từ hạt nhân một chiều (1D: $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$ và DEPT); cộng hưởng từ hạt nhân hai chiều (2D: HSQC, HMBC, COSY và NOESY). Các loại dung môi được sử dụng: DMSO- d_6 , CD_3OD và CDCl_3 theo nguyên tắc dung môi phải hòa tan hoàn toàn mẫu đo.

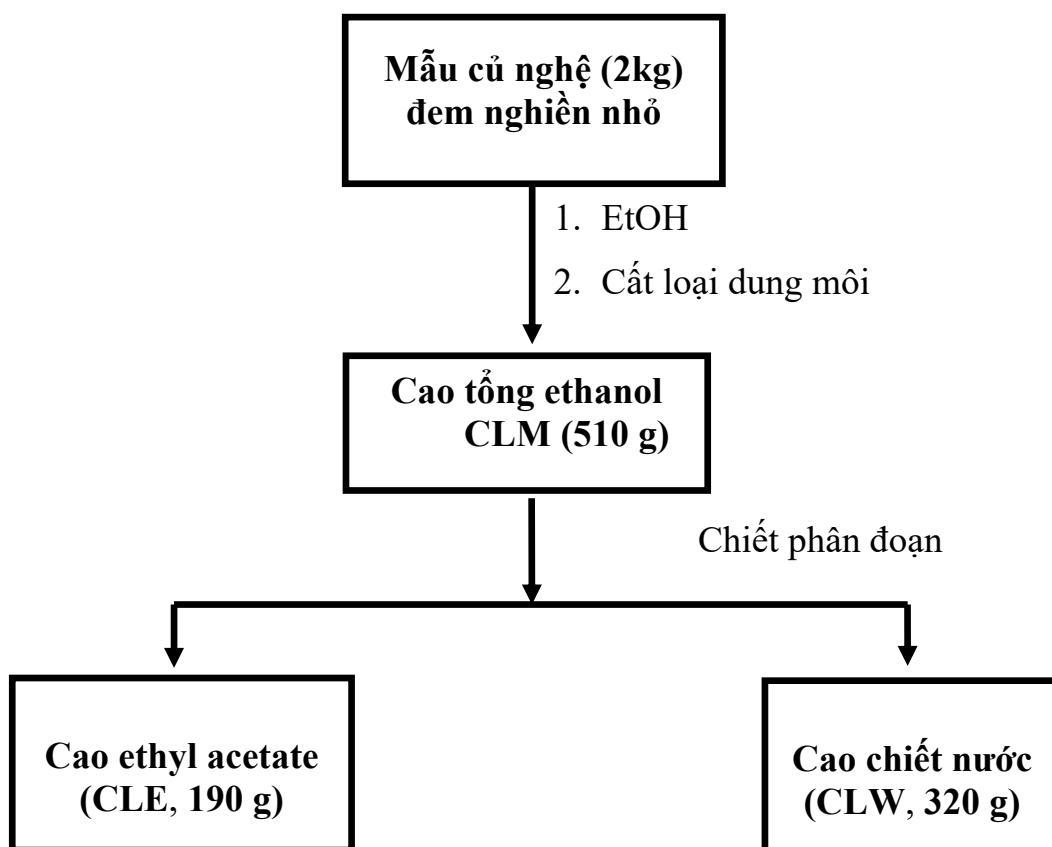
2.2.4. Phân lập các hợp chất curcuminoid từ củ nghệ

Mẫu củ *Curcuma longa* L. khô (2,0 kg) đem nghiền nhỏ và ngâm chiết 3 lần với ethanol (EtOH) trong thiết bị siêu âm ở nhiệt độ phòng. Dịch tổng thu được cất kiệt dung môi dưới áp suất giảm, nhiệt độ $< 50^\circ\text{C}$ thu được cao cô EtOH (510g). Cặn cô EtOH được thêm nước và chiết với dung ethyl acetate (EtOAc) sau đó cất kiệt dung môi thu được các cao tương ứng: EtOAc (CLE: 190 g) và nước (CLW: 320 g). Việc thu nhận các dịch chiết từ củ nghệ được tóm tắt trong Hình 2.2.

Cao chiết ethyl acetate (CLE, 90g) được tiến hành tách thô trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi rửa giải HE 0 \rightarrow 100% (tỷ lệ ethyl acetate tăng từ 0 \rightarrow 100%) thu được 5 phân đoạn (CLE1 \rightarrow CLE5).

Phân đoạn CLE2 (5,0 g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (50:1 \rightarrow 10:1), phân đoạn thu được tiếp tục tách lại trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi *n*-hexane-EtOAc (30:1 \rightarrow 10:1), sau đó kết tinh lại trong dung môi aceton thu được hợp chất curcumin (CUR: 30,8 mg).

Phân đoạn **CLE3** (4,0 g) được phân tách trên sắc ký cột pha đảo RP-18 với hệ dung môi methanol-nước (3:7), thu được 3 phân đoạn nhỏ (**CLE3.1**→**CLE3.3**). Phân đoạn **CLE3.2** được tinh chế qua cột sephadex-LH20 với dung môi rửa giải methanol, sau đó kết tinh lại trong dung môi acetone thu được hợp chất demethoxycurcumin (**DMC**: 19,6 mg).



Hình 2.2. Sơ đồ thu nhận các dịch chiết từ củ nghệ

Phân đoạn **CLE4** (3,6 g) phân tách trên sắc ký cột silica gel pha thường với hệ dung môi $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (99:1→10:1). Phân đoạn **CLH4.3** được tinh chế qua cột sephadex-LH20 với dung môi rửa giải methanol, sau đó kết tinh lại trong dung môi acetone thu được hợp chất bisdemethoxycurcumin (**BDMC**: 8,0 mg).

2.3. Phương pháp bán tổng hợp tạo các dẫn xuất curcumin

2.3.1. Tạo các dẫn xuất curcumin-zerumbone

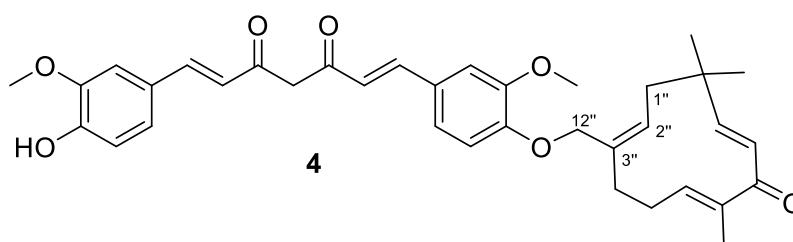
Bán tổng hợp các curcumin-zerumbone được thể hiện qua 2 giai đoạn như sau: Giai đoạn 1 (Brom hóa): Zerumbone (**2**) được phản ứng với N-bromosuccinimide (NBS) trong hệ dung môi hỗn hợp acetonitrile: nước (1:1).

Quá trình này thu được kết tủa trắng là dẫn xuất 3-bromozerumbone (**3**) với hiệu suất gần định lượng (>95%). Giai đoạn 2 (Phản ứng thế): Curcumin (**1**) được phản ứng với 3-bromozerumbone (sản phẩm của giai đoạn 1) với sự tham gia của xúc tác base K_2CO_3 trong dung môi DMF, khuấy ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Tinh chế: Hỗn hợp sau phản ứng được chiết bằng EtOAc, sau đó sản phẩm thô được tinh chế bằng sắc ký cột silica gel (hệ dung môi *n*-hexane: acetone 1,5:1) và cuối cùng được làm sạch bằng HPLC để thu được sản phẩm curcumin-monozerumbone (**4**) với hiệu suất 15% và curcumin-biszerumbone (**5**) với hiệu suất 11% [126, 127].

Dẫn xuất curcumin-monozerumbone (**4**): Dạng bột màu vàng, hiệu suất 15%, nhiệt độ nóng chảy (mp): 118-120 °C.

Phổ 1H -NMR(600 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm): 9,64 (1H, s, -OH phenol); 7,57 (2H, d, $J=7,2$ Hz); 7,34 (2H, d, $J=18,0$ Hz); 7,25 (1H, s); 7,15 - 7,10 (2H, m); 6,83 - 6,75 (3H, m); 6,12 - 5,94 (4H, m); 5,57 - 5,54 (1H, m); 4,69 (1H, m); 4,37 (1H, m); 3,84 (3H, s, -OCH₃); 3,81 (3H, s, -OCH₃); 2,61 - 2,59 (1H, m); 2,29 (2H, m); 1,99 - 1,97 (1H, m); 1,67 (3H, s, -CH₃); 1,22 (3H, s, -CH₃); 1,05 (3H, s, -CH₃).

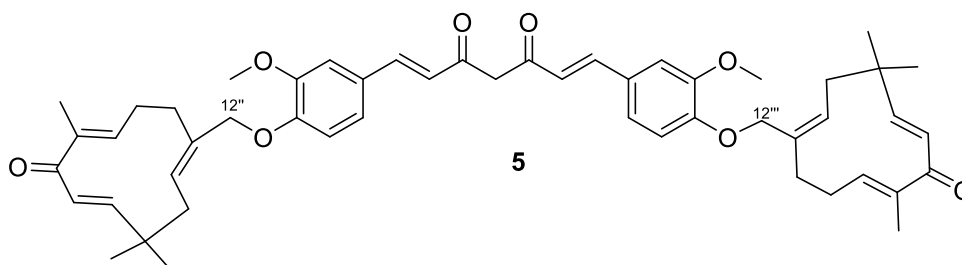
Phổ ^{13}C -NMR(150 MHz, DMSO- d_6); δ (ppm): 183,7 (C=O); 182,6 (C=O); 159,9; 150,1; 149,4; 148,7; 148,0; 140,9; 140,1; 137,8; 135,1; 130,4; 127,9; 126,8; 126,3; 123,1; 122,6; 122,1; 121,1; 115,7; 113,3; 111,4; 110,6; 100,8; 65,6 (-O-CH₂-/hoặc C mạch hở); 55,7 (-OCH₃); 55,5 (-OCH₃); 41,6; 37,0; 35,0; 28,9; 24,3; 23,7 (-CH₃); 11,7 (-CH₃).



Dẫn xuất curcumin-biszerumbone (**5**): Dạng bột màu vàng, hiệu suất 11%, nhiệt độ nóng chảy (mp): 138-140 °C.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, DMSO-d_6); δ (ppm): 7,55 (2H, d, $J= 15,5$ Hz, H-alken); 7,35 (2H, d, H-Ar); 7,15 (2H, dd, H-Ar); 7,10 (2H, d, H-Ar); 6,80 (2H, d, $J= 15,0 - 16,0$ Hz, H-alken); 6,15 - 5,90 (8H, m, H-alken vòng zerumbone); 5,55 (2H, m, H-vòng); 4,69 (2H, m, -O-CH-); 4,37 (2H, m, H-vòng); 3,84 (6H, s, 2 x -OCH₃); 2,60 (2H, m); 2,29 (4H, m); 1,98 (2H, m); 1,67 (6H, s, 2 x -CH₃); 1,22 (6H, s, 2 x -CH₃); 1,05 (6H, s, 2 x -CH₃).

Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (150 MHz, DMSO-d_6); δ (ppm): 183,0 (C=O, 2C do đôi xứng); 159,9; 150,0; 149,3; 140,8; 140,0; 137,8; 135,0; 130,4; 127,8; 126,7; 126,2; 123,0; 122,6; 122,1; 121,0; 115,6; 111,4; 100,8; 65,6 (-O-CH-); 55,6 (2 x -OCH₃); 41,5; 36,9; 34,9; 28,8; 24,2 (2 x -CH₃); 23,6 (2 x -CH₃); 11,7 (2 x -CH₃).

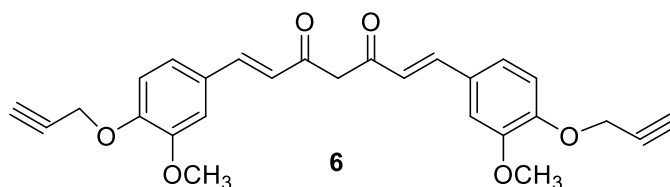


2.3.2. Tạo các dẫn xuất di-propargyl curcumin

Bán tổng hợp dẫn xuất di-propargyl curcumin được thực hiện thông qua phản ứng ether hóa Williamson [128, 129]. Hòa tan curcumin (1,00 g; 2,71 mmol) trong 15 ml dung môi phân cực khan DMF, thêm K_2CO_3 khan (1,12 g; 8,13 mmol, 3,0 đương lượng) và khuấy ở nhiệt độ phòng 30 phút. Nhỏ giọt từ từ propargyl bromide (0,80 g; 6,77 mmol, 2,5 đương lượng) vào hỗn hợp, tiếp tục khuấy ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Kết thúc phản ứng, pha loãng hỗn hợp với nước cất, chiết bằng ethyl acetate, rửa pha hữu cơ bằng brine, làm khan với Na_2SO_4 khan và cô quay chân không. Cặn thô được tinh chế qua sắc ký cột silicagel, rửa giải gradient bằng hệ *n*-hexane/ethyl acetate (từ 20/1 đến 5/1), thu được dẫn xuất di-propargyl curcumin (**6**) (hiệu suất 21%).

Dẫn xuất di-propargyl curcumin (**6**): Dạng bột màu vàng, hiệu suất 21%, nhiệt độ nóng chảy (mp): 128-129 °C.

Phổ $^1\text{H-NMR}$ (600MHz, DMSO- d_6); 193,1 δ (ppm): 7,66 (2H, d, $J=15,6$ Hz, H-alken); 7,44 (2H, d, $J=1,8$ Hz, H-Ar); 7,35 (2H, dd, $J= 8,4$ và $2,4$ Hz, H-Ar); 7,09 (2H, d, $J= 8,4$ Hz, H-Ar); 7,07 (2H, d, $J=15,6$ Hz, H-alken); 4,89 (4H, d, $J= 2,4$ Hz, $-\text{OCH}_2\text{-propargyl}$); 3,87 (6H, s, $-\text{OCH}_3$); 3,61 (2H, t, $J= 2,4$ Hz, $-\text{C}\equiv\text{CH}$); 3,20 (4H, m); 2,96 (2H, m). Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (150MHz, DMSO- d_6); δ (ppm): 193,1 (C=O); 149,3 (C-Ar); 149,2 (C-Ar); 144,5 (C-alken); 127,5 (C-alken); 123,6 (C-Ar); 119,2 (C-Ar); 113,5 (C-Ar); 111,5 (C-Ar); 79,6 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$); 78,8 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$); 78,5 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$); 74,4 ($-\text{C}\equiv\text{CH}$); 65,9 ($-\text{OCH}_2-$); 56,0 ($-\text{OCH}_3$); 55,8 ($-\text{OCH}_3$); 30,6; 20,7.



2.4. Các phương pháp đánh giá hoạt tính sinh học *in vitro*

2.4.1. Thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa (Phương pháp DPPH)

Khả năng quét gốc tự do được đánh giá thông qua thử nghiệm với thuốc thử 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) theo phương pháp của Brand-Williams và cộng sự [130].

Chuẩn bị dung dịch: Các mẫu thử được hòa tan trong dimethyl sulfoxide (DMSO) 100% để tạo dung dịch gốc. Dung dịch DPPH được pha trong ethanol 96% ở nồng độ 0,2 mM (OD điều chỉnh về khoảng $1,0 \pm 0,02$ tại bước sóng 517 nm).

Tiến hành: Trên đĩa vi phiên 96 giếng, 100 μL mẫu thử được pha loãng theo dãy nồng độ giảm dần (200; 100; 50; 25; 12,5 $\mu\text{g/mL}$). Bổ sung 100 μL dung dịch DPPH vào từng giếng, lắc nhẹ và ủ hỗn hợp phản ứng trong bóng tối ở nhiệt độ phòng trong 30 phút. Mật độ quang học (OD) được đo ở bước sóng 517 nm bằng máy đọc vi phiên (Infinite F50, Tecan). Mỗi nồng độ được thực hiện lặp lại 3 lần.

Tính toán: Phần trăm quét gốc tự do (%SC) được tính theo công thức: $\%SC = [(OD_{\text{đối chứng}} - OD_{\text{đầu}}) / OD_{\text{đối chứng}}] \times 100$. Giá trị SC_{50} (nồng độ quét 50% gốc tự do, tương đương IC_{50}) được xác định từ đường cong đáp ứng liều bằng phần mềm TableCurve. Acid ascorbic (vitamin C) được sử dụng làm chất đối chứng dương.

2.4.2. Thử nghiệm hoạt tính kháng viêm *in vitro* (Ức chế sản sinh NO)

Khả năng kháng viêm được đánh giá thông qua việc đo lường mức độ ức chế sản sinh nitric oxide (NO) trên dòng tế bào đại thực bào chuột RAW 264.7 theo phương pháp của Griess [131].

Nuôi cấy tế bào: Tế bào RAW 264.7 được nuôi cấy trong môi trường DMEM bổ sung 10% huyết thanh bò bào thai (FBS) và 1% penicillin/streptomycin, duy trì ở điều kiện 37°C, 5% CO₂. Tế bào được cấy lên đĩa 96 giếng với mật độ 2×10^5 tế bào/giếng và ủ tiền 24 giờ để tế bào bám đáy.

Tiến hành: Tế bào được kích thích phản ứng viêm bằng lipopolysaccharide (LPS) nồng độ 1 µg/mL. Đồng thời, tế bào được xử lý với các nồng độ mẫu thử khác nhau và ủ trong 24 giờ. Lượng NO giải phóng ra môi trường nuôi cấy được định lượng gián tiếp thông qua nồng độ nitrit (NO₂⁻) bằng thuốc thử Griess (1% sulfanilamide và 0,1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine trong 5% H₃PO₄). Độ hấp thụ quang học được đo ở bước sóng 540 nm. Cardamonin được sử dụng làm chất đối chứng dương. Giá trị IC_{50} được xác định thông qua phương trình hồi quy tuyến tính.

Kiểm soát độc tính: Độc tính của mẫu thử trên tế bào RAW 264.7 được kiểm tra song song bằng phương pháp MTT để đảm bảo sự giảm NO là do tác dụng kháng viêm chứ không phải do gây chết tế bào.

2.4.3. Thử nghiệm hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* (Phương pháp MTT)

Hoạt tính gây độc tế bào được đánh giá trên năm dòng tế bào ung thư người: ung thư gan (Hep-G2), ung thư cổ tử cung (HeLa), ung thư vú (MCF-7), ung thư phổi (A549) và ung thư dạ dày (HGC-27), dựa trên nguyên lý

chuyển hóa muối MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) thành tinh thể formazan màu tím bởi enzyme succinate dehydrogenase của ty thể trong tế bào sống [132].

Nuôi cấy: Các dòng tế bào được nuôi cấy trong môi trường thích hợp (DMEM cho Hep-G2, HeLa, HGC-27; EMEM cho MCF-7; RPMI 1640 cho A549) bổ sung 10% FBS và 1% penicillin/streptomycin. Tế bào được cấy vào đĩa 96 giếng với mật độ 1×10^4 tế bào/giếng và ủ tiên 24 giờ để tế bào bám đáy.

Tiến hành: Tế bào được xử lý với mẫu thử ở dải nồng độ từ 1 đến 100 $\mu\text{g/mL}$ và ủ trong 48 giờ ở điều kiện 37°C , 5% CO_2 . Sau thời gian ủ, thêm 10 μL dung dịch MTT (5 mg/mL trong PBS) vào mỗi giếng và ủ tiếp 4 giờ. Loại bỏ dịch nổi, hòa tan tinh thể formazan bằng 100 μL DMSO. Mật độ quang (OD) được đo ở bước sóng 540 nm với bước sóng tham chiếu 720 nm. Paclitaxel (Taxol) được sử dụng làm chất đối chứng dương. Giá trị IC_{50} (nồng độ ức chế 50% sự sống sót của tế bào) được tính toán từ đồ thị biểu diễn tỷ lệ % tế bào sống sót theo nồng độ.

2.4.4. Thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm *in vitro* (Xác định MIC)

Hoạt tính kháng vi sinh vật được xác định bằng phương pháp pha loãng trên đĩa 96 giếng (broth microdilution method) theo hướng dẫn của CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) [133], nhằm xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC).

Các chủng vi sinh vật thử nghiệm: 4 chủng vi khuẩn (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*), cùng 4 chủng vi nấm (*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*).

Tiến hành: Các mẫu thử được pha loãng bậc 2 trong môi trường canh thang Mueller-Hinton (cho vi khuẩn) hoặc Sabouraud Dextrose (cho vi nấm), dải nồng độ từ 256 đến 1 $\mu\text{g/mL}$. Hỗn dịch vi sinh vật được chuẩn hóa độ đục

theo thang McFarland 0,5 (tương đương khoảng $1-2 \times 10^8$ CFU/mL) và cấy vào các giếng đã chứa mẫu thử.

Điều kiện ủ: Đĩa được ủ ở 37°C trong 18-24 giờ đối với vi khuẩn và 28-30°C trong 48-72 giờ đối với vi nấm. Giá trị MIC được xác định là nồng độ mẫu thử thấp nhất mà tại đó không quan sát thấy sự sinh trưởng của vi sinh vật bằng mắt thường (giếng hoàn toàn trong suốt), được xác nhận bằng máy đọc OD ở bước sóng 630 nm. Streptomycin và nystatin được sử dụng làm kháng sinh đối chứng cho vi khuẩn và vi nấm, tương ứng.

2.5. Phương pháp phân lập và định danh tuyến trùng

2.5.1. Phương pháp phân lập

Tại mỗi điểm thu mẫu, 1 kg đất và 100 g rễ được lấy từ vùng rễ (rhizosphere) ở độ sâu 10-25 cm. Mẫu được bảo quản trong túi nilon kín, vận chuyển về phòng thí nghiệm và xử lý trong vòng 48 giờ. Tuyến trùng được tách ra từ đất bằng phương pháp khay Baermann cải tiến (modified Baermann tray method). Các mẫu rễ được rửa sạch kỹ dưới vòi nước máy, cắt thành các đoạn nhỏ 0,5 cm và đặt trên phễu Baermann cải tiến trong 48 giờ để thu hồi các tuyến trùng nội ký sinh. Các cá thể tuyến trùng sau khi tách được chọn lọc thủ công (hand-picking) dưới kính hiển vi soi nổi để phục vụ cho các phân tích hình thái và sinh học phân tử tiếp theo [134].

Xác định mật độ tuyến trùng: Tuyến trùng được đếm bằng đĩa đếm (counting dish) dưới kính hiển vi soi nổi. Kết quả được biểu thị dưới dạng số cá thể trên 100 g đất hoặc 5 g rễ.

2.5.2. Đặc điểm hình thái

Tuyến trùng tươi được diệt bằng nhiệt ở 60-70°C trong 30 giây và chuyển ngay vào dung dịch cố định TAF (8 ml formalin 40%, 2 ml triethanolamine, 90 ml nước cất) theo phương pháp của Courtney, Polley. Các mẫu vật cố định được xử lý chuyển sang glycerin khan bằng phương pháp khử nước chậm của Seinhorst [135]. Các tiêu bản cố định (lam kính) được chuẩn bị và dán kín bằng parafin. Các phép đo hình thái được thực hiện

bằng Kính hiển vi Olympus BX51 (vật kính $\times 40$ và $\times 100$ ngâm dầu) được trang bị camera kỹ thuật số và ống vẽ. Các bức ảnh vi thể và bản vẽ được chuẩn bị để mô tả phân loại.

2.5.3. Đặc điểm sinh học phân tử

Tách chiết riêng DNA, tuyến trùng sống được tách riêng và rửa ba lần trong nước cất vô trùng. Từng cá thể được chuyển vào ống PCR 0,2 ml và cắt thành các mảnh nhỏ trong 20 μ l đệm ly giải (worm lysis buffer: 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3; 2,5 mM MgCl₂, 0,45% NP-40; 0,45% Tween-20). Các mẫu được ủ ở -20°C trong ít nhất 10 phút, sau đó thêm 1 μ l proteinase K (1,2 mg/ml). Quá trình ly giải được thực hiện ở 65°C trong 1 giờ, sau đó bất hoạt enzyme ở 95°C trong 10 phút [136, 137].

Khuếch đại vùng D2-D3 của 28S rRNA sử dụng các môi D2A (5'-ACAAGTACCGTGAGGGAAAGTTG-3') và D3B (5'-TCGGAAGGAACCAGCTACTA-3') [136, 137]. Phản ứng PCR (tổng thể tích 25 μ l) gồm: 12,5 μ l PCR Master Mix 2x, 1 μ l mỗi môi (10 μ M), 2 μ l DNA khuôn mẫu, và nước vô trùng vừa đủ. Chu trình nhiệt: biến tính khởi đầu 94°C/4 phút; 5 chu kỳ (94°C/30 s, 45°C/30 s, 72°C/2 phút); 35 chu kỳ (94°C/30 s, 54°C/30 s, 72°C/1 phút); kéo dài cuối 72°C/10 phút; giữ ở 12°C.

Khuếch đại vùng ITS rDNA sử dụng Môi Vrain2F (5'-CTTTGTACACACCGCCCGTCG-3') và Vrain2R (5'-TTTCACTCGCCGTTACTAAGG-3'). Chu trình nhiệt: biến tính khởi đầu 94°C/4 phút; 40 chu kỳ (94°C/30 s, 54°C/30 s, 72°C/2 phút); kéo dài cuối 72°C/10 phút; giữ ở 12°C.

Khuếch đại gen COI mtDNA: Môi JB3 (5'-TTTTTTGGGCATCCTGAGGTTTAT-3') và JB4 (5'-TAAAGAAAGAACATAATGAAAATG-3') được sử dụng. Chu trình nhiệt tương tự vùng 28S với nhiệt độ bắt cặp môi (annealing) là 45°C [136, 137].

Giải trình tự và phân tích, tất cả sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5% nhuộm bằng ethidium bromide (hoặc SYBR Safe).

Các mẫu khuếch đại thành công được tinh sạch và giải trình tự thương mại bởi Macrogen Inc. (Châu Âu). Các sắc ký đồ thô (chromatograms) được lắp ráp và chỉnh sửa trong phần mềm Geneious R11 (Biomatters Ltd.). Tìm kiếm BLAST được sử dụng để đánh giá độ tương đồng với các trình tự hiện có trong GenBank. Các trình tự được giống hàng bằng MUSCLE v5.3, và phân tích phát sinh loài được thực hiện trong MrBayes v3.2.6. Các mô hình thay thế nucleotide phù hợp nhất được chọn bằng MEGA7 dựa trên Tiêu chuẩn Thông tin Akaike (AIC) [137, 138].

2.5.4. Phân tích thành phần của nghệ liên quan đến nhiễm tuyến trùng

Nghiên cứu này khảo sát ảnh hưởng của tuyến trùng *S. curcumae* sp. n. lên một số thông số chính gồm đặc điểm tổng thể của đất (pH, độ ẩm và nitrogen tổng số), các chỉ số của cây nghệ, hàm lượng curcuminoid, và cụ thể là nồng độ của CUR, DMC và BDMC.

Đo pH đất được thực hiện theo tiêu chuẩn TCVN 5979:2021 (ISO 10390:2021) [139].

Xác định nitrogen tổng số (phương pháp Kjeldahl) được thực hiện theo tiêu chuẩn TCVN 6498:1999 [140].

Định lượng curcuminoid bằng HPLC sử dụng thân rễ nghệ khô (210 ngày tuổi) được nghiền thành bột mịn, cân chính xác và chiết bằng dung môi. Dịch chiết được lọc qua màng 0,45 μm trước khi bơm vào hệ thống HPLC [141].

Điều kiện HPLC: Hệ thống Agilent 1260 với đầu dò UV-Vis. Cột phân tích: Eclipse XDB-C18 (150 \times 4,6 mm, 5 μm) kèm tiền cột cùng loại (Agilent). Pha động đẳng dòng (isocratic): kênh A, nước chứa 0,1% acid formic (formic acid, FA); kênh B, acetonitril (ACN); kênh C, methanol (MeOH); tỷ lệ A:B:C = 40:25:35 (v/v/v). Tốc độ dòng: 0,5 ml/phút; thể tích tiêm: 5 μL ; nhiệt độ cột: 30°C; bước sóng phát hiện: 428 nm; tổng thời gian phân tích: 30 phút [142].

2.6. Phương pháp nghiên cứu mô phỏng *in silico*

2.6.1. Mô phỏng dự đoán hoạt tính dọn dẹp gốc tự do HOO· [143, 144]

Sử dụng phần mềm Gaussian 16 Revision C.01 cho tất cả các tính toán lý thuyết phiếm hàm mật độ (DFT). Cấu trúc hình học và điện tử, nhiệt động học và động học của các dạng trung hòa và dạng ion được khảo sát bằng cách sử dụng phiếm hàm M06-2X, kết hợp với bộ hàm cơ sở 6-31+G (d,p). Độ chính xác của các mức năng lượng thu được đã được cải thiện bằng cách sử dụng bộ cơ sở Pople cao hơn là 6-311++G(3df,3pd). Các phương pháp tính toán này đã được áp dụng thành công cho các hệ phân tử khác nhau trong các nghiên cứu gần đây.

