

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN THỊ ÁNH NGUYỆT

NGHIÊN CỨU HOÁ HỌC, CHIẾT XUẤT, BÀO CHẾ VÀ
KIỂM NGHIỆM MỘT SỐ HỢP CHẤT POLYPHENOL
TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM
TỪ LÁ ACTISÔ ĐÀ LẠT
(*FOLIUM CYNARAE SCOLYMI*)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. HỒ CHÍ MINH, Năm 2023

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

NGUYỄN THỊ ÁNH NGUYỆT

NGHIÊN CỨU HÓA HỌC, CHIẾT XUẤT, BÀO CHẾ VÀ
KIỂM NGHIỆM MỘT SỐ HỢP CHẤT POLYPHENOL
TRONG NGUYÊN LIỆU VÀ THÀNH PHẨM
TỪ LÁ ACTISÔ ĐÀ LẠT
(*FOLIUM CYNARAE SCOLYMI*)

NGÀNH: DƯỢC HỌC CỔ TRUYỀN

MÃ SỐ: 62720406

LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

1. TS. PHẠM ĐÔNG PHƯƠNG

2. PGS.TS. NGUYỄN THIÊN HẢI

TP. Hồ Chí Minh, Năm 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi, các kết quả nghiên cứu được trình bày trong luận án là trung thực, khách quan và chưa từng được công bố ở bất kỳ nơi nào.

Đây là đề tài thuộc Sở Khoa học & Công nghệ Tp. Hồ Chí Minh, được Chủ nhiệm đề tài và nhóm nghiên cứu đồng ý sử dụng số liệu để báo cáo.

Tác giả luận án

Nguyễn Thị Ánh Nguyệt

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
MỤC LỤC.....	ii
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT VÀ THUẬT NGỮ ANH - VIỆT	iv
DANH MỤC CÁC BẢNG	vii
DANH MỤC CÁC SƠ ĐỒ, HÌNH.....	x
ĐẶT VẤN ĐỀ	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1. Thực vật học.....	3
1.2. Thành phần hóa học	8
1.3. Tác dụng sinh học	17
1.4. Phương pháp phân tích các polyphenol trong Actisô	24
1.5. Quy trình chiết xuất polyphenol từ lá Actisô.....	34
1.6. Tổng quan về dạng bào chế.....	35
Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	37
2.1. Đối tượng nghiên cứu	37
2.2. Cỡ mẫu của nghiên cứu.....	37
2.3. Phương tiện nghiên cứu	39
2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu.....	40
2.5. Quy trình nghiên cứu	41
2.6. Phương pháp nghiên cứu và phân tích dữ liệu.....	41
Chương 3. KẾT QUẢ	59
3.1. Nghiên cứu thành phần hóa học.....	59
3.2. Nghiên cứu phương pháp kiểm nghiệm.....	81
3.3. Tác dụng sinh học	109
3.4. Nghiên cứu chiết xuất cao Actisô	111
3.5. Nghiên cứu bào chế viên nén bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô.....	117
Chương 4. BÀN LUẬN.....	124
4.1. Nghiên cứu thành phần hóa học.....	124
4.2. Nghiên cứu về phân tích kiểm nghiệm	124

4.3. Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa	140
4.4. Nghiên cứu chiết xuất cao Actisô	145
4.5. Nghiên cứu bào chế viên bao phim chứa 200 mg cao Actisô.....	146
KẾT LUẬN.....	149
KIẾN NGHỊ.....	151
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN	152
TÀI LIỆU THAM KHẢO	153
DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC.....	PL.1

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT VÀ THUẬT NGỮ ANH - VIỆT

Từ viết tắt	Từ gốc	Nghĩa tiếng việt
AC	Acid chlorogenic	Acid chlorogenic (hợp chất)
ACN	Acetonitrile	Acetonitril (dung môi)
ALE	Artichoke Leaf Extract	Dịch chiết lá Actisô
ALP	Alkaline phosphatase	Chỉ số men gan ALP
ALT	Alanine aminotransferase	Chỉ số men gan ALT
ARE	Antioxidant response element	Yếu tố đáp ứng chống oxy hóa
APCI	Atmospheric pressure chemical ionisation	Ion hóa hóa học ở áp suất khí quyển
AST	Aspartate aminotransferase	Chỉ số men gan AST
CDC	Chất đối chiếu	Chất đối chiếu
CFU	Colony Forming Units	Đơn vị hình thành khuẩn lạc
CI	Confidence Interval	Khoảng tin cậy
CR	Cynarside	Cynarosid (hợp chất)
COSY	Correlation Spectroscopy	Phổ COSY
COX-2	Cyclooxygenase-2	Enzym thuộc nhóm oxygenase
CP	Chế phẩm	Chế phẩm
CQA	Caffeoylquinic acid	Acid caffeoylquinic
CY	Cynarin	Cynarin (hợp chất)
BPD	Bộ phận dùng	Bộ phận dùng
DCM	Dichloromethane	Dichloromethan (dung môi)
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer	Phổ DEPT
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dung môi DMSO
DPPH	1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl	Thuốc thử DPPH
ĐĐKL	Độ đồng đều khối lượng	Độ đồng đều khối lượng
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay	Xét nghiệm miễn dịch hấp thụ liên kết với enzym
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Synthase	Enzym tổng hợp oxit nitric nội mô
iNOS	Inducible Nitric Oxide Synthase	Enzym tổng hợp oxit nitric cảm ứng
ESI-MS	Electro Spray Ionization	Ion hóa phun điện
EA	Ethyl acetate	Ethyl acetat (dung môi)
EtOH	Ethanol	Ethanol (Cồn)

Từ viết tắt	Từ gốc	Nghĩa tiếng việt
GOT	Glutamic oxaloacetic transaminase	Chỉ số men gan GOT
GPT	Glutamat Pyruvat transaminase	Chỉ số men gan GPT
GSH	Glutathione	Glutthion (chất chống oxy hóa)
GST	Glutathione S-transferases	Chỉ số men gan GST
HDL	High-Density Lipoprotein	Lipoprotein tỉ trọng cao (mỡ máu)
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation	Phổ HMBC
HO-1	Heme Oxygenase -1	Ezym bảo vệ tế bào HO-1
HPLC	High performance liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng cao
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence	Phổ HSQC
IBS	Irritable bowel syndrome	Hội chứng ruột kích thích
IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50 %	Nồng độ ức chế 50 %
IR	Infrared	Hồng ngoại
KLPT	Khối lượng phân tử	Khối lượng phân tử
LDL	Low-density Lipoprotein	Lipoprotein tỉ trọng thấp (mỡ máu)
LOD	Limit of Detection	Giới hạn phát hiện
LOQ	Limit of Quantitation	Giới hạn định lượng
MDA	Malonyl dialdehyde	Malonyl dialdehyd
MPLC	Medium pressure liquid chromatography	Sắc ký lỏng hiệu năng trung bình
MeOH	Methanol	Methanol (dung môi)
MS	Mass spectrometry	Phổ khối
NAFLD	Non-alcoholic fatty liver disease	Bệnh gan nhiễm mỡ không do rượu
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis	Viêm gan không do rượu
Bu	<i>n</i> -Butanol	Butanol (dung môi)
NMR	Nuclear Magnetic Resonance	Cộng hưởng từ hạt nhân
Nrf2	Nuclear erythroid 2-related factor 2	Yếu tố hạt nhân có nguồn gốc từ erythroid 2 (giống 2)
PDA	Photo Diod Array	Dãy diod quang
PGE2	Prostaglandin E2	Prostaglandin E2
ppm	Part per million	Phần triệu
rDNA	Ribosomal DeoxyriboNucleic Acid	RNA ribosom
RSD	Relative Standard Deviation	Độ lệch chuẩn tương đối
Rt	Retention time	Thời gian lưu

Từ viết tắt	Từ gốc	Nghĩa tiếng việt
ROS	Reactive oxygen species	Các gốc oxy hóa hoạt động
SCO	Scolymoside	Scolymosid (hợp chất)
SKĐ	Sắc ký đồ	Sắc ký đồ
Semi-prep. HPLC	Semi-preparative HPLC	Sắc ký lỏng bán điều chế hiệu năng cao
SOD	Superoxid Dismutase	Superoxid Dismutase (enzym chống oxy hóa)
TFA	Trifluoroacetic acid	Acid trifluoroacetic (dung môi)
TLTK	Tài liệu tham khảo	Tài liệu tham khảo
TNF- α	Tumor Necrosis Factor - alpha	Yếu tố hoại tử khối u - alpha
TT	Thuốc thử	Thuốc thử
UPLC	Ultra-Performance Liquid Chromatography	Sắc ký lỏng siêu hiệu năng
UV-Vis	Ultraviolet - visible	Tử ngoại khả kiến

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Các loài thuộc chi <i>Cynara</i>	4
Bảng 1.2. Cấu trúc của các hợp chất acid phenol trong Actisô	10
Bảng 1.3. Cấu trúc của các hợp chất flavonoid trong Actisô	12
Bảng 1.4. Các dẫn xuất sesquiterpen lacton trong Actisô	14
Bảng 1.5. Cấu trúc của các saponin triterpen trong Actisô.....	15
Bảng 1.6. Các tiêu chuẩn kiểm nghiệm lá và cao Actisô theo DĐVN V	25
Bảng 1.7. Các tiêu chuẩn kiểm nghiệm lá và cao Actisô theo EP 10.0	26
Bảng 1.8. Tóm tắt các công trình nghiên cứu phân tích các polyphenol trong Actisô bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao	28
Bảng 1.9. Đặc tính về ion và phổ UV của các CQA và flavonoid trong Actisô.....	29
Bảng 1.10. Hàm lượng polyphenol (% , dược liệu khô) trong lá Actisô liên quan đến BPD và giống cây	32
Bảng 1.11. Hàm lượng polyphenol (mg/g, khô) trong hoa đầu Actisô trước và sau chế biến	33
Bảng 1.12. Hàm lượng polyphenol trong các cao chiết thu được từ các quy trình chiết.....	34
Bảng 1.13. Một số chế phẩm từ cao chiết lá Actisô trên thị trường Việt Nam.....	35
Bảng 2.1. Các nguyên liệu dùng trong nghiên cứu.....	37
Bảng 2.2. Các tá dược dùng trong nghiên cứu bào chế	39
Bảng 2.3. Điều kiện MPLC-Bu	43
Bảng 2.4. Điều kiện MPLC-EA-16	43
Bảng 2.5. Điều kiện semi-prep.HPLC-Bu-2.....	44
Bảng 2.6. Điều kiện semi-prep.HPLC-Bu-3.....	44
Bảng 2.7. Điều kiện semi-prep.HPLC-Bu-9.....	44
Bảng 2.8. Các thông số đánh giá góc nghỉ, chỉ số nén và tỷ số Hausner.....	57
Bảng 2.9. Điều kiện đánh giá độ ổn định của chế phẩm.....	58
Bảng 3.1. Các hợp chất phân lập từ cao Bu.....	61
Bảng 3.2. Các hợp chất phân lập từ cao EA	63
Bảng 3.3. Tổng kết các hợp chất phân lập từ cao EA và Bu	64
Bảng 3.4. Kết quả phân tách các phân đoạn của cột C ₁₈ .VLC-Bu	67
Bảng 3.5. Dữ liệu phổ ¹ H và ¹³ C-NMR của hợp chất 18-20.....	68
Bảng 3.6. Cấu trúc của các dẫn xuất acid benzoic phân lập 18 - 20.....	68
Bảng 3.7. Đặc điểm phổ UV và MS của chất 1-7 và 10-13.....	69

Bảng 3.8. Dữ liệu phổ ^1H -NMR của chất 1 - 5 và 7 so với acid quinic từ tài liệu	72
Bảng 3.9. Dữ liệu phổ ^1H -NMR của chất 6, 10 - 13 so với acid quinic từ tài liệu	73
Bảng 3.10. Dữ liệu phổ ^{13}C -NMR của chất 1 - 5 và 7 so với acid quinic từ tài liệu	74
Bảng 3.11. Dữ liệu phổ ^{13}C -NMR của chất 6 và 10 - 13 so với acid quinic từ tài liệu	74
Bảng 3.12. Cấu trúc của các hợp chất 1-7 và 10-13	75
Bảng 3.13. Đặc điểm phổ UV và MS của chất 8, 9, 15 và 17	76
Bảng 3.14. Dữ liệu phổ ^{13}C và ^1H -NMR của chất 8, 9, 15 và 17	78
Bảng 3.15. Cấu trúc các hợp chất 8, 9, 15 và 17	78
Bảng 3.16. So sánh dữ liệu phổ NMR của 16 và cynaratriol từ tài liệu	80
Bảng 3.17. Điều kiện HPLC phân tích các nguyên liệu thiết lập CDC	82
Bảng 3.18. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình định lượng nguyên liệu thiết lập CDC (n = 6) bằng HPLC-PDA	82
Bảng 3.19. Khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng của quy trình xác định độ tinh khiết nguyên liệu CDC bằng HPLC-PDA	83
Bảng 3.20. Kết quả định lượng hàm lượng % của nguyên liệu CDC bằng HPLC-PDA	83
Bảng 3.21. Tóm tắt chỉ tiêu chất lượng và phương pháp thử của CDC.....	83
Bảng 3.22. Kết quả đóng gói của các CDC	84
Bảng 3.23. Kết quả đánh giá đồng nhất liên phòng thí nghiệm.....	85
Bảng 3.24. Kết quả xác định giá trị ấn định của các CDC sau khi đóng gói.....	85
Bảng 3.25. Chương trình dung môi định lượng đồng thời AC, SCO và CR trong lá Actisô	87
Bảng 3.26. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình định lượng AC, SCO, CR trong lá Actisô bằng HPLC-PDA (n = 6).....	89
Bảng 3.27. Đường tuyến tính, LOD và LOQ của AC, SCO, CR của quy trình định lượng lá Actisô bằng HPLC-PDA	89
Bảng 3.28. Độ chính xác của quy trình định lượng AC, SCO, CR trong lá Actisô.....	89
Bảng 3.29. Độ đúng của quy trình định lượng AC, SCO và CR trong lá Actisô	90
Bảng 3.30. Chương trình dung môi định lượng đồng thời AC, CY, SCO và CR trong cao Actisô	91
Bảng 3.31. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình định lượng AC, CY, SCO, CR trong cao khô Actisô bằng HPLC - PDA (n = 6)	93
Bảng 3.32. Đường tuyến tính, LOD và LOQ của AC, CY, SCO, CR của quy trình định lượng cao khô Actisô bằng HPLC-PDA	94
Bảng 3.33. Độ chính xác của quy trình định lượng AC, CY, SCO, CR trong cao Actisô ..	94
Bảng 3.34. Độ đúng của quy trình định lượng AC, CY, SCO và CR trong cao Actisô	94

Bảng 3.35. Giá trị độ hấp thụ cực đại ($\lambda_{\max}$) của 8 chất đối chiếu	96
Bảng 3.36. Chương trình dung môi định lượng đồng thời 12 polyphenol trong cao Actisô	97
Bảng 3.37. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình định lượng 12 polyphenol trong cao khô Actisô bằng UPLC - PDA (n = 6)	98
Bảng 3.38. Đường tuyến tính, LOD và LOQ của 8 chất đối chiếu của quy trình định lượng cao khô Actisô bằng UPLC-PDA	99
Bảng 3.39. Độ chính xác của quy trình định lượng 12 polyphenol trong cao Actisô.....	99
Bảng 3.40. Độ đúng của quy trình định lượng 8 polyphenol trong cao Actisô	99
Bảng 3.41. So sánh hàm lượng % polyphenol trong cao nước và ethanol 96 %.....	102
Bảng 3.42. Hàm lượng của các hợp chất polyphenol và kết quả thử nghiệm DPPH và MDA (TB $\pm$ SD, n = 3) của các cao chiết Actisô.....	103
Bảng 3.43. Hàm lượng tích lũy của AC và CY theo thời gian thu hoạch năm 2016-2017.....	105
Bảng 3.44. Kết quả hàm lượng % 4 polyphenol chính của chế phẩm trà túi lọc trên thị trường.....	105
Bảng 3.45. Hàm lượng % của các hợp chất polyphenol (TB $\pm$ SD, n = 3) của các chế phẩm có chứa cao chiết Actisô	108
Bảng 3.46. IC ₅₀ μ M (TB $\pm$ SD) của 9 hợp chất phân lập bằng thử nghiệm DPPH và MDA	109
Bảng 3.47. Tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) của nguyên liệu lá Actisô	113
Bảng 3.48. Hàm lượng AC và CY trong các cao chiết lá tươi Actisô khảo sát.....	114
Bảng 3.49. Kết quả chiết xuất cao lá Actisô thử nghiệm quy mô PTN.....	115
Bảng 3.50. Khối lượng cao và hàm lượng AC, CY trong cao chiết nghiên cứu	116
Bảng 3.51. TCCS và kết quả kiểm tra chất lượng của các cao chiết nghiên cứu	117
Bảng 3.52. Thành phần công thức tối ưu của viên bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô	118
Bảng 3.53. Kết quả kiểm nghiệm các lô qui mô 450 viên và 3.000 viên	118
Bảng 3.54. Tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) của chế phẩm.....	119
Bảng 3.55. Thành phần công thức của viên Univerphytol (cỡ lô 15.000 viên).....	120
Bảng 3.56. Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu của bán thành phẩm và thành phẩm của lô 15.000 viên.....	120
Bảng 3.57. Kết quả hàm lượng acid chlorogenic và cynarin trong các chế phẩm.....	122
Bảng 3.58. Kết quả khảo sát độ ổn định của chế phẩm Univerphytol ở điều kiện dài hạn.....	123
Bảng 3.59. Kết quả khảo sát độ ổn định của chế phẩm Univerphytol ở điều kiện lão hóa cấp tốc	123

DANH MỤC CÁC SƠ ĐỒ, HÌNH

Hình 1.1. Mối liên hệ giữa các loài trong chi <i>Cynara</i> với <i>C. cardunculus</i> dựa vào rDNA...	4
Hình 1.2. Đặc điểm hình thái thực vật của cây Actisô	5
Hình 1.3. Đặc điểm hình thái hoa đầu của 4 nhóm giống Actisô	6
Hình 1.4. Kiểu hình của thế hệ lai F1 giữa Actisô trồng với Cardoon trồng và Cardoon dại	6
Hình 1.5. Đặc điểm hình thái của 5 giống Actisô nhập nội so sánh với giống Actisô xanh (A85)	7
Hình 1.6. Danh pháp (IUPAC 1976 và non-IUPAC) của cynarin và acid chlorogenic	9
Hình 1.7. Sắc ký đồ phân tích các hợp chất polyphenol trong cao Actisô	27
Hình 1.8. Hàm lượng các orthodiphenolic qua các thời kỳ sinh trưởng của lá	31
Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu	41
Hình 2.2. Sơ đồ qui trình bào chế viên nén bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô.....	58
Hình 3.1. Sơ đồ chiết xuất và SKĐ phân tích cao EA và Bu bằng HPLC-PDA ở 330 nm .	59
Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao Bu	60
Hình 3.3. SKĐ các phân đoạn cột MPLC của cao Bu (MPLC-Bu) dùng để phân lập các chất	61
Hình 3.4. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao EA	62
Hình 3.5. SKĐ các phân đoạn cột VLC-EA dùng để phân lập các chất.....	63
Hình 3.6. Sơ đồ chiết xuất và phân lập các nguyên liệu CDC.....	66
Hình 3.7. Kết quả phân lập CDC bằng các kỹ thuật sắc ký	66
Hình 3.8. Phổ UV của hợp chất 18 - 20.....	67
Hình 3.9. Cấu hình của acid quinic.....	71
Hình 3.10. Cấu trúc của hợp chất 16	80
Hình 3.11. Cấu trúc của hợp chất 14	81
Hình 3.12. Sắc ký đồ HPLC định lượng AC, SCO và CR trong lá Actisô.....	86
Hình 3.13. Phổ UV của AC, SCO và CR trong hỗn hợp chuẩn	87
Hình 3.14. Kết quả khảo sát điều kiện chiết xuất lá Actisô để định lượng bằng HPLC.....	88
Hình 3.15. Sắc ký đồ HPLC định lượng AC, CY, SCO và CR trong cao khô Actisô (Cao BV).....	90
Hình 3.16. Phổ UV của AC, CY, SCO và CR trong hỗn hợp chuẩn.....	90
Hình 3.17. Kết quả khảo sát điều kiện chuẩn bị cao Actisô của quy trình định lượng.....	92
Hình 3.18. Sắc ký đồ UPLC-PDA định lượng 12 hợp chất polyphenol trong cao khô Actisô	96
Hình 3.19. Phổ UV của 8 polyphenol trong hỗn hợp chuẩn.....	96

Hình 3.20. Biểu đồ so sánh hàm lượng polyphenol của cao chiết 2 giống lá Actisô ở Đà Lạt	100
Hình 3.21. Bản đồ heat map biểu diễn hàm lượng polyphenol trong các cao chiết của các bộ phận khác nhau của cây Actisô giống xanh và giống tím	101
Hình 3.22. Phân tích VIP score các polyphenol trong các bộ phận cây Actisô giống xanh	102
Hình 3.23. SKĐ phân tích các thành phần trong cao nước của Actisô (2 giống)	104
Hình 3.24. Hàm lượng % của 4 polyphenol chính của chế phẩm trà Actisô trên thị trường	105
Hình 3.25. Biểu đồ so sánh hàm lượng % các polyphenol trong các chế phẩm Actisô	107
Hình 3.26. Biểu đồ so sánh hàm lượng % tổng polyphenol trong các chế phẩm Actisô...	107
Hình 3.27. IC ₅₀ μ M (TB $\pm$ SD) của 9 hợp chất tinh khiết phân lập từ lá Actisô	110
Hình 3.28. Biểu đồ so sánh IC ₅₀ (μ g/ml, n=3) của các cao chiết Actisô (giống xanh và tím) trong thử nghiệm DPPH và MDA	111
Hình 3.29. SKĐ cao chiết lá tươi ở 60 và 100 °C	114
Hình 3.30. Kết quả thăm dò thời gian chiết xuất lá tươi Actisô	115
Hình 3.31. Sơ đồ quy trình bào chế viên nén bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô	121
Hình 3.32. Biểu đồ so sánh hàm lượng % của AC, CY trong các chế phẩm Actisô	122
Hình 4.1. SKĐ cao chiết và lá khô Actisô nghiên cứu so với TLTK	130
Hình 4.2. Biểu đồ thời tiết (lượng mưa, nhiệt độ, số giờ nắng) trong năm 2016-2017 (A) và hàm lượng tích lũy của AC và CY theo thời gian thu hoạch (B)	137
Hình 4.3. Cấu hình theo mô hình 3D ở dạng ball-stick model của 5 dẫn xuất di-CQA	143

ĐẶT VẤN ĐỀ

Actisô (*Cynara scolymus* L.) (đồng danh là *Cynara cardunculus* L.) là loại cây thân thảo thuộc họ Asteraceae, có xuất xứ từ vùng Địa Trung Hải. Actisô được dùng làm thuốc và thực phẩm chức năng để trị các bệnh về gan, mật và hạ lipid máu. Do vậy, hiện nay Actisô được trồng phổ biến ở nhiều nơi trên thế giới với quy mô và sản lượng lớn, nhiều nhất là ở Ý, Ai Cập, Tây Ban Nha,...^{1,2}. Tại Việt Nam, Actisô được trồng nhiều ở Đà Lạt, Sa Pa, Tam Đảo. Chính vì nhiều tác dụng có lợi nên Actisô đã thu hút các nhà khoa học trên thế giới quan tâm nghiên cứu.

Về tình hình nghiên cứu trên thế giới, có rất nhiều công trình nghiên cứu về hoa và lá Actisô, điển hình có các nghiên cứu về thành phần hóa học, tác dụng dược lý, phương pháp định lượng và một số thử nghiệm lâm sàng.

Về tình hình nghiên cứu trong nước, các nghiên cứu về thành phần hoá học trong Actisô Đà Lạt còn hạn chế, các hợp chất đã được công bố gồm hợp chất sterol, cynarin và flavonoid^{3,4,5}. Một số đề tài khác liên quan chủ yếu đến ngành chăn nuôi và nông nghiệp. Tại Việt Nam, việc nghiên cứu phát triển thuốc từ Actisô là hoàn toàn phù hợp với chính sách quốc gia về thuốc và định hướng phát triển dược liệu của Bộ Y tế vì Actisô là một trong 40 cây thuốc định hướng ưu tiên đầu tư phát triển.

Hiện nay, thị trường Việt Nam và thế giới có rất nhiều chế phẩm từ Actisô, đa dạng về chủng loại (trà túi lọc, viên uống bao đường, viên nang, ống nước...). Tuy nhiên, một số nghiên cứu lâm sàng cho thấy có nhiều kết quả không tương đồng của các kết quả nghiên cứu với cùng mô hình thử nghiệm nhưng trên các chế phẩm Actisô có nhãn hiệu khác nhau. Một trong những nguyên nhân được cho là do các cao chiết lá Actisô (ALE) chưa được tiêu chuẩn hóa nên có sự khác biệt lớn giữa các chế phẩm vì công nghệ sản xuất của mỗi chế phẩm khác nhau^{6,7,8} và các quy trình này đều không được công bố trên các tạp chí trong và ngoài nước. Qua khảo sát sơ bộ về hàm lượng 2 polyphenol chính (cynarin và acid chlorogenic) trong các chế phẩm trên thị trường cho thấy, hàm lượng các thành phần này trong các chế phẩm rất khác biệt, có những sản phẩm có hàm lượng hoạt chất rất thấp hoặc thậm chí không phát hiện được. Bên cạnh đó, đa số các chế phẩm trong nước có hàm lượng hoạt chất thấp hơn so với

chế phẩm Chophytol (Rosa-Pháp) - là chế phẩm nhập khẩu từ Pháp đã được bán tại thị trường Việt Nam. Do đó, đề tài **“Nghiên cứu hóa học, chiết xuất, bào chế và kiểm nghiệm một số hợp chất polyphenol trong nguyên liệu và thành phẩm từ lá Actisô Đà Lạt”** được thực hiện với 2 mục tiêu chính:

1. Nghiên cứu tiêu chuẩn hóa dược liệu lá Actisô.
2. Nghiên cứu quy trình sản xuất bán thành phẩm (cao chiết) và thuốc (thành phẩm) từ cao Actisô có hàm lượng cynarin và acid chlorogenic tương đương hoặc cao hơn chế phẩm nước ngoài (Chophytol của Pháp).

Để đạt được 2 mục tiêu trên, luận án được tiến hành với các nội dung cụ thể như sau:

- ✓ **Nghiên cứu thành phần hóa học:** Chiết xuất phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất trong lá Actisô. Phân lập các chất chính với lượng lớn để thiết lập chất đối chiếu.
- ✓ **Nghiên cứu phương pháp kiểm nghiệm:** Thiết lập chất đối chiếu. Xây dựng quy trình định lượng các thành phần chính trong lá và cao Actisô. Ứng dụng quy trình định lượng để so sánh hàm lượng hoạt chất trong các cao chiết từ các bộ phận của 2 giống cây Actisô và theo dõi động thái tích lũy hàm lượng hoạt chất chính trong lá Actisô. Đồng thời, ứng dụng kiểm tra chất lượng các chế phẩm trên thị trường.
- ✓ **Nghiên cứu tác dụng sinh học:** So sánh tác dụng chống oxy hóa của các hợp chất chính phân lập và một số cao chiết Actisô.
- ✓ **Nghiên cứu chiết xuất cao chuẩn hóa:** Nghiên cứu phương pháp chiết xuất làm tăng hàm lượng cynarin và tổng acid caffeoylquinic trong nguyên liệu Actisô. Nâng cấp cỡ lô chiết xuất cao Actisô ở quy mô lớn (500 kg phần lá/mẻ)
- ✓ **Nghiên cứu bào chế:** Dựa vào công thức và quy trình bào chế đã khảo sát trước đây, nâng cấp cỡ lô sản xuất viên nén bao phim quy mô 15.000 viên/lô.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Thực vật học

1.1.1. Phân loại thực vật

Tên khoa học: *Cynara scolymus* L. Asteraceae

Đồng danh: *Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Hayek; *Carduus scolymus* (L.) Baill.; *Cynara cardunculus* L.⁹

Tên Việt Nam: Actisô

Tên nước ngoài: Globe Artichoke, Artichoke (Tiếng Anh), Garten-Artischoke (Tiếng Đức), Artichaut (Tiếng Pháp).

Theo hệ thống phân loại của A. L. Takhtajan công bố năm 1987 và đã sửa đổi năm 2009, vị trí của chi *Cynara* thuộc họ Asteraceae như sau^{10,11}:

Giới	Thực vật (Plantae)
Ngành	Ngọc lan (Magnoliophyta, Angiospermae)
Lớp	Ngọc lan (Magnoliosida, Dicotyledones)
Phân lớp	Cúc (Asteridae)
Liên bộ	Cúc (Asterianae)
Bộ	Cúc (Asterales)
Họ	Cúc (Asteraceae)
Chi	<i>Cynara</i>
Loài	<i>Cynara scolymus</i> L.

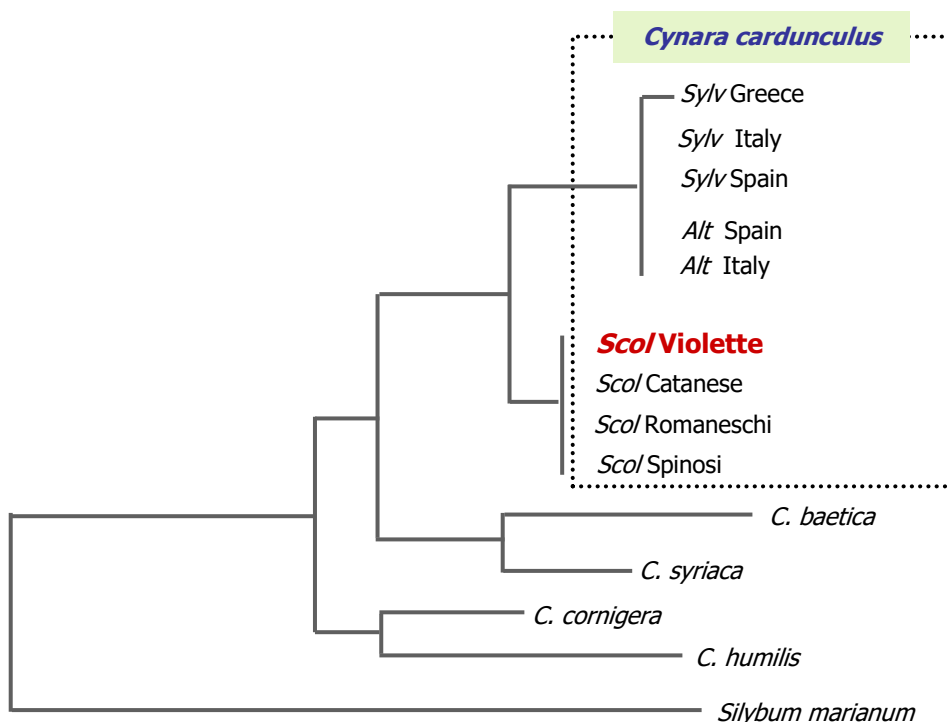
Về phân loại thực vật, có khoảng 69 danh pháp khoa học của các loài thuộc chi *Cynara* được ghi nhận nhưng chỉ có 12 loài được chấp nhận theo The Plant list¹² và 13 loài Theo Catalogue of life⁹ (**Bảng 1.1**).

C. cardunculus (L.) var. *sylvestris* (Lamk) Fiori. được chia thành hai phân loài có nguồn gen và phân bố địa lý khác nhau gồm một loài ở lưu vực Tây Địa Trung Hải, có khả năng là tổ tiên của Cardoon trồng (var. *altilis* DC.) do việc chọn và nhân giống đối với các lá lớn. Loài còn lại ở Trung - Đông Địa Trung Hải, được cho là tổ tiên của Actisô trồng (var. *scolymus* L.) do việc chọn giống hoa đầu có kích thước

lớn ^{13,14,15}. Dựa vào rDNA, Sonnante và cộng sự (2007) ¹⁶ đã mô tả mối liên hệ giữa loài *C. scolymus* và *C. cardunculus* như ở **Hình 1.1**.

Bảng 1.1. Các loài thuộc chi *Cynara*

Stt	Catalogue of life 2020 ⁹	The plant list 2013 ¹²
1	<i>Cynara algarbiensis</i> Coss. ex Mariz	<i>Cynara algarbiensis</i> Mariz
2	<i>Cynara auranitica</i> Post	<i>Cynara auranitica</i> Post
3		<i>Cynara aurantiaca</i> Post
4	<i>Cynara baetica</i> (Spreng.) Pau	<i>Cynara baetica</i> (Spreng.) Pau
5	<i>Cynara cardunculus</i> L.	<i>Cynara cardunculus</i> L.
6		<i>Cynara cardunculus</i> subsp. <i>flavescens</i> Wiklund
7	<i>Cynara cornigera</i> Lindl.	<i>Cynara cornigera</i> Lindl.
8	<i>Cynara cyrenaica</i> Maire & Weiller	<i>Cynara cyrenaica</i> Maire & Weiller
9	<i>Cynara humilis</i> L.	<i>Cynara humilis</i> L.
10	<i>Cynara makrisii</i> Hand & Hadjik.	
11	<i>Cynara scolymus</i> L.	<i>Cynara scolymus</i> L.
12	<i>Cynara syriaca</i> Boiss.	<i>Cynara syriaca</i> Boiss.
13	<i>Cynara tournefortii</i> Boiss. & Reut.	<i>Cynara tournefortii</i> Boiss. & Reut.
14	<i>Cynara gaditana</i> Blanca & Sánch. Carr.	
15	<i>Cynara pacensis</i> F. M. Vázquez	



Hình 1.1. Mối liên hệ giữa các loài trong chi *Cynara* với *C. cardunculus* dựa vào rDNA

Chú thích: *Sylv* = var. *sylvestris*; *Alt* = var. *altilis*; *Scol* = var. *scolymus*

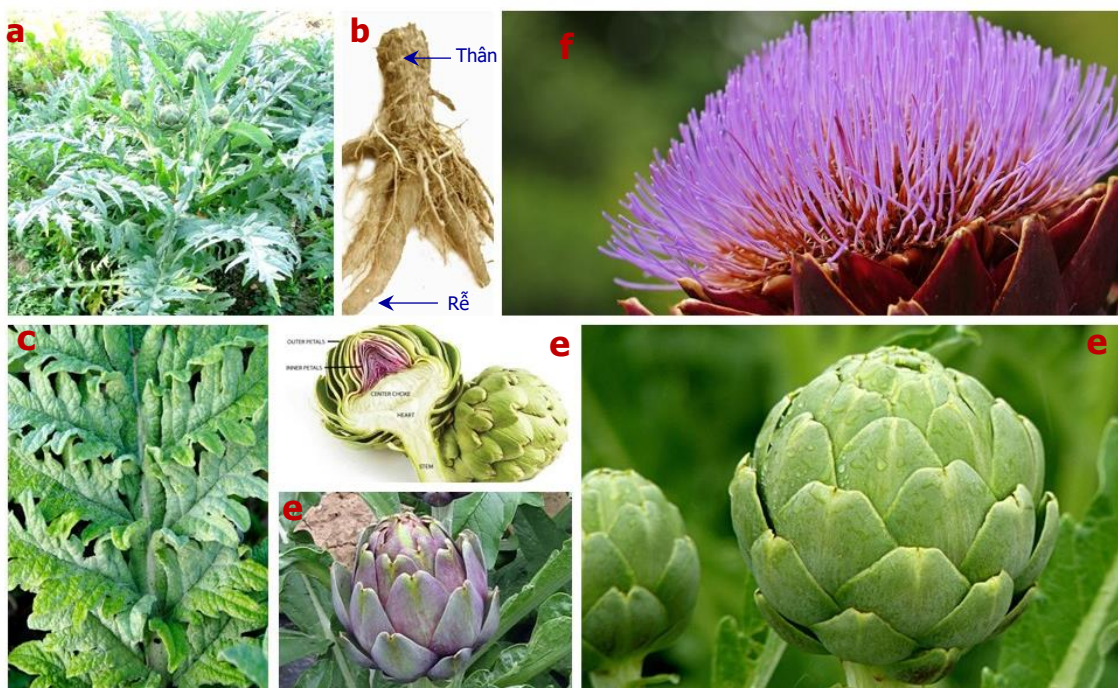
“Nguồn: Sonnante et. al., 2007” ¹⁶

1.1.2. Đặc điểm thực vật

a. Hình thái thực vật của cây Actisô

Actisô là cây thân thảo sống hai hoặc lâu năm, mọc thẳng, có hoặc không có gai tùy theo giống Actisô, cao 1 - 2 m (**Hình 1.2 a**). Rễ to nạc, nhiều rễ phụ (**Hình 1.2 b**). Thân ngắn thẳng và cứng, có khía dọc, phủ lông tơ trắng. Cây có một vòng lá mọc so le, xếp thành hình hoa thị, lá trưởng thành to dài có thể hơn 1 m, rộng hơn 50 cm, xẻ thùy sâu, màu trắng nhạt ở mặt dưới vì có nhiều lông nhung, gân lá nổi rõ (**Hình 1.2 a, c**). Khi cây trưởng thành, từ giữa vòng lá có thân mọc lên đến 1,5 m; phía dưới gốc thân mang những lá to trưởng thành, các lá nhỏ dần từ gốc đến ngọn và tận cùng là những lá không có cuống, nhỏ hơn, hơi phân thùy hoặc gần nguyên.

Các hoa màu xanh tím, hình ống, đặt trên một đế hoa nạc phủ đầy lông tơ của cụm hoa đầu (**Hình 1.2 f**). Cụm hoa to, hình cầu, mọc ở ngọn thân, đường kính 6 - 15 cm, được bao bọc bởi một bao chung lá bắc màu xanh hoặc tím, hình trứng, các lá bắc bầu ở gốc, nhọn ở đỉnh (**Hình 1.2 e**). Tuy nhiên, tùy theo loại giống Actisô khác nhau có thể có các đặc điểm hình thái hoa đầu khác nhau. Quả hình trứng, nhẵn bóng, màu nâu sẫm, bên trên có mào lông trắng^{17,18}. Hạt không có nội nhũ¹⁹.



Hình 1.2. Đặc điểm hình thái thực vật của cây Actisô

“Nguồn: *Plants For A Future* và *Riahi et.al., 2017*^{20,21} và *iStock; LiveNaturally*^{22,23}”

b. Sự đa dạng di truyền của loài Actisô

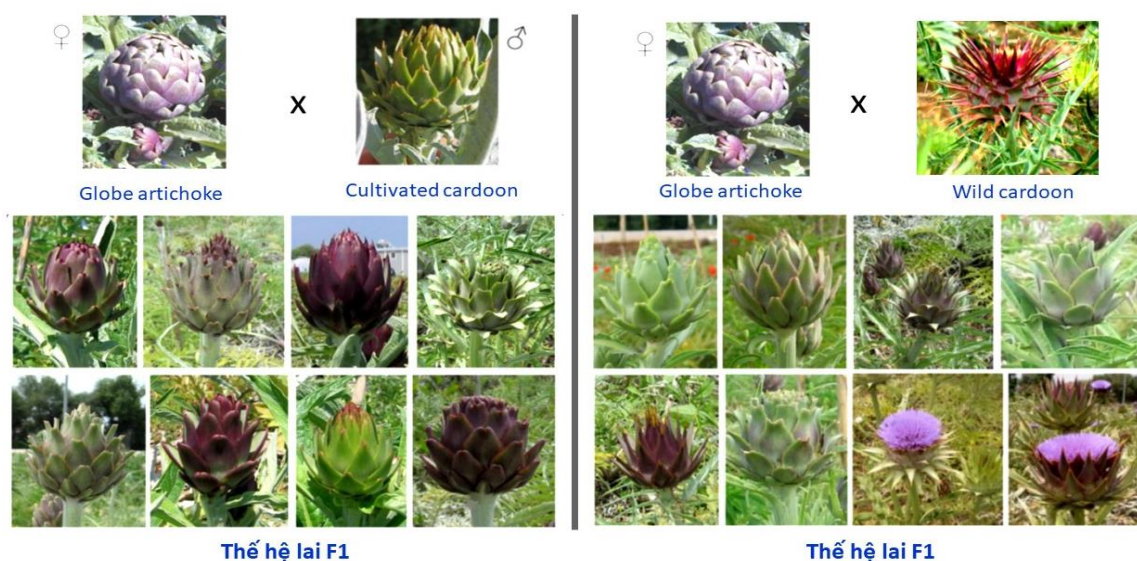
Cynara là loài lưỡng bội ($2n = 2x = 34$) nên chúng đa dạng về kiểu gen. Trong các phân loài của *C. scolymus*, việc lai tạp có thể xảy ra ^{24,25}. Lanteri và cộng sự (2012) ²⁶ đã báo cáo về sự đa dạng kiểu hình được tạo ra ở các thể hệ con nhờ lai hóa kiểu gen của Actisô trồng với cây Cardoon trồng và Cardoon dại (**Hình 1.4**) ²⁴. Việc thuần hóa Actisô bằng cách nhân giống sinh dưỡng theo truyền thống có thể ở Sicily từ thời kỳ Đế quốc La Mã, trong khi cây Cardoon trồng có thể được thuần hóa ở Tây Ban Nha vào thời trung cổ. Hiện nay, hơn 120 kiểu gen được báo cáo nhưng chỉ có 11 - 12 kiểu gen được coi là quan trọng do có nhiều lợi ích kinh tế ²⁷. Porceddu và cộng sự (1976) ²⁸ đề xuất chia các giống cây Actisô thành bốn nhóm dựa trên thời gian thu hoạch và đặc điểm hình thái của hoa đầu (**Hình 1.3**).



Hình 1.3. Đặc điểm hình thái hoa đầu của 4 nhóm giống Actisô

“Nguồn: Porceddu et. al., 1976” ²⁸

❖ Các thể hệ lai F1 của *C. scolymus*:



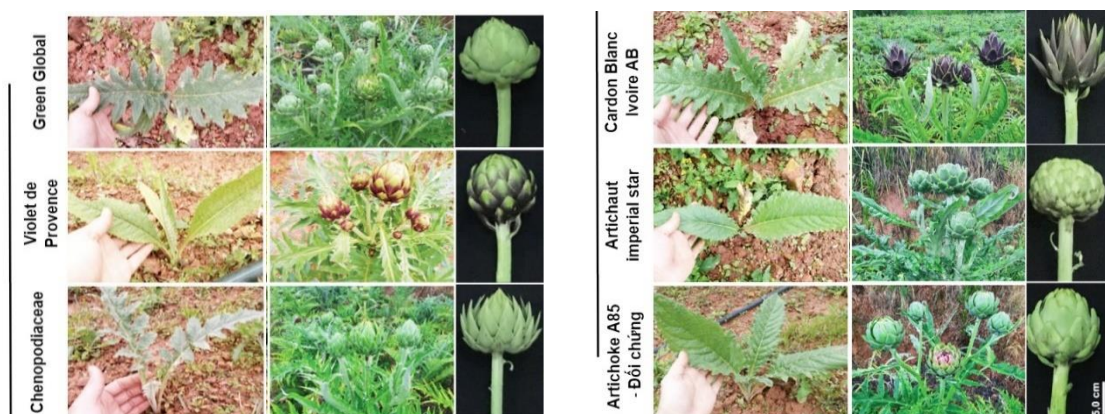
Hình 1.4. Kiểu hình của thể hệ lai F1 giữa Actisô trồng với Cardoon trồng và Cardoon dại

“Nguồn: Lanteri et. al., 2012” ²⁴

d. Các giống Actisô ở Việt Nam:

Tại Việt Nam, cho đến nay, 2 giống Actisô A80 (“giống tím”, ký hiệu **AT**) và Actisô A85 (“giống xanh”, ký hiệu **AX**) đang được trồng và nhân giống rộng rãi tại Đà Lạt²⁹. Theo phương pháp truyền thống, cây Actisô được nhân giống chủ yếu bằng cách tách chồi bên hoặc sử dụng lại gốc cây mẹ từ vụ trước¹⁴. Tuy nhiên, các phương pháp này dễ lây nhiễm các nguồn bệnh từ cây mẹ gây đốm vòng vàng, gây thoái hóa Actisô³⁰. Sự lây nhiễm các loại virus này thường gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến cả chất lượng và sản lượng cây Actisô thương phẩm³⁰.

Hoàng Đức Khải và cộng sự (2021)³¹ đã khảo sát 5 giống Actisô nhập nội so với giống **AX** của Đà Lạt. Kết quả nghiên cứu cho thấy, cả 5 giống Actisô nhập nội đều đồng loạt ra hoa cùng thời điểm tương tự như giống **AX** (7 tháng sau khi trồng trên đồng ruộng) với hình thái và màu hoa ở **Hình 1.5**. Nghiên cứu này chỉ ra rằng cả 5 giống Actisô nhập nội đều đạt năng suất và chất lượng của hoa đầu tốt, trong đó Actisô Cardon Blanc Ivoire AB (hoa màu tím) và Actisô Green Globe (hoa màu xanh) là 2 giống cho năng suất hoa cao hơn kèm theo hình thức và màu sắc hoa lạ mắt. Các giống còn lại cho năng suất thấp hơn và tương đương giống nội địa **AX**.



Hình 1.5. Đặc điểm hình thái của 5 giống Actisô nhập nội so sánh với giống Actisô xanh (A85)

“Nguồn: Hoàng Đức Khải và cộng sự, 2021”³¹

1.1.3. Phân bố, sinh thái

Actisô là giống cây tự nhiên có nguồn gốc từ Địa Trung Hải. Thế kỷ 15, loài này được đưa từ Sicile vào Châu Âu và được trồng ở Pháp, Anh và Đức¹. Đến đầu thế kỷ 16, Actisô được trồng ở khắp các quốc gia Địa Trung Hải, Trung Âu và Mỹ¹. Hiện nay, loài này được trồng khắp nơi trên thế giới. Theo số liệu thống kê của Tổ

chức Lương thực và Nông nghiệp Liên Hiệp Quốc (Faostat, 2018), tổng diện tích trồng Actisô trên thế giới là 127.368 ha, sản lượng đạt 1.678.872 tấn/năm. Actisô có vị trí quan trọng trong ngành nông nghiệp của vùng Địa Trung Hải với hơn 800.000 ha và sản lượng thu hoạch hàng năm chiếm 70 % sản lượng toàn cầu. Ý dẫn đầu thế giới về sản lượng Actisô, tiếp đến là Ai Cập, Tây Ban Nha, Peru, Pháp, Mỹ ².

Ở Việt Nam, Actisô được người Pháp di thực từ thế kỷ 20, ban đầu trồng ở Sa Pa, hiện nay được trồng ở Mường Khương (Lào Cai), Tam Đảo (Vĩnh Phúc) và nhiều nhất tại Đà Lạt (Lâm Đồng); thường trồng ở độ cao 1.000 - 1.500 m. Cây thích hợp với đất dày màu, thoát nước và bón nhiều phân. Ra hoa từ tháng 12 đến tháng 2 ¹⁹.

1.2. Thành phần hóa học

Actisô là một nguồn phong phú các hợp chất polyphenol, chủ yếu là acid caffeoylquinic, flavonoid và inulin được phân lập từ dịch chiết phân cực của lá và hoa đầu Actisô. Các thành phần kém phân cực có trong Actisô bao gồm các sesquiterpen lacton, các acid béo và các triterpen được tìm thấy trong lá Actisô, trong đó vị đắng của lá Actisô là do thành phần cynaropicrin. Các sắc tố anthocyanidin chỉ tìm thấy trong hoa đầu của Actisô. ^{14,32,33}

1.2.1. Polyphenol

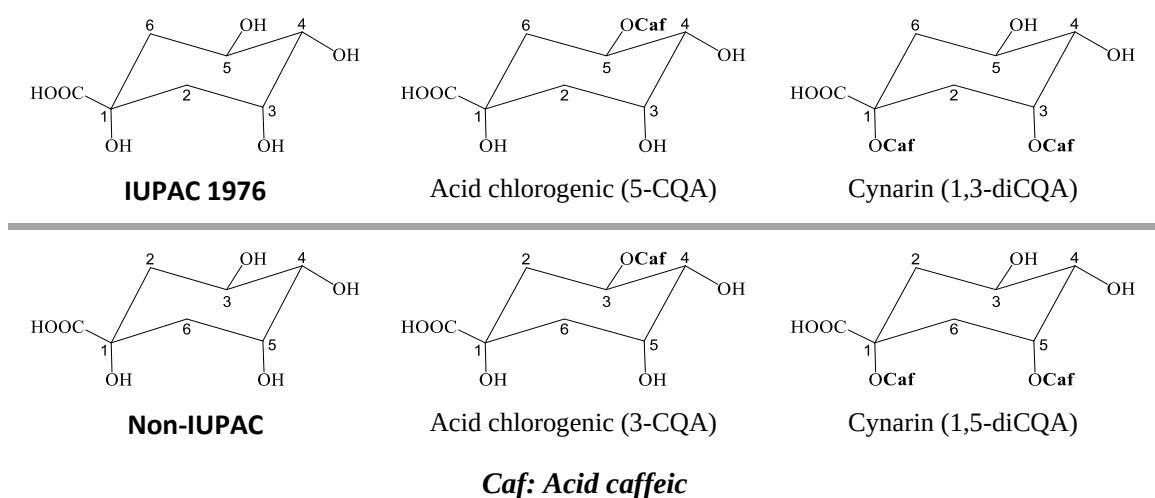
Actisô rất giàu các hợp chất phenol, chủ yếu là các dẫn xuất caffeoylquinic, flavonoid. Polyphenol toàn phần trong lá nhiều hơn trong hoa đầu, do đó lá Actisô được xem là một nguồn quan trọng giàu hợp chất phenol có lợi cho sức khỏe. Acid chlorogenic và acid 1,5-di-*O*-caffeoylquinic là các dẫn xuất acid hydroxycinnamic phong phú nhất. Các flavonoid thuộc khung flavon nhiều nhất là scolymosid và cynarosid. Theo các nghiên cứu, các phân đoạn *n*-butanol và nước, phân đoạn ethyl acetat của lá Actisô có hàm lượng polyphenol toàn phần cao nhất và hoạt tính chống oxy hóa mạnh nhất ³⁴. Tuy nhiên, hàm lượng các polyphenol còn phụ thuộc vào nhiều yếu tố như môi trường, di truyền, thời gian thu hoạch, các bộ phận (lá, đế hoa, vị trí lá bắc của hoa đầu). ^{14,32,33,35,36}

1.2.1.1. Acid phenol

Lá và hoa đầu Actisô được xác định có khoảng 23 hợp chất acid phenol (hợp

chất **1 - 23**) (**Bảng 1.2**) với thành phần chính là các acid mono-CQA (0,48 - 4,24 %), kể đến là di-CQA và flavonoid (0,03 - 0,52 %) ^{37,38}. Một số dẫn xuất CQA đã được phân lập gồm 4 dẫn xuất mono-CQA [acid 1-CQA (**11**); 3-CQA (**12**); 4-CQA (**13**); 5-CQA hay acid chlorogenic (**14**)] và 6 acid diCQA [acid 1,3-diCQA (cynarin) (**15**); 1,4-diCQA (**16**); 1,5-diCQA (**17**); 3,4-diCQA (**18**); 3,5-diCQA (**19**) và 4,5-diCQA (**20**)] ^{6,32,33,35,39,40}. Các acid hydroxycinnamic này chủ yếu có cấu hình dạng *trans*, mặc dù trong các mô thực vật tiếp xúc nhiều hơn với bức xạ tia cực tím cũng tạo ra các đồng phân *cis* ^{35,41}. Các acid phenol khác được xác định là acid caffeic (**6**), *p*-coumaric (**8**), acid ferulic (**10**), vanillic (**3**), syringic (**1**)...dạng tự do và dạng kết hợp cũng được tìm thấy trong lá và lõi hay tim của hoa đầu Actisô nhưng với hàm lượng thấp. ^{33,35}

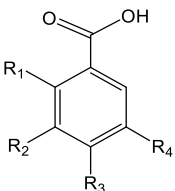
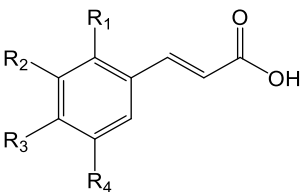
Panizzi và cộng sự là những người đầu tiên phân lập và xác định đặc tính của cynarin trong dịch chiết từ lá Actisô. Lúc đầu, cấu trúc acid 1,4-diCQA được gán cho cynarin ⁴⁰, về sau được xác định lại là acid 1,5-diCQA (theo danh pháp ngoài IUPAC được sử dụng trước năm 1960) ^{33,42}. Sau đó, danh pháp này đã thay đổi theo IUPAC 1976 và vị trí của cacbon trong khung acid quinic được quy định theo cùng chiều kim đồng hồ (**Hình 1.6**). Kết quả là cynarin (trước đây là 1,5-diCQA) trở thành 1,3-diCQA cũng như acid chlorogenic (trước đây là 3-CQA) và trở thành 5-CQA theo IUPAC ^{35,43} (**Hình 1.6**). Tuy nhiên, một số ít tác giả và chuyên khảo dược liệu của WHO (2009) ⁴⁴ vẫn gọi tên theo ngoài IUPAC.

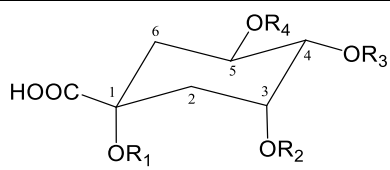


Hình 1.6. Danh pháp (IUPAC 1976 và non-IUPAC) của cynarin và acid chlorogenic

Mặc dù cynarin không phải là thành phần chính nhưng lại được chú ý nhất bởi vì có nhiều tác dụng sinh học như lợi mật và bảo vệ gan ^{45,46,47,48,49}. Một số nghiên cứu cho rằng cynarin không phải là chất nguyên thủy trong Actisô mà là một chất được tạo thành từ sự đồng phân hóa của acid 1,5-diCQA trong quá trình chiết xuất với nước ở nhiệt độ cao ^{7,50,51,52,53}. Do vậy, hàm lượng cynarin trong hoa đầu hoặc lá khô Actisô rất thấp hoặc không tìm thấy ⁶. Ngược lại, cynarin lại được tìm thấy với hàm lượng đáng kể trong các cao chiết hoặc các chế phẩm có chứa cao chiết Actisô ⁵³.

Bảng 1.2. Cấu trúc của các hợp chất acid phenol trong Actisô

STT	Tên hợp chất	Cấu trúc	CTPT (KLPT)	BPD	TLTK										
Dẫn xuất acid hydroxy benzoic															
1	Acid syringic (1)		C ₉ H ₁₀ O ₅ (198,17)	Lá	33										
2	Acid syringic- <i>O</i> -hexosid (2)		C ₁₅ H ₁₉ O ₁₀ (360,31)	Hoa (lõi)	54										
3	Acid vanillic (3)	<table><tr><th>R₁</th><th>R₂</th><th>R₃</th><th>R₄</th><th>Chất</th></tr><tr><td>H</td><td>OCH₃</td><td>OH</td><td>OCH₃</td><td>(1)</td></tr></table>	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Chất	H	OCH ₃	OH	OCH ₃	(1)	C ₈ H ₈ O ₄ (168,14)	Lá	33
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Chất											
H	OCH ₃	OH	OCH ₃	(1)											
4	Acid salicylic- <i>O</i> -hexosid (4)	<table><tr><td>H</td><td>O-ose</td><td>OH</td><td>OCH₃</td><td>(2)</td></tr><tr><td>H</td><td>OCH₃</td><td>OH</td><td>H</td><td>(3)</td></tr></table>	H	O-ose	OH	OCH ₃	(2)	H	OCH ₃	OH	H	(3)	C ₁₃ H ₁₅ O ₈ (300,26)	Hoa (lõi)	54
H	O-ose	OH	OCH ₃	(2)											
H	OCH ₃	OH	H	(3)											
5	Acid protocatechuic-4- <i>O</i> -β-hexosid (5)	<table><tr><td>O-ose</td><td>H</td><td>H</td><td>H</td><td>(4)</td></tr><tr><td>H</td><td>OH</td><td>O-ose</td><td>H</td><td>(5)</td></tr></table>	O-ose	H	H	H	(4)	H	OH	O-ose	H	(5)	C ₁₃ H ₁₅ O ₉ (316,26)	Hoa (lõi)	54
O-ose	H	H	H	(4)											
H	OH	O-ose	H	(5)											
Dẫn xuất acid hydroxycinnamic															
6	Acid caffeic (6)		C ₉ H ₈ O ₄ (180,16)	Hoa, lá	33,54										
7	Acid caffeoyl hexose (7)		C ₁₅ H ₁₇ O ₉ (342,30)	Hoa, lá	33,54										
8	Acid <i>p</i> -coumaric (8)	<table><tr><th>R₁</th><th>R₂</th><th>R₃</th><th>R₄</th><th>Chất</th></tr><tr><td>H</td><td>OH</td><td>OH</td><td>H</td><td>(6)</td></tr></table>	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Chất	H	OH	OH	H	(6)	C ₉ H ₇ O ₃ (164,05)	Hoa, lá	33,54
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Chất											
H	OH	OH	H	(6)											
9	<i>p</i> -coumaryl glucose (9)	<table><tr><td>H</td><td>OH</td><td>O-ose</td><td>H</td><td>(7)</td></tr><tr><td>H</td><td>H</td><td>OH</td><td>H</td><td>(8)</td></tr></table>	H	OH	O-ose	H	(7)	H	H	OH	H	(8)	C ₁₅ H ₁₇ O ₈ (312,31)	Hoa, lá	33,54
H	OH	O-ose	H	(7)											
H	H	OH	H	(8)											
10	Acid ferulic (10)	<table><tr><td>H</td><td>H</td><td>O-glc</td><td>H</td><td>(9)</td></tr><tr><td>H</td><td>H</td><td>OH</td><td>OCH₃</td><td>(10)</td></tr></table>	H	H	O-glc	H	(9)	H	H	OH	OCH ₃	(10)	C ₁₀ H ₁₀ O ₄ (194,18)	Hoa, lá	33,54
H	H	O-glc	H	(9)											
H	H	OH	OCH ₃	(10)											
11	1-CQA (11)		C ₁₆ H ₁₇ O ₉ (354,31)	Hoa, lá	33,54										
12	3-CQA (12)														

STT	Tên hợp chất	Cấu trúc	CTPT (KLPT)	BPD	TLTK																																								
	(A. neochlorogenic)																																												
13	4-CQA (13) (A. cryptochlorogenic)																																												
14	5-CQA (14) (A. chlorogenic)																																												
15	1,3-diCQA (15) (Cynarin)	<table><tr><th>R₁</th><th>R₂</th><th>R₃</th><th>R₄</th><th>Chất</th></tr><tr><td>Caf^e</td><td>H</td><td>H</td><td>H</td><td>(11)</td></tr><tr><td>H</td><td>Caf</td><td>H</td><td>H</td><td>(12)</td></tr><tr><td>H</td><td>H</td><td>Caf</td><td>H</td><td>(13)</td></tr><tr><td>H</td><td>H</td><td>H</td><td>Caf</td><td>(14)</td></tr><tr><td>Caf</td><td>Caf</td><td>H</td><td>H</td><td>(15)</td></tr><tr><td>Caf</td><td>H</td><td>Caf</td><td>H</td><td>(16)</td></tr><tr><td>Caf</td><td>H</td><td>H</td><td>Caf</td><td>(17)</td></tr></table>	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Chất	Caf ^e	H	H	H	(11)	H	Caf	H	H	(12)	H	H	Caf	H	(13)	H	H	H	Caf	(14)	Caf	Caf	H	H	(15)	Caf	H	Caf	H	(16)	Caf	H	H	Caf	(17)	C ₂₅ H ₂₃ O ₁₂ (516,45)	Hoa, lá	33,54
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Chất																																									
Caf ^e	H	H	H	(11)																																									
H	Caf	H	H	(12)																																									
H	H	Caf	H	(13)																																									
H	H	H	Caf	(14)																																									
Caf	Caf	H	H	(15)																																									
Caf	H	Caf	H	(16)																																									
Caf	H	H	Caf	(17)																																									
16	1,4-diCQA (16)	H	Caf	H	H	(12)																																							
17	1,5-diCQA (17)	H	H	Caf	H	(13)																																							
18	3,4-diCQA (18)	H	H	H	Caf	(14)																																							
19	3,5-diCQA (19)	Caf	Caf	H	H	(15)																																							
20	4,5-diCQA (20)	Caf	H	Caf	H	(16)																																							
		Caf	H	H	Caf	(17)																																							
21	3- <i>p</i> -coumaroylquinic (21)	H	Caf	Caf	H	(18)	C ₁₆ H ₁₇ O ₈ (338,31)	Hoa, lá	33,54																																				
		H	Caf	H	Caf	(19)																																							
22	A. 3-feruloylquinic (22)	H	H	Caf	Caf	(20)																																							
		H	Co ^f	H	H	(21)	C ₁₇ H ₁₉ O ₉ (368,33)	Hoa, lá	33,54																																				
23	A. 3- <i>p</i> -coumaroyl-4-caffeoylquinic (23)	H	Fe ^k	H	H	(22)																																							
		H	Co	Caf	H	(23)																																							
							C ₂₅ H ₂₃ O ₁₁ (500,45)																																						

^e Caffeoylquinic acid;^f Coumaroylquinic acid;^k Feruloylquinic acid

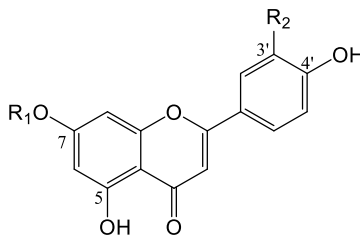
1.2.1.2. Flavonoid

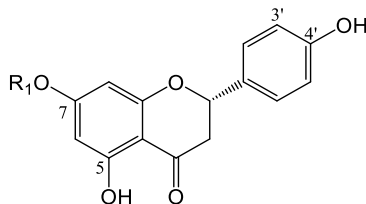
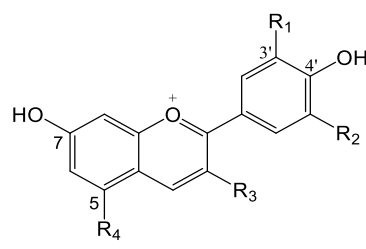
Thành phần polyphenol của ALE đã được xác định có khoảng 10 % flavonoid. Các flavonoid này thuộc khung flavon (hợp chất **24 - 35**), chủ yếu là các dẫn xuất của luteolin, apigenin và các anthocyanidin (cyanidin, peonidin và delphinidin) (hợp chất **38 - 51**) (**Bảng 1.3**). Một số hợp chất thuộc khung flavanon (naringenin và /hoặc hesperetin) (hợp chất **36 - 37**) cũng đã được xác định. ^{7,37,14,33,55}

Các flavon có trong cả lá và hoa đầu Actisô, trong khi các anthocyanidin chỉ có trong hoa đầu. Hàm lượng các flavon giảm theo độ tuổi của hoa, trong khi hàm lượng anthocyanidin tăng cao hơn ở hoa trưởng thành ⁵⁶. Flavon glycosid được xác định trong lá và hoa đầu Actisô gồm cynarosid (**25**); scolymosid (**26**); cosmosid (**30**) và isorhoifolin (**31**). Các anthocyanin chính được xác định là cyanidin 3,5-diglucosid (**41**), cyanidin 3-*O*- β -glucosid (**44**), cyanidin 3,5-malonyldiglucosid (**45**) và cyanidin

3-(3''-malonyl) glucosid (**46**). Một số hợp chất anthocyanidin khác với hàm lượng thấp gồm cyanidin 3-sophorosid (**42**), cyanidin malonylglucosid (**48**), cyanidin malonyldiglucosid (**43**), delphinidin glycosid (**47**), cyanidin 3-(6''-malonyl) glucosid (**50**), peonidin 3-*O*- β -glucosid (**49**) và peonidin 3-(6''-malonyl) glycosid (**51**) đã được xác định^{27,53}. Tổng hàm lượng anthocyanin dao động từ 8,4 - 1.705 mg/kg (khối lượng khô)^{14,33}. Trong số các flavonoid, các dẫn xuất luteolin là nhiều nhất. Đặc biệt, cynarosid (**25**) có nhiều trong lá của tất cả các giống cây Actisô.⁵⁷

Bảng 1.3. Cấu trúc của các hợp chất flavonoid trong Actisô

Stt	Tên hợp chất	Cấu trúc	CTPT (KLPT)	BPD	Tài liệu						
Khung flavon											
1	Luteolin (24)		C ₁₅ H ₉ O ₆ (286,24)	Lá, hoa	7,37,14, 33,55						
2	Luteolin-7- <i>O</i> -glucosid (cynarosid) (25)		C ₂₁ H ₁₉ O ₁₁ (448,37)	Lá, hoa							
3	Luteolin-7- <i>O</i> -rutinosid (scolymosid) (26)		C ₂₇ H ₂₉ O ₁₅ (594,52)	Lá, hoa							
4	Luteolin-7- <i>O</i> - glucuronid (27)		C ₂₁ H ₁₇ O ₁₂ (462,36)	Lá, hoa	7,37,14, 33,55						
5	Luteolin-7- <i>O</i> - glucuronid (1→6)- glucosid ^a (28)	<table><tr><th>R₁</th><th>R₂</th><th></th></tr><tr><td>H</td><td>OH</td><td>(24)</td></tr></table>	R ₁	R ₂			H	OH	(24)	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₇ (624,12)	Lá, hoa
R ₁	R ₂										
H	OH	(24)									
6	Apigenin (29)	glc	OH	(25)	C ₁₅ H ₉ O ₆ (270,05)	Lá, hoa					
7	Apigenin-7- <i>O</i> -glucosid (cosmosid) (30)	rutinose	OH	(26)	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₀ (432,38)	Lá, hoa	7,37,14, 33,55				
8	Apigenin-7- <i>O</i> -rutinosid (isorhoifolin) (31)	glucuronic	OH	(27)	C ₂₇ H ₂₉ O ₁₄ (578,52)	Lá, hoa					
9	Apigenin-7- <i>O</i> -glucuronid (32)	glucuronic-glc	OH	(28)	C ₂₁ H ₁₇ O ₁₁ (446,36)	Lá, hoa					
10	Apigenin-7- <i>O</i> - (6'acetyl) glucosid (33)	H	H	(29)	C ₂₃ H ₂₁ O ₁₁ (474,12)	Lá, hoa					
		glc	H	(30)							
11	Apigenin 4'- <i>O</i> -β-D- glucosid 7- <i>O</i> -β-D- glucuronid (34)	rutinose	H	(31)	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₆ (624,12)	Lá, hoa	14,33				
		glucuronic	H	(32)							
12	Cynarotriosid (35)	(6'acetyl) glc	H	(33)	C ₂₇ H ₂₇ O ₁₆ (624,12)	Lá, hoa	14,33				
		glucuronic	O-glc	(34)							
		rutinose	glc	(35)	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀ (756,67)	Lá, hoa	14,33				
Khung flavanon											
13	Naringenin-7- <i>O</i> - rutinosid (Narirutin) (36)				C ₂₇ H ₃₁ O ₁₄ (580,53)	Lá, hoa	7,37,14, 33,55				

Stt	Tên hợp chất	Cấu trúc	CTPT (KLPT)	BPD	Tài liệu																																																																											
14	Naringenin-7- <i>O</i> -glucosid (37)	 <table><tr><th>R₁</th><th>Chất</th></tr><tr><td>rutinose</td><td>(36)</td></tr><tr><td>glucose</td><td>(37)</td></tr></table>	R ₁	Chất	rutinose	(36)	glucose	(37)	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₀ (434,39)	Lá, hoa	14,33,37																																																																					
R ₁	Chất																																																																															
rutinose	(36)																																																																															
glucose	(37)																																																																															
Khung anthocyanidin																																																																																
15	Cyanidin (38)		C ₁₅ H ₁₁ O ₆ (287,24)	Hoa	14,33																																																																											
16	Peonidin (39)		C ₁₆ H ₁₃ O ₆ (301,27)	Hoa	14,33																																																																											
17	Delphinidin (40)		C ₁₅ H ₁₁ O ₇ (338,69)	Hoa	14,33																																																																											
18	Cyanidin 3,5-diglucosid (41)		C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆ (611,52)	Hoa	14,33																																																																											
19	Cyanidin 3-sophorosid (42)	<table><tr><th>R₁</th><th>R₂</th><th>R₃</th><th>R₄</th><th></th></tr><tr><td>OH</td><td>H</td><td>OH</td><td>OH</td><td>(38)</td></tr><tr><td>OCH₃</td><td>H</td><td>OH</td><td>OH</td><td>(39)</td></tr><tr><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>OH</td><td>(40)</td></tr><tr><td>OH</td><td>H</td><td>O-glc</td><td>O-glc</td><td>(41)</td></tr><tr><td>OH</td><td>H</td><td>O-so</td><td>OH</td><td>(42)</td></tr><tr><td>O-mglc</td><td>H</td><td>O-mglc</td><td>OH</td><td>(43)</td></tr><tr><td>OH</td><td>H</td><td>O-glc</td><td>OH</td><td>(44)</td></tr><tr><td>OH</td><td>H</td><td>O-mglc</td><td>O-mglc</td><td>(45)</td></tr><tr><td>OH</td><td>H</td><td>O-3''mglc</td><td>OH</td><td>(46)</td></tr><tr><td>OH</td><td>OH</td><td>O-glc</td><td>OH</td><td>(47)</td></tr><tr><td>OH</td><td>H</td><td>O-mglc</td><td>OH</td><td>(48)</td></tr><tr><td>OCH₃</td><td>H</td><td>O-glc</td><td>OH</td><td>(49)</td></tr><tr><td>OH</td><td>H</td><td>O-6''mglc</td><td>OH</td><td>(50)</td></tr><tr><td>OCH₃</td><td>H</td><td>O-6''mglc</td><td>OH</td><td>(51)</td></tr></table>	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		OH	H	OH	OH	(38)	OCH ₃	H	OH	OH	(39)	OH	OH	OH	OH	(40)	OH	H	O-glc	O-glc	(41)	OH	H	O-so	OH	(42)	O-mglc	H	O-mglc	OH	(43)	OH	H	O-glc	OH	(44)	OH	H	O-mglc	O-mglc	(45)	OH	H	O-3''mglc	OH	(46)	OH	OH	O-glc	OH	(47)	OH	H	O-mglc	OH	(48)	OCH ₃	H	O-glc	OH	(49)	OH	H	O-6''mglc	OH	(50)	OCH ₃	H	O-6''mglc	OH	(51)	C ₂₇ H ₃₁ O ₁₆ (611,52)	Hoa	14,33
R ₁	R ₂	R ₃	R ₄																																																																													
OH	H	OH	OH	(38)																																																																												
OCH ₃	H	OH	OH	(39)																																																																												
OH	OH	OH	OH	(40)																																																																												
OH	H	O-glc	O-glc	(41)																																																																												
OH	H	O-so	OH	(42)																																																																												
O-mglc	H	O-mglc	OH	(43)																																																																												
OH	H	O-glc	OH	(44)																																																																												
OH	H	O-mglc	O-mglc	(45)																																																																												
OH	H	O-3''mglc	OH	(46)																																																																												
OH	OH	O-glc	OH	(47)																																																																												
OH	H	O-mglc	OH	(48)																																																																												
OCH ₃	H	O-glc	OH	(49)																																																																												
OH	H	O-6''mglc	OH	(50)																																																																												
OCH ₃	H	O-6''mglc	OH	(51)																																																																												
20	Cyanidin malonyldiglucosid ^e (43)		C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄ (535,43)	Hoa	14,33																																																																											
21	Cyanidin 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucosid (44)		C ₂₁ H ₂₁ O ₁₁ (449,38)	Hoa	14,33																																																																											
22	Cyanidin 3,5-malonyldiglucosid (45)		C ₃₃ H ₃₅ O ₂₂ (697,16)	Hoa	14,33																																																																											
23	Cyanidin 3-(3''-malonyl) glucosid (46)		C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄ (535,40)	Hoa	14,33																																																																											
24	Delphinidin-3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glycosid (47)		C ₂₁ H ₂₁ O ₁₂ (465,40)	Hoa	14,33																																																																											
25	Cyanidin malonylglucosid (48)		C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄ (535,40)	Hoa	14,33																																																																											
26	Peonidin 3- <i>O</i> -β- <i>D</i> -glucosid (49)		C ₂₂ H ₂₃ O ₁₁ (463,40)	Hoa	14,33																																																																											
27	Cyanidin 3-(6''-malony) glucosid (50)		C ₂₄ H ₂₃ O ₁₄ (535,40)	Hoa	14,33																																																																											
28	Peonidin 3-(6''-malonyl) glycosid (51)		C ₂₅ H ₂₅ O ₁₄ (549,50)	Hoa	14,33																																																																											

^achưa xác định thứ tự liên kết của đường; ^b chưa xác định vị trí liên kết

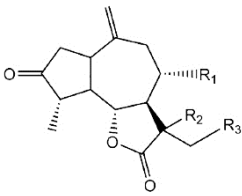
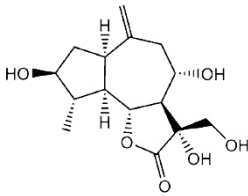
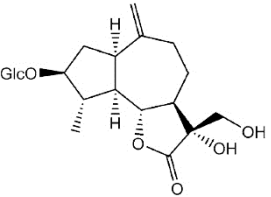
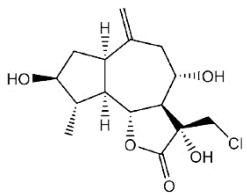
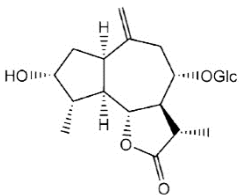
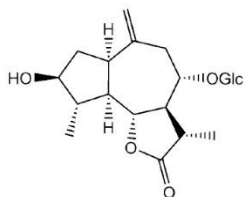
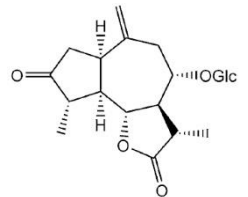
1.2.2. Sesquiterpen lacton

Vị đắng đặc trưng của Actisô chủ yếu là do sự hiện diện của các sesquiterpen lacton thuộc khung guaianolid. Các sesquiterpen lacton này đã được xác định gồm

khoảng 17 hợp chất (52-68) được trình bày ở **Bảng 1.4**. Trong đó, hai thành phần chính được tìm thấy là cynaropicrin (52) và grosheimin (54). Cynaropicrin là chất tạo vị đắng chủ yếu của lá Actisô^{58,59,60,61,62,63}. Vị đắng giảm rõ rệt nếu cấu trúc của các sesquiterpen lacton này mất đi các exomethylen hoặc mở vòng lacton⁵⁸. Cynaropicrin được tìm thấy nhiều nhất ở lá non hay lá ở ngọn và lá trưởng thành; thấp hơn ở lá già và đế hoa; không phát hiện ở lá bắc ngoài, rễ, hoa trưởng thành và quả.^{33,35}

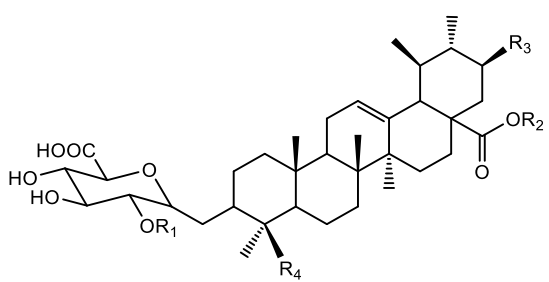
Bảng 1.4. Các dẫn xuất sesquiterpen lacton trong Actisô

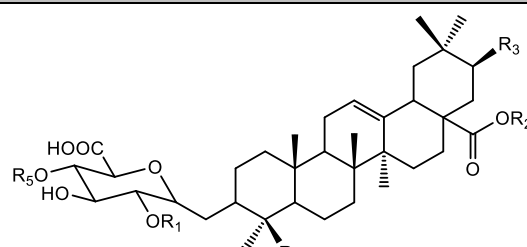
STT	Hợp chất	Cấu trúc	CTPT (KLPT)	BPD	Tài liệu
1	Cynaropicrin (52)		C ₁₉ H ₂₂ O ₆ (346,4)	Rễ, thân, hoa, lá	58,59, 60,61, 63,62,
2	Dehydrocynaropicrin (53)		C ₁₉ H ₂₀ O ₆ (344,4)	Phân trên mặt đất	61
3	Grosheimin (54)		C ₁₅ H ₁₈ O ₄ (262,3)	Phân trên mặt đất, lá	58,59, 60,61, 63
4	Cynaratriol (55)		C ₁₅ H ₂₂ O ₅ (282,3)		61,62
5	8-Epigrosheimin (56)		C ₁₅ H ₁₈ O ₄ (262,3)	Lá	64
6	Aguerin A (57)		C ₁₉ H ₂₄ O ₅ (332,4)	Phân trên mặt đất, lá	61,62
7	Aguerin B (58)		C ₁₉ H ₂₂ O ₅ (330,4)		
8	11β,13-Dihydrodesacylcynaropicrin-8-β-D-glucosid (59)		C ₂₁ H ₃₀ O ₉ (426,5)	Lá	58,61
9	8-Deoxy-11,13-dihydroxygrosheimin (60)		C ₁₅ H ₂₀ O ₅ (280,1)	Lá	61,62
10	8-Deoxy-11-hydroxy-13-chlorogrosheimin (61)		C ₁₅ H ₁₉ ClO ₅ (298,7)	Lá	61,64

11	Grosulfeimin (62)		$C_{16}H_{22}SO_7$ (358,2)	Lá	61,64
12	3 β ,8 α ,11 β ,13-Tetrahydroxy-10(14)-guaien-1 α ,4 β ,5 α ,6 β -H-6 α ,12-olid (63)		$C_{15}H_{22}O_6$ (298,4)	Lá	61
		61 $R_1=H$ $R_2=OH$ $R_3=Cl$ 62 $R_1=OH$ $R_2=H$ $R_3=SO_2CH_3$	63		
13	Cynarinin A (64)		$C_{15}H_{20}O_6$ (296,3)	Lá	61,62
14	Cynarinin B (65)		$C_{15}H_{19}ClO_5$ (314,7)	Lá	61,62
15	Cynarascolosid A (66)		$C_{21}H_{32}O_9$ (428,5)	Phần trên mặt đất, lá	32,58, 62,61
16	Cynarascolosid B (67)		$C_{21}H_{32}O_9$ (428,5)	Phần trên mặt đất	61,62
17	Cynarascolosid C (68)		$C_{21}H_{30}O_9$ (426,5)	Phần trên mặt đất, lá	32,58, 62,61

1.2.3. Saponin triterpen

Bảng 1.5. Cấu trúc của các saponin triterpen trong Actisô

STT	Hợp chất	Cấu trúc	CTPT (TPHH)	BPD	Tài liệu
Khung ursan					
1	Cynarasaponin A (69)		$C_{47}H_{74}O_{18}$ (927,1)	Toàn cây	14,65
2	Cynarasaponin B (70)		$C_{43}H_{68}O_{13}$ (792,4)	Toàn cây	14,65
3	Cynarasaponin C (71)		$C_{42}H_{66}O_{15}$ (811,0)	Toàn cây	14,65
4	Cynarasaponin D (72)		$C_{47}H_{74}O_{19}$ (943,0)	Toàn cây	14,65

STT	Hợp chất	Cấu trúc					CTPT (TPHH)	BPD	Tài liệu	
5	Cynarasaponin E (73)	Ara ^a	Glc ^b	H	CH ₃	69	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₅ (811,0)	Toàn cây	14,65	
		Ara	H	H	CH ₃	70				
6	Cynarasaponin F (74)	H	Glc	H	CH ₃	71	C ₄₁ H ₆₄ O ₁₄ (780,9)	Toàn cây	14,65	
		Ara	Glc	H	CH ₂ OH	72				
7	Cynarasaponin G (75)	H	CH ₃	H	CH ₂ OH	73	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₉ (943,0)	Toàn cây	14,65	
		Ara	H	OH	CH ₃	74				
		Ara	Glc	OH	CH ₃	75				
Khung oleanan										
8	Cynarasaponin H (76)						C ₄₇ H ₇₄ O ₁₈ (927,1)	Toàn cây	14,65	
9	Cynarasaponin I (77)						C ₄₁ H ₆₄ O ₁₄ (780,9)	Toàn cây	14,65	
10	Cynarasaponin J (78)	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	C ₄₇ H ₇₄ O ₁₉ (943,1)	Toàn cây	14,65	
		Ara	Glc	H	CH ₃	H				76
11	Chikusetsu IV (79)	Ara	H	OH	CH ₃	H	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₄ (795,0)	Toàn cây	65	
		Ara	Glc	OH	CH ₃	H				78
		H	Glc	H	CH ₃	Ara				79

^a Arabinose ^b Glucose

Khoảng 11 hợp chất saponin triterpen (**69 - 79**) đã được xác định trong Actisô (**Bảng 1.5**). Trong đó, 7 saponin thuộc khung ursan (cynarasaponin A→G) và 4 saponin thuộc khung oleanan (cynarasaponin H→J) lần đầu tiên được phân lập từ phần trên mặt đất của cây Actisô vào năm 1988⁶⁵. Khác với sesquiterpen lacton các cynarasaponin có hàm lượng thấp ở lá nhưng cao hơn ở thân và lá bắc^{33,35}.