Hệ số tỷ lệ (scaling factor) là 0,952 đã được áp dụng cho các tính toán tần số dao động. Các cấu trúc trạng thái chuyển tiếp được xác nhận bằng sự hiện diện của đúng một tần số ảo duy nhất (one imaginary frequency) tương ứng với chuyển động dọc theo tọa độ phản ứng. Tính toán tọa độ phản ứng nội tại (IRC), sử dụng bộ tích hợp dự báo, hiệu chỉnh dựa trên Hessian (HPC), được thực hiện để xác nhận rằng trạng thái chuyển tiếp kết nối đúng chất phản ứng và sản phẩm.

Ảnh hưởng của dung môi, bao gồm nước ($\epsilon = 78,3553$) và pentyl ethanoate (PEA, $\epsilon = 4,7297$), được mô hình hóa bằng cách sử dụng mô hình Solvent hóa dựa trên mật độ (SMD) - mô hình tương tác của điện tích cơ học lượng tử của phân tử chất tan với mô tả liên tục của dung môi. Sự phân bố cấu hình của các hợp chất nghiên cứu được dự đoán bằng MSTor.

Ảnh hưởng của cân bằng acid–base đến hoạt động dọn gốc HOO· trong các dung môi cũng đã được xem xét. Trong môi trường lipid (giả lập bởi dung môi PEA), tất cả các hợp chất nghiên cứu được giả định tồn tại ở dạng trung hòa. Ngược lại, trong môi trường phân cực (tức là nước), ba vị trí khử proton (deprotonation) khác nhau có thể tồn tại trong các nhóm hydroxyl hoặc methylene.

Các hằng số phân ly acid (pK_a) được tính toán bằng các mô hình bán thực nghiệm do Rebolgar-Zepeda và cộng sự đề xuất cho các dẫn xuất phenolic. Cơ chế chống oxy hóa và động học của dạng trung hòa cùng ba dạng anion sau đó được dự đoán thông qua ba quá trình tiêu chuẩn: Tách hydro (Abs), Cộng gốc (Add), và Chuyển electron đơn (SET).

Sơ đồ các phức chất tiền phản ứng do Singleton và Cvetanovic đề xuất được sử dụng cho các tính toán động học của phản ứng Abs và Add. Các tính toán tọa độ phản ứng nội tại (IRC), sử dụng bộ tích hợp dự báo-hiệu chỉnh dựa trên Hessian (HPC), đã được thực hiện để xác nhận xem tần số mô phỏng có tương ứng với chuyển động thích hợp dọc theo tọa độ phản ứng hay không.

Công cụ Gaussian Post Processor (GPOP) được sử dụng để tính toán hằng số tốc độ của tất cả các phản ứng. Năng lượng tự do Gibbs hoạt hóa của phản ứng SET được tính toán dựa trên lý thuyết Marcus. Hằng số tốc độ biểu kiến đã hiệu chỉnh khuếch tán trong dung môi được tính toán bằng lý thuyết Collins–Kimball và hằng số tốc độ Smoluchowski ở trạng thái ổn định.

Cuối cùng, các hằng số tốc độ tổng thể (k_{overall}) được tính bằng tổng của hằng số tốc độ cho các phản ứng Abs (k_{Abs}), Add (k_{Add}), và SET (k_{SET}), có tính đến phần mol của từng dạng acid–base và dạng hỗ biến (tautomeric) tương ứng thông qua phương trình sau (phương trình (1)):

$$k_{\text{overall}} = F_{\text{diketone}} \times \sum(X_{\text{fi}} \times k_{\text{tot}}^i) + F_{\text{keto-enol}} \times \sum(X_{\text{fi}} \times k_{\text{tot}}^i) \quad (1)$$

Trong đó: i biểu thị các dạng trung hòa, monoanion, dianion và trianion của CUR và BDMC. k_{tot}^i đại diện cho tổng hằng số tốc độ cho ba cơ chế được nghiên cứu (tức là Abs, Add và SET), với $k_{\text{tot}} = k_{\text{Abs}} + k_{\text{Add}} + k_{\text{SET}}$. F_{diketone} và $F_{\text{keto-enol}}$ lần lượt là phần mol của các dạng diketone và keto-enol của CUR.

2.6.2. Mô phỏng dự đoán cơ chế hoạt tính chống viêm [144, 145]

2.6.2.1. Chuẩn bị phối tử và protein

Các curcuminoid được xây dựng cấu trúc không gian hai chiều và ba chiều bằng phần mềm MarvinSketch (v19.27.0) và PyMOL (v1.3.r1). Các cấu

trúc được cực tiểu hóa năng lượng bằng phần mềm Gabedit (v2.5.0). Để tương ứng với nghiên cứu thực nghiệm sử dụng dòng tế bào RAW264.7, các mô phỏng lắp ghép phân tử (docking phân tử) tập trung vào phức hợp protein TLR4/MD-2 của chuột. Cấu trúc tinh thể tia X của TLR4/MD-2 được truy xuất từ Ngân hàng Dữ liệu Protein RCSB (RCSB PDB) với các mã định danh 2Z64 và 3VQ2. Cả hai mô hình đều nằm trong phạm vi độ phân giải chất lượng cao từ 1,5-3,0 Å. Ban đầu, dạng đơn phân (monomeric), không chứa LPS (2Z64) được sử dụng để xác định vị trí liên kết giả định ở trạng thái bất hoạt. Sau đó, cấu hình hoạt động dạng nhị phân (dimeric) (3VQ2), đặc trưng bởi sự hiện diện của LPS, được sử dụng để xác nhận các cấu hình liên kết và dự đoán tiềm năng ức chế của các hợp chất được nghiên cứu.

2.6.2.2. Docking phân tử sử dụng Autodock

Việc chuẩn bị tham số đầu vào cho protein và phối tử được thực hiện bằng phần mềm AutoDock Tools v1.5.6rc3 (ADT). Protein được loại bỏ các phân tử nước kết tinh, sau đó, bổ sung các nguyên tử hydro phân cực, tham số solvat hóa và điện tích riêng phần Kollman. Để xác định không gian mô phỏng liên kết, một hộp lưới (grid box) được thiết lập với kích thước đủ để bao gồm các amino acid tham gia cấu thành nên vùng hoạt động của protein. Quá trình docking phân tử được thực hiện bằng thuật toán di truyền Lamarckian (LGA) trong AutoDock 4.2.6. Sau mô phỏng, cấu hình có năng lượng tự do liên kết thấp nhất từ cụm (cluster) có mật độ cao nhất được chọn để phân tích dữ liệu. Độ tin cậy của quy trình docking được kiểm chứng bằng cách re-docking phối tử đồng kết tinh (co-crystallized ligand) vào vị trí liên kết ban đầu của protein. Giá trị RMSD (Root Mean Square Deviation) giữa cấu hình liên kết dự đoán bởi docking và cấu hình liên kết thực nghiệm được tính toán; $\text{RMSD} < 2,0 \text{ \AA}$ được xem là quy trình mô phỏng đáp ứng khả năng lặp lại thực nghiệm. Cấu hình liên kết giữa phối tử và protein được thể hiện bằng phần mềm PyMOL và Discovery Studio Visualizer 14.2.2.

2.6.2.3. Mô phỏng động lực học phân tử

Cấu hình tương tác thu được từ docking phân tử được dùng làm dữ liệu đầu vào để tiến hành các mô phỏng MD bằng phần mềm GROMACS nhằm tinh chỉnh liên kết của TLR4/MD-2 với các chất ức chế tiềm năng. Thiết lập mô phỏng sử dụng kết hợp Amber99SB-iLDN, TIP3P và GAFF lần lượt cho protein, dung môi và các chất ức chế tiềm năng. Đối với các phối tử, dữ liệu cấu trúc được tinh chỉnh bằng các tính toán DFT (B3LYP/6-31G (d,p)), và các điện tích được suy ra bằng phương pháp RESP trong dung môi với $\epsilon = 78,4$. Phức hệ được solvat hóa trong một hộp mười hai mặt (dodecahedron) có kích thước 6,3 x 6,3 x 6,3 nm, tổng kích thước hệ mô phỏng bao gồm khoảng 28.000 nguyên tử. Các bước thời gian trong mô phỏng MD được đặt là 2 fs. Sự tương tác tĩnh điện được bắt chước thông qua phương pháp Smooth Particle-Mesh Ewald. Tương tác van der Waals (vdW) giữa các hạt có hiệu quả trong phạm vi 0,9 nm. Hệ hòa tan được cực tiểu hóa bằng phương pháp steepest descent. Hệ đã cực tiểu năng lượng được hồi phục trong 100 ps mô phỏng NVT (constant number (N), volume (V), temperature (T)) và 2 ns mô phỏng NPT (constant number (N), pressure (P), temperature (T)) ở nhiệt độ 310K bằng thermostat V-rescale, $\tau = 0,1$ ps); (ii) 2 ns mô phỏng NPT (ổn định áp suất tại 1 bar bằng barostat Parrinello-Rahman, $\tau = 2,0$ ps). Trong quá trình mô phỏng NVT và NPT, các nguyên tử C α của protein đích được “giữ cố định” lại một cách nhẹ nhàng bằng một lực điều hòa nhỏ. Các tọa độ của các phức hệ hòa tan được ghi nhận sau mỗi 10 ps. Toàn bộ quy trình mô phỏng được lặp lại ba lần để đảm bảo ý nghĩa thống kê.

2.6.2.4. Phân tích chỉ số dược động học ADMET

Chỉ số dược động học và chỉ số an toàn dược lý của các hợp chất nghiên cứu được đánh giá thông qua các webserver Molinspiration và ProTox-II gồm các thông số về đặc tính giống thuốc và mức độ độc tính cấp tính. Các chỉ số ADMET bao gồm hấp thụ, phân bố, chuyển hóa, thải trừ và độc tính được tính toán trên hệ thống admetSAR.

2.6.2.5. Công cụ phân tích

Các kết quả docking thu được từ AutoDock được phân tích bằng các phần mềm PyMOL và Discovery Studio Visualizer. PyMOL được sử dụng để đo độ dài liên kết hydro bằng cách tính khoảng cách giữa các nguyên tử hydro và các nguyên tử tương tác với chúng. Một liên kết hydro (HB) được xác định khi góc giữa acceptor (A) - hydrogen (H) - donor (D) lớn hơn 135° và khoảng cách A - D nhỏ hơn 0,35 nm. Các trạng thái proton hóa của các phối tử được xác định bằng webserver Chemicalize (ChemAxon). Ngoài ra, độ ổn định cấu trúc được đánh giá bằng cách tính toán độ lệch bình phương trung bình góc (RMSD) của các tọa độ nguyên tử bằng mô-đun “gmx rms” được tích hợp trong GROMACS.

2.7. Phương pháp xử lý số liệu và phân tích thống kê

Các số liệu thực nghiệm được thu thập, xử lý thống kê cơ bản (tính giá trị trung bình và độ lệch chuẩn – Mean \pm SD), và vẽ đồ thị bằng phần mềm Microsoft Excel 2016.

Đối với các thử nghiệm hoạt tính sinh học *in vitro* (kháng oxy hóa DPPH và gây độc tế bào MTT), các thông số IC_{50} và SC_{50} được xác định thông qua phần mềm TableCurve v5.0 AINS (Jandel Scientific, Mỹ) dựa trên phần trăm ức chế và khoảng nồng độ thử nghiệm.

Mối tương quan giữa mật độ tuyến trùng ký sinh và các chỉ tiêu sinh hóa của mẫu thực vật (hàm lượng curcuminoid, hoạt tính sinh học) được đánh giá bằng phương pháp phân tích hồi quy tuyến tính (Linear regression analysis). Các khác biệt được coi là có ý nghĩa thống kê khi giá trị $p < 0,05$.

Đối với dữ liệu sinh học phân tử, mô hình thay thế nucleotide tối ưu được lựa chọn bằng phần mềm MEGA7 v7.0 dựa trên Tiêu chuẩn thông tin Akaike (AIC). Phân tích cây phát sinh chủng loại (Phylogenetic tree) được thực hiện bằng phương pháp suy luận Bayes trên phần mềm MrBayes v3.2.6.

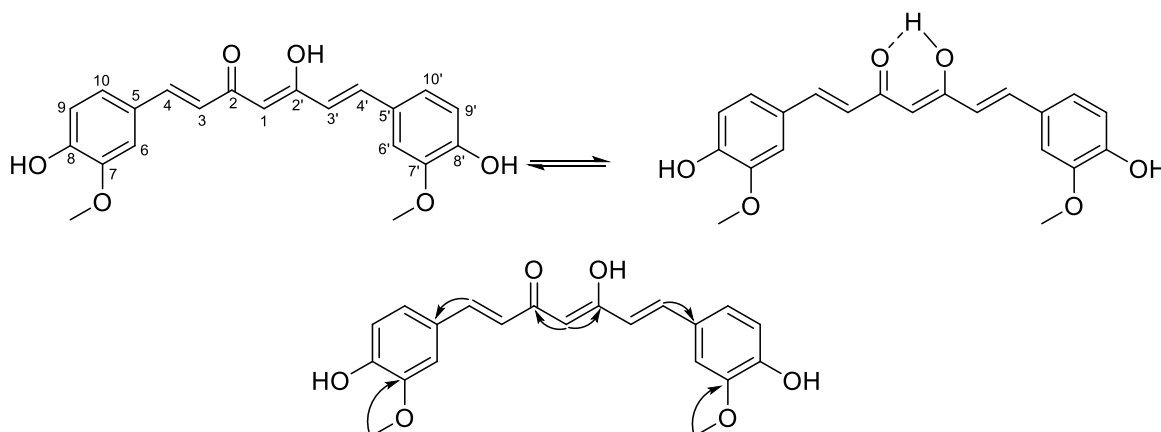
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định cấu trúc hóa học các hợp chất curcuminoid

Cấu trúc của 3 hợp chất phân lập được (CUR, DMC, BDMC) được xác định dựa trên phân tích phổ khối lượng (ESI-MS) và phổ cộng hưởng từ hạt nhân (^1H - và ^{13}C -NMR). Nhìn chung, cả 3 hợp chất đều mang bộ khung cơ bản diarylheptanoid với hệ thống β -diketone chủ yếu tồn tại ở dạng enol (đặc trưng bởi tín hiệu proton tại δ_{H} khoảng 16.0 ppm và proton olefin tại δ_{H} khoảng 5,8-6,0 ppm). Điểm mấu chốt để phân biệt và biện luận cấu trúc 3 hợp chất này nằm ở tính đối xứng phân tử và sự hiện diện của các nhóm methoxy ($-\text{OCH}_3$) trên vòng thơm.

3.1.1. Hợp chất curcumin (CUR)

Phổ ESI-MS cho mũi ion phân tử giả ở m/z 369 $[\text{M}+\text{H}]^+$, phù hợp với công thức phân tử $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$. Phổ NMR cho thấy CUR là một phân tử đối xứng, số lượng tín hiệu carbon quan sát được trên phổ ^{13}C -NMR chỉ bằng một nửa số lượng carbon thực tế. Điểm đặc trưng nhất là sự xuất hiện của tín hiệu singlet cường độ mạnh tại δ_{H} 3,94 (6H, s, 7,7'- OCH_3) trên phổ ^1H -NMR và tín hiệu carbon tại δ_{C} 56,0 (7,7'- OCH_3), khẳng định sự có mặt của hai nhóm methoxy ở vị trí meta của hai vòng benzene. Kết hợp với các tài liệu tham khảo [122], hợp chất được xác định là curcumin.



Hình 3.1. Cấu trúc hóa học và tương tác HMBC (H \rightarrow C) của CUR

Bảng 3.1. Bảng dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của CUR

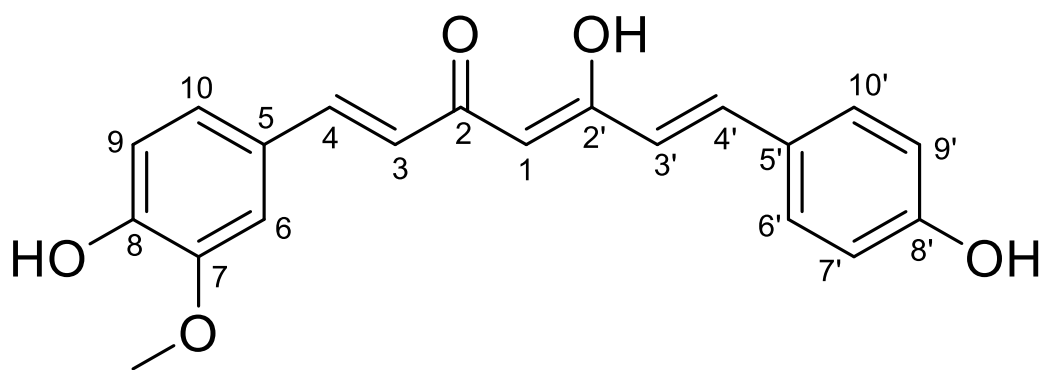
TT	CUR		[144]	
	$^a\delta_{\text{C}}$ ppm	$^a\delta_{\text{H}}$ ppm (J; Hz)	$\#\delta_{\text{C}}$ ppm	$\#\delta_{\text{H}}$ ppm (J; Hz)
1	101,1	5,80 (s)	100,9	5,98 (s)
2, 2'	183,3	-	183,4	16,41 (s)
3, 3'	121,8	6,49 (d; 15,6)	121,1	6,73 (d; 16,0)
4, 4'	140,6	7,60 (d; 15,6)	140,7	7,53 (d; 16,0)
5, 5'	127,7	-	126,4	-
6, 6'	109,7	7,04 (s)	111,4	7,32 (d; 2,0)
7, 7'	146,8	-	148,0	-
8, 8'	147,9	-	149,4	9,74 (s)
9, 9'	114,9	6,94 (d; 8,4)	115,7	6,85 (d; 8,1)
10, 10'	122,9	7,12 (d; 6,6)	123,2	7,16 (dd; 2,0; 8,1)
OCH ₃	56,0	3,94 (s)	55,7	3,84 (s)
-OH	-	5,89 (1H, br s)		

^a Đo trong CDCl₃ tại 600 MHz (^1H -NMR) và 150 MHz (^{13}C -NMR)

[#] Đo trong DMSO-d₆ tại 500 MHz (^1H -NMR) và 125 MHz (^{13}C -NMR)

3.1.2. Hợp chất demethoxycurcumin (DMC)

Phổ ESI-MS cho mũi ion phân tử ở m/z 339 $[\text{M}+\text{H}]^+$, tương ứng công thức C₂₀H₁₈O₅ (kém CUR 30 đvC, tương đương 1 nhóm -OCH₃). Khác với CUR, DMC là một phân tử không đối xứng, do đó phổ NMR hiển thị đầy đủ các tín hiệu carbon và proton của toàn bộ khung phân tử mà không có sự trùng lặp. Tín hiệu của nhóm methoxy trên phổ ^1H -NMR tại δ_{H} 3,93 ppm chỉ có tích phân là 3H, chứng tỏ phân tử chỉ chứa một nhóm methoxy duy nhất ở một bên vòng. Dữ liệu phổ hoàn toàn phù hợp với cấu trúc demethoxycurcumin [146].



Hình 3.2. Cấu trúc hóa học của DMC

Bảng 3.2. Bảng dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của DMC

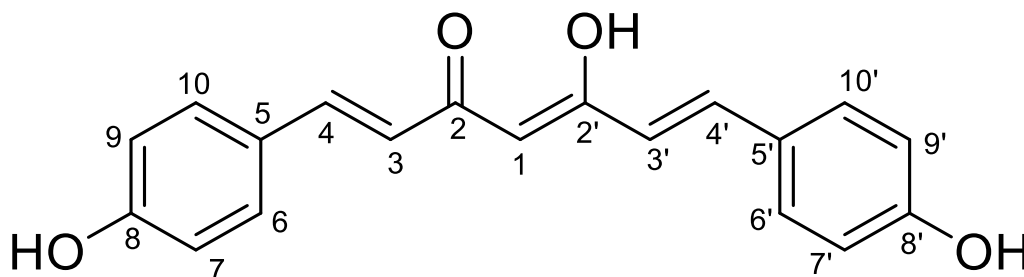
TT	DMC		[145]	
	$^a\delta_{\text{C}}$ ppm	$^a\delta_{\text{H}}$ ppm (<i>J</i> ; Hz)	$\#\delta_{\text{C}}$ ppm	$\#\delta_{\text{H}}$ ppm (<i>J</i> ; Hz)
1	100,9	5,82 (s)	102,0	5,98 (s)
2	183,3	-	184,8	-
3	121,1	6,53 (dd; 15,5; 3,0)	122,3	6,64 (d; 15,8)
4	140,7	7,63 (d; 15,5)	142,1	7,59 (d; 15,8)
5	126,4	-	128,6	-
6	111,2	7,09 (d; 2,0)	111,7	7,23 (d; 1,9)
7	148,0	-	149,4	-
8	149,3	-	150,5	-
9	115,7	6,97 (d, 8,5)	116,9	6,84 (d, 8,2)
10	125,9	7,16 (dd; 8,5; 2,0)	124,1	7,12 (dd; 8,2; 1,9)
2'	183,1	-	184,8	-
3'	123,2	6,53 (dd; 15,5; 3,0)	122,3	6,61 (d, 15,6)
4'	140,4	7,63 (d; 15,5)	142,1	7,59 (d, 15,8)
5'	127,9	-	128,0	-
6'	130,4	7,51 (d, 8,5)	131,5	7,51 (d, 8,7)
7'	116,0	6,89 (d, 8,5)	116,6	6,84 (d, 8,2)
8'	159,8	-	161,1	-
9'	116,0	6,89 (d; 8,5)	116,6	6,84 (d; 8,2)
10'	130,4	7,51 (d; 8,5)	131,5	7,51 (d; 8,7)
7-OCH ₃	56,4	3,95 (s)	56,5	3,93 (s)
-OH		5,89 (s)		

^a Đo trong CDCl₃ tại 600 MHz (¹H-NMR) và 150 MHz (¹³C-NMR)

[#] Đo trong methanol-d₄ tại 500 MHz (¹H-NMR) 125 MHz (¹³C-NMR)

3.1.3. Hợp chất bisdemethoxycurcumin (BDMC)

Hợp chất cho mũi ion tại m/z 309 [M + H]⁺ trên phổ ESI-MS, phù hợp với công thức C₁₉H₁₆O₄. Tương tự CUR, BDMC lại là một phân tử đối xứng nên số lượng tín hiệu trên phổ NMR giảm đi một nửa. Tuy nhiên, dấu hiệu quan trọng nhất là sự vắng mặt hoàn toàn của các tín hiệu thuộc nhóm methoxy (vùng δ_{H} 3,8-3,9 ppm trên ¹H-NMR và vùng δ_{C} khoảng 56 ppm trên ¹³C-NMR). Sự đối xứng và không có nhóm thế methoxy nào khẳng định hợp chất này là bisdemethoxycurcumin [122].



Hình 3.3. Cấu trúc hóa học của BDMC

Bảng 3.3. Bảng dữ liệu phổ ¹H và ¹³C-NMR của BDMC

TT	BDMC		[145]	
	^a δ_{C} ppm	^a δ_{H} ppm (J; Hz)	[#] δ_{C} ppm	[#] δ_{H} ppm (J; Hz)
1	100,9	5,80 (1H, s)	101,9	5,94 (2H, s)
2, 2'	183,2	-	184,8	-
3, 3'	120,8	6,53 (2H; d; 15,5)	122,0	6,60 (2H; d; 15,8)
4, 4'	140,4	7,62 (2H; d; 15,5)	141,8	7,58 (2H; d; 15,8)
5, 5'	125,9	-	128,0	-
6, 6', 10, 10'	130,3	7,48 (4H; d, 8,5)	131,1	7,49 (4H; d, 8,6)
7, 7', 9, 9'	115,9	6,87 (4H; d; 8,5)	116,9	6,83 (4H; d; 8,6)
8, 8'	159,8	-	161,1	-

^a Đo trong CDCl₃ tại 500 MHz (¹H-NMR) và 150 MHz (¹³C-NMR)

[#] Đo trong DMSO-d₆ tại 500 MHz (¹H-NMR) và 125 MHz (¹³C-NMR)

Từ nguyên liệu củ nghệ vàng (*Curcuma longa* L.) thu hái tại Việt Nam, nghiên cứu đã chiết xuất, phân lập và tinh chế thành công 3 dạng riêng biệt của hệ curcuminoid bao gồm: CUR, DMC và (BDMC. Cấu trúc hóa học của 3 hợp chất này đã được minh chứng và khẳng định chắc chắn thông qua các dữ liệu phổ thực nghiệm (MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR), hoàn toàn phù hợp với tài liệu tham khảo (đây là các hợp chất đã biết). Việc sử dụng phương pháp sắc ký cột kết hợp tối ưu hóa hệ dung môi rửa giải trong nghiên cứu này đã cho thấy ưu điểm về khả năng phân tách tốt từng dạng với độ tinh khiết cao so với các phương pháp truyền thống (như ngâm ngấm kiệt hay chiết Soxhlet) vốn chỉ thu được hỗn hợp curcuminoid thô, khó tách riêng do sự tương đồng lớn về độ phân cực. Kết quả này cung cấp nguồn nguyên liệu, là tiền đề bắt buộc để đánh giá hoạt tính sinh học riêng rẽ của từng dạng, cũng như lựa chọn hợp chất nền tảng tối ưu nhất cho các nghiên cứu ở giai đoạn tiếp theo.

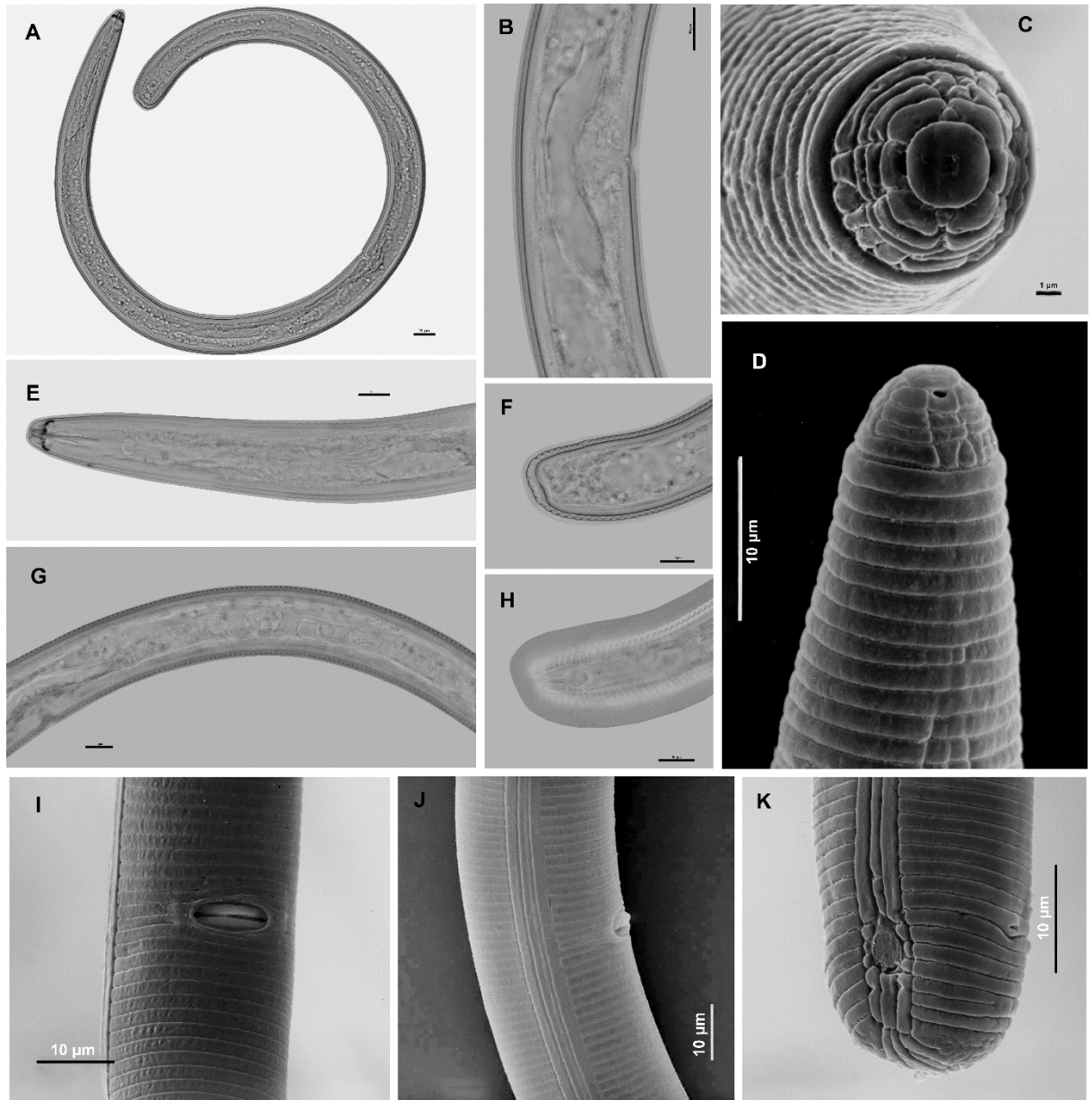
Trong tự nhiên, hệ curcuminoid chiết xuất từ củ nghệ vàng luôn tồn tại dưới dạng hỗn hợp với tỷ lệ phân bố mang tính đặc trưng của sinh học: curcumin (CUR) thường chiếm ưu thế từ 70-80%, demethoxycurcumin (DMC) chiếm 15-20% và bisdemethoxycurcumin (BDMC) chiếm 2-5%. Sự hiện diện đồng thời của cả ba dạng cấu trúc với tỷ lệ ổn định này được xem như dấu vân tay hóa thực vật (phytochemical fingerprint) để phân biệt hệ curcuminoid tự nhiên với curcumin tổng hợp nhân tạo (quá trình tổng hợp hóa học thường chỉ tạo ra một dạng đơn chất CUR tinh khiết hoặc hỗn hợp không tuân theo tỷ lệ sinh học này). Hơn nữa, việc xác định chính xác tỷ lệ của 3 dạng này còn có ý nghĩa quan trọng trong việc đánh giá chất lượng dược liệu đầu vào, bởi tỷ lệ này không hoàn toàn cố định mà có thể bị suy giảm nghiêm trọng dưới các tác động của stress sinh thái, điển hình như sự lây nhiễm của tuyến trùng thực vật.