1.2.4. Các thành phần khác

Một số hợp chất lignan trong lá Actisô được xác định là các dẫn xuất của pinoresinol gồm: 1-hydroxypinoresinol 1-*O*-β-D-glucosid, pinoresinol 4-*O*-β-D-glucosid, pinoresinol acetylhexosid, (+)-pinoresinol. Tinh dầu cũng đã được tìm thấy trong hoa đầu và lá Actisô^{33,66,67}. Trong lá, các acid béo được xác định chủ yếu là các dẫn xuất của acid hexadecanoic, acid octadecatrienoic, acid hydroxy-

octadecatrienoic, acid hydroxy-9,12,15-octadecatrienoic và acid octadecadienoic, ...³². Một số loại enzym cũng được tìm thấy trong Actisô như oxidase, peroxidase, cynarase, ascorbinase và ribulose-1,5-diphosphat carboxylase³³. Ngoài ra, Actisô chứa hàm lượng vitamin C cao cùng các vitamin khác như vitamin A, vitamin nhóm B, acid folic và nhiều acid amin^{39,68}. Các thành phần chính được xác định là các β -selinen (40%) và caryophyllen (19%).^{33,66,67}

Phần ăn được của hoa đầu Actisô có hàm lượng inulin cao, chủ yếu nằm trong đế hoa (khoảng 75 % tổng glucid)^{37,1,69}.

1.3. Tác dụng sinh học

1.3.1. Các tác dụng sinh học *in vitro* và *in vivo*

a. Tác dụng chống oxy hóa

Shabnam S. và cộng sự (2019) đã phân tích tổng hợp các nghiên cứu về tác dụng chống oxy hóa của Actisô bao gồm 2 nghiên cứu trên người, 23 nghiên cứu *in vivo* và 14 nghiên cứu *in vitro*. Kết quả cho thấy các nghiên cứu *in vitro* đã giúp khẳng định cho tác dụng chống oxy hóa của ALE. Các nghiên cứu *in vivo* cũng cho thấy việc bổ sung ALE giúp làm tăng superoxid dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathion (GSH) và glutathion peroxidase (GPx), và làm giảm malondialdehyd (MDA) trong gan và huyết tương của động vật bị bệnh so với nhóm chứng³⁴. Phân tích này đã cung cấp bằng chứng thuyết phục về hoạt động chống oxy hóa của Actisô trên *in vitro* và *in vivo*. Hoạt tính chống oxy hóa của ALE phụ thuộc vào liều và có lợi trong điều trị các bệnh về gan tốt hơn so với các bệnh khác⁷⁰. Hai thử nghiệm lâm sàng liên quan đến hoạt tính chống oxy hóa vẫn chưa đủ mạnh do cỡ mẫu nhỏ nên cần có thêm dữ liệu để khẳng định chắc chắn hơn.

Về cơ chế tác động, Actisô có tác động ức chế quá trình peroxy hóa lipid và loại bỏ các gốc tự do bằng cách hoạt động như chất khử, chất cho hydro, và chất chelat hóa kim loại cũng như điều hòa tín hiệu tế bào phụ thuộc ROS tại một số vị trí quan trọng⁷¹. Hiệu quả điều hòa có thể là do ngăn chặn các gốc tự do và ROS liên quan đến các protein kinase, phosphatase và các yếu tố phiên mã khác nhau⁷². Actisô

có thể cải thiện hệ thống bảo vệ chống oxy hóa và bảo vệ cholesterol khỏi quá trình bị oxy hóa^{73,74,75,76}. Ngoài ra, ALE có thể ức chế stress oxy hóa khi tế bào người hoặc động vật tiếp xúc với chất độc cũng như bị kích thích bởi các tác nhân tạo ra các loại oxy phản ứng^{34,73,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88}.

Về các yếu tố ảnh hưởng đến tác dụng chống oxy hóa của Actisô, hoạt tính chống oxy hóa khác nhau ở bộ phận dùng và tùy vào giai đoạn sinh trưởng và các giống cây Actisô⁸⁹. Bên cạnh đó, việc chế biến cũng làm ảnh hưởng đến hoạt tính chống oxy hóa của chúng. Cụ thể, khả năng chống oxy hóa của Actisô được ghi nhận tăng lên đáng kể sau khi hấp (gấp 15 lần) và luộc (tăng đến 8 lần)⁵⁴. Sự thay đổi hoạt tính chống oxy hóa đặc biệt là trên thử nghiệm thu dọn gốc tự do DPPH được chứng minh có liên quan đến polyphenol toàn phần với hệ số tương quan Pearson ($r = 0,87$) tương đối cao hơn các thử nghiệm khác³⁴. Do vậy, hàm lượng polyphenol trong Actisô càng cao thì ALE thể hiện hoạt tính chống oxy hóa càng mạnh.

b. Tác dụng bảo vệ gan

Elsayed E. G. và cộng sự (2020) đã nghiên cứu tác động bảo vệ gan của dịch chiết ethanol 70 % của ALE (300 mg/kg), silymarin (200 mg/kg) và ALE (300 mg/kg) + silymarin (200 mg/kg) trên 40 con chuột bị tổn thương gan do paracetamol. Kết quả điều trị trong 2 tuần bằng ALE và silymarin đều giúp làm giảm đáng kể trọng lượng gan và men gan so với nhóm chứng. Sự kết hợp giữa hai loại thuốc làm tăng tác dụng bảo vệ gan thể hiện qua kết quả làm giảm tổn thương gan và bình thường hóa cấu trúc mô học của gan⁹⁰. ALE với liều tương tự (300 mg/kg) cũng đã được chứng minh làm giảm ALT, AST và ALP xuống mức bình thường trên mô hình chuột bị nhiễm độc chì^{81,91} và mô hình chuột bị tổn thương gan do CCl₄ với liều sử dụng là 1,5 g/kg × 2 tuần. Hơn nữa, kết quả cũng cho thấy hàm lượng MDA giảm, superoxid dismutase (SOD) và catalase (CAT) tăng đáng kể. Cơ chế được chứng minh là do ALE làm giảm mức độ phân mảnh DNA, p53 và caspase 3 đáng kể nên giúp sửa chữa tổn thương DNA đối với độc tính gan do CCl₄ gây ra⁹².

Tác động bảo vệ gan chống lại độc tính CCl₄ của cynarin, acid caffeic và cynarosid có trong ALE cũng đã được báo cáo. Trong đó, cynarin thể hiện tác động

ở liều 3 mg/ml (giảm 19 % GOT / 28 % GPT so với nhóm chứng). Ở liều thấp hơn (0,01 và 0,1 mg/ml) chỉ giảm GOT nhưng GPT không bị ảnh hưởng. Các tác động của cynarin và acid caffeic được cho là do tính chống oxy hóa của các hợp chất này, ngăn cản quá trình oxy hóa phospholipid trên màng tế bào gan do CCl₄. Tác động bảo vệ gan của acid caffeic ở liều 1 mg/ml (giảm 22 % GOT / 35 % GPT). Cuối cùng, cynarosid giúp làm giảm GOT ở liều 0,01 mg/ml (thấp hơn 16 % so với nhóm chứng)⁹³. Nghiên cứu liên quan cấu trúc của các dẫn xuất CQA đối với tác động bảo vệ gan cũng đã được chứng minh, cho thấy nhóm caffeoyl có vai trò quan trọng và không có mối tương quan với vị trí gắn của nhóm caffeoyl trên khung acid quinic⁹⁴.

c. Tác dụng lợi mật

Lưu lượng mật được gia tăng đáng kể ($p < 0,001$) ở chuột Wistar sau khi điều trị ngăn ngày bằng ALE với liều 200 và 400 mg/kg so với nhóm chứng. Độ pH của dịch mật có sự khác biệt đáng kể ($p < 0,01$) giữa các nhóm chứng so với nhóm điều trị bằng dehydrocholic (DHCA) và ALE (400 mg/kg). Nồng độ acid mật tăng đáng kể sau khi chuột được điều trị ngăn ngày và dài ngày với ALE. Nói chung, hiệu quả tăng tiết acid mật do ALE gây ra rõ rệt hơn nhiều so với hiệu quả của DHCA.⁹⁵

Preziosi và cộng sự (1959) đã quan sát thấy mối liên quan giữa liều lượng và hoạt động lợi mật của cynarin: 15 - 30 mg/kg cynarin làm tăng bài tiết mật tương tự như khi dùng Na-dehydrocholat với liều tương đương. Ở liều cao hơn của cynarin (75 - 100 mg/kg), làm tăng sự bài tiết mật cao hơn 130 %, và do đó làm gia tăng đào thải cholesterol trong mật⁹⁶.

d. Tác dụng trên tim mạch

ALE (100 µg/ml) và cao chiết (100 µg/ml) thu được từ lacc phân bố với ethyl acetat - butanol (2:1) được chứng minh làm tăng sản xuất nitric oxid (NO) dẫn đến làm giãn mạch máu ở các tế bào nội mô động mạch. Thử nghiệm cũng chứng minh rằng luteolin và cynarosid (3 - 30 µM) có tác dụng làm tăng hoạt tính của eNOS trong tế bào EA.hy 926 người được nuôi cấy. Sự điều hòa tổng hợp eNOS này có liên quan đến việc giảm hoạt hóa tiểu cầu⁹⁷, cải thiện chức năng nội mô, tăng lưu lượng máu

não và ngăn ngừa đột quỵ^{98,99}. Tuy nhiên, việc sản xuất quá nhiều NO bởi iNOS có thể dẫn đến độc tế bào góp phần tăng phản ứng viêm, giảm khả năng co bóp và giảm tính đáp ứng của cơ tim với các tác nhân β -adrenergic. Các sesquiterpen lacton (cynaropicrin và grosheimin) được chứng minh có tác dụng ức chế biểu hiện iNOS mạnh với $IC_{50} = 1,2$ và $3,5 \mu M$.¹⁰⁰

Ngoài ra, ALE đã được chứng minh làm giảm mức cholesterol huyết tương của chuột hamster có chế độ ăn chứa ALE (4,5 g/kg) trong 42 ngày theo cơ chế liên quan đến việc tăng tiết acid mật trong phân và sterol trung tính. Trong đó, ở chuột đực và cái đều có cholesterol toàn phần thấp hơn đáng kể (15 %), cholesterol LDL (30 %) và triglycerid (15 - 22 %) so với nhóm chứng. Acid mật toàn phần và sterol trung tính tăng đáng kể (50 % và 53 %) trong mẫu phân của con đực; 82,4 % và 25 % ở con cái so với nhóm chứng¹⁰¹. Nghiên cứu cũng chứng minh cynarosid và aglycon của nó là luteolin có vai trò quan trọng cho tác động ức chế cholesterol máu¹⁰¹. Ngoài ra, luteolin cũng ngăn chặn hiệu quả tác động của insulin đối với quá trình sinh tổng hợp cholesterol. Bên cạnh đó, luteolin và cynarosid làm giảm đáng kể ROS do LDL gây ra ở 20 hoặc 50 mM¹⁰². Nhờ các tác dụng làm hạ lipid huyết, chống oxy hóa và làm tăng quá trình phiên mã của các gen tổng hợp nitric oxid nội sinh đã góp phần hỗ trợ điều trị các vấn đề tim mạch của dược liệu Actisô.

e. Tác dụng trên hệ tiêu hóa

Trên mô hình *in vivo*, cao chiết lá Actisô với liều 125 - 500 mg/kg được chứng minh có khả năng chống lại tác hại của ethanol trên hệ tiêu hóa. Mặt khác, ở liều 1000 - 2000 mg/kg, Actisô có thể ngăn cản tổn thương niêm mạc dạ dày do stress gây ra¹⁰³. Cynarin trong Actisô giúp tăng tiết mật, trợ tiêu hóa, tăng cảm giác thèm ăn^{104,105}

Cao lá Actisô còn có hiệu quả làm giảm các triệu chứng rối loạn dạ dày - ruột như: Khó tiêu, trướng bụng, buồn nôn, đau bụng. Đặc biệt phần dịch chiết dichloromethan cho thấy có hiệu quả nhất (IC_{50} 0,49 - 1,77 mg/ml). Thành phần có hoạt tính được xác định là sesquiterpen lacton cynaropicrin (IC_{50} là 0,049 - 0,086 mg/ml) mạnh hơn 14 lần so với phần dịch chiết dichloromethan toàn phần và có hiệu lực tương tự với papaverin. Kết quả này đã minh chứng cho việc sử dụng phổ biến

Actisô để điều trị rối loạn tiêu hóa, và khuyến khích các nghiên cứu mới về hợp chất này, nhằm thu được các chất chống co thắt mới.¹⁰⁶

f. Tác dụng kháng viêm

Trên mô hình *in vitro*, dịch chiết lá Actisô có khả năng ức chế AKR1B1 (enzym thuộc họ aldo-keto reductase) do đó có hoạt tính kháng viêm với $IC_{50} = 5,122 \mu\text{g/ml}$ (chứng dương quercetin $IC_{50} = 4,473 \mu\text{g/ml}$)⁸⁵. Trên *in vivo*, tác dụng kháng viêm của ALE được chứng minh qua thực nghiệm gây phù chân chuột do carrageenan gây ra. Chuột được điều trị bằng cách tiêm phúc mô với cao chiết ethanol của lá Actisô (400 mg/kg) và indomethacin (10 mg/kg). Kết quả cho thấy ALE làm giảm phù nề 17,3 % trong 1 giờ đầu tiên ($p < 0,001$) so với nhóm tham chiếu (Indo) và phần trăm ức chế viêm 44,27 % so với nhóm chứng. Sau năm giờ điều trị, tỉ lệ này tăng lên 735 % và 832 %. Tỷ lệ fibrinogen giảm đáng kể ($p < 0,01$) ở nhóm dùng indomethacin (16,55 %) và nhóm dùng ALE (22,90 %) so với nhóm không điều trị; mức CRP (C-reactive protein) ở 2 nhóm này cũng giảm đáng kể ($p < 0,001$) tương ứng là 60,86 % và 34,23 % so với nhóm chứng bệnh lý. Những kết quả này cho thấy dịch chiết ethanol của lá Actisô có hiệu quả mạnh mẽ tương tự như indomethacin. Tác dụng này được cho là do luteolin có hoạt tính ức chế sự thành lập COX-2, PGE2, lipopolysaccharid (LPS), xanthin oxidase, lipoxygenase, và TNF- α ^{107,108}.

1.3.2. Các thử nghiệm lâm sàng

a. Điều trị khó tiêu, đầy hơi, hội chứng ruột kích thích

ALE có tác dụng làm giảm đáng kể các triệu chứng ruột kích thích IBS (Irritable bowel syndrome) bao gồm đau bụng, sinh bụng, đầy hơi và táo bón. Các triệu chứng này có thể trùng lặp với bệnh khó tiêu, đầy hơi^{109,110,111}.

Nghiên cứu của Walker A. F. và cộng sự (2001) về khảo sát thuốc sau khi bán ra thị trường (post-marketing surveillance study), một nhóm bệnh nhân ($n = 279$) với các triệu chứng IBS đã được chọn từ một cơ mẫu gồm 533 bệnh nhân ở Đức. Các bệnh nhân này được điều trị với viên Hepar-SL-forte của Đức (320 mg ALE, uống 2 viên $\times$ 3 lần/ngày). Sau 6 tuần điều trị cho thấy ALE làm giảm đáng kể mức độ nghiêm

trọng của các triệu chứng gồm đau bụng, đầy hơi và táo bón. Sự cải thiện ở mức độ “tốt” đến “rất tốt” có ý nghĩa thống kê đã được đánh giá bởi cả bệnh nhân (96 %) và bác sĩ (84 %) ¹⁰⁹. Hiệu quả cải thiện triệu chứng IBS trên lâm sàng cũng được ghi nhận bởi nghiên cứu của Holtmann G. (2003) ¹¹⁰ trên 247 bệnh nhân và nhóm nghiên cứu Bundy R. (2004) ¹¹¹ trên 208 bệnh nhân dùng 1 - 2 viên nang Cynara™ của công ty Lichtwer Pharma - Anh mỗi ngày, có chứa 320 mg ALE.

b. Điều trị rối loạn lipid huyết

Tác dụng hạ lipid huyết của ALE được chứng minh qua ít nhất 19 thử nghiệm lâm sàng từ năm 2000 - 2020 ^{70,76,112,113,114,115,116,117,118,119,120}. Trong đó, 14 thử nghiệm được phân tích tổng hợp. Đối tượng nghiên cứu gồm 960 người (505 người nhóm can thiệp và 455 người nhóm đối chứng) ở độ tuổi từ 18 - 70, gồm những người bị tăng cholesterol máu, không hoặc có kèm các bệnh lý khác như tăng huyết áp, đái tháo đường type 2, viêm gan nhiễm mỡ có hoặc không do rượu (NASH hoặc NAFLD), tăng huyết áp, thừa cân và béo phì, rối loạn đường huyết lúc đói, bệnh thận mãn tính,... ALE được dùng với liều từ 50 - 2.700 mg/ngày, 5 - 12 tuần, trong đó liều có tác dụng là 500 - 1.800 mg/ngày. Nhìn chung, kết quả cho thấy cao chiết ALE làm giảm đáng kể triglycerid, cholesterol toàn phần và cholesterol LDL; không ảnh hưởng đến cholesterol HDL. Kết quả cho thấy việc bổ sung Actisô có thể giúp ngăn ngừa bệnh tim mạch bằng cách làm giảm lipid máu. Tuy nhiên, hiệu quả điều trị còn phụ thuộc vào chất lượng của chế phẩm và mức độ rối loạn lipid máu của người bệnh. ¹²¹

c. Điều trị tăng huyết áp

Tác động hạ huyết áp của ALE được chứng minh trên 8 thử nghiệm lâm sàng ngẫu nhiên có đối chứng gồm 512 người với các bệnh lý khác nhau như tăng huyết áp ^{119,122}; bệnh viêm gan không do rượu ^{112,123,124,125}; bệnh đái tháo đường type 2. Kết quả cho thấy ALE chỉ ảnh hưởng đáng kể đến huyết áp ở bệnh nhân bị cao huyết áp được điều trị bằng ALE với liều 100 - 500 mg/ngày có thể làm giảm huyết áp tâm thu (HATT) (-3,19 mmHg) và huyết áp tâm trương (HATTr) (-2,33 mmHg). Tuy nhiên, việc dùng Actisô cần ít nhất 12 tuần để giảm HATTr. ¹²⁶

Các tác động hạ huyết áp của Actisô cũng có thể liên quan đến tác dụng hạ cholesterol máu của ALE. Ngoài ra, Actisô có các đặc tính chống lại stress oxy hóa thông qua việc giảm trong sản xuất các ROS nội bào và giảm LDL trong tế bào người. Vì stress oxy hóa đã được xem là một trong những nguyên nhân chính trong cơ chế bệnh sinh của bệnh tăng huyết áp. Bên cạnh đó, luteolin và cynarosid đã được chứng minh làm tăng hoạt động vùng khởi động gen cũng như tăng biểu hiện mRNA của eNOS, dẫn đến sự gia tăng sản xuất nitric oxid (NO). Thiếu hụt NO góp phần làm tăng HA, vì vậy sự gia tăng NO có thể giúp khắc phục những ảnh hưởng này ¹²⁶.

d. Điều trị viêm gan nhiễm mỡ không do rượu (NAFLD)

Tác động bảo vệ gan của ALE trên người bị NAFLD đã được thực hiện trên 90 bệnh nhân điều trị bằng metformin (1.000 mg/ngày), vitamin E (400 UI/ngày) và ALE (800 mg/ngày) và chia ngẫu nhiên thành ba nhóm gồm metformin-vitamin E (**ME**), metformin-ALE (**MA**) và vitamin E-ALE (**EA**). Sau 12 tuần điều trị, tỷ lệ ALT và AST giảm đáng kể ở cả 3 nhóm ($p < 0,05$). Kết quả siêu âm gan cho thấy tỷ lệ tích tụ mỡ của bệnh nhân giảm đáng kể trong tất cả các nhóm nghiên cứu và đặc biệt là nhóm **MA** (23,3 %). Nhìn chung, việc sử dụng đồng thời ALE với vitamin E và metformin làm giảm men gan tốt hơn so với việc sử dụng đồng thời metformin với vitamin E và cải thiện các biến chứng ở bệnh nhân NAFLD ¹²³. Một số nghiên cứu lâm sàng khác cũng cho kết quả tương tự gồm thử nghiệm trên 60 người bị NAFLD (2.700 mg/ngày $\times$ 12 tháng) ¹¹²; trên 100 người NAFLD (600 mg/ngày $\times$ 2 tháng) ¹²⁴.

Tác dụng có lợi của ALE đối với bệnh NAFLD được cho là do tác động làm giảm cholesterol và triglycerid ^{127,128}, tăng độ nhạy insulin ^{129,130}, tăng tổng hợp acid mật ⁹⁵, giảm hoạt tính của HMG-CoA (enzym xúc tác sinh tổng hợp cholesterol) ¹³¹, và chống oxy hóa ^{80,88,132}. Các hoạt tính này là của luteolin, acid chlorogenic, acid caffeic và các dẫn xuất của chúng. Ngoài ra, luteolin làm giảm hấp thu cholesterol bằng cách ức chế protein Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1) - một protein có trong biểu mô đường tiêu hóa và tế bào gan giúp hấp thụ cholesterol, cho thấy những tác dụng đặc biệt có lợi trong điều trị viêm gan NAFLD ¹³³.

1.3.3. Độc tính

Lá Actisô thường được coi là một loại thuốc thảo dược an toàn và đã được cho phép sử dụng điều trị chứng khó tiêu được chấp nhận bởi German Commission E monographs - Ban cố vấn khoa học phê duyệt các chất và sản phẩm từ thảo dược sử dụng trong y học cổ truyền ¹³⁴. Trong các thử nghiệm lâm sàng, liều ALE thường dùng từ 200 - 600 mg/ngày, kéo dài từ 6 - 12 tuần cho người từ 18 - 70 tuổi, trong đó cũng có một số nghiên cứu sử dụng với liều khá lớn 1.250 - 2.700 mg/ngày, tuy nhiên ALE cho thấy khả năng dung nạp tốt và tỷ lệ các tác dụng phụ nhẹ và rất ít, thậm chí có một số tác dụng tích cực được báo cáo ^{70,75,76,112,113,114,115,116,117,118,119,120,135}.

Cao lỏng Actisô (gồm 70 % lá và 30 % hoa, nguyên liệu tươi được chiết xuất với nước, cô đến cao lỏng) khi dùng đường uống trong 4 tuần liên tục với 2 mức liều 0,2 g/kg/ngày và liều cao gấp 5 lần (1,0 g/kg/ngày) không gây độc tính bán trường diễn trên chuột cống trắng thông qua nghiên cứu thực nghiệm của Phạm Thị Vân Anh cho thấy không ảnh hưởng đến tình trạng chung, thể trọng, các chỉ số huyết học, chức năng gan, thận và mô bệnh học gan thận trên chuột cống trắng ¹³⁶. Liều gây chết trung bình (Medium Lethal dose - LD₅₀) qua đường uống và tiêm phúc mô của cao chiết ethanol từ lá Actisô ở chuột lần lượt là 1,0 và 2,0 g/kg thể trọng. Liều gây chết trung bình của cynarin bằng đường uống ở chuột là 1,9 g/kg. Đối với tiêm phúc mô, cynarin với liều từ 50 - 400 mg/kg mỗi ngày, trong vòng 15 ngày, nhận thấy không tạo ra bất thường nào về đại thể, huyết học hoặc sinh hóa ở chuột. Tuy nhiên, ở liều 100 - 400 mg/kg tiêm phúc mô trong 40 ngày làm tăng trọng lượng cơ thể và thận của chuột, và gây ra một số thoái hóa ở gan. Gần đây, một đánh giá trên ALE cho thấy không có tác dụng gây đột biến gen trên tế bào chuột nuôi cấy. Tuy nhiên, ở liều 2,0 g/kg, hoạt động gây đột biến gen bắt đầu được quan sát thấy ¹³⁷.

1.4. Phương pháp phân tích các polyphenol trong Actisô

1.4.1. Một số tiêu chuẩn kiểm nghiệm Actisô

a. Tiêu chuẩn Dược điển Việt Nam V (ĐĐVN V)

Các tiêu chuẩn kiểm nghiệm về mặt hóa học cho lá và cao đặc Actisô theo ĐĐVN V được tóm tắt ở **Bảng 1.6** ¹³⁸

Bảng 1.6. Các tiêu chuẩn kiểm nghiệm lá và cao Actisô theo ĐDVN V

Yêu cầu	Lá khô Actisô (<i>Cynarae folium</i>)	Cao đặc Actisô (<i>Cynarae folii extractum siccum</i>)
Định tính	Phản ứng hóa học: - Mẫu: Dịch chiết EtOH 96 % - DT flavonoid: Không - DT polyphenol: NaNO ₂ 10 %	Phản ứng hóa học: - Mẫu: Dịch chiết EtOH 96 % - DT flavonoid: Phản ứng cyanidin - DT polyphenol: NaNO ₂ 10 %
	Sắc ký lớp mỏng: - Thử: Dịch chiết EtOH 96 % - Chuẩn: Cynarin - Dung môi: Butyl acetat - nước - AF (14 : 5 : 5)	Sắc ký lớp mỏng: - Thử: Dịch chiết EtOH 60 % - Chuẩn: Cynarin - Dung môi: EA - nước - AF khan - AA khan (100 : 10 : 5 : 5)
Cẩn^b	Không	≤ 3 %
Độ tro	≤ 15 %	≤ 35 %
Độ ẩm	≤ 13 %	≤ 20 %
Định lượng	Đo quang: - Thử: Chiết với EtOH 96 %, rửa bằng chì acetat, giải phóng phenol bằng H ₂ SO ₄ , đo quang ở 325 nm. - Chuẩn: Cynarin “Được liệu phải chứa không ít hơn 0,1 % hoạt chất tính theo cynarin”¹³⁸	Đo quang: - Thử: Hòa tan cao trong nước, rửa bằng chì acetat, giải phóng phenol bằng H ₂ SO ₄ , đo quang ở 325 nm. - Chuẩn: Cynarin “Hàm lượng cynarin (C₂₅H₂₄O₁₂) không được nhỏ hơn 2,5 % tính theo chế phẩm khô kiệt”¹³⁸

AF: Acid formic; AA: Acid acetic; DT: Định tính; ^bCẩn không tan trong nước

Nhận xét: Về tiêu chuẩn lá khô Actisô, chỉ tiêu “cynarin” trong định tính là chưa phù hợp với Dược điển các nước trên thế giới (Anh, Pháp, Ý, Châu Âu), cũng như so với một số nghiên cứu đã công bố về hàm lượng hoạt chất này trong lá Actisô. Vì các nghiên cứu trước đây đã báo cáo rằng cynarin không tồn tại tự nhiên trong lá Actisô, hợp chất này chủ yếu được tạo ra bằng cách đồng phân hóa 1,5-diCQA trong quá trình chiết xuất lá tươi Actisô ở nhiệt độ cao^{7,50,51,52,53}. Do đó, cynarin không phát hiện được hoặc có hàm lượng rất thấp trong lá khô Actisô, ngược lại trong các chế phẩm Actisô đều có sự xuất hiện cynarin với hàm lượng đáng kể^{6,53,8}. Chính vì vậy, Dược điển Châu Âu chỉ yêu cầu chỉ tiêu về acid chlorogenic - thành phần chủ yếu trong lá Actisô. Về chỉ tiêu “định lượng hoạt chất tính theo cynarin” cho thấy quy trình chuẩn bị mẫu phức tạp nên độ lặp lại và độ phục hồi của phương pháp không cao, hơn nữa thuốc thử chì acetat không an toàn. Ngoài ra, phương pháp định lượng

chưa tiếp cận với phương pháp hiện đại như HPLC được sử dụng phổ biến hiện nay của Dược điển các nước trên thế giới. **Về tiêu chuẩn cao đặc Actisô**, chỉ tiêu về định tính và định lượng “cynarin” trong cao đặc Actisô là phù hợp vì đây là thành phần đặc trưng và có hoạt tính sinh học cao hiện diện trong các cao chiết Actisô đã được chứng minh qua nhiều nghiên cứu ^{93,139,96}. Tuy nhiên, về chỉ tiêu định lượng cynarin bằng phương pháp so màu có độ chọn lọc không cao do các đồng phân của cynarin (di-CQA) và mono-CQA đều cho cùng phổ UV và có độ hấp thụ cực đại tại 325 nm.

b. Tiêu chuẩn Dược điển Châu Âu (EP 10.0)

Các tiêu chuẩn kiểm nghiệm cho lá và cao đặc Actisô theo Dược điển Châu Âu (EP 10.0) tương tự như Dược điển Anh, Pháp và Ý được tóm tắt ở **Bảng 1.7** ¹⁴⁰.

Bảng 1.7. Các tiêu chuẩn kiểm nghiệm lá và cao Actisô theo EP 10.0

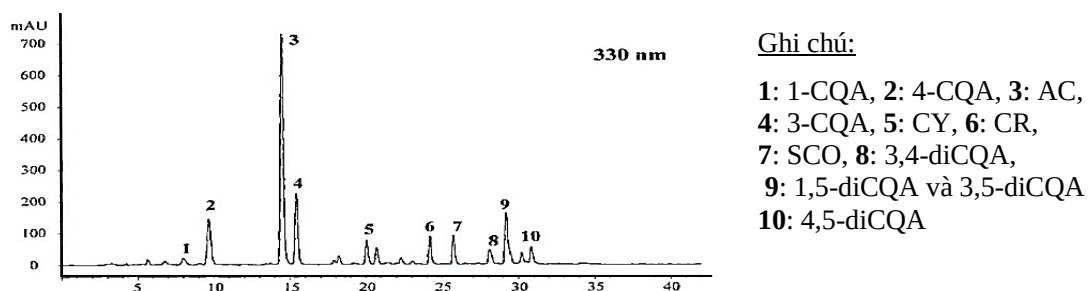
Yêu cầu	Lá khô Actisô (<i>Cynarae folium</i>)	Cao khô Actisô ^a (<i>Cynarae folii extractum siccum</i>)
Định tính	Phản ứng hóa học: Không	Phản ứng hóa học: Không
	Sắc ký lớp mỏng: - Thử: Dịch chiết EtOH 60 % - Chuẩn: Acid chlorogenic, cynarosid - Dung môi: EA - nước - AF khan - AA khan (100 : 27 : 11 : 11)	Sắc ký lớp mỏng: - Thử: Dịch chiết EtOH 60 % - Chuẩn: Acid chlorogenic, cynarosid - Dung môi: EA - nước - AF khan - AA khan (100 : 27 : 11 : 11)
Độ tro	≤ 20 %	≤ 30 %
Độ ẩm	≤ 12 %	≤ 6 %
Định lượng	HPLC: - Thử: Chiết với MeOH, 70 °C, 1h - Chuẩn: Acid chlorogenic (AC) - Hàm lượng AC: ≥ 0,8 %	HPLC: - Thử: Hòa tan cao với MeOH 70 % - Chuẩn: Acid chlorogenic (AC) - Hàm lượng AC: ≥ 0,6 %

Nhận xét: Các chỉ tiêu acid chlorogenic - một thành phần chính trong lá và cao Actisô cả về mặt định tính và định lượng là hoàn toàn phù hợp. Ngoài ra, định lượng acid chlorogenic bằng HPLC là phương pháp hiện đại có độ tin cậy cao, cho kết quả hàm lượng khá chính xác. Tuy nhiên, dược điển Châu Âu không yêu cầu kiểm nghiệm cynarin - một thành phần đặc trưng, quan trọng và có nhiều tác dụng sinh học như tác dụng chống oxy hóa, lợi mật, hạ lipid và bảo vệ gan tốt hơn so với acid chlorogenic đã được chứng minh ^{6,8,53,89}.

1.4.2. Các phương pháp phân tích đồng thời nhiều polyphenol trong ALE

Häusler M. và cộng sự (2002) đã định lượng tổng các mono-CQA; tổng di-CQA và tổng flavonoid trong cao Actisô bằng phương pháp HPLC-DAD-MS, trình tự rửa giải của các polyphenol trong lá Actisô đã được xác định (**Hình 1.7.**). Đây là công trình nghiên cứu đầu tiên sử dụng kỹ thuật phân tích hiện đại để phân tích các polyphenol trong Actisô. Nghiên cứu này đã phân tách được 10 polyphenol nhưng chưa tách được hai đồng phân 1,5- và 3,5-diCQA. Wang M. và cộng sự (2003) cũng đã xây dựng quy trình định lượng 7 polyphenol trong lá Actisô bằng phương pháp HPLC-DAD-MS với thời gian phân tích ngắn (25 phút)⁸⁹. Tuy nhiên, nghiên cứu này chưa định lượng được các đồng phân 3-CQA, 4-CQA, 3,5-diCQA và 1,5-diCQA. Schütz K. và cộng sự (2004, 2006) đã định lượng 19 polyphenol trong hoa Actisô bằng HPLC-EI/MS³ với thời gian phân tích tương đối dài (90 phút)⁷. Các công trình nghiên cứu về phân tích định tính, định lượng đồng thời các polyphenol trong lá Actisô bằng các kỹ thuật sắc ký lỏng hiện đại được tóm tắt ở **Bảng 1.8.** Trong đó, nghiên cứu của Schütz K.^{7,53}, Negro D.³⁸ và Pinelli P.¹⁴¹ định lượng 14 - 19 polyphenol nhưng chỉ sử dụng 5 - 6 chất chuẩn, hàm lượng của các polyphenol riêng biệt này trong mẫu thử được tính dựa vào đường tuyến tính của các chất chuẩn có phổ UV tương đồng. Cụ thể, các dẫn xuất mono-CQA; di-CQA; dẫn xuất luteolin, apigenin và naringenin thường được tính hàm lượng theo chuẩn tương ứng lần lượt là acid chlorogenic; cynarin; cynarosid; apigenin-7-O-rutinosid và narirutin^{7,53,141}.

Tóm lại, các công bố về phương pháp định lượng đồng thời nhiều polyphenol trong Actisô từ năm 2002 - 2021 phần lớn đều áp dụng kỹ thuật HPLC với đầu dò UV kết hợp với khối phổ. Tuy nhiên, quy trình chuẩn bị mẫu (lá khô và cao Actisô) chưa được khảo sát đầy đủ các điều kiện như nhiệt độ, thời gian và thể tích dung môi.



Hình 1.7. Sắc ký đồ phân tích các hợp chất polyphenol trong cao Actisô

“Nguồn: Häusler M. et. al., 2002”³⁸

Bảng 1.8. Tóm tắt các công trình nghiên cứu phân tích các polyphenol trong Actisô bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao

STT	Năm	Đối tượng phân tích định lượng	Thiết bị	Chuẩn bị mẫu	Chương trình dung môi	^a TL
1	2002	Tổng mono-CQA, di-CQA và flavonoid trong cao khô lá Actisô	HPLC-DAD-MS Phenomenex Luna C ₁₈ (250×2 mm; 5 µm)	Thử: 80 mg cao khô Actisô + 2 ml MeOH 15 %, siêu âm 5 phút. Chuẩn: AC; CY; luteolin	A: TFA 0,03 %; B: ACN. Gradient: 10 % B → 36 % B (0,2 ml/phút).	38
2	2003	7 polyphenol (1-CQA; AC; CY; narirutin; CR; SCO; apigenin-7-rutinosid) trong lá và hoa Actisô	HPLC-PDA-MS Phenomenex ODS3 C ₁₈ (150×3,2 mm; 5 µm)	Khảo sát dung môi chiết tốt nhất là EtOH 60 % Thử: Cân 500 mg lá/1 g hoa (Bình định mức) + 70 ml MeOH 60 %, siêu âm 25 phút. Chuẩn: 7 polyphenol	A: H ₃ PO ₄ 0,2 %; B: ACN. Gradient: 6 % B, 6-30 % B (20'), 30 % B (5') (1,2 ml/phút)	89
3	2004	19 polyphenol trong hoa Actisô	HPLC-PDA-MS ⁿ Phenomenex C ₁₈ (150×3,0 mm; 4 µm)	Thử: Hoa, 4 g hoa khô + MeOH 60 %, khuấy 1 giờ, cô cạn, hòa lại trong nước, điều chỉnh pH7, điền BDM 25 ml. Tinh chế qua SPE. Chế phẩm: 1,5 g viên nén/0,7 g viên nang/4,2 g viên sủi bột + 100 ml MeOH 60 %, 1 giờ. Chuẩn: CF; AC; CY; CR; narirutin; isorhoifolin.	A: AA 0,2 %; B: AA 0,5 % - ACN (50:50). Gradient: 10-18 % B (20'), 18-24 % B (10'), 24-30 % B (15'), 100 % B (8'), 100-10 % (2') (0,4 ml/phút).	7
4	2006	19 polyphenol trong chế phẩm từ hoa Actisô .				53
5	2007	14 polyphenol (mono-CQA, di-CQA, flavonoid, succinyl di-CQA) trong lá của loài Cardoon .	HPLC-DAD-MS Phenomenex Luna C ₁₈ (150×4,6 mm; 5 µm)	Thử: 2 g lá khô + (3 × 50 ml) EtOH 70 %, pH 3,2; loại tạp với n-hexan (4 × 20 ml), chuyển BDM 25 ml. Chuẩn: AC; CY; CR; SCO; isorhoifolin	A: FA (pH = 3); B: ACN. Gradient: 0-20 % B (5'), 20-30 % B (13'), 30-100 % (12') (0,6 ml/phút).	141
6	2012	14 polyphenol trong lá và hoa Actisô của 6 kiểu gen khác nhau	HPLC-DAD-MS/MS Phenomenex Luna C ₁₈ (150×4,6 mm; 5 µm)	Thử: 0,5 g dược liệu, chiết với 5 lần thể tích aceton-ethanol-methanol (70:15:15) 1 giờ (4 °C); Bã được chiết thêm với 5 lần thể tích EtOAc trong 1 giờ (4 °C); cô cạn dịch chiết và hòa lại trong MeOH. Chuẩn: CF; AC; CY; 1,5-diCQA; CR; isorhoifolin	A: TFA 0,01 %; B: ACN-0,01 % TFA. Gradient: 10 % B (0'), 50 % B (30'), 100 % B (35') (1,0 ml/phút).	38
7	2017	6 dẫn xuất CQA (mono và di-CQA) trong chế phẩm viên nén và viên nang	HPLC-DAD C ₁₈ (250×4,6 mm; 5 µm)	Thử: 100 mg cao khô/chế phẩm + 25 ml MeOH 70 % Chuẩn: 3-CQA; 4-CQA; AC; CY; 3,5-diCQA; 4,5-diCQA	A: H ₃ PO ₄ ; B: H ₃ PO ₄ 0,5 % - ACN. Gradient: 8 % B (1'), 8-25 % B (20'), 25 % B (7'), 25-100 % B (2'), 100-8 % B (5') (1,2 ml/phút).	8
8	2021	Ảnh hưởng của việc chế biến đến hàm lượng của 31 polyphenol trong hoa Actisô .	HPLC-MS-MS Cortecs C ₁₈ (75×3 mm; 2,7 µm)	Thử: 25 mg cao ALE + 0,5 ml (MeOH 80 %, FA 0,1 %), 3 lần, siêu âm 90 phút, ly tâm, cân chiết lại với dung môi như trên, siêu âm 25 phút, ly tâm. Chuẩn: 16 polyphenol	A: FA 0,1 %; B: ACN. Gradient: 5 % B (1,2'), 11,4 % B (7,6'), 11 % B (1,2'), 28 % B (20'), 100 % B (2') (0,35 ml/phút).	142

^aTL: Tài liệu; ACN: Acetonitril; AA: Acid acetic; TFA: Acid trifluoroacetic; FA: Acid formic; BDM (bình định mức); isorhoifolin (apigenin-7-O-rutinosid)

CF (acid caffeic); AC (acid chlorogenic); CQA (caffeoylquinic acid); CY (cynarin); CR (cynarosid); SCO (scolymosid).

1.4.3. Đặc tính phổ khối của các hợp chất polyphenol trong Actisô

Những nghiên cứu gần đây đã ứng dụng kỹ thuật LC-MS/MS trong việc định tính và định lượng các thành phần hợp chất phenol trong Actisô dựa vào sự khác nhau về số khối hay phân mảnh của chúng. Các đặc tính về ion, phổ UV của các dẫn xuất acid caffeoylquinic và các flavonoid được trình bày ở **Bảng 1.9** ⁷.

Bảng 1.9. Đặc tính về ion và phổ UV của các CQA và flavonoid trong Actisô

STT	Tên hợp chất	($\lambda_{\max}$ nm)	[M-H] ⁻ (m/z)	HPLC-ESI (-)-MS ⁿ m/z (% so với pic chính)
1.	1-CQA	233, 305sh, 328	353	MS ² [353]: 191(100), 197(5), MS ³ [353→191]: 127(100), 172(79), 85(79), 93(56)
2.	3-CQA	241, 303sh, 325	353	MS ² [353]: 191(100), 179(49), 135(13), 173(3) MS ³ [353→191]: 127(100), 172(83), 85(74), 93(68)
3.	5-CQA (acid chlorogenic)	241, 305sh, 326	353	MS ² [353]: 191(100), 179(3) MS ³ [353→191]: 127(100), 85(96), 173(85), 93(72)
4.	4-CQA	236, 303sh, 326	353	MS ² [353]: 173(100), 179(53), 191(16), 135(12) MS ³ [353→173]: 93(100), 111(80)
5.	Acid caffeic	237, 302sh, 323	179	MS ² [178]: 135(100)
6.	1,3-diCQA (cynarin)	242, 307sh, 322	515	MS ² [515]: 353(100), 179 (35), 335 (34), 191 (20) MS ³ [515→353]: 191(100), 179(45), 135(11), 173(2)
7.	Cynarosid	254, 266sh, 347	461	MS ² [461]: 285(100), 357(5), 327(4), 381(2), 355(2)
8.	Acid dicaffeoylquinic	246, 303sh, 327	515	MS ² [515]: 353 (100), 203 (61), 299 (37), 255 (28) MS ³ [515→353]: 173(100), 179(50), 191(24), 135(6)
9.	3,4-diCQA	243, 303sh, 325	515	MS ² [515]: 353(100), 173(23), 179 (14), 335(11) MS ³ [515→353]: 173(100), 179(68), 191(46) MS ⁴ [515→353→173]: 173(100), 93(23), 111(17)
10.	3,5-diCQA	243, 303sh, 327	515	MS ² [515]: 353(100), 191(12), 179(5) MS ³ [515→353]: 191(100), 179(47), 353(12) MS ⁴ [515→353→191]: 191(100), 173(43), 127(26)
11.	1,5-di-CQA	243, 303sh, 329	515	MS ² [515]: 353(100), 191(34), 335(5) MS ³ [515→353]: 191(100), 179(8) MS ⁴ [515→353→191]: 191(100), 127(31), 173(25)
12.	Apigenin 7-glucuronid	231, 267, 338	445	MS ² [445]: 269(100), 175(20) MS ³ [445→269]: 269(100), 175(29)
13.	4,5-diCQA	243, 303sh, 327	515	MS ² [515]: 353(100), 173(21), 203(13), 179(10) MS ³ [515→353]: 173(100), 179(57), 191(28), 135(8) MS ⁴ [515→353→173]: 173(100), 111(21), 93(19), 71(7)
14.	Scolymosid	255, 266sh, 348	593	MS ² [593]: 285(100), 593(6), 251(76), 281(100)
15.	Luteolin 7-glucosid	253, 266sh, 347	447	MS ² [447]: 285(100), 447(4), 327(3) MS ³ [447→285]: 243(100)
16.	Apigenin 7-rutinosid	229, 266, 339	577	MS ² [577]: 269(100)
17.	Apigenin 7-glucosid	229, 266, 339	431	MS ² [431]: 269(100), 431(8), 311(4)

sh (vai) MS²: MS/MS; MS³: MS/MS-MS “Nguồn: Schütz K. et. al., 2004” ⁷

1.4.4. Hàm lượng các polyphenol trong Actisô

Hàm lượng các polyphenol trong lá Actisô: Về thành phần acid caffeoylquinic, các acid mono-CQA có hàm lượng cao nhất (0,48 - 4,24 %); kế đến là acid di-CQA (0,03 - 0,45 %); và flavonoid (0,06 - 0,52 %) ¹⁴³. Trong đó, acid chlorogenic có hàm lượng cao nhất (0,35 - 18,34 mg/g); kế đến là cynarosid (0,04 - 10,65 mg/g); cynarin rất thấp hoặc không phát hiện được (0,00 - 1,02 mg/g) ^{33,53}. Nghiên cứu của Negro và cộng sự (2012) cũng xác định acid chlorogenic và 1,5-diCQA là 2 thành phần chính trong lá Actisô nhưng 1,5-diCQA cao hơn acid chlorogenic trong cả 6 giống Actisô có thể là do dung môi chiết xuất khác nhau ³⁸. Về thành phần flavonoid, các dẫn xuất luteolin là nhiều nhất, đặc biệt là luteolin-7-glucosid (cynarosid) có nhiều trong lá của tất cả các giống Actisô. Các dẫn xuất apigenin rất thấp ở hầu hết các giống. Hàm lượng flavonoid cao hơn khi cây ở thời kỳ sinh dưỡng. Tuy nhiên, hàm lượng của chúng còn phụ thuộc vào giống cây Actisô ^{35,57} (**Bảng 1.10, Mục 1.4.5**).

Hàm lượng polyphenol trong các chế phẩm: Một số chế phẩm Actisô cũng đã được đánh giá về hàm lượng các polyphenol chính ¹⁴³. Tương tự trong lá Actisô, các acid mono-CQA là hợp chất chính trong tất cả các mẫu phân tích, đặc biệt hàm lượng của chúng trong các thực phẩm chức năng hơi cao hơn so với các dược phẩm. Trong đó, acid chlorogenic chiếm chủ yếu, kế đến là 3-CQA và 4-CQA, không phát hiện được 1-CQA. Khác với trong lá Actisô, cynarin được tìm thấy trong chế phẩm với tỉ lệ cao hơn các diCQA khác. Điều này được cho là cynarin là một chất được tạo ra bởi sự isomer hóa acid 1,5-diCQA trong quá trình chiết xuất với nước. Do vậy, có thể thấy rằng hàm lượng acid 1,5-diCQA cao hơn trong lá Actisô nhưng lại thấp hơn đáng kể ở một số chế phẩm, và cynarin thì ngược lại ⁷. Nhìn chung, qua một số nghiên cứu khác đều cho thấy hàm lượng các polyphenol của các chế phẩm rất khác nhau là do quy trình chiết xuất của mỗi chế phẩm khác nhau ^{6,7,8}.

1.4.5. Các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol

a. Mật độ trồng và số lần thu hoạch

Thử nghiệm tại Gross-Gerau trong 3 năm 2006 - 2008 cho thấy chiều cao và hàm lượng polyphenol trong cây giảm dần khi tăng mật độ trồng và số lần thu hái.

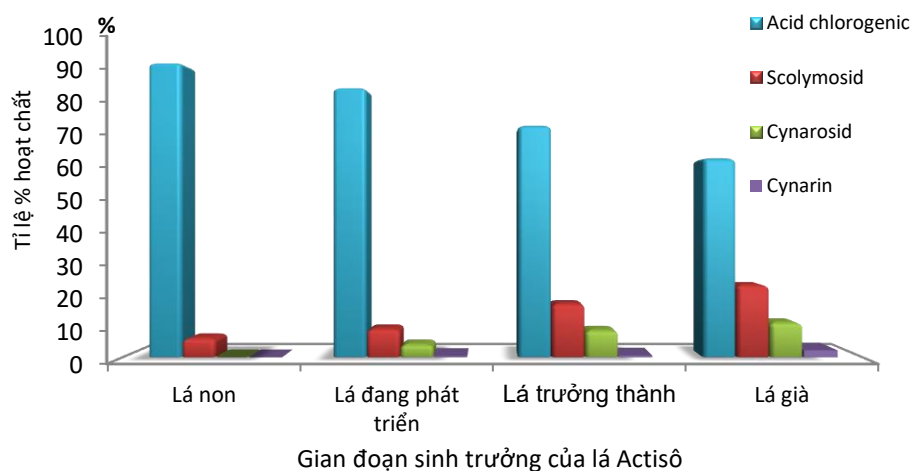
Mật độ 4 cây/m² với 3 lần thu hái trong năm cho hàm lượng polyphenol cao nhất, còn 16 cây/m² với 6 lần thu hoạch thì cho hàm lượng các chất này thấp nhất. Ngược lại, mật độ trồng và số lần thu hoạch không ảnh hưởng đến hàm lượng flavonoid ¹⁴⁴.

b. Bộ phận dùng khác nhau của Actisô

Hàm lượng CQA trong lá là cao nhất, trong khi hoa và hạt thấp hơn trong lá từ 3,5 đến 4,6 lần. Ngược lại, hàm lượng flavonoid ở lá và hạt cao hơn ở hoa ⁸. Ngoài ra, lá bắc trong có hàm lượng các CQA cao hơn so với lá bắc ngoài ¹⁴⁵.

c. Quá trình sinh trưởng của lá

Hàm lượng acid chlorogenic giảm dần trong thời kỳ sinh trưởng của lá. Ngược lại hàm lượng scolymosid, cynarosid, cynarin lại tăng dần (xem **Hình 1.8**) ¹⁴⁶.



Hình 1.8. Hàm lượng các orthodiphenolic qua các thời kỳ sinh trưởng của lá

d. Ảnh hưởng thời gian thu hái lá Actisô

Nghiên cứu của Ilde Ricci và cộng sự (2013) đã cho thấy thời gian thu hái ảnh hưởng đến chất lượng của Actisô. Thời gian thu hái tốt nhất vào khoảng những tháng lạnh nhất trong năm. Cụ thể là hàm lượng và hoạt động chống oxy hóa của các hợp chất phenolic tăng từ tháng 12 đến tháng 2 của năm ¹⁴⁷.

g. Ảnh hưởng của giống cây trồng

Hàm lượng của các polyphenol trong Actisô còn phụ thuộc vào giống và BPD của cây. Kết quả phân tích hàm lượng các dẫn xuất acid caffeoylquinic và flavonoid trong lá và hoa của 3 giống Actisô ³⁸ được trình bày ở **Bảng 1.10**.

Bảng 1.10. Hàm lượng polyphenol (% , được liệu khô) trong lá Actisô liên quan đến BPD và giống cây

Giống	Bộ phận	acid 1- caffeoylquinic	acid chlorogenic	scolymosid	cynarosid	narirutin	apigenin-7- rutinosid	cynarin	Tổng
Imperial Star	Lá ^{a,b}	0,125	4,713	0,420	0,252	0	0	1,617	7,127
Violet	Lá ^{a,b}	0,310	1,519	0,339	0,197	0	0	1,689	4,054
Violet	Lá ^{a,c}	0,740	1,429	0,345	0,186	0	0	1,471	4,170
Green Globe	Lá ^{a,b}	0,149	4,158	0,213	0,314	0	0	1,619	6,455
Green Globe	Lá ^{a,c}	0,064	4,654	0,275	0,114	0	0	0,924	6,031
Imperial Star	Hoa non ^{a,b}	0,092	0,540	0,015	0,045	0,150	0,042	0,918	1,802
Imperial Star	Hoa non ^{b,d}	0,028	0,210	0,011	0,050	0,109	0,067	0,792	1,268
Violet	Hoa non ^{b,d}	0,034	0,371	0,017	0,047	0,243	0,050	0,585	1,347
Green Globe	Hoa non ^{a,b}	0,070	0,459	0,011	0,035	0,085	0,032	0,748	1,440
Green Globe	Hoa non ^{b,d}	0,039	0,276	0,022	0,061	0,108	0,063	0,847	1,416
Imperial Star	Hoa trưởng thành ^{a,b}	0,045	0,229	0,023	0,025	0,146	0,054	0,424	0,945
Imperial Star	Hoa trưởng thành ^{b,d}	0,012	0,114	0,047	0,025	0,220	0,120	0,242	0,780
Green Globe	Hoa trưởng thành ^{a,b}	0,020	0,186	0,025	0,024	0,182	0,050	0,309	0,795
Green Globe	Hoa trưởng thành ^{b,d}	0,018	0,102	0,040	0,026	0,182	0,076	0,242	0,687

^a Thu hoạch ngày 3/10/2001; ^b sấy ở 70 °C; ^c đông khô; ^d thu hoạch ngày 5/9/2001

Chuẩn bị mẫu thử: 0,5 g lá hoặc 1 g hoa khô được chiết xuất với 70 ml methanol 60 %, siêu âm 25 phút, làm nguội và lọc, bổ sung BDM 100 ml.

“*Nguồn: Wang M. et. al., 2003*” ⁸⁹

❖ **Ảnh hưởng của việc chế biến đến hàm lượng các acid phenol trong Actisô**

Một số nghiên cứu cho thấy hàm lượng các polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa của hoa đầu Actisô tăng cao sau chế biến. Nghiên cứu của Ferracane R. và cộng sự (2008)^{51,148} và Lutz M. (2011)⁵² đều cho thấy sự thay đổi hàm lượng polyphenol trong hoa đầu Actisô khi chế biến bằng 3 phương pháp khác nhau (đun sôi, hấp và chiên). Cả 3 phương pháp sử dụng nhiệt độ đều làm tăng hàm lượng CQA toàn phần so với Actisô chưa chế biến lần lượt là 66, 94 và 71 %. Cả 5-CQA và 1,5-diCQA cũng tăng sau khi hấp hoặc chiên. Ngoài ra, nghiên cứu cũng cho thấy rõ có sự đồng phân hóa và thủy phân dẫn đến sự phân phối lại nồng độ các acid phenolic, điển hình là 3,5-diCQA và 4,5-diCQA có hàm lượng rất thấp trong Actisô lúc chưa chế biến và tăng cao sau chế biến. Tuy nhiên, nghiên cứu của Fernández M. D. và cộng sự (2021)¹⁴² cho thấy hàm lượng polyphenol toàn phần và tổng di-CQA của hoa Actisô giảm sau chế biến (xem **Bảng 1.11**) nhưng cũng cho thấy có sự sắp xếp lại hàm lượng giữa các đồng phân của mono-CQA và di-CQA, kết quả cũng cho thấy sự tăng đáng kể một số dẫn xuất di-CQA gồm 1,3-diCQA; 1,4-diCQA; 3,4-diCQA; 4,5-diCQA và giảm đáng kể hàm lượng của 5-CQA; 1,5-diCQA và 3,5-diCQA).

Bảng 1.11. Hàm lượng polyphenol (mg/g, khô) trong hoa đầu Actisô trước và sau chế biến

STT	Hợp chất	Chưa chế biến ¹	Chế biến		
			Đun sôi ²	Nướng ³	Chiên ⁴
1	1-CQA	0,652 ± 0,02 ^a	0,603 ± 0,019 ^a	0,339 ± 0,02 ^a	0,302 ± 0,011 ^a
2	3-CQA	0,186 ± 0,007 ^b	0,183 ± 0,047 ^b	0,284 ± 0,012 ^a	0,254 ± 0,004 ^a
3	4-CQA	0,053 ± 0,004 ^a	2,821 ± 0,062 ^b	0,817 ± 0,022 ^a	0,747 ± 0,407 ^a
4	5-CQA	38,653 ± 1,823 ^c	23,083 ± 1,201 ^b	15,419 ± 0,588 ^a	15,127 ± 1,771 ^a
5	1,3-diCQA (cynarin)	0,104 ± 0,001 ^a	1,628 ± 0,026 ^b	0,262 ± 0,013 ^a	0,208 ± 0,002 ^a
6	1,4-diCQA	0,093 ± 0,003 ^a	0,729 ± 0,008 ^a	0,362 ± 0,008 ^a	0,317 ± 0,001 ^a
7	3,4-diCQA	0,141 ± 0,008 ^a	1,308 ± 0,014 ^b	0,555 ± 0,01 ^{ab}	0,556 ± 0,01 ^{ab}
8	1,5-diCQA	12,583 ± 0,787 ^b	11,450 ± 0,725 ^b	9,111 ± 0,263 ^a	8,401 ± 0,717 ^a
9	3,5-diCQA	14,745 ± 0,949 ^c	4,892 ± 0,276 ^a	4,981 ± 0,333 ^a	6,399 ± 0,197 ^b
10	4,5-diCQA	0,149 ± 0,009 ^a	2,572 ± 0,004 ^c	1,280 ± 0,024 ^b	1,327 ± 0,022 ^b
11	Scolymosid	0,283 ± 0,013 ^a	0,135 ± 0,004 ^a	0,214 ± 0,010 ^a	0,281 ± 0,009 ^a
12	Cynarosid	0,305 ± 0,010 ^a	0,167 ± 0,003 ^a	0,274 ± 0,011 ^a	0,267 ± 0,010 ^a
13	Luteolin-7 glucuronid	0,132 ± 0,004 ^a	0,084 ± 0,003 ^a	0,109 ± 0,002 ^a	0,094 ± 0,003 ^a
14	Polyphenol toàn phần	69,979 ± 2,718 ^c	52,582 ± 2,203 ^b	35,653 ± 0,919 ^a	34,683 ± 2,771 ^a

¹: 25 mg Actisô tươi đông khô, thêm 0,5 ml methanol - acid formic 0,1 % (8 : 2, v/v), siêu âm 90 phút.

²: 225 g Actisô tươi, thêm 2 lít nước sôi (100 °C), đun 15 phút.

³: 225 g Actisô tươi, nướng 180 °C, 10 phút.

⁴: 225 g Actisô tươi thêm 20 lít dầu Oliu tinh luyện ở 170 °C, 7 phút.

^{a, b, c, ab}: Các giá trị có kí tự theo sau khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$).

“Nguồn: Fernández M. D. et. al., 2021”¹⁴²

1.5. Quy trình chiết xuất polyphenol từ lá Actisô

Eich và cộng sự (2004) đã đăng ký sáng chế (US 2004/0234674 A1)¹⁴⁹ về phương pháp chiết xuất làm giàu các thành phần CQA và flavonoid từ lá Actisô (tươi hoặc khô). Kết quả của sáng chế đã đề xuất các **quy trình (QT)** chiết xuất như sau:

- **Quy trình 1 (QT1):** 300 g lá Actisô được ngâm với 4,5 lít nước ở 80-90 °C (2 lần trong 5 và 3 giờ). Dịch chiết của 2 lần ngâm chứa khoảng 124 g căn khô, gộp dịch chiết và làm bay hơi đến thể tích 2,5 lít.
- **Quy trình 2 (QT2):** 300 g lá Actisô được ngâm kiệt 5 giờ ở 55-60 °C với 5 lít MeOH-nước (80:20), dịch chiết chứa 108 g chất khô, bốc hơi dịch chiết còn 1/3 thể tích và pha loãng với nước, sau đó rửa 3 lần với 500 ml dichloromethan, loại bỏ dịch chiết dung môi hữu cơ. Phần dịch chiết nước còn lại chứa 86 g căn khô.
- **Quy trình 3 (QT3):** Phần dịch chiết nước thu được ở QT1 hoặc QT2 được bốc hơi dung môi đến khoảng 1/3 thể tích và được chiết 5 lần với 500 ml ethyl acetat/2-butanol (60:40), cô thu hồi dung môi trong chân không ở 40 °C, phần cặn sau đó được sấy khô trong chân không ở 60 °C thu được 16 g cao chiết khô (**phân đoạn A**). Phần dịch chiết nước còn lại cũng được bốc hơi và sấy khô như trên thu được 61 g cao chiết khô (**phân đoạn B**).

Kết quả phân tích hàm lượng của các mono-CQA, di-CQA và flavonoid trong các cao chiết từ các quy trình chiết 1-3 được trình bày ở **Bảng 1.12**.

Bảng 1.12. Hàm lượng polyphenol trong các cao chiết thu được từ các quy trình chiết

Phương pháp chiết xuất	Cao chiết	Tổng CQA (%)	Mono-CQA (%)	Di-CQA (%)	Flavonoid (%)
Qui trình (QT) 1 + 3	Cao toàn phần	9,74	5,39	4,35	2,20
	Phân đoạn A	25,99	4,41	21,58	13,29
	Phân đoạn B	6,32	4,83	1,49	0,76
Qui trình (QT) 2 + 3	Cao toàn phần	18,84	8,32	10,52	2,79
	Phân đoạn A	47,62	6,38	41,24	10,9
	Phân đoạn B	10,38	8,12	2,26	1,41

Cao chiết phân đoạn A và B có tác dụng dược lý rất khác nhau. Cao chiết **phân đoạn A** có tác dụng ức chế sinh tổng hợp cholesterol và chống oxy hóa mạnh hơn đáng kể so với cao chiết toàn phần. Tuy nhiên, cao chiết phân đoạn A không có tác dụng hoặc tác dụng kém đối với chứng khó tiêu. Ngược lại, **cao chiết phân đoạn B** có hoạt tính trên chứng khó tiêu cao hơn cao chiết toàn phần nhưng có hoạt tính chống oxy hóa thấp hơn và không có tác dụng ức chế sự sinh tổng hợp cholesterol.

1.6. Tổng quan về dạng bào chế

Hiện nay, việc phát triển thuốc có nguồn gốc tự nhiên được các nhà nghiên cứu trên thế giới và trong nước quan tâm. Với quan điểm đông tây y kết hợp, phát triển y học cổ truyền trên cơ sở ứng dụng y học hiện đại, dạng thuốc được liệu ra đời với thành phần là các cao chiết chuẩn hóa, định chuẩn từ dược liệu dưới dạng bào chế hiện đại như viên nén, viên nang, thuốc tiêm,... góp phần hỗ trợ điều trị và điều trị hiệu quả các bệnh tật đặc biệt là các bệnh mạn tính. Việc ứng dụng các dạng bào chế hiện đại như viên bao phim, bao đường, viên sủi, viên nang, dạng bột, hỗn dịch, sirô, v.v... cho thuốc được liệu nhằm tăng cường độ hòa tan, hấp thu, sinh khả dụng, hoạt tính dược lý, tính ổn định, giảm độc tính và tăng khả năng tuân thủ góp phần nâng cao chất lượng thuốc và hiệu quả trị liệu ¹⁵⁰

Cao khô Actisô là một trong số các cao chiết từ dược liệu đã được chuẩn hóa và ứng dụng làm thuốc được liệu với nhiều dạng bào chế khác nhau dùng trị liệu các bệnh liên quan về gan mật. Từ chế phẩm đầu tiên Chophytol (Rosa – Pháp) nhập vào Việt Nam, đến nay Việt Nam có không dưới 20 loại sản phẩm chủ yếu là viên nén chứa cao chiết từ lá Actisô (**Bảng 1.13**). Tuy nhiên, ngoại trừ các doanh nghiệp uy tín, phần lớn các cơ sở sản xuất không đưa kèm chỉ tiêu cơ sở; hoặc có nhưng các chỉ tiêu đơn giản, thiếu tính khoa học của cao chiết Actisô gây khó khăn trong đánh giá chất lượng của các thành phẩm.

Bảng 1.13. Một số chế phẩm từ cao chiết lá Actisô trên thị trường Việt Nam

Stt	Sản phẩm	Dạng bào chế	Nơi sản xuất	Stt	Sản phẩm	Dạng bào chế	Nơi sản xuất
1	Boganic	Viên bao đường, Viên bao phim	Traphaco	9	Chobil, Choliver	Viên bao phim Viên bao đường	DHG Pharma
2	Actisô plus	Viên sủi, ống uống	Trường Thọ	10	Sagophytol	Cao đặc	Sapharco
3	C-Barcool	Viên sủi, Nang cứng	ADC Pharma	11	Betasiphon, centhionin	Ống uống, Nang mềm	Nadyphar
4	Altamin	Nang mềm	Bidiphar	12	Actisô PV	Nang mềm	PV Pharma
5	D-A-R	Viên bao phim	Domesco	13	B-A-R	Viên bao đường	Pharmedic
6	Hephytol	Viên bao đường	Dược phẩm trung ương 25	14	Actisô	Viên hoàn. Ống uống.	Ladophar
7	Chophytol	Viên bao đường	Rosa Phyto Pharma (Pháp)	15	Actisô Fito Actisô	Nang cứng Viên sủi	Trường Anh
8	HD Actisô	Nang mềm	HD Pharma	16	Chophytin	Viên bao đường	PP Pharco

Viên nén là một trong những dạng bào chế đường uống thuận tiện và được ưa chuộng nhất vì có nhiều ưu điểm như dễ sử dụng, bệnh nhân tuân thủ cao, dễ vận

chuyển, bảo quản và hiệu quả tốt về chi phí. Viên nén thường được bao một lớp màng mỏng polymer (bao phim) chiếm 3 - 4 % khối lượng viên nhằm tạo cảm quan đẹp, che dấu mùi vị, giúp được chất và sản phẩm ổn định, chống lại những điều kiện bất lợi như độ ẩm, ánh sáng, oxy hóa không khí,...trong quá trình lưu thông, phân phối¹⁵¹. Bên cạnh đó việc bao phim có thể kiểm soát sự giải phóng hoạt chất đến đúng vị trí, tỷ lệ và thời gian theo thiết kế¹⁵¹.

Việc bao phim cho viên nén được tiến hành trên thiết bị bao phim phù hợp (nồi bao đục lỗ) với thành phần dịch bao phim gồm polymer tạo màng phim, chất hóa dẻo, chất tạo độ đục (titan dioxit), chất màu, chất chống dính (talc, aerosol) và dung môi. Ngoài ra còn có một số chất phụ gia khác như tinh bột, natrilauryl sulphat, ...):

- Polymer tạo màng phim giúp tạo màng mỏng, liên tục bao quanh viên. Polymer phải tương thích với thành phần của viên, có độ nhớt phù hợp, hòa tan hoặc phân tán được trong dung môi bao phim thường là nước, ethanol, isopropanol, aceton, dichloromethan. Các polymer thường dùng là các dẫn chất cellulose: Hydroxypropyl methyl cellulose (HPMC) dùng chống ẩm; cellulose acetat phthalat, hydroxylpropyl methyl cellulose phthalat bao tan trong ruột; nhóm polyvinyl alcohol (PVA) dùng chống ẩm; nhóm dẫn chất acrylat (các Eudragit) như Eudragit E chống ẩm, Eudragit RS/RL 100 bao phóng thích kéo dài.¹⁵¹⁻¹⁵³

- Các chất hóa dẻo giúp hạ nhiệt độ hóa kính, làm cho màng phim bền chắc, không bị dòn, nứt gãy, bám chặt vào bề mặt viên nhân. Các chất hóa dẻo thường dùng: Alcol đa chức (polyethylen glycol, propylen glycol,...); các ester (glycerin triacetat, triethyl citrat, ...); Các glycerid (monoglycerid acetyl hóa,...); Các dầu béo (dầu thầu dầu, dầu khoáng).¹⁵¹⁻¹⁵³

Mục đích của việc bao viên nhằm bảo vệ được chất, che dấu mùi vị khó chịu, giúp dễ uống, phân biệt sản phẩm chống giả mạo, tăng độ bền cơ học, tránh nhiễm chéo trong sản xuất, cách ly các chất tương kỵ, cải thiện sinh khả dụng (viên bao tan trong ruột, viên phóng thích kéo dài, cải thiện phóng thích hoạt chất nhanh hay chậm, tạo liều khởi đầu,...). Tuy nhiên trong 3 phương pháp bao viên nén phổ biến hiện nay là bao đường, bao đập, bao phim thì bao phim cho phép đạt hầu hết các mục đích trên và là phương pháp được áp dụng phổ biến nhất hiện nay.¹⁵¹⁻¹⁵³

Chương 2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Lá Actisô (giống xanh) là nguyên liệu chính dùng trong nghiên cứu chiết xuất, phân lập, xây dựng quy trình định lượng và nghiên cứu sản xuất cao chuẩn hóa. Việc định danh và giám định tên khoa học được thực hiện bởi TS. Võ Văn Chi.

Các bộ phận dùng khác (hoa, thân, rễ, gân lá) của cả 2 giống Actisô (giống xanh và giống tím) được dùng để nghiên cứu so sánh về thành phần hóa học và tác dụng sinh học.

Các mẫu được lưu tại bộ môn Dược liệu, khoa Dược, ĐH Y Dược TPHCM.

2.2. Cỡ mẫu của nghiên cứu

Các nguyên liệu được thu hái vào các thời điểm khác nhau, phục vụ cho từng mục đích nghiên cứu, chi tiết xem ở **Bảng 2.1**.

Bảng 2.1. Các nguyên liệu dùng trong nghiên cứu

Nguyên liệu	Thời gian thu mẫu	Ghi chú
1. Chiết xuất – phân lập		
200 kg lá Actisô tươi (giống xanh), thu hái tại phường 5 - Lâm Đồng, Tp. Đà Lạt.	10/2014	Đạt tiêu chuẩn ĐĐVN V
2. Kiểm nghiệm		
2.1. Xây dựng quy trình định lượng lá Actisô: 2,0 kg lá Actisô tươi (giống xanh) thu hái tại phường 5 - Lâm Đồng, Tp. Đà Lạt. Mẫu sau khi xử lý, phơi khô còn 90 g phiến lá khô.	3/2015	
2.2. Xây dựng quy trình định lượng cao Actisô: Cao khô Actisô phun sương (kí hiệu cao BV) được cung cấp bởi công ty BV Pharma (Số lô 010114NC-1)	4/2014	Đạt tiêu chuẩn cơ sở (TCCS)
2.3. Đánh giá hàm lượng hoạt chất tích lũy theo thời gian thu hái: 1,0 kg lá Actisô tươi (giống xanh) thu hái tại phường 5 - Đà Lạt. Lá già ở gốc, chiều dài khoảng 60 cm.	6-12/2016 1-5/2017	Thu hái vào ngày 15 của mỗi tháng. Mẫu được trộn lẫn sau khi lấy tại 5 vị trí trồng cách xa nhau.
2.4. So sánh hàm lượng hoạt chất theo giống và BPD: Cả cây Actisô tươi của 2 giống (“giống xanh” - AX và “giống tím” - AT). Kí hiệu các BPD của 2 giống gồm: - Lá giống xanh (X.L) và lá giống tím (T.L): Lá già ở gốc, cách gốc cây 5 cm. - Gân lá (X.G và T.G): Gân giữa và cuống lá - Thân (X.T và T.T): Thân già ở gốc (gọi là thân đen)	3/2017	Xem hình ở Phụ lục 51 Phương pháp chuẩn bị cao chiết ở Mục 2.2.2.3

- Rễ (X.R và T.R): Rễ cây trưởng thành - Hoa (X.H và T.H): Hoa già chưa nở (toàn bộ hoa đầu)		
2.5. Định lượng các chế phẩm trà Actisô túi lọc: - 10 chế phẩm trà Actisô túi lọc được mua tại các cơ sở bán lẻ ở TP. HCM. - Lá nghiên cứu (giống xanh), kí hiệu X.LNC	5/2017 11/2016	Xem thông tin sản phẩm ở Phụ lục 52
2.6. Định lượng các chế phẩm từ cao Actisô: - 8 chế phẩm nước ngoài (Pháp, Mỹ, Đức): N.CP1-8 - 8 chế phẩm mua tại Việt nam: Kí hiệu, V.CP9-16 - 3 chế phẩm nghiên cứu: Viên bao phim chứa 200 mg cao Actisô - là sản phẩm của đề tài, NC.CP17-19	2/2020	Xem thông tin sản phẩm ở Phụ lục 53
3. Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa		
- 9 chất tinh khiết: 4 mono-CQA (1-CQA; 3-CQA; 4-CQA; AC); 3 di-CQA (CY; 1,5-diCQA; 4,5-diCQA); 2 flavonoid (CR; SCO). - 24 cao chiết tương tự ở nội dung 2.4 - 2 mẫu cao nghiên cứu (CNC): X.CNC và T.CNC		Phân lập ở Mục 3.1.1
4. Nghiên cứu chiết xuất cao Actisô		
Lá Actisô tươi được thu hái ở phường 5, 12 và Bảo Lộc, Lâm Đồng, Tp. Đà Lạt.	11/2015	
5. Nghiên cứu bào chế		
5.1. Chiết xuất cao chuẩn hóa qui mô (500 kg lá/lô): Lá Actisô của 2 giống thu hái tại phường 5, Đà Lạt	12/2015	Đạt TCCS
5.2. Bào chế viên bao phim (15.000 viên/lô): Cao chuẩn hóa - Sản phẩm của đề tài nghiên cứu Viên đối chiếu - Chế phẩm chophytol (Rosa-Pháp) chứa 200 mg cao Actisô.		Đạt TCCS

2.2.2. Dung môi, hóa chất, thuốc thử

➤ Nghiên cứu hóa học:

- Dung môi dùng trong chiết xuất và phân lập: Methanol, chloroform, ethyl acetat, *n*-butanol, acid formic đạt tiêu chuẩn tinh khiết phân tích.
- Dung môi dùng cho phân tích HPLC/UPLC hoặc HPLC bán điều chế: Acetonitril (Scharlau), acid formic (Merck), acid trifluoroacetic (Prolabo), nước cất 2 lần.
- Bản mỏng silica gel F₂₅₄ (dày 0,25 mm, Merck) trắng sẵn
- Silica gel 60 (40 - 63 µm, Merck); silica gel C₁₈ (40 × 63 µm); Sephadex LH-20.
- Thuốc thử FeCl₃ 5 %/EtOH, vanilin 1 %/acid sulfuric 10 % (VS).

- Chuẩn sơ cấp: Cynarin (96,0 %), acid chlorogenic (96,0 %) và cynarosid (96,0 %) được mua từ công ty Phytolab (Đức) (COA ở **Phụ lục 38, Phụ lục 42, Phụ lục 46**).

➤ **Thử tác dụng sinh học:**

- Chất chuẩn: Silymarin (Sigma, số lô 31K1467), acid ascorbic (Sigma, số lô A92902)
- Thử nghiệm DPPH: Thuốc thử DPPH (Sigma, số lô STBD1145V), methanol (Labscan), DMSO (Merck).
- Thử nghiệm MDA: KCl 1,15 %; đệm phosphat 50 mM, pH=7,4 (KH₂PO₄, K₂HPO₄); trichloroacetic (TCA) 10 %; acid thiobarbituric (TBA) 0,8 %.
- Động vật thí nghiệm: Chuột nhắt trắng đực khỏe mạnh, chủng *Swiss albino*, trọng lượng 25 ± 2 g, 5 - 6 tuần tuổi, được cung cấp bởi Viện Vắc xin và Sinh phẩm Y tế - TP. Nha Trang. Chuột được nuôi ổn định bằng thực phẩm viên, rau xanh và nước uống đầy đủ ít nhất 1 tuần trước khi thử nghiệm. Chuột sinh lý được mổ lấy gan dùng trong thử nghiệm MDA (malondialdehyd) (*ex vivo*).

➤ **Nghiên cứu bào chế viên nén bao phim Actisô:**

Bảng 2.2. Các tá dược dùng trong nghiên cứu bào chế

Stt	Tá dược	Tên thương mại	Xuất xứ
1	Cao khô Actisô*	Univerphytol	Cao nghiên cứu
2	Microcrystallin cellulose	MCC-102	Trung Quốc
3	Silicon Dioxid	Syloid® AL-1FP	Grace - Đức
4	Natri Croscarmellose	Vivasol® GF	JRS Pharma - Ấn Độ
5	Magnesi carbonat	Magnesium carbonate	Scora-Pháp
6	Glyceryl behenat	Compritol 888 ATO	Gattefossé - Pháp
7	Magnesi stearat	-	Trung Quốc
8	Vivacoat	-	JRS Pharma - Đức
9	Màu nâu	Fiorio colori	Ý

*Cao nghiên cứu chứa 2,6 % cynarin và 2,3 % acid chlorogenic – Đạt TCCS (Xem **Mục 3.4**)

2.3. Phương tiện nghiên cứu

Các thiết bị dùng trong chiết xuất - phân lập: Máy cô quay Büchi 20 lít - R220 và Büchi 1 lít - 210S; bể siêu âm Sonorex RK - 1028H; bếp cách thủy Memmert WB -14; máy đông khô (Martin Christ Alpha 1-4 LD); sắc ký lỏng áp suất trung bình - MPLC (Biorad, đầu dò Quadtec UV- Vis); sắc ký bán điều chế áp suất cao - semi.prep-HPLC (Shimadzu CBM-20A, đầu dò PDA); máy đo phổ hồng ngoại (IR) (Nicolet iS500 NIR-FTIR); máy đo phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (Bruker Avance 500 MHz) của Viện Hàn lâm khoa học Việt Nam - Hà Nội; máy đo khối phổ

(MS) (Micromass microTM API - Waters). Các loại cột sắc ký: Cột nhanh - VLC (7 × 40 cm), cột Sephadex LH-20 (2 × 60 cm), cột MPLC (2,5 × 50 cm), cột semi.prep-HPLC Sunfire C₁₈ (10 × 150 mm; 5 µm).

Các thiết bị dùng trong phân tích: Cân phân tích 5 số lẻ CP-2250 (Sartorius); sắc ký lỏng hiệu năng cao - HPLC (đầu dò PDA 2996, Alliance 2695 XE - Waters); sắc ký lỏng siêu hiệu năng - UPLC (đầu dò PDA, Acquity - Waters, Mỹ); máy ly tâm lạnh thường (CT15RE-Hitachi Koki); máy xác định độ ẩm bằng hồng ngoại MB-45 (Sartorius). Các loại cột sắc ký: Cột HPLC - Sunfire C₁₈ (4,6 × 250 mm; 5 µm); ThermoFisher C₁₈ (100 × 2,1 mm; 2,6 µm).

Các thiết bị dùng trong thử nghiệm sinh học: Máy đo phổ UV U-2010 (Shimadzu), máy đo pH (HI210-Hana), máy khuấy gia nhiệt (Arec-Velp), máy nghiền đồng thể (T25 Basic-IKA), máy đọc ELISA (Multiskan Ascent, Thermo electro).

Các thiết bị dùng trong chiết xuất qui mô lớn: Máy rửa dược liệu (Việt Nam), Nồi chiết xuất có áp lực 3.000 lít (Việt Nam), thiết bị cô quay tuần hoàn áp suất giảm, công suất 1.000 lít/giờ (WJ1 L-Single-effect circulation concentrator, Trung Quốc), Máy sấy phun sương công suất 50 lít/giờ (Trung Quốc).