3.2. Tuyến trùng mới *Scutellonema curcumae* sp. n. (Nematoda: Hoplolaimidae) và tác động của nó đến thành phần hóa học và hoạt tính sinh học của nghệ

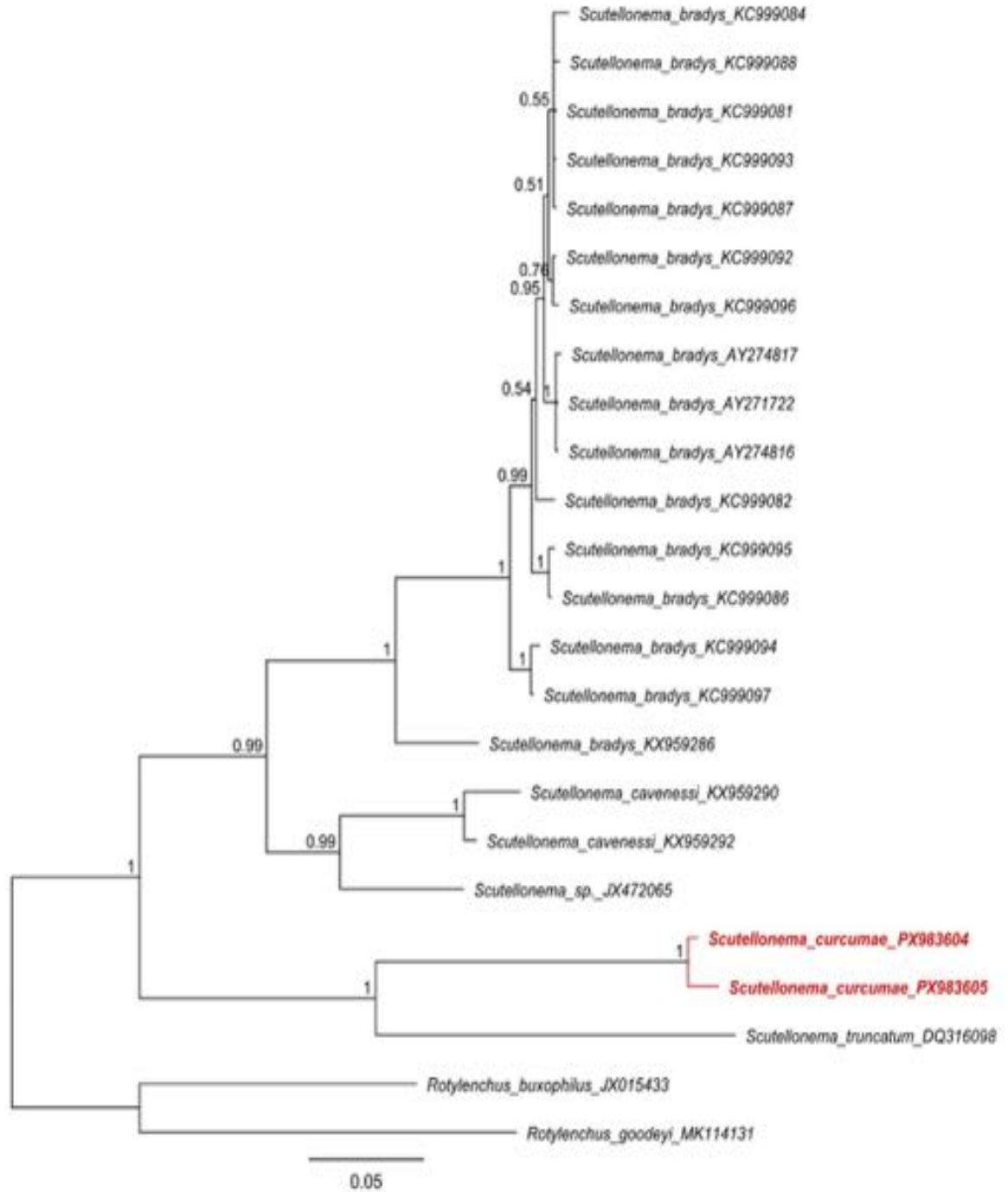
Nghiên cứu này đã tích hợp thành công dữ liệu phân loại học tuyến trùng và phân tích hóa thực vật, qua đó không chỉ phát hiện một loài tuyến trùng mới mà còn làm rõ tác động sinh thái học của chúng đối với chất lượng dược liệu của cây nghệ (*Curcuma longa* L.).

3.2.1. Phân loại học, đặc điểm phân tử và sinh thái của loài *Scutellonema curcumae* sp. n.

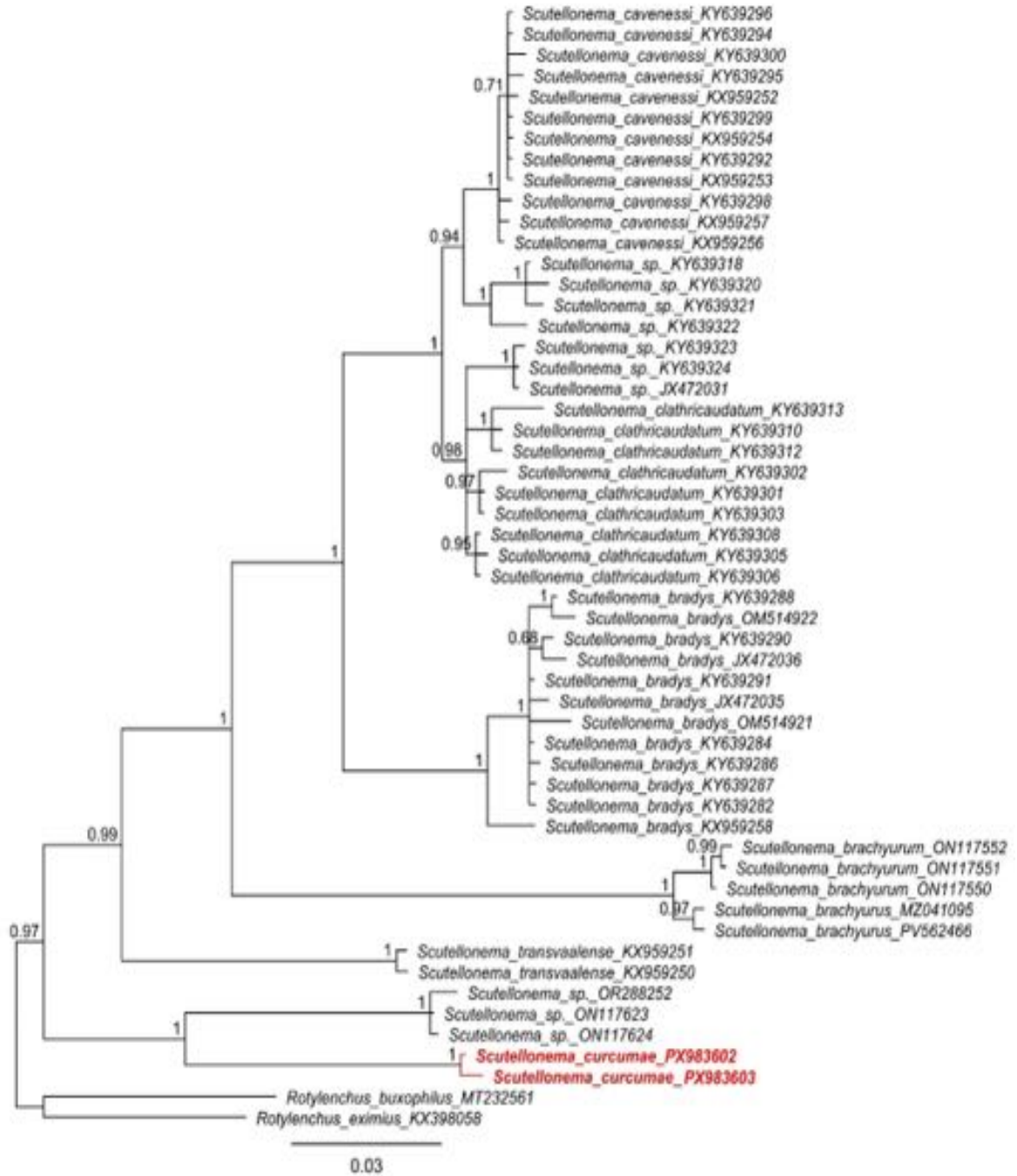
Về mặt hình thái, quần thể tuyến trùng phân lập từ vùng rễ cây nghệ ở Tây Nguyên mang những đặc trưng rõ rệt của một loài mới, được định danh là *Scutellonema curcumae* sp. n.. Chiều dài cơ thể đạt từ 802-1062 μm , có dạng cuộn xoắn ốc khi làm giãn bằng nhiệt (Hình 3.4A), vùng môi hình bán cầu với 4 vòng ngắn không phân tách khỏi đường viền cơ thể (Hình 3.4D, E), và kim chích mập mập dài 30-34 μm (Hình 3.4E). Loài này có phần cuối đuôi tròn mang một cấu trúc hình khiên (scutellum) nổi bật (Hình 3.4K), túi chứa tinh không hoạt động và cực kỳ hiếm/vắng bóng con đực. Những đặc điểm này xếp *S. curcumae* sp. n. vào phức hợp loài *S. bradys*, nhưng nó hoàn toàn phân biệt được với các loài họ hàng gần nhất (như *S. magniphasma*, *S. ussuriensis*, *S. megascutatatum* và *S. tanlamense*) nhờ sự kết hợp giữa chiều dài kim chích, kích thước hình khiên và vị trí cấu trúc bán hoàn (hemizonid).



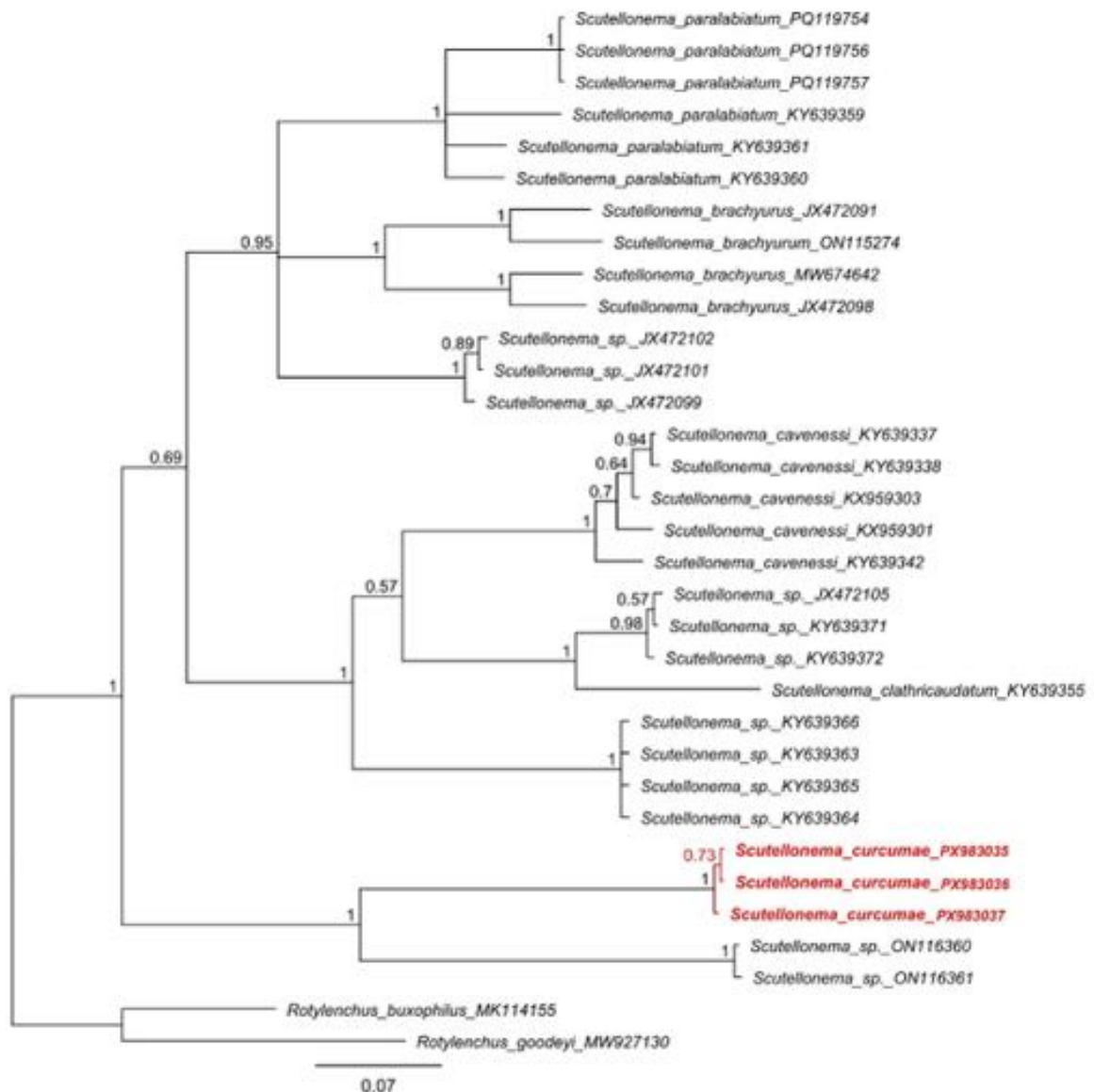
Hình 3.4. Các cá thể cái của loài *Scutellonema curcumae* sp. n. từ Việt Nam.
 A: Toàn bộ cơ thể; B, I, J: Vùng âm môn; C, D, E: Vùng trước; F: Vùng đuôi;
 H, K: Vùng đuôi cho thấy các cấu trúc hình khiên (scutella); G: Buồng trứng.
 (Thang đo: A: 20 μm ; B, D-K: 10 μm ; C: 1 μm).



Hình 3.5. Cây phát sinh chủng loại Bayes được xây dựng sử dụng các trình tự ITS của các loài *Scutellonema* theo mô hình GTR+G+I. Trình tự của loài *Scutellonema curcumae* sp. n. được biểu thị bằng chữ in đậm và màu đỏ



Hình 3.6. Cây phát sinh chủng loại Bayes được xây dựng sử dụng các trình tự D2-D3 của các loài *Scutellonema* theo mô hình GTR+G+I. Trình tự của loài *Scutellonema curcumae* sp. n. được biểu thị bằng chữ in đậm và màu đỏ.



Hình 3.7. Cây phát sinh chủng loại Bayes được xây dựng sử dụng các trình tự COI của các loài *Scutellonema* theo mô hình GTR+G+I. Trình tự của loài *Scutellonema curcumae* sp. n. được biểu thị bằng chữ in đậm và màu đỏ.

Sự khác biệt hình thái này được củng cố bởi dữ liệu phân tử đa locus. Mức độ tương đồng trình tự giữa *S. curcumae* sp. n. và các loài *Scutellonema* khác trên GenBank là rất thấp: chỉ đạt 69-70% ở vùng ITS, 89,4-90,5% ở vùng 28S D2-D3 và 79,4-79,9% ở vùng COI. Cây phát sinh chủng loại Bayes cho thấy loài mới này tạo thành một nhánh tiến hóa (lineage) tách biệt và được hỗ trợ tối đa (PP = 1.0) trên cả ba marker phân tử (Hình 3.5, 3.6 và 3.7). Việc chỉ phát hiện *S. curcumae* sp. n. trên cây nghệ không chỉ là báo cáo đầu tiên về chi

này trên *C. longa* tại Việt Nam mà còn gợi ý sự thích nghi sinh thái đặc thù đối với thực vật có thân rễ.

3.2.2. Sự biến đổi hàm lượng curcuminoid do ảnh hưởng từ tuyến trùng

Nghiên cứu cung cấp bằng chứng định lượng rõ nét về tương tác giữa thực vật, tuyến trùng và hóa học. Kết quả cho thấy có một mối tương quan nghịch phụ thuộc mật độ giữa quần thể *Scutellonema curcumae* sp. n. và chất lượng hóa thực vật của thân rễ. Khi mật độ lây nhiễm giảm từ 19,6 xuống 0,8 cá thể/100g đất, tổng hàm lượng curcuminoid đã tăng lên đáng kể từ 4,01% đến 4,95% (Bảng 3.4 và 3.5).

Phân tích hồi quy chỉ ra rằng, quần thể tuyến trùng nội ký sinh trong rễ (root population) là tác nhân chính gây ra sự suy thoái này, với tác động tiêu cực và có ý nghĩa thống kê hơn nhiều so với tuyến trùng sống tự do trong đất (Bảng 3.9). Đáng chú ý, sự sụt giảm chất chuyển hóa này không diễn ra đồng đều. Mật độ lây nhiễm làm thay đổi nghiêm trọng tỷ lệ của ba curcuminoid chính: trong khi curcumin chỉ biến động nhẹ (~8%), demethoxycurcumin tăng ~40%, thì bisdemethoxycurcumin lại chứng kiến sự gia tăng đột biến lên tới 250% (từ 0,16% lên 0,56%) ở các mẫu ít nhiễm bệnh (Bảng 3.5). Sự sụt giảm có chọn lọc này ngụ ý rằng tuyến trùng có thể đang can thiệp vào các bước enzyme cụ thể (như quá trình *O*-methyl hóa) trong con đường sinh tổng hợp phenylpropanoid.

Bảng 3.4. Tính chất lý hóa của đất, loại đất và mật độ quần thể tuyến trùng tại các khu vực trồng nghệ (*C. longa*) ở Kon Tum, Việt Nam

Mẫu	pH	Độ ẩm (%)	Tổng nitrogen (%)	Tổng nematodes (đất) ^b	Tổng nematodes (rễ) ^b	<i>S. curcumae</i> sp. n. (đất) ^b	<i>S. curcumae</i> sp. n. (rễ) ^b
M1	6,5	73,5	1,05	131,8	59,7	25,3	19,6
M2	6,3	73,4	0,92	58,2	17,7	11,4	7,5
M3	6,6	73,6	0,95	79,3	88,4	3,8	10,7

Mẫu	pH	Độ ẩm (%)	Tổng nitrogen (%)	Tổng nematodes (đất) ^b	Tổng nematodes (rễ) ^b	<i>S. curcumae</i> sp. n. (đất) ^b	<i>S. curcumae</i> sp. n. (rễ) ^b
M4	7,1	74,1	0,98	185,3	78,4	27,9	12,5
M5	6,8	74,2	1,07	125,3	58,4	29,6	16,5
M6	6,9	74,0	1,01	141,5	66,8	22,1	12,3
M7	6,0	72,8	0,90	87,6	33,9	5,5	8,2
M8	6,2	72,9	0,91	90,2	47,9	6,3	3,1
M9	5,9	72,8	0,95	70,1	23,3	4,5	1,6
M10	5,6	70,9	0,92	36,8	11,3	2,6	0,8

^a Thành phần cơ giới của đất được đánh giá bằng mắt thường là đất thịt pha sét, đặc trưng của nhóm đất đỏ bazan. ^b Số cá thể trên 100g đất/rễ

Bảng 3.5. Thành phần hóa thực vật và hoạt tính sinh học của thân rễ nghệ liên quan đến sự nhiễm tuyến trùng

Mẫu	Tổng curcuminoid (%)	CUR (%)	DMC (%)	BDMC (%)	SC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ HepG2 (µg/ml)	IC ₅₀ A549 (µg/ml)
M1	4,01 ± 0,05	3,19 ± 0,08	0,64 ± 0,04	0,16 ± 0,01	43,62 ± 3,08	44,23 ± 2,08	55,23 ± 3,34
M2	4,25 ± 0,03	3,07 ± 0,07	0,86 ± 0,02	0,32 ± 0,03	23,45 ± 2,19	43,67 ± 2,86	58,93 ± 2,99
M3	4,16 ± 0,04	3,06 ± 0,05	0,80 ± 0,03	0,31 ± 0,02	21,03 ± 2,56	45,37 ± 3,49	60,32 ± 3,05
M4	4,15 ± 0,02	3,18 ± 0,05	0,72 ± 0,02	0,23 ± 0,01	32,89 ± 3,55	38,82 ± 2,98	52,75 ± 2,45
M5	4,10 ± 0,04	3,19 ± 0,06	0,69 ± 0,04	0,21 ± 0,02	40,31 ± 3,86	37,85 ± 2,05	50,37 ± 2,97
M6	4,15 ± 0,05	3,21 ± 0,06	0,69 ± 0,01	0,23 ± 0,01	34,26 ± 3,82	38,63 ± 2,52	51,34 ± 3,14
M7	4,23 ± 0,03	3,16 ± 0,09	0,74 ± 0,02	0,31 ± 0,03	25,87 ± 2,44	39,38 ± 1,56	48,21 ± 3,82

Mẫu	Tổng curcuminoid (%)	CUR (%)	DMC (%)	BDMC (%)	SC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ HepG2 (µg/ml)	IC ₅₀ A549 (µg/ml)
M8	4,70 ± 0,06	3,38 ± 0,07	0,91 ± 0,03	0,41 ± 0,02	18,91 ± 1,73	35,76 ± 2,88	47,55 ± 2,43
M9	4,88 ± 0,07	3,45 ± 0,08	0,98 ± 0,04	0,46 ± 0,01	16,42 ± 1,89	29,04 ± 1,22	41,43 ± 3,02
M10	4,95 ± 0,02	3,45 ± 0,04	0,90 ± 0,02	0,56 ± 0,02	13,85 ± 1,31	29,35 ± 1,10	40,37 ± 3,31
Ascorbic acid	-	-	-	-	6,81 ± 1,03	-	-
Paclitaxel	-	-	-	-	-	47,2 ± 1,38 nM	21,3 ± 1,02 nM

Bảng 3.6. Phân tích hồi quy tuyến tính ảnh hưởng của mật độ *Scutellonema curcumae* sp. n. (trong rễ và đất) đến thành phần hóa học và hoạt tính sinh học

Chỉ tiêu phân tích	Tác động của quần thể trong rễ (% thay đổi/đơn vị)	Tác động của quần thể trong đất (% thay đổi/đơn vị)	Tác động kết hợp
Thành phần hoá học			
Tổng curcuminoid	-1,04	-0,46	-0,35
Curcumin	-0,44	NS	NS
Demethoxycurcumin	-1,78	-0,89	-0,64
Bisdemethoxycurcumin	-3,81	-2,05	-1,41
Hoạt tính sinh học			
Chống oxi hoá (SC ₅₀)	+12,33	+5,5	+4,51
Gây độc tế bào HepG2 (IC ₅₀)	+1,94	NS	NS
Gây độc tế bào A549 (IC ₅₀)	+1,47	NS	NS

NS = Không có ý nghĩa thống kê (P > 0,05). Giá trị dương của SC₅₀/IC₅₀ biểu thị sự suy giảm hoạt tính.

Sự thay đổi hàm lượng của curcuminoid ảnh hưởng đến hoạt tính của nghệ. Ở những mẫu ít chịu áp lực từ tuyến trùng, hàm lượng curcuminoid được tăng dẫn đến hoạt tính chống oxy hóa tăng lên mạnh (giá trị SC_{50} giảm từ 43,62 $\mu\text{g/ml}$ xuống 13,85 $\mu\text{g/ml}$) (Bảng 3.5). Tương tự, hoạt tính gây độc tế bào cũng được cải thiện rõ rệt, với giá trị IC_{50} giảm từ 44,23 xuống 29,35 $\mu\text{g/ml}$ đối với tế bào ung thư gan HepG2, và từ 55,23 xuống 40,37 $\mu\text{g/ml}$ đối với tế bào ung thư phổi A549 (Bảng 3.5, Bảng 3.6). Điều này khẳng định một quan điểm mới, việc quản lý tuyến trùng là yếu tố sống còn để quyết định được tính của sản phẩm.

Nghiên cứu cũng ghi nhận các mẫu nghệ đạt chất lượng cao nhất (mật độ tuyến trùng thấp, curcuminoid cao) đều xuất hiện ở điều kiện đất có độ pH hơi acid (5,6-5,9) (Bảng 3.4). Sự tương quan này đặt ra giả thuyết rằng môi trường acid có khả năng ức chế sự phát triển của *S. curcumae* sp. n., hoặc đóng vai trò như một yếu tố kích thích quá trình sinh tổng hợp curcuminoid ở cây nghệ. Dù dữ liệu thực địa (field data) cung cấp bằng chứng mạnh mẽ, nghiên cứu vẫn cần tiến hành các thử nghiệm lây nhiễm có kiểm soát (controlled inoculation) trong tương lai để xác nhận quan hệ nhân quả tuyệt đối, cũng như ứng dụng hệ phiên mã/hệ chuyển hóa để làm sáng tỏ cơ chế phân tử đằng sau hiện tượng này. Nhìn chung, kết quả của nghiên cứu này đã tạo ra bước chuyển dịch mô hình trong canh tác cây dược liệu, chuyển từ mục tiêu bảo vệ năng suất đơn thuần sang chiến lược quản lý bệnh hại như một công cụ thiết yếu để tối ưu hóa và đảm bảo chất lượng hóa thực vật.

Nghiên cứu đã phát hiện và định danh thành công một loài tuyến trùng thực vật mới ký sinh trên rễ cây nghệ vàng tại Việt Nam (*Scutellonema curcumae* sp. n.). Các đặc điểm sinh học và phân tử đã được công bố trên tạp chí quốc tế, xác định rõ vị trí phân loại của loài này. Quan trọng hơn, thông qua phân tích định lượng hóa thực vật, kết quả đã minh chứng rõ ràng: sự gia tăng mật độ lây nhiễm của tuyến trùng *S. curcumae* có mối tương quan nghịch biến,

gây sụt giảm nghiêm trọng hàm lượng các dạng curcuminoid (tỷ lệ BDMC). Stress sinh học do tuyến trùng gây ra làm rối loạn quá trình sinh tổng hợp, từ đó làm suy giảm trực tiếp các hoạt tính chống oxy hóa và gây độc tế bào của dược liệu. Điều này đặt ra yêu cầu cấp thiết về việc quản lý sâu bệnh hại để chuẩn hóa vùng nguyên liệu chất lượng cao.

Đánh giá hoạt tính sinh học *in vitro* đã làm rõ ảnh hưởng của cấu trúc hóa học đến tác dụng dược lý của 3 dạng curcuminoid riêng biệt cũng như các dẫn xuất bán tổng hợp. Về hoạt tính chống oxy hóa, sự hiện diện của hai nhóm methoxy (-OCH₃) giúp CUR thể hiện khả năng dọn gốc tự do mạnh mẽ nhất, mạnh hơn so với DMC và BDMC. Ngược lại, đối với hoạt tính kháng viêm (ức chế sản sinh NO) và gây độc tế bào ung thư, các phân tử thiếu vắng nhóm methoxy (như BDMC) hoặc các dẫn xuất lai hóa mới (curcumin-monozerumbone) lại cho thấy hiệu quả ức chế mạnh và ổn định hơn. Kết quả này khẳng định việc sử dụng riêng rẽ từng dạng hoặc thiết kế dẫn xuất là hoàn toàn cần thiết: CUR phù hợp cho định hướng chống oxy hóa, trong khi BDMC và các dẫn xuất lai hóa mở ra tiềm năng lớn cho các đích tác dụng kháng viêm và kháng ung thư.