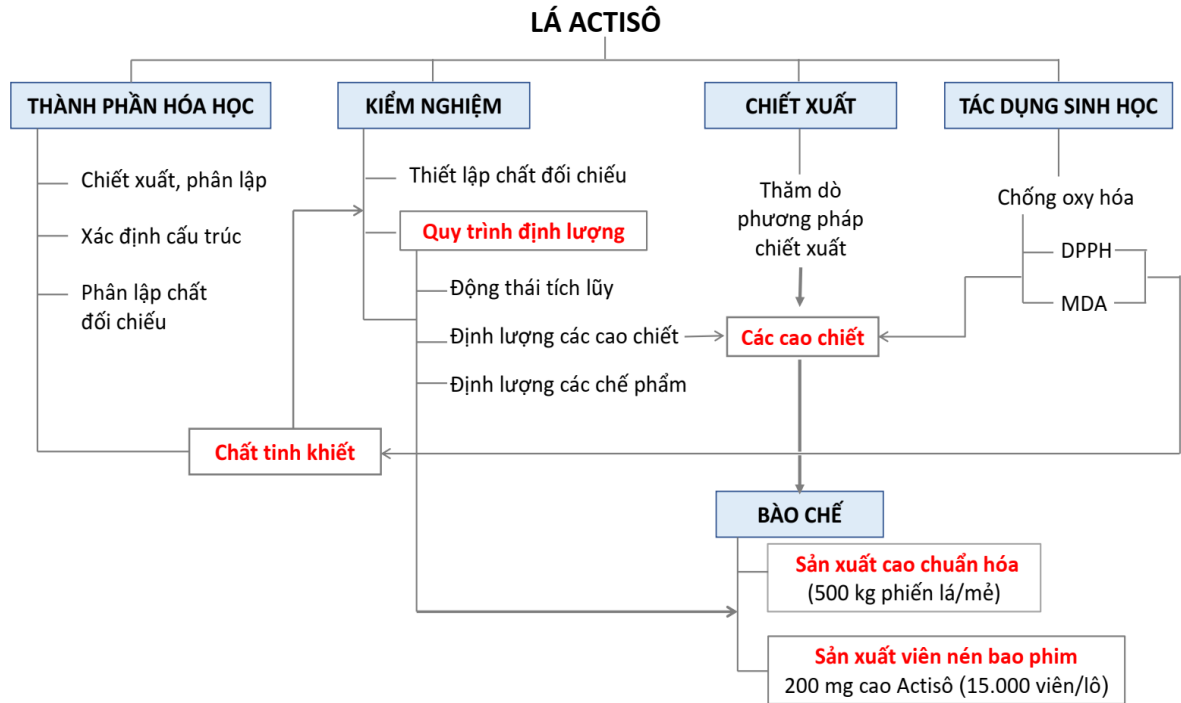
Các thiết bị trong nghiên cứu bào chế qui mô lớn: Cân phân tích 5 số lẻ (Sartorius), máy trộn chữ V 500 lít (VH500-Tianfeng, Trung Quốc), tủ sấy (Termarks), máy dập viên 27 chày, 2 lớp (Eco IV-Parle, Ấn Độ), máy bao phim tự động 150 lít (BG 150E, Trung Quốc), máy đếm viên và đóng lọ (KDV-5, Trung Quốc), máy đo tỷ trọng (Erweka), máy đo độ chảy (Erweka), cân xác định độ ẩm hồng ngoại (Sartorius), máy thử độ cứng (Erweka), máy thử độ rã (Erweka), máy thử độ mài mòn (Erweka), máy đo pH (Oakton), máy thử nghiệm độ hòa tan (Pharmatest).

2.4. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

- Khoa Dược - Đại học Y Dược TP. HCM: Các bộ môn (Dược liệu, Dược lý, Công nghiệp dược); Trung tâm Đào tạo và Nghiên cứu phát triển thuốc có nguồn gốc tự nhiên, được thực hiện từ 8/2015 – 7/2020.
- Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. HCM: Khoa Thiết lập chất chuẩn và chất đối chiếu, thực hiện vào 7/2015 – 7/2016.
- Công ty cổ phần BV Pharma: Cơ sở chiết xuất dược liệu tại phường 5, TP. Đà Lạt; Nhà máy BV Pharma - Củ Chi - TP. HCM, thực hiện vào 10/2014 và 12/2015.

2.5. Quy trình nghiên cứu

Nội dung nghiên cứu của đề tài được tóm tắt như sau:



Hình 2.1. Sơ đồ tóm tắt nội dung nghiên cứu

2.6. Phương pháp nghiên cứu và phân tích dữ liệu

2.6.1. Nghiên cứu thành phần hóa học

2.6.1.1. Chiết xuất, phân lập

a. Chiết xuất

Quy trình chiết xuất được tham khảo từ các tài liệu và được khảo sát sơ bộ một số yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng polyphenol trong lá Actisô tươi và khô với các dung môi, nhiệt độ chiết xuất,... Từ đó, quy trình được áp dụng và điều chỉnh cho phù hợp với nhu cầu và quy mô thực hiện.

Phiến lá tươi Actisô (90 kg) được rửa sạch, hấp ở 100 °C, trong 10 phút. Sau đó chiết bằng phương pháp ngâm nóng (80-90 °C) trong 4 giờ với ethanol - nước (1:1). Dịch chiết được cô thu hồi dung môi đến cao lỏng (5,2 kg), thêm nước và lắc phân bố lần lượt với chloroform (4 × 3 lít), ethyl acetat (3 × 3 lít), *n*-butanol (3 × 5 lít). Thu hồi dung môi được các cao tương ứng gồm 60 g cao chloroform (**Cf**), 30 g cao ethyl acetat (**EA**) và 90 g cao *n*-butanol (**Bu**). Kiểm tra các cao phân đoạn bằng HPLC-PDA với điều kiện đã khảo sát ở Mục 3.2.2.

b. Phân lập

Các hợp chất được phân lập chủ yếu bằng kỹ thuật sắc ký gồm sắc ký cột chân không (VLC), sắc ký lỏng áp suất trung bình (MPLC), sắc ký rây phân tử (Sephadex), các phân đoạn được tinh chế hoặc phân lập bằng sắc ký lỏng bán điều chế hiệu năng cao (semi-prep. HPLC). Các kỹ thuật được tiến hành cụ thể như sau:

Cột VLC: Mẫu được chuẩn bị trước bằng cách hòa tan hoàn toàn trong dung môi thích hợp, cho một lượng silica gel vừa đủ để mẫu có thể trộn đều vào các hạt silica gel, nghiền mịn và sấy ở 50 °C đến khi loại hết dung môi (bột khô to). Nhồi cột bằng phương pháp nhồi cột khô, khối lượng silica gel nhồi cột nhiều hơn gấp 20 - 25 lần so với khối lượng mẫu thử, sau đó cho dung môi nền chảy qua cột, hút chân không đến khi không còn dung môi. Mẫu được nạp vào cột bằng cách rắc đều mẫu lên bề mặt silica gel, triển khai lần đầu với dung môi nền, kế tiếp là chương trình pha động đã khảo sát. Cao chiết **EA** có nhiều thành phần từ phân cực đến phân cực trung bình, do đó cao này được dùng để phân tách trên cột VLC để thu được các phân đoạn đơn giản hơn.

Điều kiện cột VLC-(EA):

Cột sắc ký: 7 × 40 cm (đường kính × chiều dài), rửa sạch, sấy khô.

Pha tĩnh: 800 g silica gel (40 - 63 μm).

Pha động: CHCl₃ - EtOAc với độ phân cực tăng dần (10 : 0) → (1 : 9)

Mẫu: 30 g cao **EA**

Thể tích hứng: 250 ml

Phân tích: SKLM với hệ dung môi CHCl₃ - EtOAc - FA (2 : 8 : 0,2)

Phát hiện: UV₂₅₄ và UV₃₆₅, thuốc thử FeCl₃ 5 %/EtOH

Cột MPLC: Sắc ký lỏng áp suất trung bình được thực hiện trên hệ thống máy MPLC Biorad. Mẫu được hòa tan trong một lượng tối thiểu dung môi thích hợp và lọc qua màng lọc milipore 0,45 μm, sau đó tiêm mẫu bằng tay, lượng mẫu nạp ít hơn khối lượng pha tĩnh khoảng 25 - 50 lần tùy vào mức độ phức tạp của các thành phần có trong mẫu thử. Cài đặt chương trình pha động đã được thăm dò trước và tiến hành triển khai. Quá trình phân tách được theo dõi bởi đầu dò Quadtec UV-Vis.

Điều kiện cột MPLC-(EA-5, EA-16 và Bu):

Cột sắc ký: $2,5 \times 50$ cm (đường kính $\times$ chiều dài), rửa sạch, sấy khô

Pha tĩnh: 170 g silica gel C₁₈ (40×63 μ m)

Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1 %

Mẫu: Phân đoạn **EA-5** (2,4 g); **EA-16** (1,2 g); cao **Bu** (10 g). Nạp mẫu 1 - 2,5 g.

Chương trình pha động: Isocratic với acetonitril 15 % (**EA-5**) và gradient với tỉ lệ ở **Bảng 2.3 (Bu)** và **Bảng 2.4 (EA-16)**.

Tốc độ dòng: 10 ml/phút

Thời gian: 240 phút

Thể tích hứng: 20 ml

Bước sóng phát hiện: 254 nm và 323 nm

Bảng 2.3. Điều kiện MPLC-Bu

Phút	% ACN	% FA 0,1 %
0	8	92
4	8	92
74	15	85
104	15	85
194	30	70
224	30	70
240	100	0

Bảng 2.4. Điều kiện MPLC-EA-16

Phút	% ACN	% FA 0,1 %
0	15	85
30	15	85
70	25	75
120	25	75
180	30	70
230	30	70
240	100	0

Cột semi-prep. HPLC: Các dẫn xuất acid caffeoylquinic có nhiều đồng phân, do vậy thường không tách trên sắc ký cột cỡ điển với silica gel pha thuận, trên HPLC chúng thường có các đỉnh gần nhau (xem **Hình 3.1.**). Do vậy, kỹ thuật semi-prep. HPLC thích hợp để phân tách các hợp chất này. Kỹ thuật này được áp dụng để phân lập các hợp chất trong các phân đoạn **Bu-2, Bu-3, Bu-5** và **Bu-9**.

Điều kiện cột Semi-prep. HPLC-(Bu-2, Bu-3, Bu-5, Bu-9):

Cột sắc ký: Sunfire Prep C₁₈ (10×150 mm; 5 μ m) cho **Bu-2, Bu-3, Bu-5**;

Phenomenex Luna C₁₈ (10×250 mm; 5 μ m) cho **Bu-9**.

Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1 % (**Bu-2, Bu-3, Bu-5**);

Methanol - acid formic 0,1 % (**Bu-9**).

Mẫu: **Bu-2** (100 mg), **Bu-3** (250 mg), **Bu-5** (83,5 mg), **Bu-9** (44 mg); Hòa tan mẫu trong methanol (50 mg/ml).

Tiêm mẫu: 200 μ l.

Tốc độ dòng: 3 ml/phút.

Bước sóng phát hiện: 323 nm

Chương trình pha động: Gradient ACN từ 8 - 30 % trong 25 phút (**Bu-5**) và điều kiện cho **Bu-2, Bu-3, Bu-9** xem ở **Bảng 2.5, Bảng 2.6, Bảng 2.7.**

Bảng 2.5. Điều kiện semi-prep.HPLC-Bu-2

Phút	% ACN	% FA 0,1 %
0	8	92
10	12	88
13	12	88
15	30	70
20	8	70
25	8	0

Bảng 2.6. Điều kiện semi-prep.HPLC-Bu-3

Phút	% ACN	% FA 0,1 %
0	8	92
5	10	90
10	12	88
15	12	88
16	12,5	87,5
21	14	86
25	8	92
30	8	92

Bảng 2.7. Điều kiện semi-prep.HPLC-Bu-9

Phút	% MeOH	% FA 0,1 %
0	30	70
15	30	70
20	33	67
57	35	65
60	35	65
61	37	63
62	100	0
72	100	0

Cột sephadex: Hạt Sephadex LH-20 được ngâm trương nở trong dung môi đã chọn rồi nhồi vào cột sắc ký. Pha động triển khai là dung môi đơn hoặc hỗn hợp dung môi. Mẫu được hòa trong lượng tối thiểu với pha động và nạp mẫu. Triển khai sắc ký bằng pha động theo isocratic. Áp dụng đối với các phân đoạn **EA-6, EA-10 và EA-10.2.**

Điều kiện cột Sephadex-(EA-6, EA-10, EA-10.2):

Cột sắc ký: 2,5× 60 cm (đường kính × chiều dài)

Pha tĩnh: Sephadex LH - 20

Pha động: Methanol

Mẫu: 100 mg, hòa tan mẫu trong 1 ml methanol, lọc qua màng lọc 0,45 µm

Phân tích: SKLM với hệ dung môi CHCl₃ - EtOAc - FA (2 : 8 : 0,2)

Phát hiện: UV₂₅₄ và UV₃₆₅, thuốc thử FeCl₃ 5 %/EtOH

Kết tinh phân đoạn: Các phân đoạn có chứa một chất có hàm lượng lớn sẽ được cô thu hồi dung môi đến cạn, hoà tan cạn trong lượng vừa đủ dung môi kết tinh (methanol, ethyl acetat hoặc hỗn hợp dung môi), lọc qua phễu thủy tinh xóp. Dịch lọc được làm lạnh và cho bay hơi dung môi tự nhiên, lọc và rửa tinh thể bằng dung môi lạnh thích hợp.

Kiểm tra độ tinh khiết:

- SKLM: Các chất tinh khiết được kiểm tra trên SKLM với 3 hệ dung môi khác nhau sao cho R_f của vết phân tích ở 3 khoảng giá trị (0,3; 0,5 và 0,8), phát hiện bằng UV₂₅₄, UV₃₆₅, TT. FeCl₃ 10 %/MeOH và TT. vanilin-sulfuric. Nếu kết quả phân tích chỉ cho 1 vết trên sắc ký đồ thì được xem là tinh khiết SKLM.
- HPLC-PDA: Các chất được pha trong methanol tinh khiết (1.000 ppm) được phân tích trên HPLC ở điều kiện thích hợp với tỉ lệ dung môi methanol hoặc acetonitril tăng dần đến 100 % và chất phân tích được rửa giải ở thời gian lưu khoảng 1/3 tổng thời gian phân tích; phát hiện ở chế độ maxplot. Sử dụng công cụ tính tích phân tự động để tính hàm lượng % của chất phân tích dựa vào phần trăm diện tích đỉnh và các đỉnh này phải đạt độ tinh khiết pic (giá trị purity angle nhỏ hơn purity threshold).

c. Chiết xuất, phân lập chất đối chiếu (CĐC)

Sau khi phân lập các hợp chất tinh khiết ở **Mục 3.1.1**, dựa vào các quy trình phân lập các chất đã thực hiện bằng các kỹ thuật sắc ký để lựa chọn nguyên liệu và đưa ra quy trình phù hợp và ổn định để chiết xuất, phân lập các CĐC với khối lượng trên 500 mg và độ tinh khiết HPLC trên 95 %.

2.6.1.2. Xác định cấu trúc

Chất tinh khiết được phân tích bằng phương pháp phổ khối (MS), HPLC-PDA, NMR, so sánh đối chiếu với các dữ liệu về phổ NMR, MS của các chất tương tự đã công bố trong tài liệu.

Phổ cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) được đo trên máy BRUKER-AV-500, tại Viện hóa học thuộc Trung tâm Khoa học công nghệ Việt nam - Hà nội. Mẫu được hòa tan trong CD₃OD hoặc CD₃SOCD₃ với TMS là chất chuẩn nội. Phổ proton (¹H-NMR) được đo ở 500 MHz, phổ carbon (¹³C-NMR) được đo ở 125 MHz. Độ dịch chuyển hóa học được tính theo thang ppm ($\delta_{TMS} = 0$) với chuẩn là tín hiệu của TMS. Các hằng số ghép (*J*) tính bằng Hertz (Hz).

2.6.2. Nghiên cứu phương pháp kiểm nghiệm

2.6.2.1. Thiết lập chất đối chiếu (CĐC)

Lựa chọn các hợp chất chính có tác dụng sinh học và đã xác định cấu trúc, có khối lượng khoảng 500 mg với độ tinh khiết HPLC $\geq 95\%$, quy trình phân lập ổn định để thiết lập CĐC. Các bước thực hiện theo hướng dẫn của tài liệu do ASEAN ấn bản

về quy trình thiết lập CDC^{154,155}. Các bước tiến hành như sau:

a. Xây dựng phương pháp đánh giá nguyên liệu thiết lập CDC: Mỗi CDC được xây dựng quy trình định lượng hàm lượng phần trăm so với chuẩn gốc hay chuẩn sơ cấp của Phytolab - Đức bằng phương pháp HPLC-PDA với các điều kiện phân tích tương ứng với từng mẫu. Quy trình được khảo sát tính phù hợp của hệ thống và được đánh giá độ đúng và độ chính xác theo đúng yêu cầu của quy trình phân tích định lượng bằng HPLC theo hướng dẫn của ICH¹⁵⁶.

b. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng đánh giá nguyên liệu thiết lập CDC: Các chỉ tiêu và phương pháp thử bao gồm: Tính chất, định tính (phổ UV, IR, MS, NMR), định lượng bằng phương pháp HPLC-PDA đã xây dựng.

c. Đóng gói và đánh giá đồng nhất lô:

Đóng gói: CDC được đóng trong lọ thủy tinh nâu, khối lượng đóng mỗi lọ là 10 mg và thực hiện trong Glove-box (khí nitơ 99,99 %, độ ẩm tương đối 40 %).

Đánh giá đồng nhất lô: Tổng số lọ cần đánh giá ($\sqrt{N} + 1$, N là số lọ đóng). Mỗi lọ được phân tích hàm lượng % hai lần theo quy trình đã xây dựng ở **Mục 3.2.1.1**, lấy kết quả trung bình. Các lọ được xem là đồng nhất lô nếu có giá trị $F_{tn} < F_{lt}$ khi phân tích bằng thống kê ANOVA một yếu tố. Sau khi đóng, các ống đối chiếu được bảo quản ở nhiệt độ ổn định từ 2 - 8 °C.

Đánh giá độ đồng nhất liên phòng thí nghiệm: Sau khi lô CDC đạt yêu cầu về tính đồng nhất, chất đối chiếu được tiếp tục đánh giá đồng nhất tại hai phòng thí nghiệm (PTN) đạt GLP hoặc ISO 17025.

Mỗi PTN nhận 6 lọ CDC được lấy ngẫu nhiên cùng bộ hồ sơ (các dữ liệu phổ học, quy trình phân tích) để tiến hành phân tích. Mỗi lọ CDC được phân tích hai lần trên cùng quy trình, lấy kết quả trung bình.

e. Xác định giá trị ấn định - Giá trị công bố:

Giá trị ấn định: Được xác định từ 12 kết quả của 2 PTN tham gia đánh giá. Xử lý thống kê theo hướng dẫn của ISO 13528¹⁵⁷, các bước tiến hành như sau:

- Sắp xếp kết quả định lượng theo thứ tự tăng dần: $x_1, x_2, \dots, x_n$.
- Gọi giá trị trung bình (robust average) và độ lệch chuẩn (robust standard deviation) của các kết quả này lần lượt là x^* và s^* . Tính giá trị khởi điểm của x^* và s^* .

- Chu kỳ tính các giá trị mới của x^* và s^* được tính lặp lại đến khi các giá trị này không đổi ở số thứ ba sau dấu phẩy. Chọn x^* và s^* cuối cùng là giá trị ổn định và độ lệch chuẩn của giá trị ổn định.
- Độ không đảm bảo đo μ_x của giá trị ổn định được tính theo: $\mu_x = 1,25 \times \frac{s^*}{\sqrt{n}}$

Giá trị công bố: Được tính trên các số liệu sau khi loại các giá trị có $|z| \geq 2$.

2.6.2.2. Xây dựng quy trình định lượng

➤ **Xây dựng 3 quy trình định lượng tùy vào đối tượng nghiên cứu:**

Lá khô Actisô: Định lượng đồng thời 3 polyphenol gồm acid chlorogenic (AC), cynarosid (CR), scolymosid (SCO) bằng HPLC-PDA phục vụ cho tiêu chuẩn hóa dược liệu.

Cao khô Actisô:

- Định lượng đồng thời 4 polyphenol (AC, CY, CR và SCO) bằng HPLC-PDA phục vụ cho tiêu chuẩn hóa cao chiết, bán thành phẩm và thành phẩm.
- Định lượng đồng thời 12 polyphenol bằng UPLC-PDA phục vụ cho nghiên cứu so sánh thành phần hóa học trong các cao chiết của các BPD (lá, gân, thân, rễ, hoa) của cây Actisô và so sánh các chế phẩm từ cao Actisô trên thị trường.

➤ **Phương pháp xử lý nguyên liệu:**

Lá khô: Lá tươi của 2 giống tím và xanh được rửa sạch, phơi âm can, xay nhỏ, rây qua 2 cỡ rây 0,3 mm và 0,125 mm, lấy phần bột nằm trên rây 0,125 mm. Trong đó, giống lá xanh được dùng làm nguyên liệu để xây dựng quy trình định lượng.

Cao khô BV: Cao chiết nước của lá Actisô tươi được sấy phun sương do công ty Cổ phần BV pharma cung cấp, đạt tiêu chuẩn cơ sở.

➤ **Các bước xây dựng quy trình định lượng như sau:**

a. Khảo sát điều kiện sắc ký (HPLC/UPLC): Khảo sát bước sóng phát hiện, pha động (MeOH/ACN, các loại acid gồm acid formic - FA, acid acetic - AA, acid trifluoroacetic - TFA và tỉ lệ % của dung môi và acid), nhiệt độ cột, tốc độ dòng và chương trình triển khai sắc ký sao cho pic cần định lượng đạt yêu cầu về các thông số sắc ký (độ tinh khiết pic, hệ số kéo đuôi và độ phân giải).

b. Khảo sát quy trình chuẩn bị mẫu thử (chiết xuất dược liệu/ hòa tan cao chiết): Khảo sát dung môi, nhiệt độ (trong bếp cách thủy), thời gian, số lần chiết xuất dược

liệu hoặc hòa tan cao chiết để thu được các chất cần định lượng có hàm lượng cao nhất (so sánh diện tích đỉnh ở cùng điều kiện phân tích).

c. Đánh giá quy trình định lượng: Quy trình định lượng đã khảo sát sẽ được đánh giá theo hướng dẫn của ICH¹⁵⁸ bao gồm: Tính phù hợp hệ thống, tính chọn lọc, khoảng tuyến tính, giới hạn phát hiện (LOD), giới hạn định lượng (LOQ), độ lặp lại trong ngày, độ chính xác trung gian và độ đúng.

- *Khảo sát tính phù hợp hệ thống:* Thực hiện bằng cách chạy lặp lại 6 lần cho 1 mẫu chuẩn và 1 mẫu thử theo các điều kiện đã xác định. Tính phù hợp hệ thống đạt yêu cầu khi các pic cần định lượng có giá trị RSD % của thời gian lưu (R_t) và diện tích pic (S) nhỏ hơn 2 %; hệ số đối xứng hay hệ số kéo đuôi (A_s) từ 0,8 - 1,5; độ phân giải (R_s) của pic cần định lượng so với pic tạp (liền trước và liền sau) lớn hơn 1,5.

- *Khảo sát độ đặc hiệu hay tính chọn lọc:* Phân tích 4 dung dịch (mẫu trắng, mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn) với điều kiện đã khảo sát, quan sát và so sánh thời gian lưu, phổ UV và pic của các chất cần định lượng. Phương pháp đạt yêu cầu khi thời gian lưu và phổ UV của thành phần cần định lượng trong mẫu thử và mẫu đối chiếu phải tương đương nhau, đồng thời mẫu trắng không xuất hiện pic nào trùng với đỉnh của thành phần cần định lượng. Khi thêm 1 lượng chất đối chiếu vào mẫu thử, diện tích pic của hợp chất cần định lượng phải tăng lên so với trước khi thêm chất đối chiếu và pic của chất cần định lượng không có thành phần nào khác khi sử dụng chức năng kiểm tra độ tinh khiết pic.

- *Khảo sát khoảng tuyến tính:* Các chất đối chiếu ban đầu được cân 10 mg cho vào bình định mức 10 ml, thêm dung môi thích hợp hòa tan hoàn toàn và điền đến vạch, thu được dung dịch chuẩn gốc có nồng độ 1 mg/ml. Sau đó, dung dịch này được pha thành 6 - 8 giai mẫu có nồng độ giảm dần (nồng độ dự kiến ban đầu là 500; 200; 100; 50; 25; 10; 5 µg/ml). Tiến hành triển khai trên HPLC 2 lần cho mỗi dung dịch chuẩn với điều kiện sắc ký đã khảo sát. Xác định sự tương quan giữa nồng độ và diện tích đỉnh của các dung dịch bằng phần mềm Excel và biện luận sự tương quan để đưa ra phương trình hồi qui tuyến tính.

- *Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ):* **Đối với LOD**, pha loãng dung dịch hỗn hợp chuẩn và phân tích HPLC/UPLC đến khi tín hiệu của chất định phân tích trên sắc ký đồ thu được có tỉ lệ S/N (tín hiệu/nhiều) = 2H/h đạt khoảng

từ 2 - 3, trong đó H là chiều cao pic định phân tích, h là chiều cao tín hiệu nhiễu nền lớn nhất. Nồng độ xác định được là giới hạn phát hiện (LOD) của phương pháp ứng với từng chất định phân tích. **Đối với LOQ**, giới hạn định lượng của phương pháp được xác định dựa trên giới hạn phát hiện theo công thức ($LOQ = 3,3 \times LOD$).

- *Khảo sát độ lặp lại và độ chính xác trung gian*: Thực hiện định lượng trên 6 mẫu thử khác nhau trong cùng một ngày phân tích (độ lặp lại) và 6 mẫu thử khác nhau thực hiện trong 2 ngày (độ chính xác trung gian), tính giá trị RSD % của 6 mẫu thử (độ lặp lại) và 12 mẫu (độ chính xác trung gian).

- *Khảo sát độ đúng hay độ phục hồi*: Xác định hàm lượng các chất cần định lượng trong mẫu thử. Sau đó thêm chuẩn vào mẫu định lượng. Lượng chuẩn thêm vào ở 3 mức phần trăm hàm lượng khác nhau so với nồng độ định lượng, thực hiện 3 lần cho mỗi nồng độ. Các mẫu được xử lý và phân tích theo điều kiện sắc ký đã chọn. Từ đó xác định tỉ lệ phục hồi Y được tính theo công thức:

$$[Y] = \frac{[X_r]}{[X_a]} \times 100$$

Trong đó: X_r : Lượng tìm thấy.
 X_a : Lượng thêm vào.

2.6.2.3. Một số ứng dụng của quy trình định lượng

Quy trình định lượng được ứng dụng trong nghiên cứu động thái tích lũy hoạt chất theo thời gian thu hái trong năm và kiểm nghiệm hàm lượng của các polyphenol chính trong các chế phẩm trà túi lọc Actisô hay các viên uống bào chế hiện đại (bao phim, bao đường, viên nang,...) được thu thập trên thị trường trong và ngoài nước. Bên cạnh đó quy trình cũng ứng dụng để kiểm tra chất lượng dược liệu, bán thành phẩm (cao chiết Actisô) và thành phẩm (viên bao phim Actisô) là các sản phẩm nghiên cứu của đề tài cũng như đề xuất các tiêu chuẩn kiểm nghiệm cho DĐVN VI.

a. Nghiên cứu động thái tích lũy hoạt chất acid chlorogenic theo từng thời gian thu hái và hàm lượng cynarin trong các cao chiết tương ứng: Định lượng acid chlorogenic trong lá khô Actisô theo quy trình đã xây dựng ở **Mục 3.2.2.1**. Bên cạnh đó, lá tươi được chiết xuất với nước thành cao đặc theo quy trình ở **Mục 3.4.2**, sau đó định lượng cynarin theo quy trình định lượng cao Actisô (**Mục 3.2.2.2**).

b. So sánh hàm lượng hoạt chất trong các cao chiết từ các BPD khác nhau (lá, gân lá, thân, rễ, hoa) của 2 giống Actisô: Các BPD của 2 giống Actisô được rửa

sạch, phơi khô; riêng với lá Actisô được chiết xuất ở 2 dạng (lá tươi và khô). Sau đó chiết xuất với nước ở 100 °C (đối với cao nước); chiết siêu âm với ethanol ở 80 °C (đối với cao EtOH 40 % và 96 %). Chiết 2 lần (60 phút và 30 phút), thu dịch chiết và dịch ép bã sau mỗi lần chiết, cô thu hồi dung môi dưới áp suất giảm đối với dịch chiết còn và đông khô đối với dịch chiết nước thu được các cao chiết tương ứng. Các cao chiết được xác định hàm ẩm và bảo quản mẫu ở -18 °C (Thông tin độ ẩm, khối lượng và hiệu suất của cao chiết được trình bày ở **Phụ lục 56**). Các cao chiết này được dùng để định lượng 12 thành phần polyphenol theo quy trình định lượng cao Actisô (**Mục 3.2.3**) và thử nghiệm hoạt tính chống oxy hóa theo quy trình ở **Mục 3.3.2**.

Định lượng hàm lượng các polyphenol chính trong các cao chiết theo quy trình đã xây dựng. Tính toán kết quả bằng phần mềm Excel. Các số liệu được hiển thị bằng trị số trung bình $\pm$ SD và được phân tích thống kê bằng phương pháp One-Way ANOVA và phép kiểm định Tukey bằng phần mềm Minitab 19. Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$ với độ tin cậy 95 %. Kết quả được trình bày ở dạng biểu đồ cột (dùng Excel) hoặc biểu đồ Heatmap. Ứng dụng mô hình phân tích đa biến bằng phương pháp bình phương tối thiểu từng phần PLS-DA (partial least-squares discriminant analysis) để phân tích sự khác biệt giữa cao nước và cao cồn đồng thời phân tích dự đoán điểm quan trọng của biến - VIP scores (Variable importance in projection scores) và hệ số tương quan Pearson (r) bằng phần mềm online MetaboAnalyst 5.0.

c. Định lượng các chế phẩm trà túi lọc Actisô: Do một số chế phẩm còn có các thành phần dược liệu khác ngoài Actisô (xem thành phần chế phẩm ở **Phụ lục 52**). Tất cả các chế phẩm được xác định độ ẩm và cân 100 mg đối với các loại trà có thành phần 100 % Actisô (lá, hoa, rễ, thân); đối với các loại trà có thêm các dược liệu khác sẽ được cân trên 100 mg tùy theo tỉ lệ % Actisô có trong chế phẩm (đã trừ khối lượng các thành phần khác) để đảm bảo khối lượng cân tương ứng 100 mg dược liệu Actisô đồng đều giữa các loại trà khi định lượng. Sau đó, các chế phẩm được chiết xuất theo quy trình định lượng lá khô Actisô (**Mục 3.2.2.1**).

d. Định lượng các chế phẩm viên uống Actisô: Các chế phẩm được lựa chọn để đánh giá có chứa cao Actisô (hạn chế có thêm các cao chiết dược liệu khác) (**Phụ lục 53**). Các chế phẩm được nghiền mịn, đồng nhất, xác định độ ẩm và cân một lượng

tương ứng với 20 mg cao Actisô tùy theo hàm lượng cao Actisô ghi trên nhãn của mỗi chế phẩm (đã trừ khối lượng của tá dược) để đảm bảo lượng cân tương ứng 20 mg cao Actisô đồng đều giữa các chế phẩm khi định lượng. Sau đó quy trình định lượng cao Actisô bằng HPLC hoặc UPLC-PDA được áp dụng để định lượng chế phẩm.

e. Công thức tính hàm lượng của các polyphenol định lượng trong mẫu thử (lá khô, cao khô và chế phẩm):

$$X = \frac{St}{Sc} \times Cc \times \frac{k}{m(1-h)} \times p \times 100$$

Trong đó: *X*: Hàm lượng của chất định lượng có trong mẫu thử (%)

Sc: Diện tích đỉnh thu được của mẫu chuẩn ($\mu V \times s$)

St: Diện tích đỉnh thu được của mẫu thử ($\mu V \times s$)

Cc: Nồng độ lý thuyết của mẫu chuẩn (mg/ml)

k: Độ pha loãng của mẫu đo (ml)

m: Khối lượng mẫu thử (dược liệu/ cao chiết/ chế phẩm) (mg)

h: Độ ẩm của mẫu thử

p: Độ tinh khiết của chất chuẩn hoặc CDC (%)

2.6.3. Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa (HTCO)

2.6.3.1. Phương pháp chuẩn bị mẫu thử

Chuẩn bị cao chiết mẫu thử: Các chất tinh khiết và chất đối chiếu (acid ascorbic và silymarin) được hòa tan trong methanol. Các bộ phận dùng khác nhau của 2 giống Actisô được chiết xuất theo Mục 2.2.2.3b.

Khảo sát độ hòa tan của các cao chiết dùng thử nghiệm sinh học: Dung môi hòa tan mẫu được thăm dò tỷ lệ các thành phần gồm DMSO, nước và MeOH để hòa tan các cao chiết dùng trong thử nghiệm khảo sát hoạt tính chống oxy hóa. Kết quả nhận thấy hỗn hợp dung môi hòa tan tốt nhất (có hỗ trợ siêu âm) cho tất cả các cao chiết là: 20 % DMSO, 60 % H₂O và 20 % MeOH.

2.6.3.2. Phương pháp thử nghiệm HTCO

➤ **Khảo sát hoạt tính thu dọn gốc tự do bằng thử nghiệm DPPH:**

Nguyên tắc: DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) là một gốc tự do có bước sóng cực đại $\lambda_{\max} = 517$ nm và có màu tím. Các chất chống oxy hóa sẽ trung hòa gốc tự do DPPH bằng cách cho hydro, làm giảm độ hấp thụ tại bước sóng cực đại và màu

của dung dịch chuyển từ tím sang vàng.

Cách tiến hành: Mô hình thử nghiệm được thực hiện bởi Kulisic và cộng sự (2004), bổ sung bởi Obeid và cộng sự (2005) ¹⁵⁹. Quy trình này đã được đánh giá lại về bước sóng hấp thụ cực đại, nồng độ của DPPH, động học phản ứng, tính tương thích hệ thống, và độ lặp lại bởi Huỳnh Anh Duy (Luận văn Thạc sĩ Dược học - 2014) được thực hiện ở cùng điều kiện thí nghiệm (nơi thực hiện và trang thiết bị) với nghiên cứu này ¹⁶⁰. Do đó, quy trình áp dụng ở điều kiện tương tự gồm nồng độ DPPH là 0,08 mM, bước sóng phát hiện là 517 nm, thời gian đo độ hấp thụ là 30 phút sau khi phản ứng. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và lấy giá trị trung bình $\pm$ SD. Acid ascorbic và silymarin được sử dụng làm chất đối chiếu.

➤ **Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa ex vivo bằng phương pháp MDA** ¹⁶¹

Nguyên tắc: MDA (Malonyl dialdehyd) là chất được sinh ra trong quá trình peroxy hóa lipid màng tế bào, khi phản ứng với thuốc thử acid thiobarbituric (TBA) tạo ra phức hợp trimethin có màu hồng, có hấp thụ cực đại ($\lambda_{\max}$) ở bước sóng 532 nm. Phản ứng xảy ra ở môi trường pH từ 2-3, nhiệt độ 90-100 °C trong 10-15 phút. HTCO của các chất thử nghiệm thể hiện qua việc làm giảm màu của phức hợp này do làm giảm lượng MDA có trong mẫu dẫn đến giảm độ hấp thụ ở bước sóng 532 nm. ¹⁶¹

Cách tiến hành: Nghiền đồng thể gan chuột sinh lý trong dung dịch KCl 1,15% (tỉ lệ 1 g/10 ml) ở nhiệt độ 0 - 5 °C. Dùng 50 μ l mẫu thử ở các nồng độ khác nhau phản ứng với 250 μ l dịch đồng thể gan. Thêm đệm phosphat (pH = 7,4) vừa đủ 1 ml, ủ hỗn hợp phản ứng 60 phút ở 37 °C và dùng phản ứng bằng 500 μ l acid trichloroacetic (TCA) 10 %. Sau khi ly tâm (3.000 vòng/10 phút), lấy 500 μ l dịch phía trên cho phản ứng với 500 μ l acid thiobarbituric 0,8 % ở 100 °C trong 15 phút. Làm lạnh và đo độ hấp thụ ở bước sóng 532 nm. Sử dụng đĩa 96 giếng và đo độ hấp thụ bằng máy Elisa. Thực hiện 2 lần, lấy giá trị trung bình $\pm$ SD. Silymarin được dùng làm chất đối chiếu.

Hoạt tính chống oxy hóa (% HTCO) của 2 phương pháp được tính theo công thức: $\% \text{ HTCO} = [(\text{OD}_{\text{chứng}} - \text{OD}_{\text{thử}}) / (\text{OD}_{\text{chứng}} - \text{OD}_{\text{trắng}})] \times 100$. Trong đó: OD: Optical density (Độ hấp thụ). Thông qua phương trình hồi quy, xác định IC₅₀ của mẫu thử.

Khảo sát khoảng tuyến tính của HTCO: Các mẫu nghiên cứu được tiến hành thử nghiệm với các nồng độ khác nhau. Sau khi thêm các thành phần phản ứng, nồng

độ khảo sát dự kiến đối với mẫu cao chiết (2,5 - 250 µg/ml); đối với mẫu chất tinh khiết và đối chiếu (0,25 - 100 µg/ml). Tiếp tục thử ở các nồng độ khác để tìm được khoảng nồng độ tuyến tính với hoạt tính chống oxy hóa trên từng mẫu.

Xác định IC_{50} : Dựa vào nồng độ giai mẫu của mẫu thử đã pha và % HTCO tính toán được, lập phương trình hồi quy $y = ax + b$ thể hiện mối tương quan giữa % HTCO (y) và nồng độ (x). Từ đó, xác định IC_{50} bằng cách thế $y = 50$ vào phương trình hồi quy. Mẫu thử nếu có nồng độ IC_{50} càng thấp tức là có HTCO càng mạnh.

Đánh giá kết quả: Các số liệu được hiển thị bằng trị số trung bình $\pm$ SD và được phân tích thống kê bằng phương pháp One-Way ANOVA và phép kiểm định Tukey bằng phần mềm Minitab 19. Sự khác biệt giữa các giá trị trung bình được xem là có ý nghĩa thống kê khi $p < 0,05$ với độ tin cậy 95 %.

2.6.4. Nghiên cứu chiết xuất cao chuẩn hóa

2.6.4.1. Xây dựng TCCS cho nguyên liệu lá Actisô

Kiểm tra nguyên liệu lá Actisô theo tiêu chuẩn của DĐVN V. Riêng đối với các chỉ tiêu về định tính và định lượng bằng HPLC-PDA được thực hiện theo quy trình đã xây dựng ở **Mục 3.2.2.1**. Trên cơ sở kết quả khảo sát một số mẫu để đưa ra TCCS cho nguyên liệu lá Actisô phục vụ cho nghiên cứu và đề xuất “Dự thảo tiêu chuẩn lá Actisô cho DĐVN VI”.

2.6.4.2. Khảo sát phương pháp chiết xuất

a. Khảo sát nhiệt độ chiết xuất: Dựa theo các nghiên cứu về sự thay đổi hàm lượng cynarin và các polyphenol khi chế biến ở các nhiệt độ khác nhau ^{148,149}. Do đó, đề tài khảo sát các điều kiện chiết xuất lá Actisô tươi ở một số nhiệt độ tăng dần. Tiến hành: 200 g phiến lá Actisô tươi được cắt nhỏ, thêm 500 ml nước sôi, đun trong bếp cách thủy ở các nhiệt độ khảo sát (60, 80, 100 °C) trong 45 phút. Lọc dịch chiết và cô thành cao đặc. Xác định độ ẩm của cao và tiến hành định lượng acid chlorogenic và cynarin trong cao theo quy trình đã xây dựng ở **Mục 3.2.2.2**.

b. Khảo sát một số phương pháp làm tăng hàm lượng cynarin:

Quy trình 1: Lá tươi được đun sôi với nước (Quy trình dựa theo các nghiên cứu về sự gia tăng hàm lượng cynarin khi chế biến Actisô với nước sôi ^{148,149}). Tiến hành:

Dược liệu tươi được rửa sạch, loại bỏ phần gân chính, cắt nhỏ. Cân 200 g dược liệu, thêm 500 ml nước, đun sôi 30 phút, lọc dịch chiết và cô thành cao đặc.

Quy trình 2: Lá tươi được hấp cách thủy (Quy trình dựa theo các nghiên cứu về sự gia tăng hàm lượng cynarin khi chế biến Actisô bằng cách hấp^{148,149}). Tiến hành: Cân 200 g phiến lá tươi, hấp cách thủy 30 phút, ép lấy dịch, lọc và cô thành cao đặc.

Quy trình 3: Lá tươi được ép trước, sau đó đun với nước sôi (Quy trình được thực hiện nhằm khảo sát việc giảm thể tích dược liệu để giảm thể tích dung môi sử dụng). Tiến hành: Cân 200 g phiến lá tươi được ép để giảm thể tích, thêm 100 ml nước vào bã, đun sôi trong 30 phút, lọc và cô thành cao đặc.

Quy trình 4: Lá tươi được hấp với nước sôi, sau đó chiết với cồn (Quy trình được thực hiện ở giai đoạn đầu để gia tăng hàm lượng cynarin, sau đó chiết cồn nhằm làm tăng hiệu suất chiết flavonoid và giảm hàm lượng muối có trong lá Actisô). Tiến hành: Cân 200 g phiến lá tươi, thêm 50 ml nước sôi và hấp trong 5 phút. Thêm 160 ml cồn 96 %, đun cách thủy trong 30 phút, lọc dịch chiết, cô thành cao đặc.

Quy trình 5: Lá tươi hấp với cồn 96 %, sau đó chiết với nước (Quy trình được thực hiện dựa vào nghiên cứu trước đây về việc cần phải diệt men trước khi chiết xuất lá Actisô để làm tăng hàm lượng cynarin¹⁶²). Tiến hành: Cân 200 g phiến lá tươi, thêm 50 ml nước cồn 96 % và hấp trong 5 phút. Thêm 160 ml nước sôi, đun cách thủy trong 30 phút, lọc dịch chiết, cô thành cao đặc.

c. Khảo sát thời gian chiết xuất: Thực hiện tương tự như trên ở nhiệt độ đã chọn, với thời gian đun khảo sát (30, 45, 60, 90, 120 và 150 phút).

Tất cả các cao chiết thu được ở trên sẽ được xác định độ ẩm, sau đó tiến hành định lượng acid chlorogenic và cynarin theo quy trình đã xây dựng ở **Mục 3.2.2.2**.

2.6.4.3. Nâng cấp cỡ lô cao chiết lá Actisô (500 kg/mẻ)

Quy trình chiết xuất: Lá tươi Actisô 1.000 kg, rọc bỏ gân chính thu được 500 kg phiến lá, rửa sạch (2 lần) với nước, vớt ra và nạp vào lồng chiết. Đưa lồng chiết có phiến lá vào trong nồi chiết xuất có áp lực bằng hệ thống rỗng rọc, điều khiển bằng điện. Thêm 400 lít nước vào nồi, đun sôi ở 100 °C, trong 60 phút. Rút dịch chiết, bã được ép và chiết thêm với 200 lít nước đun nóng 100 °C trong 30 phút. Gộp dịch chiết của 2 lần, lọc và cô đặc trong thiết bị cô tuần hoàn chân không. Dịch chiết Actisô

được bay hơi dung môi trong thiết bị sấy phun sương để thu được cao khô Actisô nguyên chất (không độn tá dược).

Việc chiết xuất và cô chân không thành cao lỏng được thực hiện tại cơ sở sản xuất dược liệu CTCP BV Pharma (Lâm Đồng). Cao chiết được sấy phun sương và đóng gói tại nhà máy sản xuất đông dược của CTCP BV Pharma (Củ Chi) với điều kiện sấy phun như sau: Tốc độ bếp phun 20 vòng/phút; nhiệt độ đầu vào 150-170 °C, đầu ra 70 °C; công suất máy (50 lít/giờ). Cao khô sau khi sấy phun được để trong phòng lạnh, cân và đóng gói trong túi nhôm, dán nhãn (xem **Phụ lục 1**); bảo quản ở nhiệt độ dưới 25 °C.

2.6.4.4. Xây dựng TCCS cho cao chiết Actisô

Kiểm tra cao khô Actisô đã chiết xuất ở các quy mô lớn theo tiêu chuẩn của ĐĐVN V. Riêng đối với các chỉ tiêu về định tính và định lượng bằng HPLC-PDA được thực hiện theo quy trình đã xây dựng ở **Mục 3.2.2.2**. Dựa trên kết quả khảo sát một số mẫu cao chiết nghiên cứu để đưa ra TCCS cho cao khô Actisô (cao bán thành phẩm) của nghiên cứu và đề xuất “Dự thảo tiêu chuẩn cao khô Actisô cho ĐĐVN VI”. Các chỉ tiêu về kim loại nặng, độ nhiễm khuẩn và dư lượng thuốc bảo vệ thực vật được gửi mẫu và thực hiện bởi phòng kiểm tra chất lượng thuộc CTCP BV Pharma.

Kiểm nghiệm tiêu chuẩn cao chiết với các chỉ tiêu:

- | | |
|------------------------------------|-------------------------------------|
| - Mô tả | - Cẩn không tan trong nước |
| - Độ tro (tro toàn phần...) | - Kim loại nặng |
| - Định tính CY và AC bằng HPLC-PDA | - Định lượng AC và CY bằng HPLC-PDA |
| - Mất khối lượng do làm khô | - Độ nhiễm khuẩn |

2.6.5. Nghiên cứu bào chế viên nén bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô

2.6.5.1. Xây dựng công thức, quy trình bào chế viên bao phim chứa cao khô Actisô qui mô 3000 viên

a. Nghiên cứu viên bao phim Actisô cỡ lô 450 viên: Căn cứ vào viên đối chiếu Chophytol và dựa vào tính chất cao khô Actisô nghiên cứu ở dạng bột sấy phun kém bền với nhiệt độ và độ ẩm, có khả năng dính tốt, hàm lượng cao trong viên nghiên cứu là 200 mg chiếm khoảng hơn 1/2 khối lượng viên, áp dụng phương pháp dập thẳng để bào chế viên nhân. Tiến hành thăm dò các tá dược độn, tá dược dính, tá dược

trơn bóng và tá được rãi với cỡ lô 450 viên, khối lượng viên 350 - 360 mg, dập viên bằng máy dập viên xoay tròn, chày tròn 10 mm, hai mặt khum. Thực hiện sàng lọc và chọn lựa tỷ lệ tá được tối ưu hóa theo mô hình thực nghiệm Box Wilson. Bào chế viên nhân theo công thức và quy trình đã được lựa chọn với cỡ lô 450 viên (thực hiện 3 lô). Đánh giá tính chất viên của 3 lô về cảm quan, độ cứng, khối lượng, độ mài mòn, độ hòa tan làm cơ sở cho việc đánh giá nâng lô qui mô 3.000 viên.

b. Nâng lô 3.000 viên và kiểm tra chất lượng viên theo tiêu chuẩn khảo sát:

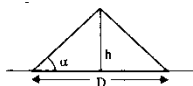
Tiến hành bào chế 3 lô qui mô 3.000 viên theo quy trình mô tả ở **Hình 2.2**. Thành phần công thức tương tự cỡ lô phòng thí nghiệm (450 viên). Khảo sát các thông số trọng yếu và đánh giá chất lượng viên nhân của cỡ lô nâng cấp theo tiêu chuẩn xây dựng. Các thông số trọng yếu cần khảo sát đối với viên nhân bằng phương pháp dập thẳng gồm **thời gian trộn, tính chất của cốm, tính chất của viên**.

Thời gian trộn: Thông số trộn sẽ được khảo sát ở 03 thời điểm, quá trình lấy mẫu được thực hiện theo phương pháp ngẫu nhiên, mỗi thời điểm lấy ở 6 vị trí khác nhau bên trong thiết bị để có thể đảm bảo được tính đại diện cho mẫu chung.

Tính chất cốm: Đánh giá độ ẩm, góc nghỉ, tốc độ chảy, chỉ số nén, tỷ số Hausner.

- **Góc nghỉ:** Cân m (g) bột cho chảy qua phễu lọc đường kính trong cuống phễu và chiều dài cuống phễu lần lượt là 10 mm và 10 cm. Thu được hình nón. Góc nghỉ α được tính theo công thức:

$$\operatorname{tg} \alpha = \frac{2h}{D} = \frac{h}{r}$$



- **Tốc độ chảy của khối bột:** Trong thử nghiệm tiến hành đo góc nghỉ, tốc độ chảy là thời gian để khối lượng bột chảy hết qua phễu.

$$\text{Tốc độ chảy} = \text{Khối lượng hạt (g)} / \text{Thời gian chảy hết khối hạt (s)}$$

- **Chỉ số nén và tỷ số Hausner:** Cân m (g) bột, đổ vào ống đong, đọc thể tích bột trước khi gõ (V_0). Gõ ống đong theo chiều thẳng đứng xuống mặt nhẵn đến khi thể tích bột không đổi, đọc thể tích (V). Chỉ số nén và tỷ số Hausner được tính theo công thức:

$$\text{Chỉ số nén} = 100 \times \frac{(V_0 - V)}{V_0}$$

$$\text{Tỷ số Hausner} = \frac{V_0}{V}$$

Bảng 2.8. Các thông số đánh giá góc nghỉ, chỉ số nén và tỷ số Hausner

Góc nghỉ (°)	Chỉ số nén (CI %)	Tỷ số Hausner (HR)	Đánh giá
25 - 30	≤ 10	1,00 - 1,11	Rất tốt
31 - 35	11 - 15	1,12 - 1,18	Tốt
36 - 40	16 - 20	1,19 - 1,25	Khá
41 - 45	21 - 25	1,26 - 1,34	Trung bình
46 - 55	26 - 31	1,35 - 1,45	Kém
56 - 65	32 - 37	1,46 - 1,59	Rất kém
> 66	> 38	> 1,60	Rất rất kém

Kiểm tra viên nhân theo tiêu chuẩn DDVN V: Cảm quan, độ đồng đều khối lượng viên (**PL-11.2**); Độ rã (**PL-11.6**); Độ hòa tan (**PL-11.4**). Hàm lượng cynarin và acid chlorogenic (theo TCCS).

Viên nhân lô 3.000 viên đạt yêu cầu sẽ được tiếp tục tiến hành bao phim chống ẩm theo qui trình khảo sát và đánh giá tiêu chuẩn viên bao phim chứa 200 mg cao Actisô và đề xuất TCCS cho chế phẩm. Việc đề xuất TCCS của chế phẩm được dựa vào chuyên luận viên nén trong DDVN V và dựa trên các kết quả nghiên cứu khi xây dựng công thức và kiểm nghiệm sản phẩm gồm: Cảm quan, độ đồng đều khối lượng, độ hòa tan, định tính, định lượng.

2.6.5.2. Nâng cấp cỡ lô 15.000 viên và kiểm tra chất lượng viên theo TCCS

Tính toán cỡ lô, tiến hành bào chế theo quy trình được tóm tắt ở **Hình 2.2**:

- Cân riêng từng nguyên liệu theo công thức pha chế lô.
- Rây riêng các nguyên liệu qua rây 0,5 mm (magnesi carbonat qua rây 0,25 mm).
- Trộn bột dập viên: Trộn sơ bộ các bột theo trình tự gồm trộn cao khô Actisô với tá dược chống ẩm trước (silicon dioxid), trộn tiếp với tá dược độn (magnesi carbonat và MCC 102) rồi cho vào thùng trộn chữ V, trộn tiếp khoảng 7 phút, tốc độ 20 - 30 vòng/phút. Lấy bột ra, trộn sơ bộ với tá dược rã (natri croscarmellose), trộn tiếp với tá dược trơn (glyceryl behenat) rồi cho hỗn hợp vào máy trộn chữ V, tiếp tục trộn trong 3 phút với cùng tốc độ trên.

Kiểm nghiệm bột dập viên: Lấy mẫu kiểm tra các thông số đặc trưng, kiểm nghiệm bán thành phẩm (cảm quan, độ ẩm, tốc độ chảy, góc nghỉ, định tính, định lượng).

Dập viên: Viên tròn, 2 mặt lồi, đường kính 10 mm, khối lượng trung bình 352 mg. Kiểm tra trong quá trình dập viên bao gồm tính chất viên, độ đồng đều khối lượng,

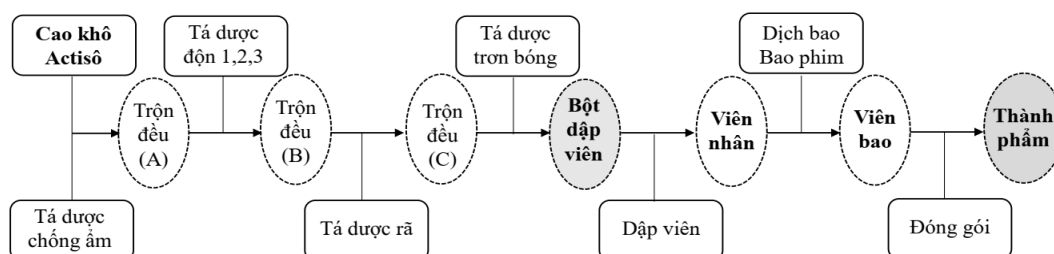
độ cứng, độ rã, độ mài mòn và các chỉ tiêu định tính, định lượng, độ hòa tan. Viên sau khi dập xong được chứa trong thùng kín với 2 lớp bao PE và chuyển sang phòng biệt trữ chờ bao phim.

Quy trình bao phim: Phân tán toàn bộ tá dược bao phim vivacoat và màu nâu (tan trong nước) với lượng cồn nước (1:1) vừa đủ tạo dịch có nồng độ 10 %. Khuấy với tốc độ 600 vòng/phút cho tới khi dịch bao đồng nhất thu được dịch bao phim. Kiểm tra và điều chỉnh các thông số bao phim như sau:

- Nhiệt độ gió vào: 55 °C - 60 °C
- Nhiệt độ sản phẩm: 42 °C - 45 °C
- Lưu lượng gió vào: 12 - 16 cm³/giây
- Áp suất súng phun: 2,5 bar
- Nhiệt độ gió ra: 48 °C - 52 °C
- Tốc độ bơm dịch: 7 - 8 vòng/phút
- Lưu lượng gió ra: 10 - 14 cm³/giây
- Tốc độ nổi bao: 8 vòng/phút

Tiến hành: Làm nóng viên nhân khoảng 15 phút ở 0 °C, khi đó nhiệt độ viên đạt khoảng 42 - 45 °C bắt đầu phun dịch bao. Khi phun hết dịch bao (khối lượng viên tăng khoảng 4 %), tiến hành sấy viên 15 phút ở nhiệt độ 55 °C, làm nguội viên ở nhiệt độ phòng. Đựng trong thùng kín với 2 lớp bao PE và chuyển sang phòng biệt trữ.

Đóng gói cấp 1 – đóng chai: Sản phẩm được đóng trong lọ thủy tinh nâu, 120 viên/ lọ, nhãn đúng qui chế (xem **Phụ lục 1**).



Hình 2.2. Sơ đồ quy trình bào chế viên nén bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô

2.6.5.3. Khảo sát độ ổn định của chế phẩm

Độ ổn định của sản phẩm nghiên cứu được khảo sát ở 2 điều kiện (**Bảng 2.9**) trong khoảng thời gian phù hợp. Đánh giá cảm quan, khối lượng, độ hòa tan, hàm lượng.

Bảng 2.9. Điều kiện đánh giá độ ổn định của chế phẩm

Điều kiện	Dài hạn	Lão hóa cấp tốc
Nhiệt độ	30 ± 2 °C	40 ± 2 °C
Độ ẩm	75 ± 5%	75 ± 5%
Thời điểm lấy mẫu	0, 3, 6, 9, 12 tháng	0, 1, 2, 3, 6 tháng

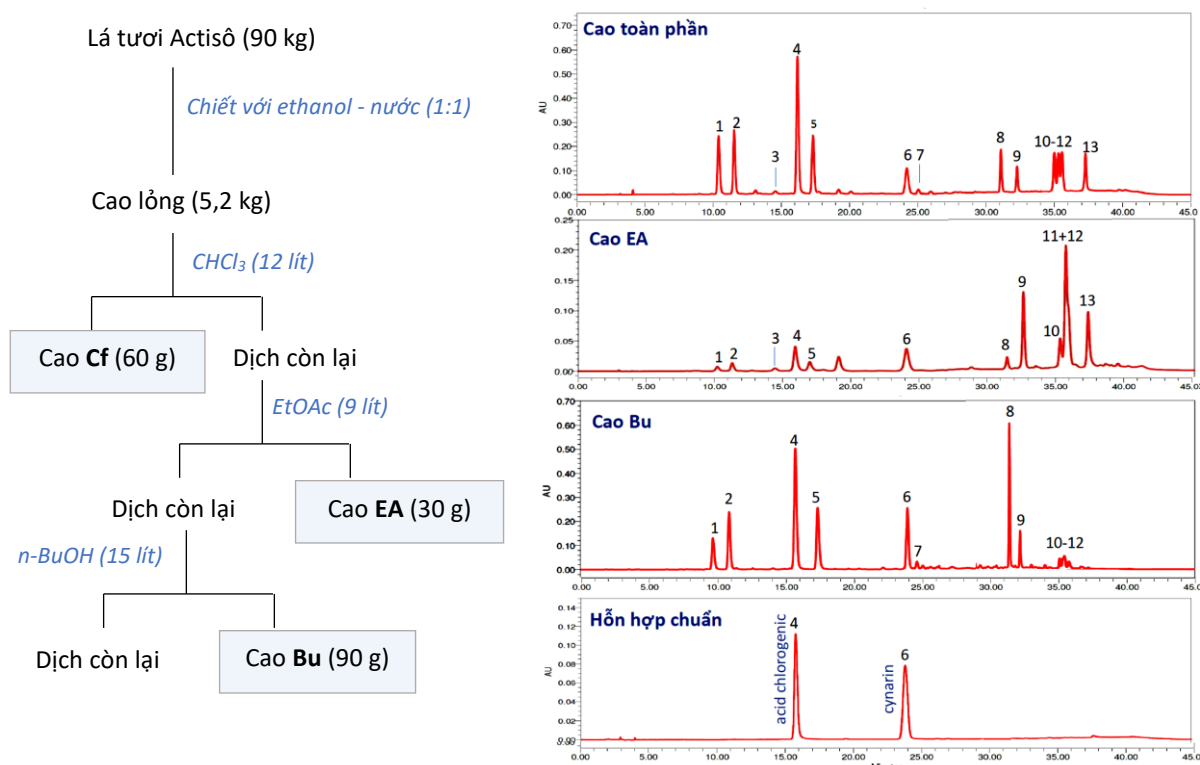
Chương 3. KẾT QUẢ

3.1. Nghiên cứu thành phần hóa học

3.1.1. Chiết xuất, phân lập

3.1.1.1. Chiết xuất

Lá Actisô được xử lý và chiết xuất theo quy trình ở **Mục 2.2.1.1**. Cao chiết **Cf**, **EA** và **Bu** thu được bằng phương pháp chiết phân bố lỏng - lỏng với dịch chiết lá Actisô, quy trình và kết quả được tóm tắt ở **Hình 3.1**. Kết quả phân tích trên HPLC cho thấy pic CY (pic **6**) và AC (pic **4**) có nhiều ở cao **Bu**. Cao **EA** có nhiều thành phần polyphenol khác là các dẫn xuất CQA (được xác định do chúng có cùng phổ UV với CY và AC). Ngoài ra, cao **EA** và **Bu** đã được chứng minh có thành phần chủ yếu là các acid phenol có nhiều tác dụng sinh học đáng chú ý¹⁶³. Do vậy, 2 cao chiết này được dùng để phân lập các hợp chất. Các chất phân lập của luận án được đánh số theo trình tự rửa giải trên HPLC tương ứng với cao toàn phần (xem **Hình 3.1**).

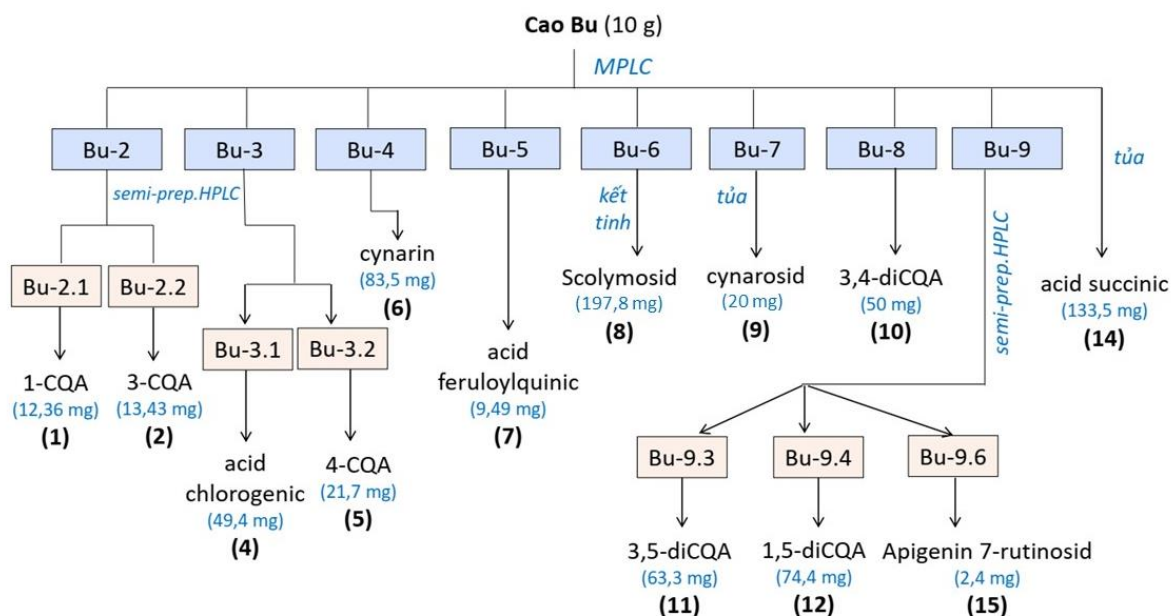


Hình 3.1. Sơ đồ chiết xuất và SKĐ phân tích cao EA và Bu bằng HPLC-PDA ở 330 nm

Chú thích: Các đỉnh đánh số từ 1 - 13 là các chất được phân lập của đề tài, xem ở bảng tóm tắt các chất phân lập (**Mục 3.1.1.2 và 3.1.1.3**). Điều kiện HPLC: Xem **Mục 3.2.2.2**

3.1.1.2. Phân lập các chất từ cao *n*-butanol (Bu)

13 hợp chất gồm chất **1-2, 4-12** và **14-15** được phân lập theo quy trình tóm tắt ở **Hình 3.2** và **Bảng 3.1**. Kết quả phân tích các phân đoạn bằng HPLC-PDA ở **Hình 3.3**.



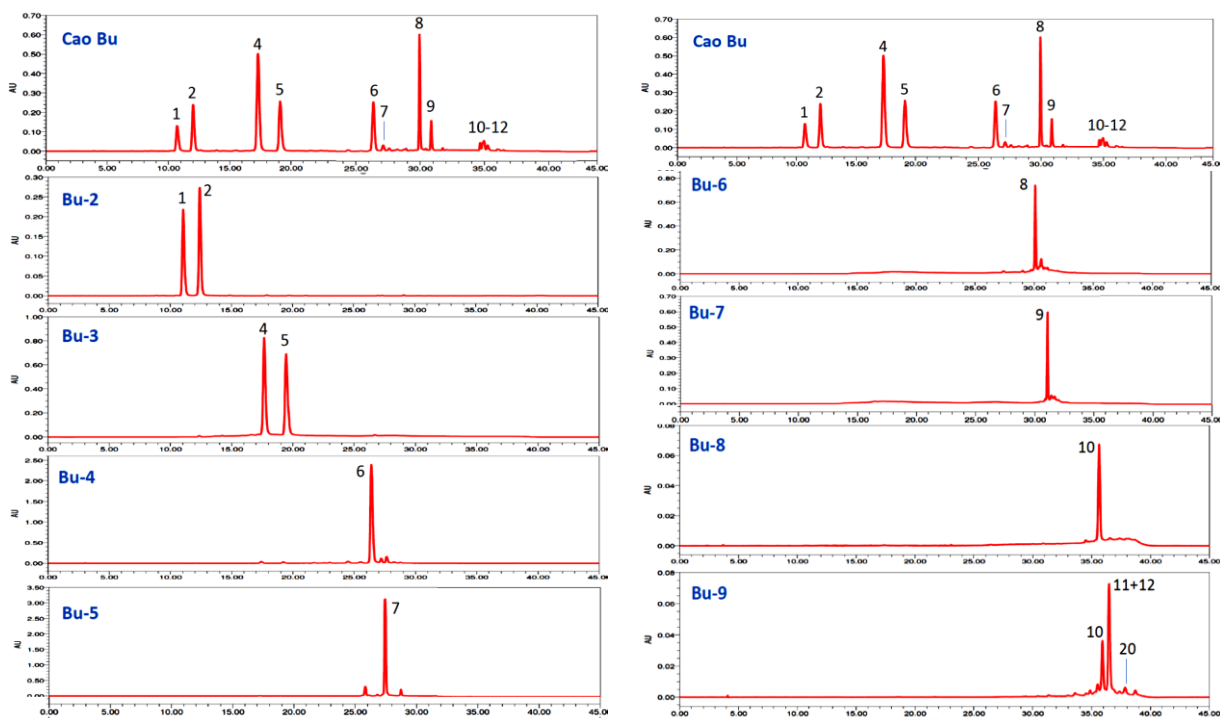
Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao Bu

Chú thích: Các chất được xác định cấu trúc bằng phổ NMR (xem ở **Mục 3.1.2**)

Cao **Bu** (10 g) được hòa trong methanol thu được tủa, tủa này được lọc rửa với methanol lạnh thu được hợp chất **14** (133,5 mg); phần dịch còn lại được lọc và cô đến cạn, hòa cạn trong lượng tối thiểu nước cất để tiến hành phân lập các hợp chất bằng MPLC (điều kiện cột **MPLC-Bu** ở **Mục 2.2.1.1**) thu được 10 phân đoạn, ký hiệu (**Bu-1** đến **Bu-10**). Trong đó, 8 phân đoạn **Bu-2** (0,35 g), **Bu-3** (0,43 g), **Bu-4** (0,45 g), **Bu-5** (0,083 g), **Bu-6** (0,5 g), **Bu-7** (0,11 g), **Bu-8** (0,06 g) và **Bu-9** (2,5 g) được dùng để phân lập các hợp chất.

Phân đoạn **Bu-2** (0,35 g) và **Bu-3** (0,43 g) được phân tách trên cột sắc ký lỏng bán điều chế áp suất cao (điều kiện cột **semi-prep. HPLC-Bu-2** và **Bu-3** ở **Mục 2.2.1.1**) thu được các hợp chất **1** (12,36 mg) và **2** (13,43 mg) từ **Bu-2**; hợp chất **4** (49,4 mg) và **5** (21,7 mg) từ **Bu-3**. Từ phân đoạn **Bu-4** (0,45 g) thu được tủa vô định hình, tủa này được kết tinh lại trong methanol - nước thu được hợp chất **6** (83,5 mg). Phân đoạn **Bu-5** (0,083 g) được tinh chế trên cột semi-prep. HPLC (xem điều kiện ở **Mục 2.2.1.1**) thu được hợp chất **7** (9,49 mg). Từ phân đoạn **Bu-6** (0,5 g) và **Bu-7** (0,11 g)

thu được tủa màu vàng nhạt; tủa từ **Bu-6** được kết tinh lại trong chloroform - methanol thu được chất **8** (197,8 mg); lọc rửa tủa từ **Bu-7** với methanol lạnh thu được hợp chất **9** (20 mg). Phân đoạn **Bu-8** được cô loại acetonitril và đông khô thu được hợp chất **10** (50 mg). Phân đoạn **Bu-9** (1,5 g) được phân tách tiếp trên cột semi-prep.HPLC (điều kiện ở Mục 2.2.1.1) thu được 6 phân đoạn (**Bu-9.1** đến **Bu-9.6**); trong đó phân đoạn **Bu-9.3**, **Bu-9.4** và **Bu-9.6** được cô loại acetonitril và đông khô thu được các hợp chất tương ứng là **11** (63,3 mg), **12** (74,4 mg) và **15** (2,4 mg).



Hình 3.3. SKĐ các phân đoạn cột MPLC của cao Bu (MPLC-Bu) dùng để phân lập các chất

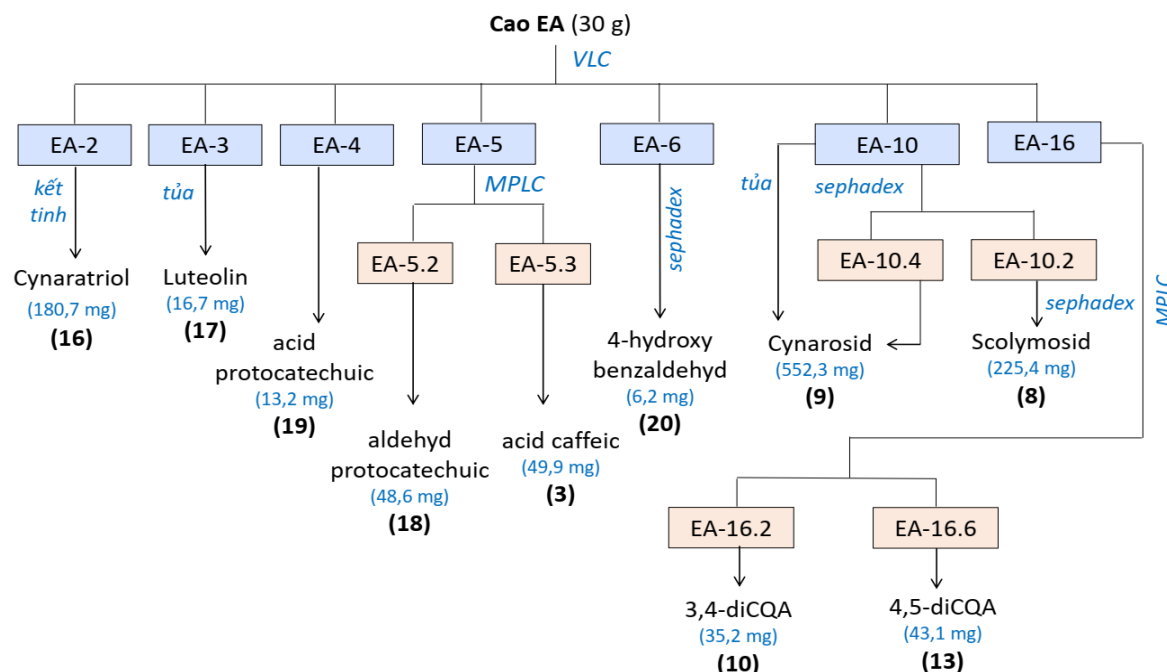
Bảng 3.1. Các hợp chất phân lập từ cao Bu

Nhóm	Chất	KL ^a	Tên hợp chất	Chất	KL ^a	Tên hợp chất
CQA	1	12,36	1-CQA	6	83,5	cynarin
	2	13,43	3-CQA	10	50,0	3,4-diCQA
	4	49,4	acid chlorogenic	11	63,3	3,5-diCQA
	5	21,7	4-CQA	12	74,4	1,5-diCQA
	7	9,49	3-feruloylquinic			
Flavonoid	8	197,8	scolymosid	15	2,4	apigenin-7-rutinosid
	9	20,0	cynarosid			
Acid hữu cơ	14	133,5	acid succinic			

^aKL: Khối lượng (mg). Các pic đánh số 1 - 12 là các hợp chất phân lập, thứ tự đánh số dựa vào thứ tự rửa giải so với cao **Bu** và cao toàn phần. Các chất có hàm lượng thấp không xuất hiện pic trên SKĐ được đánh số theo trình tự phân lập và nối tiếp với các chất đã phân lập. Các chất được xác định cấu trúc bằng phổ NMR (xem ở Mục 3.1.2).

3.1.1.3. Phân lập các chất từ cao ethyl acetat (EA)

10 hợp chất gồm chất **3**, **8-10**, **13**, **16-20** được phân lập theo quy trình tóm tắt ở **Hình 3.4** và **Bảng 3.2**. Kết quả phân tích các phân đoạn bằng HPLC-PDA ở **Hình 3.4**.



Hình 3.4. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao EA

Chú thích: Các chất được xác định cấu trúc bằng phổ NMR (xem ở Mục 3.1.2).

Cao EA (30 g) được phân lập bằng sắc ký cột VLC (điều kiện cột VLC-EA ở Mục 2.2.1.1) thu được 16 phân đoạn, ký hiệu (EA-1 đến EA-16). Trong đó, 6 phân đoạn EA-2 (1,12 g), EA-3 (0,27 g), EA-4 (0,35 g), EA-5 (2,4 g), EA-6 (0,32 g), EA-10 (1,1 g), EA-16 (10 g) được dùng để phân lập các hợp chất. Các phân đoạn khác không nghiên cứu do có khối lượng ít và có thành phần trùng với cao Bu.

Phân đoạn EA-2 (1,12 g) được hòa trong methanol và lọc, thu được tủa trắng ngà; tủa này được kết tinh lại trong chloroform - methanol thu được hợp chất **16** (180,7 mg). Phân đoạn EA-3 (0,27 g) được hòa trong methanol, cô thu hồi dung môi thu được tủa, rửa tủa với chloroform - methanol lạnh thu được hợp chất **17** (16,7 mg). Phân đoạn EA-4 (0,35 g) được kết tinh lại trong methanol thu được hợp chất **19** (13,2 mg). Phân đoạn EA-5 (2,4 g) được tiếp tục phân tách trên cột MPLC (điều kiện cột MPLC-EA-5 ở Mục 2.2.1.1) thu được 3 phân đoạn (EA-5.1 đến EA-5.3); trong đó, các phân đoạn EA-5.2 và EA-5.3 được cô loại acetonitril và đông khô thu được các

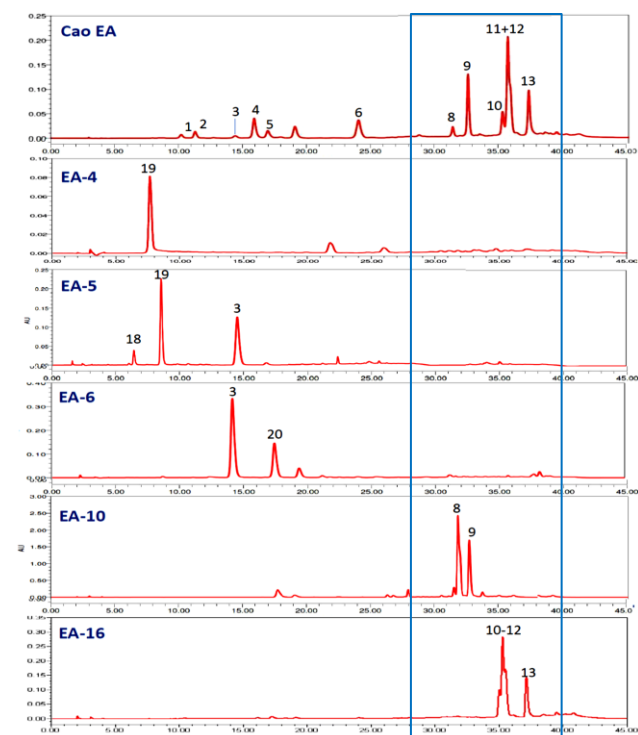
hợp chất tương ứng là **18** (48,6 mg) và **3** (49,9 mg). Phân đoạn **EA-6** (0,32 g) được phân tách trên cột Sephadex LH-20 (điều kiện cột **sephadex-EA-6** ở Mục 2.2.1.1) thu được 5 phân đoạn, từ phân đoạn **EA-6.3** thu được hợp chất **20** (6,2 mg). Phân đoạn **EA-10** (1,1 g) được hòa trong methanol thu được tủa màu vàng, tủa này được kết tinh lại trong methanol thu được hợp chất **9** (520,3 mg); phần dịch còn lại sau khi lọc lấy tủa được cô thu hồi dung môi và tiếp tục phân tách trên cột Sephadex LH-20 (điều kiện cột **sephadex-EA-10** ở Mục 2.2.1.1) thu được 4 phân đoạn (**EA-10.1** đến **EA-10.4**); từ phân đoạn **EA-10.4** thu được hợp chất **9** (32,0 mg); phân đoạn **EA-10.2** (520 mg) tiếp tục được tinh chế trên cột Sephadex LH-20 thu được hợp chất **8** (225,4 mg). Phân đoạn **EA-16** (10 g) được dùng một phần (1,2 g) để phân tách tiếp trên cột MPLC (điều kiện cột **MPLC-EA-16** ở Mục 2.2.1.1) thu được 6 phân đoạn; phân đoạn **EA-16.2** và **EA-16.6** được cô loại acetonitril và đông khô thu được các chất tương ứng là **10** (35,2 mg) và **13** (43,1 mg).

Bảng 3.2. Các hợp chất phân lập từ cao EA

Nhóm	Chất	KL ^a	Tên hợp chất
CQA	3	49,9	acid caffeic
	10	35,2	3,4-diCQA
	13	43,1	4,5-diCQA
Dẫn xuất acid benzoic	18	48,6	aldehyd protocatechuic
	19	13,2	acid protocatechuic
	20	6,2	4- <i>p</i> -hydroxy benzaldehyd
	8	225,4	scolymosid
Flavonoid	9	552,3	cynarosid
	17	16,7	luteolin
	16	180,7	cynatriol

KL^a là khối lượng (mg); CQA: Caffeoyquinic acid

Ghi chú: Các pic đánh số **1 - 13** là các chất được phân lập, thứ tự đánh số dựa vào thứ tự rửa giải so với cao EA và cao toàn phần. Các chất có hàm lượng thấp không xuất hiện pic trên SKĐ được đánh số theo trình tự phân lập và nối tiếp với chất đã phân lập. Các chất được xác định cấu trúc bằng phổ NMR (xem Mục 3.1.2).



Hình 3.5. SKĐ các phân đoạn cột VLC-EA dùng để phân lập các chất

Kết quả kiểm tra tinh khiết cho thấy các chất phân lập đều đạt tinh khiết SKLM và có độ tinh khiết HPLC-PDA trên 95 % (ngoại trừ 3,4-diCQA và 3,5-diCQA). Do vậy, các chất này được dùng để tiến hành đo phổ NMR (xem **Bảng 3.3**).

Bảng 3.3. Tổng kết các hợp chất phân lập từ cao EA và Bu

STT	Ký hiệu hợp chất	Nhóm	KL ^a	Tên hợp chất ^c	Tinh khiết	
					SKLM	HPLC (%)
1	1	mono-CQA	12,36	1-CQA ^b	+	99,17
2	2		13,43	3-CQA ^b	+	97,78
3	3		49,9	acid caffeic ^{b, h}	+	97,53
4	4		49,4	acid chlorogenic ^b	+	98,69
5	5		21,7	4-CQA ^b	+	97,16
6	7		9,49	3-feruloylquinic ^b	+	99,67
7	6	di-CQA	83,5	cynarin	+	98,60
8	10		85,2	3,4-diCQA ^b	+	90,47
9	11		63,3	3,5-diCQA ^b	+	91,22
10	12		74,4	1,5-diCQA ^b	+	95,99
11	13		43,1	4,5-diCQA ^b	+	96,39
12	18	Dẫn xuất acid benzoic	48,6	aldehyd protocatechuic ^b	+	95,99
13	19		13,2	acid protocatechuic ^b	+	97,36
14	20		6,2	4- <i>p</i> -hydroxy benzaldehyd ^b	+	95,24
15	8	Flavonoid	423,2	scolymosid ^{b, e}	+	99,61
16	9		572,3	cynarosid ^h	+	97,70
17	17		16,7	luteolin ^h	+	95,61
18	15		2,4	apigenin-7-rutinosid ^c	+	96,47
19	16	Sesquiterpen lacton	180,7	cynaratrion ^{c,d}	+	- ^d
20	14	Acid hữu cơ	133,5	acid succinic	+	97,21

^a: Khối lượng (mg); ^b: Hợp chất lần đầu tiên được phân lập trong loài Actisô tại Việt Nam.

^c: Các hợp chất đã được xác định bằng phổ NMR (xem **Mục 3.1.2**)

^d: Không kiểm tra tinh khiết HPLC do kém phân cực và kém nhạy với đầu dò PDA.