3.3. Bán tổng hợp các dẫn xuất curcumin phân lập từ củ nghệ

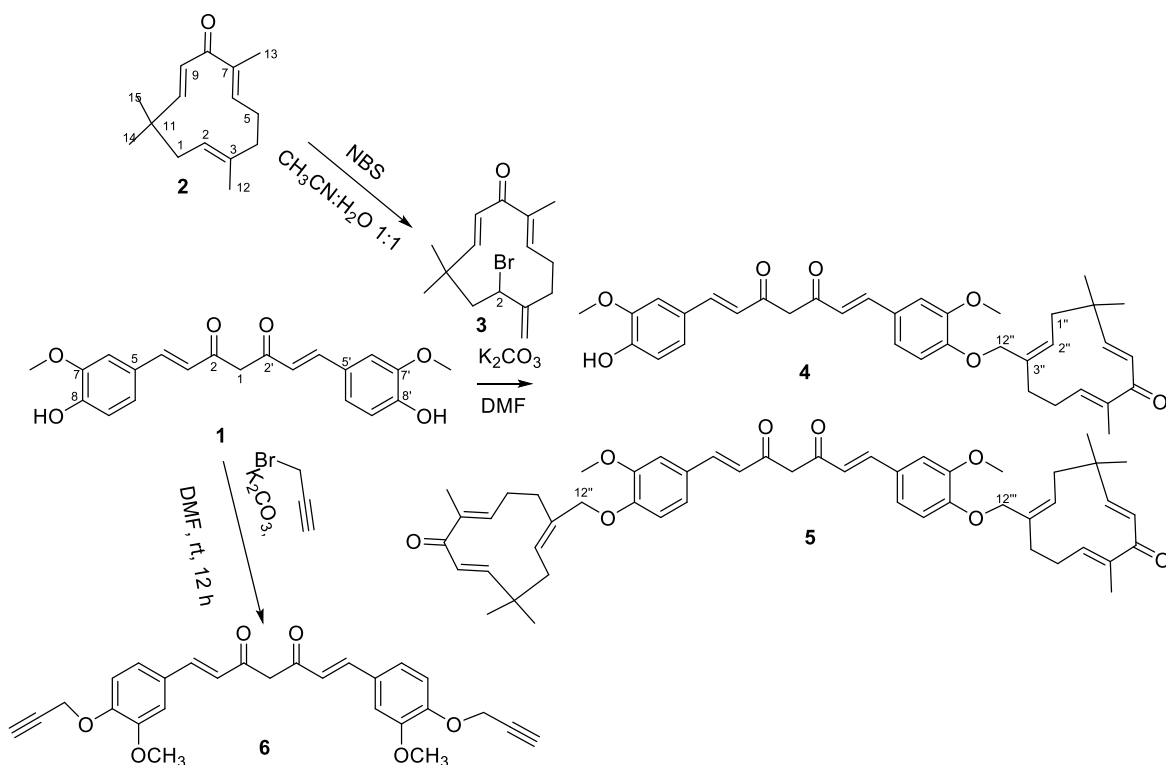
Trong nghiên cứu này, CUR được lựa chọn làm nguyên liệu đầu cho quá trình bán tổng hợp thay vì DMC hay BDMC do hàm lượng cao và lợi thế cấu trúc (hai nhóm -OCH₃ làm tăng hoạt tính nucleophile của nhóm -OH phenol). Chiến lược tập trung vào việc che chắn nhóm -OH, đồng thời bảo tồn nguyên vẹn hệ β -diketone cốt lõi. Luận án hướng tới tổng hợp dẫn xuất lai curcumin-zerumbone nhằm kết hợp và phát huy tiềm năng hiệp đồng kháng ung thư, kháng viêm và kháng vi sinh vật kiểm định của cả các hợp chất tự nhiên. Ngoài ra, dẫn xuất curcumin-propargyl cũng được tổng hợp thêm để đóng vai trò làm chất đối chiếu cấu trúc, phục vụ việc đánh giá và so sánh mức độ hoạt tính. Hướng tiếp cận này không chỉ giúp cải thiện sinh khả dụng, tận dụng đặc thù vi môi trường khối u để giải phóng thuốc chọn lọc, mà còn tạo ra bộ dữ liệu lý

tương cho các đánh giá *in silico* (molecular docking) và *in vitro*, giúp làm sáng tỏ toàn diện mối quan hệ cấu trúc - tác dụng (SAR).

3.3.1. Bán tổng hợp curcumin-zerumbone

Sơ đồ tổng hợp các dẫn xuất curcumin-zerumbone như hình 3.8.

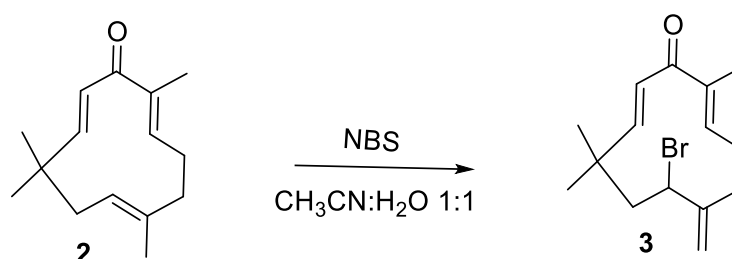
Giai đoạn 1: Hòa tan 1 g (4,6 mmol) zerumbone (**1**) trong 15 ml hỗn hợp dung môi acetonitrile: H₂O 1:1 (v:v) khuấy cho đến khi thu được huyền phù đồng nhất, tiếp theo vừa khuấy mạnh vừa thêm nhanh 0,9 g (5,0 mmol) *N*-bromosuccinimide (NBS) vào. Kết tủa hình thành ngay lập tức, tiến hành lọc tủa, rửa với nước, sấy khô trong chân không ở 50°C thu được chất rắn **3** màu trắng với hiệu suất 15% (1,4 g), sản phẩm này dùng ngay cho giai đoạn sau (hình 3.9).



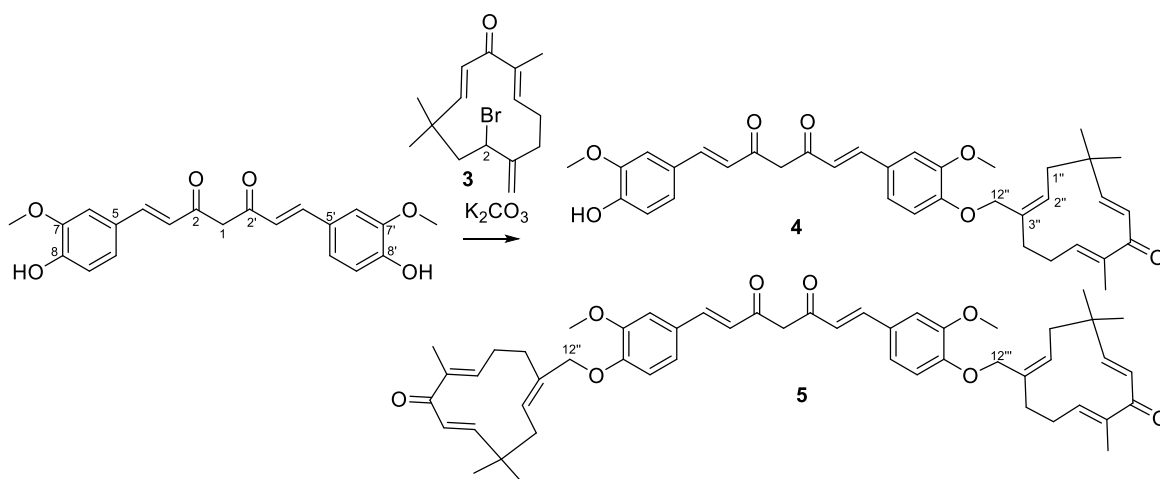
Hình 3.8. Tổng hợp các dẫn xuất curcumin-zerumbone

Giai đoạn 2: Một hỗn hợp của 184 mg (0,5 mmol) curcumin và 304 mg (2,2 mmol) K₂CO₃ được hòa bằng 3 ml DMF. Tiếp theo, vừa khuấy vừa thêm 148 mg (0,5 mmol) 2-bromozerrumbone. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng 12 giờ, tiến trình phản ứng được kiểm soát bằng TLC (*n*-hexane: acetone 1,5:1). Kết thúc phản ứng (12 giờ) hỗn hợp được hòa vào nước đá đập nhỏ và

hỗn hợp phản ứng được chiết bằng ethyl acetate (3 x 15 ml). Gộp các dịch chiết ethyl acetate và rửa 1 lần với nước muối bão hòa, làm khô bằng Na₂SO₄ khan, loại dung môi thu sản phẩm thô. Sản phẩm thô được chạy sắc ký cột/silica gel, rửa giải với hệ dung môi *n*-hexane: acetone 1,5:1 để thu phân đoạn chính chứa sản phẩm **4** và **5**. Phân đoạn này tiếp tục được chạy HPLC (Sử dụng cột Eclipse XDB C18 (kích thước 150 x 4.6 mm, kích thước hạt 5 μm), hệ dung môi gồm kênh A (H₂O + 0,1% FA), kênh B (ACN) và kênh C (MeOH). Hệ thống được thiết lập để chạy đẳng dòng với tỉ lệ 40 - 25 - 35 trong 30 phút, tốc độ dòng 0,5 ml/phút) để thu được curcumin-monozerumbone (**4**, hiệu suất 15%) và curcumin-biszerumbone (**5**, hiệu suất 11%) sạch (hình 3.10).



Hình 3.9. Tổng hợp các dẫn xuất curcumin-zerumbone giai đoạn 1



Hình 3.10. Tổng hợp các dẫn xuất curcumin-zerumbone giai đoạn 2

Hợp chất **4** thu được dưới dạng bột màu vàng với hiệu suất 15%. Trên phổ ¹H-NMR xuất hiện của duy nhất một tín hiệu proton thuộc nhóm -OH phenol tại δ_H 9,64 (1H, s). Điều này chứng tỏ phản ứng thế (ether hóa) chỉ xảy ra tại một trong hai đầu của phân tử curcumin, phá vỡ tính đối xứng nguyên

bản. Sự bất đối xứng này tiếp tục được minh chứng qua tín hiệu của hai nhóm methoxy (-OCH₃) tách biệt thành hai mũi đơn tại δ_H 3,84 (3H, s) và 3,81 (3H, s) thay vì chập lại làm một. Sự hiện diện của gốc zerumbone được xác nhận thông qua các proton nhóm methyl đặc trưng tại δ_H 1,67 (3H, s), 1,22 (3H, s) và 1,05 (3H, s). Trên phổ ¹³C-NMR phù hợp với sự mất đối xứng không gian, hệ carbonyl trung tâm cho hai tín hiệu riêng biệt tại δ_C 183,7 và 182,6 ppm. Tín hiệu carbon tại vị trí liên kết mới (-O-CH-) xuất hiện tại 65,6 ppm. Các carbon methyl của gốc zerumbone xuất hiện rõ nét tại 24,3; 23,7 và 11,7 ppm. Dữ liệu phổ này hoàn toàn tương thích và khẳng định sự hình thành của dẫn xuất bất đối xứng curcumin-monozerumbone.

Hợp chất **5** thu được dưới dạng bột màu vàng với hiệu suất 11%. Trên phổ ¹H-NMR: Phân tử đã khôi phục lại tính đối xứng cao do cả hai nhóm -OH phenol đều đã tham gia phản ứng (tín hiệu -OH tại vùng > 9,0 ppm hoàn toàn biến mất). Hai nhóm methoxy lúc này chập lại thành một tín hiệu duy nhất tại δ_H 3,84 với tích phân 6H. Các tín hiệu đặc trưng của gốc zerumbone đều có tích phân nhân đôi, minh chứng là 3 cụm methyl xuất hiện tại δ_H 1,67 (6H, s), 1,22 (6H, s) và 1,05 (6H, s). Tỷ lệ 6H này khẳng định có chính xác 2 gốc zerumbone được gắn vào khung curcumin. Trên phổ ¹³C-NMR nhờ tính đối xứng, hệ β -diketone chỉ cho một tín hiệu carbonyl chập duy nhất tại δ_C 183,0 ppm (đặc trưng cho cấu trúc dạng enol). Các carbon methyl tương ứng của hai gốc zerumbone được ghi nhận tại 24,2; 23,6 và 11,7 ppm. Kết quả biện luận khẳng định hợp chất là curcumin-biszerumbone.

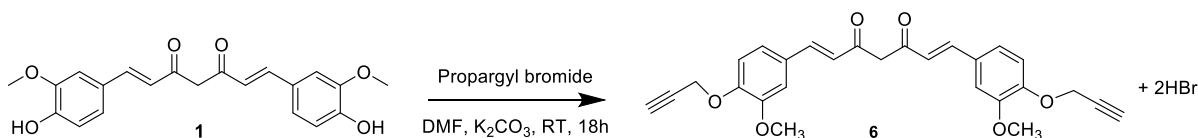
3.3.2. Bán tổng hợp di-propargyl curcumin

Quá trình bán tổng hợp dẫn xuất di-propargyl curcumin được tiến hành theo cơ chế phản ứng ether hóa Williamson (hình 3.11). Hòa tan 1,00 g (2,71 mmol) curcumin trong bình cầu chứa 15 ml dung môi phân cực khan. Bật máy khuấy từ, sau đó bổ sung 1,12 g (8,13 mmol) base K₂CO₃ khan nhằm hoạt hóa triệt để hai nhóm hydroxyl phenolic. Hỗn hợp được khuấy ở nhiệt độ phòng trong khoảng 30 phút. Tiếp theo, nhỏ giọt từ từ 0,80 g (6,77 mmol) tác nhân

alkyl hóa propargyl bromide vào bình phản ứng. Việc sử dụng lượng dư propargyl bromide và base so với số mol của curcumin là điều kiện thiết yếu để định hướng thể hoàn toàn tạo sản phẩm di-propargyl.

Hỗn hợp phản ứng được khuấy liên tục và giữ ở nhiệt độ phòng trong 24 giờ. Tiến trình phản ứng được theo dõi chặt chẽ bằng sắc ký lớp mỏng (TLC). Khi curcumin ban đầu được tiêu thụ hoàn toàn, hỗn hợp được làm nguội, pha loãng với khoảng 30 ml nước cất và chiết bằng dung môi ethyl acetate (3 x 20 ml). Các pha hữu cơ được gộp chung, rửa lại bằng dung dịch nước muối bão hòa (brine) (2 x 20 ml), làm khan bằng Na₂SO₄ khan, lọc và cất quay chân không ở nhiệt độ thấp để thu được cặn sản phẩm thô.

Cặn thô sau đó được tinh chế bằng phương pháp sắc ký cột pha thường với chất mang silicagel. Quá trình rửa giải được thực hiện bằng hệ dung môi gradient *n*-hexane/ethyl acetate với tỷ lệ phân cực tăng dần từ 20/1 đến 5/1. Các phân đoạn chứa sản phẩm đích được thu thập, kiểm tra bằng TLC, gộp lại và cô quay chân không để thu được dẫn xuất di-propargyl curcumin (**6**, hiệu suất 21%) sạch (Hình 3.11).



Hình 3.11. Tổng hợp dẫn xuất di-propargyl curcumin

Hợp chất **6** thu được dưới dạng bột màu vàng với hiệu suất 21%. Trên phổ ¹H-NMR: Tính đối xứng của phân tử được thể hiện rõ ràng. Việc alkyl hóa thành công bằng gốc propargyl được minh chứng qua hai tín hiệu đặc trưng: nhóm methylene (-OCH₂-) tại δ_H 4,89 với tích phân 4H (d, *J*= 2,4 Hz) và proton alkyne đầu mạch (-C≡CH) tại δ_H 3,61 với tích phân 2H (t, *J*= 2,4 Hz). Khung curcumin được bảo toàn cấu hình *trans* với hai proton alkene xuất hiện tại δ_H 7,66 và 7,07 (2H, d, *J*= 15,6 Hz) cùng nhóm methoxy đối xứng tại 3,87 (6H, s). Trên phổ ¹³C-NMR xác nhận sự hiện diện của liên kết ba alkyne (-C≡C-) liên kết với oxy phenolic xuất hiện tại 65,9 ppm. Sự biến mất của tín hiệu

hydroxyl và sự xuất hiện các tín hiệu alkyne có tính đối xứng nhân đôi đã khẳng định cấu trúc hợp chất là O,O-di-propargyl curcumin.

Bám sát định hướng can thiệp cấu trúc nhằm tăng cường hoạt tính sinh học, nghiên cứu đã thực hiện thành công việc bán tổng hợp các dẫn xuất mới từ khung curcuminoid. Việc can thiệp vào nhóm chức hydroxyl phenol thông qua phản ứng ether hóa đã tạo ra dẫn xuất dipropargyl curcumin; ghép nối thành công hoạt chất zerumbone tạo ra các dẫn xuất lai hóa (curcumin-monozerumbone và curcumin-biszerumbone) nhằm tận dụng tác dụng hiệp đồng. Cấu trúc của các dẫn xuất này đã được biện luận và xác nhận chính xác qua dữ liệu phổ lý hóa ($^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, HSQC, HMBC).

Bên cạnh các dẫn xuất đã tổng hợp, dựa trên đặc điểm cấu trúc chứa hệ β -diketone và các nối đôi liên hợp, một số phương án bán tổng hợp tiềm năng khác hoàn toàn có thể được mở rộng trong tương lai như: tạo phức với các ion kim loại chuyển tiếp (Zn^{2+} , Cu^{2+}) để tăng độ bền, hoặc thực hiện phản ứng ngưng tụ Knoevenagel tại vị trí carbon trung tâm (C4) để đưa thêm các nhóm thế hút/đẩy electron, từ đó tạo ra các dẫn xuất có dược tính đích mạnh mẽ hơn.

3.3.3. Đánh giá hoạt tính chống viêm của các dẫn xuất curcumin

Khả năng kháng viêm của CUR và các dẫn xuất bán tổng hợp (**4**, **5**, **6**) được đánh giá *in vitro* thông qua mức độ ức chế sản sinh gốc tự do NO trên mô hình đại thực bào RAW 264.7 kích thích bởi LPS. Đồng thời, thử nghiệm đo lường tỷ lệ tế bào sống sót bằng phương pháp MTT cũng được tiến hành nhằm loại trừ khả năng sự sụt giảm NO là hệ quả của độc tính gây chết tế bào. Kết quả được thể hiện như bảng 3.7.

Trước hết, về tính an toàn, kết quả thử nghiệm MTT tại nồng độ 128 $\mu\text{g/ml}$ cho thấy tất cả các hợp chất đều duy trì tỷ lệ sống sót của tế bào RAW 264.7 ở mức an toàn (trên 80%). Đáng chú ý, các dẫn xuất bán tổng hợp (**4**, **5**, **6**) đều cho tỷ lệ tế bào sống sót (86,4% - 92,1%) cao hơn so với CUR (82,5%). Điều này khẳng định việc biến đổi cấu trúc đã làm giảm độc tính không đặc hiệu lên đại thực bào. Do đó, các giá trị IC_{50} ức chế NO ghi nhận được hoàn

toàn xuất phát từ cơ chế can thiệp dược lý chuyên biệt vào quá trình viêm, chứ không phải do tiêu diệt tế bào.

Về hiệu lực kháng viêm, sự biến đổi cấu trúc đã mang lại sự cải thiện rõ rệt. CUR thể hiện hoạt tính ức chế NO yếu nhất trong nhóm với IC_{50} khá cao, đạt $121,06 \pm 2,16 \mu\text{g/ml}$. Hạn chế này chủ yếu do tính thân nước một phần (nhờ 2 nhóm -OH tự do) làm giảm khả năng xuyên qua màng lipid của đại thực bào, đồng thời cấu trúc dễ bị thoái biến trong môi trường nuôi cấy. Khi khóa nhóm -OH bằng gốc propargyl để tạo ra dẫn xuất (**5**), hoạt tính đã tăng lên đáng kể (IC_{50} giảm xuống còn $85,40 \pm 1,85 \mu\text{g/ml}$). Sự gia tăng tính thân dầu đã giúp phân tử (**5**) thâm nhập nội bào tốt hơn và bảo vệ hệ β -diketone.

Bảng 3.7. Hoạt tính ức chế sản sinh NO và tỷ lệ sống sót của tế bào RAW 264.7 khi xử lý với curcumin và các dẫn xuất

TT	Ký hiệu	Tên hợp chất	Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Tỷ lệ tế bào sống sót (%)
1	CUR	Curcumin	$121,06 \pm 2,16$	$82,5 \pm 2,1$
2	6	Dipropargyl curcumin	$85,40 \pm 1,85$	$86,4 \pm 1,8$
3	5	Curcumin-biszerumbone	$68,20 \pm 1,50$	$88,2 \pm 2,4$
4	4	Curcumin-monozerumbone	$32,15 \pm 1,20$	$92,1 \pm 1,5$
5	Đối chứng	Cardamonin	$0,61 \pm 0,24$	$95,0 \pm 1,2$

Ở các phân tử lai hóa với zerumbone, dẫn xuất curcumin-monozerumbone (**4**) thể hiện hoạt tính kháng viêm tốt nhất với IC_{50} đạt $32,15 \pm 1,20 \mu\text{g/ml}$, mạnh hơn CUR tới gần 4 lần. Sự thế một lần (mono) có thể đã tạo ra một cấu hình không gian phù hợp, kết hợp được tính thấm tế bào mạnh hơn và khả năng ức chế đa đích từ cả hai khung cấu trúc (hệ Michael acceptor của curcuminoid và hệ liên hợp của zerumbone) lên tổ hợp protein NF- κ B/iNOS nội bào.

Trong khi đó, dù dẫn xuất curcumin-biszerumbone (**5**) cũng thể hiện hoạt tính khá tốt ($IC_{50} = 68,20 \pm 1,50 \mu\text{g/ml}$), mạnh hơn CUR và dẫn xuất (**6**), nhưng lại có xu hướng kém hơn dẫn xuất mono (**4**). Sự công kênh quá mức ở hai đầu phân tử do hai gốc zerumbone có thể gây ra chướng ngại lập thể, làm giảm độ linh hoạt khi phân tử len lỏi và liên kết với các thụ thể đích bên trong tế bào.

3.3.4. Đánh giá hoạt tính gây độc tế bào của các dẫn xuất curcumin

Thử hoạt tính gây độc tế bào *in vitro* của các dẫn xuất tổng hợp bao gồm curcumin-monozerumbone (**4**), curcumin-biszerumbone (**5**), dipropargyl curcumin (**6**) cùng với CUR, được tiến hành trên 5 dòng tế bào ung thư người: Hep-G2 (ung thư gan), HeLa (ung thư cổ tử cung), MCF-7 (ung thư vú), A549 (ung thư phổi) và HGC-27 (ung thư dạ dày) (Bảng 3.8). Kết quả cho thấy các dẫn xuất bán tổng hợp đều mang lại sự cải thiện đáng kể về mặt hoạt tính so với chất gốc curcumin ban đầu. Sự khác biệt về giá trị IC_{50} giữa các hợp chất đã bước đầu phản ánh rõ nét ảnh hưởng của các nhóm thế khác nhau khi đưa vào vị trí hydroxyl phenolic của bộ khung curcuminoid.

Bảng 3.8. Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) của curcumin và các dẫn xuất tổng hợp trên 5 dòng tế bào ung thư

TT	Ký hiệu	Dòng tế bào, Giá trị IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)				
		Hep-G2	HeLa	MCF-7	A549	HGC-27
1	CUR	$62,45 \pm 2,15$	$58,15 \pm 1,90$	$65,60 \pm 2,35$	$72,20 \pm 2,50$	$60,85 \pm 2,05$
2	4	$25,35 \pm 1,20$	$22,42 \pm 1,15$	$28,05 \pm 1,35$	$31,25 \pm 1,50$	$26,60 \pm 1,25$
3	5	$38,62 \pm 1,55$	$35,30 \pm 1,45$	$41,85 \pm 1,70$	$45,45 \pm 1,85$	$39,20 \pm 1,60$
4	6	$48,15 \pm 1,80$	$45,45 \pm 1,65$	$52,60 \pm 1,95$	$56,80 \pm 2,10$	$49,35 \pm 1,75$
5	Paclitaxel	$0,85 \pm 0,05$	$0,68 \pm 0,04$	$0,92 \pm 0,05$	$1,15 \pm 0,08$	$0,80 \pm 0,05$

Trước hết, khi thay thế nguyên tử hydro ở nhóm -OH bằng gốc propargyl để tạo thành dẫn xuất dipropargyl curcumin (**6**), hoạt tính ức chế tế bào ung thư đã tăng lên ở mức độ vừa phải. Mặc dù bản thân nhóm propargyl không mang được tính kháng khối u đặc hiệu, nhưng sự hiện diện của nó có thể đóng vai trò che chắn, giúp phân tử bền vững hơn trước các enzyme chuyển hóa và giảm

thiếu sự thoái biến nhanh trong môi trường sinh lý. Dẫn xuất (6) có thể hoạt động tương tự như một dạng tiền thuốc (prodrug), giúp bảo tồn hệ β -diketone và kéo dài thời gian phát huy tác dụng của cấu trúc lõi.

Sự chuyển biến về hoạt tính trở nên rõ rệt và tích cực nhất khi đưa gốc zerumbone vào cấu trúc. Dẫn xuất lai thế một lần curcumin-monozerumbone (4) thể hiện hiệu lực ức chế tốt nhất trong toàn bộ các chất khảo sát. Sự gia tăng hoạt tính này gợi ý về một hiệu ứng hiệp đồng khá hiệu quả giữa hai nhóm mang dược tính (pharmacophore) từ curcumin và zerumbone. Việc tích hợp một gốc zerumbone dường như tạo ra sự cân bằng lý tưởng: cấu trúc mới vừa được tăng cường tính thân dầu (lipophilicity) giúp phân tử dễ dàng thâm thấu qua màng tế bào, vừa bổ sung thêm cơ chế tác động đa đích từ bản thân khung zerumbone.

Tuy nhiên, khi tiếp tục gắn thêm gốc zerumbone thứ hai để tạo thành dẫn xuất curcumin-biszerumbone (5), hoạt tính lại có xu hướng giảm nhẹ so với dẫn xuất mono (4), mặc dù hiệu lực vẫn duy trì ở mức cao hơn so với hợp chất (6) và curcumin gốc. Hiện tượng này có thể được lý giải thông qua yếu tố chướng ngại không gian (steric hindrance). Sự hiện diện của hai gốc zerumbone khá chồng kènh ở cả hai đầu phân tử đã làm tăng đáng kể kích thước và làm giảm tính linh hoạt của cấu dạng. Điều này phần nào gây ra những cản trở nhất định khi phân tử di chuyển, len lõi và gắn kết (docking) vào các khe xúc tác hẹp trên các receptor hoặc enzyme đích bên trong tế bào ung thư.

Nhìn chung, việc biến đổi cấu trúc tại vị trí -OH phenol đã mang lại những tác động tích cực đến hiệu quả kháng ung thư. Kết quả đối chiếu cho thấy, việc kết hợp các nhóm thế vừa có khả năng bảo vệ cấu trúc, vừa mang thêm dược tính (như zerumbone), đồng thời kiểm soát tốt yếu tố cản trở không gian sẽ là một hướng tiếp cận tiềm năng để tối ưu hóa và phát triển các thế hệ dẫn xuất curcumin mới trong tương lai.

Từ những kết quả khả quan trên, có thể kết luận rằng việc lai tạo cấu trúc curcumin với zerumbone, là dẫn xuất thế một lần (mono), là một chiến lược

thiết kế phân tử tối ưu giúp nâng cao đáng kể hoạt lực kháng ung thư. Kết quả này không chỉ khẳng định tiềm năng của hợp chất curcumin-monozerumbone (4) như một chất dẫn đường (lead compound) có tiềm năng, mà còn vạch ra định hướng rõ ràng cho các bước nghiên cứu tiếp theo. Cụ thể, để làm sáng tỏ cơ chế tác dụng ở mức độ phân tử, nghiên cứu được định hướng tiếp tục triển khai các mô hình tính toán mô phỏng *in silico* nhằm đánh giá ái lực và vị trí liên kết của các dẫn xuất này với các protein đích tiềm năng (ví dụ như các thụ thể liên quan đến con đường tăng sinh hay hình thành mạch máu khối u). Đồng thời, đây cũng là cơ sở dữ liệu nền tảng quan trọng để tiến tới các thử nghiệm sinh học chuyên sâu hơn (như đánh giá khả năng cảm ứng tế bào tự chết apoptosis) và các thử nghiệm *in vivo* trên mô hình động vật, qua đó hoàn thiện bức tranh toàn cảnh về giá trị dược lý và tiềm năng ứng dụng của hệ dẫn xuất mới.

3.3.5. Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của các dẫn xuất curcumin

Hoạt tính kháng vi sinh vật của curcumin (CUR) và các dẫn xuất bán tổng hợp (4, 5, 6) được đánh giá trên 8 chủng vi sinh vật kiểm định bao gồm vi khuẩn (Gram âm, Gram dương) và vi nấm (nấm mốc, nấm men). Kết quả xác định nồng độ ức chế tối thiểu (MIC) tại bảng 3.9 cho thấy việc biến đổi cấu trúc đã làm thay đổi đáng kể phổ kháng khuẩn và kháng nấm của các hợp chất.

CUR nguyên bản thể hiện hoạt tính kháng vi sinh vật rất yếu. Tại nồng độ 200 µg/ml, CUR chỉ thể hiện sự ức chế nhẹ trên 2 chủng vi khuẩn Gram dương (*B. subtilis* và *S. aureus*) và hoàn toàn không có tác dụng trên vi khuẩn Gram âm cũng như các chủng nấm (> 200 µg/ml). Sự hiện diện của hai nhóm -OH phenol làm tăng tính phân cực, khiến CUR khó xuyên qua lớp màng lipid kép của vi khuẩn và nấm để phát huy tác dụng nội bào.

Bảng 3.9. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng vi sinh vật kiểm định của curcumin và các dẫn xuất, nồng độ mẫu

Ký hiệu mẫu	Nồng độ ức chế tối thiểu (MIC: $\mu\text{g/ml}$)							
	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>
CUR	> 200	> 200	200	200	> 200	> 200	> 200	> 200
6	200	> 200	100	100	> 200	> 200	200	200
5	200	> 200	100	100	> 200	> 200	> 200	> 200
4	200	>200	100	100	200	> 200	200	100

Giá trị > 200 $\mu\text{g/ml}$ được xem là không có hoạt tính ở nồng độ thử nghiệm

Khi chuyển hóa thành dẫn xuất dipropargyl curcumin (**6**), phổ tác dụng đã được mở rộng lên 5 chủng. Hoạt tính trên vi khuẩn Gram dương tăng lên gấp đôi (MIC giảm còn 100 $\mu\text{g/ml}$), đồng thời hợp chất bắt đầu ghi nhận hoạt tính trên *E. coli* và 2 chủng nấm men ở nồng độ 200 $\mu\text{g/ml}$. Việc ether hóa nhóm -OH bằng gốc propargyl giúp tăng tính thân dầu (lipophilicity), tạo điều kiện cho phân tử chui qua rào cản peptidoglycan và màng tế bào của vi sinh vật dễ dàng hơn.

Sự khác biệt lớn nhất nằm ở các dẫn xuất lai hóa với zerumbone. Dẫn xuất curcumin-monozerumbone (**4**) thể hiện phổ hoạt tính rộng và mạnh nhất, có khả năng ức chế 6/8 chủng kiểm định. Hợp chất này nhạy cảm với vi khuẩn Gram dương và nấm men *C. albicans* (MIC = 100 $\mu\text{g/ml}$), đồng thời ức chế tốt với nấm *S. cerevisiae*, *A. niger* và *E. coli* (MIC = 200 $\mu\text{g/ml}$). Sự kết hợp thể một lần (mono) này mang lại hiệu ứng hiệp đồng. Cấu hình bất đối xứng của chất (**4**) duy trì được tính linh hoạt không gian và hệ số phân bố dầu-nước (LogP) tối ưu để thẩm thấu qua các loại màng sinh học.

Ngược lại, dù cũng chứa gốc zerumbone, dẫn xuất curcumin-biszerumbone (**5**) lại bị thu hẹp phổ hoạt tính (chỉ kháng 3 chủng) và hoàn toàn mất tác dụng trên vi nấm. Việc gắn hai gốc zerumbone công kênh ở hai đầu

phân tử có thể đã tạo ra hiệu ứng chướng ngại lập thể (steric hindrance). Kích thước phân tử quá lớn (oversized) khiến dẫn xuất (5) không thể lọt qua các kênh porin trên màng ngoài của vi khuẩn Gram âm hay vách tế bào vững chắc của nấm men và nấm mốc.

Dữ liệu kháng vi sinh vật kiểm định đồng thuận chặt chẽ với các kết quả độc tính tế bào và kháng viêm. Việc che chắn nhóm -OH là cần thiết để tăng tính thấm qua màng, nhưng sự kiểm soát kích thước phân tử mới là chìa khóa quyết định. Dẫn xuất mono (4) là minh chứng rõ nét nhất cho một thiết kế phân tử thành công, mở ra hướng ứng dụng làm tác nhân kháng sinh phổ rộng từ nguồn gốc thiên nhiên.

Nghiên cứu đã thực hiện thành công việc can thiệp cấu trúc hóa học trên bộ khung của curcuminoid, định hướng tập trung vào các nhóm chức (như hydroxyl phenol) nhằm tăng cường hoạt tính. Cụ thể, các dẫn xuất mới đã được tổng hợp thành công bao gồm dẫn xuất ether hóa (dipropargyl...) và các dẫn xuất lai hóa giữa curcuminoid với gốc zerumbone. Dữ liệu phổ hóa lý (MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR) đã xác nhận chính xác cấu trúc của các dẫn xuất tạo thành. Bên cạnh hướng đi hiện tại, dựa trên đặc điểm cấu trúc chứa hệ β -diketone và các nối đôi liên hợp, một số phương án bán tổng hợp khác hoàn toàn có thể được mở rộng trong tương lai như: tạo phức với các ion kim loại chuyển tiếp (Zn^{2+} , Cu^{2+}), hoặc thực hiện phản ứng ngưng tụ Knoevenagel tại vị trí carbon trung tâm (C4) để đưa thêm các nhóm thế hút/đẩy electron. Các định hướng này sẽ tạo ra thư viện các dẫn xuất nhiều hơn, phục vụ cho việc thiết kế các hoạt chất được dụng mới với phổ tác dụng mạnh và trúng đích hơn.

3.4. Mô phỏng dự đoán hoạt tính quét gốc tự do HOO• của curcuminoid

Nghiên cứu đã tiến hành phân tích cấu trúc và đặc tính điện tử của hai dẫn xuất curcumin (CUR và BDMC) trong hai môi trường dung môi mô phỏng khác nhau: nước (môi trường phân cực) và pentyl ethanoate (PEA - dung môi không phân cực, giả lập môi trường lipid). Hình 3.12 trình bày cấu trúc hình học tối ưu, các orbital biên (HOMO/LUMO) và bản đồ thế tĩnh

điện (ESP) của các dạng hổ biến (tautomer) diketone và keto-enol của CUR và BDMC trong môi trường nước. Kết quả tính toán khẳng định dạng keto-enol, với hệ π liên hợp mở rộng và cấu hình phẳng, là dạng ưu thế về mặt nhiệt động lực học với phân số mol đạt trên 99% ở cả hai hợp chất, nhất quán với các công bố trước đây. Sự phân bố mật độ điện tử của HOMO và LUMO chủ yếu tập trung tại các liên kết đôi mạch nhánh và vòng thơm, xác định đây là các trung tâm phản ứng tiềm năng cho cơ chế cộng gốc tự do (RAF). Trong khi đó, bản đồ ESP hiển thị các vùng mật độ electron cao (vùng âm) tập trung tại nhóm carbonyl và vòng phenyl, trong khi các vùng thiếu hụt electron (vùng dương) xuất hiện tại nhóm hydroxyl, gợi ý về khả năng cho proton H^+ của phân tử.

Việc đánh giá các thông số mô tả nhiệt hóa nội tại của các tautomer diketone và keto-enol thuộc CUR và BDMC trong môi trường nước và PEA (Bảng 3.10), bao gồm enthalpy phân ly liên kết (BDE), thế ion hóa (IP) và ái lực proton (PA), cung cấp cái nhìn tổng quan về tiềm năng kháng oxy hóa của các hợp chất. Một xu hướng nhiệt động học nổi bật là giá trị PA trong môi trường nước thấp hơn đáng kể so với BDE và IP (ví dụ: PA \sim 124-135 kJ/mol so với BDE \sim 351-389 kJ/mol và IP $>$ 518 kJ/mol đối với CUR). Điều này chỉ ra rằng trong môi trường phân cực như nước, quá trình khử proton diễn ra rất thuận lợi, tạo điều kiện cho các cơ chế kháng oxy hóa liên quan đến loài anion, điển hình là cơ chế chuyển electron đơn lẻ (SET) hoặc cơ chế chuyển electron mất proton tuần tự (SPLET). Sự khác biệt giữa các thông số này trở nên ít rõ rệt hơn trong môi trường PEA, nơi các giá trị nhiệt hóa đều tăng cao do hằng số điện môi thấp của dung môi.

Yếu tố quan trọng chi phối hoạt tính trong pha nước chính là cân bằng acid-base. Các giá trị pK_a tính toán cho ba bước phân ly proton cho thấy các hằng số này nằm trong khoảng pH sinh lý (7-9), phù hợp với dữ liệu thực nghiệm. Tại pH 7.4, cả CUR và BDMC tồn tại dưới dạng hỗn hợp của bốn dạng hóa học: dạng trung hòa (Neu), monoanion (MoA), dianion (DiA) và

trianion (TriA). Đáng chú ý, mặc dù phân số mol của các dạng đa anion (DiA và TriA) thường rất nhỏ (dưới 2%), nhưng đóng góp của chúng vào hoạt tính kháng oxy hóa tổng thể - thông qua cơ chế SET - lại mang tính quyết định nhờ hằng số tốc độ phản ứng cực lớn, vượt xa các dạng còn lại.

Để làm rõ cơ chế phản ứng, bề mặt năng lượng tiềm tàng (PES) cho tương tác với gốc $\text{HOO}\cdot$ đã được thiết lập. Hình 3.12 và Hình 3.13 mô tả biểu đồ enthalpy tương đối tại 0 K (ΔH_{0K}) cho các con đường tách hydrogen (Abs) và cộng gốc (Add) của CUR và BDMC. Trong môi trường nước, đối với monoanion dạng diketone (dạng hỗn biến ưu thế của diketone), phản ứng Add tại nguyên tử C4 trung tâm có rào năng lượng hoạt hóa thấp nhất ($\Delta H^\ddagger \sim 15\text{-}19$ kJ/mol), thuận lợi hơn so với phản ứng Abs tại nhóm phenolic O-H ($\Delta H^\ddagger \sim 29\text{-}44$ kJ/mol). Tuy nhiên, đối với dạng trung hòa keto-enol (dạng ưu thế của keto-enol), con đường Abs lại có xu hướng thuận lợi hơn một chút so với Add. Trong môi trường PEA, nơi chỉ tồn tại dạng trung hòa, rào năng lượng hoạt hóa cho cả hai cơ chế đều tăng đáng kể (khoảng $\sim 10\text{-}15$ kJ/mol) so với trong nước, cho thấy hoạt tính kháng oxy hóa bị suy giảm mạnh trong môi trường lipid. Phân tích động học chi tiết (Bảng 3.11 và Bảng 3.12) cho thấy một bức tranh phức tạp hơn so với các dự đoán thuần túy từ nhiệt động học.

Đối với các dạng Neu và MoA của CUR và BDMC, cơ chế Abs tại các nhóm phenolic O22H và O23H đóng góp chính với hằng số tốc độ đạt mức $10^3 - 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.

Tuy nhiên, đối với các dạng DiA và TriA, cơ chế SET hoàn toàn chiếm ưu thế. Mặc dù phân số mol hiện diện cực thấp (ví dụ ở CUR: DiA chiếm 1.09%, TriA chiếm 0.03%), hằng số tốc độ SET của chúng lại đạt mức tiệm cận giới hạn khuếch tán (ví dụ: $9.10 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ cho DiA keto-enol CUR). Khi xét hằng số tốc độ biểu kiến (tích của hằng số tốc độ và phân số mol), đóng góp của các dạng anion đa điện tích vào tốc độ phản ứng tổng (Bảng 3.13) là cực kỳ quan trọng, chiếm trên 97% tỷ lệ phân nhánh (Γ). Kết quả

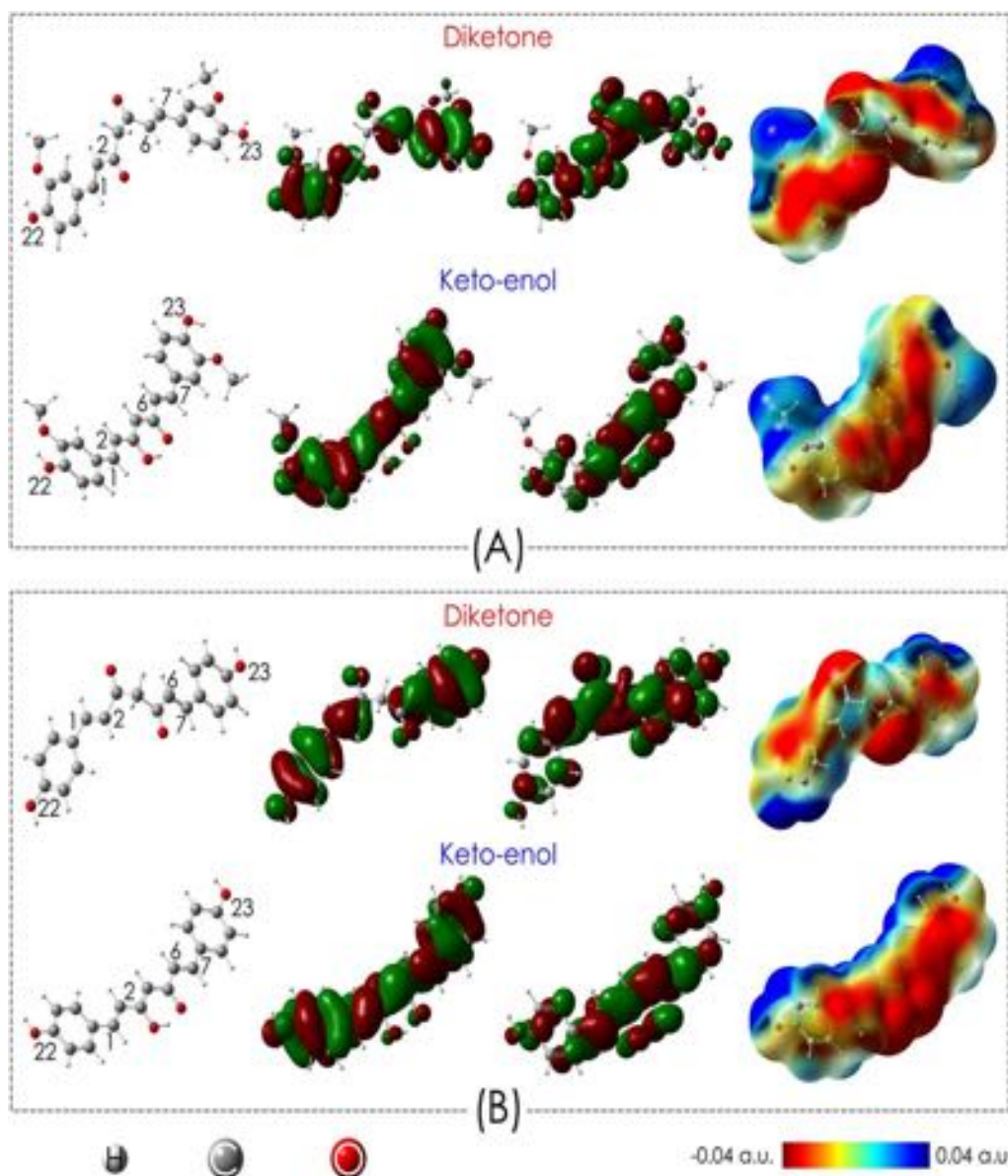
này nhấn mạnh vai trò cốt lõi của các dạng anion trong việc khử gốc tự do trong môi trường nước.

Trong môi trường PEA, đặc tính động học thay đổi hoàn toàn. Do chỉ tồn tại dạng trung hòa, phản ứng tách Abs trở thành con đường phản ứng gần như duy nhất với hằng số tốc độ thấp hơn nhiều (CUR: $\sim 4 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$; BDMC: $\sim 8 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Các phản ứng Add và SET trong môi trường này gần như không đáng kể.

So sánh hiệu suất tổng thể giữa CUR và BDMC cho thấy sự đảo ngược hoạt tính tùy thuộc vào môi trường phản ứng. Trong nước, hằng số tốc độ tổng của CUR ($9.36 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) cao hơn BDMC ($2.60 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) khoảng 3.6 lần. Sự mạnh hơn này được giải thích bởi hiệu ứng đẩy electron của hai nhóm methoxy (-OCH₃) tại vị trí ortho trong cấu trúc CUR, làm tăng mật độ electron và thúc đẩy khả năng cho electron của dạng DiA trong cơ chế SET. Ngược lại, trong môi trường PEA, BDMC ($8.16 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) lại phản ứng nhanh hơn CUR ($4.02 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Nguyên nhân do ở dạng trung hòa, các nhóm -OH trong BDMC ở trạng thái tự do, trong khi ở CUR, nhóm -OH tạo liên kết hydrogen nội phân tử với nhóm -OCH₃ lân cận, làm bền hóa cấu trúc và gây khó khăn cho quá trình tách nguyên tử hydrogen.

Cuối cùng, nghiên cứu tập trung phân tích bản chất hóa học của quá trình chuyển dịch hydrogen. Thông qua phân tích orbital phân tử chiếm giữ đơn lẻ (SOMO) tại trạng thái chuyển tiếp (TS), diễn biến mật độ spin và điện tích dọc theo tọa độ phản ứng nội tại (IRC), cùng với cấu hình electron tự nhiên (NEC) được trình bày tại Hình 3.15 và Bảng 3.14, có thể kết luận rằng phản ứng tách Abs tại các nhóm phenolic -OH không tuân theo cơ chế chuyển nguyên tử hydrogen (HAT) thông thường, mà là quá trình chuyển electron kết hợp proton (PCET). Trong PCET, proton và electron được chuyển dịch độc lập từ các trung tâm khác nhau của chất cho sang chất nhận, thay vì chuyển dịch đồng thời như một nguyên tử hydro trung hòa. Các bằng chứng ủng hộ bao gồm: orbital SOMO tại trạng thái chuyển tiếp TS không

định hướng dọc theo trục chuyển dịch H; điện tích của nguyên tử H đang chuyển dịch luôn mang giá trị dương ($\sim +0.55e$); mật độ spin trên H xấp xỉ bằng 0; và phân tích NEC cho thấy cấu hình electron $1s^0$ - tất cả đều minh chứng đây là một proton chứ không phải nguyên tử hydrogen trung hòa.



Hình 3.12. Cấu trúc hình học tối ưu, orbital biên (HOMO, LUMO) và bản đồ thế điện tĩnh (ESP) của các tautomer diketone và keto–enol thuộc CUR (A) và BDMC (B) trong môi trường nước.

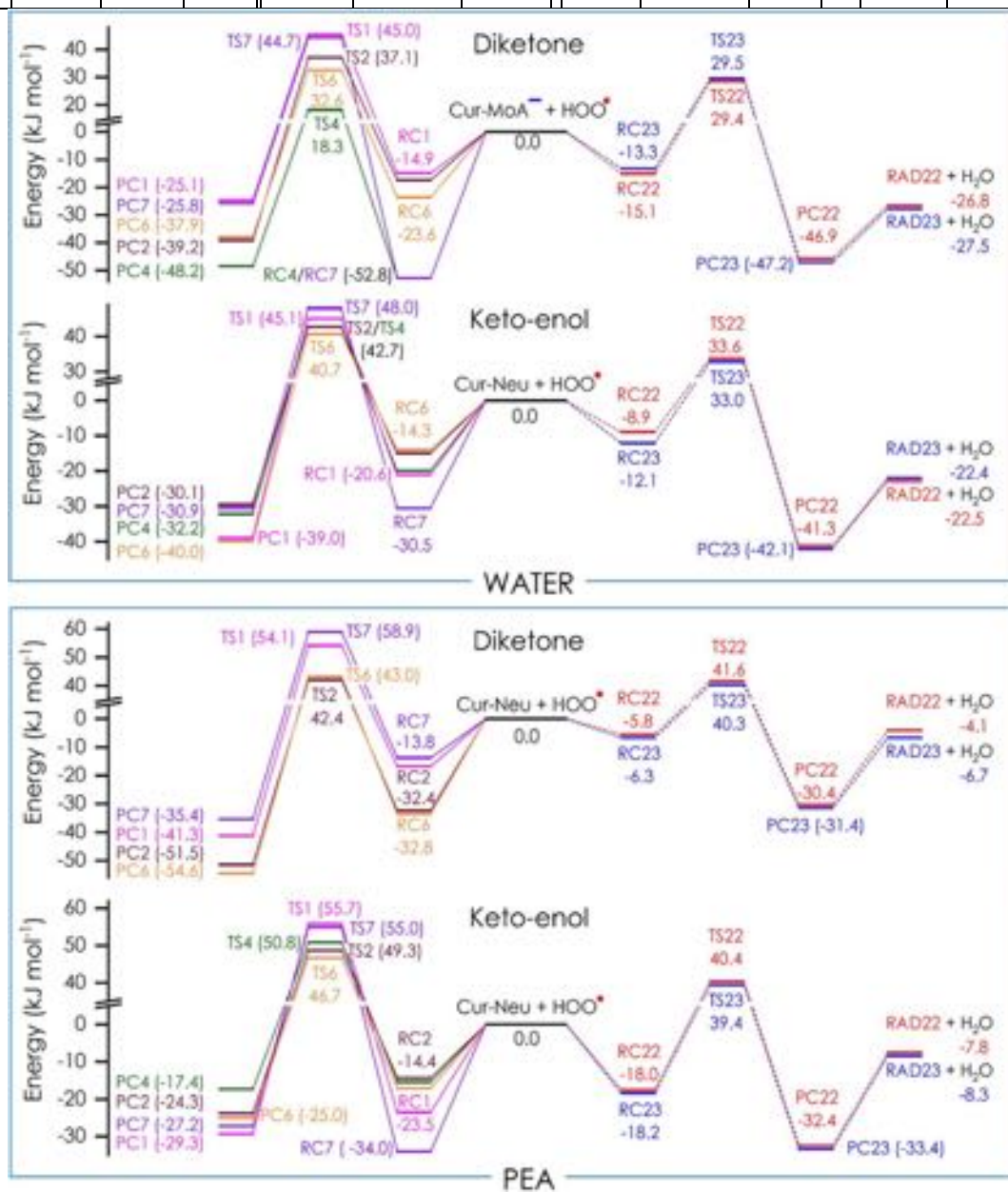
Tóm lại, nghiên cứu tính toán này cung cấp một cái nhìn toàn diện về cơ chế thu dọn gốc $\text{HOO}\cdot$ của curcuminoid, nhấn mạnh sự phụ thuộc mật thiết vào môi trường phản ứng thông qua ảnh hưởng của cân bằng acid-base và hỗ biến. Trong môi trường nước sinh lý, hiệu quả kháng oxy hóa được quyết định bởi

khả năng chuyển electron cực nhanh của các dạng anion (điển hình là dianion) qua cơ chế SET. Trong khi đó, tại môi trường lipid, cơ chế tách hydrogen (Abs) của dạng trung hòa chiếm ưu thế nhưng hiệu suất thấp hơn đáng kể. Việc xác định cơ chế PCET cũng làm sáng tỏ bản chất tinh vi trong phản ứng kháng oxy hóa của các hợp chất phenolic như CUR.

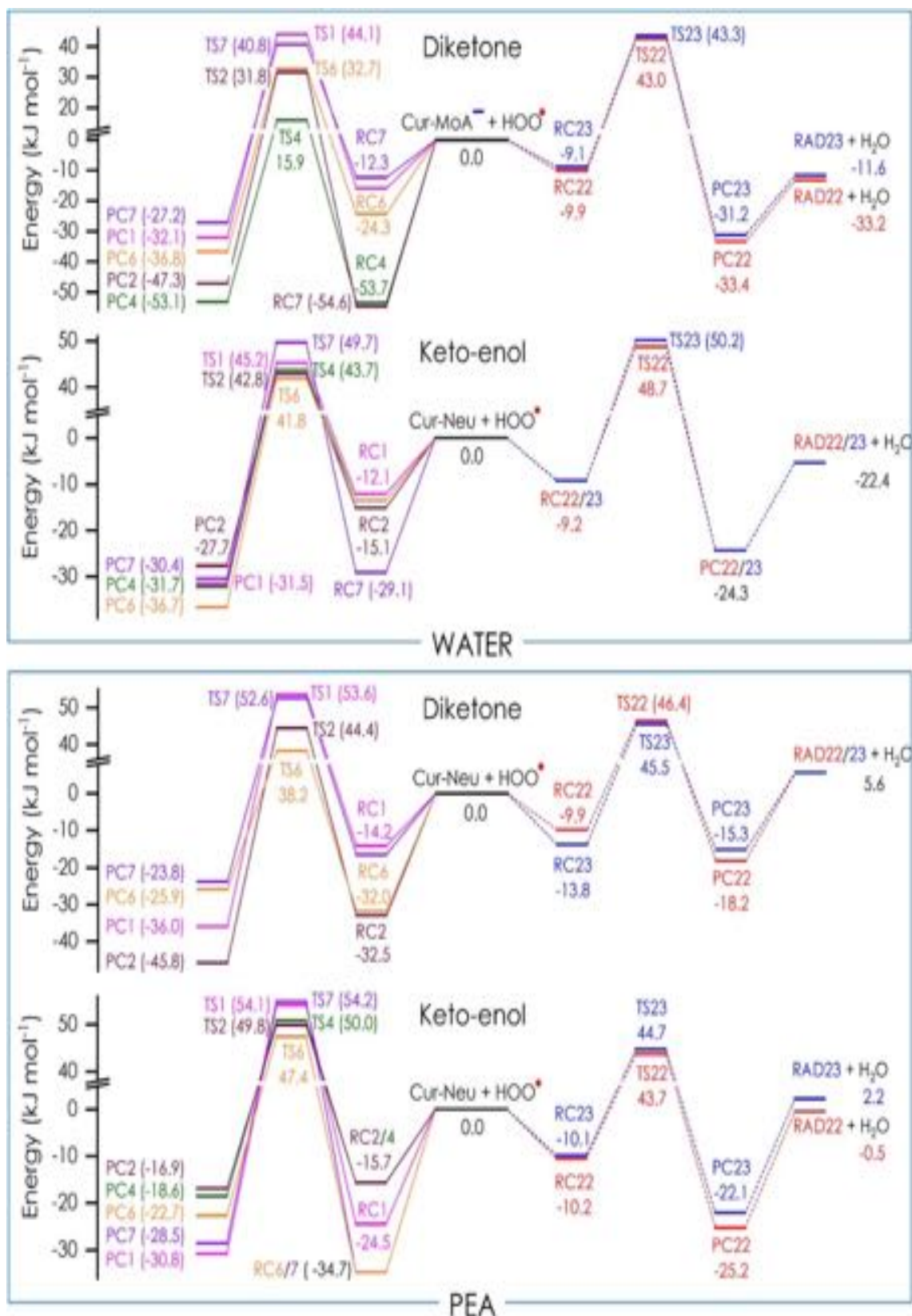
Bảng 3.10. Các thông số nhiệt hóa nội tại (BDE, PA và IP) của các tautomer diketone và keto-enol thuộc CUR và BDMC trong môi trường nước và PEA (đơn vị: kJ mol⁻¹)

	CUR						BDMC					
	Diketone			Keto-enol			Diketone			Keto-enol		
Vị trí	BDE	PA	IP	BDE	PA	IP	BDE	PA	IP	BDE	PA	IP
Nước												
—			527,4			518,5			543,6			528,9
O22H	357,3	128,0		351,5	131,4		374,9	129,1		368,3	133,0	
O23H	354,8	129,5		351,3	132,2		374,9	129,1		371,8	132,6	
O20H	—	—		464,5	135,2		—	—		463,0	137,1	
C1H	—	292,6		—	—		—	307,0		—	—	
C2H	—	234,5		—	—		—	223,7		—	—	
C4H	389,3	124,1		464,9	293,1		388,5	124,4		495,5	293,6	
C6H	—	212,6		—	—		—	223,7		—	—	
C7H	—	302,2		—	—		—	307,2		—	—	
C24H	421,1	—		421,4	—		—	—		—	—	
C25H	419,0	—		421,0	—		—	—		—	—	
PEA												
—			536,6			550,8			579,8			560,4
O22H	356,1	250,7		352,3	250,3		365,7	239,9		362,6	240,4	
O23H	353,5	251,9		351,7	252,9		365,7	239,9		360,0	239,7	
O20H	—	—		463,3	283,4		—	—		462,2	283,1	
C1H	—	411,4		—	—		—	420,3		—	—	
C2H	—	367,4		—	—		—	366,7		—	—	
C4H	384,0	248,1		490,1	418,3		384,1	247,8		490,0	418,0	
C6H	—	354,2		—	—		—	366,7		—	—	
C7H	—	412,6		—	—		—	420,3		—	—	

C24H	415,6	—	415,7	—	—	—	—	—	—	—	—
C25H	416,2	—	416,0	—	—	—	—	—	—	—	—



Hình 3.13. Giảm độ enthalpy tương đối hiệu chỉnh năng lượng điểm không (ZPE) tại 0 K (ΔH_{0K}) của các quá trình tách hydrogen (Abs) và cộng gốc (Add) giữa CUR và gốc tự do HOO[•] trong môi trường nước và PEA.