^e: Trùng với các chất đã được phân lập năm 2011¹⁶⁴

3.1.1.4. Phân lập chất đối chiếu

Acid chlorogenic (**AC**), cynarin (**CY**) và cynarosid (**CR**) là các thành phần chính và có tác dụng sinh học đã được chứng minh của lá Actisô. Do đó, các chất này sẽ được lựa chọn làm nguyên liệu thiết lập CDC.

Cao khô Actisô (Số lô CNC1.1 có hàm lượng CY 2,6 %; AC 2,3 %) đã nghiên cứu điều chế ở **Mục 3.4.3** được lựa chọn làm nguyên liệu chiết xuất phân lập các chất

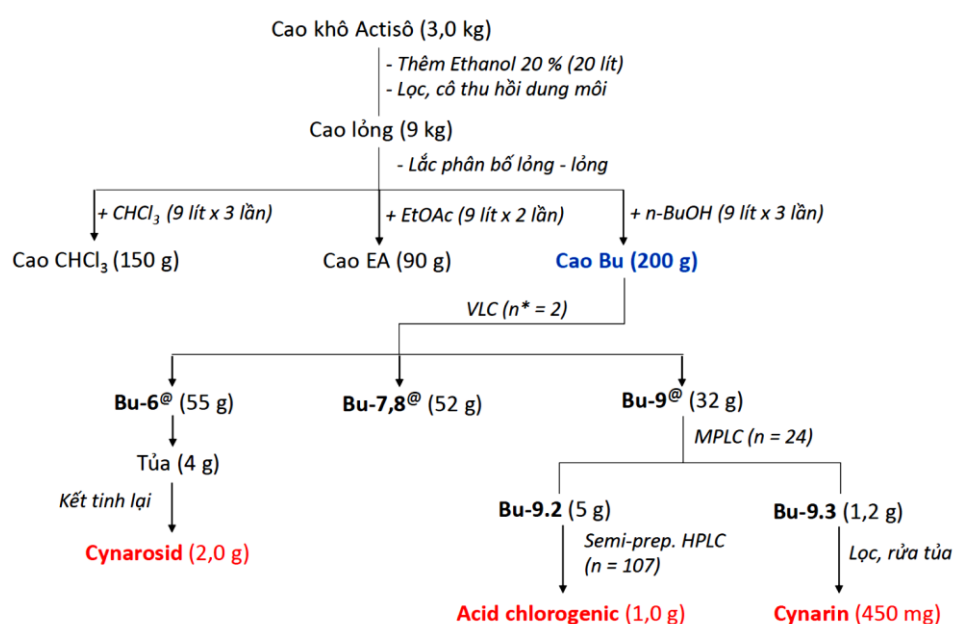
CĐC (acid chlorogenic, cynarin và cynarosid). Ethanol 20 - 40 % đã được khảo sát là dung môi có khả năng hòa tan tốt nhất với hàm lượng hoạt chất cao nhất đối với cao khô Actisô (xem **Mục 3.2.2.2**). Sau khi được hòa tan, cao lỏng Actisô được lọc và tiến hành loại tạp bằng cách lắng phân bố lỏng - lỏng (**Hình 3.6**) và tiếp tục được phân lập bằng các kỹ thuật sắc ký như sau:

Phân lập CĐC cynarosid và phân tách các phân đoạn giàu AC và CY bằng sắc ký cột chân không (Cột CĐC.VLC-Bu): 100 g cao *n*-butanol (độ ẩm 25 %) được triển khai trên VLC với cột 7×40 cm, khối lượng 600 g silica gel 0,04-0,063 mm, pha động ethyl acetat và methanol với lượng methanol tăng dần (xem **Bảng 3.4**). Kiểm tra các phân đoạn trên SKLM, gom các phân đoạn có thành phần giống nhau. Kết quả thu được 9 phân đoạn (**Bu-1** đến **Bu-9**). Từ **Bu-6** thu được 4,0 g kết tủa màu vàng, tủa này được kết tinh lại 2 lần trong methanol thu được **cynarosid (2,0 g)**. Phân đoạn **Bu-6** sau khi hết tủa được cô thu hồi dung môi. **Bu-6 đến Bu-9** là các phân đoạn có khối lượng lớn và có nhiều AC và CY nên được làm nguyên liệu để phân lập các hợp chất này trên MPLC (xem **Hình 3.7**).

Phân lập cynarin và phân tách phân đoạn giàu acid chlorogenic bằng sắc ký lỏng áp suất trung bình (CĐC.MPLC-Bu-9): Triển khai phân đoạn **Bu-9** ($1 \text{ g} \times 24$ lần) trên hệ thống máy MPLC, cột sắc ký $2,5 \times 50$ cm, 170 g silica gel C_{18} ($0,04 \times 0,063$ mm), pha động gồm acetonitril (dung môi B) và acid formic 0,1% (dung môi A) với chương trình gradient như sau: 8 % B (4 phút) 8 - 15 % B (70 phút), 15 % B (30 phút), 15 - 30 % B (90 phút), 30 % B (30 phút), 30 - 100 % B (15 phút), tổng thời gian là 240 phút, tốc độ dòng 10 ml/phút, thể tích hứng 20 ml và bước sóng phát hiện 323 nm. Kết quả cho thấy có 3 phân đoạn chính (**Bu-9.1 đến Bu-9.3**) (**Hình 3.7**), trong đó PD **Bu-9.3** được kiểm tra trên HPLC-PDA có thời gian lưu và phổ UV trùng với cynarin chuẩn, gộp tất cả các phân đoạn này của 24 cột, cô thu hồi dung môi, làm lạnh, xuất hiện tủa, lọc tủa dưới áp suất giảm thu được **cynarin (450 mg)** có dạng bột vô định hình màu trắng.

Phân lập acid chlorogenic bằng semi-prep. HPLC (Cột CĐC.Semi-prep.HPLC-Bu-9.2): Phân đoạn **Bu-9.2** của cột MPLC được hòa tan trong nước với nồng độ 35

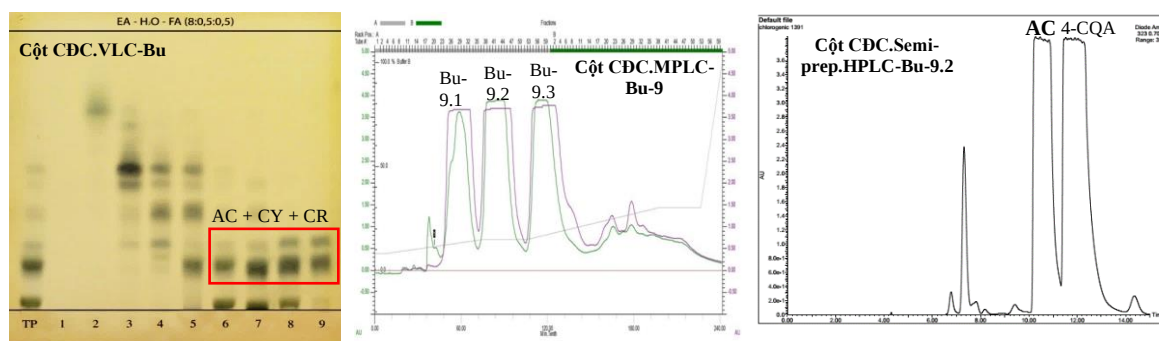
mg/ml sau đó được triển khai nhiều lần (107 lần, mỗi lần 15 phút) trên cột sắc ký lỏng bán điều chế áp suất cao với pha động gồm acetonitril (B) và acid formic 0,1% (A) với chương trình isocratic tỉ lệ 12 : 88, tốc độ dòng 3 ml/phút, thể tích tiêm mẫu 80 µl, và bước sóng phát hiện 323 nm. Kết quả cho thấy có 2 pic chính (**Hình 3.7**) trong đó pic 1 có thời gian lưu và phổ UV trùng với acid chlorogenic chuẩn, gộp tất cả các lần hứng pic 1 sau nhiều lần triển khai, cô dưới áp suất giảm để loại acetonitril, đông khô và thu được **acid chlorogenic (1,0 g)** và chất 4-CQA (550 mg). Sơ đồ chiết xuất phân lập các nguyên liệu CDC được trình bày ở **Hình 3.6**.



Hình 3.6. Sơ đồ chiết xuất và phân lập các nguyên liệu CDC

Ghi chú: *n: Lặp lại n lần với cùng điều kiện sắc ký (n=2, mỗi cột VLC thực hiện 1-2 ngày; n=24, mỗi cột MPLC thực hiện 3 giờ; n=107, mỗi cột semi-prep.HPLC thực hiện 15 phút)

@Các PD giàu CY và AC, có thể dùng phân lập tiếp các hợp chất này bằng MPLC



Hình 3.7. Kết quả phân lập CDC bằng các kỹ thuật sắc ký

Ghi chú: AC (acid chlorogenic); CY (cynarin); CR (cynarosid)

Bảng 3.4. Kết quả phân tách các phân đoạn của cột CDC.VLC-Bu

PĐ	Hệ dung môi	Bình	V (lít)	P ₁ (g)	P ₂ (g)	P (g)
1	EA	1	0,5	0,3	0,2	0,5
2	EA - MeOH - H ₂ O (6:0,5:0,5)	2	0,5	0,5	0,5	1,0
3	EA - MeOH - H ₂ O (6:0,5:0,5)	3	0,5	1,0	0,8	1,8
4	EA - MeOH - H ₂ O (6:0,5:0,5)	4	0,5	1,2	0,9	2,1
5	EA - MeOH - H ₂ O (6:0,5:0,5)	5 - 8	2,0	3,1	2,9	6,0
6	EA - MeOH - H ₂ O (5:0,5:0,5)	9 - 16	4,0	27,0	28,0	55,0
	EA - MeOH - H ₂ O (2:0,5:0,5)	17 - 24	4,0	tủa	tủa	tủa (4 g)
7	EA - MeOH - H ₂ O (2:0,5:0,5)	25 - 27	1,5	6,3	6,7	13,0
8	EA - MeOH (1:1)	28 - 31	2,0	20,8	18,4	39,2
9	EA - MeOH (2:8)	32 - 50	9,0	11,0	10,0	21,0

P₁: khối lượng thực tế thu được từ cột VLC 1

P₂: khối lượng thực tế thu được từ cột VLC 2

P: khối lượng thực tế thu được từ 2 cột VLC

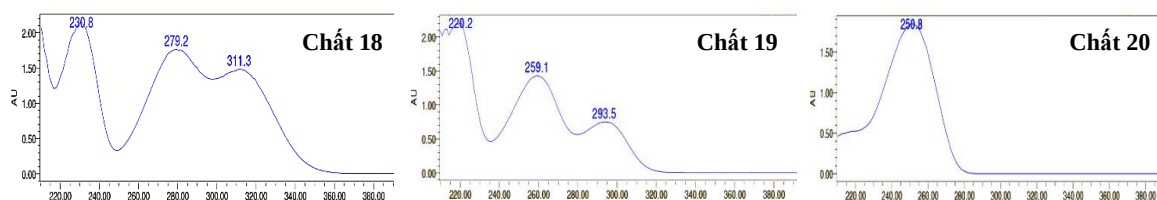
Các nguyên liệu thiết lập CDC được phân lập gồm acid chlorogenic (1,0 g), cynarin (450 mg) và cynarosid (2,0 g) sẽ được thiết lập chuẩn thứ cấp (xem **Mục 3.2.1**).

3.1.2. Xác định cấu trúc

3.1.2.1. Dẫn xuất acid benzoic

Hợp chất **18**, **19** và **20** là dạng bột vô định hình, tan tốt trong methanol, cho phản ứng dương tính với thuốc thử FeCl₃.

Phổ UV λ_{max} (MeOH): Hợp chất **18** có 3 đỉnh hấp thụ cực đại ở (230,8; 279,2 và 311,3 nm); hợp chất **19** có 3 đỉnh ở (220,2; 259,1 và 293,5 nm); hợp chất **20** chỉ có 1 đỉnh hấp thụ cực đại ở 250,8 nm (xem **Hình 3.8**).



Hình 3.8. Phổ UV của hợp chất 18 - 20

Phổ ESI-MS (ES⁻) m/z: Hợp chất **18**, **19** và **20** có ion [M-H]⁻ với m/z tương ứng là 137,0; 153,0 và 121,1. Do đó, KLPT và CTPT dự đoán của các chất là 138,0 (C₇H₆O₃, chất **18**), 154,0 (C₇H₆O₄, chất **19**) và 122,1 (C₇H₆O₂, chất **20**) (**Phụ lục 9**).

Phổ ¹³C-NMR: Có 7 tín hiệu cộng hưởng của carbon, trong đó có 1 nhóm

carbonyl acid ở δ_C 168,4 (C-7) của hợp chất **19** hoặc carbonyl aldehyd ở δ_C 190,9 - 197,3 (C-7) của hợp chất **18** và **20**. Sáu tín hiệu cộng hưởng còn lại đều tập trung ở vùng δ_C 114,2 - 161,4 đặc trưng của vòng thơm. Riêng hợp chất **20** có 2 tín hiệu carbon ở δ_C 131,4 (C-2 và C-6) và δ_C 115,0 (C-3 và C-5) có cường độ mạnh gợi ý vòng thơm có cấu trúc đối xứng qua trục (**Phụ lục 31, Phụ lục 32, Phụ lục 33**).

Phổ $^1\text{H-NMR}$: Hợp chất **18** và **19** có 3 tín hiệu proton tại [δ_H 7,22 - 7,32 (1H, *d*, 2,0); δ_H 6,73 - 6,89 (1H, *d*, 8,0) và δ_H 7,25 - 7,25 (1H, *dd*, 8,0; 2,0)] và các proton này tương tác với nhau theo hệ ABX chứng tỏ vòng thơm bị thế ở các vị trí 1, 3, 4. Hợp chất **20** có 2 cặp tín hiệu proton ở δ_H 6,80 (2H, *d*, 8,0) và δ_H 7,77 (2H, *d*, 8,0) phù hợp với dữ liệu thu được từ phổ $^{13}\text{C-NMR}$ giúp khẳng định cấu trúc đối xứng của chất này (**Phụ lục 31, Phụ lục 32, Phụ lục 33**).

So sánh dữ liệu phổ ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$) với tài liệu đã công bố, các hợp chất **18**, **19** và **20** được xác định tương ứng là **aldehyd protocatechuic**¹⁶⁵; **acid protocatechuic**¹⁶⁵ và **4-hydroxybenzaldehyd**¹⁶⁶. Cấu trúc và dữ liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của các hợp chất được trình bày ở **Bảng 3.5** và **Bảng 3.6**.

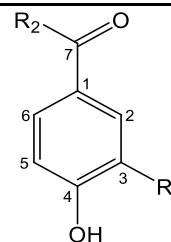
Bảng 3.5. Dữ liệu phổ ^1H và $^{13}\text{C-NMR}$ của hợp chất 18-20

Vị trí	Chất 18 ^{a, b} (aldehyd protocatechuic)		Chất 19 ^{a, b} (acid protocatechuic)		Chất 20 ^{a, b} (4-hydroxy benzaldehyd)	
	δ_C	δ_H (J)	δ_C	δ_H (J)	δ_C	δ_H (J)
1	128,6	-	123,9	-	121,9	-
2	114,2	7,22 <i>d</i> (2,0)	115,1	7,32 <i>d</i> (2,0)	131,4*	6,80 <i>d</i> (8,0)
3	146,0	-	144,9	-	115,0*	7,77 <i>d</i> (8,0)
4	152,5	-	149,6	-	161,4	-
5	115,5	6,89 <i>d</i> (8,0)	117,0	6,73 <i>d</i> (8,0)	115,0*	7,77 <i>d</i> (8,0)
6	124,5	7,26 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	121,5	7,25 <i>dd</i> (8,0; 2,0)	131,4*	6,80 <i>d</i> (8,0)
7	190,9	-	168,4	-	197,3	-

δ_C, H (ppm); *J* (Hz); ^a: 500 MHz; ^b: Đo trong DMSO-*d*₆; *carbon đối xứng qua trục;

Bảng 3.6. Cấu trúc của các dẫn xuất acid benzoic phân lập 18 - 20

Kí hiệu	Tên hợp chất	R ₁	R ₂
18	Aldehyd protocatechuic	OH	H
19	Acid protocatechuic	OH	OH
20	4-hydroxy benzaldehyd	H	H

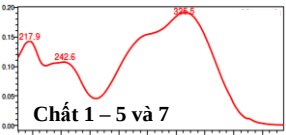
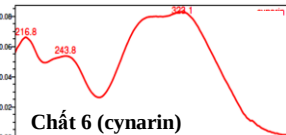


3.1.2.2. Dẫn xuất acid caffeic

11 hợp chất gồm **1 - 7** và **10 - 13** có dạng bột vô định hình màu trắng tan tốt trong methanol, cho phản ứng dương tính với thuốc thử FeCl_3 .

Phổ UV λ_{max} (MeOH): Các hợp chất đều có hình dạng phổ UV với 3 đỉnh hấp thụ cực đại tương tự nhau. Riêng hợp chất **6** (cynarin) có hình dạng vai của phổ UV hơi khác hơn so với các hợp chất còn lại (xem **Bảng 3.7**).

Bảng 3.7. Đặc điểm phổ UV và MS của chất 1-7 và 10-13

Nhóm	Hợp chất	Phổ ESI-MS (ES^-) (m/z)					UV (MeOH) (λ_{max} nm)	Hình dạng phổ UV
		$[\text{M}-\text{H}]^-$	Phân mảnh ion					
mono-CQA	3	179,6	-	-	-	135,4	217,9; 240,2; 324,4	
	1	353,1	-	191,1	-	-	217,9; 242,6; 325,5	
	2	353,1	-	191,1	179,1	-	217,5; 242,4; 325,5	
	4	353,1	-	191,1	-	-	217,7; 242,4; 325,3	
	5	353,1	-	191,1	179,1	173,1	217,5; 242,2; 324,5	
	7	367,2	-	191,1	179,1	-	218,0; 242,7; 326,9	
di-CQA	6	515,4	353,2	191,1	179,1	-	216,8; 243,8; 323,1	
	10	515,3	353,1	191,1	-	173,1	217,5; 243,6; 325,4	
	11	515,1	353,1	191,5	179,5	-	217,9; 242,6; 328,0	
	12	515,1	353,1	191,1	-	-	216,7; 243,8; 325,6	
	13	515,2	353,2	191,1	-	173,1	217,8; 242,4; 325,6	

Phổ ESI-MS (ES^-) m/z : Dựa vào đặc điểm phổ UV và đặc tính phân mảnh trên phổ ESI-MS (ES^-) của các chất (xem **Bảng 3.7**, **Phụ lục 6**, **Phụ lục 7**), so sánh với tài liệu ¹⁶⁷ có thể dự đoán các chất này là dẫn xuất của acid caffeic và các hợp chất này được chia làm 3 nhóm cấu trúc gồm:

- **Nhóm 1 (acid caffeic):** Hợp chất **3** có $[\text{M}-\text{H}]^-$ với m/z 179,1 [caffeoyl – H] $^-$. Do đó khối lượng phân tử là 180 với CTPT dự đoán là $\text{C}_9\text{H}_8\text{O}_4$.
- **Nhóm 2 (acid quinic + 1 acid caffeic):** Hợp chất **1, 2, 4, 5 và 7** được dự đoán là các mono-CQA do chúng đều có các mảnh ion $[\text{M}-\text{H}]^-$ với m/z = 353,1 và các phân mảnh ion đặc trưng gồm m/z = 191,1 [acid quinic – H] $^-$ hay $[\text{M}$ – caffeoyl – H] $^-$ và m/z 179,1 [caffeoyl – H] $^-$. Do đó, hợp chất **1, 2, 4 và 5** có KLPT là 354 phù hợp với CTPT là $\text{C}_{16}\text{H}_{18}\text{O}_9$. Hợp chất **7** có m/z = 367,2 có các phân mảnh ion cũng tương tự như hợp chất **1, 2, 4 và 5**. Do đó, hợp chất **7** có KLPT là 367 phù hợp với CTPT là $\text{C}_{17}\text{H}_{20}\text{O}_9$ (xem **Phụ lục 6**).

- **Nhóm 3 (acid quinic + 2 acid caffeic):** Hợp chất **6, 10, 11, 12** và **13** đều có ion $[M-H]^-$ với $m/z = 515,1$ và các ion đặc trưng gồm $m/z = 353,1$ $[M - \text{caffeoyl} - H]^-$ cùng các phân mảnh ion tương tự như ở nhóm 2 (**Bảng 3.7, Phụ lục 7**). Do đó các hợp chất này được dự đoán là di-CQA với CTPT phù hợp là $C_{25}H_{24}O_{12}$.

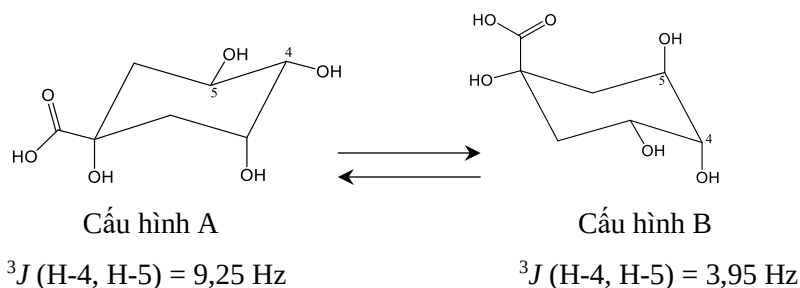
Phổ ^{13}C -NMR: Từ **Bảng 3.7** cho thấy hợp chất **1 - 7** và **10 - 13** được chia làm 3 nhóm cấu trúc như sau:

- **Nhóm 1 (Chất 3):** Có 9 tín hiệu carbon của 5 nhóm CH và 4 carbon bậc IV [1 nhóm carbonyl có δ_C 165,3 - 168,7 (C-9'); 2 carbon oxymethin vòng thơm ở δ_C 145,1 - 149,5 (C-3' và C-4') và 1 tín hiệu còn lại ở δ_C 125,3 - 127,8 (C-1')].
- **Nhóm 2 (Chất 1, 2, 4, 5 và 7):** Có 16 tín hiệu carbon gồm 9 tín hiệu tương tự với nhóm 1 và 7 tín hiệu khác [1 tín hiệu ở δ_C 171,1 - 177,1 (C-7) của nhóm carbonyl và 6 tín hiệu ở vùng trường cao ở δ_C 73,1 - 81,2]. Riêng hợp chất **7** có thêm 1 tín hiệu cường độ mạnh ở δ_C 51,7 gợi ý là 1 nhóm methoxy.
- **Nhóm 3 (Chất 6 và 10 - 13):** Có 25 tín hiệu carbon gồm 16 tín hiệu tương tự với nhóm 2, nhiều hơn nhóm hai 9 tín hiệu tương tự nhóm 1.

Khung acid caffeic của hợp chất **3** và các hợp chất **nhóm 2 (1, 2, 4, 5 và 7), nhóm 3 (6 và 10 - 13)** được xác định dựa trên sự xuất hiện của 2 cặp tín hiệu đỉnh đôi của 2 proton lần lượt ở δ_H 7,37 - 7,55 ($J = 16,0$) và 6,11 - 6,28 ($J = 16,0$) gợi ý là 2 proton olefinic H-7'(H-7'') và H-8'(H-8'') có liên hệ *trans* với nhau của một hoặc 2 nhóm acid caffeic. Ngoài ra, 3 tín hiệu proton của vòng thơm tương tác với nhau theo hệ ABX [H-2'(H-2'') d (2,0); H-5'(H-5'') d (8,0); H-6' (H-6'') dd (2,0; 8,0)] chứng tỏ vòng thơm có 3 vị trí thế ở 1, 3 và 4. Từ kết quả của phổ MS, phổ NMR (^{13}C , 1H , COSY, HMBC), kết hợp với so sánh dữ liệu phổ trong tài liệu ¹⁶⁸, hợp chất **3** được xác định là **acid caffeic** ¹⁶⁸. Các hợp chất thuộc nhóm 2 và 3 đều có nhóm thế acyl là acid caffeic, trong đó nhóm 2 và 3 được dự đoán lần lượt là mono-CQA và di-CQA. Hợp chất **7** có thêm 1 tín hiệu của carbon methoxy ở δ_C 51,7 và 3 proton của nhóm OCH_3 ở δ_H 3,56. Kết hợp với các mối tương quan trong phổ HMBC giữa các proton này với δ_C 145,1 (C-5') có thể xác nhận hợp chất **7** có nhóm thế acyl là **acid ferulic**.

Khung acid quinic của các hợp chất **nhóm 2 (1, 2, 4, 5, 7) và nhóm 3 (6; 10 - 13)** được xác định dựa trên 7 tín hiệu cộng hưởng trên phổ ^{13}C -NMR [3 oxymethin ở

δ_C 63,9 - 77,0 (C-3, C-4 và C-5); 2 methylen ở δ_C 33,0 - 40,8 (C-2 và C-6); 1 carbon bậc 4 oxy hóa ở δ_C 72,9 - 81,2 (C-1) và 1 nhóm carbonyl ở δ_C 173,1 - 178,2 (C-7)]. Phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy sự cộng hưởng đôi với ba proton oxymethin ở δ_H 3,31 - 5,34 (H-3, H-4 và H-5) và hai cặp proton methylen ở δ_H 1,76 - 2,25 [(2H) H-2 và (2H) H-6]. Cấu hình của acid quinic được xác định dựa trên hằng số ghép J của H-4 và H-5 (Hình 3.9). Hằng số ghép 3J (H-4, H-5) của các hợp chất nhóm 2 và 3 có giá trị từ 8,0 - 11,5 Hz, do vậy các hợp chất này phù hợp với cấu hình A của acid quinic¹⁶⁹.



Hình 3.9. Cấu hình của acid quinic

Phổ $^1\text{H-NMR}$: Phân tích tín hiệu các proton của acid quinic ở vùng trường cao có δ_H 3,31 - 5,63 (H-3, H-4 và H-5) bằng cách quan sát tín hiệu downfield rõ của các proton này so với phổ của acid quinic chứng tỏ tại vị trí này có liên kết với nhóm acyl^{167,170,171} (xem **Bảng 3.8** và **Bảng 3.9, Phụ lục 10, Phụ lục 11**).

Phổ 2D-NMR (COSY, HMBC): Dữ liệu phổ COSY ghi nhận được các tương tác của các proton kế cận của acid quinic giúp xác định vị trí các proton này trong cấu trúc. Phổ HMBC cho thấy sự tương tác giữa (H-2' và C-7'); (H-7' và C-9') giúp khẳng định sự liên kết của vòng thơm với mạch nhánh C₃ - olefinic.

Cấu trúc của các hợp chất nhóm 2 (**1, 2, 4, 5** và **7**): So sánh dữ liệu phổ ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$) của các hợp chất này với các tài liệu đã công bố, các hợp chất nhóm 2 được xác định tương ứng lần lượt là **acid 1-caffeoylquinic**¹⁷², **acid 3-caffeoylquinic**^{172,173}, **5-caffeoylquinic (acid chlorogenic)**¹⁷³, **acid 4-caffeoylquinic**^{172,173} và **3-feruloylquinic**¹⁷⁴ (**Phụ lục 14, Phụ lục 15, Phụ lục 17, Phụ lục 18**).

Cấu trúc của các hợp chất nhóm 3 (**6** và **10 - 13**): So sánh dữ liệu phổ ($^1\text{H-NMR}$ và $^{13}\text{C-NMR}$) của các hợp chất này với các tài liệu đã công bố, các hợp chất nhóm 2 được xác định tương ứng là **acid 1,3-dicafeoylquinic (cynarin)**¹⁷⁵, **acid 3,4-dicafeoylquinic**¹⁷³, **acid 3,5-dicafeoylquinic**¹⁷³, **acid 1,5-dicafeoylquinic**¹⁷³ và **4,5-dicafeoylquinic**¹⁷³ (**Phụ lục 19, Phụ lục 23, Phụ lục 24, Phụ lục 25, Phụ lục 26**).

Bảng 3.8. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất 1 - 5 và 7 so với acid quinic từ tài liệu

Vị trí	Chất 1 ^{a, c} (1-CQA)	Chất 2 ^{a, c} (3-CQA)	Chất 4 ^{a, d} (5-CQA)	Chất 5 ^{a, c} (4-CQA)	Chất 7 ^{a, c} (3-FQA)	Chất 3 ^{a, d} (Acid caffeic)	Acid quinic ^{b, c} ¹⁶⁹
	δ_{H} (J)	δ_{H} (J)	δ_{H} (J)	δ_{H} (J)	δ_{H} (J)	δ_{H} (J)	δ_{H} (J)
2a*	2,06-2,13 ^a m	1,84 ^a m	2,18-2,27 ^a m	1,81-1,88 ^a m	2,07-2,13 ^a m	-	1,60-1,70 dd (13,0; 3,3)
2b*	2,06-2,13 ^a m	1,85 ^a m	2,18-2,27 ^a m	1,81-1,88 ^a m	2,07-2,13 ^a m	-	1,60-1,70 dd (13,3; 3,3)
3	3,84 m	5,17 m	4,19 m	4,10 brd	5,01 m	-	3,80 td (3,3; 2,2)
4	3,31 ^b	3,53 ^a d (3,0)	3,74 dd (8,5; 3,5)	4,66 dd (8,0; 3,0)	3,57 m	-	3,20 dd (7,8; 2,2)
5	3,95 brd	3,86 dd (11,5; 6,0)	5,34 m	4,00 m	3,87 m	-	3,70 td (7,8; 4,0)
6a*	2,21-2,25 ^a m	2,00 ^a m	2,05-2,12 ^a m	1,92-2,02 ^a m	1,76 m	-	1,70-1,80 dd (7,8; 4,0)
6b*	2,21-2,25 ^a m	1,89 ^a	2,05-2,12 ^a m	1,92-2,02 ^a m	1,94 m	-	1,78-1,80 dd (7,8; 4,0)
2'	7,02 d (2,0)	7,02 d (2,0)	7,06 d (2,0)	7,04 d (1,5)	7,02 d (1,5)	7,06 d (2,0)	-
5'	6,76 d (8,0)	6,76 d (8,0)	6,80 d (8,0)	6,77 d (8,0)	6,76 d (8,5)	6,79 d (8,5)	-
6'	6,97 dd (8,0; 2,0)	6,97 dd (8,0; 2,0)	6,97 dd (8,5; 2,0)	7,00 d (8,0; 1,5)	6,90 dd (8,5; 1,5)	6,95 dd (8,5; 2,0)	-
7'	7,41 d (16,0)	7,46 d (16,0)	7,57 d (16,0)	7,50 d (16,0)	7,37 d (16,0)	7,55 d (16,0)	-
8'	6,18 d (15,5)	6,20 d (16,0)	6,27 d (16,0)	6,28 d (16,0)	6,11 d (16,0)	6,24 d (16,0)	-
OCH ₃	-	-	-	-	[3H] 3,56 s	-	-
3-OH	1,77 s	-	-	-	-	-	-
4-OH	4,56 s	4,87 d (4,0)	-	4,90 d (6,5)	4,72 s	4,72 s	-
5-OH	4,25 d (3,5)	-	-	3,82 s	-	-	-
3'-OH	9,16 s	9,17 s	-	9,17 s	9,20 s	9,20 s	-
4'-OH	9,57 s	9,53 s	-	9,53 s	9,60 s	9,58 s	-

δ_{H} (ppm); J (Hz); ^a: 500 MHz; ^b: 300 MHz; ^c: Đo trong DMSO-*d*₆; ^d: Đo trong CD₃OD; brd: tín hiệu rộng; ^etín hiệu chồng chập; * giá trị có thể hoán đổi cho nhau

Bảng 3.9. Dữ liệu phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất 6, 10 - 13 so với acid quinic từ tài liệu

Vị trí	Chất 6 ^{a, e} (cynarin) $\delta_{\text{H}} (J)$	Chất 10 ^{b, e} (3,4-diCQA) $\delta_{\text{H}} (J)$	Chất 11 ^{b, e} (3,5-diCQA) $\delta_{\text{H}} (J)$	Chất 12 ^{a, d} (1,5-diCQA) $\delta_{\text{H}} (J)$	Chất 13 ^{a, d} (4,5-diCQA) $\delta_{\text{H}} (J)$	Acid quinic ^{c, d} ¹⁶⁹ $\delta_{\text{H}} (J)$
2a*	1,86 <i>m</i>	2,04-2,13 ^f <i>m</i>	2,15-2,32 ^f <i>m</i>	2,26-2,36 ^f <i>m</i>	2,04-2,15 ^f <i>m</i>	1,60-1,70 <i>dd</i> (13,0; 3,3)
2b*	2,33 <i>m</i>	2,04-2,13 ^f <i>m</i>	2,15-2,32 ^f <i>m</i>	2,26-2,36 ^f <i>m</i>	2,04-2,15 ^f <i>m</i>	1,60-1,70 <i>dd</i> (13,3; 3,3)
3	5,39 <i>brd</i>	5,63 <i>m</i>	5,48 <i>dd</i> (3,6; 3,3)	4,06 <i>m</i>	4,18 <i>m</i>	3,80 <i>td</i> (3,3; 2,2)
4	3,65 <i>dd</i> (9,5; 3,5)	5,09 <i>dd</i> (7,4; 2,9)	3,95 <i>dd</i> (8,5; 3,3)	3,60 <i>dd</i> (8,2; 3,1)	4,96 <i>dd</i> (7,8, 3,1)	3,20 <i>dd</i> (7,8; 2,2)
5	4,25 <i>m</i>	4,25 <i>m</i>	5,42 <i>dd</i> (8,5; 3,8)	5,22 <i>td</i> (9,0; 4,0)	5,36 <i>d</i> (4,2)	3,70 <i>td</i> (7,8; 4,0)
6a*	2,54 <i>m</i>	2,25-2,29 ^f <i>m</i>	2,13-2,34 ^f <i>m</i>	1,87-1,91 <i>m</i>	1,98-1,81 ^f <i>m</i>	1,70-1,80 <i>dd</i> (7,8; 4,0)
6b*	2,90 <i>m</i>	2,25-2,29 ^f <i>m</i>	2,13-2,34 ^f <i>m</i>	1,87-1,91 <i>m</i>	1,98-1,81 ^f <i>m</i>	1,70-1,80 <i>dd</i> (7,8; 4,0)
2' (2'')	6,84 (6,95) <i>d</i> (2,0)	7,02 (7,03) <i>d</i> (2,0)	7,07 (7,06) <i>d</i> (2)	7,04 (7,05) <i>d</i> (2,0)	7,01 (7,02) <i>d</i> (2,0)	-
5' (5'')	6,54 (6,66) <i>d</i> (8,0)	6,89 (6,91) <i>d</i> (8,0)	6,78 (6,76) <i>d</i> (8,2)	6,78 (6,78) <i>d</i> (8,0)	6,74 (6,75) <i>d</i> (8,0)	-
6' (6'')	6,61 (6,77) <i>dd</i> (8,0; 2,0)	6,74 (6,75) <i>dd</i> (8,0; 2,0)	6,97 (6,96) <i>dd</i> (8,2; 2,0)	6,98 (6,99) <i>m</i>	6,96 (6,98) <i>dd</i> (8,5; 2,0)	-
7' (7'')	7,48 (7,51) <i>d</i> (16,0)	7,52 (7,56) <i>d</i> (16,0)	7,61 (7,57) <i>d</i> (16,0)	7,45 (7,48) <i>d</i> (16,0)	7,43 (7,49) <i>d</i> (15,0)	-
8' (8'')	6,14 (6,21) <i>d</i> (16,0)	6,24 (6,27) <i>d</i> (16,0)	6,34 (6,24) <i>d</i> (16,0)	6,20 (6,21) <i>d</i> (16,0)	6,14 (6,24) <i>d</i> (16,0)	-
3-OH	-	-	-	4,52 <i>s</i>	-	-
4-OH	-	-	-	4,90 <i>s</i>	-	-
5-OH	-	-	-	-	4,50 <i>s</i>	-
3' (3'')-OH	-	-	-	-	9,58 (9,58) <i>s</i>	-
4' (4'')-OH	-	-	-	-	9,10 (9,10) <i>s</i>	-

δ_{H} (ppm); J (Hz); ^a 500 MHz; ^b 400 MHz; ^c 300 MHz; ^d Đo trong DMSO- d_6 ; ^e Đo trong CD_3OD ; *brd* Tín hiệu rộng

^f Tín hiệu chồng chập; * vị trí a,b có thể hoán đổi cho nhau

Bảng 3.10. Dữ liệu phổ ^{13}C -NMR của chất 1 - 5 và 7 so với acid quinic từ tài liệu

Vị trí	Chất 1 ^{a, c} (1-CQA) δ_{C}	Chất 2 ^{a, c} (3-CQA) δ_{C}	Chất 4 ^{a, d} (5-CQA) δ_{C}	Chất 5 ^{a, c} (4-CQA) δ_{C}	Chất 7 ^{a, c} (5-FQA) δ_{C}	Chất 3 ^{a, d} (a. caffeic) δ_{C}	Acid quinic ^{b, c} ¹⁶⁹ δ_{C}
1	81,2	72,9	76,2	74,1	73,0	-	74,7
2	39,0 ^f	39,0	38,2	40,8	37,2	-	40,7
3	67,5 ^f	71,0	71,3	63,9	71,0	-	69,3
4	74,2	71,2	72,0	77,0	69,3	-	74,8
5	66,4	67,3	73,5	66,6	66,8	-	66,9
6	34,4	35,1	38,8	37,7	35,1	-	37,6
7	173,1	176,1	177,1	175,3	173,6	-	175,8
1'	125,5	125,7	127,8	125,6	125,3	127,9	-
2'	114,6	115,1	116,5	114,7	114,6	116,5	-
3'	145,6	145,6	147,1	145,6	145,1	146,8	-
4'	148,3	148,2	149,5	148,3	148,4	149,4	-
5'	115,8	115,8	115,3	115,8	115,8	116,5	-
6'	121,2	121,1	122,9	121,2	121,2	122,9	-
7'	145,0	144,4	146,8	144,8	145,1	147,0	-
8'	114,7	114,6	115,2	114,6	113,8	115,7	-
9'	165,3	166,1	168,7	166,3	165,3	171,2	-
OCH ₃	-	-	-	-	51,7	-	-

^a 125 MHz; ^b 75 MHz; ^c Đo trong DMSO-*d*₆; ^d Đo trong CD₃OD; δ_{C} (ppm); ^f Suy ra từ phổ HSQC

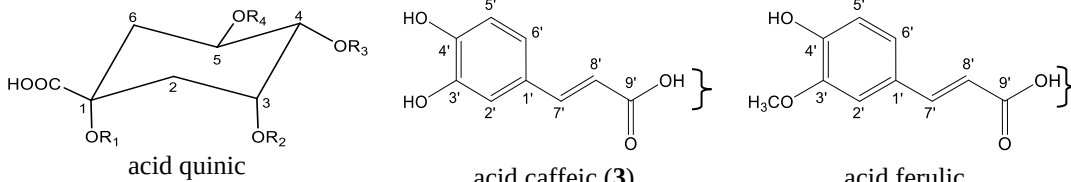
Bảng 3.11. Dữ liệu phổ ^{13}C -NMR của chất 6 và 10 - 13 so với acid quinic từ tài liệu

Vị trí	Chất 6 ^{a, e} (cynarin) δ_{C}	Chất 10 ^{b, e} (3,4-diCQA) δ_{C}	Chất 11 ^{b, e} (3,5-diCQA) δ_{C}	Chất 12 ^{a, d} (1,5-diCQA) δ_{C}	Chất 13 ^{a, e} (4,5-diCQA) δ_{C}	a. quinic ^b ¹⁶⁹ δ_{C}
1	81,2	77,8	74,2 ^g	79,6	73,4	74,7
2	33,0	37,6	35,2	34,2	37,4	37,6
3	73,0	70,0	70,8	67,6	66,2	69,3
4	75,3	75,6	70,3 ^f	71,0	77,2	74,8
5	67,8	66,8	72,1^f	70,0	69,6	66,9
6	41,3	40,4	37,6 ^f	35,9	37,0	40,7
7	174,6	177,3	178,2	172,7	174,6	175,8
1' (1'')	127,4 (127,5)	126,3 (126,4)	127,8 (128,0)	125,5 (125,5)	125,4 (125,4)	-
2' (2'')	116,1 (115,5)	114,7 (113,8)	115,8 (115,8)	114,8 (114,9)	114,8 (114,8)	-
3' (3'')	146,5 (146,7)	145,4 (145,4)	146,8 (146,8)	145,6 (145,6)	145,5 (145,5)	-
4' (4'')	149,2 (149,6)	148,1 (148,2)	149,5 (149,6)	148,4 (148,4)	148,4 (148,4)	-
5' (5'')	116,6 (116,6)	115,1 (115,1)	116,5 (116,5)	115,8 (115,9)	115,8 (115,7)	-
6' (6'')	122,0 (122,9)	121,7 (121,8)	123,0 (123,0)	121,2 (121,3)	121,4 (121,4)	-
7' (7'')	147,1 (147,7)	145,8 (145,9)	146,9 (147,1)	145,1 (145,1)	145,5 (145,4)	-
8' (8'')	115,4 (115,5)	113,6 (113,6)	115,1 (115,3)	114,2 (114,2)	113,8 (113,6)	-
9' (9'')	167,8 (168,8)	167,1 (167,0)	168,6 (169,1)	165,0 (166,2)	165,9 (165,5)	-

^a 125 MHz; ^b 100 MHz; ^c 75 MHz; ^d Đo trong DMSO-*d*₆; ^e Đo trong CD₃OD; δ_{C} (ppm);

^f Giá trị được suy ra từ phổ HSQC; ^g Giá trị được suy ra từ phổ HMBC

Bảng 3.12. Cấu trúc của các hợp chất 1-7 và 10-13

					
Kí hiệu	Tên chất	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	1-caffeoyl quinic	caffeoyl	H	H	H
2	3-caffeoyl quinic	H	caffeoyl	H	H
4	5-caffeoyl quinic (a. chlorogenic)	H	H	H	caffeoyl
5	4-caffeoyl quinic	H	H	caffeoyl	H
7	3-feruloylquinic	H	feruloyl	H	H
6	1,3-dicaffeoylquinic (cynarin)	caffeoyl	caffeoyl	H	H
10	3,4-dicaffeoylquinic	H	caffeoyl	caffeoyl	H
11	3,5-dicaffeoylquinic	H	caffeoyl	H	caffeoyl
12	1,5-dicaffeoylquinic	caffeoyl	H	H	caffeoyl
13	4,5-dicaffeoylquinic	H	H	caffeoyl	caffeoyl

3.1.2.3. Hợp chất flavonoid

Các hợp chất **8**, **9**, **15** và **17** có dạng bột vô định hình màu vàng, tan tốt trong methanol, ethanol, ethyl acetat, cho phản ứng dương tính với thuốc thử FeCl₃ và AlCl₃.

Phổ UV λ_{max} (MeOH): Các chất đều có hình dạng phổ UV với 3 đỉnh hấp thụ cực đại tương tự nhau. Hình dạng phổ UV của hợp chất **17** hơi khác hơn so với các chất còn lại (xem **Bảng 3.13**).

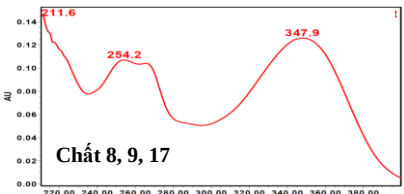
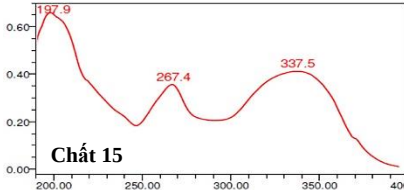
Phổ ESI-MS (ES)⁻ m/z: Các ion phân tử và phân mảnh ion *m/z* của 4 hợp chất (xem **Bảng 3.13**, **Phụ lục 8**) được phân tích như sau:

- Hợp chất **17** *m/z* 285,1 [M – H]⁻
- Hợp chất **9**: *m/z* 447,6 [M – H]⁻; 285,5 [M – glc – H]⁻
- Hợp chất **8**: *m/z* 593,3 [M – H]⁻; 447,4 [M – rha – H]⁻
- Hợp chất **15**: *m/z* 577,0 [M – H]⁻; 269,3 [M – glc – rha – H]⁻

Từ kết quả phân tích phổ ESI-MS cho thấy hợp chất **8** và **9** được dự đoán là hợp chất glycosid có cùng khung aglycon với hợp chất **17**. Hợp chất **15** cũng được dự đoán là một glycosid có 2 phân tử đường là glucose và rhamnose tương tự hợp chất **8** nhưng

khác khung aglycon. KLPT của các hợp chất được dự đoán lần lượt là $C_{15}H_{10}O_6$ (M=186, **chất 17**); $C_{21}H_{20}O_{11}$ (M=448, **chất 9**); $C_{27}H_{30}O_{15}$ (M=594, **chất 8**); $C_{27}H_{30}O_{14}$ (M= 578, **chất 15**).

Bảng 3.13. Đặc điểm phổ UV và MS của chất 8, 9, 15 và 17

Hợp chất	Phổ ESI-MS (ES ⁻) (m/z)				UV (MeOH) (λ _{max} nm)	
	[M-H] ⁻	Phân mảnh ion				
17	285,1	-	-	-	211,7; 254,3; 347,2	Chất 8, 9, 17
9	447,6	285,5	279,7	255,7	211,6; 254,2; 349,1	
8	593,4	515,3	447,4	-	211,6; 254,2; 347,9	
15	577,0	429,3	269,3	255,6	197,9; 267,4; 337,5	

Phổ ^{13}C -NMR: Phân tích 15 tín hiệu cộng hưởng của carbon trong vùng δ_C 98,9 - 184,0 [6 carbon bậc III, 8 carbon bậc IV và 1 nhóm carbonyl]. Tất cả các carbon bậc III và IV đều xuất hiện ở vùng trường thấp đặc trưng của các carbon sp^2 của nối đôi và vòng thơm gợi ý các hợp chất này có phần genin là một flavonoid. Hơn nữa, cả 4 hợp chất đều có 1 tín hiệu cộng hưởng ở vùng trường thấp có δ_C 181,7 - 184,0 (C-4) đặc trưng của khung flavon. Riêng hợp chất **15** có 2 tín hiệu cộng hưởng mạnh ở δ_C 115,7 và δ_C 128,3 là dấu hiệu của vòng B có cấu trúc đối xứng, chứng tỏ vòng B chỉ có 1 nhóm thế hydroxy. Ngoài ra, hợp chất **8, 9** và **15** có thêm các tín hiệu cộng hưởng ở δ_C 60,6 - 77,8 gợi ý là các tín hiệu của đường. Trong đó, hợp chất **9** là một mono-glycosid và hợp chất **8** và **15** là di-glycosid do có nhiều hơn 4 tín hiệu cộng hưởng ở vùng này so với hợp chất **17**. Kết quả cũng phù hợp với các tín hiệu quan sát được trên phổ MS của các hợp chất này (**Phụ lục 21, Phụ lục 22, Phụ lục 28, Phụ lục 30**).

Phổ 1H -NMR: Phân tích các tín hiệu ở δ_H 6,18 - 7,80 cho thấy hợp chất **8, 9** và **17** có 5 tín hiệu proton của vòng thơm gồm 2 proton ở vị trí *meta* tại δ_H 6,18 - 6,79 (1H, *d*, 2,0) thuộc vòng A và 3 proton thuộc vòng B của khung flavon tại [δ_H 7,39 - 7,42 (1H, *d*, 2,0); δ_H 6,87 - 6,93 (1H, *d*, 8,5) và δ_H 7,39 - 7,80 (1H, *dd*, 8,5; 2,0)] và các proton này tương tác với nhau theo hệ ABX chứng tỏ vòng B bị thế ở các vị trí

1', 3', 4'. Hợp chất **15** có các tín hiệu vòng A tương tự hợp chất **8, 9** và **17**, tuy nhiên vòng B có 2 cặp tín hiệu ở δ_H 6,87 (2H, *d*, 8,0) và δ_H 7,80 (2H, *d*, 8,0) là 2 cặp proton của nhóm CH vòng thơm đối xứng qua trục, phù hợp với kết quả thu được từ phổ ^{13}C -NMR. Như vậy, hợp chất **15** chỉ có 1 nhóm OH ở vòng B.

Phần đường của hợp chất **8, 9** và **15** được xác định dựa trên tín hiệu cộng hưởng của các proton ở δ_H 3,27 - 5,08 trong phổ ^1H -NMR. Các hợp chất này đều có tín hiệu đỉnh đôi ở δ_H 4,96 - 5,08 (1H, *d*, 7,5) gắn với carbon ở δ_C 99,9 - 101,7 gợi ý là proton anomer của đường hexose, trong đó hằng số ghép khoảng 7,5 Hz nên có thể xác định cấu trúc có liên kết *O*- β -D-glycosid¹⁷⁶. Kết hợp với 5 tín hiệu cộng hưởng ở δ_C 60,1 - 77,9 và 1 tín hiệu ở δ_C 99,9 - 101,7. Trong đó, có 1 tín hiệu tại δ_C 60,61 là một carbon methylen đặc trưng của đường glucose. Do đó, phần đường được dự đoán là β -D-glucopyranose. Phân tử đường thứ 2 của hợp chất **8** và **15** được xác định là đường α -L-rhamnopyranose dựa trên tín hiệu của proton ở δ_H 4,62 (1H, *d*, 1,5) hoặc tín hiệu đỉnh đơn rộng (1H, *s*, *brd*) và một tín hiệu đỉnh đôi của proton nhóm methyl ở δ_H 1,08 - 1,21 (1H, *d*, 6,4) (**Phụ lục 21, Phụ lục 22, Phụ lục 28**).

Phổ 2D-NMR (COSY và HMBC): Vị trí liên kết của phần đường ở C-7 của hợp chất **8, 9** và **15** được xác nhận bởi tương tác của proton anomer (H-1') của đường với carbon này trên phổ HMBC. Ngoài ra, tín hiệu tương tác giữa ở δ_H 4,74 - 4,62 (1H, *d*, 1,5, H-1'') và δ_C 66,0 - 67,5 (C-6'') cho phép xác định liên kết giữa 2 đường là (1 $\rightarrow$ 6). Chuyển dịch hoá học của các carbon được xác định bằng cách so sánh với phổ của các chất tương tự đã công bố và được xác nhận bởi các tương tác quan sát được trong phổ COSY và HMBC (**Phụ lục 21, Phụ lục 22, Phụ lục 28**).

So sánh dữ liệu phổ (^1H -NMR và ^{13}C -NMR) với các tài liệu đã công bố, các hợp chất **8, 9, 15** và **17** được xác định tương ứng là **luteolin-7-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(6 $\rightarrow$ 1)- α -L-rhamnopyranosyl]** hay **luteolin-7-O-rutinosid (scolymosid)**¹⁷⁷, **luteolin-7-O- β -D-glucopyranosid (cynarosid)**¹⁷⁸, **apigenin-7-O- $[\beta$ -D-glucopyranosyl-(6 $\rightarrow$ 1)- α -L-rhamnopyranosyl]** hay **apigenin-7-O-rutinosid (isorhoifolin)**¹⁷⁹ và **luteolin**¹⁸⁰. Cấu trúc và dữ liệu phổ ^1H và ^{13}C -NMR của các hợp chất được trình bày ở **Bảng 3.14** và **Bảng 3.15**.

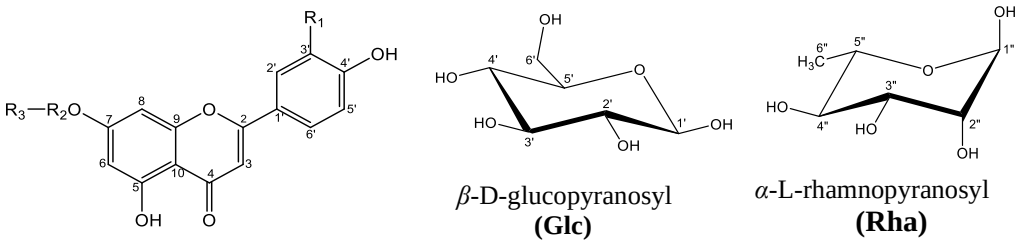
Bảng 3.14. Dữ liệu phổ ^{13}C và ^1H -NMR của chất 8, 9, 15 và 17

Vị trí	Chất 17 ^{c, e} (Luteolin)		Chất 9 ^{c, e} (Luteolin 7-glucosid)		Chất 8 ^{c, e} (Luteolin 7-rutinosid)		Chất 15 ^{d, f} (Apigenin 7-rutinosid)	
	δ_{C}	δ_{H} (J)	δ_{C}	δ_{H} (J)	δ_{C}	δ_{H} (J)	δ_{C}	δ_{H} (J)
2	164,0	-	164,4	-	166,9	-	165,5	-
3	102,9	6,65 s	103,1	6,74 s	104,3	6,59 s	102,6	6,58 s
4	181,7	-	181,8	-	184,0	-	182,7	-
5	161,5	-	161,1	-	162,9	-	161,6	-
6	98,9	6,18 d (2,0)	99,5	6,44 d (2,0)	101,2	6,52 d (2,5)	99,6	6,44 d (1,7)
7	164,2	-	162,9	-	164,7	-	163,3	-
8	93,9	6,44 d (2,0)	94,7	6,79 d (2,0)	96,2	6,73 d (2,0)	94,8	6,69 brd
9	157,4	-	156,9	-	158,9	-	157,5	-
10	103,8	-	105,3	-	107,1	-	105,7	-
1'	121,6	-	121,4	-	123,6	-	121,7	-
2'	113,4	7,41 d (2,0)	113,5	7,42 d (2,0)	114,4	7,39 ^h m	128,3*	7,80 d (8,0)
3'	145,8	-	145,7	-	147,0	-	115,7*	6,87 d (8,0)
4'	149,8	-	149,9	-	151,1	-	161,5	-
5'	116,1	6,89 d (8,5)	116,0	6,90 d (8,5)	116,9	6,93 d (9,0)	115,7*	6,87 d (8,0)
6'	119,1	7,39 dd (8,0; 2,0)	119,1	7,45 dd (8,5; 2,0)	120,6	7,41 ^h m	128,3*	7,80 d (8,0)
1''	-	-	99,9	5,08 d (7,5)	101,7	5,05 d (7,5)	100,1	4,96 d (7,2)
2''	-	-	73,1	3,27 m	74,8	3,51 ^h m	73,4	3,39 m
3''	-	-	76,4	3,32 m	77,2	3,69 ^h m	76,4	3,40 m
4''	-	-	69,6	3,19 t (9,0)	71,4	3,42 m	69,8	3,32 t (8,0)
5''	-	-	77,1	3,44 dd (9,5; 5,5)	77,8	3,53 ^h m	75,7	3,58 ^h m
6''a	-	-	60,6	3,71 d (10,5)	67,5	4,07 d (9,0)	66,0	3,96 d (9,6)
6''b	-	-	60,6	3,50 t (5,5)	67,5	3,69 m	66,0	3,57 ^h m
1'''	-	-	-	-	102,1	4,74 d (1,5)	100,7	4,62 brd
2'''	-	-	-	-	72,1	3,93 dd (3,5; 2,0)	70,5	3,81 brd
3'''	-	-	-	-	72,5	3,75 dd (9,5; 3,5)	71,0	3,61 dd (9,5; 3,3)
4'''	-	-	-	-	74,1	3,36 t (9,5)	72,6	3,24 d (9,5)
5'''	-	-	-	-	69,8	3,69 ^h m	68,4	3,56 ^h m
6'''	-	-	-	-	17,9	[3H] 1,21 d (6,5)	16,5	[3H] 1,08 d (5,0)

$\delta_{\text{C}}, \text{H}$ (ppm); J (Hz); ^c: 500 MHz; ^d: 800 MHz; ^e: Đo trong DMSO-*d*₆; ^f: Đo trong CD₃OD;

^h: Tín hiệu chồng chập; *carbon đối xứng qua trục; brd: Pic rộng

Bảng 3.15. Cấu trúc các hợp chất 8, 9, 15 và 17

				
Kí hiệu	Tên hợp chất	R₁	R₂	R₃
17	Luteolin	OH	H	-
9	Luteolin 7-glucosid	OH	glc (1'')	-
8	Luteolin 7-rutinosid	OH	glc (1'')	rha (6''→1''')
15	Apigenin 7-rutinosid	H	glc (1'')	rha (6''→1''')

Glc (1''): Glucose liên kết ở 1''; Rha (6''→1'''): Rhamnose liên kết với glucose ở 6'' (Glc) và 1''' (Rha)

3.1.2.4. Các hợp chất khác

a. Cynaratriol

Hợp chất 16: Là tinh thể không màu, tan tốt trong chloroform, kém tan trong methanol, không phát hiện được ở UV₂₅₄ và UV₃₆₅, cho màu tím với thuốc thử VS.

Phổ APCI-MS (APCI⁺): Có tín hiệu ion phân tử ở m/z 283,3. Do đó có khối lượng phân tử là 282,3 với công thức nguyên dự đoán là C₁₅H₂₂O₅ (**Phụ lục 9**).

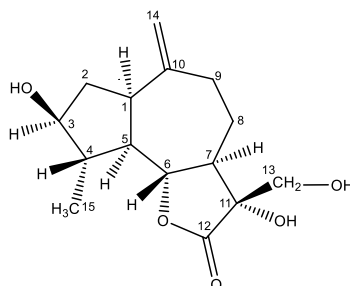
Phổ ¹³C-NMR: Có 15 tín hiệu cộng hưởng carbon. Kết hợp với phổ DEPT có thể xác định hợp chất **16** có 3 nhóm carbon bậc IV trong đó có 1 nhóm carbonyl có δ_C 178,6; 6 carbon bậc III, 5 carbon nhóm methylen; 1 nhóm methyl có δ_C 18,3. Các tín hiệu của carbon bậc III trong vùng trường cao δ_C 76,86 - 83,75 đặc trưng cho các carbon của nhóm oxymethin. Ngoài ra, có 1 tín hiệu của carbon bậc II xuất hiện trong vùng trường thấp ở δ_C 111,43 được gán cho carbon nhóm methylen olefin và 1 tín hiệu ở δ_C 63,12 được gán cho carbon nhóm oxymethylen. Từ phổ ¹³C-NMR và tổng quan thành phần hóa học (**Mục 1.2.2**), hợp chất **14** được dự đoán là 1 sesquiterpen lacton thuộc **khung guaianolid (Phụ lục 29)**.

Phổ ¹H-NMR: Hợp chất **16** có sự hiện diện của 2 cặp tín hiệu của proton methylen ở δ_H 3,42 - 4,82 (2H, *m*) được gán lần lượt cho các proton của nhóm oxymethylen và methylen olefin; 3 tín hiệu của proton methylen còn lại có δ_H 1,49-1,94 (3H, *m*). Hợp chất **16** có 6 tín hiệu proton của nhóm methin, trong đó 2 tín hiệu có δ_H 3,42 - 3,98 (1H, *m*) được gán cho các proton của nhóm oxymethin, 4 tín hiệu còn lại ở vùng từ trường cao hơn có δ_H 1,49 - 2,69 (1H, *m*) được gán cho các proton methin còn lại không oxy hóa (xem **Bảng 3.16, Phụ lục 29**).

Phổ 2D-NMR (COSY, HMBC): Các tương tác trong phổ COSY giữa các proton của nhóm methin cũng như nhóm methylen giúp xác định vị trí liên kết của chúng trong vòng cyclopentan và cycloheptan của khung guaianolid. Ngoài ra, dựa vào phổ HMBC để quan sát các tương tác giữa proton của nhóm hydroxy với các carbon cũng như tương tác giữa các nhóm olefin và ceton với proton tương ứng giúp xác định chắc chắn vị trí liên kết của chúng trong cấu trúc (xem **Phụ lục 29**).

So sánh dữ liệu phổ (¹H-NMR và ¹³C-NMR) của hợp chất **16** với hợp chất cynaratriol từ tài liệu đã công bố ¹⁸¹ (**Bảng 3.16**). Kết quả cho thấy hợp chất **16** khá

phù hợp. Do vậy, cấu trúc của hợp chất **16** được xác định là **cynaratriol** (Hình 3.10).



Hình 3.10. Cấu trúc của hợp chất 16

Bảng 3.16. So sánh dữ liệu phổ NMR của 16 và cynaratriol từ tài liệu

Vị trí	DEPT	a, c Chất 16		b, c Cynaratriol ¹⁸¹	
		δ_C	δ_H (J)	δ_C	δ_H (J)
1	CH	41,4	2,69 <i>dd</i> (17,5; 11,0)	42,7	3,30-3,60 <i>m</i>
2a*	CH ₂	38,3	1,49-1,61 ^e <i>m</i>	39,4	[2H] 1,4-3,0 <i>m</i>
2b*			1,88-1,94 ^e <i>m</i>		
3	CH	83,7	3,98 <i>t</i> (10,5)	85,2	3,30-3,60 <i>m</i>
4	CH	46,3	1,49-1,61 ^e <i>m</i>	47,6	1,4-3,0 <i>m</i>
5	CH	51,1	1,73-1,81 <i>dd</i> (19,1; 10,4)	52,6	1,4-3,0 <i>m</i>
6	CH	76,6	3,42-3,50 ^e <i>m</i>	78,1	4,04 <i>t</i> (9,0)
7	CH	54,1	2,08 <i>m</i>	55,8	1,4-3,0 <i>m</i>
8a*	CH ₂	26,4	1,49-1,61 ^e <i>m</i>	28,0	[2H] 1,4-3,0 <i>m</i>
8b*			1,88-1,94 ^e <i>m</i>		
9a*	CH ₂	36,5	1,73-1,81 <i>dd</i> (19,1; 10,4)	37,8	[2H] 1,4-3,0 <i>m</i>
9b*			1,88-1,94 ^e <i>m</i>		
10	C	150,2	-	150,9	-
11	C	76,9	-	78,6	-
12	C=O	178,6	-	180,3	-
13a*	CH ₂	63,1	[2H] 3,42-3,50 ^e <i>m</i>	64,8	[2H] 3,30-3,60 <i>m</i>
13b*					
14a*	CH ₂	111,4	4,86 <i>s</i>	112,1	4,85 <i>brd</i>
14b*			4,82 <i>s</i>		
15	CH ₃	18,3	[3H] 1,08 <i>d</i> (6,5)	19,0	[3H] 1,13 <i>d</i> (6,0)
3-OH	-	-	4,71 <i>d</i> (5,7)	-	4,71 <i>d</i> (6,0)
13-OH	-	-	5,10 <i>t</i> (4,5)	-	5,01 <i>s</i>
11-OH	-	-	5,63 <i>s</i>	-	5,55 <i>s</i>

δ_C, H (ppm); J (Hz); ^a: 500 MHz; ^b: 400 MHz; ^c: Đo trong DMSO-*d*₆;

^e: Tín hiệu chồng chập; *giá trị có thể hoán đổi cho nhau; *brd*: Pic rộng

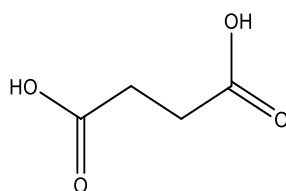
b. Acid succinic

Hợp chất 14: Là tinh thể không màu, có vị chua, tan tốt trong nước.

Phổ APCI-MS (APCI⁻) m/z : Hợp chất **14** có ion $[M-H]^-$ với m/z là 117,0. Do đó, KLPT là 118 và CTPT dự đoán là C₄H₆O₄.

Phổ ¹³C và ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): Hợp chất **14** chỉ có 2 tín hiệu cộng

hưởng của carbon có cường độ mạnh gợi ý hợp chất **14** có cấu trúc đối xứng. Trong đó gồm 1 tín hiệu của carbon nhóm carbonyl acid ở δ_C 173,5 và 1 carbon nhóm methylen có δ_C 28,8. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ cho thấy có tín hiệu ở δ_H 12,1 (1H, s) được gán cho proton của nhóm carbonyl acid và 1 tín hiệu có cường độ mạnh của proton nhóm methylen ở δ_H 2,42 (2H, s). Từ dữ liệu thu được của phổ MS và NMR có thể xác định hợp chất **14** là **acid succinic** (xem Phụ lục 27).



Hình 3.11. Cấu trúc của hợp chất 14

3.2. Nghiên cứu phương pháp kiểm nghiệm

3.2.1. Thiết lập chất đối chiếu (CĐC)

Các hợp chất được chọn để thiết lập chất đối chiếu (CĐC) gồm: (1) **acid chlorogenic**, (2) **cynarin** và (3) **cynarosid** hay luteolin-7-glucosid.

Nguyên liệu thiết lập CĐC được đánh giá hàm lượng trên HPLC-PDA bằng cách so sánh với chất chuẩn sơ cấp (**acid chlorogenic**, **cynarin** và **cynarosid**) được cung cấp bởi Phytolab - Đức với hàm lượng của cả 3 chất chuẩn đều đạt 96 %.

3.2.1.1. Xây dựng phương pháp đánh giá nguyên liệu thiết lập CĐC

a. Xây dựng quy trình định lượng nguyên liệu thiết lập CĐC bằng HPLC-PDA

Điều kiện sắc ký:

- Cột: C₁₈ Sunfire (150 × 4,6 mm; 5 μm)
- Nhiệt độ cột: 25 °C
- Bước sóng phát hiện: Xem **Bảng 3.17**
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút
- Mẫu thử: và nguyên liệu CĐC (100 μg/ml) pha trong MeOH (xem **Bảng 3.17**).
- Mẫu chuẩn: Chuẩn sơ cấp (acid chlorogenic, cynarin, cynarosid) (100 μg/ml)
- Thể tích tiêm mẫu: 10 μl
- Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1 % (Tỉ lệ xem **Bảng 3.17**)

Bảng 3.17. Điều kiện HPLC phân tích các nguyên liệu thiết lập CDC

Tên chất khảo sát	Dung môi hòa tan mẫu	Tỷ lệ pha động	Tổng thời gian phân tích	Bước sóng (nm)
A. chlorogenic	MeOH	10 : 90	12 phút	325
Cynarin	MeOH	17 : 83	15 phút	325
Cynarosid	MeOH 20%	20 : 80	10 phút	349

b. Đánh giá quy trình định lượng nguyên liệu thiết lập CDC:

Tính phù hợp hệ thống: Quy trình phân tích các nguyên liệu thiết lập CDC bằng HPLC-PDA đều đạt tính phù hợp hệ thống với thời gian lưu và diện tích đỉnh của pic định lượng có RSD = 0,15 - 1,22 %; Độ phân giải (R_s) = 1,6 - 8,8 và hệ số bất đối (A_s) = 1,11 - 1,16 (xem **Bảng 3.18**).

Bảng 3.18. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình định lượng nguyên liệu thiết lập CDC (n = 6) bằng HPLC-PDA

Tên chất	Thời gian lưu (R_t)		Diện tích đỉnh (S)		Độ phân giải (R_s)		Hệ số bất đối (A_s)
	R_t (phút)	RSD (%)	($\mu V \times \text{giây}$)	RSD (%)	Tập trước	Tập sau	
A.chlorogenic	9,4	0,15	2650704	1,08	2,2	3,0	1,12
Cynarin	10,9	0,41	3797253	0,41	-	1,6	1,11
Cynarosid	5,8	1,22	2489836	0,16	3,4	8,8	1,16
Yêu cầu	RSD ≤ 2		RSD ≤ 2		$R_s > 1,5$	$R_s > 1,5$	$0,8 \leq A_s \leq 1,5$

Tính đặc hiệu:

- Mẫu trắng không xuất hiện pic tại thời gian lưu 5,8; 9,46 và 10,93 phút.
- Thời gian lưu (t_R) và phổ UV của chất định lượng trong mẫu thử (nguyên liệu CDC), chuẩn sơ cấp (acid chlorogenic/ cynarin/ cynarosid), thử + chuẩn tương đương nhau. Thời gian lưu của các chất được xác định lần lượt là **9,4 phút (acid chlorogenic)**; **10,9 phút (cynarin)** và **5,8 phút (cynarosid)**. Các pic chính đạt độ tinh khiết (giá trị purity angle-PA < purity threshold-PT).
- Pic của chất trong mẫu thử + chuẩn cao hơn trong mẫu thử.

Khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng: Quy trình xác định độ tinh khiết của 3 nguyên liệu làm CDC bằng phương pháp HPLC-PDA có tính đặc hiệu, độ chính xác, độ đúng cao và khoảng tuyến tính rộng. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3.19**. Do đó, quy trình này có thể áp dụng để tiến hành xác định độ tinh khiết cũng như hàm lượng của các nguyên liệu thiết lập CDC (xem **Bảng 3.20**).

Bảng 3.19. Khoảng tuyến tính, độ chính xác và độ đúng của quy trình xác định độ tinh khiết nguyên liệu CĐC bằng HPLC-PDA

Chỉ tiêu đánh giá	Acid chlorogenic	Cynarin	Cynarosid
Phương trình hồi quy	$y = 14828 x$	$Y = 36824 x$	$y = 12962 x$
Hệ số tương quan	0,999	0,999	0,999
Khoảng tuyến tính ($\mu\text{g/ml}$); (n = 2)	15,63 - 1000	7,81 - 500	15,63 - 1000
Độ chính xác trong ngày (n=6) (hàm lượng $\pm$ SD %); (RSD %)	$92,17 \pm 3,74$ (1,40)	$94,28 \pm 0,80$ (0,85)	$92,06 \pm 0,96$ (0,94)
Độ đúng % (n = 9) (RSD %)	94,4 - 101,0 (1,0 - 1,4)	102,7 - 104,9 (1,1 - 1,8)	96,2 - 104,0 (1,5 - 2,2)

Bảng 3.20. Kết quả định lượng hàm lượng % của nguyên liệu CĐC bằng HPLC-PDA

stt	Tên CĐC	Hàm lượng ^a (%) (so với CSC)	
		% (n = 6)	RSD %
1	Acid chlorogenic	92,17	1,40
2	Cynarin	94,28	0,85
3	Cynarosid	92,06	0,94

CSC (chuẩn sơ cấp); ^a Hàm lượng (%) tính trên nguyên trạng

3.2.1.2. Xây dựng tiêu chuẩn chất lượng đánh giá các nguyên liệu CĐC

Dựa vào tính chất lý hóa và mục đích sử dụng của các nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu được dùng cho phép thử định lượng các hợp chất tự nhiên. Áp dụng kết quả xây dựng quy trình định lượng nguyên liệu CĐC so với chuẩn gốc bằng HPLC-PDA ở Mục 3.2.1.1 và tham khảo chứng chỉ phân tích của các chất đối chiếu gốc. Dự kiến tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) của các nguyên liệu làm CĐC hóa học là các hợp chất tự nhiên gồm các chỉ tiêu và phương pháp thử được tóm tắt ở **Bảng 3.21**.

Bảng 3.21. Tóm tắt chỉ tiêu chất lượng và phương pháp thử của CĐC

Chỉ tiêu	Phương pháp thử	Yêu cầu
1. Tính chất	Cảm quan, độ tan	AC và CY: Dạng bột vô định hình, màu trắng, tan trong MeOH. CR: Dạng bột vô định hình màu vàng nhạt, tan trong MeOH 20 %.
2. Hàm ẩm	DSC (ĐĐVN V - Phụ lục 6.12)	CY: Không quá 3,0 % AC và CR: Không quá 1 %
3. Định tính:		
- Phổ UV-Vis	ĐĐVN V - Phụ lục 4.1	AC: 217,5; 241,2; 325,7 (nm)

Chỉ tiêu	Phương pháp thử	Yêu cầu
($\lambda_{\max}$)	- Nồng độ mẫu: 100 $\mu\text{g/ml}$ - AC và CY: Hòa trong MeOH - CR: Hòa trong MeOH 20 % - Quét phổ 200 - 800 nm	CY: 216,7; 243,8; 323,0 (nm) CR: 211,6; 254,2; 347,9 (nm) Hình dạng phổ UV và 3 đỉnh hấp thụ cực đại phải phù hợp bộ dữ liệu chuẩn và không lệch quá ± 2 nm (xem Mục 3.1.2)
- Phổ IR (KBr, $\nu \text{ cm}^{-1}$)	ĐENVN V - Phụ lục 4.2 Dập viên KBr. Xác định dao động đặc trưng.	AC: 1489; 1687; 1710; 2900; 3375 CY: 1533; 1683; 1716; 3398; 3598 CR: 1250; 1489; 1610; 13450 Bảng dao động đặc trưng và vùng vân tay phải phù hợp với bộ dữ liệu chuẩn (xem Phụ lục 37, Phụ lục 41, Phụ lục 45)
- Phổ MS	Đo phổ ESI-MS (ES^-) Xác định pic cơ bản $[\text{M-H}]^- m/z$	$[\text{M-H}]^- m/z$: AC (353,1); CY (515,1); CR (447,6)
- Phổ NMR	Đo phổ ^1H và ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$) hoặc CD_3OD	Dữ liệu phổ NMR (^{13}C , ^1H , COSY, HSQC) phải phù hợp với bộ dữ liệu chuẩn (Phụ lục 19, Phụ lục 17, Phụ lục 22), dữ liệu phổ đã công bố.
4. Định lượng:		
- HPLC-PDA	Xác định hàm lượng bằng HPLC theo quy trình ở Mục 3.2.1.1c : - Tính phù hợp hệ thống (n=6) - Tính hàm lượng % của CĐC so với CSC (n=6)	- Tính phù hợp hệ thống: RSD % (t_R , S) của các pic trên SKĐ thu được phải < 2%. Rs giữa pic chính và pic tạp $\geq 1,5$. - Không được thấp hơn 92 % (CY) và 90 % (AC, CR) tính theo chế phẩm nguyên trạng.

CY (cynarin); AC (acid chlorogenic); CR (cynarosid); CSC (chuẩn sơ cấp); CĐC (chuẩn đối chiếu)

3.2.1.3. Đóng gói và đánh giá đồng nhất lô

Hàm lượng của các CĐC trong các lọ đóng gói đều có giá trị $F_{\text{tn}} < F_{\text{lt}}$. Do vậy, các lọ CĐC đồng nhất lô. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3.22**.

Bảng 3.22. Kết quả đóng gói của các CĐC

Đóng gói	A. chlorogenic	Cynarin	Cynarosid
Khối lượng ban đầu (mg)	1000	450	2000
Khối lượng đóng mỗi lọ (mg)	10	10	10
Tổng số lọ đóng gói (lọ)	76	44	173
Số lọ cần đánh giá (lọ)	10	7	14
Hàm lượng (so với CSC) (%) (n lọ)	92,18 - 92,74 (n = 20)	93,75 - 94,43 (n = 14)	91,31 - 92,00 (n = 28)
Phân tích ANOVA 1 yếu tố			
(F_{tn})	0,409	1,412	1,111
(F_{lt})	4,413	3,866	4,225

CSC: Chuẩn sơ cấp

3.2.1.4. Đánh giá đồng nhất liên phòng thí nghiệm

Bảng 3.23. Kết quả đánh giá đồng nhất liên phòng thí nghiệm

Hàm lượng (%)	A. chlorogenic	Cynarin	Cynarosid
PTN 1 (%) (n = 6) (Trung bình)	92,19 - 92,68 (92,48)	93,66 - 94,69 (94,20)	91,23 - 91,91 (91,60)
PTN 2 (%) (n = 6) (Trung bình)	92,10 - 92,86 (92,35)	94,07 - 94,72 (94,33)	91,27 - 92,09 (91,36)
Trung bình (%) (n = 12)	92,42	94,27	91,56
RSD % (n = 12)	0,28	0,31	0,32
Phân tích ANOVA (N= 12)			
F _{tn}	0,736	0,584	2,606
F _{lt}	4,965	4,965	4,965

PTN 1: Khoa Thiết lập chất chuẩn – chất đối chiếu, Viện Kiểm nghiệm thuốc TPHCM

PTN 2: Khoa Vật lý đo lường, Viện kiểm nghiệm thuốc TPHCM

Kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm (PTN) được trình bày ở **Bảng 3.23** cho thấy hàm lượng của các CĐC có giá trị $F_{tn} < F_{lt}$ khi phân tích ANOVA một yếu tố. Do đó, kết quả trung bình của 2 phòng thí nghiệm khác nhau không ý nghĩa ($p < 0,05$), phương pháp phân tích có độ lặp lại cao ($RSD < 2\%$). Phiếu kiểm nghiệm của các PTN được trình bày ở **Phụ lục 36, Phụ lục 40, Phụ lục 44**.

Kết luận: Kết quả hàm lượng % của các nguyên liệu CĐC không phụ thuộc vào 2 PTN tham gia đánh giá, nghĩa là phương pháp phân tích có độ chính xác cao.

3.2.1.5. Xác định giá trị ấn định và giá trị công bố

Kết quả hàm lượng công bố của các CĐC ghi trên chứng chỉ phân tích và số lượng chất chuẩn thiết lập được trình bày ở **Bảng 3.24, Phụ lục 36, Phụ lục 40, Phụ lục 44**). Cả 03 nguyên liệu dùng thiết lập CĐC (acid chlorogenic, cynarin và cynarosid) đủ điều kiện để đăng ký chuẩn quốc gia với hàm lượng được xác định trên 91 % theo nguyên trạng, các CĐC bảo quản ở nhiệt độ 2 - 8 °C, tránh ánh sáng.

Bảng 3.24. Kết quả xác định giá trị ấn định của các CĐC sau khi đóng gói.

(n = 12)	A. chlorogenic	Cynarin	Cynarosid
Hàm lượng TB tính trên nguyên trạng (%)	92,39	94,26	91,53
Độ lệch s	0,22	0,21	0,24
Độ không đảm bảo đo μ	0,088	0,086	0,097

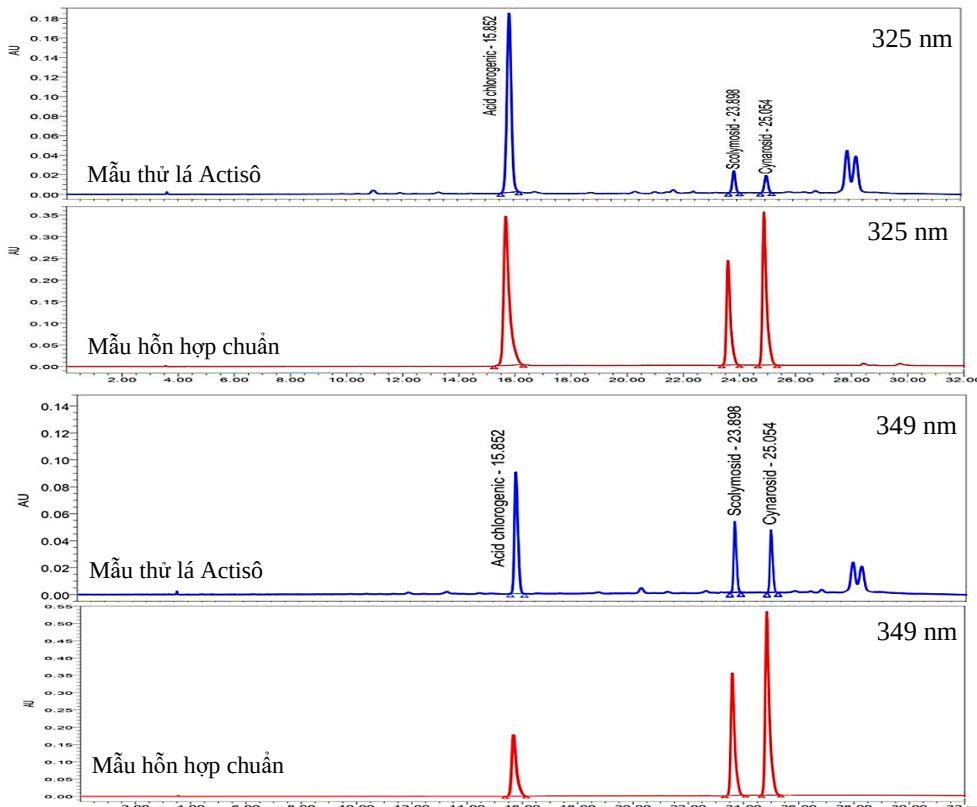
3.2.2. Xây dựng quy trình định lượng

3.2.2.1. Định lượng đồng thời 3 polyphenol trong lá khô Actisô bằng HPLC-PDA

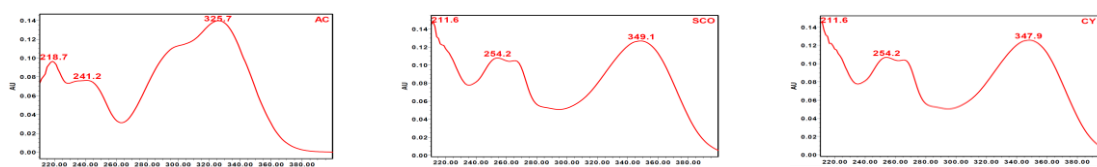
a. Khảo sát điều kiện sắc ký

Các thành phần polyphenol chính được lựa chọn để kiểm nghiệm lá Actisô gồm acid chlorogenic (AC), scolymosid (SCO) và cynarosid (CR).