Hình 3.14. Giảm đồ enthalpy tương đối hiệu chỉnh năng lượng điểm không (ZPE) tại 0 K (ΔH_{0K}) của các quá trình tách hydrogen (Abs) và cộng gốc (Add) giữa BDMC và gốc tự do $\text{HOO}\cdot$ trong môi trường nước và PEA.

Bảng 3.11. Thông số động học và nhiệt động học của phản ứng giữa gốc HOO• và các dạng tồn tại của tautomer keto–enol CUR trong môi trường nước và PEA tại 298 K

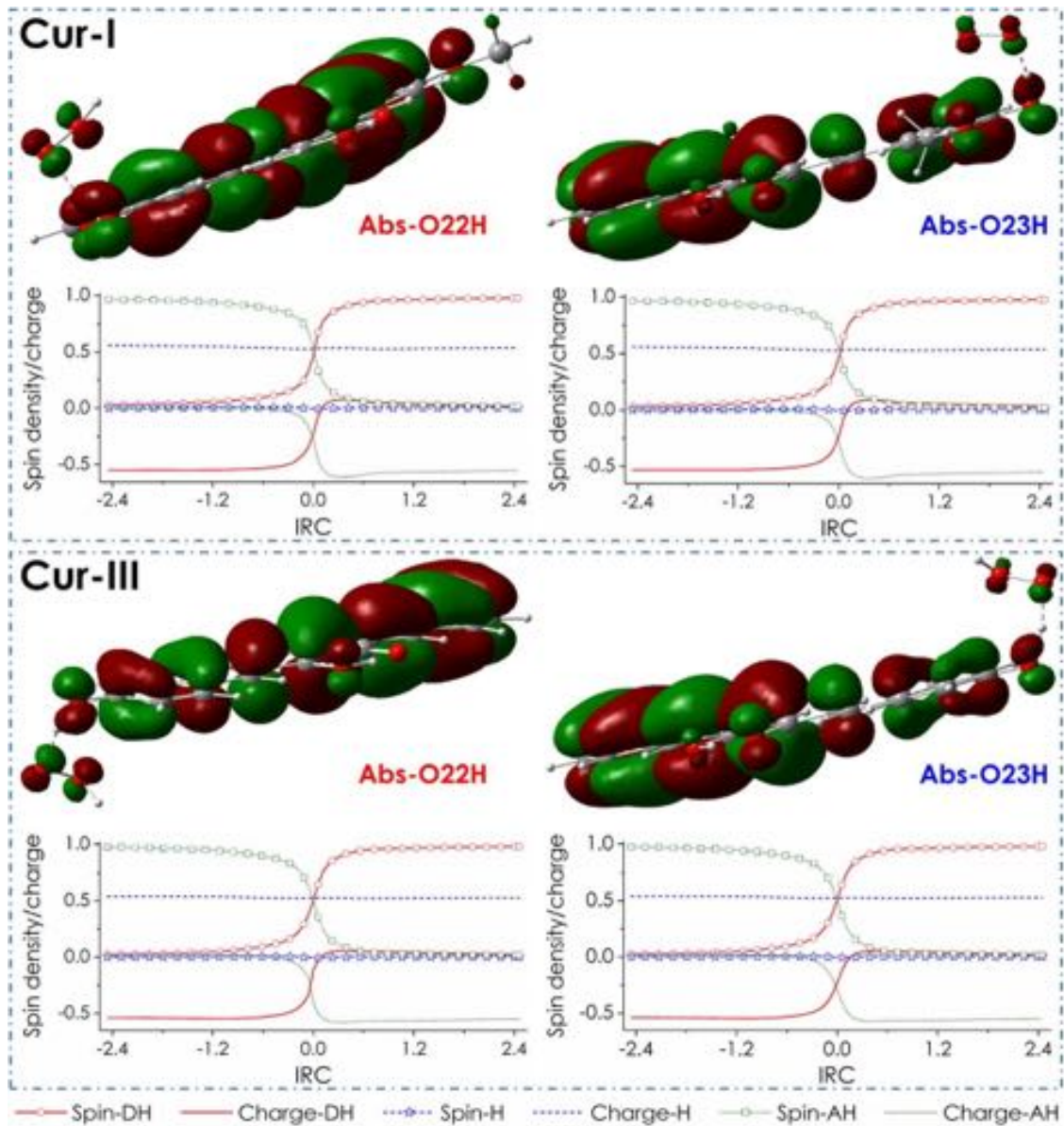
Dạng	Vị trí	DG^\ddagger	D_rG^0	k_T	k_D	k_{app}	k_{app}^{Mf}	G
Trong nước								
Phản ứng tách								
Trung hòa ($f_i = 75,10\%$)								
O22H		-25,5	80,1	$4,01 \times 10^3$	$2,42 \times 10^9$	$4,01 \times 10^3$	$3,01 \times 10^3$	0,00
O23H		-23,0	78,8	$5,14 \times 10^3$	$2,42 \times 10^9$	$5,14 \times 10^3$	$3,86 \times 10^3$	0,00
Phản ứng cộng								
C1		8,9	88,6	$7,83 \times 10^{-2}$	$2,00 \times 10^9$	$7,83 \times 10^{-2}$	$5,88 \times 10^{-2}$	0,00
C2		16,5	90,3	$3,66 \times 10^{-2}$	$2,01 \times 10^9$	$3,66 \times 10^{-2}$	$2,52 \times 10^{-2}$	0,00
C4		11,9	89,0	$5,12 \times 10^{-2}$	$1,97 \times 10^9$	$5,12 \times 10^{-2}$	$3,85 \times 10^{-2}$	0,00
C6		9,2	86,0	$1,89 \times 10^{-1}$	$2,01 \times 10^9$	$1,89 \times 10^{-1}$	$1,42 \times 10^{-1}$	0,00
C7		17,2	91,9	$2,16 \times 10^{-2}$	$1,97 \times 10^9$	$2,16 \times 10^{-2}$	$1,62 \times 10^{-2}$	0,00
Chuyển electron (SET)								
		142,6	174,3	$4,46 \times 10^{-17}$	$8,45 \times 10^9$	$4,46 \times 10^{-17}$	$3,44 \times 10^{-17}$	0,00
MonoAnion ($f_i = 23,78\%$) Phản ứng tách								
O22H		-29,5	74,4	$1,57 \times 10^4$	$2,42 \times 10^9$	$1,57 \times 10^4$	$3,72 \times 10^3$	0,00
O23H		-29,7	72,8	$2,06 \times 10^4$	$2,42 \times 10^9$	$2,06 \times 10^4$	$4,90 \times 10^3$	0,01
Phản ứng cộng								
C1		21,5	88,4	$7,85 \times 10^{-2}$	$2,01 \times 10^9$	$7,85 \times 10^{-2}$	$1,87 \times 10^{-2}$	0,00
C2		4,1	78,3	$3,85 \times 10^0$	$2,03 \times 10^9$	$3,85 \times 10^0$	$9,14 \times 10^{-1}$	0,00
C4		-4,2	66,9	$3,17 \times 10^2$	$1,92 \times 10^9$	$3,17 \times 10^2$	$7,54 \times 10^1$	0,00
C6		-2,6	79,0	$3,23 \times 10^0$	$2,04 \times 10^9$	$3,23 \times 10^0$	$7,68 \times 10^{-1}$	0,00
C7		8,8	88,7	$7,03 \times 10^{-2}$	$2,08 \times 10^9$	$7,03 \times 10^{-2}$	$1,67 \times 10^{-2}$	0,00
Chuyển electron (SET)								
		66,7	66,7	$2,91 \times 10^2$	$8,48 \times 10^9$	$2,91 \times 10^2$	$6,91 \times 10^1$	0,00
DiAnion ($f_i = 1,09\%$) Phản ứng tách								

Dạng	Vị trí	DG^\ddagger	D_rG^0	k_T	k_D	k_{app}	k_{app}^{Mf}	G
O23H		11,8	75,5	$1,78 \times 10^4$	$2,39 \times 10^9$	$1,78 \times 10^4$	$1,95 \times 10^2$	0,00
Phản ứng cộng								
C1		20,4	86,9	$1,48 \times 10^{-1}$	$2,03 \times 10^9$	$1,48 \times 10^{-1}$	$1,62 \times 10^{-3}$	0,00
C2		-8,1	55,6	$4,95 \times 10^4$	$2,25 \times 10^9$	$4,95 \times 10^4$	$5,42 \times 10^2$	0,00
C4		-12,0	62,8	$1,67 \times 10^3$	$1,90 \times 10^9$	$1,67 \times 10^3$	$1,83 \times 10^1$	0,00
C6		7,0	78,8	$3,18 \times 10^0$	$2,00 \times 10^9$	$3,18 \times 10^0$	$3,48 \times 10^{-2}$	0,00
C7		14,8	88,3	$8,30 \times 10^{-2}$	$1,98 \times 10^9$	$8,30 \times 10^{-2}$	$9,08 \times 10^{-4}$	0,00
Chuyển electron (SET)								
		3,2	16,0	$2,35 \times 10^{11}$	$8,62 \times 10^9$	$8,31 \times 10^9$	$9,10 \times 10^7$	97,60
TriAnion ($f_i = 0,03\%$) Phản ứng cộng								
C1		20,4	87,2	$1,23 \times 10^{-1}$	$2,05 \times 10^9$	$1,23 \times 10^{-1}$	$3,24 \times 10^{-5}$	0,00
C2		-7,4	55,0	$6,75 \times 10^4$	$2,26 \times 10^9$	$6,75 \times 10^4$	$1,77 \times 10^1$	0,00
C4		2,7	61,9	$2,41 \times 10^3$	$1,89 \times 10^9$	$2,41 \times 10^3$	$6,32 \times 10^{-1}$	0,00
C6		-1,3	54,0	$5,87 \times 10^4$	$2,24 \times 10^9$	$5,87 \times 10^4$	$1,54 \times 10^1$	0,00
C7		21,4	85,3	$2,51 \times 10^{-1}$	$2,01 \times 10^9$	$2,51 \times 10^{-1}$	$6,59 \times 10^{-5}$	0,00
Pentyl ethanoate ($f_i = 100,00\%$) Phản ứng tách								
O22H		-6,32	89,55	$1,91 \times 10^1$	$2,63 \times 10^9$	$1,91 \times 10^1$	$1,91 \times 10^1$	47,54
O23H		-6,30	88,88	$2,11 \times 10^1$	$2,66 \times 10^9$	$2,11 \times 10^1$	$2,11 \times 10^1$	52,45
Phản ứng cộng								
C1		18,31	102,37	$2,95 \times 10^{-4}$	$2,17 \times 10^9$	$2,95 \times 10^{-4}$	$2,95 \times 10^{-4}$	0,00
C2		28,01	98,46	$1,33 \times 10^{-3}$	$2,18 \times 10^9$	$1,33 \times 10^{-3}$	$1,33 \times 10^{-3}$	0,00
C4		33,44	98,48	$1,19 \times 10^{-3}$	$2,14 \times 10^9$	$1,19 \times 10^{-3}$	$1,19 \times 10^{-3}$	0,00
C6		20,40	96,43	$2,88 \times 10^{-3}$	$2,16 \times 10^9$	$2,88 \times 10^{-3}$	$2,88 \times 10^{-3}$	0,00
C7		27,10	107,52	$4,20 \times 10^{-5}$	$2,16 \times 10^9$	$4,20 \times 10^{-5}$	$4,20 \times 10^{-5}$	0,00
Tổng							$4,02 \times 10^1$	100,00

Bảng 3.12. Thông số động học và nhiệt động học của phản ứng giữa gốc HOO• và các dạng tồn tại của tautomer keto-enol BDMC trong môi trường nước và PEA tại 298 K

Dạng	Vị trí	DG^\ddagger	D_rG^0	k_T	k_D	k_{app}	k_{app}^{Mf}	G
Trong nước Trung hòa ($f_i = 77,56\%$)		Phản ứng tách						
O23H		-6,1	88,4	$8,31 \times 10^2$	$2,43 \times 10^9$	$8,31 \times 10^2$	$6,44 \times 10^2$	0,00
O22H		-6,1	88,1	$9,73 \times 10^2$	$2,42 \times 10^9$	$9,73 \times 10^2$	$7,54 \times 10^2$	0,00
Phản ứng cộng								
C1		14,0	89,4	$5,84 \times 10^{-2}$	$2,05 \times 10^9$	$5,84 \times 10^{-2}$	$4,53 \times 10^{-2}$	0,00
C2		18,9	89,8	$4,18 \times 10^{-2}$	$2,05 \times 10^9$	$4,18 \times 10^{-2}$	$3,24 \times 10^{-2}$	0,00
C4		11,8	87,4	$9,74 \times 10^{-2}$	$2,01 \times 10^9$	$9,74 \times 10^{-2}$	$7,55 \times 10^{-2}$	0,00
C6		11,2	87,3	$1,13 \times 10^{-1}$	$2,05 \times 10^9$	$1,13 \times 10^{-1}$	$8,76 \times 10^{-2}$	0,00
C7		16,5	97,2	$2,59 \times 10^{-3}$	$2,01 \times 10^9$	$2,59 \times 10^{-3}$	$2,01 \times 10^{-2}$	0,00
Chuyển electron (SET)								
127,7			135,9	$2,36 \times 10^{-10}$	$8,28 \times 10^9$	$2,36 \times 10^{-10}$	$1,83 \times 10^{-10}$	0,00
MonoAnion ($f_i = 21,92\%$)		Phản ứng tách						
O23H		-11,2	77,1	$2,23 \times 10^4$	$2,14 \times 10^9$	$2,23 \times 10^4$	$4,89 \times 10^3$	0,02
O22H		-11,2	77,0	$2,30 \times 10^4$	$2,14 \times 10^9$	$2,30 \times 10^4$	$5,39 \times 10^3$	0,02
Phản ứng cộng								
C1		15,6	90,4	$3,52 \times 10^{-2}$	$2,03 \times 10^9$	$3,52 \times 10^{-2}$	$7,73 \times 10^{-3}$	0,00
C2		9,9	81,1	$1,26 \times 10^0$	$2,06 \times 10^9$	$1,26 \times 10^0$	$2,27 \times 10^{-1}$	0,00
C4		-4,3	68,2	$1,93 \times 10^2$	$1,94 \times 10^9$	$1,93 \times 10^2$	$4,23 \times 10^1$	0,00
C6		9,9	81,1	$1,23 \times 10^0$	$2,06 \times 10^9$	$1,23 \times 10^0$	$2,70 \times 10^{-1}$	0,00
C7		17,4	91,1	$3,04 \times 10^{-2}$	$2,06 \times 10^9$	$3,04 \times 10^{-2}$	$6,66 \times 10^{-3}$	0,00
Chuyển electron (SET)								
69,5			69,6	$9,56 \times 10^1$	$8,33 \times 10^9$	$9,56 \times 10^1$	$2,10 \times 10^1$	0,00
DiAnion ($f_i = 0,51\%$)		Phản ứng tách						
O23H		-14,4	81,1	$3,41 \times 10^4$	$2,04 \times 10^9$	$3,41 \times 10^4$	$1,73 \times 10^2$	0,00
Phản ứng cộng								
C1		20,4	86,9	$1,48 \times 10^{-1}$	$2,03 \times 10^9$	$1,48 \times 10^{-1}$	$1,62 \times 10^{-3}$	0,00

Dạng	Vị trí	DG^\ddagger	$D_r G^0$	k_T	k_D	k_{app}	k_{app}^{Mf}	G
C2		-8,1	55,6	$4,95 \times 10^4$	$2,25 \times 10^9$	$4,95 \times 10^4$	$5,42 \times 10^2$	0,00
C4		-12,0	62,8	$1,67 \times 10^3$	$1,90 \times 10^9$	$1,67 \times 10^3$	$1,83 \times 10^1$	0,00
C6		7,0	78,8	$3,18 \times 10^0$	$2,00 \times 10^9$	$3,18 \times 10^0$	$3,48 \times 10^{-2}$	0,00
C7		14,8	88,3	$8,30 \times 10^{-2}$	$1,98 \times 10^9$	$8,30 \times 10^{-2}$	$9,08 \times 10^{-4}$	0,00
Chuyển electron (SET)								
		16,1	23,2	$1,30 \times 10^{10}$	$8,33 \times 10^9$	$5,08 \times 10^9$	$2,57 \times 10^7$	98,70
TriAnion ($f_i = 0,01\%$) Phản ứng cộng								
C1		21,8	76,6	$8,16 \times 10^0$	$2,05 \times 10^9$	$8,16 \times 10^0$	$8,20 \times 10^{-4}$	0,00
C2		1,2	57,6	$1,32 \times 10^4$	$2,19 \times 10^9$	$1,32 \times 10^4$	$1,30 \times 10^0$	0,00
C4		-1,1	61,4	$2,95 \times 10^3$	$1,92 \times 10^9$	$2,95 \times 10^3$	$2,90 \times 10^{-1}$	0,00
C6		1,5	60,8	$3,58 \times 10^3$	$2,15 \times 10^9$	$3,58 \times 10^3$	$3,51 \times 10^{-1}$	0,00
C7		16,1	80,7	$1,71 \times 10^0$	$2,09 \times 10^9$	$1,71 \times 10^0$	$1,68 \times 10^{-4}$	0,00
Chuyển electron (SET)								
		11,8	25,3	$1,71 \times 10^9$	$8,40 \times 10^9$	$3,33 \times 10^9$	$3,27 \times 10^5$	1,26
Tổng							$2,61 \times 10^7$	100,00
Pentyl ethanoate ($f_i = 100,00\%$) Phản ứng tách								
O22H		-3,7	85,7	$4,61 \times 10^2$	$2,68 \times 10^9$	$4,61 \times 10^2$	$4,61 \times 10^2$	56,52
O23H		-0,8	86,4	$3,55 \times 10^2$	$2,68 \times 10^9$	$3,55 \times 10^2$	$3,55 \times 10^2$	43,48
Phản ứng cộng								
C1		14,3	98,1	$1,66 \times 10^{-3}$	$2,23 \times 10^9$	$1,66 \times 10^{-3}$	$1,66 \times 10^{-3}$	0,00
C2		27,3	95,3	$4,54 \times 10^{-3}$	$2,21 \times 10^9$	$4,54 \times 10^{-3}$	$4,54 \times 10^{-3}$	0,00
C4		24,8	92,9	$1,13 \times 10^{-2}$	$2,20 \times 10^9$	$1,13 \times 10^{-2}$	$1,13 \times 10^{-2}$	0,00
C6		21,4	93,6	$9,07 \times 10^{-3}$	$2,22 \times 10^9$	$9,07 \times 10^{-3}$	$9,07 \times 10^{-3}$	0,00
C7		20,1	102,4	$3,25 \times 10^{-4}$	$2,21 \times 10^9$	$3,25 \times 10^{-4}$	$3,25 \times 10^{-4}$	0,00
Tổng							$8,16 \times 10^2$	100,00



Hình 3.15. Diễn biến mật độ spin, điện tích NPA của trung tâm cho (DH), hydrogen chuyển dịch (H), trung tâm nhận (AH) dọc theo tọa độ phản ứng nội tại (IRC) và hình ảnh orbital SOMO tại trạng thái chuyển tiếp (TS) của các phản ứng PCET ưu thế trong pha nước.

Bảng 3.13. Hằng số tốc độ biểu kiến (k_{app}), hằng số tốc độ hiệu chỉnh phân số mol (k_{Mf}) và tỷ lệ phân nhánh (Γ) tổng thể của CUR và BDMC trong môi trường nước và PEA tại 298 K

Tautomers	Nước				PEA			
	k_{app}	Mf	k_{Mf}	G	k_{app}	Mf	k_{Mf}	G
CUR Diketone	$1,62 \times 10^8$	0,59	$9,53 \times 10^5$	1,02	$5,36 \times 10^1$	0,01	$7,14 \times 10^{-3}$	0,02
Keto-enol	$9,32 \times 10^7$	99,41	$9,26 \times 10^7$	98,98	$4,02 \times 10^1$	99,99	$4,02 \times 10^1$	99,98
Overall			$9,36 \times 10^7$	100,00			$4,02 \times 10^1$	100,00
BDMC Diketone	$1,96 \times 10^6$	0,14	$2,81 \times 10^3$	0,01	$1,12 \times 10^3$	0,20	$2,26 \times 10^0$	0,28
Keto-enol	$2,61 \times 10^7$	99,86	$2,60 \times 10^7$	99,99	$8,15 \times 10^2$	99,80	$8,14 \times 10^2$	99,72
Overall			$2,60 \times 10^7$	100,00			$8,16 \times 10^2$	100,00

Bảng 3.14. Phân tích cấu hình electron tự nhiên (NEC) của nguyên tử hydrogen (H), trung tâm cho (DH) và trung tâm nhận (AH) tại trạng thái chuyển tiếp của các phản ứng tách hydrogen ưu thế trong nước

CUR-O22H	H	$1S^0$
	O-DH	$[Core]2S^{1.65}2p^{5.06}$
	O-AH	$[Core]2S^{1.82}2p^{4.58}$
CUR-O23H	H	$1S^0$
	O-DH	$[Core]2S^{0.83}2p^{2.47}$
	O-AH	$[Core]2S^{0.91}2p^{2.12}$
BDMC-O22H	H	$1S^0$
	O-DH	$[Core]2S^{0.83}2p^{2.42}$
	O-AH	$[Core]2S^{0.90}2p^{2.24}$
BDMC-O23H	H	$1S^0$
	O-DH	$[Core]2S^{0.83}2p^{2.42}$
	O-AH	$[Core]2S^{0.90}2p^{2.20}$

3.5. Dự đoán cơ chế ức chế tiềm năng đối với phức hệ protein TLR4/MD-2 của curcuminoid kết hợp mô phỏng và thực nghiệm

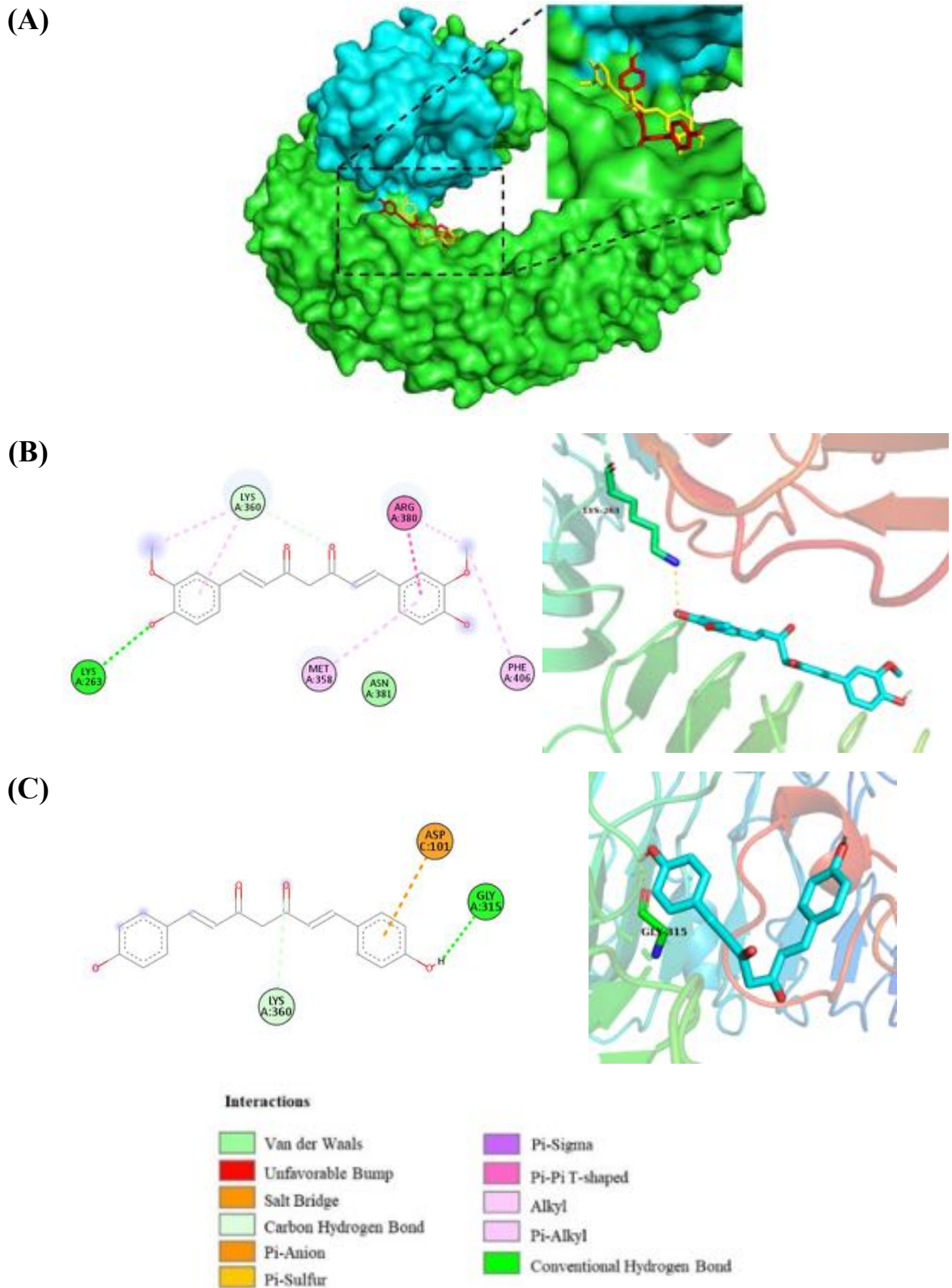
3.5.1. Mô phỏng lắp ghép phân tử

Do các thử nghiệm *in vitro* trong nghiên cứu này được thực hiện trên đại thực bào RAW264.7, các nghiên cứu mô phỏng được tiến hành với phức hệ protein TLR4/MD-2 để tìm hiểu cơ chế hoạt động của curcuminoid. Autodock4 là một công cụ lắp ghép phân tử phổ biến đã được trích dẫn khoảng 10.000 lần kể từ năm 2009 tới nay. Đây là một phần mềm mã nguồn mở cho phép dự đoán ái lực liên kết và cấu hình tương tác của các phối tử đối với một đích protein cụ thể. Trong nghiên cứu này, AutoDock4 được sử dụng để dự đoán cấu hình liên kết của các curcuminoid với protein nghiên cứu và năng lượng liên kết tự do (ái lực liên kết) tương ứng của chúng. Kết quả mô phỏng được trình bày tại Bảng 3.15.

Bảng 3.15. Năng lượng liên kết tự do và các amino acid của phức hợp TLR4/MD-2 tham gia liên kết với curcuminoid

Hợp chất	Năng lượng liên kết tự do (kcal/mol)	Các amino acid tham gia vào liên kết hydro (trước MD)	Các amino acid tham gia vào liên kết kỵ nước (sau tinh chỉnh MD)
CUR	-9,29	Lys263	Asp101, Lys263, Phe406
DMC	-7,53	Arg337, Arg380, Ala382	–
BDMC	-9,73	Gly315	Arg337, Asn359

Theo tiêu chí xếp hạng của Autodock4, giá trị năng lượng liên kết tự do càng thấp (càng âm) thì ái lực liên kết của phối tử với thụ thể mục tiêu càng lớn. Phân tích kết quả docking cho thấy CUR và BDMC thể hiện ái lực liên kết cao với protein nghiên cứu với năng lượng liên kết tự do lần lượt là -9,29 và -9,73 kcal/mol. Cấu hình liên kết của các phối tử này trong vùng hoạt động được minh họa trong Hình 3.16.