Kết quả khảo sát bước sóng phát hiện và chương trình pha động đã được lựa chọn cho quy trình định lượng đồng thời AC, SCO và CR được trình bày ở **Hình 3.12**. Phổ UV của AC có 3 đỉnh hấp thụ hấp thụ cực đại ($\lambda_{\max}$) tại bước sóng 218,7; 241,2; 325,6 nm. Phổ của SCO có 3 đỉnh hấp thụ tại 211,6; 254,2; 349,1. Phổ của CR có 3 đỉnh hấp thụ tại 211,6; 254,2; 347,9 (**Hình 3.13**). Chọn bước sóng 325 nm để định lượng AC và 349 nm để định lượng SCO và CR vì các đỉnh hấp thụ này có tín hiệu ổn định, độ nhạy cao và không bị ảnh hưởng bởi đường nền. Điều kiện sắc ký đã lựa chọn (**Hình 3.12** và **Bảng 3.25**) để định lượng đồng thời AC, SCO và CR cho thấy các pic cần định lượng tách hoàn toàn với các tạp kế cận, ngoài ra các pic này cũng đạt độ tinh khiết pic (purity angle - PA < threshold - TH).



Hình 3.12. Sắc ký đồ HPLC định lượng AC, SCO và CR trong lá Actisô



Hình 3.13. Phổ UV của AC, SCO và CR trong hỗn hợp chuẩn

Điều kiện sắc ký cho quy trình định lượng đồng thời AC, SCO và CR trong lá Actisô được đề nghị như sau:

- Cột SunFire C₁₈ (25 cm × 4,6 mm, 5 μm)
- Detector PDA: 325 nm (AC); 349 nm (SCO và CR)
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút
- Thể tích tiêm: 10 μl
- Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1 %
- Tiến hành sắc ký theo chương trình dung môi như sau:

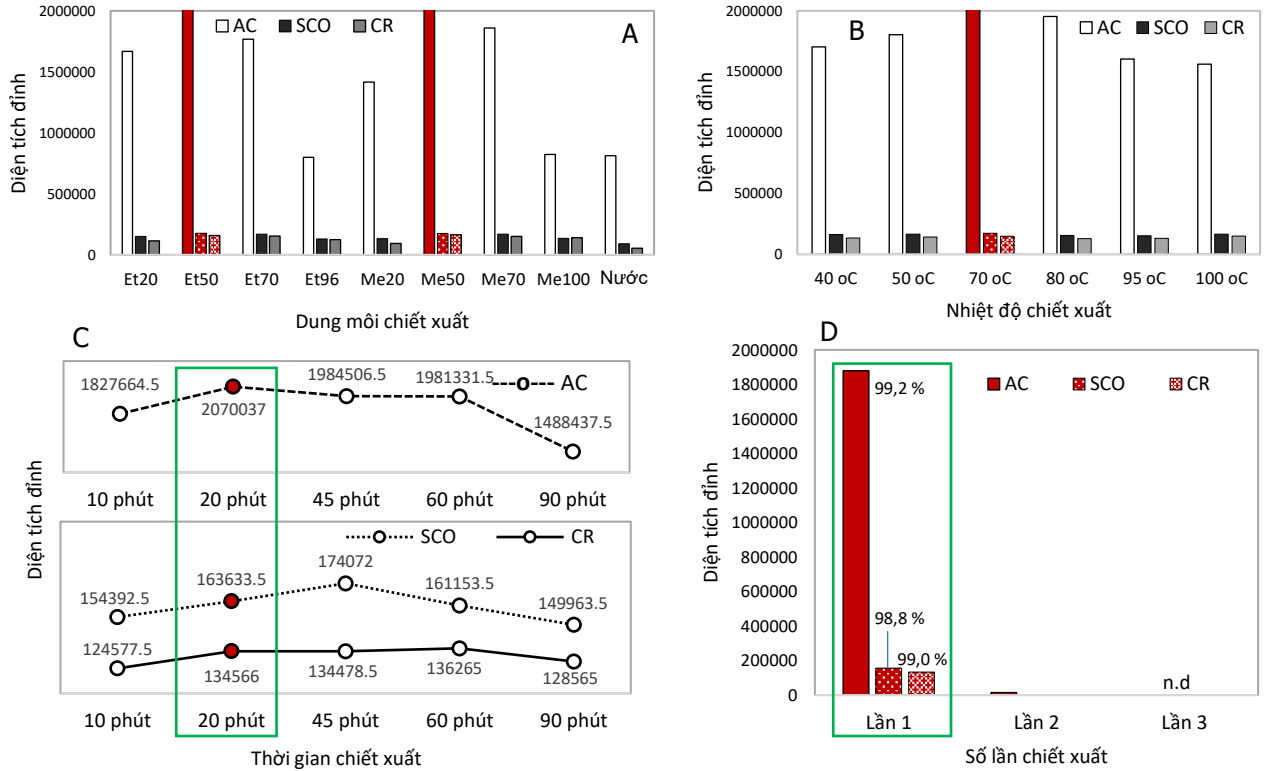
Bảng 3.25. Chương trình dung môi định lượng đồng thời AC, SCO và CR trong lá Actisô

Thời gian (phút)	Acetonitril (% tt/tt)	Acid formic 0,1 % (% tt/tt)
0	8	92
15	20	80
18	25	75
23	30	70
25	30	70
26	95	05
31	95	05
32	8	92
37	8	92

b. Khảo sát điều kiện chiết xuất lá Actisô

Kết quả khảo sát dung môi chiết, nhiệt độ chiết, thời gian chiết và số lần chiết được trình bày ở **Hình 3.14**. Kết quả cho thấy dung môi chiết là ethanol 50 % và methanol 50 % đều là dung môi chiết xuất tốt nhất cho cả 3 polyphenol; nhiệt độ 70 - 80 °C phù hợp để chiết cả 3 hợp chất này. Đối với thời gian chiết xuất 20 phút có xu hướng gia tăng hàm lượng hoạt chất của cả 3 polyphenol, nhưng ở phút 45 trở đi cho thấy hàm lượng của AC và CR có xu hướng giảm dần nhưng SCO có xu hướng tăng. Do đó, quy trình chiết thực hiện ở 20 phút để tránh bị phân hủy AC và CR. Ngoài ra, qua khảo sát số lần chiết cho thấy ở lần chiết 1 cho hiệu suất của các pic AC, SCO và CR lần lượt là 99,2; 98,8 và 99,0 %, ở các lần chiết sau pic AC, CR và

SCO có hiệu suất dưới 1,2 % không đáng kể. Do đó, quy trình định lượng được lựa chọn chiết 1 lần.



Hình 3.14. Kết quả khảo sát điều kiện chiết xuất lá Actisô để định lượng bằng HPLC

Et: Ethanol; Et20: Ethanol 20 %; Et50: Ethanol 50 %; Me: Methanol; n.d: Không phát hiện

Màu đỏ thể hiện điều kiện chiết xuất được lựa chọn

A (0,1 g lá, chiết ở 95 °C, 60 phút, 15 ml dung môi x 1 lần); **B** (0,1 g lá, chiết 60 phút, 15 ml Et50 x 1 lần)

C (0,1 g lá, chiết ở 70 °C, 15 ml Et50 x 1 lần); **D** (0,1 g lá, chiết ở 70 °C, 20 phút, 15 ml Et50 x 1, 2, 3 lần)

Quy trình chuẩn bị mẫu thử được đề nghị như sau: Cân chính xác khoảng 0,1 g bột dược liệu (qua rây số 355) vào bình nón 100 ml, thêm 15 ml ethanol 50 % (TT), đun cách thủy ở 70 °C trong 20 phút, lọc vào bình định mức 25 ml, tráng bình nón và bã dược liệu với 8 ml ethanol 50 % (TT), thêm ethanol 50 % (TT) vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc PTFE 0,45 µm (xem quy trình định lượng ở **Phụ lục 34**).

c. Đánh giá quy trình định lượng

Khảo sát tính phù hợp hệ thống: 6 lần tiêm liên tiếp mẫu thử lá Actisô có kết quả độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của các thông số sắc ký như diện tích pic, thời gian lưu không quá 2 %; độ phân giải ($R_s > 1,5$) và hệ số bất đối có giá trị từ 0,8 - 1,5 nên quy trình đạt tính phù hợp hệ thống (xem **Bảng 3.26, Phụ lục 48**).

Tính đặc hiệu: Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy mẫu trắng không có pic của các chất cần định lượng; phổ UV và thời gian lưu (t_R) của AC (15,6 phút), SCO (23,7 phút), CR (24,8 phút) trong mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn tương đương nhau; các chất định lượng đều đạt độ tinh khiết pic (xem **Phụ lục 48**).

Khoảng tuyến tính, LOD, LOQ, độ chính xác và độ đúng: Kết quả khảo sát được trình bày ở **Bảng 3.26, Bảng 3.28, Bảng 3.29, Phụ lục 48**. Quy trình định lượng AC, SCO, CR trong lá Actisô bằng HPLC-PDA đã xây dựng có độ lặp lại cao với RSD = 0,9 - 1,2 %; độ đúng của phương pháp có tỉ lệ phục hồi 96,3 - 103,5 % (RSD = 1,3 - 3,7 %).

Bảng 3.26. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình định lượng AC, SCO, CR trong lá Actisô bằng HPLC-PDA (n = 6)

	t_R (phút) (RSD %)	S ($\mu V \times s$) (RSD %)	^a Rs	As
MẪU CHUẨN (100 $\mu g/ml$)				
A.chlorogenic	15,6 (0,3)	2287533 (0,3)	-	1,42
Scolymosid	23,7 (0,2)	1127785 (0,6)	32,70	1,08
Cynarosid	24,8 (0,2)	1675783 (1,1)	5,36	1,17
MẪU THỬ				
A.chlorogenic	15,7 (0,4)	2051301 (0,9)	6,32	1,04
Scolymosid	23,8 (0,2)	174985 (0,7)	3,25	1,01
Cynarosid	24,9 (0,2)	150881 (1,1)	5,36	1,00
Yêu cầu	RSD ≤ 2	RSD ≤ 2	Rs $> 1,5$	0,8 $\leq$ As $\leq 1,5$

^a Độ phân giải của pic định lượng so với pic liền trước

Bảng 3.27. Đường tuyến tính, LOD và LOQ của AC, SCO, CR của quy trình định lượng lá Actisô bằng HPLC-PDA

Hợp chất	Phương trình hồi quy ^a	R ²	Khoảng áp dụng ($\mu g/ml$)	LOD ($\mu g/ml$)	LOQ ($\mu g/ml$)
Acid chlorogenic	$y = 23255x$	0,9986	1 - 200	0,025	0,083
Scolymosid	$y = 11028x$	0,9992	1 - 200	0,06	0,198
Cynarosid	$y = 16424x$	0,9991	1 - 200	0,06	0,198

^a Phương trình hồi quy có tính tương thích ($F > F_{0,05}$), hệ số b không có ý nghĩa thống kê

Bảng 3.28. Độ chính xác của quy trình định lượng AC, SCO, CR trong lá Actisô

Hợp chất	$\bar{X} \pm SD$ (n = 6) (mg/g)	Hàm lượng (%)	Độ chính xác	
			RSD % (n=6) ^a	RSD % (n=12) ^b
Acid chlorogenic	23,96 $\pm$ 0,29	2,40	1,2	1,1
Scolymosid	4,33 $\pm$ 0,05	0,43	1,0	1,1
Cynarosid	2,63 $\pm$ 0,02	0,26	0,9	1,2

^a Độ lặp lại trong ngày;

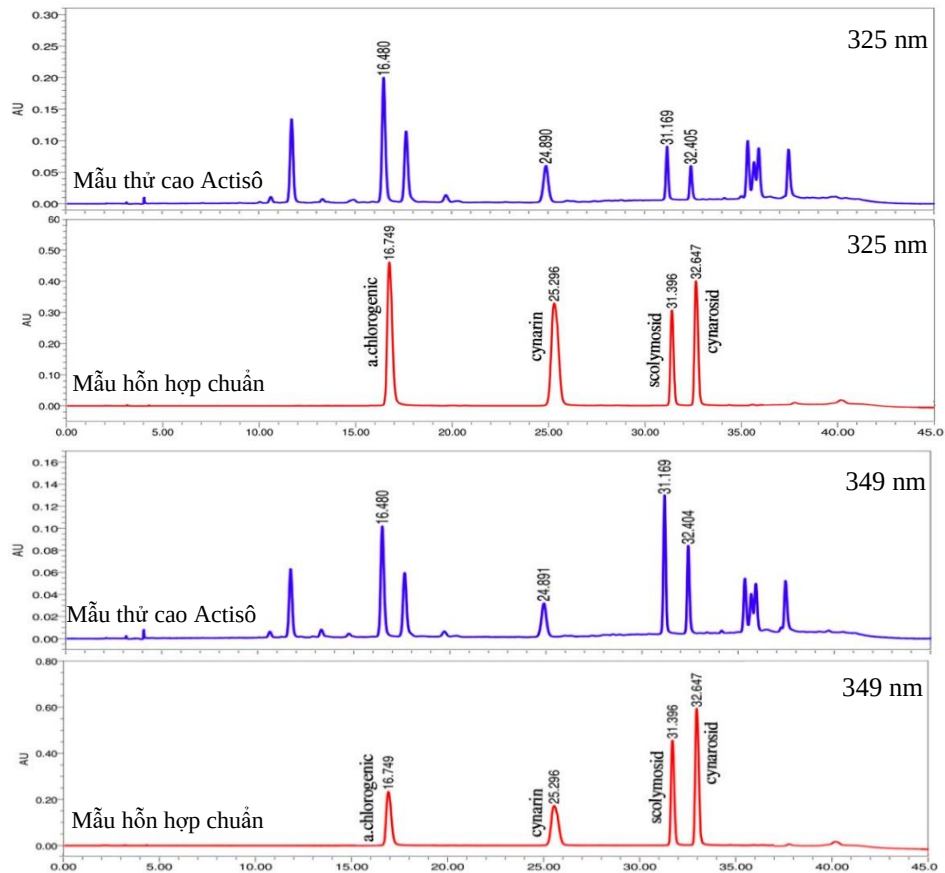
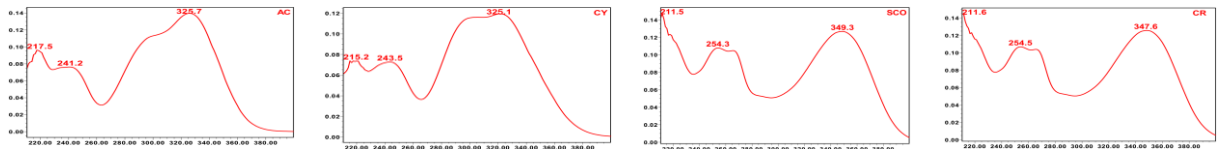
^b Độ chính xác trung gian;

Bảng 3.29. Độ đúng của quy trình định lượng AC, SCO và CR trong lá Actisô

Tên hợp chất	Tỷ lệ phục hồi (n = 9)			
	50 % (RSD %)	80 % (RSD %)	100 % (RSD %)	TB %
Acid chlorogenic	102,14 (2,9)	98,58 (3,5)	102,51 (2,9)	101,1
Scolymosid	100,80 (1,9)	100,46 (3,1)	99,74 (2,7)	100,3
Cynarosid	96,28 (2,2)	96,95 (1,3)	103,47 (3,7)	98,9

3.2.2.2. Định lượng đồng thời 4 polyphenol trong cao khô Actisô bằng HPLC-PDA

a. Khảo sát điều kiện sắc ký

**Hình 3.15. Sắc ký đồ HPLC định lượng AC, CY, SCO và CR trong cao khô Actisô (Cao BV)****Hình 3.16. Phổ UV của AC, CY, SCO và CR trong hỗn hợp chuẩn**

Các thành phần polyphenol chính được lựa chọn để kiểm nghiệm cao Actisô gồm acid chlorogenic (AC), cynarin (CY), scolymosid (SCO) và cynarosid (CR).

Chương trình pha động đã được khảo sát và lựa chọn cho quy trình định lượng

đồng thời AC, CY, SCO và CR được thể hiện qua SKĐ phân tích mẫu thử và mẫu chuẩn trình bày ở **Hình 3.15**. Bước sóng ($\lambda_{\max}$) đã được lựa chọn để định lượng AC là 325 nm và 349 nm để định lượng SCO và CR (**Mục 3.2.2.1**). Cynarin (CY) có hình dạng phổ UV và 3 đỉnh hấp thụ cực đại tương tự AC, do đó CY và AC được định lượng ở 325 nm (**Hình 3.16**). Điều kiện sắc ký đã lựa chọn (**Bảng 3.30**) để định lượng đồng thời AC, CY, SCO và CR cho thấy các pic cần định lượng tách hoàn toàn với các tạp kế cận, ngoài ra các pic này cũng đạt độ tinh khiết pic.

Điều kiện sắc ký cho quy trình định lượng đồng thời AC, CY, SCO và CR trong cao khô Actisô được đề nghị như sau:

- Cột SunFire C₁₈ (25 cm × 4,6 mm, 5 μ m)
- Detector PDA: 325 nm (AC, CY); 349 nm (SCO, CR)
- Tốc độ dòng: 1 ml/phút
- Thể tích tiêm: 10 μ l
- Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1 %
- Tiến hành sắc ký theo chương trình dung môi như sau:

Bảng 3.30. Chương trình dung môi định lượng đồng thời AC, CY, SCO và CR trong cao Actisô

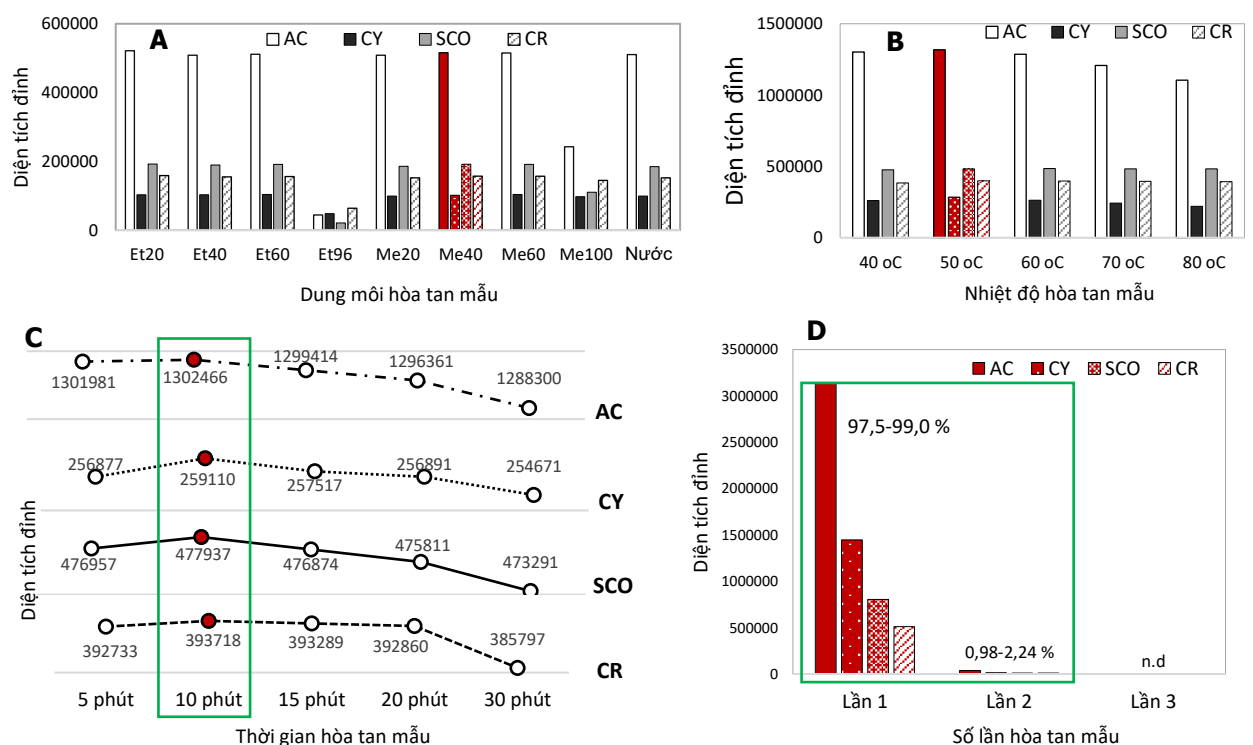
Thời gian (phút)	Acetonitril (% tt/tt)	Acid formic 0,1 % (% tt/tt)
0	8	92
20	15	75
21	15	75
30	30	70
35	30	70
36	8	92
45	8	92

% tt/tt: % thể tích/thể tích

b. Khảo sát điều kiện chuẩn bị mẫu cao khô Actisô

Kết quả khảo sát dung môi, nhiệt độ, thời gian và thể tích dung môi hòa tan cao khô Actisô để thu được hàm lượng các chất định lượng tốt nhất được trình bày ở **Hình 3.17**. Kết quả cho thấy các dung môi phân cực như nước, ethanol và methanol 20 - 60 % đều có khả năng hòa tan tốt cao khô Actisô cũng như 4 polyphenol định lượng; nhiệt độ siêu âm ở 50 °C hòa tan tốt nhất cả 4 polyphenol mà không làm ảnh hưởng đến hàm lượng các chất, trong khi trên 60 °C bắt đầu có sự giảm đáng kể hàm lượng AC và CY do các chất này kém bền với nhiệt hơn so với flavonoid (SCO và CR).

Thời gian siêu âm 10 phút nhận thấy có thể hòa tan được tối đa hàm lượng các chất, từ phút 15 trở đi cho thấy hàm lượng của các polyphenol có xu hướng giảm dần. Do đó, thời gian siêu âm hòa tan mẫu được thực hiện ở 10 phút để tránh bị phân hủy các chất. Qua khảo sát lượng dung môi hòa tan mẫu (20 mg cao Actisô, cân trong ống ly tâm 1,5 ml) cho thấy ở lần hòa tan đầu tiên với 1 ml methanol 40 % cho hiệu suất của các pic AC, CY, SCO và CR từ 97,5 - 99,0 %, ở lần hòa tan sau với 1 ml dung môi cho các pic có hàm lượng từ 0,98 - 2,24 %. Do đó, cao khô Actisô được hòa tan với 2 ml dung môi để tiến hành phân tích định lượng 4 hợp chất này bằng HPLC.



Hình 3.17. Kết quả khảo sát điều kiện chuẩn bị cao Actisô của quy trình định lượng

Et: Ethanol; Et20: Ethanol 20 %; Et40: Ethanol 40 %; Me: Methanol; n.d: Không phát hiện

Màu đỏ thể hiện điều kiện chiết xuất được lựa chọn

A (20 mg cao, siêu âm 60 °C, 15 phút, 1 ml dung môi x 1 lần); **B** (20 mg cao, siêu âm 15 phút, 1 ml Me40 x 1 lần)

C (20 mg cao, siêu âm 50 °C, 1 ml Me40 x 1 lần); **D** (20 mg cao, siêu âm 50 °C, 10 phút, 1 ml Me40 x 1, 2, 3 lần)

Quy trình chuẩn bị mẫu thử: Cân chính xác khoảng 20 mg (cân 5 số lẻ) cao khô Actisô cho vào ống eppendorf (1,5 ml), thêm 1 ml methanol 40 % (TT), trộn đều, siêu âm 10 phút ở nhiệt độ 40 °C, ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 2 phút, chuyển dịch chiết vào bình định mức 5 ml. Phần cặn còn lại được chiết tiếp lần 2 với 1 ml methanol 40 % (TT) tương tự như trên. Gộp chung dịch chiết của 2 lần chiết vào

bình định mức 5 ml và điều chỉnh *methanol* 40 % (TT) vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc PTFE 0,45µm (xem quy trình định lượng ở **Phụ lục 35**).

c. *Đánh giá quy trình định lượng*

Khảo sát tính phù hợp hệ thống: Mẫu thử cao khô Actisô với 6 lần liên tiếp có độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của các thông số sắc ký gồm diện tích pic (S), thời gian lưu (t_R) không quá 2 %; độ phân giải ($R_s > 1,5$) và hệ số bất đối có giá trị từ 0,8 - 1,5 nên quy trình đạt tính phù hợp hệ thống (xem **Bảng 3.31, Phụ lục 49**).

Tính đặc hiệu: Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy mẫu trắng không có pic của các chất cần định lượng; phổ UV và thời gian lưu (t_R) của AC (16,2 phút), CY (24,2 phút), SCO (31,1 phút), CR (32,2 phút) trong mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn tương đương nhau; các chất định lượng đều đạt độ tinh khiết pic. Do đó, quy trình định lượng có tính đặc hiệu cao (xem **Phụ lục 49**).

Khoảng tuyến tính, LOD, LOQ, độ chính xác và độ đúng: Kết quả khảo sát được trình bày ở **Bảng 3.32, Bảng 3.33, Bảng 3.34, Phụ lục 49**. Quy trình định lượng AC, CY, SCO, CR trong cao khô Actisô bằng HPLC-PDA có độ lặp lại cao với RSD = 1,5 - 2,3 %; độ đúng có tỉ lệ phục hồi từ 93,0 - 103,9 % (RSD = 0,78 - 3,72 %).

Bảng 3.31. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình định lượng AC, CY, SCO, CR trong cao khô Actisô bằng HPLC - PDA (n = 6)

	t_R (phút) (RSD %)	S ($\mu V \times s$) (RSD %)	^a R_s	As
MẪU CHUẨN (100 µg/ml)				
A.chlorogenic	16,5 (0,64)	1893752 (1,73)	-	1,20
Cynarin	24,8 (0,82)	1942917 (0,63)	15,0	1,09
Scolymosid	31,1 (0,76)	835688 (0,62)	13,1	1,10
Cynarosid	32,4 (0,91)	1203502 (0,29)	4,1	1,15
MẪU THỬ				
A.chlorogenic	16,2 (0,80)	6105349 (0,27)	5,7	1,11
Cynarin	24,2 (1,03)	1066846 (0,78)	12,1	0,98
Scolymosid	31,1 (0,87)	1401178 (0,64)	23,5	1,06
Cynarosid	32,3 (0,69)	850031 (1,10)	5,5	1,04
Yêu cầu	RSD ≤ 2	RSD ≤ 2	$R_s > 1,5$	$0,8 \leq A_s \leq 1,5$

^a Độ phân giải của pic định lượng so với pic liền trước

Bảng 3.32. Đường tuyến tính, LOD và LOQ của AC, CY, SCO, CR của quy trình định lượng cao khô Actisô bằng HPLC-PDA

Hợp chất	Phương trình hồi quy ^a	R ²	Khoảng áp dụng (µg/ml)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
Acid chlorogenic	y = 82344x	0,9994	5 - 300	0,125	0,417
Cynarin	y = 81150 x	0,9994	5 - 300	0,125	0,417
Scolymosid	y = 16857 x	0,9991	5 - 300	0,062	0,206
Cynarosid	y = 22762 x	0,9993	5 - 300	0,031	0,103

^a Phương trình hồi quy có tính tương thích ($F > F_{0,05}$), hệ số b không có ý nghĩa thống kê

Bảng 3.33. Độ chính xác của quy trình định lượng AC, CY, SCO, CR trong cao Actisô

Hợp chất	$\bar{X} \pm SD$ (n = 6) (mg/g)	Hàm lượng (%)	Độ chính xác	
			RSD % (n=6) ^a	RSD % (n=12) ^b
Acid chlorogenic	8,69 ± 0,16	0,87	1,88	1,73
Cynarin	4,77 ± 0,23	0,47	1,57	1,83
Scolymosid	5,43 ± 0,08	0,54	1,55	2,19
Cynarosid	3,23 ± 0,05	0,32	1,45	2,26

^a Độ lặp lại trong ngày; ^b Độ chính xác trung gian;

Bảng 3.34. Độ đúng của quy trình định lượng AC, CY, SCO và CR trong cao Actisô

Tên hợp chất	Tỷ lệ phục hồi (n = 9)			
	80 % (RSD %)	100 % (RSD %)	120 % (RSD %)	TB %
Acid chlorogenic	95,80 (1,85)	96,17 (1,39)	98,02 (2,55)	96,66
Cynarin	93,02 (2,77)	97,60 (2,28)	102,00 (0,78)	97,54
Scolymosid	103,97 (2,71)	102,76 (1,84)	104,50 (0,82)	101,2
Cynarosid	103,37 (3,72)	93,94 (2,19)	97,88 (1,99)	101,8

3.2.2.3. Định lượng đồng thời 12 polyphenol trong cao khô Actisô bằng UPLC-PDA

a. Khảo sát điều kiện sắc ký

Định lượng 12 thành phần polyphenol chính trong cao khô Actisô gồm: Acid 1-caffeoylquinic (1-CQA) (1); 3-CQA (2); acid caffeic (CF) (3); 5-CQA hay acid chlorogenic (AC) (4); 4-CQA (5); cynarin (CY) (6); cynarosid (CR) (7); scolymosid (SCO) (8); 3,4-diCQA (9); 3,5-diCQA (10); 1,5-diCQA (11) và 4,5-diCQA (12). Các chất chuẩn sử dụng cho phương pháp định lượng gồm 8 chuẩn, trong đó có 3 chất chuẩn (AC, CY và CR) đã được thiết lập chất đối chiếu, 5 chuẩn còn lại được xác định độ tinh khiết bằng HPLC-PDA (**Phụ lục 50**). Do các hợp chất 3-CQA; 4-CQA phân lập có khối lượng ít và 3,4-diCQA; 3,5-diCQA có độ tinh khiết chưa cao nên các thành phần này trong mẫu thử được tính hàm lượng dựa theo chất đối chiếu có

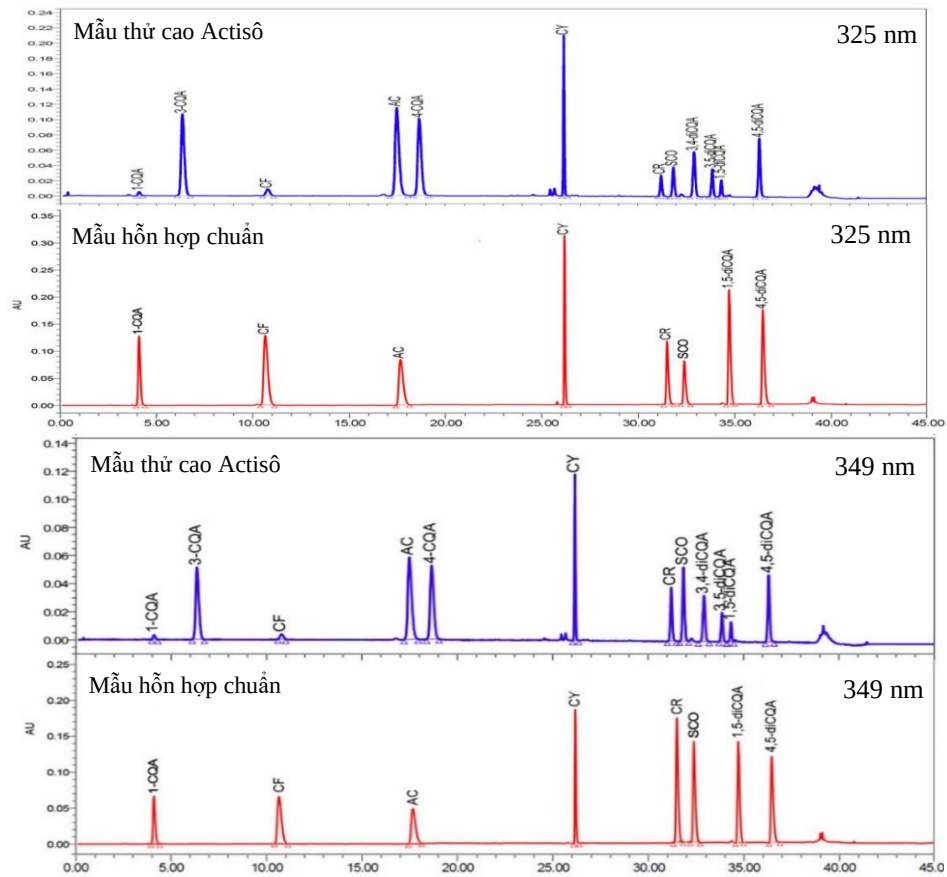
cấu trúc và phổ UV tương đồng. Cụ thể, hàm lượng của các mono-CQA (3-CQA và 4-CQA) được tính theo acid chlorogenic; các di-CQA (3,4-diCQA và 3,5-diCQA) được tính theo cynarin.

Xác định 12 hợp chất polyphenol cần định lượng trong mẫu thử như sau:

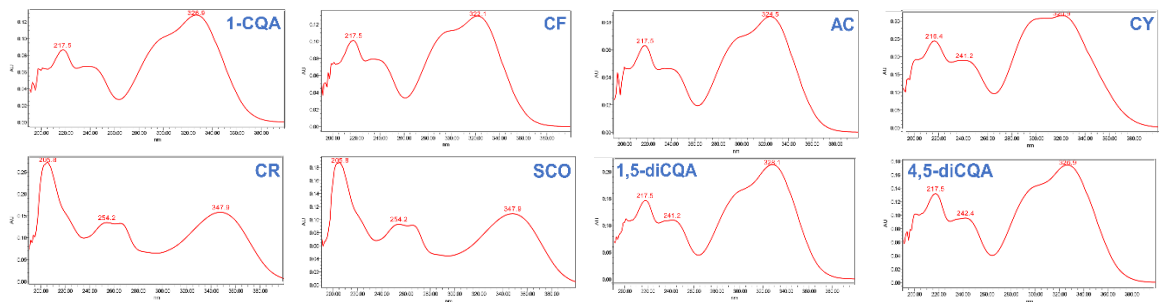
- 8 hợp chất 1-CQA, acid caffeic, acid chlorogenic, cynarin, cynarosid, scolymosid, 1,5-diCQA và 4,5-diCQA trong mẫu thử được xác định dựa vào việc tiến hành khảo sát độ chọn lọc để so sánh thời gian lưu và phổ UV với chất đối chiếu. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3.37**, **Hình 3.18** và **Phụ lục 50**.
- Các chất 3-CQA, 4-CQA, 3,4-diCQA, 3,5-diCQA trong mẫu thử được xác định dựa vào kết quả phân lập các hợp chất này từ cao **Bu** và cao **EA** (ở **Mục 3.1.1**). Hơn nữa, dựa vào trình tự rửa giải của các mono-CQA lần lượt là 1-CQA, 3-CQA, 5-CQA, 4-CQA và các di-CQA (1,3-diCQA; 3,4-diCQA; 3,5-diCQA; 1,5-diCQA; 4,5-diCQA) cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu trên thế giới^{7,8,53,89,143,182}.

Khảo sát bước sóng định lượng: Đối với các mono-CQA và di-CQA có đỉnh hấp thụ cực đại tại các bước sóng được trình bày ở **Hình 3.19** và **Bảng 3.35**, trong đó tại bước sóng 321-328 nm, các chất này đều có độ hấp thụ cao nhất và không bị ảnh hưởng bởi đường nền. Vì vậy, chọn bước sóng 325 nm làm bước sóng phát hiện đồng thời các acid mono-CQA và di-CQA. Đối với 2 flavonoid (CR và SCO) có hình dạng phổ UV giống nhau và có 3 đỉnh hấp thụ cực đại tại 205,8 và 348 nm nên chọn 348 nm là bước sóng định lượng đồng thời CR và SCO. **Kết luận:** Chọn bước sóng 325 nm để định lượng các acid mono-CQA (1-CQA, 3-CQA, AC, 4-CQA, CF) và di-CQA (CY; 3,4-diCQA, 3,5-diCQA; 1,5-diCQA; 4,5-diCQA). Bước sóng 349 nm để định lượng 2 flavonoid (CR và SCO).

Khảo sát chương trình triển khai sắc ký: Pha động đã được khảo sát và lựa chọn cho quy trình định lượng đồng thời 12 polyphenol được thể hiện qua SKĐ phân tích mẫu thử và mẫu chuẩn trình bày ở **Hình 3.18**. Điều kiện sắc ký của UPLC đã lựa chọn (**Bảng 3.36**) để định lượng đồng thời 12 polyphenol trong cao khô Actisô cho thấy các pic cần định lượng tách hoàn toàn với các pic kế cận và các pic này cũng đạt độ tinh khiết pic (xem **Phụ lục 50**).



Hình 3.18. Sắc ký đồ UPLC-PDA định lượng 12 hợp chất polyphenol trong cao khô Actisô



Hình 3.19. Phổ UV của 8 polyphenol trong hỗn hợp chuẩn

Ghi chú: CQA (caffeoylquinic acid); CF (acid caffeic); AC (acid chlorogenic); CY (cynarin); CR (cynarosid); SCO (scolymosid)

Bảng 3.35. Giá trị độ hấp thụ cực đại ($\lambda_{\max}$) của 8 chất đối chiếu

$\lambda_{\max}$	1-CQA	CF	AC	CY	CR	SCO	1,5-diCQA	4,5-diCQA
$\lambda_{\max 1}$	217,5	217,5	217,5	216,4	205,8	205,8	217,5	217,5
$\lambda_{\max 2}$	-	-	-	241,2	254,2	254,2	241,2	242,4
$\lambda_{\max 3}$	326,9	322,1	324,5	320,9	347,9	347,9	328,1	326,9

Do đó, điều kiện sắc ký UPLC-PDA cho quy trình định lượng đồng thời 12

polyphenol trong cao khô Actisô được đề nghị như sau:

- Cột ThermoFisher C₁₈ (10 cm × 2,1 mm; 2,6 µm)
- Detector PDA: 325 nm (mono-CQA và di-CQA); 349 nm (SCO, CR)
- Tốc độ dòng: 0,8 ml/phút
- Thể tích tiêm: 5 µl
- Nhiệt độ cột: 35 °C
- Pha động: Acetonitril (ACN) - acid trifluoroacetic (TFA) 0,1 %
- Tiến hành sắc ký theo chương trình dung môi như sau:

Bảng 3.36. Chương trình dung môi định lượng đồng thời 12 polyphenol trong cao Actisô

Thời gian (phút)	ACN (% tt/tt)	TFA 0,1% (% tt/tt)
0	0	100
20	3	97
22	3	97
25	10	90
27	10	90
29,5	12	88
32	12	88
34	15	85
38	15	85
39	90	10
42	90	10
43	0	100
50	0	100

b. Khảo sát điều kiện chuẩn bị mẫu cao khô Actisô:

Cao khô Actisô đã được khảo sát độ hòa tan ở **Mục 2.2.4.1**. Qua SKĐ của UPLC phân tích cần sau khi được hòa tan lần 3 với 1 ml methanol 40 % cho thấy 12 pic của polyphenol định lượng có hàm lượng không đáng kể hoặc không phát hiện. Do vậy, phương pháp chuẩn bị mẫu thử của cao khô Actisô của quy trình định lượng bằng HPLC và UPLC tương tự nhau.

Quy trình chuẩn bị mẫu thử được đề nghị như sau: Cân chính xác khoảng 20 mg (cân 5 số lẻ) cao khô Actisô cho vào ống eppendorf (1,5 ml), thêm 1 ml *methanol 40 % (TT)*, trộn đều, siêu âm 10 phút ở nhiệt độ 40 °C, ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 2 phút, chuyển dịch chiết vào bình định mức 5 ml. Phần cặn còn lại được chiết tiếp lần 2 với 1 ml *methanol 40 % (TT)* tương tự như trên. Gộp chung dịch chiết của 2 lần chiết vào bình định mức 5 ml và điều chỉnh bằng *methanol*

40 % (TT) vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc PTFE 0,22 μm (xem quy trình định lượng ở **Phụ lục 50**).

c. Đánh giá quy trình định lượng

Khảo sát tính phù hợp hệ thống: Khi tiêm mẫu thử cao khô Actisô 6 lần liên tiếp, kết quả có độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của các thông số sắc ký gồm diện tích pic (S), thời gian lưu (t_R) không quá 2 %; độ phân giải ($R_s > 1,5$) và hệ số bất đối có giá trị từ 1,0 - 1,4 nên quy trình đạt tính phù hợp hệ thống (**Bảng 3.37, Phụ lục 50**).

Bảng 3.37. Kết quả khảo sát tính phù hợp hệ thống của quy trình định lượng 12 polyphenol trong cao khô Actisô bằng UPLC - PDA (n = 6)

STT	Tên chất	t_R (phút) (RSD %)	S ($\mu\text{V} \times \text{s}$) (RSD %)	^a R_s	As
MẪU THỬ					
1	1-CQA	4,09 (0,85)	46485 (0,26)	1,6	1,17
2	3-CQA	6,35 (1,17)	1259407 (0,16)	8,4	1,27
3	CF	10,79 (0,99)	117937 (0,90)	13,3	1,08
4	AC	17,48 (0,64)	1645049 (0,29)	1,7	1,39
5	4-CQA	18,65 (0,61)	1328070 (0,24)	3,3	1,31
6	CY	26,16 (0,12)	763895 (0,12)	2,8	1,12
7	CR	31,21 (0,19)	191058 (0,21)	37,1	1,08
8	SCO	31,85 (0,19)	294700 (0,23)	3,4	1,08
9	3,4-diCQA	32,93 (0,20)	491672 (0,31)	4,1	1,07
10	3,5-diCQA	33,87 (0,14)	243745 (0,35)	4,8	1,04
11	1,5-diCQA	34,35 (0,12)	128857 (0,14)	2,9	1,00
12	4,5-diCQA	36,31 (0,13)	571698 (0,18)	10,4	1,11
Yêu cầu		RSD ≤ 2	RSD ≤ 2	$R_s > 1,5$	$0,8 \leq A_s \leq 1,5$

^a Độ phân giải của pic định lượng so với pic liền trước

Tính đặc hiệu: Kết quả khảo sát tính đặc hiệu cho thấy mẫu trắng không có pic của các chất cần định lượng; phổ UV và thời gian lưu (t_R) của 12 polyphenol định lượng trong mẫu thử, mẫu chuẩn và mẫu thử thêm chuẩn tương đương nhau; các chất định lượng đều đạt độ tinh khiết pic (xem **Phụ lục 50**). Do đó, quy trình định lượng có tính đặc hiệu cao. Tên và thời gian lưu của 12 hợp chất polyphenol trong mẫu thử đã được xác định (xem **Bảng 3.37**).

Khoảng tuyến tính, LOD, LOQ, độ chính xác và độ đúng: Kết quả khảo sát được trình bày ở **Bảng 3.38, Bảng 3.40, Bảng 3.39, Phụ lục 50**). Quy trình định lượng 12 polyphenol trong cao khô Actisô bằng UPLC-PDA đã xây dựng có độ lặp lại trong ngày

cao với RSD % từ 0,57 - 1,17 %; độ chính xác trung gian có RSD = 0,90 - 2,51 %; độ đúng của phương pháp có tỉ lệ phục hồi của 8 CDC từ 90,0 - 106,3 % (RSD = 0,39 - 2,53 %).

Bảng 3.38. Đường tuyến tính, LOD và LOQ của 8 chất đối chiếu của quy trình định lượng cao khô Actisô bằng UPLC-PDA

Hợp chất	Phương trình hồi quy ^a	R ²	Khoảng áp dụng (µg/ml)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
1-CQA	y = 13433 x	0,9999	1 - 500	0,125	0,412
CF	y = 25533 x	0,9998	1 - 500	0,125	0,412
AC	y = 17659 x	0,9999	1 - 500	0,125	0,412
CY	y = 17657 x	0,9998	1 - 500	0,050	0,165
CR	y = 16497 x	0,9999	1 - 500	0,0625	0,206
SCO	y = 12151 x	0,9998	1 - 500	0,0625	0,206
1,5-diCQA	y = 22109 x	0,9999	1 - 500	0,0625	0,206
4,5-diCQA	y = 20950 x	0,9999	1 - 500	0,0625	0,206

^a Phương trình hồi quy có tính tương thích ($F > F_{0,05}$), hệ số b không có ý nghĩa thống kê

Bảng 3.39. Độ chính xác của quy trình định lượng 12 polyphenol trong cao Actisô

STT	Hợp chất	$\bar{X} \pm SD$ (n = 6) (mg/g)	Hàm lượng (%)	Độ chính xác	
				RSD % (n=6) ^d	RSD % (n=12) ^e
1	1-CQA	8,902 ± 0,02	0,089	0,70	0,91
2	3-CQA	18,261 ± 0,41	1,826 ^a	0,78	1,20
3	CF	12,803 ± 0,03	0,128	0,84	2,01
4	AC	23,972 ± 0,58	2,397	0,96	1,24
5	4-CQA	19,384 ± 0,03	1,938 ^b	0,62	1,05
6	CY	10,57 ± 0,20	1,057	0,76	1,27
7	CR	4,253 ± 0,13	0,425	1,16	2,38
8	SCO	8,374 ± 0,22	0,837	1,09	1,59
9	3,4-diCQA ^c	6,930 ± 1,03	0,693 ^c	0,62	1,60
10	3,5-diCQA ^c	3,331 ± 0,05	0,333 ^c	0,71	1,22
11	1,5-diCQA	1,423 ± 0,03	0,142	0,90	1,24
12	4,5-diCQA	6,890 ± 0,15	0,689	0,83	1,36

^aTính theo 1-CQA; ^bTính theo AC; ^cTính theo 1,5-diCQA; ^dĐộ lặp lại trong ngày; ^eĐộ chính xác trung gian;

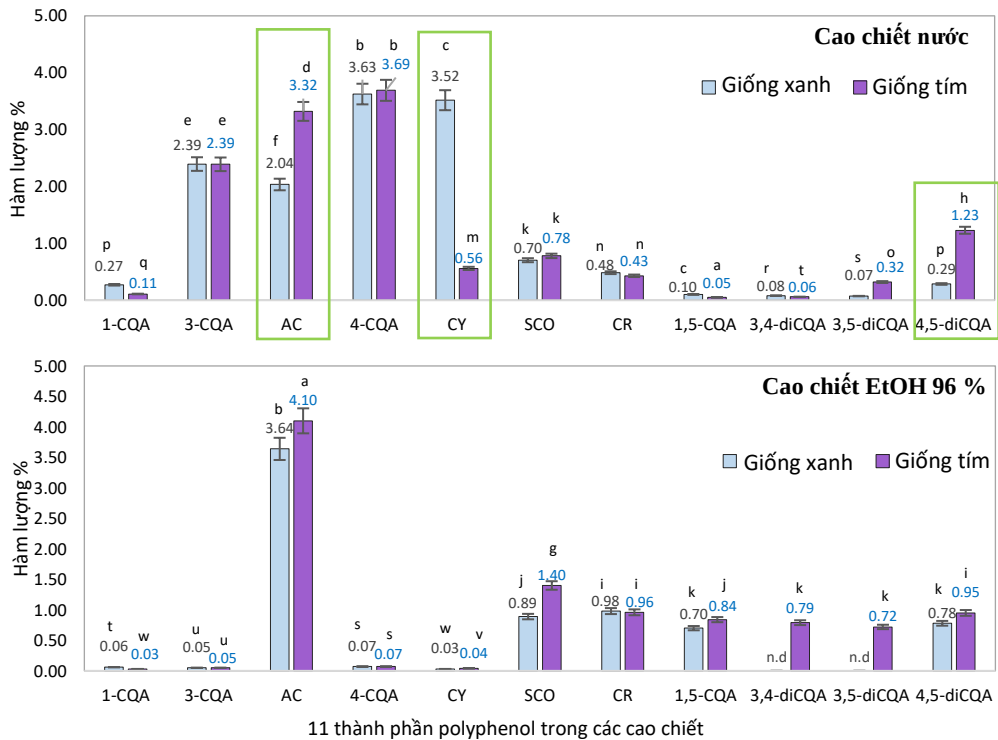
Bảng 3.40. Độ đúng của quy trình định lượng 8 polyphenol trong cao Actisô

Tỉ lệ thêm vào	Tỷ lệ phục hồi (n = 9)							
	1-CQA	CF	AC	CY	CR	SCO	1,5-diCQA	4,5-diCQA
80 %	90,02	103,07	94,75	95,61	91,40	102,81	94,88	91,74
(RSD %)	(0,51)	(0,63)	(0,59)	(1,21)	(2,78)	(0,51)	(1,17)	(1,87)
100 %	95,22	106,34	91,94	96,12	94,40	103,57	97,90	95,26
(RSD %)	(0,67)	(0,46)	(0,88)	(1,10)	(1,83)	(0,87)	(0,68)	(1,33)
120 %	100,41	106,11	93,49	95,66	95,09	105,07	101,07	92,59
(RSD %)	(2,53)	(0,91)	(1,28)	(0,39)	(1,75)	(1,70)	(0,60)	(0,73)
TB %	95,13	105,17	93,39	95,79	93,63	103,82	97,95	93,19

3.2.3. Nghiên cứu động thái tích lũy

3.2.3.1. So sánh thành phần hoạt chất trong các cao chiết của 2 giống Actisô

Lá tươi và lá khô Actisô gồm giống xanh (AX) và giống tím (AT) được xử lý và chiết xuất theo quy trình ở **Mục 2.2.2.3b** (Thông tin độ ẩm, khối lượng và hiệu suất của cao chiết được trình bày ở **Phụ lục 56**). Các cao chiết này được tiến hành định lượng đồng thời 12 hợp chất polyphenol theo quy trình đã xây dựng ở **Mục 3.2.2.3**. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3.42** và **Hình 3.20**.



Hình 3.20. Biểu đồ so sánh hàm lượng polyphenol của cao chiết 2 giống lá Actisô ở Đà Lạt

Ghi chú: Các cột có ký tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$; Tukey)

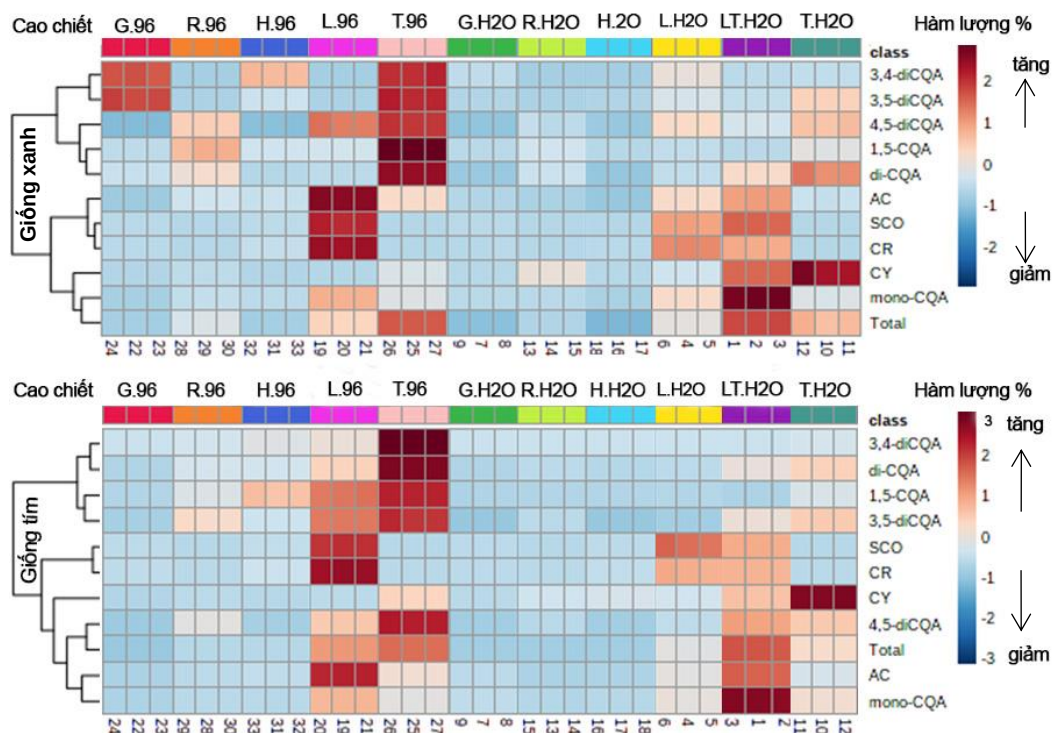
Nhìn chung giống **AX** và **AT** có thành phần polyphenol tương đối giống nhau, khác nhau về tỉ lệ của một số thành phần như CY, AC và 4,5-diCQA tùy thuộc vào dung môi chiết xuất. Ở cao chiết cồn chủ yếu có các thành phần gồm AC (3,64 - 4,10 %) và các di-CQA (0,72 - 0,96 %), trong khi đó ở cao chiết nước có các thành phần chủ yếu là CY (0,56 - 3,52 %) và các mono-CQA (0,11 - 3,69 %). Flavonoid (CR và SCO) có hàm lượng tương đương ở cả 2 giống, và ở cao cồn có flavonoid cao hơn so với cao nước. Ngoài ra, ở cao nước lá Actisô tươi, các thành phần khác biệt chủ yếu ở 2 giống là AC, CY và 4,5-diCQA, trong đó giống **AX** có hàm lượng CY cao hơn

đáng kể, ngược lại giống **AT** có AC và 4,5-diCQA cao hơn giống **AX**. Tổng polyphenol của cao chiết **AX** tương đương hoặc hơi cao hơn so **AT** ở cao chiết nước. Đối với cao cồn, các thành phần polyphenol tương đối giống nhau ở cả 2 giống, trong đó giống **AT** có hàm lượng polyphenol hơi cao hơn so với giống **AX** (xem **Hình 3.20**).

3.2.3.2. So sánh thành phần hoạt chất trong các cao chiết từ các bộ phận của cây

Kết quả phân tích hàm lượng 12 thành phần polyphenol trong các bộ phận dùng (BPD) gồm rễ, thân, lá, gân và hoa Actisô trong các cao chiết nước và cồn cho thấy thân và lá có nhiều polyphenol nhất, bao gồm các polyphenol chính như acid AC, CY, CR và SCO,... Các bộ phận khác như rễ, gân lá và hoa có hàm lượng polyphenol rất thấp từ 0,00 - 0,43 %. Phương pháp chuẩn bị cao chiết cồn 96 % và nước được trình bày ở **Mục 2.2.2.3**, kết quả xem ở **Bảng 3.42** và **Bảng 3.41**.

Bằng việc tổng hợp toàn bộ dữ liệu thu thập được. Bản đồ Heat map mang đến cái nhìn tổng quát về hàm lượng từng polyphenol trong các bộ phận dùng khác nhau của cây Actisô trong các dung môi chiết nước và cồn (**Hình 3.21**).



Hình 3.21. Bản đồ heat map biểu diễn hàm lượng polyphenol trong các cao chiết của các bộ phận khác nhau của cây Actisô giống xanh và giống tím

Chú thích: BPD (G- gân; H- hoa; L - lá khô; R- rễ; T- thân; LT - lá tươi) - Dung môi chiết xuất (H₂O - nước; 96 - ethanol 96 %). Ví dụ: **G.96** (gân lá - cao chiết ethanol 96 %).

Bảng 3.41. So sánh hàm lượng % polyphenol trong cao nước và ethanol 96 %

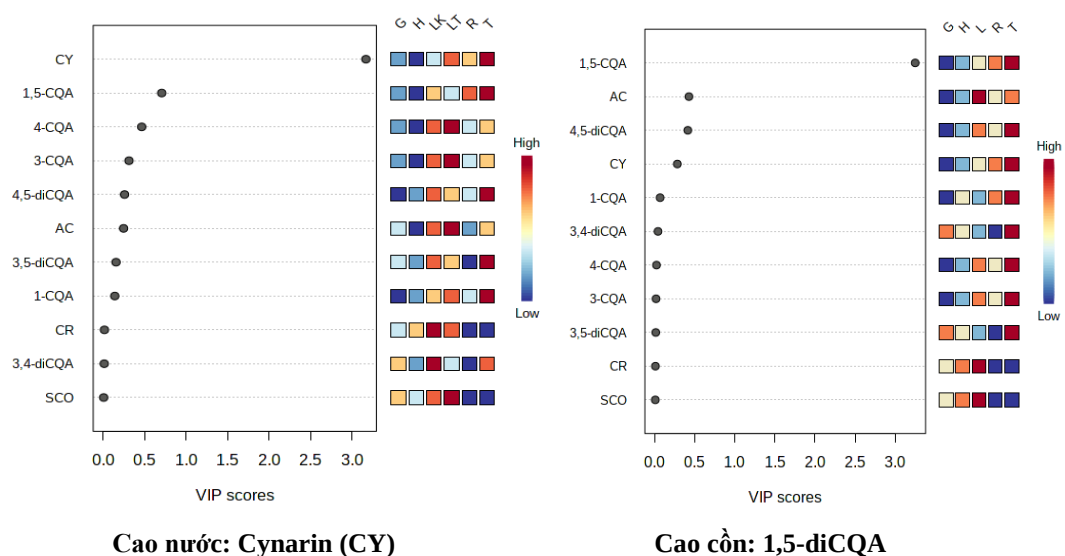
Thành phần	Cao cồn 96 %	Cao nước
Cynarin (1,3-diCQA)	Thân* (0,46-0,70) ^a	Lá tươi** (0,56-3,52); thân*** (1,48-5,02)
Acid chlorogenic	Lá khô*** (3,64-4,10)	Lá tươi** (1,71-3,69)
Flavonoid (SCO và CR)	Lá khô*** (1,87-2,36)	Lá khô** (1,11-1,56)
1,5-diCQA	Thân*** (1,13-7,71)	< 0,3
Tổng mono-CQA	Lá khô* (3,82-4,24)	Lá tươi*** (5,60-9,51)
Tổng di-CQA	Thân*** (9,99-11,25)	Thân** (3,35-7,19)
Polyphenol toàn phần	Lá khô** (7,20-9,96); thân*** (11,91-12,86)	Lá tươi*** (8,4-13,51); thân* (5,94-8,72)
DPPH	Thân**	Lá tươi***; lá khô*; thân**
MDA	Thân***	Lá tươi***; lá khô**; thân**

Kết quả thử nghiệm HTCO của các cao chiết được trình bày ở Mục 3.3.2 (xem **Bảng 3.42**)

Số lượng (*) càng nhiều thể hiện hàm lượng càng cao hay HTCO càng mạnh

^aBPD (hàm lượng %); ^bBPD (IC₅₀ µg/ml)

Ứng dụng mô hình phân tích đa biến bằng phương pháp bình phương tối thiểu từng phần PLS-DA (partial least-squares discriminant analysis) cho thấy sự khác nhau rõ rệt giữa cao nước lá tươi và cao cồn 96 % và phân tích dự đoán điểm quan trọng của biến - VIP scores (Variable importance in projection scores). Trong đó, thành phần hợp chất có sự khác biệt nhiều nhất giữa các bộ phận dùng của Actisô (cả 2 giống) trong cao chiết cồn 96 % là 1,5-diCQA, trong khi cao chiết nước là cynarin (1,3-diCQA) (**Hình 3.22**).

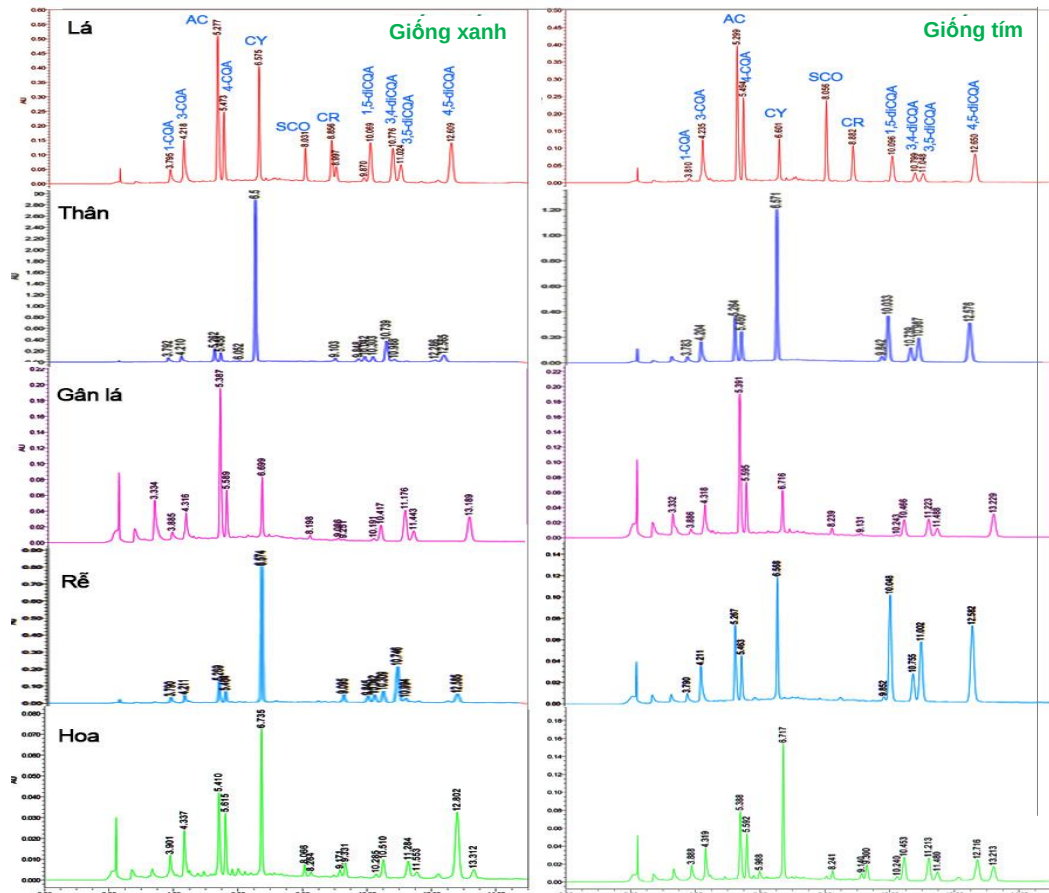
**Hình 3.22. Phân tích VIP score các polyphenol trong các bộ phận cây Actisô giống xanh**

Bảng 3.42. Hàm lượng của các hợp chất polyphenol và kết quả thử nghiệm DPPH và MDA (TB ± SD, n = 3) của các cao chiết Actisô

Mẫu cao chiết		Hàm lượng (TB ± SD, n = 3) (%)													IC ₅₀ (µg/ml)	
		1-CQA	3-CQA	CF	AC	4-CQA	CY	SCO	CR	1,5-diCQA	3,4-diCQA	3,5-diCQA	4,5-diCQA	Tổng	DPPH	MDA
Cao nước	X.LT	0,27±0,014	2,39±0,024	n.d	2,04±0,02	3,62±0,008	3,52±0,001	0,70±0,006	0,48±0,005	0,10±0,001	0,08±0,002	0,07±0,002	0,29±0,007	13,51±0,06	13,27±0,08	119,83±3,90
	X.L	0,19±0,002	0,50±0,004	n.d	1,27±0,007	0,58±0,009	0,51±0,005	0,52±0,006	0,59±0,006	0,31±0,002	0,27±0,004	0,15±0,004	0,46±0,005	5,36±0,027	21,91±0,30	114,00±2,79
	X.G	0,05±0,001	0,10±0,000	n.d	0,37±0,001	0,11±0,000	0,08±0,000	0,02±0,000	0,01±0,001	0,09±0,001	0,09±0,000	0,03±0,000	0,08±0,001	1,03±0,004	62,76±0,77	580,04±18,03
	X.T	0,27±0,009	0,29±0,013	n.d	0,59±0,03	0,37±0,023	5,02±0,353	n.d	n.d	1,15±0,096	0,10±0,002	0,36±0,001	0,56±0,018	8,72±0,463	17,91±0,47	122,97±3,04
	X.R	0,11±0,001	0,13±0,001	n.d	0,28±0,002	0,14±0,01	1,13±0,01	n.d	n.d	0,64±0,007	n.d	n.d	0,22±0,018	2,65±0,017	35,22±0,34	360,32±10,10
	X.H	0,05±0,002	0,07±0,001	n.d	0,09±0,002	0,06±0,001	0,08±0,002	0,01±0,000	0,01±0,000	0,03±0,002	n.d	0,02±0,001	0,11±0,008	0,52±0,013	224,25±4,35	1192,22±60,95
	X.CNC	0,64±0,018	1,64±0,044	n.d	2,33±0,062	1,71±0,053	2,61±0,075	0,70±0,017	0,60±0,016	0,54±0,014	0,27±0,003	0,24±0,003	0,24±0,007	11,51±0,299	20,05±1,05	434,48±9,26
	T.LT	0,11±0,011	2,39±0,033	n.d	3,32±0,042	3,69±0,041	0,56±0,006	0,78±0,006	0,43±0,004	0,05±0,000	0,06±0,002	0,32±0,004	1,23±0,021	12,95±0,085	16,71±0,28	135,59±2,93
	T.L	0,06±0,002	0,44±0,031	n.d	1,02±0,033	0,58±0,017	0,15±0,006	1,11±0,045	0,45±0,016	0,08±0,003	0,06±0,002	0,06±0,002	0,27±0,014	4,29±0,150	30,80±0,23	227,78±4,76
	T.G	0,06±0,001	0,14±0,002	n.d	0,38±0,005	0,14±0,002	0,03±0,001	0,03±0,001	0,01±0,000	0,06±0,001	0,06±0,002	0,02±0,001	0,09±0,001	1,02±0,010	70,62±1,63	709,32±12,56
	T.T	0,18±0,003	1,12±0,029	n.d	0,80±0,006	0,49±0,014	1,48±0,011	n.d	n.d	0,24±0,001	0,24±0,004	0,46±0,006	0,93±0,004	5,94±0,041	19,43±0,127	161,90±7,31
	T.R	0,03±0,004	0,11±0,006	n.d	0,16±0,003	0,09±0,001	0,14±0,004	n.d	n.d	0,07±0,005	0,06±0,001	0,13±0,002	0,22±0,011	1,00±0,012	84,92±0,446	603,03±12,59
	T.H	0,07±0,010	0,12±0,001	n.d	0,19±0,003	0,11±0,003	0,17±0,002	0,04±0,001	0,03±0,000	0,08±0,001	0,06±0,002	0,02±0,000	0,08±0,001	0,96±0,011	129,94±1,786	625,58±9,72
	T.CNC	0,08±0,001	1,63±0,09	n.d	2,13±0,011	1,76±0,012	0,67±0,003	0,67±0,003	0,33±0,002	0,11±0,002	0,09±0,003	0,44±0,009	0,51±0,003	8,40±0,047	29,78±0,27	671,36±16,34
Cao EtOH	X.L96	0,06±0,001	0,05±0,002	n.d	3,64±0,027	0,07±0,003	0,03±0,002	0,89±0,017	0,98±0,015	0,70±0,004	n.d	n.d	0,78±0,018	7,20±0,085	44,18±0,061	712,18±21,65
	X.G96	0,04±0,001	0,01±0,001	n.d	0,16±0,002	0,01±0,000	0,01±0,000	0,02±0,001	0,01±0,001	0,17±0,003	0,84±0,018	0,81±0,018	0,05±0,001	2,13±0,029	92,89±5,259	1644,02±55,61
	X.T96	0,20±0,002	0,06±0,001	n.d	1,28±0,011	0,08±0,001	0,70±0,005	n.d	n.d	7,71±0,038	0,97±0,024	0,91±0,024	0,96±0,009	12,86±0,067	15,06±0,132	75,02±3,47
	X.R96	0,13±0,003	0,04±0,001	n.d	0,67±0,03	0,04±0,002	0,18±0,002	n.d	n.d	3,06±0,219	n.d	n.d	0,51±0,005	4,63±0,260	27,11±0,569	259,03±3,80
	X.H96	0,07±0,003	0,03±0,003	n.d	0,58±0,023	0,04±0,004	0,03±0,001	0,03±0,004	0,05±0,002	0,61±0,029	0,50±0,012	0,11±0,002	0,07±0,002	2,11±0,021	134,21±1,288	1689,92±52,69
	X.L40	0,15±0,003	0,30±0,007	n.d	1,66±0,037	0,32±0,008	0,21±0,005	0,77±0,015	0,98±0,018	0,48±0,009	0,42±0,011	0,15±0,002	0,48±0,009	5,93±0,094	26,89±0,248	287,30±10,76
	T.L96	0,03±0,000	0,05±0,001	n.d	4,10±0,038	0,07±0,002	0,04±0,001	1,40±0,023	0,96±0,015	0,84±0,016	0,79±0,021	0,72±0,005	0,95±0,016	9,96±0,047	34,24±1,042	662,26±14,55
	T.G96	0,02±0,000	0,02±0,000	n.d	0,16±0,002	0,01±0,000	n.d	0,05±0,001	0,02±0,001	0,08±0,001	0,08±0,002	0,007±0,003	0,05±0,001	0,56±0,002	149,95±2,282	1764,38±22,67
	T.T96	0,13±0,001	0,23±0,002	n.d	1,32±0,009	0,24±0,002	0,46±0,003	n.d	n.d	1,13±0,007	5,43±0,018	0,93±0,002	2,04±0,017	11,91±0,041	18,04±0,285	178,92±6,20
	T.R96	0,07±0,004	0,07±0,006	n.d	0,37±0,012	0,05±0,005	0,04±0,001	n.d	n.d	0,24±0,007	0,21±0,002	0,38±0,01	0,55±0,014	1,98±0,026	60,29±0,857	618,73±9,89
	T.H96	0,03±0,004	0,02±0,004	n.d	0,44±0,009	0,44±0,015	0,02±0,001	0,02±0,001	0,07±0,002	0,60±0,001	0,47±0,001	0,19±0,001	0,10±0,003	1,97±0,04	118,31±1,310	1275,23±34,99
	T.L40	0,07±0,001	0,28±0,011	n.d	1,95±0,032	0,32±0,006	0,09±0,002	1,08±0,027	0,70±0,016	0,31±0,010	0,20±0,002	0,15±0,002	0,65±0,02	5,80±0,109	27,48±1,152	341,43±14,32

- n.d: Không phát hiện được; Giống xanh (X) hoặc tím (T) - BPD (G- gân; H- hoa; L - lá; R- rễ; T- thân; LT - lá tươi; LK - lá khô) - Dung môi chiết xuất (H₂O -nước; 96 ethanol 96 %). Ví dụ: **XG.96** (Giống xanh - gân - cao chiết ethanol 96 %). X.CNC và T.CNC (Cao nghiên cứu giống xanh và tím). Độ ẩm cao xem ở **Phụ lục 56**

- CQA (caffeoylquinic acid); CF (acid caffeic); AC (acid chlorogenic); CY (Cynarin); SCO (scolymosid); CR (cynarosid)



Hình 3.23. SKD phân tích các thành phần trong cao nước của Actisô (2 giống)

Ghi chú: CQA (caffeoylquinic acid); CF (acid caffeic); AC (acid chlorogenic); CY (Cynarin); SCO (scolymosid); CR (cynarosid)

3.2.3.3. Đánh giá hoạt chất tích lũy theo thời gian thu hái trong năm

Acid chlorogenic (AC) và cynarin (CY) được chọn là đối tượng để đánh giá hàm lượng tích lũy theo thời gian thu hái của chúng trong lá khô và cao Actisô (giống xanh). Lá Actisô tươi được thu hái, xử lý và phơi khô theo quy trình xử lý lá khô đã khảo sát ở Mục 2.2.3, phần còn lại được xử lý và chiết xuất cao đặc theo quy trình ở Mục 2.2.3 và tiến hành định lượng bằng HPLC-PDA (xem Mục 3.2.2.1). Kết quả được trình bày ở Bảng 3.43.

Kết quả cho thấy AC trong lá Actisô có hàm lượng từ 1,17 - 4,94 % và CY trong cao Actisô là 1,34 - 3,58 %. Trong đó, hàm lượng AC và CY tích lũy cao nhất vào tháng 10 - 12 (AC = 4,22 - 4,94 %; CY = 3,1 - 3,58 %) và hàm lượng thấp nhất vào tháng 9, 4, 5 (AC = 1,17 - 1,24 %; CY = 1,34 - 1,57 %).

Bảng 3.43. Hàm lượng tích lũy của AC và CY theo thời gian thu hoạch năm 2016-2017

Tháng	Nhiệt độ [#] (°C)	Số giờ nắng [#] (giờ)	Lượng mưa [#] (mm)	Hàm lượng % (TB±SD, n=3)	
				AC**	CY##
Th.6*	19,3	152	226	1,67 ^g ± 0,02	2,05 ^g ± 0,03
Th.7	19,0	140	209	2,64 ^e ± 0,05	2,56 ^{d,e} ± 0,03
Th.8	19,3	150	83	2,74 ^e ± 0,04	2,67 ^{c,d} ± 0,03
Th.9	18,6	98	499	1,21 ^h ± 0,09	1,42 ⁱ ± 0,04
Th.10	18,5	194	377	4,70 ^b ± 0,12	3,10 ^b ± 0,06
Th.11	18,5	203	116	4,22 ^c ± 0,06	3,08 ^b ± 0,06
Th.12	17,4	231	174	4,94 ^a ± 0,13	3,58 ^a ± 0,04
Th.1	17,1	143	13	2,01 ^f ± 0,04	2,53 ^{e,f} ± 0,04
Th.2	16,8	205	37	3,39 ^d ± 0,05	2,42 ^f ± 0,04
Th.3	18,5	224	25	3,52 ^d ± 0,05	2,75 ^c ± 0,06
Th.4	19,0	170	205	1,24 ^h ± 0,03	1,34 ⁱ ± 0,02
Th.5	20,4	161	259	1,17 ^h ± 0,02	1,57 ^h ± 0,04

[#] Đo tại trạm quan trắc Đà Lạt ¹⁵⁷; *tháng thu hoạch đầu tiên

**AC: Hàm lượng % trong lá Actisô khô; ## CY: Hàm lượng % trong cao đặc Actisô

Các giá trị hàm lượng có kí tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê (Tukey, $p < 0,05$)

3.2.4. Định lượng các chế phẩm

3.2.4.1. Định lượng các chế phẩm từ lá trà khô Actisô

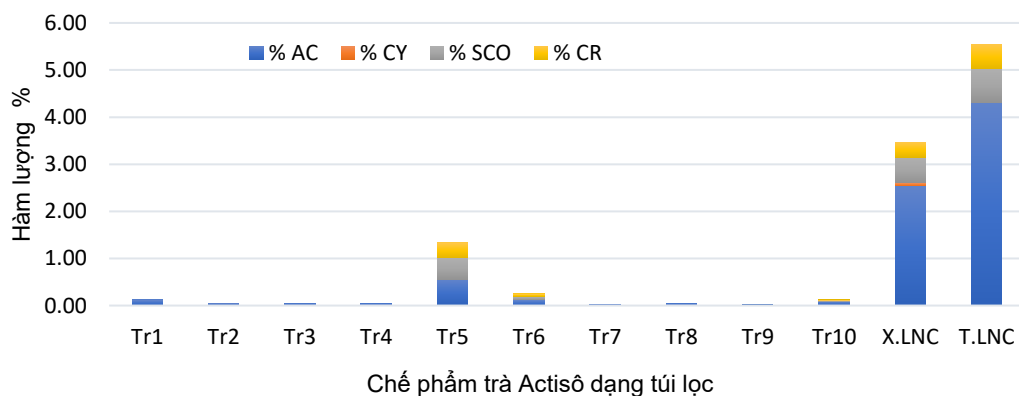
Bảng 3.44. Kết quả hàm lượng % 4 polyphenol chính của chế phẩm trà túi lọc trên thị trường

Hàm lượng %	Chế phẩm trà túi lọc (n = 3)											
	Tr1	Tr2	Tr3	Tr4	Tr5	Tr6	Tr7	Tr8	Tr9	Tr10	X.LNC	T.LNC
AC	0,121	0,05	0,042	0,040	0,559	0,120	0,026	0,040	0,013	0,093	2,540	4,320
CY	n.d	n.d	n.d	n.d	n.d	0,011	n.d	n.d	n.d	n.d	0,070	n.d
SCO	n.d	n.d	n.d	n.d	0,459	0,070	n.d	n.d	n.d	0,010	0,540	0,710
CR	n.d	n.d	n.d	n.d	0,315	0,050	n.d	n.d	n.d	0,015	0,320	0,520
Tổng	0,121	0,005	0,042	0,040	1,333	0,251	0,026	0,040	0,013	0,118	3,870	5,550

Tr: Trà túi lọc Actisô, thành phần trà và độ ẩm được trình bày ở Phụ lục 52

LNC: Lá Actisô nghiền cứu (Giống xanh – X.LNC và giống tím – T.LNC) được xử lý ở điều kiện thích hợp (xem Mục 3.2.4.1).

n.d: Non-detected (Không phát hiện)

**Hình 3.24. Hàm lượng % của 4 polyphenol chính của chế phẩm trà Actisô trên thị trường**

10 chế phẩm trà túi lọc Actisô có thành phần khác nhau (lá, rễ, thân, hoa, có hoặc không có dược liệu khác) (xem **Phụ lục 52**) được so sánh hàm lượng AC, CY, SCO và CR theo quy trình đã xây dựng ở **Mục 3.2.2.1** và **Mục 2.2.2.4**, kết quả được trình bày ở **Bảng 3.44** và **Hình 3.24**. Hàm lượng của các polyphenol chính trong các chế phẩm từ Actisô bao gồm: AC (0,013 - 4,32 %), CY (0,00 - 0,47 %), SCO (0,00 - 0,71 %) và CR (0,00 - 0,52 %). Tổng 4 polyphenol chính trong các chế phẩm có hàm lượng từ 0,005 - 5,550. Trong đó, các lá Actisô của đề tài nghiên cứu (X.LNC và T.LNC) có hàm lượng cả 4 polyphenol cao nhất gồm AC (2,54 - 4,32 %), CY (0,00 - 0,07 %); SCO (0,54 - 0,71 %), CR (0,32 - 0,52 %), tổng 4 polyphenol (3,87 - 5,55 %).

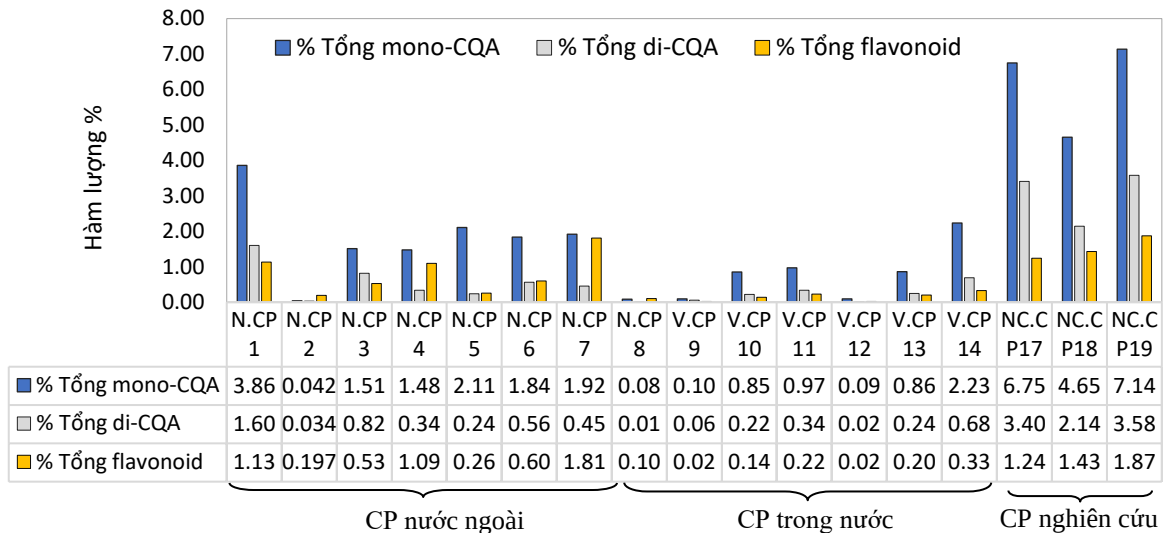
3.2.4.2. Định lượng các chế phẩm từ cao chiết Actisô

Tám chế phẩm từ cao chiết Actisô của nước ngoài (Mỹ, Pháp, Đức – xem thông tin chế phẩm ở **Phụ lục 53**) (**N.CP1 - 8**) và 6 chế phẩm của Việt Nam (**V.CP9 - 14**), so sánh với 3 chế phẩm nghiên cứu (**NC.CP17 - 19**) (xem **Mục 3.5**) được tiến hành so sánh hàm lượng 12 polyphenol theo quy trình định lượng đã xây dựng ở **Mục 3.2.2.3**. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3.45**.

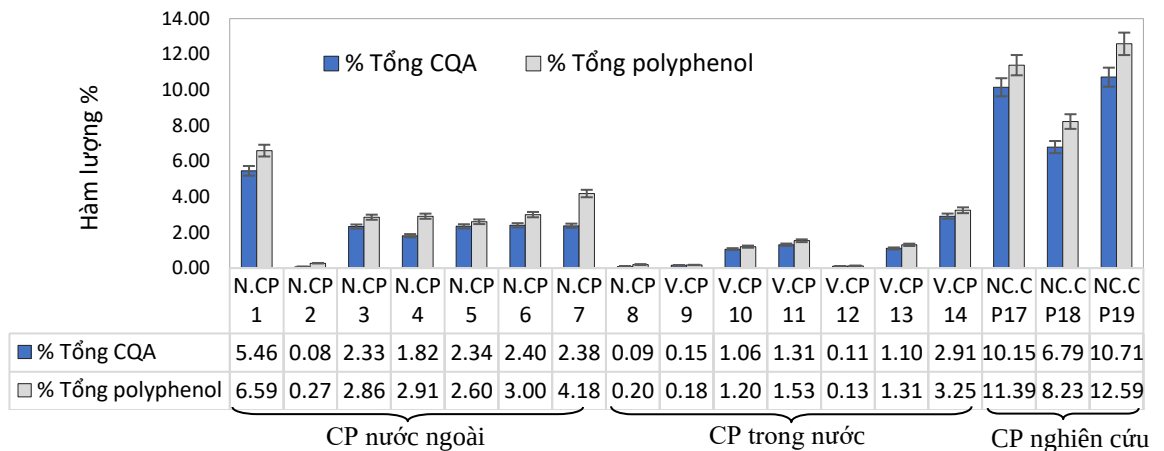
Nhìn chung, các mono-CQA (0,04 - 7,14 %) là thành phần chiếm chủ yếu trong cao chiết Actisô (nguyên liệu sản xuất chế phẩm), kế đến là di-CQA (0,02 - 3,58 %) và sau cùng là các flavonoid (0,02 - 1,87 %) (ngoại trừ 3 chế phẩm của nước ngoài là **N.CP2, 4 và 8** có hàm lượng flavonoid cao hơn di-CQA). Thành phần chiếm tỉ lệ cao nhất trong các mono-CQA là acid chlorogenic có hàm lượng từ 0,01 - 2,73 %. Thành phần chủ yếu trong các di-CQA là cynarin (0,01 - 2,61 %); trong flavonoid là scolymosid (0,06 - 1,1 %) và cynarosid (0,009 - 1,32 %). Hàm lượng % của các polyphenol trong các chế phẩm được so sánh ở **Hình 3.25**.

So sánh hàm lượng của tổng các polyphenol trong nguyên liệu của chế phẩm, hàm lượng của tổng các dẫn xuất CQA (TCQ) gồm [4 dẫn xuất mono-CQA (1-CQA; 3-CQA; AC; 4-CQA) và 5 di-CQA (CY; 1,5-diCQA; 3,4-diCQA; 3,5-diCQA; 4,5-diCQA)] và tổng polyphenol (TPC) (gồm 12 thành phần polyphenol định lượng) có sự tương quan với nhau, TPC chỉ cao hơn TCQ từ 0,2 - 2,0 % vì các dẫn xuất CQA (gồm mono-CQA và di-CQA) là thành phần polyphenol chính trong cao chiết ALE.

Các chế phẩm có hàm lượng TCQ từ 0,08 - 10,71 % và 0,13 - 12,59 % TPC, tương ứng với 0,37 - 27,29 mg TCQ và 0,17 - 32,96 mg trong 1 đơn vị chế phẩm. Trong đó, 6/8 chế phẩm nước ngoài (**N.CP1, 3-7**) có hàm lượng TCQ và TPC cao (4,66 - 32,96 mg), và 2 chế phẩm (**N.CP2 và 8**) có hàm lượng khá thấp 0,37 - 0,46 mg/viên. Đối với 6 chế phẩm trong nước được khảo sát, chỉ có 1 chế phẩm (**V.CP14**) có hàm lượng TCQ và TPC từ 5,83 - 6,49 mg/viên, các chế phẩm còn lại có hàm lượng khá thấp từ 2,62 - 3,37 mg (**V.CP10, 11, 13**) và rất thấp chỉ từ 0,17 - 1,16 mg/viên (**V.CP8, 9, 12**). Cả 3 chế phẩm nghiên cứu (**NC.CP17-19**) đều có hàm lượng TCQ và TPC rất cao, từ 13,58 - 25,17 mg/viên. Hàm lượng phần trăm của TCQ và TPC được so sánh giữa các chế phẩm ở **Hình 3.26**.



Hình 3.25. Biểu đồ so sánh hàm lượng % các polyphenol trong các chế phẩm Actisô



Hình 3.26. Biểu đồ so sánh hàm lượng % tổng polyphenol trong các chế phẩm Actisô

CP nước ngoài (N.CP1-8); CP trong nước (V.CP9-16); CP nghiên cứu (NC.CP17-19)

Bảng 3.45. Hàm lượng % của các hợp chất polyphenol (TB ± SD, n = 3) của các chế phẩm có chứa cao chiết Actisô

STT	Chế phẩm	Độ ẩm (%)	Hàm lượng (TB ± SD, n = 3) (%)												Tổng
			1-CQA	3-CQA	CF	AC	4-CQA	CY	SCO	CR	1,5-diCQA	3,4-diCQA	3,5-diCQA	4,5-diCQA	
1	N.CP1	5,15	0,38±0,001	0,87±0,004	0,01±0,002	1,49±0,037	1,12±0,008	0,92±0,002	0,39±0,011	0,74±0,002	0,20±0,001	0,09±0,001	0,04±0,003	0,36±0,000	6,60±0,032
2	N.CP2	5,16	0,01±0,000	0,014±0,001	0,002±0,00	0,013±0,001	0,008±0,00	0,018±0,00	0,14±0,002	0,06±0,001	0,005±0,00	0,006±0,00	0,002±0,00	0,004±0,001	0,27±0,002
3	N.CP3	5,65	0,20±0,003	0,40±0,001	0,004±0,001	0,52±0,012	0,39±0,008	0,51±0,014	0,22±0,001	0,31±0,004	0,10±0,003	0,05±0,004	0,03±0,003	0,12±0,021	2,86±0,058
4	N.CP4	5,62	0,11±0,002	0,42±0,002	0,003±0,001	0,57±0,026	0,38±0,023	0,22±0,008	0,33±0,002	0,76±0,006	0,06±0,003	0,01±0,001	0,07±0,000	0,04±0,000	2,91±0,065
5	N.CP5	5,50	0,10±0,002	0,09±0,004	n.d	1,68±0,294	0,23±0,012	0,07±0,002	0,15±0,001	0,10±0,001	n.d	0,05±0,002	0,08±0,003	0,04±0,002	2,60±0,320
6	N.CP6	6,21	0,14±0,001	0,52±0,002	n.d	0,67±0,003	0,51±0,003	0,40±0,002	0,18±0,001	0,42±0,002	0,07±0,002	0,03±0,001	0,07±0,001	0,03±0,001	3,00±0,014
7	N.CP7	5,12	0,15±0,003	0,51±0,002	0,01±0,002	0,75±0,017	0,50±0,009	0,29±0,003	0,49±0,014	1,32±0,027	0,09±0,006	0,02±0,002	0,02±0,003	0,03±0,002	4,20±0,057
8	N.CP8	5,53	n.d	0,03±0,001	n.d	0,03±0,004	0,02±0,001	0,01±0,001	0,07±0,004	0,04±0,004	n.d	n.d	n.d	n.d	0,20±0,005
9	V.CP9	3,08	0,003±0,001	0,018±0,003	0,001±0,00	0,052±0,008	0,022±0,003	0,016±0,002	0,016±0,003	0,009±0,005	0,006±0,001	0,019±0,003	0,005±0,001	0,010±0,002	0,18±0,026
10	V.CP10	5,96	0,05±0,001	0,23±0,001	n.d	0,33±0,004	0,23±0,003	0,19±0,001	0,10±0,002	0,04±0,000	0,02±0,000	0,01±0,001	0,01±0,002	0,008±0,00	1,20±0,010
11	V.CP11	2,06	0,07±0,002	0,24±0,008	n.d	0,33±0,008	0,32±0,007	0,26±0,007	0,16±0,010	0,06±0,002	0,003±0,001	0,03±0,003	0,01±0,008	0,032±0,004	1,54±0,049
12	V.CP12	2,68	n.d	0,03±0,000	n.d	0,034±0,001	0,026±0,001	0,010±0,00	0,017±0,001	0,007±0,001	0,001±0,00	0,002±0,00	0,001±0,00	0,001±0,00	0,13±0,001
13	V.CP13	2,78	0,04±0,001	0,18±0,004	n.d	0,41±0,007	0,23±0,008	0,14±0,002	0,06±0,001	0,15±0,045	0,03±0,001	0,03±0,003	0,02±0,001	0,03±0,001	1,30±0,036
14	V.CP14	1,59	0,04±0,001	0,45±0,080	n.d	1,11±0,042	0,63±0,024	0,29±0,007	0,23±0,006	0,10±0,002	0,09±0,004	0,11±0,002	0,07±0,005	0,13±0,005	3,25±0,080
15	V.CP15	11,29	0,12±0,001	0,87±0,006	0,02±0,001	2,65±0,016	1,20±0,010	0,50±0,003	0,46±0,009	0,23±0,002	0,30±0,001	0,25±0,002	0,14±0,001	0,33±0,003	7,08±0,041
16	V.CP16	11,59	0,13±0,007	0,70±0,003	0,04±0,001	0,91±0,003	0,89±0,003	0,69±0,003	0,32±0,002	0,70±0,004	0,06±0,000	0,11±0,000	0,05±0,009	0,11±0,004	4,72±0,019
17	NC.CP17	8,42	0,95±0,014	1,27±0,037	n.d	2,33±0,019	2,18±0,022	2,61±0,036	0,74±0,002	0,50±0,004	0,38±0,007	0,16±0,005	0,12±0,005	0,12±0,003	11,39±0,082
18	NC.CP18	7,56	0,59±0,006	1,32±0,011	n.d	1,53±0,019	1,21±0,016	1,66±0,025	0,86±0,005	0,57±0,002	0,20±0,006	0,12±0,003	0,09±0,003	0,07±0,003	8,22±0,073
19	NC.CP19	8,21	1,09±0,021	1,94±0,015	0,14±0,001	2,73±0,016	1,97±0,001	2,02±0,034	1,10±0,002	0,77±0,003	0,71±0,002	0,34±0,002	0,19±0,001	0,33±0,001	12,73±0,052

Chú thích: Chế phẩm nước ngoài (N.CP1 – N.CP8); Chế phẩm trong nước (V.CP9 – V.CP16); Chế phẩm nghiên cứu (NC.CP17 – NC.CP19)

CQA (caffeoylquinic acid); CF (acid caffeic); AC (acid chlorogenic); CY (cynarin); SCO (scolymosid); CR (cynarosid);

3.3. Tác dụng sinh học

3.3.1. Hoạt tính chống oxy hóa của các chất tinh khiết

So sánh hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) của 9 hợp chất phân lập từ lá Actisô: Kết quả thử nghiệm DPPH và MDA của 9 hợp chất được trình bày ở **Hình 3.27** và **Bảng 3.46** cho thấy phần lớn các hợp chất đều cho HTCO hóa mạnh hơn chứng dương silymarin. **Đối với phương pháp thu dọn gốc tự do DPPH**, 5 hợp chất có HTCO mạnh gồm CY, AC, SCO, CR, 1,5-diCQA và 4,5-diCQA (với $IC_{50} = 5,71 - 7,79 \mu M$) so với acid ascorbic ($IC_{50} = 33,53 \mu M$, $p < 0,05$). Các polyphenol này là thành phần chính của lá Actisô. **Đối với phương pháp thử nghiệm MDA**, 2 hợp chất có HTCO mạnh nhất là cynarin và cynarosid ($IC_{50} = 24,7 - 66,8 \mu M$) so với silymarin ($IC_{50} = 1115,8 \mu M$, $p < 0,05$). HTCO của các chất tinh khiết được sắp xếp như sau:

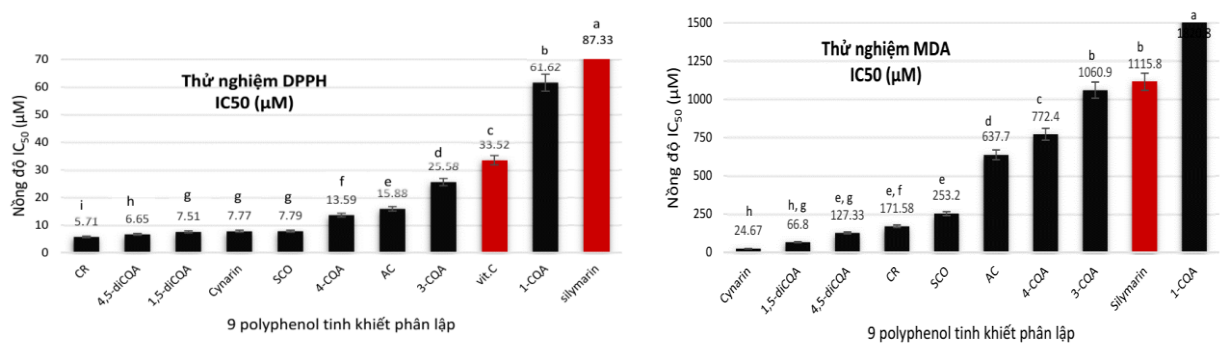
- Thử nghiệm DPPH: Cynarosid* > 4,5-diCQA > 1,5-diCQA = cynarin* = scolymosid > 4-CQA > acid chlorogenic* > **vitamin C** > 3-CQA > 1-CQA > **silymarin**
- Thử nghiệm MDA: Cynarin* > 1,5-diCQA > 4,5-diCQA > cynarosid* > scolymosid > acid chlorogenic* > 4-CQA > 3-CQA > **silymarin** > 1-CQA.

Trong đó, các chất AC, CY và CR được lựa chọn làm chất marker trong kiểm nghiệm lá, cao chiết và chế phẩm Actisô.

Bảng 3.46. $IC_{50} \mu M$ (TB $\pm$ SD) của 9 hợp chất phân lập bằng thử nghiệm DPPH và MDA

Stt	Tên hợp chất	Thử nghiệm DPPH (n = 3)			Thử nghiệm MDA (n = 2)		
		Nồng độ ($\mu g/ml$)	R ²	$IC_{50} \pm SD$ (μM)	Nồng độ ($\mu g/ml$)	R ²	$IC_{50} \pm SD$ (μM)
1	1-CQA	1,0 - 40	0,999	61,62 ^b $\pm$ 0,63	200 - 700	0,998	1820,8 ^a $\pm$ 75,9
2	3-CQA	1,0 - 17,5	0,981	25,58 ^d $\pm$ 0,12	100 - 450	0,999	1060,9 ^b $\pm$ 36,4
3	AC	0,5 - 10	0,999	15,88 ^e $\pm$ 0,08	25 - 500	0,996	637,7 ^d $\pm$ 29,7
4	4-CQA	0,5 - 10	0,989	13,59 ^f $\pm$ 0,02	50 - 400	0,980	772,3 ^c $\pm$ 36,5
5	Cynarin	0,5 - 7,5	0,990	7,77^g $\pm$ 0,11	2,5 - 50	0,981	24,7^h $\pm$ 0,81
6	SCO	0,25 - 7,5	0,994	7,79^g $\pm$ 0,06	10 - 200	0,985	253,2 ^e $\pm$ 6,49
7	CR	0,25 - 5,0	0,988	5,71ⁱ $\pm$ 0,06	10 - 150	0,996	171,6 ^{e,f} $\pm$ 6,39
8	1,5-diCQA	0,5 - 7,5	0,997	7,51^g $\pm$ 0,03	10 - 80	0,987	66,8^{h,g} $\pm$ 2,19
9	4,5-diCQA	0,25 - 5,0	0,996	6,65^h $\pm$ 0,16	10 - 150	0,980	127,3 ^{e,g} $\pm$ 5,30
10	Silymarin	20 - 100	0,998	87,33 ^a $\pm$ 0,54	100 - 800	0,988	1115,8 ^b $\pm$ 25,7
11	Vit.C	0,5 - 10	0,993	33,53 ^c $\pm$ 0,18	-	-	-

Các giá trị trung bình của IC_{50} có các ký tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$; Tukey)



Hình 3.27. IC₅₀ μM (TB ± SD) của 9 hợp chất tinh khiết phân lập từ lá Actisô

Ghi chú: Các giá trị IC₅₀ có các ký tự theo sau khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$). Biểu đồ biểu diễn IC₅₀ theo mức độ tăng dần từ trái sang phải đồng nghĩa với HTCO giảm dần.

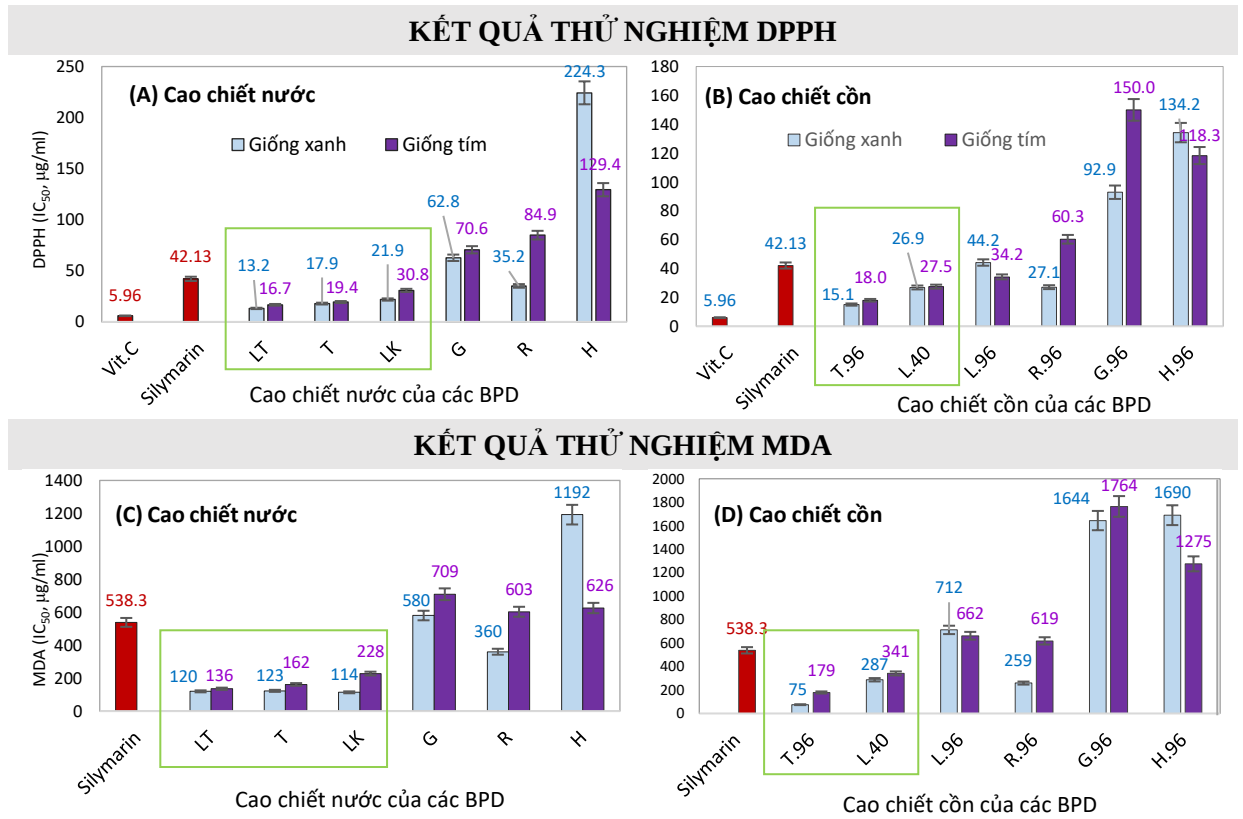
3.3.2. Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) của các cao chiết

Các bộ phận dùng khác nhau của cây Actisô (lá, gân lá, thân, rễ, hoa) được chiết xuất với dung môi nước, ethanol 40 và 96 % thu được các cao chiết tương ứng (xem ở **Mục 2.2.2.3**). Các cao chiết này được định lượng các polyphenol chính và đồng thời được đánh giá tác dụng chống oxy hóa bằng phương pháp thu dọn gốc tự do DPPH và MDA, cách tiến hành thử nghiệm được trình bày ở **Mục 2.2.4**. Kết quả được trình bày ở **Hình 3.28** và **Phụ lục 60**.

Nhìn chung, HTCO của các cao chiết theo mô hình DPPH và MDA có sự tương quan khá tốt, nghĩa là cao chiết có IC₅₀ ở thử nghiệm DPPH thấp thì cũng có IC₅₀ thấp ở thử nghiệm MDA. Điều này được thể hiện ở biểu đồ **Hình 3.28** cho thấy sự tương quan giữa các cột của **Hình 3.28-A, B** (IC₅₀, thử nghiệm DPPH) và các cột ở **Hình 3.28-C, D** (IC₅₀, thử nghiệm MDA).

Qua biểu đồ ở **Hình 3.28** cho thấy giá trị IC₅₀ của các cao chiết lá và thân ở cả 2 phương pháp thử nghiệm đều thấp hơn các BPD khác, cao hơn IC₅₀ của vitamin C (DPPH: 5,96 μg/ml) và thấp hơn silymarin (DPPH: 42,13 và MDA: 538,3 μg/ml), cho thấy hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) của cao chiết lá và thân là mạnh nhất so với các BPD khác, thấp hơn vitamin C nhưng cao hơn silymarin. Giá trị IC₅₀ của các cao chiết nước là (DPPH: 13,2 - 224,3 và MDA: 136 - 1192 μg/ml) và cao chiết cồn là (DPPH: 15,1 - 150,0 và MDA: 75 - 1.764 μg/ml). Cao chiết nước có HTCO mạnh nhất, kể đến là cao ethanol 40 % và sau cùng là cao ethanol 96 %. Ở cao chiết nước, lá tươi (ở cả 2 giống) đều có HTCO mạnh nhất. Giống xanh có HTCO mạnh hơn so

với giống tím thể hiện qua cả 2 phương pháp DPPH và MDA.



Hình 3.28. Biểu đồ so sánh IC₅₀ (µg/ml, n=3) của các cao chiết Actisô (giống xanh và tím) trong thử nghiệm DPPH và MDA

Chú thích: - Cao chiết nước: LT – lá tươi; LK – lá khô; T – thân; G – gân; R – rễ; H – hoa

- Cao chiết cồn: Chữ cái đầu là kí hiệu BPD tương tự cao chiết nước. Kí hiệu sau là dung môi chiết xuất (EtOH 40 và 96 %).

- Biểu đồ được sắp xếp theo IC₅₀ tăng dần (HTCO giảm dần)

- Sự khác biệt giữa các mẫu có ý nghĩa thống kê (Tukey, $p < 0,05$) (xem **Phụ lục 61**)

3.4. Nghiên cứu chiết xuất cao Actisô

3.4.1. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) cho nguyên liệu lá Actisô

3.4.1.1. Kiểm nghiệm nguyên liệu lá Actisô

a. Vi phẫu:

Đặc điểm vi phẫu của lá Actisô chưa được mô tả trong ĐĐVN V. Do vậy, vi phẫu của lá Actisô (giống xanh và tím) được khảo sát để phục vụ cho xây dựng TCCS.

Gân lá: Mặt trên lõm hình chữ V, mặt dưới lồi có nhiều chỗ uốn lượn. Biểu bì mang nhiều lông che chở đa bào một dãy, thường có 4 - 5 tế bào, nhiều lông dài uốn lượn, đan xen nhau; rải rác có các lông tiết đơn bào đầu tròn. Sát lớp biểu bì là mô dày góc, gồm 2 - 3 lớp tế bào. Mô dẫn gồm 3 - 5 bó libe - gỗ rời nhau, hình trứng thuôn dài: Bó ở giữa lớn, các bó hai bên nhỏ dần, gỗ trên - libe dưới và có mô dày bao

quanh (xem hình ở **Phụ lục 5**).

Phiến lá: Biểu bì trên và biểu bì dưới gồm 1 lớp tế bào hình chữ nhật dài, mang nhiều lông che chở đa bào và lông tiết tương tự như ở phần gân lá. Mô mềm giậu gồm 2 hàng tế bào hình chữ nhật to thuôn dài, xếp sát nhau và thẳng góc với biểu bì trên, kể đến là mô mềm khuyết (xem hình ở **Phụ lục 5**).

b. Bột dược liệu: Đạt theo tiêu chuẩn DĐVN V

Kết quả: Mảnh biểu bì phiến lá gồm những tế bào hình nhiều cạnh, mang lỗ khí và lông che chở dài. Mảnh biểu bì gân lá gồm tế bào hình chữ nhật, thành mỏng. Sợi riêng lẻ hay tập trung thành từng bó. Lông tiết đơn bào, đầu tròn. Mảnh mạch xoắn, mạch mạng, mạch vòng và mạch vạch. Mảnh mô mềm. Nhiều khối nhựa màu nâu, kích thước to nhỏ không nhất định (xem hình ở **Phụ lục 5**).

c. Định tính:

Theo tiêu chuẩn DĐVN V: Phản ứng hóa học và SKLM

Kết quả: Đạt (xem hình ở **Phụ lục 5**)

Theo TCCS: Phân tích bằng HPLC-PDA (theo điều kiện ở **Mục 3.2.2.1**)

Kết quả: Pic AC (thử) có $t_R = 15,6$ và AC (chuẩn) có $t_R = 15,7$ (phút)

Pic CR (thử) có $t_R = 23,7$ và CR (chuẩn) có $t_R = 23,8$ (phút)

d. Độ ẩm: Theo tiêu chuẩn DĐVN V (Phụ lục 9.6) (Không quá 13 %)

Kết quả (TB $\pm$ SD, n=12): Đạt $10,84 \pm 0,32$ % (xem ở **Phụ lục 5**)

e. Tro toàn phần: Theo tiêu chuẩn DĐVN V (Phụ lục 9.8) (Không quá 15 %)

Kết quả (TB $\pm$ SD, n=12): Đạt $13,8 \pm 0,13$ % (xem ở **Phụ lục 5**)

f. Tạp chất: Theo tiêu chuẩn DĐVN V (Phụ lục 12.11) (Không quá 0,5 %)

Kết quả (TB $\pm$ SD, n=12): Đạt $0,32 \pm 0,003$ %

g. Định lượng:

Theo tiêu chuẩn DĐVN V: Định lượng cynarin bằng UV-Vis (Không dưới 0,1 %)

Kết quả: Giống xanh = $11,78 \pm 0,63$ %; Giống tím = $12,45 \pm 0,54$ %

Theo TCCS: Định lượng acid chlorogenic bằng HPLC-PDA (Không dưới 2,5 %)

Kết quả: Giống xanh thu hoạch tháng 7-12/2016 và 2-3/2017 có AC từ 2,64 - 4,94 % nên đạt TCCS. Các lá thu hoạch tháng 1/2017 và 4-6/2017 có hàm lượng AC không đạt TCCS (dưới 2,5 %). Do đó, các lá này không được dùng để chiết xuất cao

chuẩn hóa. Không khảo sát hàm lượng AC trong lá tím theo thời kỳ thu hái, tuy nhiên qua một số khảo sát hàm lượng polyphenol trong các cao chiết ở **Mục 3.2.3** cho thấy giống tím thường có hàm lượng AC cao hơn giống xanh.

3.4.1.2. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) của nguyên liệu lá Actisô

Bảng 3.47. Tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) của nguyên liệu lá Actisô

Chỉ tiêu	Phương pháp thử	Yêu cầu
1. Vi phẫu ^a	Soi kính hiển vi	Gân lá và phiến lá giống với mô tả ở Mục 3.5.1.a
2. Soi bột	Soi kính hiển vi	Bột có các cấu tử như mô tả ở Mục 3.5.1.a
3. Độ ẩm ^a	ĐĐVN V (Phụ lục 9.6)	Không quá 12 %
4. Định tính ^b	HPLC-PDA: Thực hiện theo điều kiện ở Mục 3.2.2.1	Đạt độ đặc hiệu của pic acid chlorogenic và cynarosid.
5. Tro toàn phần ^c	ĐĐVN V (Phụ lục 9.8)	Không quá 15 %
6. Tạp chất	ĐĐVN V (Phụ lục 12.11)	Không quá 0,5 %
7. Định lượng ^b	HPLC-PDA: Thực hiện theo điều kiện ở Mục 3.2.2.1	Hàm lượng acid chlorogenic không được thấp hơn 2,5 % tính theo dược liệu khô kiệt.

^aChỉ tiêu có mức yêu cầu cao hơn ĐĐVN V và tương tự EP 10.0

^bCác chỉ tiêu có phương pháp thử cao hơn so với ĐĐVN V và mức hàm lượng cao hơn so với EP 10.0

^cChỉ tiêu có mức yêu cầu tương tự ĐĐVN V và cao hơn EP 10.0

Từ các kết quả khảo sát ở **Mục 3.4.1.1**, tiêu chuẩn của nguyên liệu lá Actisô được mô tả ở **Bảng 3.47**. Trong đó, các chỉ tiêu phần lớn giống với ĐĐVN V, khác biệt ở chỉ tiêu “vi phẫu, định tính và định lượng”. Hàm lượng acid chlorogenic được đề nghị cho TCCS tối thiểu là 2,5 % dựa trên các kết quả khảo sát động thái tích lũy hoạt chất theo thời gian thu hái ở **Mục 3.2.3**, đồng thời khảo sát một số mẫu lá Actisô được thu thập ở nhiều vùng khác nhau tại Đà Lạt. Mức chỉ tiêu độ tro vẫn giữ nguyên “không quá 15 %” tương tự ĐĐVN V, cao hơn so với EP 10.0 (không quá 20 %). Chỉ tiêu về độ tro của lá khô Actisô cũng đã khảo sát trên một số mẫu của 2 giống Actisô xanh và tím đều đạt từ 13,6 - 14,0 %.

3.4.2. Khảo sát phương pháp chiết xuất cao Actisô

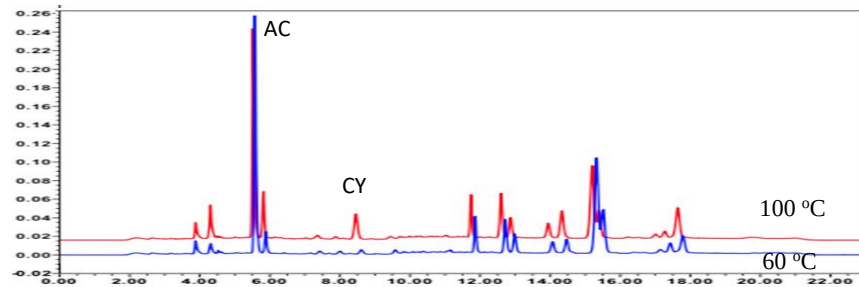
3.4.2.1. Khảo sát phương pháp chiết xuất

Cynarin được chọn làm mục tiêu nghiên cứu chiết xuất. Các yếu tố ảnh hưởng đến hàm lượng CY cần được khảo sát bao gồm: Phương pháp làm tăng hàm lượng CY, nhiệt độ chiết, thời gian chiết, tỉ lệ dược liệu và dung môi chiết xuất (chưa được khảo sát trong khuôn khổ của đề tài).

Lá tươi Actisô (giống xanh) được lựa chọn làm nguyên liệu chiết xuất cao do cao chiết lá tươi có hàm lượng CY và các thành phần polyphenol khác cũng như tác dụng chống oxy hóa cao hơn cao chiết lá khô đã được chứng minh ở **Mục 3.3.2**.

a. Khảo sát nhiệt độ chiết xuất làm tăng hàm lượng cynarin:

Trong khuôn khổ của đề tài chỉ khảo sát nhiệt độ chiết xuất từ 60 - 100 °C. Kết quả cho thấy cao chiết ở 60 °C có nhiều AC và các đồng phân của CY (các di-CQA khác). Ở nhiệt độ chiết xuất càng cao có sự gia tăng CY và các đồng phân của AC (các mono-CQA khác), đồng thời có sự gia tăng của các flavonoid (CR và SCO) (xem **Hình 3.29**). Do đó, nhiệt độ 100 °C được lựa chọn cho quy trình chiết xuất lá tươi Actisô.



Hình 3.29. SKĐ cao chiết lá tươi ở 60 và 100 °C

b. Khảo sát phương pháp làm tăng hàm lượng cynarin:

Bảng 3.48. Hàm lượng AC và CY trong các cao chiết lá tươi Actisô khảo sát

STT	Cao chiết từ Quy trình chiết xuất	Hàm lượng % (TB $\pm$ SD, n=2)	
		AC	CY
1	Quy trình 1 (QT1)	2,91 ^b $\pm$ 0,05	2,83 ^a $\pm$ 0,34
2	Quy trình 2 (QT2)	1,73 ^c $\pm$ 0,16	1,20 ^{b,c} $\pm$ 0,06
3	Quy trình 3 (QT3)	1,70 ^c $\pm$ 0,21	1,26 ^{b,c} $\pm$ 0,14
4	Quy trình 4 (QT4)	3,20 ^a $\pm$ 0,04	0,98 ^c $\pm$ 0,003
5	Quy trình 5 (QT5)	2,75 ^b $\pm$ 0,01	1,56 ^b $\pm$ 0,005

Các giá trị có kí tự theo sau khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p \leq 0,05$)

QT1: Lá tươi được đun sôi với nước

QT2: Lá tươi được hấp cách thủy

QT3: Lá tươi được ép trước, sau đó đun với nước sôi

QT4: Lá tươi được hấp nước sôi, sau đó chiết với cồn

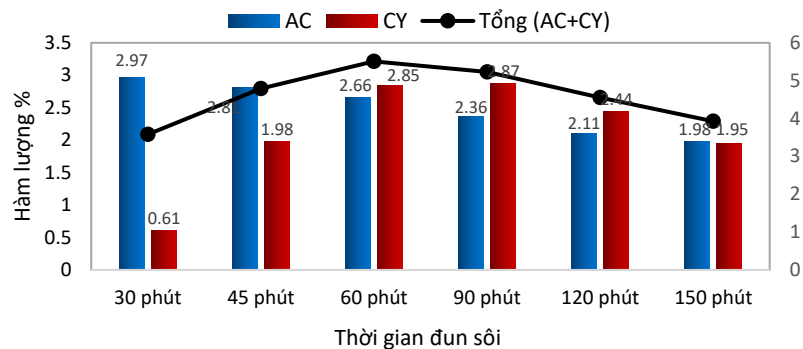
QT5: Lá tươi hấp với cồn 96 %, sau đó chiết với nước

Lá tươi Actisô được chiết xuất cao theo 5 quy trình được mô tả ở **Mục 2.2.3.1**. Kết quả cho thấy cao chiết lá tươi của quy trình 1 (QT1) có hàm lượng CY cao nhất. Mặc dù, cao chiết ở QT4 có hàm lượng AC cao hơn QT1 nhưng hàm lượng CY thấp hơn đáng kể, và tổng hàm lượng của AC và CY thấp hơn QT1 (xem **Bảng 3.48**). Do

đó, QT1 được lựa chọn để tiếp tục nghiên cứu chiết xuất. Ngoài ra, từ phương pháp chiết của QT1 cho thấy dung môi nước và nhiệt độ là yếu tố có ảnh hưởng lớn đến hàm lượng CY trong quá trình chiết xuất. Do đó, nước được lựa chọn làm dung môi chiết xuất, các yếu tố nhiệt độ và thời gian đun sẽ tiếp tục được khảo sát.

c. Khảo sát thời gian chiết xuất:

Lá tươi Actisô được đun ở 100 °C trong khoảng thời gian 30 - 150 phút (**Hình 3.30**). Kết quả cho thấy hàm lượng AC có xu hướng giảm dần theo thời gian, tuy nhiên hàm lượng CY cũng như tổng hàm lượng của AC và CY tăng từ 30 - 60 phút, sau đó giảm dần sau 90 phút. Do đó, thời gian đun 60 phút được lựa chọn để chiết xuất do có hàm lượng CY cao nhất.



Hình 3.30. Kết quả thăm dò thời gian chiết xuất lá tươi Actisô

❖ **Quy trình chiết xuất quy mô phòng thí nghiệm:**

Từ kết quả thăm dò, quy trình chiết xuất lá tươi Actisô ở quy mô phòng thí nghiệm (PTN) như sau: 200 g phần lá tươi được cắt nhỏ, thêm 500 ml nước sôi, đun sôi trong 60 phút, lọc dịch chiết và cô cách thủy đến cao đặc.

Tiến hành chiết xuất thử nghiệm trên 3 mẫu lá Actisô (giống xanh và tím) thu hái tại các vùng trồng khác nhau. Kết quả được trình bày ở **Bảng 3.49**.

Bảng 3.49. Kết quả chiết xuất cao lá Actisô thử nghiệm quy mô PTN

	Nơi thu mẫu	Khối lượng cao thu được	Độ ẩm	% AC	% CY
Giống xanh	Phường 5	11,78	9,68	2,91	2,72
	Phường 12	12,16	12,33	2,43	2,02
	Bảo Lộc	7,43	12,37	2,23	2,62
Giống tím	Phường 5	12,70	11,67	3,82	0,78
	Phường 12	13,22	12,01	3,10	1,66

3.4.3. Nâng cấp cỡ lô cao chiết lá Actisô (500 kg/mẻ)

Tiến hành chiết xuất 4 mẻ lá Actisô (giống xanh) trên quy mô lớn theo quy trình ở **Mục 2.2.3.3**. Mỗi mẻ gồm 1.000 kg lá tươi, tương ứng với khoảng 500 kg phiến lá sau khi đã loại bỏ gân chính. Khối lượng cao thu được trung bình là 8 kg/mẻ. Kết quả kiểm nghiệm cynarin và acid chlorogenic của các lô chiết xuất và so sánh với các cao mềm và cao khô Actisô hiện đang phân phối trên thị trường Việt Nam (**Bảng 3.50**).

Đóng gói: Cao khô Actisô được đóng trong túi nhôm 1 kg hoặc 2 kg/túi, dán nhãn, bảo quản nơi mát, tránh ánh sáng (Xem hình ở **Phụ lục 1**)

Bảng 3.50. Khối lượng cao và hàm lượng AC, CY trong cao chiết nghiên cứu

stt	Kí hiệu	Chiết xuất cao (500 kg/mẻ)			Hàm lượng ^b %	
		Số lô	Phiến lá (kg)	m cao ^a (kg)	AC	CY
1	CNC.1	NCL1.1_1	500	7,4	2,30	2,57
2	CNC.1	NCL1.1_2	500	8,0	2,32	2,61
3	CNC.3	NCL1.2	450	7,0	1,66	1,47
4	CNC.4	NCL.1.3	540	9,6	1,61	1,48
So sánh với các cao chiết nguyên liệu Actisô trên thị trường						
5	C1	-	-	-	2,29	0,77
6	C2	-	-	-	1,91	0,02
7	C3	-	-	-	0,07	0,07
8	C4	-	-	-	0,05	0,03
9	BV1	-	-	-	0,87	0,47
10	BV2	-	-	-	2,40	1,06

^aCao khô (độ ẩm ≤ 5 %); C1-C4 là cao mềm được thu thập ở thị trường Việt Nam

BV1-2: Cao khô phun sương được cung cấp bởi Công ty BV Pharma; C1: Cao sản xuất bởi Ladophar
CNC.1-4 là cao nghiên cứu; ^bHàm lượng % tính trên chế phẩm khô kiệt;

3.4.4. Xây dựng tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) cao khô Actisô

Các lô cao khô Actisô nghiên cứu (CNC1.1 - 1.3) sản xuất ở **Mục 3.4.3** sau khi đóng gói được kiểm tra chất lượng theo TCCS (**Bảng 3.51**). Đối với TCCS được xây dựng dựa trên các chỉ tiêu, phương pháp của ĐĐVN V. Riêng chỉ tiêu định tính và định lượng hàm lượng của cynarin và acid chlorogenic được đưa vào TCCS với phương pháp thực hiện được tiến hành theo quy trình đã xây dựng ở **Mục 3.2.2.2**. Các chỉ tiêu về độ nhiễm khuẩn được gửi mẫu kiểm tra.

Dựa vào kết quả khảo sát hàm lượng cynarin trong các cao chiết lá Actisô thu hái vào các thời điểm khác nhau trong năm 2016-2017 (**Mục 3.2.3.3**) kết hợp với việc khảo sát sơ bộ hàm lượng acid chlorogenic và cynarin trong một số chế phẩm trong và nước ngoài (**Mục 3.2.4**) để đưa ra mức hàm lượng của 2 hợp chất này cho TCCS.

Bảng 3.51. TCCS và kết quả kiểm tra chất lượng của các cao chiết nghiên cứu

stt	Chỉ tiêu	Yêu cầu	Kết quả ^d
1	Mô tả	Bột vàng xám, đồng nhất, dễ hút ẩm, có mùi đặc trưng của Actisô, vị mặn, sau đắng	Đạt
2	Định tính Cynarin và acid chlorogenic bằng HPLC-PDA	Đạt độ đặc hiệu của pic cynarin và acid chlorogenic	Đạt
3	Cẩn không tan trong nước	< 3 %	Đạt (0,31-2,03 %)
4	Độ ẩm	≤ 6,0 %	Đạt (4,0-4,5 %)
5	Tro toàn phần^a	≤ 30 ^a %	Đạt (20,8-25,1 %)
6	Giới hạn kim loại nặng^b	≤ 20 ppm	Đạt
7	Định lượng^c Bằng HPLC-PDA - Hàm lượng (%) CY ^c (trên chế phẩm khô kiệt) - Hàm lượng (%) AC (trên chế phẩm khô kiệt)	≥ 1,0 % ≥ 1,5 ^c %	Đạt (1,47-2,6 %) Đạt (1,61-2,3 %)
8	Giới hạn nhiễm khuẩn^b - Tổng số vi khuẩn hiếu khí /g - Tổng số nấm men và mốc/g - Enterobacterial/g - <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> /g	≤ 10 ³ CFU/g ≤ 10 ² CFU/g ≤ 500 CFU/g Không được có	Đạt (20-2.300 CFU/g) Đạt (10-60 CFU/g) Đạt (<10 CFU/g) Không phát hiện

^aChỉ tiêu có yêu cầu cao hơn DDVN V, tương tự EP 10.0^bChỉ tiêu được thực hiện bởi Phòng kiểm tra chất lượng – CTCP BV Pharma^cChỉ tiêu có yêu cầu cao hơn DDVN V và EP 10.0^dKết quả kiểm nghiệm của 4 mẻ cao chiết Actisô nghiên cứu

3.5. Nghiên cứu bào chế viên nén bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô

3.5.1. Công thức, quy trình bào chế viên bao phim Actisô qui mô 3.000 viên

Công thức và quy trình bào chế viên nén bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô qui mô 450 - 3.000 viên đã được khảo sát và xây dựng bởi các thành viên của nhóm nghiên cứu (Đề tài Sở KH & Công Nghệ) (xem **Phụ lục 2**), đã được báo cáo bởi thành viên của nhóm nghiên cứu (Luận văn Thạc sĩ Dược học)¹⁸³. Kết quả được trình bày trong **Bảng 3.52**.

Ngoài ra, kết quả khảo sát thời gian trộn bột cho thấy 10 phút là thời gian ngắn nhất mà hoạt chất phân tán đều trong toàn khối. Tăng thời gian trộn thêm 5 phút có sự phân ly nên độ phân tán có xu hướng tăng hao phí về năng lượng khi đưa vào sản xuất.

Bảng 3.52. Thành phần công thức tối ưu của viên bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô

STT	Thành phần	Công thức ^a 01 viên (%)	Công thức 01 viên (mg)	Lô 450 viên (g)	Lô 3.000 viên (g)
1	Cao khô Actisô ^b (CNC1.1)	57	200	90,0	600
2	Silicon dioxid	4	13	5,85	39
3	Cellulose vi tinh thể	14	49	22,05	147
4	Magnesi carbonnat	11	40	18,0	120
5	Glyceryl behenat	3	10	4,5	30
6	Natri croscarmellose	11	40	18,0	120
7	Vivacoat	-	15	6,75	45
8	Màu nâu	-	8	3,6	24
9	Ethanol 50 % ^c	-	71	3,95	213
Tổng			375	168,75	1.125

^a Tỷ lệ các tá dược trong công thức đã được nghiên cứu tối ưu hóa theo mô hình Box Wilson⁶

^b Cao nghiên cứu (Số lô CNC1.1) có hàm lượng 2,3 % AC và 2,6 % CY

^c Dung môi của dịch bao bị mất đi trong quá trình bao phim

Bảng 3.53. Kết quả kiểm nghiệm các lô qui mô 450 viên và 3.000 viên

Mẫu	Chỉ tiêu kiểm nghiệm	Yêu cầu	Lô 450 viên			Lô 3.000 viên		
			Lô 1	Lô 2	Lô 3	Lô 1	Lô 2	Lô 3
Bột dập viên	Cảm quan	(*)	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	Độ ẩm (%)	< 4	3,33	3,26	3,45	3,24	3,56	3,24
	Góc nghỉ (<°)	< 35	33,5	33,5	33,2	33,1	33,6	33,5
	Chỉ số nén (n = 3)		15,35	17,07	19,04	19,4	16,2	17,9
	Tỷ số Haussner (n = 3)		1,18	1,20	1,24	1,22	1,19	1,22
	Tốc độ chảy (g/s) (n = 3)		5,1	5,2	4,9	5,2	4,9	4,9
Viên thành phẩm	Độ cứng (N) (n = 6)	≥ 40	142,1 217,4	147,0 220,1	143,2 218,2	141,0 215,3	145,4 218,9	143,3 221,2
	Độ mài mòn (%) (n = 3)	< 0,8	0,25 0,14	0,32 0,12	0,27 0,11	0,22 0,11	0,31 0,13	0,26 0,11
	Đồng đều khối lượng (mg) (n = 20)	375 ± 5%	369,7 376,1	362,4 375,8	363,6 377,2	368,5 377,2	361,6 374,2	364,2 375,4
	Độ rã (phút) (n = 6)	< 15	6,25 7,15	6,66 7,24	6,50 7,32	6,25 7,13	6,66 7,27	6,50 8,03
	Độ hòa tan (%) (n = 6)		> 80 %/ 45 phút					
	- Acid chlorogenic		97,8	98,5	99,1	98,98	97,65	98,20
	- Cynarin		98,2	99,4	94,3	99,04	99,07	99,00
	Hàm lượng (mg/viên) (n = 3)							
	- Acid chlorogenic	≥ 4,10	4,56	4,50	4,66	4,69	5,00	4,89
	- Cynarin	≥ 4,70	4,95	5,27	5,16	5,19	5,28	5,21

* Màu vàng nâu đồng nhất, khô toi, không có bụi đen hay vật lạ

Từ kết các kết quả trên, đề xuất TCCS cho kiểm soát viên bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô cụ thể như sau:

Yêu cầu kỹ thuật: Công thức cho một viên nén bao phim Actisô 200 mg:

- Cao khô Actisô (hai trăm milligram) 200 mg
- Tá dược (tá dược độn, tá dược gây thấm, chất ổn định, aerosil...) vừa đủ 375 mg

Tiêu chuẩn nguyên liệu: Cao khô Actisô đạt tiêu chuẩn cơ sở, tá dược (tá dược độn,

tá được gây thấm, chất ổn định, aerosil...) đạt tiêu chuẩn DĐVN V.

Tiêu chuẩn kỹ thuật:

- Tính chất: Viên nén tròn màu nâu, cạnh viên lành lặn
- Độ đồng đều khối lượng: 375 mg $\pm$ 5 %
- Độ hòa tan: Không dưới 80 % acid chlorogenic và cynarin, so với hàm lượng ghi trên nhãn được hòa tan trong 45 phút.
- Định tính, định lượng: Mỗi viên phải chứa acid chlorogenic và cynarin từ 90 - 110 % so với hàm lượng ghi trên nhãn.

Phương pháp thử:

- Tính chất: Bằng cảm quan chế phẩm phải đạt các yêu cầu đã nêu
 - Độ đồng đều khối lượng: Thử theo DĐVN V - PL 11.2
 - Độ hòa tan: Theo DĐVN V - PL 11.4, môi trường đệm pH 6,8 (500 ml), thiết bị kiểu cánh khuấy (kiểu 2), tốc độ khuấy 100 vòng/phút. Yêu cầu không dưới 80 % acid chlorogenic và cynarin được hòa tan trong 45 phút.
 - Định tính và định lượng: Thực hiện theo quy trình đã xây dựng ở Mục 3.2.2.2
- ❖ **Đề xuất tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) viên nén bao phim Actisô 200 mg:** Qua các thử nghiệm đã thực hiện trên viên nén bao phim Actisô 200 mg, TCCS của chế phẩm được đề nghị như sau:

Bảng 3.54. Tiêu chuẩn cơ sở (TCCS) của chế phẩm

Yêu cầu	Phương pháp thử	Tiêu chuẩn
Mô tả	Cảm quan	Viên tròn đường kính 10 mm, màu nâu, hai mặt viên nhẵn, khum lõ.
Định tính	HPLC	Trên SKĐ của mẫu thử phải có thời gian lưu (Rt) của pic chính giống với Rt của mẫu đối chiếu.
Đồng đều khối lượng	DĐVN V	$\pm$ 5 % so với khối lượng trung bình
Độ hòa tan (sau 45 phút)	HPLC	Không dưới 80 % hàm lượng AC và CY so với hàm lượng ghi trên nhãn
Định lượng	HPLC	90 - 110 % so với hàm lượng ghi trên nhãn

3.5.2. Nâng cỡ lô ở quy mô 15.000 viên (5,6 kg/mẻ)

Sau khi khảo sát tính lặp lại của quy trình bào chế trên cỡ lô 3.000 viên, tiến hành sản xuất 3 lô với cỡ lô 15.000 viên/lô. Thành phần công thức viên được trình bày ở **Bảng 3.55**. Viên bao phim chứa 200 mg cao Actisô (khối lượng trung bình 1 viên là

375 mg) được đặt tên là **Univerphytol**. Quy trình bào chế được thực hiện như mô tả ở **Mục 2.2.5.6** và tóm tắt ở **Hình 3.31**. Chế phẩm và bán thành phẩm được kiểm tra qua từng công đoạn và đánh giá các thông số đặc trưng được trình bày trong **Bảng 3.56**.

Bảng 3.55. Thành phần công thức của viên Univerphytol (cỡ lô 15.000 viên = 5,3 kg viên nhân)

	Thành phần (mg)	Công thức 1 viên (mg)	Công thức 15.000 viên (g)	Tiêu chuẩn
Viên nhân	Cao khô Actisô (CNC1.1) (*)	200	3.000	TCCS
	Silicon dioxid	13	195	USP
	Cellulose vi tinh thể	49	735	USP
	MgCO ₃	40	600	USP, EP
	Glyceryl behenat	10	150	USP, EP
	Natri croscarmellose	40	600	NF, EP, JP
	Khối lượng viên nhân	352	5.280	
Dịch bao phim	Vivacoat	15	225	USP, EP
	Màu nâu (Fioric color)	8	120	USP, EP
	Ethanol 50 % (**)	71	1.065	TCCS
	Khối lượng viên thành phẩm	375	5.625	

* Cao nghiên cứu (Số lô CNC1.1) có hàm lượng 2,3 % AC và 2,6 % CY

** Dung môi của dịch bao bị mất đi trong quá trình bao phim

Bảng 3.56. Kết quả kiểm tra các chỉ tiêu của bán thành phẩm và thành phẩm của lô 15.000 viên

Cỡ lô 15.000 viên	Chỉ tiêu kiểm nghiệm	Yêu cầu	L1	L2	L3
Bột dập viên	Cảm quan	(*)	Đạt	Đạt	Đạt
	Độ ẩm (%)	< 4	3,21	3,25	3,26
	Góc nghỉ (°)	< 35	32,5	32,4	32,6
	Chỉ số nén (n = 3)		18,9	17,4	17,5
	Tỷ số Haussner (n = 3)		1,20	1,22	1,22
	Tốc độ chảy (g/s)	> 3,0	4,8	5,2	5,0
Viên nhân Actisô (200 mg)	Cảm quan	(**)	Đạt	Đạt	Đạt
	Độ cứng (n = 6) (N)	> 100	155,3	151,6	152,2
	Độ mài mòn (n = 20) (%)	≤ 0,5	0,35	0,33	0,33
	ĐĐKL (n=20) (mg)	375 ± 5	367,1-376,8 ^a	365,4-372,6	366,8-380,1
	Độ rã (n = 6) (phút)	< 15	7,01	6,99	6,42
Viên bao phim Actisô (200 mg) UNIVERPHYTOL	Cảm quan	(***)	Đạt	Đạt	Đạt
	Giới hạn nhiễm khuẩn	ĐĐVN V	Đạt	Đạt	Đạt
	Độ hòa tan: AC CY	≥ 80	98,92	97,85	98,30
			99,05	99,08	99,04
	Hàm lượng: AC (n = 3) % CY	(90 – 110 %) ^b	101,95	108,69	106,52
			99,81	101,34	100,57

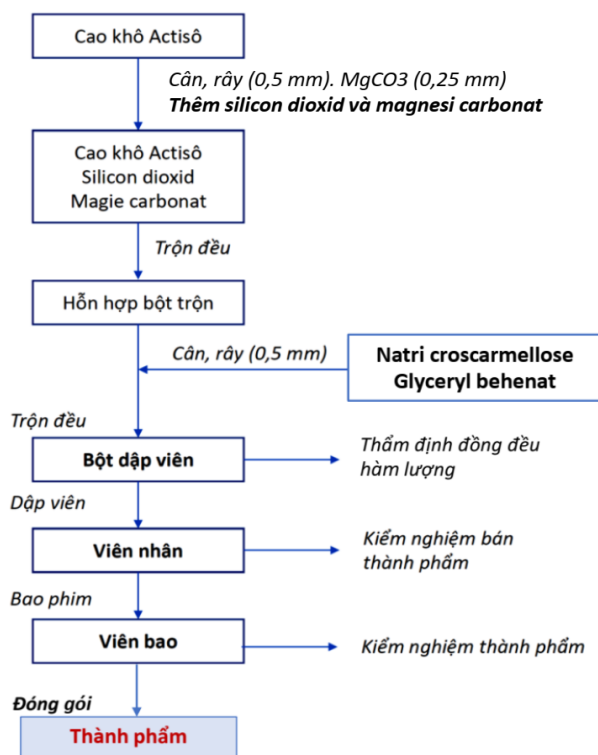
* Bột màu vàng nâu, đồng nhất, khô toi, không có bụi đen hay màu lạ; ** Viên nén dạng tròn, 2 mặt lõm, màu vàng nhạt, cạnh và thành viên nguyên vẹn; *** Viên nén bao phim màu nâu, 2 mặt lõm và nhẵn; ^a Max – min;

^b Tỷ lệ hàm lượng của a. chlorogenic và cynarin đo được của viên so với hàm lượng trên nhãn

Thành phần ghi trên nhãn: Viên nén bao phim Actisô chứa 5,2 mg cynarin và 4,6 mg acid chlorogenic

Nhận xét: Kết quả cho thấy viên bao phim Actisô 200 mg ở 3 lô nghiên cứu (15.000 viên/lô) không khác biệt đáng kể và đạt TCCS. Do đó, quy trình bào chế thể hiện sự ổn định và có tính lặp lại. Hàm lượng hoạt chất cynarin và acid chlorogenic

trong viên Univerphytol được so sánh với các chế phẩm trong và ngoài nước được trình bày ở **Mục 3.2.4.2**.

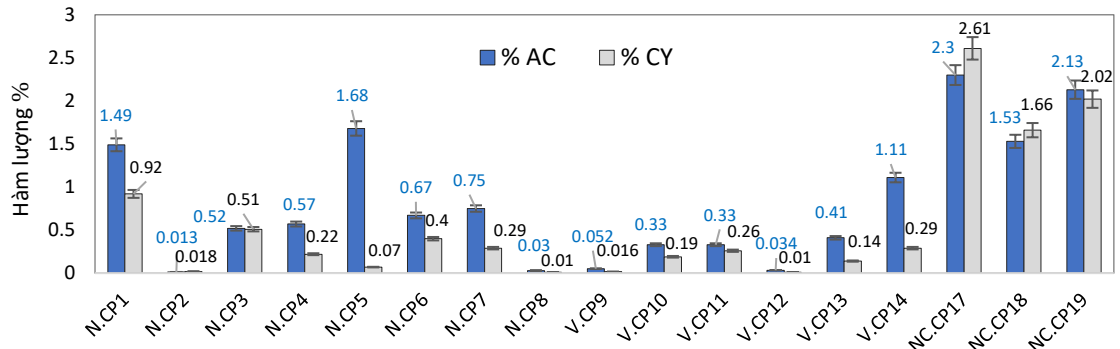


Hình 3.31. Sơ đồ quy trình bào chế viên nén bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô

3.5.3. So sánh hàm lượng cynarin và acid chlorogenic của các chế phẩm

Tám chế phẩm của nước ngoài (Mỹ, Pháp, Đức - xem **Phụ lục 53**) (**N.CP1 - 8**) và sáu chế phẩm sản xuất tại Việt Nam (**V.CP9 - 14**), so sánh với 3 chế phẩm nghiên cứu (**NC.CP17 - 19**) được tiến hành định lượng cynarin và acid chlorogenic theo quy trình định lượng đã được xây dựng ở **Mục 3.2.2.3**. Kết quả được thể hiện ở **Hình 3.32** và **Bảng 3.57**, hàm lượng của AC và CY trong các chế phẩm nước ngoài (**N.CP1-7**) lần lượt là 0,013 - 1,68 % và 0,01 - 0,92 %, trong đó 6/8 chế phẩm có hàm lượng AC tương đối cao là 0,52 - 1,68 % và 5/8 chế phẩm có CY là 0,22 - 0,92 %. Sáu chế phẩm trong nước (**V.CP8-13**) có AC (0,01 - 1,11 %) và CY (0,01 - 0,29 %), trong đó có 4 chế phẩm có hàm lượng AC (0,33 - 1,11 %) và CY (0,14 - 0,29 %). Nhìn chung, các chế phẩm trong nước có hàm lượng phần trăm của AC và CY thấp hơn so với các chế phẩm nước ngoài. Các chế phẩm từ cao chiết Actisô trên thị trường trong và ngoài nước cũng có một số chế phẩm kém chất lượng với hàm lượng AC và CY rất thấp (< 0,2 %). Tuy nhiên, hàm lượng AC và CY trong cả 3 chế phẩm nghiên cứu (**NC.CP17-**

19) đều khá cao với AC (1,53 - 2,30 %) và CY (1,66 - 2,61).



Hình 3.32. Biểu đồ so sánh hàm lượng % của AC, CY trong các chế phẩm Actisô

Ghi chú: % AC và % CY (Hàm lượng mg/100 mg cao chiết Actisô trong chế phẩm)

Bảng 3.57. Kết quả hàm lượng acid chlorogenic và cynarin trong các chế phẩm

Stt	Thông tin chế phẩm (CP)			Hàm lượng AC		Hàm lượng CY		Tổng CQA
	Kí hiệu	Cao ^d	Liều dùng	%	mg/viên	%	mg/viên	
1	N.CP1*	500	1 viên/ngày	1,49 ^e	7,45	0,92 ^{ad}	4,60	27,29
2	N.CP2*	600	2 viên/ngày	0,01 ^o	0,08	0,02 ^{am}	0,11	0,46
3	N.CP3 [#]	200	3-6 viên/ngày	0,52 ^h	1,04	0,51 ^{af}	1,02	4,66
4	N.CP4 [#]	200	3-6 viên/ngày	0,57 ^j	1,14	0,22 ^{ai}	0,44	3,63
5	N.CP5*	350	3 viên/ngày	1,68 ^d	5,88	0,07 ^{al}	0,25	8,20
6	N.CP6*	700	2 viên/ngày	0,57 ⁱ	4,69	0,34 ^{aj}	2,80	16,81
7	N.CP7*	550	2 viên/ngày	0,58 ⁱ	4,13	0,22 ^{ai}	1,60	13,07
8	N.CP8*	400	1-2 viên/ngày	0,03 ⁿ	0,12	0,01 ^{an}	0,04	0,37
9	V.CP9 [#]	100	8-18 viên/ngày	0,05 ⁿ	0,05	0,02 ^{am}	0,02	0,15
10	V.CP10 ^a	280	2-4 ống/ngày	0,33 ^m	0,92	0,19 ^{aj}	0,53	2,98
11	V.CP11 ^a	200	1-3 ống/ngày	0,33 ^m	0,66	0,26 ^{ah}	0,52	2,62
12	V.CP12 ^a	900	2-4 ống/ngày	0,03 ⁿ	0,31	0,01 ^{an}	0,09	0,95
13	V.CP13 ^a	200	2-4 ống/ngày	0,41 ^k	0,82	0,14 ^{ak}	0,28	2,20
14	V.CP14 ^a	200	2-4 ống/ngày	1,11 ^j	2,22	0,29 ^{ah}	0,58	5,83
15	V.CP15 ^b	-	-	2,65 ^a	-	0,50 ^{af}	-	-
16	V.CP16 ^b	-	-	0,91 ^h	-	0,69 ^{ae}	-	-
17	NC.CP17 ^c	200	2-3 viên/ngày	2,30 ^b	4,60	2,61 ^{aa}	5,22	20,30
18	NC.CP18 ^c	200	2-3 viên/ngày	1,53 ^e	3,06	1,66 ^{ac}	3,32	13,59
19	NC.CP19 ^c	200	2-3 viên/ngày	2,13 ^c	4,26	2,02 ^{ab}	4,04	21,43

*Viên nang cứng; [#]Viên bao đường; ^dKhối lượng cao/viên; TCQ (tổng các acid caffeoylquinic)

^aDạng ống nước chứa cao lỏng; ^bCao mềm/ cao khô; ^cViên bao phim

CP nước ngoài (N.CP1-8); CP trong nước (V.CP9-16); CP nghiên cứu (NC.CP17-19)

CP1-16 được khảo sát trong thời hạn sử dụng. CP17-19 được đánh giá sau 4 năm kể từ ngày sản xuất.

Các giá trị hàm lượng % có kí tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$; Tukey)

3.5.4. Khảo sát độ ổn định của thuốc viên bao phim

Độ ổn định của sản phẩm viên nén bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô (Univerphytol) được khảo sát ở 2 điều kiện: Dài hạn (nhiệt độ 30 ± 2 °C, độ ẩm 75 ± 5

%) trong 12 tháng và lão hóa cấp tốc (nhiệt độ 40 ± 2 °C, độ ẩm 75 ± 5 %) trong 6 tháng. Kết quả các chỉ tiêu đánh giá được trình bày ở **Bảng 3.58** và **Bảng 3.59**.

Bảng 3.58. Kết quả khảo sát độ ổn định của chế phẩm Univerphytol ở điều kiện dài hạn

Stt	Chỉ tiêu	Yêu cầu	Tháng				
			0	3	6	9	12
1	Cảm quan	(*)	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
2	ĐDKL (n = 20) (mg)	375 ± 5 %	378-369 (**)	379-367	376-369	379-368	375-369
3	Định tính	TCCS	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
4	Độ ẩm (n = 6) (%)	$\leq 5,0$	2,89	3,01	3,20	3,04	3,23
5	Độ rã (n = 6) (phút)	≤ 15	6,91	6,81	6,91	7,24	7,32
6	Độ hòa tan (n = 6) (%)						
	a. chlorogenic	≥ 80	101,5	98,2	99,1	98,7	98,5
	cynarin	≥ 80	100,5	99,2	98,8	99,4	98,7
7	Định lượng: (n = 3) (%)						
	a. chlorogenic	90 - 110	107,84	107,54	106,74	106,04	105,48
	cynarin		103,58	103,14	102,48	102,05	101,34

* Viên nén bao phim hình tròn, màu nâu đen, đường kính 10 mm, hai mặt lõm, nhẵn; ** Max – min

Thành phần ghi trên nhãn: Viên Univerphytol chứa 5,2 mg cynarin và 4,6 mg acid chlorogenic

Bảng 3.59. Kết quả khảo sát độ ổn định của chế phẩm Univerphytol ở điều kiện lão hóa cấp tốc

Stt	Chỉ tiêu	Yêu cầu	0 tháng	1 tháng	2 tháng	3 tháng	6 tháng
1	Cảm quan	(*)	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
2	ĐDKL (n = 20) (mg)	375 ± 5 %	378-369 (**)	376-368	379-367	375-368	377-366
3	Định tính	TCCS	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
4	Độ ẩm (%)	$\leq 5,0$	2,89	2,95	2,98	3,01	3,12
5	Độ rã (phút)	≤ 15	6,91	6,93	6,95	7,02	7,05
6	Độ hòa tan (%)						
	a. chlorogenic	≥ 80	101,5	100,2	99,8	99,7	99,1
	cynarin	≥ 80	100,5	99,8	99,7	99,5	98,9
7	Định lượng: (n = 3) %						
	acid chlorogenic	90 - 110	107,84	107,57	107,13	107,03	106,32
	cynarin		103,58	103,26	103,14	102,91	102,01

* Viên nén bao phim hình tròn, màu nâu đen, đường kính 10 mm, hai mặt lõm, nhẵn.

Kết quả kiểm nghiệm từ **Bảng 3.58** và **Bảng 3.59** cho thấy mẫu viên nén bao phim nghiên cứu qui mô 15.000 viên đóng trong lọ thủy tinh màu nâu (120 viên/lọ) đạt tất cả các chỉ tiêu kiểm nghiệm vật lý và hóa học trong suốt thời gian khảo sát ở hai điều kiện lão hóa và dài hạn. Không nhận thấy có sự giảm hàm lượng một cách đáng kể hay biến đổi về độ hòa tan. Cho thấy viên nghiên cứu ổn định tuy nhiên cần tiếp tục nghiên cứu độ ổn định ở điều kiện dài hạn đến ít nhất 24 tháng ở các thời điểm 18 và 24 tháng để có thể ứng dụng đưa ra thị trường.

Chương 4. BÀN LUẬN

4.1. Nghiên cứu thành phần hóa học

Chiết xuất, phân lập, xác định cấu trúc: Kết quả của luận án đã phân lập được 20 hợp chất từ cao chiết ethyl acetat và *n*-butanol gồm:

- 11 dẫn xuất acid caffeoylquinic: 5 mono-CQA (1-CQA; 3-CQA; 5-CQA hay acid chlorogenic; 4-CQA; 3-feruloylquinic); 5 dẫn xuất di-CQA (1,3-diCQA hay cynarin; 3,4-diCQA; 3,5-diCQA; 1,5-diCQA; 4,5-diCQA) và acid caffeic.
- 3 dẫn xuất của acid benzoic: Acid protocatechuic; aldehyd protocatechuic và 4-*p*-hydroxy benzaldehyd.
- 4 flavonoid thuộc phân nhóm flavon, bao gồm: Luteolin, cynarosid, scolymosid và apigenin-7 rutinosid.
- 1 acid hữu cơ (acid succinic) và 1 sesquiterpen lacton (cynaratrion).

Theo tổng quan tài liệu (**Mục 1.2.1**), trên thế giới đã xác định được ít nhất 23 dẫn xuất acid caffeoylquinic và 12 hợp chất flavon trong lá và hoa đầu Actisô. Trong đó, các dẫn xuất acid caffeoylquinic chiếm khoảng 95 % polyphenol toàn phần, các flavonoid chính trong lá Actisô là dẫn xuất của luteolin; còn dẫn xuất của apigenin chủ yếu có trong lá của loài Cardoon trồng (*C. altilis* DC.) và Cardoon dại (*C. sylvestris* (Lamk) Fiori)³³. Kết quả phân lập và xác định cấu trúc các hợp chất từ lá Actisô của luận án cho thấy có sự phù hợp với các nghiên cứu trong và ngoài nước. Các acid phenol trong cây bao gồm 4-*p*-hydroxybenzaldehyd, acid protocatechuic, aldehyd protocatechuic, và acid 3-feruloylquinic đã được tìm thấy trong lá Actisô trước đây bằng LC-MSⁿ hoặc LC-QTOF-MSⁿ trong dịch chiết toàn phần mà chưa phân lập các hợp chất này ở dạng tinh khiết. Với kết quả của luận án đã phân lập được các hợp chất này và xác định cấu trúc bằng phổ NMR giúp khẳng định chắc chắn hơn về sự hiện diện của chúng trong thành phần hóa học của lá Actisô.

4.2. Nghiên cứu về phân tích kiểm nghiệm

4.2.1. Thiết lập chất đối chiếu (CĐC)

Tại Việt Nam, hai đơn vị cung cấp chất chuẩn chính thức là Viện Kiểm nghiệm Thuốc Trung Ương (có 10 CĐC từ 2013 - 2020)¹⁸⁴ và Viện Kiểm nghiệm Thuốc TP.

HCM (27 CDC từ 2013 - 2022) ¹⁸⁵. Trong đó, hai đơn vị này đều có chất chuẩn acid chlorogenic (98 %) nhưng chưa có chuẩn cynarin và cynarosid. Do vậy, các chất này được mua từ nước ngoài với giá thành cao (4 - 10 triệu/10 mg cynarin và 4,5 - 6,5 triệu/10 mg cynarosid). Mặt khác, các chất chuẩn này không có sẵn trên thị trường trong nước mà cần thời gian vận chuyển từ vài tuần đến vài tháng, gây ảnh hưởng đến công tác kiểm nghiệm và nghiên cứu. Vì vậy, việc phân lập và thiết lập CDC đối với các hợp chất này đạt chất lượng và được thẩm định đầy đủ là cấp thiết để đẩy mạnh việc tiêu chuẩn hóa, đánh giá chất lượng nguyên liệu và các chế phẩm từ Actisô nói riêng và các thuốc có nguồn gốc từ dược liệu nói chung.

Cynarin, acid chlorogenic và cynarosid được chọn để thiết lập CDC vì các chất này là thành phần chính đã được chứng minh có tác dụng sinh học trong lá Actisô. Hơn nữa, Dược điển các nước (Châu Âu, Anh, Pháp, Ý và Việt Nam) đều qui định kiểm nghiệm các thành phần này trong lá và cao khô Actisô (xem **Mục 1.4.1**). Từ kết quả phân lập polyphenol cho thấy, cao **Bu** có chứa đồng thời cả 3 hợp chất acid chlorogenic, cynarin và cynarosid với hàm lượng lớn. Bên cạnh đó, luận án đã thăm dò điều kiện phân tách cao **Bu** khá hiệu quả (**Hình 3.3, Mục 3.1.1.2**) bằng kỹ thuật sắc ký lỏng áp suất trung bình (MPLC) với pha tĩnh C₁₈. Do đó, cao **Bu** và phương pháp phân tách bằng MPLC được áp dụng để phân lập đồng thời 3 nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu (cynarin, acid chlorogenic và cynarosid).

Nhận xét về quy trình phân lập 3 nguyên liệu CDC: Các dẫn xuất acid caffeoylquinic là hợp chất khó phân lập vì có độ phân cực mạnh, nhiều đồng phân, phần lớn khó kết tinh và đặc biệt là dễ bị oxy hóa ở điều kiện khí hậu tại Việt Nam. Do đó, kỹ thuật phân lập bằng sắc ký cột cổ điển cho thấy không thích hợp để phân tách các hợp chất này do chúng bị hấp phụ mạnh bởi silica gel pha thuận (do cấu trúc có nhiều nhóm OH) và thường khó phân tách trên Sephadex (do có nhiều đồng phân). Từ kết quả phân lập cao **Bu** bằng MPLC của luận án đã cho thấy silica gel C₁₈ là pha tĩnh thích hợp nhất để phân lập nhóm hợp chất này. Qua tham khảo các tài liệu về việc phân lập các polyphenol trong lá Actisô đều thu được các chất tinh khiết với khối lượng khá thấp, cụ thể là cynarin (≤ 10 mg) và cynarosid (≤ 50 mg) từ 35 g cao chiết butanol ^{45,175,186}. Đối với quy trình phân lập CDC của luận án cho thấy hiệu suất cao

hơn gấp 14-16 lần. Ngoài ra, các công bố trước đây đều có quy trình phân lập các hợp chất này khá phức tạp, phần lớn các phân đoạn phải trải qua nhiều sắc ký cổ điển, tinh chế nhiều lần bằng Sephadex LH-20 và cuối cùng là semi.prep-HPLC mới thu được chất tinh khiết. Quy trình phân lập của luận án đơn giản hơn và đồng thời còn thu được một số polyphenol khác (4-CQA, scolymosid) với khối lượng tương đối nhiều (**Mục 3.1.1.4**). Hiện nay, nhu cầu đối với chuẩn scolymosid cũng cao trong công tác kiểm nghiệm do hợp chất này hiện diện phổ biến trong một số dược liệu. Hiện nay, chuẩn scolymosid (Sigma Aldrich) có giá khá cao (10 triệu/1,0 mg). Do đó, có thể thấy lá Actisô là nguồn nguyên liệu tiềm năng để phân lập hợp chất này.

Tóm lại, luận án đã thiết lập 03 chất đối chiếu (cynarin, acid chlorogenic và cynarosid) có nguồn gốc từ lá Actisô và công bố đạt yêu cầu của CDC hóa học thứ cấp với bộ dữ liệu chuẩn bao gồm phổ UV, IR, MS, NMR. Hàm lượng của 3 CDC đã được Viện kiểm nghiệm thuốc Tp. HCM đánh giá. Cynarin và cynarosid lần đầu được thiết lập CDC ở Việt Nam. Chất chuẩn này rất cần thiết cho các cơ sở sản xuất chế phẩm từ Actisô nhằm phục vụ cho việc kiểm nghiệm nguyên liệu lá Actisô, bán thành phẩm (cao chiết) và thành phẩm (chế phẩm). Mặc dù các chất chuẩn này không phải lần đầu được thiết lập trên thế giới nhưng luận án đã cung cấp một quy trình phân lập hiệu quả đồng thời cả 3 hợp chất cynarin, acid chlorogenic và cynarosid với hiệu suất cao, phù hợp để thiết lập CDC.

4.2.2. Xây dựng quy trình định lượng

a. Xây dựng quy trình định lượng cho lá và cao khô Actisô:

Luận án đã xây dựng quy trình định lượng 3 polyphenol chính (acid chlorogenic, cynarosid và scolymosid) trong lá Actisô. Đối với cao khô Actisô đã xây dựng quy trình định lượng 4 polyphenol chính gồm cynarin, acid chlorogenic, cynarosid và scolymosid. Hai quy trình định lượng này nhằm áp dụng kiểm soát chất lượng nguyên liệu lá Actisô, chuẩn hóa cao chiết, và kiểm tra bán thành phẩm của các giai đoạn bào chế viên nén bao phim Actisô. Quy trình còn được ứng dụng trong việc đánh giá động thái tích lũy hàm lượng hoạt chất theo thời gian thu hái. Bên cạnh đó, 2 quy trình định lượng này cũng được đề xuất thay cho phương pháp định lượng bằng quang phổ có độ

chọn lọc không cao của ĐĐVN V giúp nâng cao tiêu chuẩn chất lượng cho dược liệu Actisô trong nước tương đương hoặc cao hơn so với tiêu chuẩn quốc tế.

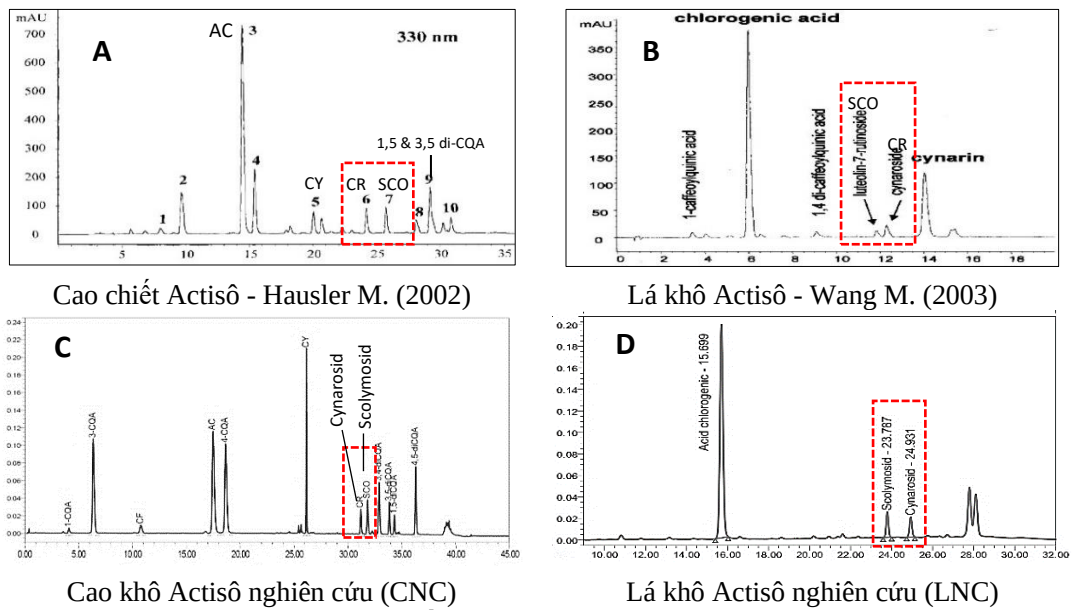
Các chỉ tiêu kiểm nghiệm lá và cao Actisô trong chuyên luận Dược điển Anh, Châu Âu và Việt Nam đã được tóm tắt ở **Bảng 1.6** và **Bảng 1.7**. Từ các nhận xét, phân tích đánh giá về các chỉ tiêu chất lượng và phương pháp thử đối với các tiêu chuẩn này cũng đã được trình bày ở phần tổng quan tài liệu (**Mục 1.4.1**) cho thấy, **đối với tiêu chuẩn lá khô Actisô**, các chỉ tiêu định tính acid chlorogenic và cynarosid bằng SKLM và định lượng acid chlorogenic bằng HPLC-PDA của Dược điển Anh, Pháp, Ý và Châu Âu là hoàn toàn phù hợp. Do đó, ĐĐVN VI cần phải bỏ chỉ tiêu “cynarin” và thay vào đó là kiểm nghiệm “acid chlorogenic và cynarosid” trong lá khô Actisô tương tự như Dược điển Châu Âu. Mức chất lượng về hàm lượng acid chlorogenic trong lá khô Actisô được đề nghị cho TCCS là “không dưới 2,5 %”, cao hơn so với EP 10.0 (0,8 %). Mức hàm lượng này được đưa ra dựa trên cơ sở từ kết quả khảo sát động thái tích lũy hoạt chất này ở giống Actisô xanh theo thời gian (**Mục 3.2.3.3**) với hàm lượng acid chlorogenic của cây trong chu kỳ sinh trưởng một năm đều đạt từ 2,6 - 4,9 % (xem ở **Mục 3.2.3.2**). Tuy nhiên, cần phải khảo sát thêm về hàm lượng của hoạt chất này trong lá Actisô ở nhiều vùng trồng khác tại Đà Lạt cũng như ở Sapa để đưa ra mức chỉ tiêu hàm lượng của acid chlorogenic cho ĐĐVN VI.