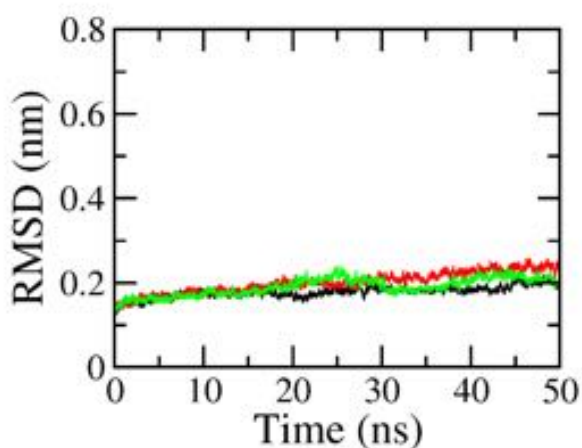


Hình 3.16. Cấu hình liên kết giữa CUR và BDMC với phức hệ protein TLR4/MD-2 dự đoán bởi AutoDock4. (A) Hình ảnh liên kết của các hợp chất nghiên cứu với bề mặt protein TLR4, liên kết với bề mặt tiếp xúc của chúng với protein MD-2: CUR-màu đỏ, BDMC-màu vàng; (B) Cấu hình liên kết của CUR; (C) Cấu hình liên kết của BDMC.

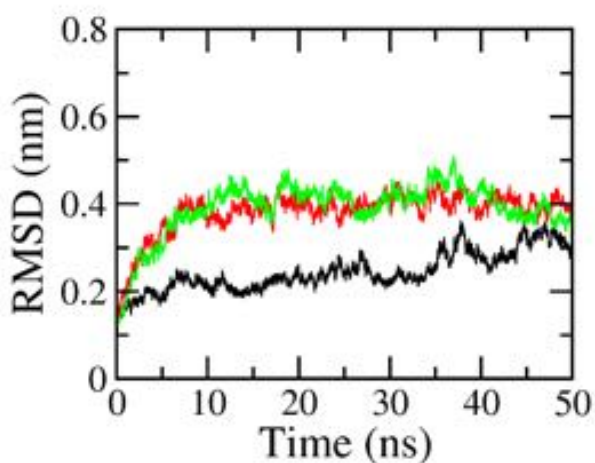
Kết quả thu được chỉ ra rằng curcumin I tương tác với TLR4/MD-2 thông qua một liên kết hydro với Lys263, các liên kết kỵ nước khác được hình thành với các amino acid Met358, Lys360, Arg380, Asn381, Phe406. Mặt khác, BDMC được quan sát thấy tạo thành một liên kết hydro với Gly315 và liên kết này được củng cố thêm bởi các tương tác yếu giữa phối tử với Asp101 và Lys360.

3.5.2. Mô phỏng động lực học phân tử

Mặc dù docking phân tử là một công cụ hiệu quả trong sàng lọc ảo, phương pháp này thường bị giới hạn bởi việc sử dụng cấu trúc thụ thể tĩnh (rigid receptor) và mô hình dung môi ẩn (implicit solvent). Để khắc phục các rào cản sự thiếu hụt tính linh hoạt cấu hình (conformational flexibility) và đặc tính động học của protein - mô phỏng động lực học phân tử đã được triển khai nhằm tinh chỉnh và đánh giá độ ổn định của các phức hợp docking. Mỗi hệ thống enzyme-chất ức chế được thực hiện mô phỏng trong thời gian 50 ns, sử dụng dữ liệu đầu vào là cấu hình liên kết thu được từ docking, nhằm mục đích hồi phục cấu trúc (structural relaxation) trong môi trường dung môi nước. Như thể hiện tại Hình 3.17, phân tích quỹ đạo (trajectory analysis) xác nhận tất cả các hệ thống đều đạt trạng thái cân bằng nhiệt động trong vòng 10 ns đầu tiên. Độ ổn định của các phức hệ được minh chứng qua giá trị sai lệch bình phương trung bình gốc (RMSD) thấp, duy trì ổn định quanh ngưỡng 0,2 nm trong suốt thời gian khảo sát.



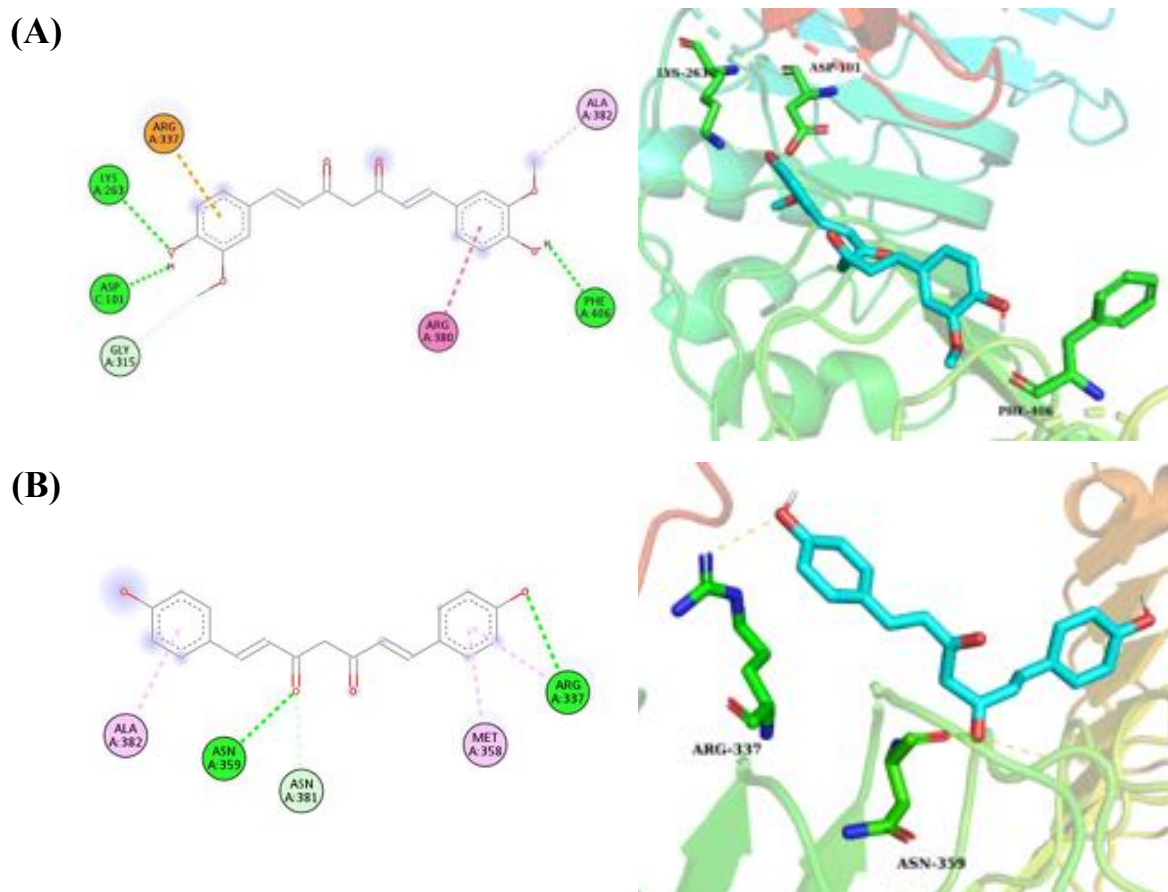
CUR



BDMC

Hình 3.17. Biến thiên RMSD theo thời gian tính cho toàn bộ nguyên tử của TLR4/MD-2 với CUR (A) và BDMC (B) qua 3 lần mô phỏng MD độc lập trong thời gian 50ns.

Sự ổn định giá trị RMSD quan sát được cho thấy tương tác liên kết của phối tử không gây ra nhiễu loạn đáng kể về cấu hình, từ đó bảo toàn tính toàn vẹn cấu trúc của phức hệ TLR4/MD-2 trong suốt quá trình mô phỏng. Các cấu hình liên kết đại diện của CUR và BDMC trong vùng hoạt động của TLR4/MD-2 được trình bày tại Hình 3.18.



Hình 3.18. Cấu hình liên kết được tinh chỉnh bằng MD giữa CUR (A) và BDMC (B) với phức hợp TLR4/MD-2 thu được bằng phương pháp phân cụm từ các ảnh chụp ở trạng thái cân bằng của phức hệ với ngưỡng cắt 0.2 nm.

Phân tích tương tác cho thấy CUR thiết lập ba liên kết hydro với các amino acid Asp101, Lys263 và Phe406. Bên cạnh đó, các tương tác kỵ nước được hình thành với Gly315, Arg337, Arg380 và Ala382 đóng vai trò quan trọng trong việc ổn định phối tử trong vùng hoạt động của protein. Đối với BDMC, phân tích cấu hình liên kết chỉ ra các liên kết hydro được hình thành yếu với Arg337 và Asn359, trong khi các tương tác kỵ nước được tạo với các amino acid Asn381, Ala382 và Met358.

3.5.3. Đánh giá theo quy tắc Lipinski và ADMET

Đặc tính giống thuốc (drug-likeness) của hai ứng viên được đánh giá dựa trên Quy tắc năm tiêu chí của Lipinski (Ro5), đây là bộ quy tắc phổ biến để dự đoán sinh khả dụng đường uống của hợp chất. Tiếp theo, hồ sơ dược động học và tiềm năng độc tính của hai curcuminoid được phân tích *in silico* thông qua

các webserver Molinspiration và ProTox 3.0, kết quả chi tiết được tổng hợp tại Bảng 3.16.

Cả CUR và BDMC đều sở hữu các đặc tính hóa lý tối ưu cho hấp thu đường uống, tuân thủ hoàn toàn quy tắc Lipinski mà không có bất kỳ vi phạm nào. Sự nhất quán giữa các mô hình dược động học, kết quả mô phỏng MD và điểm số ái lực từ AutoDock4 khẳng định các dẫn xuất tự nhiên này là những chất ức chế TLR4/MD-2 tiềm năng với đặc tính dược học khả thi. Hơn nữa, việc được phân loại vào nhóm độc tính 4 và 5, đi kèm với các giá trị LD₅₀ dự đoán thuận lợi, cho thấy các hợp chất này có cửa sổ an toàn rộng, hỗ trợ triển khai các nghiên cứu phát triển thuốc giai đoạn tiếp theo.

Bảng 3.16. Chỉ số ADMET và dự đoán độc tính của các chất tiềm năng

Hợp chất	KLPT (MW)	HBD	HBA	LogP	MR (cm ³ /mol)	TPSA (Å ²) ^a	LD ₅₀ (mg/kg)	Dự đoán độc tính ^b	HIA (%)
CUR	368	2	6	3,72	102,80	93,06	2000	4	93,30
BDMC	308	2	4	3,24	89,82	74,60	2560	5	94,20
4	486	1	5	6,51	165,56	85,00	2300	5	92,80

^aDiện tích bề mặt phân cực toàn phân tử; ^bPhân loại dự đoán độc tính: 1 → 6 (Độc tính cao đến không độc).

3.5.4. Hoạt tính kháng viêm *in vitro*

Các curcuminoid được sàng lọc hoạt tính kháng viêm bằng cách sử dụng mô hình đại thực bào RAW 264.7 cảm ứng LPS để theo dõi sự ức chế sản xuất NO. Các kết quả *in vitro* tương ứng được ghi nhận trong bảng 3.17.

Dữ liệu giá trị IC₅₀ của các hợp chất trong Bảng 3.17 cho thấy CUR và BDMC thể hiện hoạt tính kháng viêm mạnh so với thuốc đối chứng dương cardamonin (IC₅₀ = 0,61 μM) với các giá trị IC₅₀ lần lượt là 121,06 ± 2,16 và 91,22 ± 1,58 μM. Những kết quả này cho thấy mối tương quan cao với dữ liệu thu được từ các nghiên cứu *in silico*.

Bảng 3.17. Khả năng ức chế sản xuất NO của các curcuminoid

STT	Tên hợp chất	IC ₅₀ (μM)
1	CUR	121,06 ± 2,16
2	DMC	> 200
3	BDMC	91,22 ± 1,58
	Cardamonin	0,61 ± 0,24

Tóm lại, nghiên cứu đã hoàn thiện đánh giá về hoạt tính sinh học của các curcuminoid thông qua các nghiên cứu *in vitro* và mô phỏng *in silico*:

Cả CUR, DMC và BDMC đều thể hiện hiệu năng ức chế rõ rệt đối với sự sản sinh NO trong đại thực bào và sự tăng sinh của các dòng tế bào ung thư. Trong đó, BDMC nổi bật như một ứng viên tiềm năng cao với khả năng kháng viêm mạnh thông qua cơ chế ức chế iNOS và tác động chọn lọc trên các dòng tế bào ung thư kháng thuốc.

Các nghiên cứu *in silico* (mô phỏng docking phân tử và mô phỏng động lực học phân tử) đã xác nhận và giải thích ưu thế cấu trúc của BDMC. Việc thiếu hụt các nhóm methoxy linh hoạt giúp BDMC tối ưu hóa các tương tác không gian và mạng lưới liên kết hydro, từ đó hình thành các phức hệ có độ ổn định nhiệt động cao hơn với các đích protein then chốt như iNOS và phức hệ TLR4/MD-2.

Phân tích ADMET chỉ ra rằng các curcuminoid, điển hình là BDMC, sở hữu hồ sơ dược động học thuận lợi và độ an toàn cao (thuộc nhóm độc tính 4 và 5), củng cố cơ sở cho việc phát triển thành các tác nhân trị liệu tiềm năng.

Cần triển khai các thử nghiệm *in vivo* trên mô hình động vật viêm hoặc ung thư để xác thực hiệu quả điều trị và độ an toàn hệ thống của BDMC. Đồng thời, sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử (Western blot, qPCR, ELISA) để làm sáng tỏ thêm cơ chế điều hòa các con đường tín hiệu NF-κB, STAT3 và iNOS đã được dự đoán. Các dữ liệu docking và MD thu được sẽ là tiền đề quan trọng cho chiến lược thiết kế các dẫn xuất BDMC thế hệ mới nhằm tối ưu hóa ái lực liên kết, độ tan và sinh khả dụng.

Các phương pháp mô phỏng tính toán *in silico* (DFT, docking phân tử và MD) đã làm sáng tỏ cơ chế tác dụng của các hợp chất ở cấp độ phân tử, giải thích sự đồng thuận cao với các kết quả thực nghiệm *in vitro*. Cụ thể, phân tích phiếm hàm mật độ (DFT) đã chứng minh bản chất của hoạt tính chống oxy hóa phụ thuộc vào khả năng cho hydro (HAT) hoặc chuyển electron (SET) tại các nhóm hydroxyl phenol, đồng thời giải thích vì sao CUR hoạt động chống oxy hóa mạnh hơn BDMC. Trong khi đó, mô hình docking và mô phỏng động lực học phân tử (MD) đã phác họa chi tiết ái lực liên kết bền vững của curcumin và các dẫn xuất lai hóa lên các đích protein liên quan đến phản ứng viêm (như TLR4/MD-2, COX-2) hoặc sự tăng sinh tế bào ung thư. Từ các kết quả *in silico* này, luận án đưa ra định hướng ứng dụng rõ ràng: sử dụng mô phỏng tính toán như một công cụ sàng lọc hiệu quả (virtual Screening) để dự đoán trước sinh khả dụng (ADMET) và ái lực liên kết của các dẫn xuất. Điều này sẽ định hướng trực tiếp cho các nghiên cứu hóa tổng hợp tiếp theo, tập trung vào việc thiết kế các cấu trúc thuốc mới có độ hòa tan tốt hơn và tính chọn lọc đích cao hơn, rút ngắn thời gian phát triển các chế phẩm bảo vệ sức khỏe từ cây nghệ vàng.

Phương pháp mô phỏng tính toán *in silico* đã góp phần dự đoán cơ chế tác dụng ở mức độ phân tử, tương đồng cao với kết quả *in vitro*. Cụ thể, tính toán lượng tử (DFT) đã làm rõ cơ chế chống oxy hóa phụ thuộc dung môi: môi trường nước ưu tiên cơ chế chuyển điện tử đơn (SET) từ các anion, trong khi môi trường lipid ưu tiên cơ chế chuyển điện tử kết hợp proton (PCET). Đối với hoạt tính kháng viêm, mô phỏng docking và động lực học phân tử (MD) đã minh chứng BDMC và các dẫn xuất thiếu nhóm methoxy có ái lực liên kết tĩnh điện và kỵ nước ổn định, bền vững hơn với phức hệ protein đích TLR4/MD-2 so với CUR. Các dữ liệu giải mã cơ chế *in silico* này, kết hợp với các thông số dự đoán dược động học (ADMET), chính là cơ sở khoa học để định hướng trực tiếp cho việc ứng dụng và phát triển các dòng sản phẩm (dược mỹ phẩm, chế phẩm sinh học, thực phẩm chức năng) từ các dạng curcuminoid đặc hiệu trong giai đoạn tiếp theo.

KẾT LUẬN

Từ các kết quả: Nghiên cứu phân lập, tinh chế curcumin và bán tổng hợp các dẫn xuất của nó theo định hướng hoạt tính sinh học *in vitro* và *in silico* từ cây nghệ vàng *Curcuma longa* L. Việt Nam, luận án đã rút ra những kết luận cụ thể như sau:

1. Đã chiết xuất và phân lập thành công 3 dạng phân tử riêng biệt của hệ curcuminoid gồm CUR, DMC BDMC từ rễ cây nghệ vàng *Curcuma longa* L.

2. Lần đầu tiên định danh được loài tuyến trùng mới *Scutellonema curcumae* sp. n. ký sinh trên rễ nghệ vàng tại Việt Nam. Quần thể tuyến trùng lây nhiễm ở rễ làm suy giảm chất lượng dược liệu, khi mật độ tuyến trùng tăng, hàm lượng BDMC giảm mạnh nhất (lên tới 3,81% cho mỗi đơn vị tuyến trùng tăng lên), kéo theo sự suy giảm 12,33% hoạt tính chống oxy hóa. Ở điều kiện tuyến trùng được kiểm soát (mật độ thấp 0,8 cá thể/100g đất), hàm lượng BDMC tăng 2,5 lần, SC_{50} giảm xuống 13,85 $\mu\text{g/ml}$ và IC_{50} trên dòng HepG2 đạt mức 29,35 $\mu\text{g/ml}$.

3. Đã bán tổng hợp thành công và đánh giá hoạt tính sinh học của các dẫn xuất mới biến đổi tại nhóm hydroxyl phenol, bao gồm dẫn xuất *O,O*-di-propargyl curcumin và các dẫn xuất lai hóa ghép gốc zerumbone (curcumin-monozerumbone và curcumin-biszerumbone).

4. Đánh giá hoạt tính *in vitro* cho thấy mối tương quan rõ rệt giữa cấu trúc và hoạt tính: trong hệ curcuminoid gốc, BDMC (không chứa nhóm methoxy) thể hiện hoạt tính kháng viêm vượt trội hơn CUR ($IC_{50} = 91,22$ so với 121,06 $\mu\text{g/mL}$). Đặc biệt, dẫn xuất lai hóa curcumin-monozerumbone (4) cho hoạt tính cải thiện toàn diện so với curcumin: kháng viêm tăng 3,8 lần ($IC_{50} = 32,15$ $\mu\text{g/mL}$), gây độc tế bào ung thư gan Hep-G2 tăng 2,5 lần ($IC_{50} = 25,35$ $\mu\text{g/mL}$), và mở rộng phổ kháng vi sinh vật lên 6/8 chủng thử nghiệm (CUR chỉ đạt 2/8). Kết quả khẳng định chiến lược lai hóa curcumin–zerumbone thể một lần (mono) giúp tăng đồng thời tính thân dầu (ClogP từ 3,72 lên 6,51) và hoạt tính sinh học

5. Đã ứng dụng hiệu quả các phương pháp hóa học tính toán *in silico* để làm sáng tỏ cơ sở phân tử cho các hoạt tính sinh học. Về hoạt tính chống oxy hóa, tính toán DFT chỉ ra cơ chế chuyển điện tử (SET/PCET) đóng vai trò chủ đạo trong môi trường nước. Về hoạt tính kháng viêm, kết quả mô phỏng docking phân tử và mô phỏng động lực học phân tử chứng minh sự vắng mặt của nhóm methoxy ở BDMC giúp tối ưu hóa tương tác không gian, tạo ra mạng lưới liên kết tĩnh điện và kỵ nước bền vững với phức hệ thụ thể TLR4/MD-2. Năng lượng liên kết của BDMC đạt -9,73 kcal/mol, có xu hướng bền vững hơn so với curcumin (-9,29 kcal/mol). Những phát hiện này tạo thành luận cứ khoa học, giải thích cho hiệu quả ức chế con đường tín hiệu viêm hiệu quả của BDMC trên thực nghiệm.

KIẾN NGHỊ

1. Mở rộng phương án bán tổng hợp, tiếp tục thiết kế và tổng hợp các dẫn xuất curcuminoid theo các hướng can thiệp cấu trúc mới tại vị trí C4 của hệ β -diketone (ngưng tụ Knoevenagel) hoặc tạo phức kim loại chuyển tiếp (Zn^{2+} , Cu^{2+}) để tối ưu hóa độ hòa tan và dược tính.

2. Đẩy mạnh công cụ *in silico*, lấy dữ liệu mô phỏng động lực học phân tử (MD) và dược động học (ADMET/Lipinski) làm kim chỉ nam để định hướng trước cấu trúc cho quá trình bán tổng hợp.

3. Ứng dụng tạo chế phẩm, kết quả thử nghiệm của dạng BDMC tinh khiết và các dẫn xuất lai hóa là cơ sở khoa học vững chắc. Kiến nghị tiếp tục nghiên cứu và ứng dụng các dòng sản phẩm như sau:

- Dòng sản phẩm thực phẩm chức năng chuyên biệt cho khả năng chống oxy hóa mạnh (giàu BDMC) trong môi trường lipid. Thực tiễn nghiên cứu trong luận án, kết hợp với các tính toán lý thuyết mật độ phiếm hàm (DFT) cho thấy trong dung môi pentyl ethanoate (mô phỏng môi trường màng tế bào lipid), hằng số tốc độ dạn gốc tự do HOO của BDMC đạt $8,16 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, cao gấp hơn 20 lần so với CUR ($4,02 \times 10^1 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$). Kiến nghị nghiên cứu bào chế dòng sản phẩm được bào chế dưới dạng viên nang mềm hoặc dung dịch dầu nhũ tương với phân đoạn giàu BDMC để bảo vệ lớp lipid kép của màng tế bào khỏi quá trình peroxy hóa lipid - nguyên nhân gốc rễ của sự lão hóa tế bào và các bệnh lý tim mạch.

- Dòng sản phẩm thực phẩm chức năng hỗ trợ điều trị viêm (giàu BDMC), kết quả sàng lọc *in vitro* trong luận án cho thấy BDMC thể hiện khả năng ức chế sản sinh NO - một chất trung gian gây viêm điển hình - mạnh

hơn đáng kể so với curcumin. Giá trị IC_{50} của BDMC đạt $91,22 \pm 1,58 \mu\text{M}$, thấp hơn và hiệu quả hơn so với CUR ($121,06 \pm 2,16 \mu\text{M}$). Kiến nghị triển khai thử nghiệm *in vivo* trên mô hình viêm mạn tính để xác nhận tiềm năng phát triển chế phẩm hỗ trợ điều trị các bệnh viêm mạn tính.

- *Ứng dụng trong dược mỹ phẩm*, với ưu thế chống oxy hóa và kháng viêm mạnh trong môi trường lipid của BDMC. Kiến nghị nghiên cứu công nghệ nano-BDMC tăng cường thâm thấu qua da và thử nghiệm trên mô hình da *ex vivo*.

- *Phát triển dẫn xuất bán tổng hợp hỗ trợ điều trị ung thư*, các dẫn xuất curcumin-zerumbone và di-propargyl curcumin thể hiện hoạt tính gây độc tế bào trên các dòng ung thư gan (Hep-G2) và phổi (A549) [NCS điền giá trị IC_{50} cụ thể]. Kết quả ADMET dự đoán các dẫn xuất đạt tiêu chuẩn giống thuốc (drug-likeness). Kiến nghị tối ưu hóa cấu trúc để nâng cao tính chọn lọc, đồng thời triển khai thử nghiệm tiền lâm sàng trên mô hình *in vivo*.

- *Phát triển chế phẩm sinh học kiểm soát tuyến trùng*, một trong những phát hiện độc đáo nhất của luận án là mối tương quan sinh thái giữa tuyến trùng *Scutellonema curcumae* sp. n. và quá trình sinh tổng hợp curcuminoid trong cây nghệ. Số liệu thực nghiệm cho thấy một mối tương quan nghịch biến rõ rệt: khi mật độ tuyến trùng được kiểm soát giảm từ 19,6 xuống 0,8 cá thể/100g đất, hàm lượng BDMC trong củ nghệ đã tăng vọt lên tới 250% (từ 0,16% lên 0,56%). Đồng thời, các điều kiện thổ nhưỡng hơi chua (pH 5,6 - 5,9) cũng được ghi nhận là thuận lợi cho sự tích lũy hoạt chất. Kiến nghị phát triển chế phẩm sinh học kiểm soát tuyến trùng kết hợp điều chỉnh pH đất để tối ưu hóa hàm lượng BDMC tự nhiên trong vùng nguyên liệu.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Tu Thi Dinh**, Quan Minh Pham, Long Quoc Pham, Chi Kim Ngo, Van Thi Thuy Nguyen, Thuong Thi Le Hoang, Tu Ngoc Ly, Linh Ngoc Nguyen, Thao Thi Phuong Nguyen and Lam Tien Do (2026). Impact of *Scutellonema curcumae* sp. n. (Nematoda: Hoplolaimidae) on the Phytochemical Profile and Biological Activities of Turmeric (*Curcuma longa* L.). *Molecules*, 31(6), 920.
2. **Dinh Thi Tu**, Ngo Kim Chi, Le Thi Thuy Huong, Do Huu Nghi, Pham Minh Quan (2026). *In silico* and *in vitro* investigation of curcuminoid as potential TLR4/MD-2 complex inhibitors using molecular docking and molecular dynamic simulations. *Vietnam Journal of Science and Technology*. <https://doi.org/10.15625/2525-2518/24045>.
3. Truong, D. H., **Dinh, T. T.**, Trinh, T. M. D., Pham, T. H. M., Pham, M. Q., Gawlik-Dziki, U., & Dao, D. Q. (2025). HOO radical scavenging activity of curcumin I and III in physiological conditions: a theoretical investigation on the influence of acid–base equilibrium and tautomerism. *RSC advances*, 15(8), 5649-5664.
4. Nguyễn Phi Hùng, Nguyễn Anh Tuấn, **Dinh Thị Tú**, Tô Đạo Cường, Hoàng Thị Phương, Đặng Ngọc Quang, Đỗ Thị Thúy, Vũ Thị Hà, Bùi Thị Thực, Trịnh Thị Thu Hà (2023). Phương pháp phân tích nhanh hàm lượng curcumin, demethoxycurcumin và bisdemethoxycurcumin từ củ nghệ bằng hệ thống HPLC 1260 agilent. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ-Đại học Đà Nẵng*, 103-109, Vol. 21, No. 05.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Beganovic, S. and C. Wittmann, *Medical properties, market potential, and microbial production of golden polyketide curcumin for food, biomedical, and cosmetic applications*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2024. **87**: p. 103112.
2. Ashaolu, T.J., et al., *Recent advancements in curcumin extraction, chemical/bio-synthesis, purification, and food applications*. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2025. **65**(14): p. 2714-2730.
3. Do, T.C.V., et al., *Evaluation of Antioxidant, Antibacterial, Antifungal, and Anticancer Properties of Curcuma longa, Curcuma aromatica, and Curcuma caesia Oil*. *Industrial Biotechnology*, 2025. **21**(6): p. 374-385.
4. Nguyen, A.-T., et al., *Identification of natural curcumins as potential dual inhibitors of PTP1B and α -glucosidase through experimental and computational study*. *Kuwait Journal of Science*, 2025. **52**(1): p. 100312.
5. Vo, T.S., et al., *Turmeric (Curcuma longa L.): Chemical components and their effective clinical applications*. *Journal of the Turkish Chemical Society Section A: Chemistry*, 2021. **8**(3): p. 883-898.
6. Nguyen, H.T., et al., *Effects of roasting conditions on antibacterial properties of Vietnamese turmeric (Curcuma longa) rhizomes*. *Molecules*, 2023. **28**(21): p. 7242.
7. Latif, R. and T. Nawaz, *Medicinal plants and human health: A comprehensive review of bioactive compounds, therapeutic effects, and applications*. *Phytochemistry Reviews*, 2025: p. 1-44.
8. Huang, C., et al., *Curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin induced caspase-dependent and-independent apoptosis via Smad or Akt signaling pathways in HOS cells*. *BMC complementary medicine and therapies*, 2020. **20**(1): p. 68.
9. Van Hung, P. and T.N.D. Vo, *Structure, physicochemical characteristics, and functional properties of starches isolated from yellow (Curcuma longa) and black (Curcuma caesia) turmeric rhizomes*. *Starch-Stärke*, 2017. **69**(5-6): p. 1600285.
10. Shoaib, M., et al., *Search of novel immunomodulatory drugs*. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 2025. **14**(4): p. 837-843.
11. Chát, P., N.T.N. Hiền, and H.V.T.T. Xuân, *Xây dựng phương pháp định lượng đồng thời ba curcuminoid trong bã nghệ*. *Tạp chí Kiểm nghiệm Dược và Mỹ phẩm*, 2024. **22**(1): p. 21-28.
12. Võ, T.T.V., *Khảo sát quy trình sản xuất và yếu tố ảnh hưởng đến sản phẩm tinh bột nghệ tại vườn ươm công nghệ công nghiệp Việt Nam-Hàn Quốc*. 2021, Trường Đại học Nam Cần Thơ.
13. Kaliyadasa, E. and B.A. Samarasinghe, *A review on golden species of Zingiberaceae family around the world: Genus Curcuma*. *Afr. J. Agric. Res*, 2019. **14**(9): p. 519-531.