Đối với tiêu chuẩn cao khô Actisô, mặc dù Dược điển Châu Âu không có chỉ tiêu cynarin trong cao Actisô nhưng các chế phẩm chứa cao chiết Actisô được bán trên thị trường Châu Âu (Pháp, Đức) và Mỹ hiện nay đều có xu hướng ghi rõ trên nhãn hàm lượng hoạt chất này nhằm thể hiện chất lượng của sản phẩm. Dựa vào tài liệu tham khảo, cynarin được tìm thấy trong các chế phẩm với hàm lượng đáng kể (34,2 - 51,6 % trong tổng số các di-CQA), thậm chí một số chế phẩm có đến 63,6 - 72,8 %⁵³. Các kết quả phân tích hàm lượng hoạt chất này trong cao chiết và chế phẩm từ Actisô của luận án cũng cho kết quả tương tự (**Mục 3.2.4.2**). Hơn nữa, cynarin là thành phần đặc trưng hơn so với acid chlorogenic vì chúng chỉ được tìm thấy giới hạn trong một số chi thuộc họ Cúc như *Arnica* sp., *Echinacea* sp., *Helianthus* sp...., trong khi acid chlorogenic không chỉ phổ biến trong các loài thuộc họ Asteraceae mà còn

được tìm thấy trong nhiều loài khác thuộc các họ thực vật khác nhau như *Camellia* sp., *Coffea* sp., *Plantago* sp., *Urtica* sp., *Lonicera* sp.,... Điều đáng chú ý là một số loài trong các họ kể trên như Kim ngân, Trà và hạt Cà phê non có rất nhiều dẫn xuất acid caffeoylquinic gồm mono-CQA và di-CQA, tuy nhiên các dược liệu này đều giàu acid chlorogenic nhưng lại không có cynarin trong các cao chiết như ở Actisô. Mặc dù cynarin không phải là chất nguyên thủy trong cây mà được tạo ra trong quá trình chiết xuất, nhưng hợp chất này lại được chứng minh có nhiều tác dụng sinh học mạnh hơn so với acid chlorogenic và các đồng phân khác của nó. Các hoạt tính của cynarin đã được trình bày ở phần tổng quan (**Mục 1.3.1**) bao gồm tác dụng chống oxy hóa, lợi mật, hạ lipid và bảo vệ gan^{6,53,89,187}. Kết quả thử tác dụng sinh học của luận án cũng cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của cynarin bằng thử nghiệm DPPH và MDA đều cao hơn so với các thành phần khác (xem **Mục 3.3.1**). Việc lựa chọn “marker” cho một quy trình định lượng của một dược liệu bất kỳ đôi khi cũng còn nhiều tranh luận do có nhiều quan điểm và lập luận khác nhau. Tuy nhiên, đối với dược liệu Actisô, dựa vào các cơ sở dữ liệu thu thập được từ nhiều nguồn tài liệu khoa học chính thống đã trình bày ở phần tổng quan cũng như một số kết quả đạt được của luận án, việc định lượng đồng thời cả 2 thành phần acid chlorogenic và cynarin bằng phương pháp HPLC-PDA được nhận định là chỉ tiêu thiết thực và nên bổ sung vào tiêu chuẩn cao Actisô của ĐĐVN VI. Tuy nhiên, đối với mức chỉ tiêu hàm lượng (%) của cynarin trong cao chiết Actisô cho ĐĐVN VI chưa được đề xuất vì cần phải khảo sát thêm trên các cao chiết từ lá tươi của Sapa. Đối với TCCS của luận án, mức hàm lượng của cynarin và acid chlorogenic được đưa ra lần lượt là “không dưới 1,0 và 1,5 %”. Trong đó mức hàm lượng của acid chlorogenic cao hơn gấp 2 lần so với EP 10.0 vì mục tiêu chính của đề tài là nghiên cứu sản xuất cao chiết bán thành phẩm và thành phẩm có chất lượng tương đương hoặc cao hơn so với các chế phẩm nước ngoài. Ngoài ra, dựa vào kết quả khảo sát hàm lượng cynarin trong các cao chiết lá Actisô thu hái vào các thời điểm khác nhau trong năm 2016-2017 (**Mục 3.2.3.3**) đều cho thấy hàm lượng cynarin trong giống Actisô xanh nếu được chiết xuất phù hợp sẽ cho hàm lượng hoạt chất này từ 1,34 - 3,58 %.

Nhận xét về quy trình định lượng các polyphenol trong lá và cao Actisô, phương pháp định lượng các hợp chất này bằng HPLC-PDA hoặc HPLC-PDA-MS đã được công bố trên thế giới và được tóm tắt ở phần tổng quan (**Mục 1.4.2**). Tuy nhiên, khi áp dụng các chương trình pha động đã được công bố đều cho kết quả các pic định lượng không tách nhau, điều này có thể là do cột sắc ký của các hãng sản xuất khác nhau làm cho hiệu quả tách của các chất trong dược liệu cũng khác nhau. Chính vì vậy, 2 quy trình định lượng trong lá và cao Actisô đã được thăm dò lại để phù hợp với điều kiện phân tích phục vụ cho các mục tiêu của luận án.

Kết quả khảo sát điều kiện sắc ký cho thấy các pic cần định lượng đạt các yêu cầu về thông số sắc ký như độ tinh khiết pic, hệ số kéo đuôi và độ phân giải đạt yêu cầu định lượng. Trình tự rửa giải của các pic trong lá Actisô khá phù hợp với đa số tài liệu công bố ^{7,8,38,53,141}. Điều đáng chú ý là trình tự rửa giải của 2 pic flavonoid (cynarosid và scolymosid) thường rất gần nhau và có thể bị đảo vết nếu sử dụng các cột sắc ký khác nhau. Xét về độ phân cực, hợp chất scolymosid có 2 phân tử đường nên sẽ được rửa giải trước hơn so với cynarosid (có 1 đường). Tuy nhiên qua kết quả phân tích của luận án cho thấy đối với cột Sunfire C₁₈ (**Hình 4.1-D**) thì pic scolymosid được rửa giải trước cynarosid. Trong khi với cột ThermoFisher C₁₈ (**Hình 4.1-C**) cho trình tự rửa giải của pic scolymosid ra sau. Điều này được giải thích là do scolymosid phân cực hơn nên tương tác nhiều với các nhóm silanol tự do chưa được khóa “endcapped” trong pha tĩnh của cột ThermoFisher, trong khi đó số lượng nhóm silanol tự do ở pha tĩnh của cột Sunfire ít hơn nên không gặp hiện tượng đảo vết này. Điều này cho thấy hiệu quả khóa “endcapped” các nhóm silanol tự do ở cột Sunfire (Waters) tốt hơn ở cột ThermoFisher. Hiện tượng đảo vết này cũng quan sát thấy ở một số công bố trên thế giới khi phân tích lá và hoa Actisô. SKĐ trong nghiên cứu của Häusler M. ³⁸ cũng cho thấy pic cynarosid ra trước scolymosid (**Hình 4.1-A**) với cột sắc ký sử dụng là Luna (Phenomenex). Ngược lại, nghiên cứu của Wang M. cho thấy pic scolymosid ra trước cynarosid (**Hình 4.1-B**) khi sử dụng cột Luna prodigy ODS3 (Phenomenex). Mặc dù cả hai cột sắc ký sử dụng trong hai nghiên cứu này đều là Phenomenex nhưng dòng sản phẩm khác nhau cũng có thể cho hiệu quả khóa “endcapped” không giống nhau.



Hình 4.1. SKĐ cao chiết và lá khô Actisô nghiên cứu so với TLTK

Về khảo sát quy trình định lượng, các quy trình định lượng đã công bố trên thế giới đều không khảo sát điều kiện chiết xuất lá hoặc cao Actisô, chỉ có nghiên cứu của Wang M. (2003)⁸⁹ có khảo sát tỉ lệ ethanol trong chiết xuất nhưng không khảo sát các yếu tố khác. Kết quả của luận án đã khảo sát các yếu tố ảnh hưởng như dung môi, nhiệt độ và thời gian chiết xuất, tỉ lệ dung môi hay số lần chiết xuất để thu được hàm lượng chất cần định lượng đạt hiệu suất tối đa do đó có thể xác định được chính xác hàm lượng của các chất này có trong nguyên liệu. Qua khảo sát, đối với lá khô Actisô dùng dung môi chiết tốt nhất là cồn 50 % cũng phù hợp với nghiên cứu của Wang M. dùng cồn 60 %. Còn đối với cao khô Actisô cho thấy methanol ở nồng độ 20 - 40 % đều hòa tan được cao khô khá tốt. Kết quả này cũng phù hợp với quy trình định lượng cao Actisô của M. Häusler và cộng sự (2022) dùng methanol 20 %³⁸. Quy trình của luận án dùng methanol 40 % vì cả 2 nồng độ 20 - 40 % đều hòa tan tốt nhưng chọn 40 % vì ít tạp phân cực hơn và dịch chiết có độ nhớt thấp nên dễ lọc hơn.

Về kết quả đánh giá quy trình định lượng theo hướng dẫn của ICH, cả 2 quy trình định lượng các polyphenol trong lá và cao khô Actisô đều đạt tính tương thích hệ thống, khoảng tuyến tính, độ chính xác cao (RSD = 0,9 - 2,3 %) và độ phục hồi từ 93,0 - 103,9 % (RSD = 0,78 - 3,73), chứng tỏ quy trình định lượng đáng tin cậy.

Tóm lại, luận án đã xây dựng quy trình định lượng có độ tin cậy cao cùng với

việc khảo sát các điều kiện chiết xuất ảnh hưởng đến thành phần các hoạt chất cần định lượng trong khi chưa thấy việc khảo sát này ở các quy trình đã công bố trước đây.

b. Xây dựng quy trình định lượng đồng thời 12 polyphenol trong cao khô Actisô:

Luận án đã xây dựng quy trình định lượng 12 polyphenol trong cao khô Actisô bằng UPLC-PDA gồm: 4 mono-CQA (1-CQA; 3-CQA; AC; 4-CQA), acid caffeic, 5 di-CQA (CY; 3,4-diCQA; 3,5-diCQA; 1,5-di-CQA; 4,5-diCQA) và 2 flavonoid (cynarosid và scolymosid). Trình tự rửa giải của các chất cũng như tỉ lệ của các pic polyphenol trong cao Actisô phù hợp với nghiên cứu của Häusler M. (2002)³⁸ định lượng 10 polyphenol trong lá Actisô bằng HPLC-MS. Điều kiện phân tích của nghiên cứu này vẫn chưa phân tách được 2 đồng phân là acid 1,5- và 3,5-diCQA (**Hình 4.1-A**). Tuy nhiên, điều kiện phân tích của luận án có thể phân tách hoàn toàn 2 pic này với nhau (**Hình 4.1-C**) bằng kỹ thuật UPLC. **Về hàm lượng của các chất định lượng**, trong số 12 chất định lượng của đề tài thì có 8 chất được tính hàm lượng theo 8 chất đối chiếu tương ứng. Tuy nhiên, vì 4 chất phân lập gồm 3-CQA; 4-CQA; 3,4-diCQA và 3,5-diCQA có khối lượng ít nên cả 4 polyphenol định lượng này được tính hàm lượng theo các đồng phân của chúng là acid chlorogenic và cynarin. Mặc dù cách tính này có sai số so với việc tính hàm lượng theo các chất chuẩn tương ứng của chúng, nhưng việc định lượng 12 polyphenol của luận án chỉ nhằm mục đích so sánh hàm lượng của chúng giữa các bộ phận khác nhau của cây, không dùng để tiêu chuẩn hóa dược liệu. Một số nghiên cứu về Actisô được tóm tắt ở tổng quan (**Mục 1.4.2**) cũng áp dụng cách tính này đối với một số chất định lượng là mono-CQA hoặc di-CQA khi không có chất chuẩn tương ứng^{7,141}.

Tóm lại, luận án đã xây dựng quy trình định lượng được gần như đầy đủ các thành phần polyphenol chính trong cao khô Actisô (12 polyphenol). Các pic cần định lượng tách nhau khá rõ trên SKĐ và đã được thẩm định đầy đủ các chỉ tiêu theo hướng dẫn của ICH. Quy trình đạt về tính tương thích hệ thống, khoảng tuyến tính, độ lặp lại trong ngày (RSD = 0,57 - 1,17 %); độ chính xác trung gian (RSD = 0,90 - 2,51%); độ phục hồi từ 90,0 - 106,3 % (RSD = 0,39 - 2,53 %). Do đó quy trình có độ tin cậy cao. Ngoài ra, khi áp dụng quy trình này để phân tích các thành phần trong các bộ phận khác nhau của cây Actisô đều thể hiện việc phân tách khá tốt mặc dù mỗi bộ phận của cây đều có hỗn hợp các thành phần với độ phức tạp khác nhau.

4.2.3. Nghiên cứu động thái tích lũy

a. So sánh hàm lượng hoạt chất theo giống cây:

Cây Actisô “giống tím - A80” (**AT**) và “giống xanh - A85” (**AX**) là hai giống Actisô có giá trị kinh tế cao và được trồng phổ biến tại Đà Lạt, nơi có diện tích trồng và sản lượng cây Actisô lớn nhất Việt Nam. Sự khác biệt về đặc điểm hình thái của hoa và lá của 2 giống được trình bày ở **Phụ lục 51**. Cả 2 giống này đều có nguồn gốc từ Pháp, được di thực vào Việt Nam từ đầu thế kỷ 20. Tuy nhiên, hiện nay sản lượng và chất lượng cây Actisô được cho là đang suy giảm nghiêm trọng bởi sự thoái hóa giống, nhiễm bệnh từ các phương pháp nhân giống truyền thống¹⁵⁷. Chính vì vậy, việc đánh giá đầy đủ các thành phần polyphenol chính cũng như hoạt tính chống oxy hóa của 2 giống cây này là thật sự cần thiết để bổ sung vào hồ sơ chất lượng của 2 giống Actisô này nhằm góp phần vào việc lựa chọn cải tạo hoặc nhân giống Actisô đáp ứng được các yêu cầu trong nông nghiệp và cả ngành dược phẩm.

Luận án đã phân tích các thành phần chính và đồng thời so sánh hoạt tính chống oxy hóa (*in vitro* và *ex vivo*) trong các cao chiết của 2 giống Actisô từ các BPD gồm lá, gân lá, thân, rễ và hoa được chiết xuất bởi các dung môi khác nhau (nước, ethanol 40 và 96 %). Qua tham khảo tài liệu cho thấy dung môi chiết xuất có ảnh hưởng đến thành phần cũng như tỉ lệ của các polyphenol trong các cao chiết Actisô^{51,148,149}. Chính vì vậy, luận án đã lựa chọn các dung môi chiết xuất có độ phân cực tăng dần gồm ethanol 96 %, EtOH 40 % và nước để so sánh thành phần hóa học và tác dụng chống oxy hóa giữa các bộ phận khác nhau của cây Actisô. Đối với lá tươi được chiết xuất với nước ở 100 °C vì ở điều kiện này đã được chứng minh giúp làm gia tăng hàm lượng cynarin và một số di-CQA^{51,148}. Còn đối với dược liệu khô thường được chiết với dung môi cồn - nước (40 - 60 %) ⁸⁹. Một số kết quả chính thu được như sau:

Về giống cây, nhìn chung giống **AX** và **AT** có thành phần polyphenol tương đối giống nhau, chỉ khác nhau về tỉ lệ hay hàm lượng của từng thành phần tùy thuộc vào dung môi chiết xuất. **Xét trên cao chiết nước của lá Actisô**, hàm lượng polyphenol tổng (TPC) của **AX** tương đương hoặc hơi cao hơn **AT** (13,5 so với 12,9 %). Các thành phần khác biệt chủ yếu ở 2 giống là acid chlorogenic và các di-CQA (cynarin; 1,5-diCQA; 3,4-di CQA; 4,5-diCQA). Trong đó, đáng chú ý nhất là cynarin của giống **AX** cao hơn **AT** gấp 6 lần (3,52 so với 0,56 %, $p < 0,05$) ở cao chiết lá tươi và gấp 2

lần ở cao chiết lá khô (0,51 so với 0,15 %, $p < 0,05$). Kế đến là dẫn xuất 3,4-diCQA và 3,5-diCQA ở giống **AX** cao gấp 4,2 - 4,5 lần **AT**; và cao hơn gấp 2 lần đối với 1,5-diCQA. Bên cạnh đó, hoạt tính chống oxy hóa của **AX** cũng cao hơn **AT** trên cả 2 mô hình thử nghiệm, với **AX** có IC_{50} là 21,9 $\mu\text{g/ml}$ (DPPH) và 114,0 $\mu\text{g/ml}$ (MDA); **AT** có IC_{50} là 30,8 và 227,8 $\mu\text{g/ml}$. **Xét trên cao chiết cồn của lá Actisô**, ngược lại với cao chiết nước, giống **AT** có hàm lượng polyphenol cao hơn so với giống **AX** (9,96 so với 7,20 %, $p < 0,05$). Các thành phần khác biệt chủ yếu là acid chlorogenic; scolymosid; 3,4- và 3,5-diCQA. Trong đó, đáng chú ý nhất là 3,4- và 3,5-diCQA được tìm thấy trong giống **AT** (0,7 - 0,8 %) trong khi không phát hiện được ở **AX**. Kế đến là scolymosid ở giống **AT** cao hơn gấp 1,5 lần so với **AX** (1,4 so với 0,89 %, $p < 0,05$). Hàm lượng acid chlorogenic của giống **AT** cũng hơi cao hơn so với **AX** (4,1 so với 3,6 %, $p < 0,05$). Cả 2 giống đều có hàm lượng cynarin rất thấp (0,03 - 0,04 %) trong cao chiết cồn 96 %. Về hoạt tính chống oxy hóa, cao chiết cồn của **AT** có hoạt tính mạnh hơn **AX** (**AT** có IC_{50} là 34,2 $\mu\text{g/ml}$ (DPPH) và 662,3 $\mu\text{g/ml}$ (MDA); **AX** có IC_{50} là 44,2 và 712,2 $\mu\text{g/ml}$) (xem **Hình 3.28**, **Mục 3.2.3.2**). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Wang M. (2003) ⁸⁹ (**Mục 1.4.3**) với hàm lượng TPC của cao chiết cồn lá khô là 6,9 - 9,8 % so với kết quả của luận án là 7,20 - 9,96 % tùy vào giống Actisô. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu của Wang M. cũng cho hàm lượng acid chlorogenic phụ thuộc giống với 1,4 - 4,7 % so với kết quả của luận án là 1,17 - 4,94 % (cao cồn) tùy vào giống và thời điểm thu hái trong năm (xem **Mục 3.2.3.3**).

Tóm lại, 2 giống Actisô phổ biến tại Đà Lạt lần đầu tiên được so sánh đầy đủ về hàm lượng 12 polyphenol cũng như hoạt tính chống oxy hóa của chúng trên mô hình *in vitro* và *ex vivo*. Kết quả cho thấy hàm lượng các polyphenol của 2 giống lá Actisô phụ thuộc vào dung môi chiết xuất. Giống **AX** có hàm lượng polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa cao hơn **AT** ở cao chiết nước. Ngược lại, ở cao chiết cồn thì giống **AT** có polyphenol và hoạt tính chống oxy hóa tốt hơn giống **AX**. Hàm lượng cynarin đặc biệt cao ở cao chiết nước của giống **AX**. Nhìn chung, với quy trình xử lý dược liệu và chiết xuất thích hợp cho thấy hàm lượng polyphenol ở cả 2 giống đều đạt chất lượng tốt với acid chlorogenic cao gấp 3 - 5 lần so với hàm lượng quy định bởi Dược điển Châu Âu. Luận án cung cấp các bằng chứng khoa học về thành phần hóa học và hoạt tính chống oxy hóa của các cao chiết của đầy đủ BPD ở cả 2 giống cây Actisô.

b. So sánh hàm lượng hoạt chất theo bộ phận dùng (BPD) của cây:

Từ kết quả ở Mục 3.2.3.2 cho thấy, hàm lượng polyphenol trong Actisô còn có sự khác biệt rõ rệt ở các bộ phận khác nhau của cây. Một số kết quả về hàm lượng tổng các polyphenol định lượng (TPC) được tóm tắt như sau:

- **Ở cao chiết nước:** Lá tươi > thân > lá khô > rễ > gân > hoa (AX)

Lá tươi > thân > lá khô > rễ = gân = hoa (AT)

- **Ở cao chiết cồn:** Thân > lá khô > rễ > gân = hoa (AX)

Thân > lá khô > rễ = hoa > gân (AT)

Nghiên cứu của Wang M. và cộng sự (2003)⁸⁹; Falleh H. (2008)¹⁸⁸; Bùi Thị Thu Hà (2008)¹⁸⁹, Pandino G. (2013)¹⁹⁰ và Nouraei S. (2017)¹⁹¹ cũng cho kết quả tương tự về hàm lượng tổng polyphenol (TPC) trong lá cao hơn hoa.

Nhóm nghiên cứu của Bùi Thị Thu Hà đã so sánh hàm lượng của cynarin trong các cao chiết cho kết quả là thân già (ở gốc) > lá > rễ > hoa > thân xanh. Kết quả này cũng tương tự với kết quả của luận án. Lưu ý rằng nguyên liệu thân cây mà luận án sử dụng là loại thân già ở gốc mà người dân Đà Lạt thường gọi là “thân đen” (xem hình ở Phụ lục 51), loại thân này thường có vị thơm và ngọt, được người dân bán với giá cao hơn “thân xanh” - thân chính còn diệp lục tiếp nối với cuống hoa. Kết quả phân tích của luận án cho thấy, hàm lượng cynarin đặc biệt cao ở cao chiết nước của “thân đen” ở cả 2 giống, cao hơn ở lá tươi từ 1,4 - 2,6 lần. Kết quả này cũng phù hợp với kết quả của Bùi Thị Thu Hà khi so sánh về hàm lượng cynarin như đã đề cập ở trên. Đặc biệt, ở giống AX có hàm lượng cynarin của cao chiết nước “thân đen” có thể lên đến 5,0 %. Tuy nhiên, khi so sánh về tổng polyphenol của chúng thì có sự khác biệt giữa 2 nghiên cứu. Cụ thể, nghiên cứu của Bùi Thị Thu Hà cho thấy hàm lượng tổng polyphenol trong các BPD theo trình tự như sau: Lá > hoa > rễ > thân (đen) > thân (xanh). Sự khác biệt này có thể được lý giải như sau. Thứ nhất, tổng polyphenol của Bùi Thị Thu Hà được định lượng bằng phương pháp Folin-ciocalteu, còn hàm lượng TPC của luận án không phải là polyphenol toàn phần mà là tổng 12 polyphenol chính định lượng. Do vậy, hoa Actisô có thể có các thành phần polyphenol khác như anthocyanidin, dẫn xuất apigenin, narirutin,... mà quy trình của

luan án không định lượng nên hàm lượng tổng 12 polyphenol không cao nhưng có thể cho hàm lượng tổng polyphenol theo phương pháp Folin-ciocalteu lại cao. Mặc dù vậy, luận án cũng cho thấy hoạt tính chống oxy hóa của hoa cũng thấp hơn so với các BPD khác. Do vậy, hàm lượng này cần phải kiểm chứng thêm ở một số mẫu thu hái vào các thời điểm khác cũng như ở vùng trồng khác. *Thứ hai*, nguyên liệu trong nghiên cứu của Bùi Thị Thu Hà được thu mua tại chợ Đà Lạt, do đó các BPD của cây là từ nhiều nguồn khác nhau hoặc từ nhiều cây Actisô khác nhau cũng như khác về vùng trồng nên dẫn đến sự khác biệt về hàm lượng. Nguyên liệu của luận án được thu thập trên cùng một cây Actisô do đó hạn chế sự ảnh hưởng của các yếu tố này.

Tóm lại, luận án lần đầu định lượng 12 polyphenol và so sánh hoạt tính chống oxy hóa của các BPD từ cây Actisô. Mặc dù Bùi Thị Thu Hà lần đầu công bố về việc so sánh TPHH trong các BPD này, song chỉ đánh giá 5 polyphenol (cynarin, narirutin, apigenin-7-*O*-glucosid, acid caffeic, acid gallic), trong đó chỉ có cynarin là thành phần chính, trong khi các thành phần khác có hàm lượng không đáng kể hoặc không phát hiện trong lá Actisô. Mặc khác, nghiên cứu của Bùi Thị Thu Hà cũng chưa so sánh về hoạt tính chống oxy hóa của các BPD của cây. Kết quả của luận án cho thấy, ngoài lá Actisô, thân cây cũng là nguồn nguyên liệu tiềm năng giàu polyphenol và có tác dụng chống oxy hóa khá tốt, đặc biệt là “thân đen giống AX” của cây Actisô.

c. Hàm lượng tích lũy theo thời kỳ sinh trưởng và thời gian thu hái:

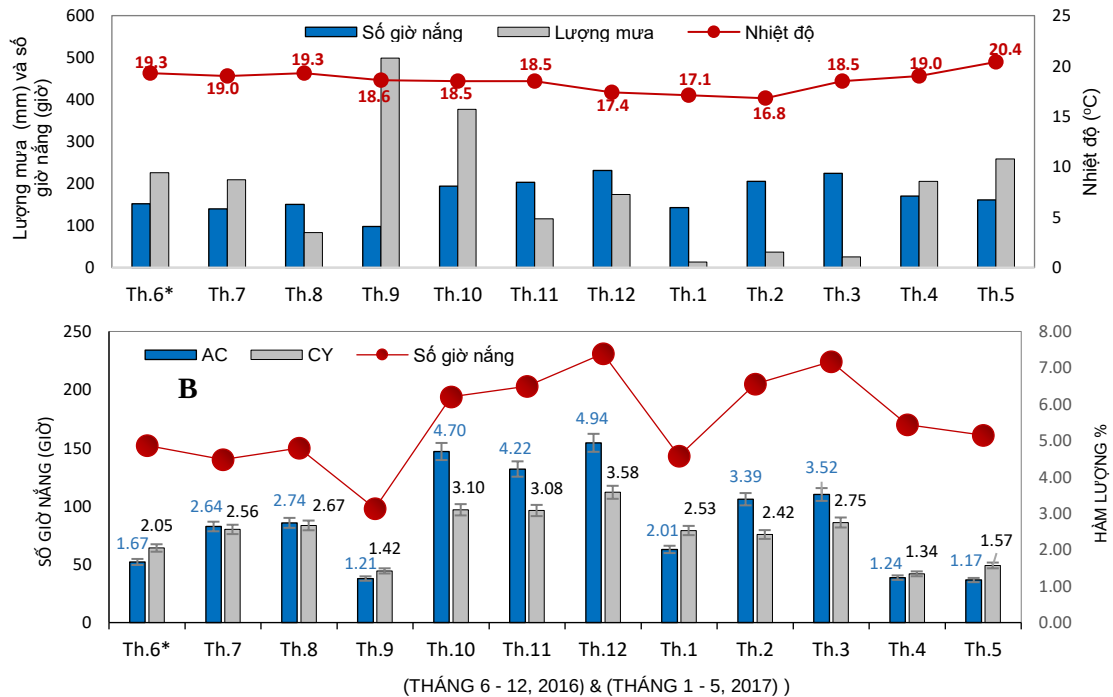
Thí nghiệm được thực hiện trong mùa vụ 2016 - 2017 trên vườn trồng Actisô ở phường 5 - Thái Phiên (Lâm Đồng), một khu vực điển hình cho việc trồng Actisô ở Đà Lạt. Với độ cao 1.500 mét, Đà Lạt có khí hậu ôn hòa và dịu mát quanh năm. Nhiệt độ hàng tháng trung bình trong 10 năm (2009 - 2019) khoảng 18,5 °C. Năm 2016-2017 có nhiệt độ thấp nhất là 16,8 °C và cao nhất là 20,4 °C¹⁵⁷.

Thử nghiệm được thực hiện trên cây Actisô giống A85 - AX. Cây thường được trồng tháng 4 - 6, thu hoạch cuối kỳ tháng 2 - 3 năm sau, và 1 tháng còn lại để cải tạo đất chuẩn bị cho vụ mới. Cây con mọc ra từ gốc cây mẹ khỏe mạnh được chiết tách để đưa ra trồng ở khu vực vườn ươm chăm sóc đặc biệt trước khi lên luống trồng vụ mới. Sau 2-3 tháng đầu xuống giống trồng Actisô thì bắt đầu thu hoạch các lá già (xẻ

thùy sâu) ở gốc cây với chiều dài lá trung bình khoảng 60 cm. Nếu sau 2 tháng thu hoạch thì chỉ thu được vài lá ở gốc, còn sau 4 tháng thì lá ở gốc có sinh khối nhiều hơn (2 kg/cây), mỗi tháng thu lá 2 lần (cách 15 ngày) đến khi cây bắt đầu ra hoa thì ngừng. Sau 6 - 8 tháng từ lúc trồng, cây bắt đầu ra hoa (tháng 12), hoa phát triển và trưởng thành khoảng 3 tháng (tháng 1 - 3). Sau khi thu hoạch hoa thì tiến hành thu hoạch các bộ phận còn lại gồm rễ, thân “xanh” và thân “đen”. Trong phạm vi của luận án là đánh giá hàm lượng hoạt chất acid chlorogenic tích lũy theo chu kỳ sinh trưởng của cây trong năm và hàm lượng cynarin có trong các cao chiết tương ứng của chúng. Vì vậy, cây Actisô trồng tháng 4 và tháng 6 bắt đầu thu mẫu lá ở gốc lần đầu, tiếp tục lấy mẫu vào ngày thứ 15 của mỗi tháng và liên tục đến tháng 4 năm sau.

Kết quả nghiên cứu cho thấy hàm lượng của acid chlorogenic - thành phần chính của lá Actisô từ 1,17 - 4,94 %. Đối với cynarin, phần lớn các công bố trên thế giới đều định lượng lá khô nên hàm lượng cynarin rất thấp hoặc không phát hiện. Nghiên cứu của Häusler M. và cộng sự (2002) ³⁸ cũng cho kết quả tương tự với acid chlorogenic là 0,48 - 4,24 %, nhưng cynarin trong các cao khô Actisô chỉ có hàm lượng từ 0,03 - 0,43 %, trong khi kết quả của luận án là 1,34 - 3,58 %. Như đã phân tích ở trên, sự tạo thành cynarin trong quá trình chiết xuất phụ thuộc vào nhiều yếu tố như giống cây và đặc biệt là điều kiện chiết xuất. Trong thí nghiệm của đề tài thực hiện, Actisô giống xanh cũng như điều kiện chiết xuất đã được khảo sát chiết được hàm lượng cynarin tốt nhất. Cụ thể, hàm lượng acid chlorogenic trong lá và cynarin trong cao chiết Actisô cao nhất được ghi nhận trong thí nghiệm hiện tại là ở mùa thu hoạch lá tháng 10 - 12 với acid chlorogenic (4,22 - 4,94 %) và cynarin (3,10 - 3,58 %) trong cao chiết nước. Tháng 10 - 12 và tháng 2,3 có nhiều bức xạ mặt trời hơn và nhiệt độ thấp hơn các tháng khác trong năm nghiên cứu. Sự kết hợp này có thể tạo điều kiện cho sự tích lũy polyphenol (acid chlorogenic và cynarin) trong cây. Do đó, ở tháng 9 có lượng mưa nhiều nhất trong năm 2016 dẫn đến hàm lượng polyphenol của lá Actisô cho thấy thấp đáng kể. Mặc dù tháng 2 và 3 cũng có số ngày nắng nhiều tương đương với tháng 12 nhưng hàm lượng acid chlorogenic (2,42 - 2,75 %) và cynarin (2,01 - 3,52 %) thấp hơn tháng 10 - 12 có thể là do cây đang trong giai đoạn

ra hoa, do đó quá trình sinh tổng hợp các hoạt chất cần thiết cho sự phát triển của hoa được ưu tiên hơn. Như vậy, sự tích lũy các thành phần polyphenol trong lá Actisô còn phụ thuộc vào giai đoạn sinh trưởng của cây.



Hình 4.2. Biểu đồ thời tiết (lượng mưa, nhiệt độ, số giờ nắng) trong năm 2016-2017 (A) và hàm lượng tích lũy của AC và CY theo thời gian thu hoạch (B)

(A): Nguồn “Cục thống kê tỉnh Lâm Đồng (2012) - Niên giám thống kê năm 2017”¹⁹²

*Th.6: Thu hoạch lần đầu (cây 2 tháng tuổi)

Thực vật phản ứng với những thay đổi của khí hậu nên làm thay đổi quá trình sinh tổng hợp các chất chuyển hóa thứ cấp của chúng, chẳng hạn như flavonoid và các dẫn xuất của acid caffeoylquinic. Endreva (2005)¹⁹³ đã chỉ ra rằng sự tổng hợp các flavonoid và hydroxycinnamic giúp bảo vệ chống lại các tổn thương do quá trình oxy hóa. Tương tự, ở lá cây Bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) cũng tích tụ flavonol khi tiếp xúc với ánh sáng mặt trời kéo dài¹⁹⁴. Hàm lượng hydroxycinnamic trong quả Cà chua tăng khoảng 20 % khi cây tiếp xúc với tia UV tăng cường¹⁹⁵. Trong nghiên cứu của luận án, hàm lượng polyphenol được phát hiện cũng theo xu hướng tương tự. Các kết quả hiện tại của luận án cũng đã chứng minh tầm quan trọng của nhiệt độ không khí và bức xạ mặt trời đối với sự tích lũy polyphenol trong lá Actisô. Mức bức xạ mặt trời tăng dẫn đến lượng electron được tạo ra từ quang hợp nhiều hơn và do đó sự hiện diện của ROS tăng lên. Phản ứng của thực vật dường như làm tăng rõ rệt hàm

lượng acid caffeoylquinic (chủ yếu là 5-CQA và 1,5-diCQA) trong cây Actisô. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Pandno G. (2013) và cộng sự¹⁹⁶.

Tóm lại, luận án lần đầu công bố về động thái tích lũy hàm lượng acid chlorogenic trong lá Actisô trồng tại Đà Lạt theo thời gian thu hoạch. Việc điều chỉnh thời gian trồng trong điều kiện có mức bức xạ mặt trời và nhiệt độ không khí dự kiến giúp thúc đẩy tổng hợp polyphenol trong cây. Theo kết quả nghiên cứu của luận án, sau 2 tháng xuống giống (tháng 6) thì sinh khối cũng như hàm lượng hoạt chất chưa cao, và hàm lượng acid chlorogenic bắt đầu tăng từ tháng thứ 3 trở đi sau khi trồng. Do đó việc thu hoạch lá Actisô không nên thu hoạch trước 2 tháng từ lúc trồng ra vườn. Ngoài ra, sau khi thu hoạch hoa thì có thể thu hoạch toàn bộ cây là hợp lý vì hàm lượng hoạt chất tích lũy trong lá rất thấp vào thời điểm này. Tuy nhiên, việc chọn thời điểm trồng cây còn tùy thuộc vào năng suất và chất lượng hoa vì đây là nguồn cung cấp chính, cũng như các yếu tố khác ảnh hưởng đến sự phát triển của cây.

4.2.4. Kiểm nghiệm các chế phẩm

a. Các chế phẩm trà Actisô túi lọc

Về **acid chlorogenic**, đa số các chế phẩm trà túi lọc trên thị trường (trong phạm vi của luận án thu thập) đều chứa acid chlorogenic nhưng hàm lượng rất thấp từ 0,01 - 0,56 %. Nhóm chế phẩm mà trong thành phần công thức có 100 % lá Actisô (không có thành phần dược liệu khác hay BPD khác) thì có hàm lượng acid chlorogenic cao hơn (**Tr1** và **Tr5**). Kết quả này cũng phù hợp với kết quả nghiên cứu động thái tích lũy theo BPD của cây mà luận án đã đạt được ở **Mục 3.2.3.2**, cho thấy lá có hàm lượng acid chlorogenic cao hơn các bộ phận khác của cây và phù hợp với một số công bố trên thế giới^{89,189,190,191}. Đáng chú ý là mẫu lá nghiên cứu của giống xanh (**X.LNC**) và giống tím (**T.LNC**) có hàm lượng acid chlorogenic cao nhất (2,54 - 4,32 %), gấp hơn nhiều lần so với các trà túi lọc trên thị trường. Sự chênh lệch khá lớn này có thể do một số yếu tố như sau. *Thứ nhất*, hàm lượng acid chlorogenic còn phụ thuộc vào thời gian thu hái cũng như tùy giống cây Actisô như đã trình bày ở **Mục 3.2.3.1**. *Thứ hai*, phương pháp làm khô dược liệu (nhiệt độ sấy, phơi âm can, phơi nắng thông thường, đông khô,...) có ảnh hưởng đáng kể đến hàm lượng polyphenol, đặc biệt là

acid chlorogenic của lá Actisô sau khi thu hái ⁸⁹. Thứ ba, lá của nghiên cứu là phần phiến lá đã loại bỏ gân chính và cuống lá. Ngoài ra, sau khi phơi khô, phiến lá được xay và rây, loại bỏ xơ và lông che chở (thông thường các phần này chiếm 50 %). Trong khi đó, các sản phẩm trà túi lọc sử dụng lá nguyên chưa được loại đi các gân giữa, thậm chí là cuống lá cũng như các xơ và lông che chở của nó, đây là các thành phần không có hoặc chứa rất ít các polyphenol.

Về **cynarin**, hàm lượng hợp chất này trong các chế phẩm đều rất thấp (dưới 0,1 %) ngay cả lá Actisô nghiên cứu. Kết quả này cũng phù hợp với nhiều công bố trên thế giới như đã trình bày ở phần tổng quan, cho thấy cynarin không có hoặc có hàm lượng rất thấp trong lá khô Actisô. Ngược lại, chúng chỉ được tìm thấy với hàm lượng đáng kể trong cao chiết từ lá tươi Actisô.

Về **flavonoid (scolymosid và cynarosid)**, được phát hiện trong 2 mẫu lá nghiên cứu (X.LNC và T.LNC) và 3/10 mẫu chế phẩm trên thị trường (**Tr.5, 6, 10**). Trong đó, hàm lượng scolymosid thường cao hơn cynarosid từ 1,5 - 2 lần, ngoại trừ mẫu **Tr10** vì chứa BPD khác, còn **Tr.5 và 6** có chứa 100 % lá Actisô. Tuy nhiên, hàm lượng của flavonoid trong các mẫu trà túi lọc rất khác biệt, có 7 mẫu trà không phát hiện được cynarosid và scolymosid, 2 mẫu **Tr6 và 10** có hàm lượng flavonoid là 0,01 - 0,07 %, chỉ có mẫu **Tr5** có hàm lượng tương đối cao hơn với scolymosid (0,46 %) và cynarosid (0,32 %); 2 mẫu lá nghiên cứu (X.LNC và T.LNC) có scolymosid (0,54 - 0,71 %) và cynarosid (0,32 - 0,52 %). Sự khác biệt này có thể do chất lượng lá cũng như do quá trình thu hái, sơ chế hoặc bảo quản chưa phù hợp như đã đề cập ở trên.

Tóm lại, luận án lần đầu công bố về việc đánh giá hàm lượng của 4 polyphenol chính (acid chlorogenic, cynarin, cynarosid và scolymosid) trong 10 chế phẩm trà túi lọc được thu thập ngẫu nhiên trên thị trường Việt Nam. Ở thị trường trong nước cũng như trên thế giới có rất nhiều chế phẩm trà túi lọc từ lá khô Actisô, nhưng chưa có công bố nào đánh giá chất lượng giữa của các chế phẩm này. Qua kết quả nghiên cứu của luận án cho thấy, trà túi lọc thường có hàm lượng hoạt chất chống oxy hóa thấp hơn so với chế phẩm chứa cao chiết từ lá tươi Actisô. Vì vậy, các chế phẩm từ cao chiết lá tươi Actisô mang nhiều lợi ích cho sức khỏe hơn so với dạng trà túi lọc. Để

đảm bảo chất lượng, trà túi lọc sử dụng nguyên liệu lá khô Actisô phải trải qua phương pháp xử lý thích hợp mới cho hoạt chất có hàm lượng cao tương tự như nguyên liệu lá khô Actisô mà luận án thực hiện. Bên cạnh đó, đối với các chế phẩm từ lá Actisô được bào chế ở dạng thuốc hiện đại (viên nang) để bảo vệ sức khỏe hay hỗ trợ điều trị bệnh thì chỉ ***nên bào chế đối với cao chiết Actisô, không nên bào chế ở dạng bột lá khô*** vì không đảm bảo hiệu quả điều trị.

b. Chế phẩm từ cao Actisô trong nước và nước ngoài:

Về ***SKĐ phân tích 12 polyphenol trong các chế phẩm***, mặc dù các chế phẩm có mức độ phức tạp khác nhau nhưng không có sự chênh lệch đáng kể về thời gian lưu của các pic định lượng với nhau (xem hình SKĐ của các chế phẩm ở **Phụ lục 54**). Ngoài ra, trên SKĐ cho thấy đa số các chế phẩm đều có 11 thành phần chính gồm 1-CQA; 3-CQA; acid chlorogenic; 4-CQA; cynarin, cynarosid; scolymosid; 3,4-diCQA; 3,5-diCQA; 1,5-diCQA và 4,5-diCQA. Riêng acid caffeic có hàm lượng rất thấp hoặc không phát hiện được ở nhiều chế phẩm. SKĐ của các chế phẩm nước ngoài khá tương đồng với chế phẩm trong nước, chỉ khác ở một số pic rất nhỏ (pic được đánh dấu sao trên SKĐ, ở **Phụ lục 54**), sự khác biệt này có thể là do phương pháp chiết xuất hoặc do khác biệt về giống hoặc vùng trồng. Đáng chú ý, tất cả các chế phẩm đều có tín hiệu của pic cynarin, có một số chế phẩm tín hiệu này khá cao như 3 lô chế phẩm nghiên cứu của luận án (**NC.CP17-19**), 5 chế phẩm nước ngoài (**N.CP1, N.CP3-4, N.CP6-7**); 2 chế phẩm trong nước (**V.CP11,15-16**). Do vậy, kết quả này một lần nữa khẳng định sự xuất hiện đáng kể của cynarin trong các cao chiết hay các chế phẩm chứa cao Actisô. Như đã đề cập ở phần tổng quan, cynarin được xem là một chất artifact có hoạt tính sinh học được tạo ra trong quá trình chiết xuất.

4.3. Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa

Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) của các polyphenol đã được báo cáo thông qua khả năng trung hòa gốc tự do dựa trên cơ chế nhường hydro nhờ sự hiện diện của các nhóm hydroxyl và khả năng khử ion kim loại ¹⁹⁷. Từ kết quả của luận án, các cao chiết toàn phần (cao nước, cao cồn 96 %) từ các BPD khác nhau (lá, gân lá, rễ, thân, hoa) của cây Actisô cũng như 9 hợp chất polyphenol tinh khiết phân lập từ lá Actisô

đã được đánh giá HTCO bằng thử nghiệm DPPH. Theo phân loại về khả năng chống oxy hóa dựa vào giá trị IC_{50} bằng phương pháp DPPH, hoạt tính chống oxy hóa được phân thành 5 mức độ: Mạnh ($IC_{50} < 50 \mu g/ml$); khá ($50 - 100 \mu g/ml$); trung bình ($101 - 250 \mu g/ml$), yếu ($250 - 500 \mu g/ml$); và không có hoạt tính ($IC_{50} > 500 \mu g/ml$)¹⁹⁸.

HTCO của 9 polyphenol tinh khiết phân lập từ lá Actisô, kết quả của nghiên cứu cho thấy cả 9 hợp chất thử nghiệm (1-CQA; 3-CQA; acid chlorogenic; 4-CQA; cynarin; 1,5-diCQA; 4,5-diCQA; cynarosid; scolymosid) đều có HTCO mạnh ($IC_{50} = 2,6 - 21,7 \mu g/ml$). Đặc biệt đối với các hợp chất flavonoid (cynarosid và scolymosid) và di-CQA (cynarin; 1,5-diCQA; 4,5-diCQA) có hoạt tính rất mạnh ($IC_{50} = 2,6 - 4,8 \mu g/ml$; tương ứng $5,7 - 7,7 \mu M$), mạnh hơn vitamin C ($5,9 \mu g/ml$; tương ứng $33,5 \mu M$). Mức độ chống oxy hóa của các chất được sắp xếp theo trình tự là cynarosid > **4,5-diCQA** > **1,5-diCQA** = **cynarin** - **1,3-diCQA** = scolymosid > 4-CQA > acid chlorogenic > vitamin C > 3-CQA > 1-CQA > silymarin. Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Wang M. và cộng sự (2003)⁸⁹. Tương tự, Xican L. và cộng sự (2018)¹⁹⁹ đã đánh giá HTCO của 5 dẫn xuất di-CQA. Trong đó, thử nghiệm DPPH cho kết quả IC_{50} của các di-CQA được sắp xếp lần lượt là **4,5-diCQA** ($1,7 \mu g/ml$ hay $3,4 \mu M$) > **cynarin** - **1,3-diCQA** ($2,9 \mu g/ml$ hay $5,7 \mu M$) = 3,4-diCQA > 3,5-diCQA ($3,2 \mu g/ml$ hay $6,1 \mu M$) > **1,5-diCQA** ($4,7 \mu g/ml$ hay $9,2 \mu M$).

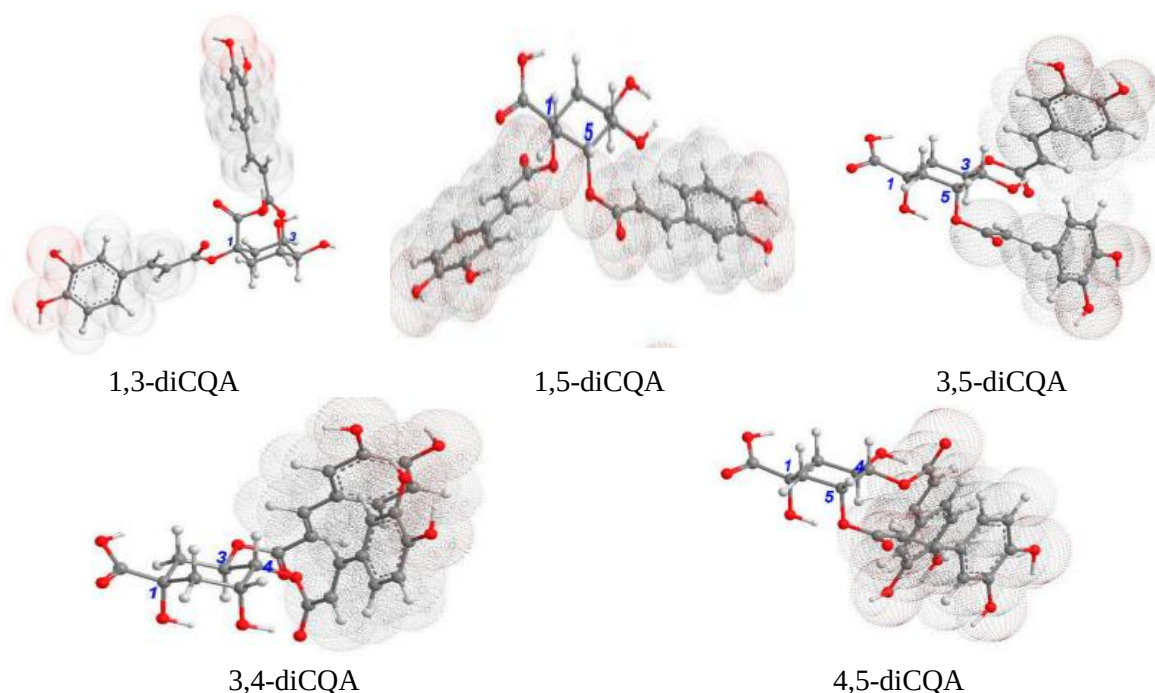
Liên quan cấu trúc - tác dụng: Cơ chế chống oxy hóa của các polyphenol được chứng minh là có thể bao gồm chuyển nguyên tử hydro (Hydrogen Atom Transfer - HAT); chuyển điện tử (Single Electron Transfer - SET) và khả năng tạo phức chelat với Fe^{2+} . Các tác động này có liên quan đến các đặc điểm cấu trúc của chúng bao gồm số lượng và sự sắp xếp trên nhân thơm của các nhóm hydroxyl⁸⁹. Ngoài ra, hoạt động chống oxy hóa của các hợp chất phenol phần lớn được xác định bởi số lượng nhóm hydroxyl trên vòng thơm. Số lượng nhóm hydroxyl càng nhiều, HTCO càng mạnh. Hơn nữa, sự hiện diện của nhóm hydroxyl thứ hai trên vị trí ortho hoặc para cũng làm tăng hoạt tính chống oxy hóa. Cynarin cũng như các đồng phân của nó là di-CQA và flavonoid thuộc dẫn xuất của luteolin có hai nhóm hydroxyl trên hai vòng thơm của nó nên thể hiện hoạt tính chống oxy hóa mạnh hơn acid

chlorogenic hoặc các mono-CQA khác (1-CQA; 3-CQA và 4-CQA) với hai nhóm hydroxyl liền kề trên cùng một vòng thơm⁸⁹. Bên cạnh đó, luận án cũng cho thấy cynarosid là flavonoid có ít hơn scolymosid 1 phân tử đường trong cấu trúc nên có HTCO mạnh hơn so với scolymosid (có 2 phân tử đường) (IC_{50} của cynarosid 5,51 μM so với scolymosid là 7,79 μM). Kết quả này phù hợp với nghiên cứu của Zun M. và cộng sự (2003) công bố rằng puerarin và daidzin (dạng glycosid) không thể hiện HTCO mạnh bằng dạng aglycon của nó (daidzein, genistein), được cho là do sự khác biệt về khối lượng phân tử và độ phân cực giữa các hợp chất nên có thể dẫn đến sự khác biệt về khả năng hấp thu của tế bào²⁰⁰

Về HTCO của các di-CQA (cynarin hay 1,3-diCQA; 1,5-diCQA; 3,4-diCQA; 3,5-diCQA; 4,5-diCQA), nghiên cứu của Xican L. và cộng sự (2018)¹⁹⁹ cho thấy, các di-CQA có 2 nhóm caffeoyl liền kề (4,5-CQA và 3,4-CQA) luôn sở hữu khả năng chống oxy hóa cao hơn so với các di-CQA không liền kề (1,3-CQA; 1,5-CQA và 3,5-CQA). Tuy nhiên, hợp chất 1,3-CQA và 1,5-CQA lại thể hiện hiệu quả bảo vệ tế bào cao hơn so với các di-CQA liền kề. Những khác biệt này có thể là do vị trí của hai nhóm caffeoyl và có liên quan đến hiệu ứng cấu trúc của khung acid quinic.

Một số cơ chế đề xuất cho sự khác biệt về mức độ chống oxy hóa của các di-CQA: Thứ 1, các 4,5- và 3,4-diCQA chứa hai nhóm caffeoyl liền kề nên chúng gần nhau, làm tăng mức độ dày đặc trong phân tử, do đó làm tăng năng lượng phân tử, dẫn đến tăng khả năng phản ứng oxy hóa khử (**Hình 4.51**)¹⁹⁹. Do đó, trong thử nghiệm HTCO dựa trên cơ chế oxy hóa khử như DPPH thì 4,5- và 3,4-diCQA có hoạt tính mạnh hơn so với các di-CQA không liền kề (1,3-CQA, 1,5-CQA và 3,5-CQA). Ngược lại, cynarin (1,3-diCQA) và 1,5-diCQA có 2 nhóm caffeoyl gắn xa nhau trên khung acid quinic nên làm giảm năng lượng phân tử và làm giảm khả năng phản ứng oxy hóa khử. Thứ 2, HTCO của các polyphenol còn thể hiện qua khả năng tạo phức chelat với Fe^{2+} với 2 nhóm OH của khung caffeoyl¹⁹⁹. Như ở **Hình 4.3**, hai phân tử caffeoyl liền kề nhau trong cấu trúc của 3,4-CQA và 4,5-CQA kéo dài ra khỏi khung acid quinic và ở cùng một phía, do đó chúng có thể bao quanh Fe^{2+} nhiều hơn để tham gia vào phản ứng tạo chelat. Ngược lại, hai gốc caffeoyl trong các di-CQA không liền

kề (1,3-CQA và 1,5-CQA) kéo dài từ hai hướng và khó có thể bao quanh nhiều Fe^{2+} để tham gia phản ứng. Vì vậy, trong thử nghiệm FRAP (Ferric reducing antioxidant power – năng lực khử ion Fe^{3+}) các chất này thường có HTCO kém hơn so với các di-CQA liền kề. Thật vậy, cơ chế này đã được chứng minh qua thử nghiệm tạo phức với Fe^{2+} cho thấy 3,4- và 3,5-diCQA cho màu xanh đậm hơn và độ hấp thụ UV cao hơn so với 1,5- và 1,3-diCQA¹⁹⁹.



Hình 4.3. Cấu hình theo mô hình 3D ở dạng ball-stick model của 5 dẫn xuất di-CQA

Nguồn “Xican Li (2018) et. Al”¹⁹⁹

Ngoài khả năng thu dọn gốc tự do, các polyphenol còn thể hiện khả năng phá vỡ chuỗi phản ứng peroxyd hóa lipid màng tế bào nhờ đặc điểm cấu trúc và khả năng tương tác với phospholipid màng, thâm nhập vào lớp lipid màng giúp ổn định màng và có khả năng ức chế quá trình peroxyd hóa lipid hiệu quả²⁰⁰. Peroxyd hóa lipid là quá trình các gốc tự do lấy điện tử từ lipid của màng tế bào, hình thành sản phẩm oxy hóa của lipid hay lipid peroxyd, dẫn đến tổn thương tế bào²⁰⁰. Sự cho điện tử hoặc hydro của các hợp chất polyphenol góp phần vào quá trình bẻ gãy chuỗi phản ứng và ức chế peroxyd hóa lipid. Nghiên cứu đã đánh giá hoạt tính chống oxy hóa, ức chế peroxyd hóa lipid của các cao chiết Actisô và 9 chất tinh khiết phân lập từ lá Actisô bằng phương pháp malonyl dialdehyd (MDA). MDA là sản phẩm cuối cùng và được

xem là chất chỉ thị của quá trình peroxyd hóa lipid tế bào ²⁰⁰. Một phân tử MDA sinh ra phản ứng với hai phân tử acid thiobarbituric tạo phức màu hồng có hấp thụ cực đại ở bước sóng 532 nm. Hàm lượng MDA sinh ra càng thấp chứng tỏ chất thử có HTCO và ức chế peroxyd hóa lipid càng mạnh.

Về HTCO theo mô hình MDA của 9 chất tinh khiết, Xican L. và cộng sự (2018) ¹⁹⁹ đưa ra nhận định rằng các di-CQA không liên kề (1,3-CQA và 1,5-CQA) thể hiện hiệu quả bảo vệ tế bào cao hơn so với các di-CQA liên kề có thể là do hình dạng phân tử của chúng. Trong 1,3-CQA và 1,5-CQA, hai phân tử caffeoyl kéo dài từ khung acid quinic theo các hướng khác nhau, dẫn đến cấu trúc dài và hẹp, nên có thể giúp chúng dễ vượt qua màng tế bào đến nhân. Tuy nhiên, giả thuyết trên cần được nghiên cứu thêm. Tóm lại, sự khác biệt giữa 5 dẫn xuất di-CQA về tác dụng chống oxy hóa hoặc bảo vệ tế bào có thể là do cấu tạo của bộ khung acid quinic. Do đó, có thể thấy một đặc biệt là cynarin có HTCO thấp hơn 3,4- và 4,5-diCQA ở thử nghiệm DPPH nhưng thể hiện hoạt tính bảo vệ tế bào gan tốt hơn trong thử nghiệm MDA. Kết quả nghiên cứu của luận án cũng phù hợp với giả thuyết này ¹⁹⁹.

Đối với các cao chiết thử nghiệm DPPH, so sánh giá trị IC₅₀ giữa các cao toàn phần Actisô (lá, gân chính, rễ, hoa, thân) của cao chiết nước và ethanol 96 %, thứ tự HTCO được trình bày ở **Mục 3.3.2**. Nhìn chung, cao chiết nước của các BPD đều có IC₅₀ thấp hơn cao chiết cồn. Trong đó, lá và thân ở cả 2 loại cao chiết đều cho HTCO mạnh (IC₅₀ là 13,2 - 44,2 µg/ml), kể đến là rễ và hoa có HTCO trung bình đến khá (60,3 - 221,2 µg/ml) tùy giống cây Actisô. **Đối với thử nghiệm MDA**, kết quả cho thấy HTCO của 2 phương pháp thử nghiệm DPPH và MDA có mối tương quan mạnh (hệ số Pearson, $r = 0,86 - 0,99$) (**Phụ lục 62**). Ngoài ra, luận án còn đồng thời kết hợp phân tích 12 thành phần polyphenol chính trong các cao chiết này.

Tóm lại, luận án lần đầu cung cấp đầy đủ thông tin về HTCO trên 2 thử nghiệm DPPH và MDA của 9 hợp chất polyphenol phân lập từ lá Actisô cũng như các cao chiết nước và cồn của các BPD (lá, gân lá, rễ, hoa, thân). Trên thế giới cũng có một số ít nghiên cứu so sánh HTCO của polyphenol trong Actisô nhưng chưa đầy đủ. Cụ thể, nghiên cứu của Wang M. (2003) ⁸⁹ so sánh 7 polyphenol gồm cynarin, cynarosid,

scolymosid, 1-CQA, acid chlorogenic, apigenin rutinosid, narirutin. Trong đó dẫn xuất của apigenin và narirutin lại có hàm lượng rất thấp trong lá Actisô. Tương tự, nghiên cứu của Xican L. và cộng sự¹⁹⁹ cũng chỉ phân tích 5 loại di-CQA như đã đề cập ở trên. Bên cạnh đó, luận án cũng góp phần cung cấp cơ sở dữ liệu về HTCO của các BPD cây Actisô đồng thời làm sáng tỏ thêm về mối liên quan cấu trúc - tác dụng cũng như mối tương quan giữa TPHH và HTCO trong các cao chiết Actisô.

4.4. Nghiên cứu chiết xuất cao Actisô

Dựa vào kết quả phân tích các cao chiết nước và cồn của lá tươi và lá khô Actisô (xem **Mục 3.2.3.2**) cho thấy, lá tươi chiết nước có thành phần hoạt chất tốt nhất. Do đó, lá tươi được chọn để nghiên cứu tiếp về phương pháp chiết xuất cho cao chiết chuẩn hóa. Kết quả cho thấy, cao chiết ở **QT1** có hàm lượng CY cao nhất (2,5 %), mặc dù hàm lượng acid chlorogenic (2,61 %) thấp hơn so với cao chiết ở **QT4** và **QT5** nhưng tổng acid chlorogenic và cynarin là cao nhất. Từ kết quả mà luận án thu được cho thấy nước và nhiệt độ đều có vai trò quan trọng cho quá trình isomer hóa đồng phân 1,5-diCQA tạo thành cynarin (1,3-diCQA). Điều này cũng phù hợp với nghiên cứu của Lutz M. và cộng sự (2011), Fernández M. D. và cộng sự (2021)¹⁴².

Mặc dù các công bố trước đây đều cho thấy việc “đun sôi” giúp làm tăng cynarin nhưng vẫn chưa xác định thời gian đun để gia tăng hàm lượng cynarin là cao nhất. Kết quả của luận án cũng cho thấy ở 60 - 90 phút có sự gia tăng cynarin, tuy nhiên sau đó sẽ giảm dần theo thời gian đun. Ngoài ra, luận án còn khảo sát sự thay đổi các thành phần khác bên cạnh sự gia tăng cynarin để lựa chọn điều kiện chiết xuất cao Actisô tốt nhất. Kết quả cũng chỉ ra rằng song song với việc gia tăng cynarin cũng có sự giảm đáng kể acid chlorogenic. Do vậy, luận án cũng cân nhắc lựa chọn các phương pháp chiết xuất đều giàu cả 2 thành phần này, đồng thời có hàm lượng tổng lượng CQA cao và hoạt tính chống oxy hóa mạnh.

Luận án đã triển khai việc sản xuất cao chuẩn hóa ở quy mô lớn (500 kg phiến lá tươi/mẻ). Hàm lượng acid chlorogenic và cynarin trong các lô chiết xuất quy mô lớn chỉ hơi thấp hơn so với cao chiết thử nghiệm ở quy mô nhỏ. Tuy nhiên, các cao chiết này đều đạt TCCS. Đáng chú ý là các cao nghiên cứu ở 4 lô sản xuất đều có

hàm lượng acid chlorogenic (1,61 - 2,30 %) và cynarin (1,47 - 2,57 %) cao hơn đáng kể so với các cao Actisô (cao mềm, cao khô) đang lưu hành trên thị trường trong nước với AC (0,05 - 2,40 %) và CY (0,03 - 1,06 %).

4.5. Nghiên cứu bào chế viên bao phim chứa 200 mg cao Actisô

Viên nén bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô có khối lượng trung bình viên khoảng $375 \text{ mg} \pm 5 \%$, hàm lượng cao chiếm khoảng hơn 1/2 khối lượng viên nên phương pháp dập thẳng là phù hợp với viên nén bao phim có hoạt chất dễ hút ẩm và biến chất như cao Actisô (do cao chiết Actisô là cao nguyên chất không độn tá dược).

Về kết quả bào chế, các viên thành phẩm có khối lượng tương đối đồng đều trong từng lô và giữa các lô với nhau, là kết quả của bột cao chiết bán thành phẩm có lưu tính tốt như đã phân tích ở **Mục 3.5.6**. Độ cứng viên tương đối cao, dẫn đến độ mài mòn được duy trì ở mức khá thấp, đảm bảo độ bền của viên trong quá trình đóng gói, vận chuyển và bảo quản. Việc bao phim đóng vai trò bảo vệ hoạt chất khỏi tác động của môi trường đặc biệt là hàm lượng polyphenol trong chế phẩm rất cao nhưng màng bao lại ảnh hưởng đến độ hòa tan. Vì vậy cần phải xác định tỷ lệ bao phim phù hợp. Với tỷ lệ màng bao là 0,5 % vừa đủ để đáp ứng cả 2 yêu cầu trên trong thời gian khảo sát. Ngoài ra, độ ổn định của chế phẩm tương đối cao với hàm lượng AC và CY chỉ giảm khoảng 1,0 - 1,5 % ở 2 điều kiện khảo sát (12 tháng dài hạn và 6 tháng lão hóa cấp tốc), điều này có thể là do chế phẩm được bào chế từ cao khô Actisô và màng bao phim giúp bảo vệ các thành phần hoạt chất tốt hơn so với bao đường đặc biệt là các polyphenol dễ bị oxy hóa do giảm khả năng hút ẩm của viên.

Đánh giá về chất lượng của các cao chiết có trong chế phẩm trong và ngoài nước, kết quả phân tích cho thấy tất cả các cao Actisô phân tích đều có hàm lượng tổng mono-CQA là cao nhất, kế đến là di-CQA và cuối cùng là flavonoid (xem **Phụ lục 55**). Tuy nhiên, một số chế phẩm như **N.CP2,4,7** lại có hàm lượng tổng flavonoid cao hơn di-CQA có thể là do khác biệt về dung môi chiết xuất, thông thường với dung môi chiết xuất là ethanol sẽ cho hàm lượng flavonoid cao hơn chiết nước. Ngoài ra, trong các chế phẩm đa số đều có acid chlorogenic chiếm tỉ lệ cao nhất (xem **Phụ lục 55**). Hàm lượng của 1-CQA tương đối thấp trong đa số các chế phẩm, thậm chí không phát hiện được.

Cyanrin có tỉ lệ cao vượt trội so với các đồng phân di-CQA khác trong nhóm. Các kết quả này đều phù hợp với nhiều công bố trên thế giới ¹⁵⁷.

Nghiên cứu của Häusler M. và cộng sự (2002) ¹⁵⁷ định lượng 10 polyphenol trong 12 cao chiết Actisô cũng cho kết quả tương tự với tổng mono-CQA (0,48 - 4,24 %); tổng di-CQA (0,03 - 0,45 %); tổng flavonoid (0,03 - 0,52 %). Kết quả nghiên cứu của luận án cũng cho thấy các chế phẩm trên thị trường trong và ngoài nước có tổng mono-CQA (0,04 - 3,86 %), tổng di-CQA (0,02 - 1,60 %), và tổng flavonoid (0,02 - 1,87 %). Trong đó, tổng 2 flavonoid này trong một số chế phẩm nước ngoài **N.CP1,4,7** (với nhãn “premium”) là 1,09 - 1,81 % và 3 lô chế phẩm nghiên cứu (khoảng 1,24 - 1,87 %) có hàm lượng cao hơn gấp 2 lần so với chế phẩm định lượng bởi Häusler M. Đáng chú ý, trong nghiên cứu của luận án cũng cho thấy phần lớn các chế phẩm trên thị trường đều có tổng các di-CQA tương đương với công bố của Häusler M., riêng 3 lô chế phẩm của nghiên cứu (**NC.CP17-19**) có hàm lượng tổng di-CQA vượt trội (2,14 - 3,58 %), đặc biệt là hàm lượng cynarin của 3 lô chế phẩm nghiên cứu đạt 1,66 - 2,61 % so với chế phẩm thị trường là 0,01 - 0,92 %. Trong đó, chỉ có **N.CP1** được sản xuất tại Mỹ có nhãn “premium” có hàm lượng cao nhất (0,92 %) trong số các chế phẩm thu thập. Trong khi, các chế phẩm trong nước chỉ có cynarin từ 0,01 - 0,29 %. Điều đó cho thấy, việc nghiên cứu và kiểm soát từ khâu chọn giống đến trồng trọt và chiết xuất đều rất quan trọng để tạo ra các chế phẩm Actisô chất lượng cao. Do đó, các chế phẩm nghiên cứu của luận án không chỉ có hàm lượng cynarin cao mà polyphenol toàn phần cũng cao hơn so với một số chế phẩm thu thập trên thị trường, đặc biệt là 1 số chế phẩm uy tín của nước ngoài như **N.CP1** (Mỹ), **N.CP3-4** (Chophytol mua tại Pháp và Việt Nam); **N.CP6-7** (Đức).

Đánh giá về chất lượng của 1 đơn vị chế phẩm (viên/ống uống), mặc dù nhiều nghiên cứu bao gồm các thử nghiệm trên người đã được tiến hành để làm sáng tỏ các hoạt động dược lý của các chế phẩm Actisô, nhưng vẫn còn rất ít thông tin về liều dùng cần thiết của các hợp chất riêng lẻ trong chế phẩm. Ủy ban Châu Âu đề nghị liều hàng ngày của chế phẩm Actisô phải đạt tối thiểu 12 mg acid caffeoylquinic ¹⁵⁷ trong khi cơ quan quản lý Brazil khuyến cáo lượng tiêu thụ hàng ngày từ 24 đến 48 mg CQA ¹⁵⁷.

Theo kết quả hiện tại, phần lớn các chế phẩm nước ngoài đều đáp ứng yêu cầu tối thiểu theo Châu Âu, ngoại trừ 2 chế phẩm (**N.CP2** và **8**). Ngược lại 6 chế phẩm trong nước qua khảo sát cho thấy chỉ có 1 chế phẩm (**V.CP14**) đạt yêu cầu. Tuy nhiên, đối với 3 lô của chế phẩm nghiên cứu có hàm lượng tổng acid caffeoylquinic (TCQ) rất cao 13,59 - 21,43 mg/viên với liều uống đề nghị là 2 - 3 viên/ngày. Trong số các chế phẩm khảo sát, chế phẩm **N.CP1** (Mỹ) với nhãn “premium” có hàm lượng cao nhất với acid chlorogenic (7,45 mg/viên), cynarin (4,6 mg/viên) và TCQ (27,29 mg/viên), liều khuyến cáo 1 viên/ngày. Đối với 3 lô của chế phẩm nghiên cứu (**NC.CP1-3**) có hàm lượng acid chlorogenic (3,06 - 4,60 mg/viên); cynarin (3,32 - 5,22 mg/viên) và TCQ (13,59 - 21,43 mg/viên). Mặc dù hàm lượng acid chlorogenic và acid tổng caffeoylquinic của viên chế phẩm nghiên cứu thấp hơn so với **N.CP1** nhưng do hàm lượng cao chiết trong viên nghiên cứu của luận án chỉ chứa 200 mg cao Actisô, trong khi **N.CP1** có chứa 500 mg cao. Do đó, có thể thấy cao chiết Actisô bán thành phẩm của luận án sản xuất có hàm lượng các thành phần này cao hơn chế phẩm **N.CP1**. Vì vậy, cao chiết Actisô chuẩn hóa của luận án cho thấy đạt chất lượng cao nên có thể giảm được nguyên liệu sản xuất giúp thuận tiện hơn trong việc xây dựng công thức bào chế cho chế phẩm viên nén hoặc viên nang nhưng vẫn đảm bảo sản phẩm đạt chất lượng cao. Những khác biệt được tìm thấy trong thành phần hóa học trong các chế phẩm có thể là do thời điểm thu hoạch, khí hậu và phương pháp chiết xuất. Do đó, điều quan trọng là phải thiết lập tiêu chuẩn hóa các cao chiết phù hợp về tính an toàn và hiệu quả. Điều này rõ ràng rất quan trọng vì qua nghiên cứu đã chứng minh acid chlorogenic và cynarin làm tăng dòng chảy của mật lên tương ứng là 10 và 20 % tùy theo liều. Tác dụng chống oxy hóa và bảo vệ gan của cynarin cũng đã được chứng minh là mạnh hơn so với tác dụng của acid chlorogenic, được cho là do chúng có nhiều hơn 1 gốc acid caffeic có liên quan về mặt dược lý. Do đó, hàm lượng cao của acid di-caffeoylquinic đặc biệt là cynarin luôn được mong muốn trong các cao chiết Actisô. Vì vậy, có thể thấy sản phẩm nghiên cứu của luận án có tiềm năng lớn về nguồn nguyên liệu cũng như tính ứng dụng thực tiễn, đồng thời là một sản phẩm có ý nghĩa trong việc chăm sóc sức khỏe cộng đồng từ nguồn nguyên liệu sẵn có trong nước.

KẾT LUẬN

Các kết quả thu được của luận án được tóm tắt như sau:

1. Nghiên cứu thành phần hóa học:

- Phân lập và xác định cấu trúc 20 hợp chất trong lá Actisô bằng phổ MS và NMR.
- Phân lập 3 chất chính (cynarin - CY, acid chlorogenic - AC và cynarosid - CR) với khối lượng từ 450 - 2000 mg) làm nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu.

2. Nghiên cứu phương pháp kiểm nghiệm:

- Thiết lập 3 chất đối chiếu gồm CY, AC và CR bằng phương pháp định lượng HPLC-PDA so với chuẩn sơ cấp, hàm lượng của 3 CĐC từ 92 - 94 %.
- Xây dựng 3 quy trình định lượng các thành phần chính trong lá và cao Actisô.
- Đề xuất 2 dự thảo về tiêu chuẩn lá và cao khô Actisô cho DĐVN VI
- Ứng dụng quy trình định lượng để so sánh hàm lượng 12 polyphenol chính trong các cao chiết từ các bộ phận của 2 giống cây Actisô.
- Theo dõi động thái tích lũy hàm lượng acid chlorogenic trong lá Actisô theo thời gian thu hái trong năm và hàm lượng cynarin trong các cao chiết tương ứng.
- So sánh hàm lượng 12 polyphenol trong 10 chế phẩm trà túi lọc trên thị trường trong nước và 16 chế phẩm từ cao chiết Actisô được mua ở Việt Nam, Mỹ, Pháp và Đức.

3. Nghiên cứu tác dụng sinh học: So sánh tác dụng chống oxy hóa bằng thử nghiệm DPPH và MDA đối với 9 polyphenol phân lập và 26 cao chiết từ các bộ phận rễ, thân, gân lá, hoa của 2 giống Actisô.

4. Nghiên cứu chiết xuất cao chuẩn hóa:

- Nghiên cứu phương pháp chiết xuất làm tăng hàm lượng cynarin và tổng acid caffeoylquinic trong nguyên liệu Actisô.
- Nâng cỡ lô chiết xuất cao Actisô ở quy mô lớn (500 kg phần lá/mè), sản xuất thành công cao chiết nguyên liệu Actisô với hàm lượng cynarin và acid chlorogenic cao.
- Đã xây dựng TCCS cho cao chiết Actisô.

5. Nghiên cứu bào chế: Áp dụng thành công sản xuất viên nén bao phim chứa 200 mg cao Actisô ở quy mô 15.000 viên/lô.

Tóm tắt các đóng góp mới của luận án:

- Lần đầu cung cấp quy trình phân lập đồng thời 3 CDC (CY, AC, CR) đạt hiệu suất cao, quy trình đơn giản dễ thực hiện với điều kiện nghiên cứu trong nước.
- Lần đầu công bố về động thái tích lũy hàm lượng acid chlorogenic trong lá Actisô theo thời gian thu hái và hàm lượng cynarin trong các cao chiết tương ứng của chúng.
- Lần đầu công bố sự khác biệt về 12 thành phần polyphenol chính và hoạt tính chống oxy hóa của 2 giống Actisô trồng phổ biến tại Đà Lạt (giống xanh và tím).
- Lần đầu công bố về sự khác biệt 12 thành phần polyphenol chính của các bộ phận dùng (lá, gân lá, thân, rễ, hoa) của 2 giống cây Actisô.
- Lần đầu công bố so sánh hàm lượng 12 polyphenol chính của các chế phẩm Actisô trong nước so với chế phẩm nước ngoài.
- Lần đầu tiên công bố so sánh HTCO trên 2 mô hình (DPPH và MDA) của 9 hợp chất tinh khiết phân lập từ lá Actisô.
- Lần đầu công bố so sánh HTCO trên 2 mô hình (DPPH và MDA) của các cao chiết (còn và nước) của các bộ phận dùng của 2 giống cây Actisô Đà Lạt.
- Lần đầu sản xuất thành công cao chiết Actisô chuẩn hóa và viên nén bao phim từ cao Actisô với hàm lượng acid chlorogenic và cynarin đạt chất lượng cao.

Như vậy, luận án đã cung cấp một sản phẩm có ý nghĩa trong việc chăm sóc sức khỏe cộng đồng từ nguồn nguyên liệu sẵn có trong nước. Do đó, quy trình này sẽ hướng đến việc chuyển giao công nghệ cho các cơ sở sản xuất trong nước cũng như hướng đến việc xuất khẩu sang thị trường quốc tế.

KIẾN NGHỊ

- Nghiên cứu tối ưu hóa quy trình chiết xuất cao Actisô sử dụng phương pháp bề mặt đáp ứng (RSM – Response Surface Methodology).
- Khảo sát hàm lượng acid chlorogenic và cynarin trong lá và cao chiết Actisô ở vùng trồng khác để đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cho ĐĐVN VI.
- Đánh giá hàm lượng CY trong “thân xanh” cũng như trong “thân đen” ở các vùng trồng khác nhằm khai thác tiềm năng của BPD này trong sản xuất chế phẩm.

DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN

Đề tài, dự án khoa học công nghệ

1. Phạm Đông Phương, Nguyễn Thiện Hải (Chủ nhiệm), **Nguyễn Thị Ánh Nguyệt** (Thành viên chính), Võ Ngọc Linh Giang, Lê Văn Huân (Năm 2014 - 2016), “Nghiên cứu sản xuất bán thành phẩm (cao chiết chuẩn hóa) và một vài chế phẩm từ Actisô Đà Lạt có hàm lượng cynarin và acid chlorogenic tương đương với chế phẩm của nước ngoài (Chophytol) đang lưu thông ở thị trường trong nước”, *Đề tài Sở KH&CN TP.HCM*.

Tạp chí trong nước

1. **Nguyễn Thị Ánh Nguyệt**, Phạm Phương Chi, Nguyễn Thị Duyên Anh, Phạm Đông Phương (2016), Phân lập và thiết lập chất chuẩn cynarin, *Tạp chí Dược học*, 483(56), tr. 37-42.
2. **Nguyễn Thị Ánh Nguyệt**, Lê Phan Kim Trang, Phạm Đông Phương (2016), “Phân lập và thiết lập chất chuẩn acid chlorogenic”, *Tạp chí Dược học*, 56(11), tr. 22-27.
3. **Nguyễn Thị Ánh Nguyệt**, Lê Phan Kim Trang, Phạm Đông Phương (2017), “Phân lập và thiết lập chất chuẩn cynarosid”, *Tạp chí Dược học*, 57(8), tr. 32-37.
4. **Nguyễn Thị Ánh Nguyệt**, Hồ Nguyễn Cao Nguyên, Phạm Đông Phương (2017), Phân lập luteolin và acid caffeic trong lá Actisô (*Cynara scolymus* L. Asteraceae), *Tạp chí Y Học Tp. HCM*, 21(1), tr. 602-606.
5. **Nguyễn Thị Ánh Nguyệt**, Vũ Thị Thanh Tuyền, Đỗ Thị Hồng Tươi, Phạm Đông Phương (2019), Phân lập và đánh giá hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* của một số dẫn xuất acid mono-caffeoylquinic từ lá Actisô, *Tạp chí Dược liệu*, 24(2), 74-80.
6. **Nguyễn Thị Ánh Nguyệt**, Lê Minh Tâm, Phạm Đông Phương (2019), Phân lập một số đồng phân của cynarin từ lá Actisô (*Cynara scolymus* L.), *Tạp chí Dược học*, 524(59), 39-44.

Báo cáo toàn văn đăng trong kỷ yếu hội nghị KHCN quốc gia và quốc tế

7. **Nguyen Thi Anh Nguyet**, Đào Thi Thoai Truc, Pham Dong Phuong (2015), Simultaneous qualification of chlorogenic acid, cynarin, scolymoside, cynaroside from Artichoke leaves by HPLC-PDA, *The 1st International Conference on Pharmacy Education and Research Network of Asean, Thailand, Proceeding*, p.247-252.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Gostin AI, Waisundara VY. Edible flowers as functional food: A review on artichoke (*Cynara cardunculus* L.). *Trends Food Sci Technol.* 2019;86:381-391. doi:10.1016/j.tifs.2019.02.015.
2. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Artichoke. FAOSTAT website. Updated May 13, 2022. July 1, 2022. <https://www.fao.org/faostat/en/>.
3. Nguyễn Ngọc Hạnh, Nguyễn Đông Trú, Phùng Văn Trung, et al. Khảo sát thành phần hóa học của hoa Actisô (*Cynara scolymus* L.) trồng tại Đà Lạt và hoạt tính kháng oxy hóa. Toàn văn: Hội nghị khoa học và Công nghệ hóa hữu cơ toàn quốc lần thứ 4. *Hội Hóa học Việt nam.* 2007:382-387.
4. Nguyễn Thị Kim Hạnh, Trần Nguyên Khanh, Tân Hoàng. Ly trích cynarin trong lá cây Actisô *Cynara scolymus*. Toàn văn: Hội nghị khoa học và Công nghệ hóa hữu cơ toàn quốc lần thứ 2. *Hội Hóa học Việt nam.* 2001:314-316.
5. Nguyễn Văn Đậu, Trần Thị Hiếu, Nguyễn Thu Thủy. Nghiên cứu hóa thực vật cây Actisô (*Cynara scolymus* L.). *Hóa học thế kỷ XXI vì sự phát triển bền vững.* 2005;3(6):111-115.
6. Mena-García A, Ruiz-Matute AI, Soria AC, et al. A multi-analytical strategy for evaluation of quality and authenticity of artichoke food supplements for overweight control. *J Chromatogr A.* 2021;1647:462102. doi:10.1016/j.chroma.2021.462102.
7. Schütz K, Kammerer D, Carle R, et al. Identification and quantification of caffeoylquinic acids and flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads, juice, and pomace by HPLC-DAD-ESI/MSⁿ. *J Agric Food Chem.* 2004;52(13):4090-4096. doi:10.1021/jf049625x.
8. Carneiro A, Barros YY, Freitas MM, et al. Identification and quantification of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. tablets and capsules. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2017;11(6):94-102. doi:10.5897/AJPP2016.4718.
9. *Cynara scolymus* L. *Catalogue of Life.* Updated March 21. May 20, 2022. <https://www.catalogueoflife.org/data/taxon/339BH>.
10. Võ Văn Chi. *Từ điển thực vật thông dụng.* 1st ed. NXB Khoa học và Kỹ thuật; 2004
11. Reveal JL. Summary of recent systems of angiosperm classification. *Kew Bull.* 2011;66(1):5-48. doi:10.1007/s12225-011-9259-y.
12. *Cynara.* *The Plant List.* May 20, 2022. <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=cynara>
13. Sonnante G, Hammer K, Pignone D. From the cradle of agriculture a handful of lentils: History of domestication. *Rend Lincei Sci Fis Nat.* 2009/04/01 2009;20(1):21-37. doi:10.1007/s12210-009-0002-7.
14. Falco B, Incerti G, Amato M, et al. Artichoke: Botanical, agronomical, phytochemical, and pharmacological overview. *Phytochemistry reviews.* 2015;14(6):993-1018. doi:10.1007/s11101-015-9428-y.