14. Elhawary, E.A., A.Y. Moussa, and A.N.B. Singab, *Genus Curcuma: Chemical and ethnopharmacological role in aging process*. BMC complementary medicine and therapies, 2024. **24**(1): p. 31.
15. Anyaoku, I.C., I.O. Igwilo, and C.N. Ezekwesili, *Nutritional Profile and Health Promoting Properties of Curcuma Longa (Linn)(Turmeric)*. International Journal of Research Publication and Reviews, 2023. **4**(11): p. 2731-2740.
16. Hossain, F., et al., *The Pharmacological Prospects of Curcuma: A Review of Its Antimicrobial, Antioxidant, and Anticancer Properties*. Dhaka University Journal of Pharmaceutical Sciences, 2025. **24**(2): p. 231-249.
17. Ibrahim, N.N.A., et al., *A Comprehensive Review with Future Prospects on the Medicinal Properties and Biological Activities of Curcuma caesia Roxb*. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2023. **2023**(1): p. 7006565.
18. Sahoo, S., et al., *Review on Phytopharmacological Activity of Curcuma amada Roxb.(Mango ginger)*. Defence Life Science Journal, 2023. **8**(4): p. 351-362.
19. Paul, A., et al., *Exploring the chemical characterization and insecticidal activities of Curcuma angustifolia roxb. leaf essential oils against three major stored product insects*. Saudi Journal of Biological Sciences, 2024. **31**(6): p. 103986.
20. Brindhadevi, K., et al., *Extraction, antioxidant, and anticancer activity of saponins extracted from Curcuma angustifolia*. Applied Nanoscience, 2023. **13**(3): p. 2063-2071.
21. Akbar, S., *Curcuma aromatica Salisb.(Zingiberaceae) (Syn.: C. wenyujin YH Chen & C. Ling)*, in *Handbook of 200 Medicinal Plants: A Comprehensive Review of Their Traditional Medical Uses and Scientific Justifications*. 2020, Springer. p. 773-780.
22. Albaqami, J.J., et al., *Chemical composition and biological activities of the leaf essential oils of Curcuma longa, Curcuma aromatica and Curcuma angustifolia*. Antibiotics, 2022. **11**(11): p. 1547.
23. Jyotirmayee, B. and G. Mahalik, *Traditional uses and variation in curcumin content in varieties of curcuma—the saffron of India*. Ambient Science, 2022. **9**(1): p. 06-12.
24. Jotisalikorn, C., *Thai spa book: The natural Asian way to health and beauty*. 2012: Tuttle Publishing.
25. Idowu-Adebayo, F., *Adoption of turmeric in street-vended beverages: a case to improve nutritional status and livelihoods in Nigeria*. 2022, Wageningen University and Research.
26. Kwon, Y., *Estimation of curcumin intake in Korea based on the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (2008-2012)*. Nutrition research and practice, 2014. **8**(5): p. 589-594.
27. Shaik, M.I., et al., *Physicochemical and phytochemical properties of botanical drinks with different turmeric (Curcuma longa) concentrations*. CyTA-Journal of Food, 2026. **24**(1): p. 2622142.
28. Güneri, N., *A review on turmeric (Curcuma longa L.) and usage in seafood*. Marine Science and Technology Bulletin, 2021: p. 71-84.

29. Novais, C., et al., *Natural food colorants and preservatives: A review, a demand, and a challenge*. Journal of agricultural and food chemistry, 2022. **70**(9): p. 2789-2805.
30. Rasul, A., et al., *Curcuma and breast cancer: A focus on cell signaling pathways*, in *Nutraceuticals and cancer signaling: Clinical aspects and mode of action*. 2021, Springer. p. 179-200.
31. Zorofchian Moghadamtousi, S., et al., *A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin*. BioMed research international, 2014. **2014**(1): p. 186864.
32. Karpuz Ağören, B. and E.K. Akkol, *Secondary Metabolites of Turmeric Extract and Essential Oils*, in *Curcumin and Neurodegenerative Diseases: From Traditional to Translational Medicines*. 2024, Springer. p. 81-99.
33. Huỳnh, N.T.T., et al., *Analysis of the morphological characteristics, microstructural anatomy, and powdered herb Curcuma aromatica Salisb.* VNUHCM Journal of Natural Sciences, 2024. **8**(3): p. 3023-3033.
34. Chi, V.V., *Từ điển cây thuốc Việt Nam, tập 1, 2*. Nxb Y học, 2012. **1**.
35. Kuttan, R., et al., *Potential anticancer activity of turmeric (Curcuma longa)*. Cancer letters, 1985. **29**(2): p. 197-202.
36. Velayudhan, K., N. Dikshit, and M.A. Nizar, *Ethnobotany of turmeric (Curcuma longa L.)*. Indian Journal of Traditional Knowledge, 2012. **11**(4): p. 607-614.
37. Bân, N.T., *Danh lục các loài thực vật Việt Nam, tập 2*. Nxb Nông nghiệp, Hà Nội, 2003.
38. Qiang, Y., et al., *Spatial variation of volatile organic compounds and antioxidant activity of turmeric (Curcuma longa L.) essential oils harvested from four provinces of China*. Current Research in Food Science, 2021. **4**: p. 882.
39. Poudel, D.K., et al., *Analysis of Volatile Constituents in Curcuma Species, viz. C. aeruginosa, C. zedoaria, and C. longa, from Nepal*. Plants, 2022. **11**(15): p. 1932.
40. Verma, R.K., et al., *Medicinal properties of turmeric (Curcuma longa L.): A review*. Int. J. Chem. Stud, 2018. **6**(4): p. 1354-1357.
41. Nuari, D.A., A. Sadino, and S.H. Ainaya, *The safety evaluation of some plants of the Zingiberaceae family*. Buletin Farmatera, 2023. **8**(1): p. 43-63.
42. Cooksey, C., *Turmeric: old spice, new spice*. Biotechnic & Histochemistry, 2017. **92**(5): p. 309-314.
43. Oliveira, A.S., et al., *Curcumin: a natural lead for potential new drug candidates*. Current medicinal chemistry, 2015. **22**(36): p. 4196-4232.
44. Kuzminska, J., et al., *Curcumin derivatives in medicinal chemistry: potential applications in cancer treatment*. Molecules, 2024. **29**(22): p. 5321.
45. Jahanbakhshi, F., et al., *Curcumin anti-tumor effects on endometrial cancer with focus on its molecular targets*. Cancer Cell International, 2021. **21**(1): p. 120.
46. Huang, T.Y., et al., *Combinational treatment of all-trans retinoic acid (ATRA) and bisdemethoxycurcumin (BDMC)-induced apoptosis in liver cancer Hep3B cells*. Journal of Food Biochemistry, 2020. **44**(2): p. e13122.

47. Ramezani, M., M. Hatamipour, and A. Sahebkar, *Promising anti-tumor properties of bisdemethoxycurcumin: A naturally occurring curcumin analogue*. Journal of cellular physiology, 2018. **233**(2): p. 880-887.
48. Liu, H., et al., *Atractylenolide I modulates ovarian cancer cell-mediated immunosuppression by blocking MD-2/TLR4 complex-mediated MyD88/NF- κ B signaling in vitro*. Journal of Translational Medicine, 2016. **14**(1): p. 104.
49. Igwe, K., et al., *Identification of the phytocomponents in Loranthus micranthus methanolic extract by Gas Chromatography-Mass Spectrometry*. International Journal of Research Science and Management, 2015. **2**(12): p. 53-56.
50. Rahban, M., et al., *Anti-viral potential and modulation of Nrf2 by curcumin: pharmacological implications*. Antioxidants, 2020. **9**(12): p. 1228.
51. Martichonok, V.V., et al., *On regioselectivity of aldol condensation of aromatic aldehydes with borate complex of acetylacetone*. Synthetic Communications, 2014. **44**(9): p. 1245-1250.
52. Ferreira, J.R., et al., *Curcumin-based molecular probes for fluorescence imaging of fungi*. Organic & Biomolecular Chemistry, 2023. **21**(7): p. 1531-1536.
53. Alsalim, T.A., et al., *Design, synthesis, and integrated in silico analysis of novel difluoroboron curcumin analogues as potent inhibitors of the K562 leukemia cell line*. Journal of Computer-Aided Molecular Design, 2026. **40**(1): p. 28.
54. Bérubé, G., *An overview of molecular hybrids in drug discovery*. Expert opinion on drug discovery, 2016. **11**(3): p. 281-305.
55. Dai, H., et al., *Advances in β -Diketocyclisation of Curcumin Derivatives and their Antitumor Activity*. Chemistry & Biodiversity, 2024. **21**(2): p. e202301556.
56. Mohammed, A.-A.A., *Synthesis and Evaluation of a Novel Series of β -Diketones and Related Compounds as Anticancer Agents*. 2021: University of Salford (United Kingdom).
57. Sellaperumal, C., et al., *Plant-parasitic nematodes, a looming threat to turmeric cultivation in India: results of recent surveys*. Nematology, 2023. **26**(1): p. 15-23.
58. Haroun, H.M., G. Aydınli, and S. Mennan, *Screening of the nematicidal potential of some spice extracts against root-knot nematode, Meloidogyne arenaria (Neal, 1889) Chitwood, 1949 (Tylenchida: Meloidogynidae)*. Turkish Journal of Entomology, 2022. **46**(3): p. 275-288.
59. Kim Anh, L.T., et al., *Biosynthesis of silver nanoparticles using nanocurcumin extracted from fresh turmeric of Vietnam*. International Journal of Materials Research, 2022. **113**(9): p. 776-784.
60. Mandal, H.R., et al., *Plant parasitic nematodes and their management in crop production: a review*. Journal of Agriculture and Natural Resources, 2021. **4**(2): p. 327-338.
61. Pandey, R., et al., *Nematode Problems in Medicinal Plants*, in *Diseases of Ornamental, Aromatic and Medicinal Plants*. 2024, Bentham Science Publishers. p. 308-334.

62. Mohanta, S., et al., *Morphological and molecular screening of turmeric (Curcuma longa L.) cultivars for resistance against parasitic nematode, Meloidogyne incognita*. Journal of Plant Pathology & Microbiology, 2015. **6**(5): p. 1.
63. Ohri, P. and S.K. Pannu, *Effect of phenolic compounds on nematodes-A review*. Journal of Applied and Natural Science, 2010. **2**(2): p. 344.
64. Ulfa, M., T. Himawan, and H. Tarno, *Nematicidal activity of turmeric extract against nematodes Meloidogyne spp.* Research Journal of Life Science, 2021. **8**(1): p. 48-56.
65. KUMAR¹, S. and G. CHAND, *Diseases of Ginger and Turmeric and Their. Diseases of Fruits and Vegetable Crops: Recent Management Approaches*, 2020.
66. Jalaluddin, S.M., *Management of Nematode Disease Complex in Turmeric with Bio Control Agents*. Medicon Agriculture & Environmental Sciences, 2024. **7**: p. 24-32.
67. Mohanta, S., C. Patra, and A. Mangaraj, *Physiological and morphological response of turmeric (Curcuma longa L.) to root-knot nematode infestation: Estimation of avoidable yield loss*. INTERNATIONAL JOURNAL, 2025. **9**(1S): p. 509-513.
68. Li, S., et al., *Chemical composition and product quality control of turmeric (Curcuma longa L.)*. 2011.
69. Mošovská, S., et al., *Antioxidant properties of curcuminoids isolated from Curcuma longa L.* Acta Chimica Slovaca, 2016. **9**(2): p. 130-135.
70. Sharma, V. and H.D. Sharma, *Bioactive Compounds in Turmeric*, in *Spice Bioactive Compounds*. 2022, CRC Press. p. 71-92.
71. Singh, Y.D. and R. Ningthoujam, *Phytochemical Constituents and Therapeutic Applications of Spices: A Consolidated Review*. Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences, 2025: p. 1-21.
72. Wang, Y., et al., *Curcumin as a therapeutic agent for blocking NF- κ B activation in ulcerative colitis*. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2018. **40**(6): p. 476-482.
73. Vasanthkumar, T., M. Hanumanthappa, and R. Lakshminarayana, *Curcumin and capsaicin modulates LPS induced expression of COX-2, IL-6 and TGF- β in human peripheral blood mononuclear cells*. Cytotechnology, 2019. **71**(5): p. 963-976.
74. Zhou, Y., et al., *Curcumin modulates macrophage polarization through the inhibition of the toll-like receptor 4 expression and its signaling pathways*. Cellular Physiology and Biochemistry, 2015. **36**(2): p. 631-641.
75. Fujisawa, S., et al., *Cytotoxicity, ROS-generation activity and radical-scavenging activity of curcumin and related compounds*. Anticancer research, 2004. **24**(2B): p. 563-570.
76. Emami, A.-M., H.M. Homaeae, and M.A. Azarbayjani, *Effects of high intensity interval training and curcumin supplement on glutathione peroxidase (GPX) activity and malondialdehyde (MDA) concentration of the liver in STZ induced diabetic rats*. Iranian Journal of Diabetes and Obesity, 2016. **8**(3): p. 129-134.

77. Zahid, R., et al., *Phytherapeutic modalities for the management of Helicobacter pylori associated peptic ulcer*. 2020, SAGE Publications Sage UK: London, England. p. 2058739220968308.
78. Atefi, M., et al., *A systematic review of the clinical use of curcumin for the management of gastrointestinal diseases*. Studies on biomarkers and new targets in aging research in iran: focus on turmeric and curcumin, 2021: p. 295-326.
79. Girish, C., et al., *Hepatoprotective activity of picroliv, curcumin and ellagic acid compared to silymarin on paracetamol induced liver toxicity in mice*. Fundamental & clinical pharmacology, 2009. **23**(6): p. 735-745.
80. Wang, Y., et al., *Choleretic activity of turmeric and its active ingredients*. Journal of food science, 2016. **81**(7): p. H1800-H1806.
81. Ramkumar, S., H. Thulasiram, and A. RaviKumar, *Improvement in serum amylase and glucose levels in diabetic rats on oral administration of bisdemethoxycurcumin from Curcuma longa and limonoids from Azadirachta indica*. Journal of Food Biochemistry, 2021. **45**(4): p. e13674.
82. Roney, M., et al., *Curcumin, a bioactive compound of Turmeric (Curcuma longa) and its derivatives as α -amylase and α -glucosidase inhibitors*. Cell Biochemistry and Biophysics, 2025. **83**(1): p. 53-71.
83. Sahebkar, A., et al., *Effect of curcuminoids on oxidative stress: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials*. Journal of functional foods, 2015. **18**: p. 898-909.
84. Shakib, P., et al., *Anti-trichophyton effects of curcumin: a systematic review*. Anti-Infective Agents, 2021. **19**(4): p. 29-34.
85. Rahman, A.N., et al., *Antidermatophytic activity of Curcuma longa against Trichophyton spp.: compound identification and molecular docking to lanosterol 14 α -demethylase*. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2025. **25**(1): p. 321.
86. Lopes-Rodrigues, V., E. Sousa, and M.H. Vasconcelos, *Curcumin as a modulator of P-glycoprotein in cancer: challenges and perspectives*. Pharmaceuticals, 2016. **9**(4): p. 71.
87. Tizabi, Y., et al., *Relevance of the anti-inflammatory properties of curcumin in neurodegenerative diseases and depression*. Molecules, 2014. **19**(12): p. 20864-20879.
88. Benameur, T., et al., *The effects of curcumin on inflammasome: Latest update*. Molecules, 2023. **28**(2): p. 742.
89. Kumar, H., et al., *Advances in the concept of functional foods and feeds: applications of cinnamon and turmeric as functional enrichment ingredients*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2025. **65**(6): p. 1144-1162.
90. Rahman, A.U. and P. Panichayupakaranant, *Antioxidants in Cancer Prevention*. Antioxidants: Nature's Defense Against Disease, 2024: p. 21.
91. Rege, S.A., M. Arya, and S.A. Momin, *Structure activity relationship of tautomers of curcumin: A review*. Ukrainian food journal, 2019(8, Issue 1): p. 45-60.
92. Manimaran, S., et al., *Medicinal plant using ground state stabilization of natural antioxidant curcumin by keto-enol tautomerisation*. Natural Products and Bioprospecting, 2018. **8**(5): p. 369-390.

93. Rege, S., M. Arya, and S. Momin, *Mini review on keto-enol ratio of curcuminoid*. Ukrainian journal of food science, 2019(7, Iss. 1): p. 27-32.
94. Madinah, R., et al., *First-principles study of the dispersion effects in the structures and keto–enol tautomerization of curcumin*. ACS omega, 2023. **8**(37): p. 34022-34033.
95. Rodríguez Cid, L., *Synthesis and characterization of curcuminoids and their derived polymeric systems*. 2021.
96. Wünsche, S., et al., *A contribution to the solid state forms of bis (demethoxy) curcumin: Co-crystal screening and characterization*. Molecules, 2021. **26**(3): p. 720.
97. Shahrajabian, M.H. and W. Sun, *The golden spice for life: turmeric with the pharmacological benefits of curcuminoids components, including curcumin, bisdemethoxycurcumin, and demethoxycurcumins*. Current organic synthesis, 2024. **21**(5): p. 665-683.
98. Jagannathan, R., P.M. Abraham, and P. Poddar, *Temperature-dependent spectroscopic evidences of curcumin in aqueous medium: a mechanistic study of its solubility and stability*. The Journal of Physical Chemistry B, 2012. **116**(50): p. 14533-14540.
99. Parvathy, K., *Chemical approaches toward preparation of water-soluble curcumin derivatives*. 2009, University of Mysore.
100. Di Martino, R.M.C., *Naturally Inspired Privileged Structures in Drug Discovery: Multifunctional Compounds for Alzheimer's Disease Treatment*. 2016.
101. Peram, M.R., et al., *Stability studies of pure and mixture form of curcuminoids by reverse phase-HPLC method under various experimental stress conditions*. Food science and biotechnology, 2017. **26**(3): p. 591-602.
102. Schneider, C., et al., *Degradation of curcumin: from mechanism to biological implications*. Journal of agricultural and food chemistry, 2015. **63**(35): p. 7606-7614.
103. Kumar, K.V., et al., *TOF-SIMS analysis of curcuminoids and curcumin crystals crystallized from their pure and impure solutions*. CrystEngComm, 2022. **24**(13): p. 2485-2504.
104. Gordon, O.N., et al., *Oxidative transformation of demethoxy-and bisdemethoxycurcumin: products, mechanism of formation, and poisoning of human topoisomerase II α* . Chemical research in toxicology, 2015. **28**(5): p. 989-996.
105. Ramya, P.S., et al., *Synthesis and biological evaluation of curcumin inspired indole analogues as tubulin polymerization inhibitors*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2017. **127**: p. 100-114.
106. Tran, T.B., et al., *Herbal Extracts: Importance, Classification, Quality Characteristics, and Control*. VNU Journal of Science: Medical and Pharmaceutical Sciences, 2022. **38**(2).
107. Lan, Đ.T.N., et al., *Nghiên cứu phân lập, tinh chế eurycomalacton từ dược liệu Mật nhân (*Radix Eurycomae longifoliae*) làm nguyên liệu thiết lập chuẩn*. Tạp chí Kiểm nghiệm Dược và Mỹ phẩm, 2024. **22**(2): p. 7-13.

108. Zhu, J., G. Islas-Gonzalez, and M. Bois-Choussy, *Recent progress in isolation, bioactivity evaluation and total synthesis of diarylheptanoids*. Organic Preparations and Procedures International, 2000. **32**(6): p. 505-546.
109. Kulyal, H., A. Tiwari, and V. Tiwari, *Synthesis of Polyphenol Conjugate and Prodrugs*, in *Exploring the Synthesis, Ethnopharmacology, and Therapeutic Applications of Bioactive Polyphenols*. 2026, CRC Press. p. 86-100.
110. Srivastava, S., et al., *One pot synthesis of Curcumin-NSAIDs prodrug, spectroscopic characterization, conformational analysis, chemical reactivity, intramolecular interactions and first order hyperpolarizability by DFT method*. Journal of Molecular Structure, 2016. **1117**: p. 173-180.
111. Haque, M.A., et al., *Exploring the immunomodulatory and anticancer properties of zerumbone*. Food & function, 2017. **8**(10): p. 3410-3431.
112. Wang, M., et al., *Zerumbone protects against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced acute liver injury in mice via inhibiting oxidative stress and the inflammatory response: Involving the TLR4/NF- κ B/COX-2 pathway*. Molecules, 2019. **24**(10): p. 1964.
113. Girisa, S., et al., *Potential of zerumbone as an anti-cancer agent*. Molecules, 2019. **24**(4): p. 734.
114. Moreira da Silva, T., et al., *Zerumbone from Zingiber zerumbet (L.) smith: a potential prophylactic and therapeutic agent against the cariogenic bacterium Streptococcus mutans*. BMC complementary and alternative medicine, 2018. **18**(1): p. 301.
115. Nobari, S., et al., *Combination of curcumin and zerumbone improves vegf-a inhibition in colorectal cancer in vivo and in vitro model*. Proceedings of the national academy of sciences, india section B: biological sciences, 2023. **93**(4): p. 883-894.
116. Brogi, S., et al., *In silico methods for drug design and discovery*. 2020, Frontiers Media SA. p. 612.
117. Ullah, Z., et al., *Density functional theory and phytochemical study of 8-hydroxyisodiospyrin*. Journal of Molecular Structure, 2015. **1095**: p. 69-78.
118. Gabidia Torres, O.L., et al., *Computational Study of the Kinetics and Mechanisms of Gas-Phase Decomposition of N-Diacetamides Using Density Functional Theory*. Molecules, 2024. **29**(16): p. 3833.
119. Panda, S., et al., *Reactivity of a heterobinuclear heme-peroxo-Cu complex with para-substituted catechols shows a K_a-dependent change in mechanism*. Chemical Science, 2025. **16**(5): p. 2402-2412.
120. Tamafo Fouegue, A.D., et al., *DFT insights into the structure, reactivity and radical scavenging activity of cycloartocarpesin*. Journal of Physical Organic Chemistry, 2021. **34**(9): p. e4245.
121. Wang, Z., et al., *Insights into the binding mode of curcumin to MD-2: studies from molecular docking, molecular dynamics simulations and experimental assessments*. Molecular BioSystems, 2015. **11**(7): p. 1933-1938.
122. Ahmed, M., et al., *Curcumin: Synthesis optimization and in silico interaction with cyclin dependent kinase*. Acta Pharmaceutica, 2017. **67**(3): p. 385-395.
123. Rasul, M.G., *Extraction, isolation and characterization of natural products from medicinal plants*. Int. J. Basic Sci. Appl. Comput, 2018. **2**(6): p. F0076122618.

124. Zhang, M., et al., *Extraction and analysis of chemical compositions of natural products and plants*. Separations, 2023. **10**(12): p. 598.
125. Feng, W., et al., *Analytical Methods of Isolation*. Phytochemicals in human health, 2020: p. 45.
126. Sabale, P.M., M.A. Kamble, and V.P. Sabale, *Chemical Derivatization of Phytoconstituents to Enhance Therapeutic Potential*. Bharati Vidyapeeth Medical Journal, 2025. **5**(1): p. 7-14.
127. Ilkar Erdagi, S. and C. Uyanik, *Biological evaluation of bioavailable amphiphilic polymeric conjugate based-on natural products: Diosgenin and curcumin*. International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials, 2020. **69**(2): p. 73-84.
128. Iobbi, V., et al., *Metabolite profiling of " Eretto Liguria", an Italian local ecotype of Salvia rosmarinus, and antimicrobial activity against Pectobacterium carotovorum subsp. carotovorum*. Planta Medica, 2023. **89**: p. 1409-1409.
129. Paquin, A., C. Reyes-Moreno, and G. Bérubé, *Recent advances in the use of the dimerization strategy as a means to increase the biological potential of natural or synthetic molecules*. Molecules, 2021. **26**(8): p. 2340.
130. Tatarczak-Michalewska, M. and J. Flieger, *Application of high-performance liquid chromatography with diode array detection to simultaneous analysis of reference antioxidants and 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) in free radical scavenging test*. International journal of environmental research and public health, 2022. **19**(14): p. 8288.
131. Vu, D.H., et al., *Design, synthesis, anti-inflammatory evaluation, and molecular docking studies of novel quinazoline-4 (3 H)-one-2-carbothioamide derivatives*. RSC advances, 2025. **15**(4): p. 2850-2861.
132. Chelliah, R. and D.-H. Oh, *Screening for anticancer activity: 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium (MTT) assay*, in *Methods in Actinobacteriology*. 2022, Springer. p. 423-425.
133. Pham, T.T.T., et al., *Synthesis and transformation of novel dibenzothipodand derivatives*. VNU Journal of Science: Natural Sciences and Technology, 2020. **36**(4).
134. Tintori, S.C., S.A. Sloat, and M.V. Rockman, *Rapid isolation of wild nematodes by Baermann funnel*. Journal of visualized experiments: JoVE, 2022(179): p. 10.3791/63287.
135. de Villalobos, L.C. and N.B. Camino, *Limnomermis subtropicalis n. sp.(Nematoda: Mermithidae) a parasite of larvae of Simulium orbitale Lutz (Diptera: Simuliidae) in Argentina*. 1997.
136. Nguyen, H.T., et al., *Remarks on phylogeny and molecular variations of criconematid species (Nematoda: Criconematidae) with case studies from Vietnam*. Scientific Reports, 2022. **12**(1): p. 14832.
137. Trinh, Q.P., et al., *Integrative taxonomy of the aggressive pest Meloidogyne enterolobii and molecular phylogeny of Meloidogyne spp. based on five gene regions*. Australasian Plant Pathology, 2022. **51**(3): p. 345-358.
138. Trinh, Q.P., et al., *Morphological and molecular characterizations of Neodolichodorus bachlongviensis sp. n. (Nematoda: Dolichodoridae), a new*

- plant-parasitic nematode species from Bach Long Vy island in Vietnam. Australasian Plant Pathology*, 2024. **53**(2): p. 141-150.
139. Pham, T.H.N. and T.M.L. Tran, *Bioavailability and Bioaccumulation of Heavy Metals in Soil-crop System (Brassica rapa var. Parachinensis and Brassica rapa subsp. Chinensis) and Health Risk Assessment*. VNU Journal of Science: Earth and Environmental Sciences, 2025.
140. Nguyen, N.T.N., et al., *Use of local inoculants to produce organic fertilizer from the brewing industry*. Journal of Science and Technology Development, 2017. **20**(K3): p. 25-30.
141. Vương, T.T.T., et al., *Định lượng đồng thời 1-[(2-chlorophenyl) methyl] imino methyl] cyclopentanol hydroclorid và 2-Hydroxy-2-(o-chloro phenyl) cyclohexanon, hai tiền chất của ketamin, trong nước thải bằng LC-MS/MS*. Vietnam Journal of Food Control-vol, 2022. **5**(2): p. 451.
142. Thành, Đ.N., *Xác định hàm lượng rutin trong một số cao dược liệu hoa hòe được sử dụng làm nguyên liệu trong các chế phẩm thực phẩm bảo vệ sức khỏe bằng phương pháp HPLC-UV*. Heavy metals and arsenic concentrations in water, agricultural soil, and rice in Ngan Son district, Bac Kan province, Vietnam, 2023.
143. To, D.C., et al., *Inflammation and diabetic inhibitors from Amanita abrupta and Amanita pantherina: experimental and computational results*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2025: p. 130438.
144. Van, N.T.H., et al., *Chemical Composition and Pesticidal Activities Against Three Vector Mosquito Species of Zanthoxylum armatum DC. Essential Oils*. Chemistry & Biodiversity, 2025: p. e202500648.
145. Nguyen, A.H., et al., *Searching for potential xanthine oxidase inhibitors from Vietnamese herb plants via computational studies*. Computational Biology and Chemistry, 2025: p. 108763.
146. Araya-Sibaja, A.M., et al., *Characterization, antioxidant and cytotoxic evaluation of demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin from curcuma longa cultivated in costa rica*. Separations, 2024. **11**(1): p. 23.

PHỤ LỤC