15. Lim TK. *Edible medicinal and non-medicinal plants*. 7th ed. Springer; 2012.
16. Sonnante G, Pignone D, Hammer K. The Domestication of Artichoke and Cardoon: From Roman Times to the Genomic Age. *Ann Bot.* 2007;100:1095-100. doi:10.1093/aob/mcm127.
17. Ngô Văn Thu, Trần Hùng. *Dược liệu học*. 1st ed. NXB Y học; 2011
18. Viện Dược liệu. *Cây thuốc và động vật làm thuốc ở Việt Nam*. NXB Khoa học & Kỹ thuật; 2004.
19. Võ Văn Chi. *Từ điển cây thuốc Việt Nam*. 1st ed. NXB Y học; 2012.
20. *Cynara scolymus* L. *Plants For A Future*. Updated March 14. May 9, 2021. <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Cynara+scolymus>.
21. Riahi J, Nicoletto C, Bouzaein G, et al. Effect of Vegetative Propagation Materials on Globe Artichoke Production in Semi-Arid Developing Countries: Agronomic, Marketable and Qualitative Traits. *Agronomy*. 2017;7(4):65. doi:10.3390/agronomy7040065.
22. *Artichoke leaf*. iStock. March 5, 2021. <https://www.istockphoto.com/vi/search/2image?>
23. *Artichoke*. LiveNatural. March 5, 2019. <https://www.livenatural.com/crop.search/3image.plant>.
24. Curt M, Gominho J, González J, et al. *Cynara cardunculus* as a multiuse crop. Springer Cham. *The Globe Artichoke Genome*. 1st ed. 2019:65-98. doi:10.1016/J.BIOMBIOE.2018.01.001.
25. Rottenberg A, Zohary D. The wild ancestry of the cultivated artichoke. *Genet Resour Crop Evol.* 1996;43(1):53-58. doi:10.1007/BF00126940.
26. Menin B, Comino C, Portis E, et al. Genetic mapping and characterization of the globe artichoke (+)-germacrene A synthase gene, encoding the first dedicated enzyme for biosynthesis of the bitter sesquiterpene lactone cynaropicrin. *Plant Sci.* 2012;190:1-8. doi:10.1016/j.plantsci.2012.03.006.
27. Lanteri S, Portis E. Globe Artichoke and Cardoon. Prohens J, Nuez F, eds. *Handbook of Plant Breeding*. Springer; 2008:49-74. https://doi.org/10.1007/978-0-387-30443-4_2.
28. Sonnante G, De Paolis A, Lattanzio V, et al. Genetic variation in wild and cultivated artichoke revealed by RAPD markers. *Genet Resour Crop Evol.* 2002;49(3):247-252. doi:10.1023/A:1015574627621.
29. Hoàng Đắc Khải, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Quang Vinh, et al. Cải thiện khả năng ra rễ *in vitro* và thích nghi ở giai đoạn vườn ươm của cây Artichoke "Giống tím" và cây Artichoke "Giống xanh". *Tạp chí Công nghệ Sinh học*. 2021;19(1):129-145.
30. Minutillo SA, Mascia T, Gallitelli D. A DNA probe mix for the multiplex detection of ten artichoke viruses. *Eur J Plant Pathol.* 2012;134(3):459-465. doi:10.1007/s10658-012-0032-3.
31. Hoàng Đắc Khải, Hoàng Thanh Tùng, Nguyễn Quang Vinh, et al. Tỷ lệ nảy mầm, khả năng sinh trưởng và sự tích lũy hoạt chất của 5 giống Actisô nhập nội (*Cynara scolymus* L.)

- trồng tại tỉnh Lâm Đồng. *Tạp chí Khoa học & Công nghệ Việt Nam*. 2021;64(2):37-42.
32. Farag MA, El-Ahmady SH, Elian FS, et al. Metabolomics driven analysis of artichoke leaf and its commercial products via UHPLC–q-TOF-MS and chemometrics. *Phytochemistry*. 2013;95:177-187. doi:10.1016/j.phytochem.2013.07.003.
 33. Lim TK. *Edible Medicinal And Non-Medicinal Plants*. 1th ed. Springer Dordrecht. 2013.
 34. Yang M, Ma Y, Wang Z, et al. Phenolic constituents, antioxidant and cytoprotective activities of crude extract and fractions from cultivated artichoke inflorescence. *Ind Crops Prod*. 2020;143:111433. doi:10.1016/j.indcrop.2019.05.082.
 35. Portis E, Acquadro A, Lanteri S. *The Globe Artichoke Genome*. Springer; 2019.
 36. Lombardo S, Pandino G, Mauromicale G, et al. Influence of genotype, harvest time and plant part on polyphenolic composition of globe artichoke [*Cynara cardunculus* L. var. *scolymus* (L.) Fiori]. *Food Chem*. 2010;119(3):1175-1181. doi:10.1016/j.foodchem.2009.08.033.
 37. Lattanzio V, Kroon PA, Linsalata V, et al. Globe artichoke: A functional food and source of nutraceutical ingredients. *Journal of functional foods* 2009;1(2):131-144. doi:10.1016/j.jff.2009.01.002
 38. Häusler M, Ganzera M, Abel G, et al. Determination of caffeoylquinic acids and flavonoids in *Cynara scolymus* L. by high performance liquid chromatography. *Chromatographia*. 2002;56(7-8):407-411. doi:10.1007/BF02492002.
 39. Orlovskaya TV, Luneva IL, Chelombit'ko VA. Chemical composition of *Cynara scolymus* leaves. *Chem Nat Compd*. 2007;43(2):239-240. doi:10.1007/s10600-007-0093-2.
 40. Panizzi L, Scarpati ML. Constitution of cynarine, the active principle of the artichoke. *Nature*. 1954;174(4440):1062-1062. doi:10.1038/1741062a0.
 41. Towers G, Abeysekera B. Cell wall hydroxycinnamate esters as UV-A receptors in phototropic responses of higher plants - a new hypothesis. *Phytochemistry*. 1984;23(5):951-952. doi:10.1016/S0031-9422(00)82589-3.
 42. Ancora G. Globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Crops I*. Springer; 1986:471-519.
 43. Clifford MN, Jaganath IB, Ludwig IA, et al. Chlorogenic acids and the acyl-quinic acids: Discovery, biosynthesis, bioavailability and bioactivity. *Nat Prod Rep*. 2017;34(12):1391-1421. doi:10.1039/C7NP00030H.
 44. World Health Organization. *WHO monographs on selected medicinal plants*. 4th ed. 2009.
 45. Fritsche J, Beindorff CM, Dachtler M, et al. Isolation, characterization and determination of minor artichoke (*Cynara scolymus* L.) leaf extract compounds. *Eur Food Res Technol*. 2002;215(2):149-157. doi:10.1007/s00217-002-0507-0.
 46. Jun NJ, Jang KC, Kim SC, et al. Radical scavenging activity and content of cynarin (1, 3-dicaffeoylquinic acid) in Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Appl Biol Chem*. 2007;50(4):244-248. doi:https://www.koreascience.or.kr/article/JAKO200706717341493.page

47. Tong J, Mo QG, Ma BX, et al. The protective effects of *Cichorium glandulosum* seed and cynarin against cyclophosphamide and its metabolite acrolein-induced hepatotoxicity *in vivo* and *in vitro*. *Food Funct*. 2017;8(1):209-219. doi:10.1039/C6FO01531J.
48. Topal M, Gocer H, Topal F, et al. Antioxidant, antiradical, and anticholinergic properties of cynarin purified from the Illyrian thistle (*Onopordum illyricum* L.). *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(2):266-275. doi:10.3109/14756366.2015.1018244.
49. Xia N, Pautz A, Wollscheid U, et al. Artichoke, cynarin and cyanidin downregulate the expression of inducible nitric oxide synthase in human coronary smooth muscle cells. *Molecules*. 2014;19(3):3654-3668. doi:10.3390/molecules19033654.
50. Wichtl M. *Herbal drugs and phytopharmaceuticals: A handbook for practice on a scientific basis*. 3rd ed. Medpharm GmbH Scientific; 2004, May 14, 2021. <https://doi.org/10.1002/ffj.2730100512>.
51. Ferracane R, Pellegrini N, Visconti A, et al. Effects of different cooking methods on antioxidant profile, antioxidant capacity, and physical characteristics of artichoke. *J Agric Food Chem*. 2008;56(18):8601-8608. doi:10.1021/jf800408w.
52. Lutz M, Henríquez C, Escobar M. Chemical composition and antioxidant properties of mature and baby artichokes (*Cynara scolymus* L.), raw and cooked. *J Food Compos Anal*. 2011;24(1):49-54. doi:10.1016/j.jfca.2010.06.001.
53. Schütz K, Muks E, Carle R, et al. Quantitative determination of phenolic compounds in artichoke-based dietary supplements and pharmaceuticals by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem*. 2006;54(23):8812-8817. doi:10.1021/jf062009b.
54. Abu-Reidah IM, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, et al. Extensive characterisation of bioactive phenolic constituents from globe artichoke (*Cynara scolymus* L.) by HPLC–DAD–ESI–QTOF–MS. *Food Chemistry*. 2013;141(3):2269-2277. doi:10.1016/j.foodchem.2013.04.066.
55. Sánchez-Rabaneda F, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, et al. Identification of phenolic compounds in artichoke waste by high-performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2003;1008(1):57-72. doi:10.1016/S0021-9673(03)00964-6.
56. Lattanzio V, van Sumere CF. Changes in phenolic compounds during the development and cold storage of artichoke (*Cynara scolymus* L.) heads. *Food Chem*. 1987;24(1):37-50. doi:10.1016/0308-8146(87)90082-3.
57. Negro D, Montesano V, Grieco S, et al. Polyphenol compounds in artichoke plant tissues and varieties. *J Food Sci*. 2012;77(2):244-252. doi:10.1111/j.1750-3841.2011.02531.x.
58. Cravotto G, Nano GM, Binello A, et al. Chemical and biological modification of cynaropicrin and grosheimin: A structure - bitterness relationship study. *J Sci Food Agric*. 2005;85(10):1757-1764. doi:10.1002/jsfa.2180.
59. Eljounaidi K, Comino C, Moglia A, et al. Accumulation of cynaropicrin in globe artichoke and localization of enzymes involved in its biosynthesis. *Plant Science*. 2015;239:128-

136. doi:10.1016/j.plantsci.2015.07.020.

60. Noldin VF, Cechinel Filho V, Monache FD, et al. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynara scolymus* L.(alcachofra) cultivada no Brasil. *Química nova*. 2003;26(3):331-334. doi:10.1590/S0100-40422003000300008.
61. Ramos PA, Ferro AM, Oliveira MM, et al. Biosynthesis and bioactivity of *Cynara cardunculus* L. guaianolides and hydroxycinnamic acids: A genomic, biochemical and health-promoting perspective. *Phytochemistry Rev.* 2019;18(2):495-526. doi:10.1007/s11101-019-09604-4.
62. Rouphael Y, Bernardi J, Cardarelli M, et al. Phenolic compounds and sesquiterpene lactones profile in leaves of nineteen artichoke cultivars. *J Agric Food Chem.* 2016;64(45):8540-8548. doi:10.1021/acs.jafc.6b03856
63. Shimoda H, Ninomiya K, Nishida N, et al. Anti-hyperlipidemic sesquiterpenes and new sesquiterpene glycosides from the leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.): Structure requirement and mode of action. *Bioorg Med Chem Lett.* 2003;13(2):223-228. doi:10.1016/S0960-894X(02)00889-2.
64. Barbetti P, Chiappini I, Fardella G, et al. Grosulfemin and new related guaianolides from *Cynara scolymus* L. *Nat Prod Res.* 1993;3(1):21-30. doi:10.1080/10575639308043833.
65. Shimizu S, Ishihara N, Umehara K, et al. Sesquiterpene glycosides and saponins from *Cynara cardunculus* L. *Chem Pharm Bull.* 1988;36(7):2466-2474. doi:10.1248/cpb.36.2466.
66. Buttery RG, Guadagni DG, Ling LC. Volatile aroma components of cooked artichoke. *J Agric Food Chem.* 1978;26(4):791-793. doi:10.1021/jf60218a041.
67. MacLeod AJ, Pieris NM, Troconis NG. Aroma volatiles of *Cynara scolymus* and *Helianthus tuberosus*. *Phytochemistry.* 1982;21(7):1647-1651. doi:10.1016/S0031-9422(82)85033-4.
68. El Sohaimy S. A. The effect of cooking on the chemical Composition of Artichoke (*Cynara scolymus* L.). *AJFST.* 2013;3(8):182-187. doi:10.14303/ajfst.2013.037.
69. López-Molina D, Navarro-Martínez MD, Rojas-Melgarejo F, et al. Molecular properties and prebiotic effect of inulin obtained from artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Phytochemistry.* 2005;66(12):1476-1484. doi:10.1016/j.phytochem.2005.04.003.
70. Salekzamani S, Ebrahimi-Mameghani M, Khatereh Rezazadeh J. The antioxidant activity of artichoke (*Cynara scolymus*): A systematic review and meta-analysis of animal studies. *Phytotherapy Res.* 2019;33(1):55-71. doi:10.1002/ptr.6213.
71. Pistón M, Machado I, Branco CS, et al. Infusion, decoction and hydroalcoholic extracts of leaves from artichoke (*Cynara cardunculus* L. subsp. *cardunculus*) are effective scavengers of physiologically relevant ROS and RNS. *Int Food Res J.* 2014;64:150-156. doi:10.1016/j.foodres.2014.05.078.
72. Leonarduzzi G, Sottero B, Poli G. Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: The antioxidant concept revisited. *Pharmacol Ther.*

2010;128(2):336-374. doi:10.1016/j.pharmthera.2010.08.003.

73. Brown JE, Rice-Evans CA. Luteolin-rich artichoke extract protects low density lipoprotein from oxidation *in vitro*. *Free Radic Res.* 1998;29(3):247-255. doi:10.1080/10715769800300281.
74. Jimenez-Escrig A, Dragsted LO, Daneshvar B, et al. *In vitro* antioxidant activities of edible artichoke (*Cynara scolymus* L.) and effect on biomarkers of antioxidants in rats. *J Agric Food Chem.* 2003;51(18):5540-5545. doi:10.1021/jf030047e.
75. Rezazadeh K, Rahmati-Yamchi M, Mohammadnejad L, et al. Effects of artichoke leaf extract supplementation on metabolic parameters in women with metabolic syndrome: Influence of TCF7L2-rs7903146 and FTO-rs9939609 polymorphisms. *Phytotherapy Res.* 2018;32(1):84-93. doi:10.1002/ptr.5951.
76. Skarpańska-Stejnborn A, Pilaczynska-Szczesniak L, Basta P, et al. The influence of supplementation with artichoke (*Cynara scolymus* L.) extract on selected redox parameters in rowers. *Int J Sport Nutr Exerc Metab.* 2008;18(3). doi:10.1123/IJNEM.18.3.313.
77. Ben Salem M, Affes H, Athmouni K, et al. Chemicals compositions, antioxidant and anti-inflammatory activity of *Cynara scolymus* leaves extracts, and analysis of major bioactive polyphenols by HPLC. *eCAM.* 2017;2017. doi:10.1155/2017/4951937.
78. El-Boshy M, Ashshi A, Gaith M, et al. Studies on the protective effect of the artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against cadmium toxicity-induced oxidative stress, hepatorenal damage, and immunosuppressive and hematological disorders in rats. *ESPR.* 2017;24(13):12372-12383. doi:10.1007/s11356-017-8876-x.
79. El Morsy EM, Kamel R. Protective effect of artichoke leaf extract against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. *Pharm Biol.* 2015;53(2):167-173. doi:10.3109/13880209.2014.913066.
80. Gebhardt R. Antioxidative and protective properties of extracts from leaves of the artichoke (*Cynara scolymus* L.) against hydroperoxide-induced oxidative stress in cultured rat hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1997;144(2):279-286. doi:10.1006/taap.1997.8130.
81. Heidarian E, Rafieian-Kopaei M. Protective effect of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against lead toxicity in rat. *Pharm Biol.* 2013;51(9):1104-1109. doi:10.3109/13880209.2013.777931.
82. Juzyszyn Z, Czerny B, Pawlik A, et al. The effect of artichoke (*Cynara scolymus* L.) extract on ROS generation in HUVEC cells. *Phytotherapy Res.* 2008;22(9):1159-1161. doi:10.1002/ptr.2385.
83. Mehmetçik G, Özdemirler G, Koçak-Toker N, et al. Effect of pretreatment with artichoke extract on carbon tetrachloride-induced liver injury and oxidative stress. *Exp Toxicol Pathol.* 2008;60(6):475-480. doi:10.1016/j.etp.2008.04.014.

84. Miccadei S, Di Venere D, Cardinali A, et al. Antioxidative and apoptotic properties of polyphenolic extracts from edible part of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on cultured rat hepatocytes and on human hepatoma cells. *Nutr Cancer*. 2008;60(2):276-283. doi:10.1080/01635580801891583.
85. Miláčková I, Kapustová K, Mučaji P, et al. Artichoke leaf extract inhibits AKR1B1 and reduces NF- κ B activity in human leukemic cells. *Phytotherapy Res*. 2017;31(3):488-496. doi:10.1002/ptr.5774.
86. Pérez-García F, Adzet T, Cañigueral S. Activity of artichoke leaf extract on reactive oxygen species in human leukocytes. *Free Radic Res*. 2000;33(5):661-665. doi:10.1080/10715760000301171.
87. Rahimuddin SA, Khoja SM, Zuhair MM, et al. Inhibition of lipid peroxidation in UVA-treated skin fibroblasts by luteolin and its glucosides. *Eur J Lipid Sci Technol*. 2007;109(7):647-655. doi:10.1002/ejlt.200700012.
88. Zapolska-Downar D, Zapolski-Downar A, Naruszewicz M, et al. Protective properties of artichoke (*Cynara scolymus*) against oxidative stress induced in cultured endothelial cells and monocytes. *Life Sci*. 2002;71(24):2897-2908. doi:10.1016/S0024-3205(02)02136-7.
89. Wang M, Simon JE, Tadmor Y, et al. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J Agric Food Chem*. 2003;51(3):601-608. doi:10.1021/jf020792b.
90. Elsayed EG, Abdou AG, Maher TD, et al. Hepatoprotective effect of artichoke leaf extracts in comparison with silymarin on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *J Immunoassay Immunochem*. 2020;41(1):84-96. doi:10.1080/15321819.2019.1692029.
91. Heidarian E, Soofiniya Y. Hypolipidemic and hypoglycemic effects of aerial part of *Cynara scolymus* in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Med Plant Res*. 2011;5(13):2717-2723. doi:http://eprints.skums.ac.ir/id/eprint/3097.
92. Colak E, Ustuner MC, Tekin N, et al. The hepatocurative effects of *Cynara scolymus* L. leaf extract on carbon tetrachloride-induced oxidative stress and hepatic injury in rats. *SpringerPlus*. 2016;5(1):1-9. doi:10.1186/s40064-016-1894-1.
93. Adzet T, Camarasa J, Laguna JC. Hepatoprotective activity of polyphenolic compounds from *Cynara scolymus* against CCl₄ toxicity in isolated rat hepatocytes. *J Nat Prod*. 1987;50(4):612-617. doi:10.1021/np50052a004.
94. Xiang T, Xiong QB, Ketut AI, et al. Studies on the hepatocyte protective activity and the structure-activity relationships of quinic acid and caffeic acid derivatives from the flower buds of *Lonicera bournei*. *Planta medica*. Jun 2001;67(4):322-325. doi:10.1055/s-2001-14337.
95. Rodriguez TS, Giménez DG, De PR. Choleretic activity and biliary elimination of lipids and bile acids induced by an artichoke leaf extract in rats. *Phytomedicine*. 2002;9(8):687-693. doi:10.1078/094471102321621278.

96. Preziosi P, Loscalzo B, Marmo E. Comparison of choleretic effects of CYN and Na-dehydrocholate. *Experientia*. 1959;15(4):135-138. doi:10.1007/BF02165524.
97. Laufs U, Gertz K, Huang P, et al. Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke*. 2000;31(10):2442-2449. doi:10.1161/01.STR.31.10.2442.
98. Endres M, Laufs U, Huang Z, et al. Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *PNAS*. 1998;95(15):8880-8885. doi:10.1073/pnas.95.15.8880.
99. Amin HS, Stagliano NE, Yamada M, et al. Mevastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduces stroke damage and upregulates endothelial nitric oxide synthase in mice. *Stroke*. 2001;32(4):980-986. doi:10.1161/01.STR.32.4.980.
100. Matsumoto T, Nakashima S, Nakamura S, et al. Inhibitory effects of cynaropicrin and related sesquiterpene lactones from leaves of artichoke (*Cynara scolymus* L.) on induction of iNOS in RAW264. 7 cells and its high-affinity proteins. *J Nat Med*. 2021;75(2):381-392. doi:10.1007/s11418-020-01479-6.
101. Qiang Z, Lee SO, Ye Z, et al. Artichoke extract lowered plasma cholesterol and increased fecal bile acids in Golden Syrian hamsters. *Phytotherapy Res*. 2012;26(7):1048-1052. doi:10.1002/ptr.3698.
102. Lii CK, Lei YP, Yao HT, et al. *Chrysanthemum morifolium* Ramat. reduces the oxidized LDL-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin in human umbilical vein endothelial cells. *J Ethnopharmacol*. 2010;128(1):213-220. doi:10.1016/j.jep.2010.01.018.
103. Ishida K, Kojima R, Tsuboi M, et al. Effects of artichoke leaf extract on acute gastric mucosal injury in rats. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(2):223-229. doi:10.1248/bpb.33.223.
104. Fratianni F, Pepe R, Nazzaro F. Polyphenol composition, antioxidant, antimicrobial and quorum quenching activity of the “Carciofo di Montoro” (*Cynara cardunculus* var. *scolymus*) Global artichoke of the Campania region, southern Italy. *Food Sci Nutr*. 2014;5(21):2053. doi:10.4236/fns.2014.521217.
105. Sabater C, Blanco-Doval A, Margolles A, et al. Artichoke pectic oligosaccharide characterisation and virtual screening of prebiotic properties using in silico colonic fermentation. *Carbohydrate Polymers*. 2021;255:117367. doi:10.1016/j.carbpol.2020.117367.
106. Emendörfer F, Emendörfer F, Bellato F, et al. Antispasmodic activity of fractions and cynaropicrin from *Cynara scolymus* on guinea-pig ileum. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(5):902-904. doi:10.1248/bpb.28.902.
107. Harris GK, Qian Y, Leonard SS, et al. Luteolin and chrysin differentially inhibit cyclooxygenase-2 expression and scavenge reactive oxygen species but similarly

- inhibit prostaglandin-E2 formation in RAW 264.7 cells. *Nutr J* 2006;136(6):1517-1521. doi:10.1093/jn/136.6.1517.
108. Wauquier F, Boutin-Wittrant L, Viret A, et al. Metabolic and anti-inflammatory protective properties of human enriched serum following artichoke leaf extract absorption: Results from an innovative *ex vivo* clinical trial. *Nutrients*. 2021;13(8):2653. doi:10.3390/nu13082653.
 109. Walker AF, Middleton RW, Petrowicz O. Artichoke leaf extract reduces symptoms of irritable bowel syndrome in a post-marketing surveillance study. *Phytotherapy research: PTR*. Feb 2001;15(1):58-61. doi:10.1002/1099-1573(200102)15:1<58::AID-PTR805>3.0.CO;2-R.
 110. Holtmann G, Adam B, Haag S, et al. Efficacy of artichoke leaf extract in the treatment of patients with functional dyspepsia: a six-week placebo-controlled, double-blind, multicentre trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;18(11-12):1099-105. doi:10.1046/j.1365-2036.2003.01767.x
 111. World Health Organization. *WHO monographs on selected medicinal plants*. 4th ed. 2006. July 20, 2021. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42052>.
 112. Rangboo V, Noroozi M, Zavoshy R, et al. The effect of artichoke leaf extract on alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase in the patients with nonalcoholic steatohepatitis. *Int J Hepatol*. 2016;2016. doi:10.1155/2016/4030476.
 113. Bundy R, Walker AF, Middleton RW, et al. Artichoke leaf extract (*Cynara scolymus*) reduces plasma cholesterol in otherwise healthy hypercholesterolemic adults: a randomized, double blind placebo controlled trial. *Phytomedicine*. 2008;15(9):668-675. doi:10.1016/j.phymed.2008.03.001.
 114. Englisch W, Beckers C, Unkauf M, et al. Efficacy of artichoke dry extract in patients with hyperlipoproteinemia. *Arzneimittelforschung*. 2000;50(03):260-265. doi:10.1055/s-0031-1300196.
 115. Gatmiri SM, Khadem E, Fakhrian T, et al. The effect of artichoke leaf extract supplementation on lipid profile of chronic kidney disease patients; a double-blind, randomized clinical trial. *J Renal Inj*. 2019;8(3):225-229. doi:10.15171/jrip.2019.42
 116. Huseini HF, Kianbakht S, Hajiaghaee R, et al. Anti-hyperglycemic and anti-hypercholesterolemic effects of Aloe vera leaf gel in hyperlipidemic type 2 diabetic patients: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Planta medica*. 2012;78(04):311-316. doi:10.1055/s-0031-1280474.
 117. Rezazadeh K, Aliashrafi S, Asghari-Jafarabadi M, et al. Antioxidant response to artichoke leaf extract supplementation in metabolic syndrome: A double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. *Clin Nutr* 2018;37(3):790-796. doi:10.1016/j.clnu.2017.03.017.
 118. Roghani-Dehkordi F, Kamkhah A. Artichoke leaf juice contains antihypertensive effect in

- patients with mild hypertension. *J Diet Suppl.* 2009;6(4):328-341. doi:10.3109/19390210903280207.
119. Rondanelli M, Giacosa A, Opizzi A, et al. Beneficial effects of artichoke leaf extract supplementation on increasing HDL-cholesterol in subjects with primary mild hypercholesterolaemia: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Int J Food Sci Nutr.* 2013;64(1):7-15. doi:10.3109/09637486.2012.700920.
 120. Rondanelli M, Giacosa A, Orsini F, et al. Appetite control and glycaemia reduction in overweight subjects treated with a combination of two highly standardized extracts from *Phaseolus vulgaris* and *Cynara scolymus*. *Phytotherapy Res.* 2011;25(9):1275-1282. doi:10.1002/ptr.3425.
 121. Shahinfar H, Bazshahi E, Amini MR, et al. Effects of artichoke leaf extract supplementation or artichoke juice consumption on lipid profile: A systematic review and dose–response meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytotherapy Res.* 2021;35(12):6607-6623. doi:10.1002/ptr.7247.
 122. Ardalani H, Jandaghi P, Meraji A, et al. The Effect of *Cynara scolymus* on blood pressure and BMI in hypertensive patients: A randomized, double-blind, placebo-controlled, clinical trial. *J Complement Med Res.* 2020;27(1):40-46. doi:10.1159/000502280.
 123. Majnooni MB, Ataee M, Bahrami G, et al. The effects of co-administration of artichoke leaf extract supplementation with metformin and vitamin E in patients with nonalcoholic fatty liver disease: A randomized clinical trial. *Phytotherapy Res.* 2021;35(11):6324-6334. doi:10.1002/ptr.7279.
 124. Panahi Y, Kianpour P, Mohtashami R, et al. Efficacy of artichoke leaf extract in non-alcoholic fatty liver disease: A pilot double-blind randomized controlled trial. *Phytotherapy Res.* 2018;32(7):1382-1387. doi:10.1002/ptr.6073.
 125. Talebi Pour B, Jameshorani M, Salmani R. The effect of *Chlorella vulgaris* vs. Artichoke on patients with non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD): A randomized clinical trial. *J Adv Med Biomed Res.* 2015;23(100):36-44.
 126. Moradi M, Sohrabi G, Golbidi M, et al. Effects of artichoke on blood pressure: A systematic review and meta-analysis. *Complement Ther Clin Pract.* 2021;57:102668. doi:10.1016/j.ctim.2021.102668.
 127. Cao X, Wu C, Tian Y, Guo P. The caffeic acid moiety plays an essential role in attenuating lipid accumulation by chlorogenic acid and its analogues. *RSC advances.* 2019;9(22):12247-12254. doi:10.1039/C8RA09395D.
 128. Meguro S, Hasumura T, Hase T. Coffee polyphenols exert hypocholesterolemic effects in zebrafish fed a high-cholesterol diet. *Nutr Metab.* 2013;10(1):1-8. doi:10.1186/1743-7075-10-61.
 129. Kwon EY, Jung UJ, Park T, et al. Luteolin attenuates hepatic steatosis and insulin resistance through the interplay between the liver and adipose tissue in mice with diet-

- induced obesity. *Diabetes*. 2015;64(5):1658-1669. doi:10.2337/db14-0631.
130. Lecoultre V, Carrel G, Egli L, et al. Coffee consumption attenuates short-term fructose-induced liver insulin resistance in healthy men. *AJCN*. 2014;99(2):268-275. doi:10.3945/ajcn.113.069526.
 131. Ceccarelli N, Curadi M, Picciarelli P, et al. Globe artichoke as a functional food. *Mediterr J Nutr Metab*. 2010;3(3):197-201. doi:10.3233/s12349-010-0021-z.
 132. Brown EJ, Khodr H, Hider CR, et al. Structural dependence of flavonoid interactions with Cu²⁺ ions: Implications for their antioxidant properties. *Biochem J*. 1998;330(3):1173-1178. doi:10.1042/bj3301173.
 133. Kokudo N, Takemura N, Hasegawa K, et al. Clinical practice guidelines for hepatocellular carcinoma: the Japan Society of Hepatology 2017 (4th JSH-HCC guidelines) 2019 update. *Hepatology Res*. 2019;49(10):1109-1113. doi:10.1111/hepr.13411.
 134. Rezazadeh K, Ebrahimi-Mameghani M. Artichoke leaf extract and use in metabolic syndrome as an antioxidant. *Oxidative Stress and Pathology*. Elsevier. *Pathology. Masucci S*; 2020:169-177. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815972-9.00016-0>.
 135. Rondanelli M, Opizzi A, Faliva M, et al. Metabolic management in overweight subjects with naive impaired fasting glycaemia by means of a highly standardized extract from *Cynara scolymus*: A double-blind, placebo-controlled, randomized clinical trial. *Phytotherapy research: PTR*. 2014;28(1):33-41. doi:10.1002/ptr.4950.
 136. Phạm Thị Vân Anh, Vũ Việt Hằng, Phạm Văn Tú, et al. Nghiên cứu độc tính cấp và bán trường diễn của cao lỏng Actisô trên thực nghiệm. *Tạp chí Y Dược Cổ truyền Việt Nam*. 2021;04(37):1-7.
 137. Zan MA, Ferraz AB, Richter MF, et al. *In vivo* genotoxicity evaluation of an artichoke (*Cynara scolymus* L.) aqueous extract. *J Food Sci*. 2013;78(2):T367-T371. doi:10.1111/1750-3841.12034.
 138. Bộ Y Tế. *Dược Điển Việt Nam*. 5th ed. NXB Y học Hà Nội. 2017:681-682.
 139. Gebhardt R. Anticholestatic activity of flavonoids from artichoke (*Cynara scolymus* L.) and of their metabolites. *Med Sci Monit*. 2001;7:316-320. doi:<https://europepmc.org/article/med/12211745>.
 140. Council of Europe. *The European Pharmacopoeia*. 10th ed. EDQM. 2019:1321-1323.
 141. Pinelli P, Agostini F, Romani A, et al. Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves. *Food Chem*. 2007;105(4):1695-1701. doi:10.1016/j.foodchem.2007.05.014.
 142. Domínguez FM, Irigoyen A, Angeles Vargas-Alvarez M, et al. Influence of culinary process on free and bound (poly) phenolic compounds and antioxidant capacity of artichokes. *Int J Gastron Food Sci*. 2021;25:100389. doi:10.1016/j.ijgfs.2021.100389.
 143. M. Häusler, M Ganzera, H. Stuppner, et al. Determination of caffeoylquinic acids and

- flavonoids in *Cynara scolymus* L. by high performance liquid chromatography. *Chromatographia*. 2002;56(7-8):407-411. doi:10.1007/BF02492002.
144. Sajid A. *Leaf Yield and Polyphenols of Artichoke (Cynara cardunculus L.) influenced by Harvest Frequency and Herbicide Stress*. Doctoral Thesis in Agriculture. Institute of Agronomy and Plant Breeding I. Justus Liebig University Giessen, Germany. 2011.
 145. Izquierdo AG, Gil MI, Conesa MA, et al. The effect of storage temperatures on vitamin C and phenolics content of artichoke *Cynara scolymus* L. heads. *IFSET*. 2001;2:199-202. doi:10.1016/S1466-8564(01)00018-2.
 146. Lattanzio V, Irene M. Variations of the orthodiphenol content of *Cynara scolymus* L. during the plant growing seasons. *Experientia*. 1979;35:993-994. doi:10.1007/BF01949900.
 147. Ilde Ricci GC, et al. Influence of pre-cutting operations on quality of fresh-cut artichokes (*Cynara scolymus* L.): Effect of harvest dates. *Postharvest Biol Technol*. 2013; 90-96. doi:10.1016/j.postharvbio.2013.05.011.
 148. Ferracane R, Pellegrini N, Visconti A, et al. Effects of different cooking methods on antioxidant profile, antioxidant capacity, and physical characteristics of artichoke. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008;56(18):8601-8608. doi:10.1021/jf800408w.
 149. Jurgen Eich Ortsstrasse THB, Thomas Goerke Berlin, Werner Schneider Eisenach, inventor; Artichoke leaf extracts. United States patent US 2004/0234674 A1. patent application 10/486,145. 2004.
 150. Kumadoh D, Ofori-Kwakye K. Dosage forms of herbal medicinal products and their stability considerations-an overview. *J Crit Rev*. 2017;4(4):1-8. doi:10.22159/jcr.2017v4i4.16077.
 151. Lê Quan Nghiê, Huỳnh Văn Hóa. *Bào chế và sinh dược học*. 1st ed. NXB Y học TP. HCM. 2014.
 152. Seo KS, Bajracharya R, Lee SH, et al. Pharmaceutical application of tablet film coating. *Pharmaceutics*. 2020;12(9):853. doi:10.3390/pharmaceutics12090853.
 153. Porter SC. Coating of pharmaceutical dosage forms. Remington. *The Science and Practice of Pharmacy*. 23th ed. Elsevier;2021:551-564.
 154. Committee on Asean Reference Substances. Guidelines for the establishment, handling, storage and use of Asean Reference Substances. 2005.
 155. Committee on Asean Reference Substances. SOP for the Production of Asean Reference Substances. 2009.
 156. ICH Harmonised Tripartite Guideline. Validation of analytical procedure: Text and methodology. 2005.
 157. ISO 13528. Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory

comparisons. 2005;

158. ICH Guideline. *Validation of Analytical Procedures: Methodology*.
159. Kulisic T, Radonic A, Katalinic V, et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chem.* 2004;85(4):633-640. doi:10.1016/j.foodchem.2003.07.024.
160. Huỳnh Anh Duy. *Khảo sát thành phần hóa học hướng tác dụng chống oxy hóa từ lá cây Gừa Folium Fici microcarpae*. Luận văn Thạc sĩ Dược học. Đại học Y Dược TP. HCM. 2014.
161. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979;95(2):351-358. doi:10.1016/0003-2697(79)90738-3.
162. Ngô Văn Thu, Trần Hùng. *Dược liệu học*. Vol 1. NXB Y học; 2011:307-311.
163. Zayed A, Serag A, Farag MA. *Cynara cardunculus* L.: Outgoing and potential trends of phytochemical, industrial, nutritive and medicinal merits. *J Funct Foods.* 2020;69:103937. doi:10.1016/j.jff.2020.103937.
164. Tác giả. *Nghiên cứu phân lập và xây dựng phương pháp đánh giá một vài polyphenol trong Actisô (Cynara scolymus L., Asteraceae)*. Luận văn Thạc sĩ Dược học. Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh; 2011.
165. Lee IC, Bae JS, Kim T, et al. Polyphenolic constituents from the aerial parts of *Thymus quinquecostatus* var. *japonica* collected on Ulleung Island. *J Appl Biol Chem.* 2011;54(5):811-816. doi:10.1007/BF03253166.
166. Zhang J, Mohamad H, Wong JH, et al. The Effect of 4-hydroxybenzaldehyde on the γ -aminobutyric Acid Type A Receptor. *MJMS.* 2017;24(2):94. doi:10.21315/mjms2017.24.2.12.
167. Clifford MN. Coffee bean dicaffeoylquinic acids. *Phytochemistry.* 1986;25(7):1767-1769. doi: 10.1016/S0031-9422(00)81260-1.
168. Lim EK, Higgins GS, Li Y, et al. Regioselectivity of glucosylation of caffeic acid by a UDP-glucose: Glucosyltransferase is maintained in planta. *Biochem J.* 2003;373(3):987-992. doi:10.1042/bj20021453.
169. Flores-Parra A, Gutiérrez-Avella DM, Contreras R, et al. ^{13}C and ^1H NMR investigations of quinic acid derivatives: Complete spectral assignment and elucidation of preferred conformations. *Magn Reson Chem.* 1989;27(6):544-555. doi:10.1002/mrc.1260270607.
170. Horman I, Badoud R, Ammann W. Food-related applications of one-and two-dimensional high-resolution proton-NMR: structure and conformation of cynarin. *J Agric Food Chem.* 1984;32(3):538-540. doi:10.1016/j.tifs.2012.04.003.
171. Slacanin I, Marston A, Hostettmann K, et al. The isolation of *Eleutherococcus senticosus* constituents by centrifugal partition chromatography and their quantitative determination by high performance liquid chromatography. *Phytochem Anal.* 1991;2(3):137-142. doi:10.1002/PCA.2800020310.

172. Sefkow M, Kelling A, Schilde U. First efficient syntheses of 1-, 4-, and 5-caffeoylquinic acid. *Eur J Org Chem.* 2001;2001(14):2735-2742. doi:10.1002/1099-0690(200107)2001:14<2735::AID-EJOC2735>3.0.CO;2-I.
173. Wan C, Li S, Liu L, et al. Caffeoylquinic acids from the aerial parts of *Chrysanthemum coronarium* L. *Plants.* 2017;6(1):10. doi:10.3390/plants6010010.
174. Dokli I, Navarini L, Hamersak Z. Syntheses of 3-, 4-, and 5-O-feruloylquinic acids. *Tetrahedron: Asymmetry.* 2013;24(13-14):785-790. doi:10.1016/j.tetasy.2013.06.002.
175. Zhu X-F, Zhang H-X, Lo R. Three di-O-caffeoylquinic acid derivatives from the heads of *Cynara scolymus* L. *Nat Prod Res.* 2009;23(6):527-532. doi:10.1080/14786410600800165.
176. Coxon B. Two-dimensional J-resolved proton nuclear magnetic resonance spectrometry of hydroxyl-coupled. α -and. β -D-glucose. *Analytical Chemistry.* 1983;55(14):2361-2366. doi:10.1021/ac00264a036.
177. Kim NM, Kim J, Chung HY, Choi JS. Isolation of luteolin 7-O-rutinoside and esculetin with potential antioxidant activity from the aerial parts of *Artemisia montana*. *Arch Pharm Res.* 2000;23(3):237-239. doi:10.1007/BF02976451.
178. Zhu X, Zhang H. Flavonoids of *Cynara scolymus*. *Chem Nat Compd.* 2004;40(6):600-601. doi:10.1007/s10600-005-0049-3.
179. Kasaj D, Krenn L, Reznicek G, et al. Flavonoids in *Achillea collina*. *Sci Pharm.* 2001;69(1):75-84. doi:https://www.researchgate.net/profile/Liselotte-Krenn/publication/235407870_Flavonoids_in_Achillea_collina/links/56b9e7e108ae7e3a0fa09414/Flavonoids-in-Achillea-collina.pdf
180. Owen R, Haubner R, Mier W, et al. Isolation, structure elucidation and antioxidant potential of the major phenolic and flavonoid compounds in brined olive drupes. *Food Chem Toxicol.* 2003;41(5):703-717. doi:10.1016/S0278-6915(03)00011-5.
181. Bernhard HO, Thiele K, Pretsch E. Cynaratriol, ein neues Guajanolid aus der Kardone *Cynara cardunculus* L. und der Artischocke *C. scolymus* L. (Compositae). *Helv Chim Acta.* 1979;62(4):1288-1297. doi:10.1002/hlca.19790620440.
182. Carneiro AdA, Barros YYd, Fonseca-Bazzo YM, et al. Identification and quantification of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. tablets and capsules. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2017;11(6):94-102. doi:10.5897/AJPP2016.4718.
183. Tác giả. *Nghiên cứu phương pháp phân tích và xây dựng công thức bào chế chế phẩm từ cao khô Actisô (Cynara scolymus L.-Asteraceae).* Luận văn Thạc sĩ Dược học. Đại học Y Dược TP. Hồ Chí Minh, 2014.
184. Viện kiểm nghiệm thuốc Trung ương. *Danh mục chất chuẩn Viện Kiểm nghiệm thuốc Trung ương. Updated October 14, 2021. May 20, 2022.* <https://nidqc.gov.vn/danh-muc-chat-chuan-vien-kiem-nghiem-thuoc-trung-uong>.
185. Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. HCM. *Chất chuẩn - Chất đối chiếu.* Updated May 15. June

27, 2022, <https://vienkiemnghiem.gov.vn/chat-chuan-doi-chieu/>.

186. Zhu X, Zhang H, Lo R. Phenolic compounds from the leaf extract of artichoke (*Cynara scolymus* L.) and their antimicrobial activities. *J Agric Food Chem*. 2004;52(24):7272-7278. doi:10.1021/jf0490192.
187. Amanda dAC, Yuri YdB, Marcela MdF, et al. Identification and quantification of caffeoylquinic acid derivatives in *Cynara scolymus* L. tablets and capsules. *AJPP*. 2017;11(6):94-102. doi:10.5897/AJPP2016.4718.
188. Falleh H, Ksouri R, Chaieb K, et al. Phenolic composition of *Cynara cardunculus* L. organs, and their biological activities. *C R Biol*. 2008;331(5):372-379. doi:10.1016/j.crv.2008.02.008.
189. Bui Thi Thu Ha, Park M-K. Total phenolic compounds and flavonoids in the parts of artichoke (*Cynara scolymus* L.) in Viet Nam. *Int J Environ Sci*. 2008;17(1):19-27. doi:10.5322/JES.2008.17.1.019.
190. Pandino G, Courts FL, Lombardo S, et al. Caffeoylquinic acids and flavonoids in the immature inflorescence of globe artichoke, wild cardoon, and cultivated cardoon. *J Agric Food Chem*. 2010;58(2):1026-1031. doi:https://doi.org/10.1021/jf903311j.
191. Nouraei S, Rahimmalek M, Saeidi G. Variation in polyphenolic composition, antioxidants and physiological characteristics of globe artichoke (*Cynara cardunculus* var. *scolymus* Hayek L.) as affected by drought stress. *Sci Hortic*. 2018;233:378-385. doi:10.1016/j.scienta.2017.12.060.
192. Cục Thống Kê Lâm Đồng. Niên giám thống kê năm 2017. July 27, 2022. <http://cucthongke.lamdong.gov.vn/Default.aspx?Act=10&IDNews=1029>
193. Edreva A. The importance of non-photosynthetic pigments and cinnamic acid derivatives in photoprotection. *Agric Ecosyst Environ*. 2005;106(2-3):135-146. doi:10.1016/j.agee.2004.10.002.
194. Jaakola L, Määtä-Riihinen K, Kärenlampi S, et al. Activation of flavonoid biosynthesis by solar radiation in bilberry (*Vaccinium myrtillus* L.) leaves. *Planta*. 2004;218(5):721-728. doi:10.1007/s00425-003-1161-x.
195. Luthria DL, Mukhopadhyay S, Krizek DT. Content of total phenolics and phenolic acids in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) fruits as influenced by cultivar and solar UV radiation. *J Food Compos Anal*. 2006;19(8):771-777. doi:10.1016/j.jfca.2006.04.005.
196. Pandino G, Lombardo S, Monaco AL, et al. Choice of time of harvest influences the polyphenol profile of globe artichoke. *J Funct Foods*. 2013;5(4):1822-1828. doi:10.1016/j.jff.2013.09.001.
197. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci*. 2016;8:33-42. doi:10.1016/j.cofs.2016.02.002.
198. Marjoni MR, Zulfisa A. Antioxidant Activity of Methanol Extract/Fractions of Senggani Leaves (*Melastoma candidum* D. Don). *Pharm Anal Acta*. 2017;08. doi:10.4172/2153-2435.1000557.

199. Li X, Li K, Xie H, et al. Antioxidant and cytoprotective effects of the Di-O-Caffeoylquinic acid family: The mechanism, structure–activity relationship, and conformational effect. *Molecules*. 2018;23(1):222. doi:10.3390/molecules23010222.
200. Jun M, Fu HY, Hong J, et al. Comparison of antioxidant activities of isoflavones from kudzu root (*Pueraria lobata* Ohwi). *J Food Sci*. 2003;68(6):2117-2122. doi:10.1111/j.1365-2621.2003.tb07029.x.

DANH MỤC CÁC PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Cao chuẩn hóa và chế phẩm viên nén bao phim Actisô 200 mg	3
Phụ lục 2. Giấy chứng nhận nghiệm thu đề tài sở KH & CN	4
Phụ lục 3. Hợp đồng biên soạn tiêu chuẩn DĐVN, chuyên luận lá Actisô	5
Phụ lục 4. Hợp đồng biên soạn tiêu chuẩn đđvn vi, chuyên luận cao Actisô	6
Phụ lục 5. Kiểm nghiệm nguyên liệu đầu vào theo DĐVN	7
Phụ lục 6. Phổ MS của 5 dẫn xuất mono-CQA (1, 2, 4, 5, 7).....	11
Phụ lục 7. Phổ MS của 5 dẫn xuất di-CQA (6, 10, 11, 12, 13).....	12
Phụ lục 8. Phổ MS của 4 flavonoid (8, 9, 15, 17)	13
Phụ lục 9. Phổ MS của hợp chất 3, 16, 18, 19, 20	14
Phụ lục 10. Phổ NMR của các dẫn xuất mono-CQA.....	15
Phụ lục 11. Phổ NMR của các dẫn xuất di-CQA.....	16
Phụ lục 12. Phổ NMR của các flavonoid	17
Phụ lục 13. Phổ NMR của các dẫn xuất acid benzoic	18
Phụ lục 14. Phổ NMR của hợp chất 1 (1-CQA)	19
Phụ lục 15. Phổ NMR của hợp chất 2 (3- CQA)	22
Phụ lục 16. Phổ NMR của hợp chất 3 (acid caffeic).....	25
Phụ lục 17. Phổ NMR của hợp chất 4 (5- CQA =acid chlorogenic).....	28
Phụ lục 18. Phổ NMR của hợp chất 5 (4- CQA)	31
Phụ lục 19. Phổ NMR của hợp chất 6 (1,3-diCQA = cynarin)	34
Phụ lục 20. Phổ NMR của hợp chất 7 (acid 3-feruloylquinic)	37
Phụ lục 21. Phổ NMR của hợp chất 8 (scolymosid).....	40
Phụ lục 22. Phổ NMR của hợp chất 9 (cynarosid).....	43
Phụ lục 23. Phổ NMR của hợp chất 10 (3,4-diCQA)	46
Phụ lục 24. Phổ NMR của hợp chất 11 (3,5-diCQA)	48
Phụ lục 25. Phổ NMR của hợp chất 12 (1,5-diCQA)	51
Phụ lục 26. Phổ NMR của hợp chất 13 (4,5-diCQA)	54
Phụ lục 27. Phổ NMR của hợp chất 14 (acid succinic)	57
Phụ lục 28. Phổ NMR của hợp chất 15 (apigenin-7-rutinosid)	58
Phụ lục 29. Phổ NMR của hợp chất 16 (cynatriol).....	61
Phụ lục 30. Phổ NMR của hợp chất 17 (luteolin).....	65
Phụ lục 31. Phổ NMR của hợp chất 18 (aldehyd protocatechuic).....	68
Phụ lục 32. Phổ NMR của hợp chất 19 (acid protocatechuic).....	70
Phụ lục 33. Phổ NMR của hợp chất 20 (4- <i>p</i> -hydroxy benzaldehyd).....	72

Phụ lục 34. Dự thảo chuyên luận lá Actisô.....	73
Phụ lục 35. Dự thảo chuyên luận cao khô Actisô	75
Phụ lục 36. Phiếu kiểm nghiệm cđc cynarin.....	77
Phụ lục 37. Phổ IR, MR, DSC của CĐC cynarin	78
Phụ lục 38. COA (Certificate of Analysis) của chuẩn sơ cấp cynarin.....	79
Phụ lục 39. Kết quả xử lý thống kê thiết lập CĐC cynarin	81
Phụ lục 40. Phiếu kiểm nghiệm CĐC cynarosid.....	82
Phụ lục 41. Phổ IR, MS và DSC của cynarosid.....	83
Phụ lục 42. COA (Certificate of Analysis) của chuẩn sơ cấp cynarosid	84
Phụ lục 43. Kết quả xử lý thống kê thiết lập CĐC cynarosid.....	86
Phụ lục 44. Phiếu kiểm nghiệm cđc acid chlorogenic	87
Phụ lục 45. Phổ IR, MS, DSC của acid chlorogenic.....	88
Phụ lục 46. COA (Certificate of Analysis) của chuẩn sơ cấp acid chlorogenic	89
Phụ lục 47. Kết quả xử lý thống kê thiết lập chuẩn đối chiếu acid chlorogenic.....	91
Phụ lục 48. Xây dựng quy trình định lượng 3 polyphenol.....	92
Phụ lục 49. Xây dựng quy trình định lượng 4 polyphenol.....	101
Phụ lục 50. Xây dựng quy trình định lượng 12 polyphenol.....	110
Phụ lục 51. Nguyên liệu dùng trong nghiên cứu động thái tích lũy	126
Phụ lục 52. Định lượng các chế phẩm trà túi lọc Actisô.....	127
Phụ lục 53. Thông tin chế phẩm nước ngoài chứa cao Actisô.....	128
Phụ lục 54. Skđ định lượng chế phẩm chứa cao chiết Actisô.....	129
Phụ lục 55. Định lượng polyphenol trong chế phẩm chứa cao Actisô	130
Phụ lục 56. Thông tin các cao chiết thử nghiệm.....	131
Phụ lục 57. Kết quả thử nghiệm DPPH của 9 chất tinh khiết.....	132
Phụ lục 58. Kết quả thử nghiệm MDA của 9 chất tinh khiết.....	133
Phụ lục 59. Kết quả thử nghiệm DPPH của các cao chiết	134
Phụ lục 60. Kết quả thử nghiệm mda của các cao chiết.....	136
Phụ lục 61. Kết quả xử lý thống kê của thử nghiệm (DPPH và MDA) của các cao chiết.....	138
Phụ lục 62. Mối tương quan giữa hàm lượng và polyphenol trong cao chiết Actisô	139

Phụ lục 1. CAO CHUẨN HÓA VÀ CHẾ PHẨM VIÊN NÉN BAO PHIM ACTISÔ 200 MG



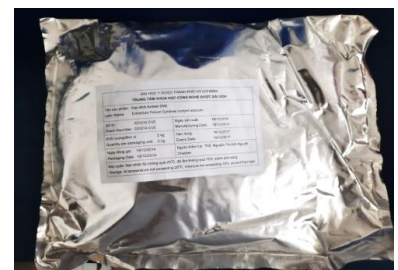
Một số cao khô Actisô sản xuất



Số lô: 040116



Số lô: 050116



Số lô: 031214



Số lô: NCL1.2



Số lô: 011214



Số lô: 021214

Phụ lục 2. GIẤY CHỨNG NHẬN NGHIỆM THU ĐỀ TÀI SỞ KH & CN

Mẫu 10
14/2014/TT-BKHCN

SỞ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
TRUNG TÂM THÔNG TIN VÀ THỐNG KÊ
KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

GIẤY CHỨNG NHẬN
ĐĂNG KÝ KẾT QUẢ THỰC HIỆN NHIỆM VỤ KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ
SỬ DỤNG NGÂN SÁCH NHÀ NƯỚC
Số đăng ký: 2016-214

Tên nhiệm vụ: **Nghiên cứu sản xuất bán thành phẩm (cao chiết chuẩn hóa) và một vài chế phẩm từ actisô Đà Lạt có hàm lượng cynarin và acid clorogenic tương đương với chế phẩm của nước ngoài (Chophytol) đang lưu thông ở thị trường trong nước.**

Cấp nhiệm vụ: Cấp tỉnh.

Tổ chức chủ trì nhiệm vụ: Trung tâm Khoa học Công nghệ Dược Sài Gòn.

Cơ quan chủ quản tổ chức chủ trì: Đại học Y Dược TP.HCM.

Chủ nhiệm nhiệm vụ:

TS. Phạm Đông Phương

PGS.TS. Nguyễn Thiện Hải.

Cá nhân tham gia: **ThS. Nguyễn Thị Ánh Nguyệt; ThS. Võ Ngọc Linh Giang; ThS. Lê Văn Huân.**

Hội đồng đánh giá nghiệm thu chính thức kết quả thực hiện nhiệm vụ khoa học và công nghệ được thành lập theo Quyết định số: 473/QĐ-SKHCN ngày 18 tháng 7 năm 2016 của Giám đốc Sở Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh, họp ngày 28 tháng 7 năm 2016 tại Sở Khoa học và Công nghệ TP. Hồ Chí Minh, đã đăng ký kết quả thực hiện nhiệm vụ khoa học và công nghệ.

Hồ sơ lưu tại:

Trung tâm Thông tin và Thống kê

KH&CN TP.HCM.

Địa chỉ: 79 Trương Định, P. Bến Thành,

Q. 1, TP.HCM.

Số hồ sơ lưu: BC16000214

Thành phố Hồ Chí Minh, ngày 13 tháng 9 năm 2016



SAO Y BẢN CHÍNH

Ngày 15 tháng 9 năm 2016



GIÁM ĐỐC
Bùi Thanh Bằng

Phụ lục 3. HỢP ĐỒNG BIÊN SOẠN TIÊU CHUẨN DDVN VI, CHUYÊN LUẬN LÁ ACTISÔ

CỘNG HOÀ XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BIÊN BẢN NGHIỆM THU - THANH LÝ HỢP ĐỒNG

Biên soạn tiêu chuẩn TCVN về thuốc (Dược điển Việt Nam VI)

- Căn cứ Hợp đồng thuê khoán chuyên môn số: 26/TTDDDTVN ký ngày 10 tháng 7 năm 2019 giữa Trung tâm Dược điển - Dược thư Việt Nam và TS. Phạm Đông Phương, chuyên gia Biên soạn tiêu chuẩn TCVN về thuốc (Dược điển Việt Nam VI).

Hôm nay, ngày 12 tháng 8 năm 2019, tại Trung tâm Dược điển - Dược thư VN, chúng tôi gồm có:

Bên A: TRUNG TÂM DƯỢC ĐIỂN - DƯỢC THƯ VIỆT NAM

Đại diện: **ThS. Lục Thị Thu Hằng**

Chức vụ: Giám đốc

Điện thoại: 0243 8256905

Tài khoản: 9527.1.1095363 tại Kho bạc Nhà nước Hoàn Kiếm

Địa chỉ: 48 Hai Bà Trưng - Hà Nội

Fax: 0243 9343547

Bên B: TS. Phạm Đông Phương

Địa chỉ: 41 Đinh Tiên Hoàng, Quận 1, TP Hồ Chí Minh

Điện thoại: 0918265213

Mã số thuế: 0301944587

Số CMT: 020061340 ngày cấp: 27/5/2004 Tại: TP Hồ Chí Minh

Sau khi xem xét kết quả thực hiện Hợp đồng thuê khoán, hai bên thống nhất Nghiệm thu - thanh lý Hợp đồng số 26/TTDDDTVN, ngày 10 tháng 7 năm 2019 với các nội dung sau:

1. TS. Phạm Đông Phương đã hoàn thành Hợp đồng trên với kết quả công việc cụ thể như sau:

- Biên soạn tiêu chuẩn TCVN về thuốc (Dược điển Việt Nam VI): 1 Actiso (lá); theo nội dung hợp đồng thuê khoán:

** Yêu cầu về chất lượng đối với các Tiêu chuẩn quốc gia về thuốc:*

- Nội dung dự thảo tiêu chuẩn phải đáp ứng các yêu cầu thực tế kiểm nghiệm và sản xuất thuốc ở Việt Nam, đồng thời nâng cao chất lượng tiêu chuẩn và đề xuất phương pháp kiểm nghiệm tiên tiến tương đương với một số nước trong khu vực và trên thế giới tại thời điểm biên soạn.

- Bố cục của tiêu chuẩn, danh pháp thuật ngữ, cách trình bày, thể hiện nội dung theo yêu cầu của Hội đồng Dược điển Việt Nam.

- Đã áp dụng các phương pháp chung (Phụ lục) và các quy định chung của TCVN 1-1: Phương pháp kiểm nghiệm thuốc vào việc biên soạn tiêu chuẩn.

** Sản phẩm nộp tại Trung Tâm Dược điển - Dược thư Việt Nam bao gồm:*

- Bản in dự thảo Tiêu chuẩn quốc gia về thuốc (02 bản) đánh máy vi tính, font Unicode, kiểu chữ Arial, cỡ chữ 11, có chữ ký của tác giả và đánh số trên từng trang.

- Bản thuyết minh dự thảo (giải thích lý do đưa ra các chỉ tiêu, phép thử, phương pháp).

- Hồ sơ kiểm nghiệm ghi lại đầy đủ các kết quả Khảo nghiệm trên mẫu thực tế, có chữ ký của Kiểm nghiệm viên.

- Tài liệu tham khảo: Bản photo của các tài liệu tham khảo đã được sử dụng làm cơ sở để biên soạn như Dược điển VN, Dược điển nước ngoài (Anh, Mỹ, Châu Âu,...), tiêu chuẩn chất lượng thuốc của nhà sản xuất, các tài liệu và kết quả nghiên cứu (nếu có)

- File điện tử của bản dự thảo.

2. Hình thức thanh toán:

Tổng giá trị Hợp đồng là: 30.000.000 đồng

Số tiền đã tạm ứng: 0 đồng

Số tiền còn phải thanh toán cho Bên B: 30.000.000 đồng

Bằng chữ: Ba mươi triệu đồng chẵn.

Phụ lục 4. HỢP ĐỒNG BIÊN SOẠN TIÊU CHUẨN ĐDVN VI, CHUYÊN LUẬN CAO ACTISÔ

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập – Tự do – Hạnh phúc

BIÊN BẢN NGHIỆM THU - THANH LÝ HỢP ĐỒNG

Xây dựng, biên soạn Dược điển Việt Nam VI

- Căn cứ Hợp đồng thuê khoán chuyên môn số: 25/TTDDDTVN ký ngày 01 tháng 5 năm 2020 giữa Trung tâm Dược điển - Dược thư Việt Nam và TS. Phạm Đông Phương, chuyên gia Xây dựng, biên soạn Dược điển Việt Nam VI.

Hôm nay, ngày 29 tháng 5 năm 2020, tại Trung tâm Dược điển - Dược thư VN, chúng tôi gồm có:

Bên A: TRUNG TÂM DƯỢC ĐIỂN - DƯỢC THƯ VIỆT NAM

Đại diện: **ThS. Lục Thị Thu Hằng**

Chức vụ: Giám đốc

Địa chỉ: 48 Hai Bà Trưng - Hà Nội

Điện thoại: 0243 8256905

Fax: 0243 9343547

Tài khoản: 9527.1.1095363 tại Kho bạc Nhà nước Hoàn Kiếm

Bên B: TS. Phạm Đông Phương

Địa chỉ: 41 Đinh Tiên Hoàng, Quận 1, TP Hồ Chí Minh

Điện thoại: 0918265213

Mã số thuế: 0301944587

Số CMT: 020061340 ngày cấp: 27/5/2004 Tại: TP Hồ Chí Minh

Sau khi xem xét kết quả thực hiện Hợp đồng thuê khoán, hai bên thống nhất Nghiệm thu - thanh lý Hợp đồng số 25/TTDDDTVN, ngày 01 tháng 5 năm 2020 với các nội dung sau:

1. TS. Phạm Đông Phương đã hoàn thành Hợp đồng trên với kết quả công việc cụ thể như sau:

- Xây dựng, biên soạn tiêu chuẩn TCVN về thuốc (Dược điển Việt Nam VI): 1/ Cao khô actiso; theo nội dung hợp đồng thuê khoán:

*** Yêu cầu về chất lượng đối với các Tiêu chuẩn quốc gia về thuốc:**

- Nội dung dự thảo tiêu chuẩn phải đáp ứng các yêu cầu thực tế kiểm nghiệm và sản xuất thuốc ở Việt Nam, đồng thời nâng cao chất lượng tiêu chuẩn và đề xuất phương pháp kiểm nghiệm tiên tiến tương đương với một số nước trong khu vực và trên thế giới tại thời điểm biên soạn.

- Bố cục của tiêu chuẩn, danh pháp thuật ngữ, cách trình bày, thể hiện nội dung theo yêu cầu của Hội đồng Dược điển Việt Nam.

- Đã áp dụng các phương pháp chung (Phụ lục) và các quy định chung của TCVN I-1: Phương pháp kiểm nghiệm thuốc vào việc biên soạn tiêu chuẩn.

*** Sản phẩm nộp tại Trung Tâm Dược điển - Dược thư Việt Nam bao gồm:**

- Bản in dự thảo Tiêu chuẩn quốc gia về thuốc (02 bản) đánh máy vi tính, font Unicode, kiểu chữ Arial, cỡ chữ 11, có chữ ký của tác giả và đánh số trên từng trang.

- Bản thuyết minh dự thảo (giải thích lý do đưa ra các chỉ tiêu, phép thử, phương pháp).

- Hồ sơ kiểm nghiệm ghi lại đầy đủ các kết quả Khảo nghiệm trên mẫu thực tế, có chữ ký của Kiểm nghiệm viên.

- Tài liệu tham khảo: Bản photo của các tài liệu tham khảo đã được sử dụng làm cơ sở để biên soạn như Dược điển VN, Dược điển nước ngoài (Anh, Mỹ, Châu Âu,...), tiêu chuẩn chất lượng thuốc của nhà sản xuất, các tài liệu và kết quả nghiên cứu (nếu có)

- File điện tử của bản dự thảo.

2. Hình thức thanh toán:

Tổng giá trị Hợp đồng là: 30.000.000 đồng

Số tiền đã tạm ứng: 0 đồng

Số tiền còn phải thanh toán cho Bên B: 30.000.000 đồng

Bằng chữ: Ba mươi triệu đồng chẵn.

Phụ lục 5. KIỂM NGHIỆM NGUYÊN LIỆU ĐÀU VÀO THEO DĐVN

Đặc điểm thực vật của 2 Giống Actisô

Giống tím



Lá bắc màu tím

Giống xanh



Lá bắc màu xanh



Gốc cuống lá màu xanh



Gốc cuống lá màu tím

Vi phẫu: Nội dung này chưa có trong DĐVN V, đề nghị bổ sung cho DĐVN VI

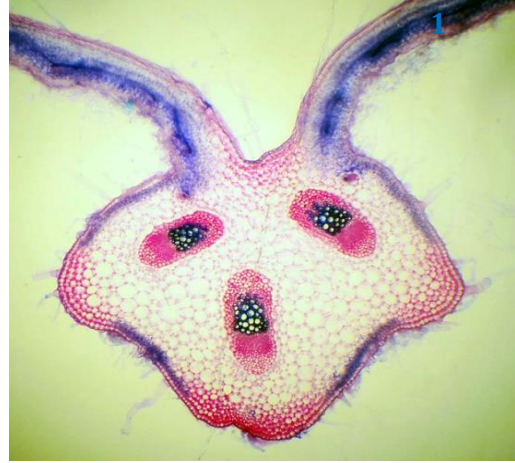
Gân lá: Mặt trên lõm hình chữ V, mặt dưới lồi có nhiều chỗ uốn lượn. Biểu bì trên và biểu bì dưới cấu tạo bởi nhiều tế bào hình trứng hoặc gần tròn xếp liên tục đều đặn, được phủ bởi 1 lớp cutin mỏng. Tế bào biểu bì mang nhiều lông che chở đa bào một dãy, thường có 4 - 5 tế bào, nhiều lông dài uốn lượn, đan xen nhau; rải rác có các lông tiết đơn bào đầu tròn. Sát lớp biểu bì là mô dày góc, gồm 2 - 3 lớp tế bào. Mô mềm là những tế bào hình tròn, thành mỏng, kích thước không đều nhau. Có 3 - 5 bó libe - gỗ rời nhau, hình trứng thuôn dài: Bó ở giữa lớn nhất, các bó hai bên nhỏ dần, gỗ trên - libe dưới và có mô dày bao quanh.

Phiến lá: Biểu bì trên và biểu bì dưới gồm 1 lớp tế bào hình chữ nhật dài, lớn hơn tế bào ở phần gân lá, mang nhiều lông che chở đa bào và lông tiết tương tự như ở phần gân lá. Mô mềm giậu gồm 2 hàng tế bào hình chữ nhật to thuôn dài, xếp sát nhau và thẳng góc với biểu bì trên, kể đến là mô mềm khuyết.

Giống xanh

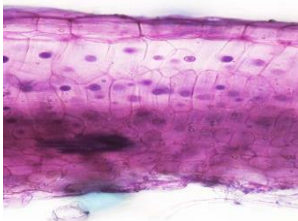


Giống tím



Hình PL-1. Vi phẫu lá Actisô (giống xanh và tím)

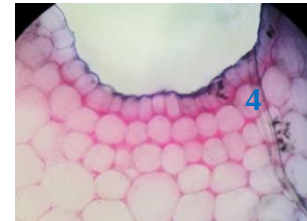
1. Mô mềm giậu 2. Mô mềm khuyết 3. Lông tiết đơn bào 4. Mô mềm
5. Bó libe - gỗ 6. Mô dày 7. Lông che chở đa bào



Mô mềm giậu



Biểu bì dưới



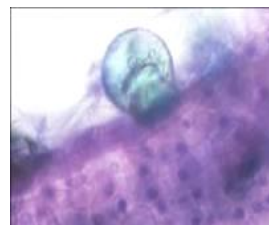
Biểu bì trên



Bó libe - gỗ



Lông che chở đa bào



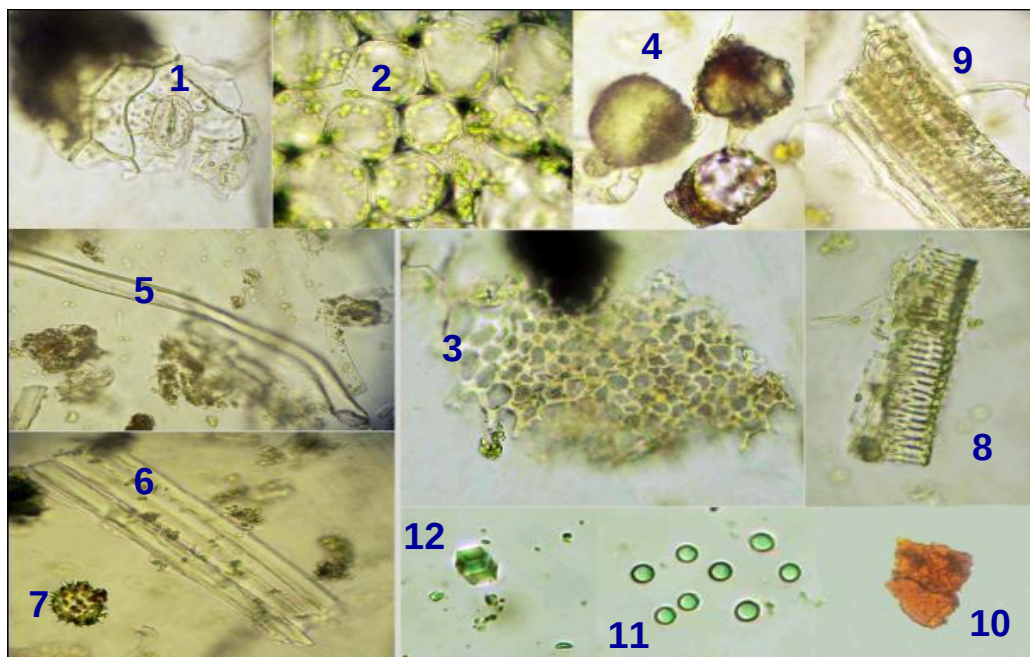
Lông tiết đơn bào



Cutin mỏng

Bột

Mảnh biểu bì phiến lá gồm những tế bào hình nhiều cạnh, mang lỗ khí và lông che chở dài. Mạch gân lá gồm tế bào hình chữ nhật, thành mỏng. Sợi riêng lẻ hay tập trung thành từng bó. Lông tiết đơn bào, đầu tròn. Mạch xoắn, mạch mạng, mạch vòng và mạch vạch. Mạch mô mềm. Nhiều khối nhựa màu nâu, kích thước to nhỏ không nhất định.



Hình PL-2. Đặc điểm bột của lá Actisô (giống xanh và tím)

1. Biểu bì mang lỗ khí 2. Mô mềm 3. Mô dày 4. Lông tiết 5. Lông che chở
6. Sợi mô cứng 7. Hạt phấn hoa 8. Mạch mạng 9. Mạch xoắn 10. Khối nhựa
11. Tinh bột 12. Canxi oxalat hình khối.

Định tính

A. Cân 0,2 g bột dược liệu, cho vào bình nón, thêm 10 ml *ethanol* 96 % (TT), đun sôi cách thủy với ống sinh hàn trong 30 phút, lọc (dung dịch A).

Lấy 5 ml dung dịch A, bốc hơi trên cách thủy cho hết ethanol. Hoà lẫn còn lại trong 1 ml dung dịch *acid hydrochloric* 1N (TT) và 4 ml *nước cất*, lọc. Thêm vào dịch lọc 1 ml *dung dịch natri nitrit* 10 % (TT), để lạnh ở 10 °C trong 20 phút. Thêm 4 ml *dung dịch natri hydroxyd* 10 % (TT), xuất hiện màu hồng cánh sen bền vững.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: Silica gel 60F₂₅₄

Dung môi khai triển: Ethyl acetat - nước - acid formic (8 : 0,5 : 0,5).

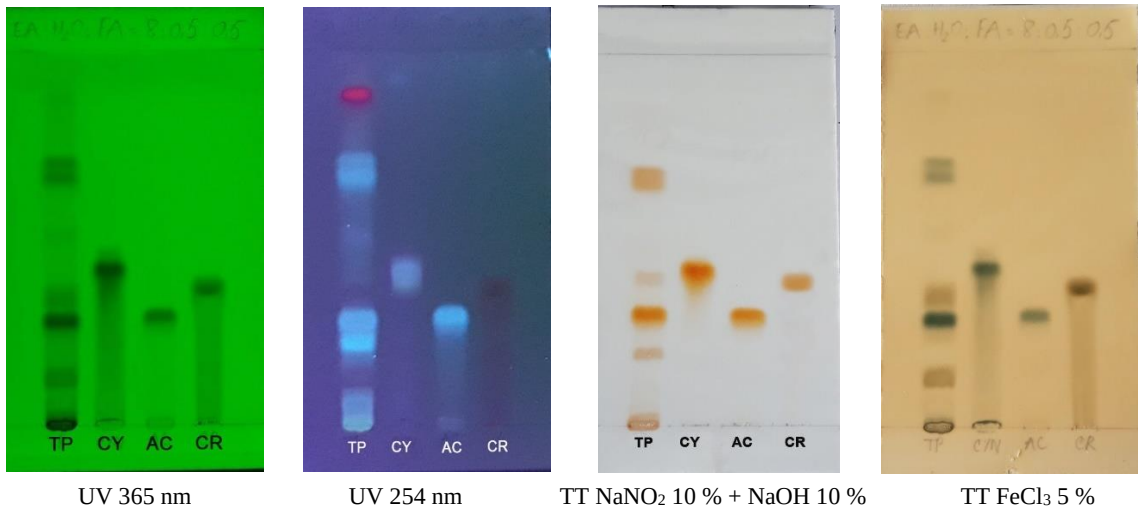
Dung dịch thử: Dung dịch A

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch acid chlorogenic và cynarosid trong *methanol* (0,01 mg/ml)

Cách tiến hành: Chấm lên bản mỏng 15 µl dung dịch thử, 10 µl dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai xong, lấy bản mỏng ra để khô ở nhiệt độ phòng. Phun *dung dịch FeCl₃* 5 % (TT). Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có 1 vết màu xanh đen (cynarosid); 1 vết màu xanh rêu (acid chlorogenic) có cùng trị số R_f với vết của cynarosid và acid chlorogenic trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.



Hình PL-3. Phản ứng định tính dịch chiết lá



Hình PL-4. Định tính lá Actisô bằng sắc ký lớp mỏng

Chú thích: CY (chuẩn cynarin) AC (chuẩn acid chlorogenic) CR (chuẩn cynarosid)

Độ ẩm: Không quá 13 % (Phụ lục 9.6).

Bảng PL-1. Độ ẩm lá Actisô xanh

Mẫu	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Độ ẩm (%)	11,06	11,14	10,98	10,42	10,89	11,18
Độ ẩm trung bình (%)	10,94					
RSD (%)	2,5397					

Bảng PL-2. Độ ẩm của lá Actisô tím

Mẫu	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Độ ẩm (%)	10,51	11,04	10,98	10,80	11,00	10,14
Độ ẩm trung bình (%)	10,7					
RSD (%)	3,3076					

Kết quả: Độ ẩm của lá Actisô xanh là 10,94 %, của lá Actisô tím là 10,70 %, đạt tiêu chuẩn độ ẩm theo ĐBVN 5 (< 13 %). **Tro toàn phần:** Không quá 15 % (Phụ lục 9.8)

Bảng PL-3. Độ tro toàn phần của Actisô lá xanh

Mẫu	D1	D2	D3	D4	D5	D6
T (%)	13,70	13,67	14,00	13,77	13,80	13,65
Ttb (%)	13,77					
RSD (%)	0,9357					

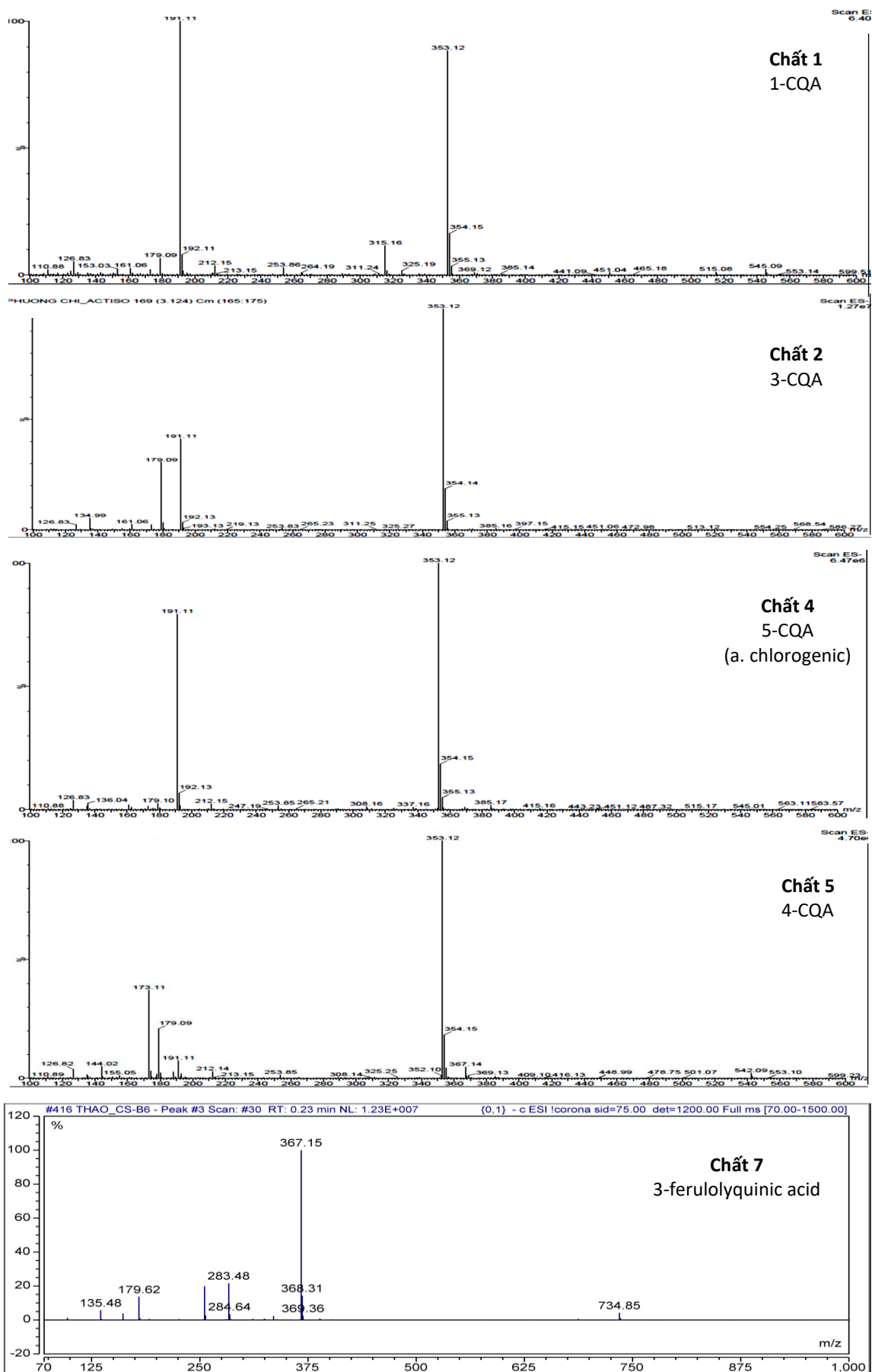
Bảng PL-4. Độ tro toàn phần của lá Actisô tím

Mẫu	D1	D2	D3	D4	D5	D6
T (%)	13,88	14,02	13,90	13,81	13,64	13,90
Ttb (%)	13,86					
RSD (%)	0,9132					

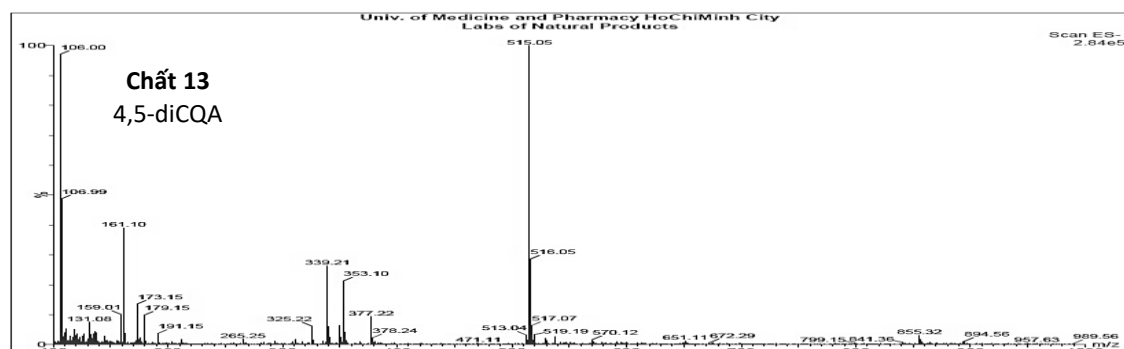
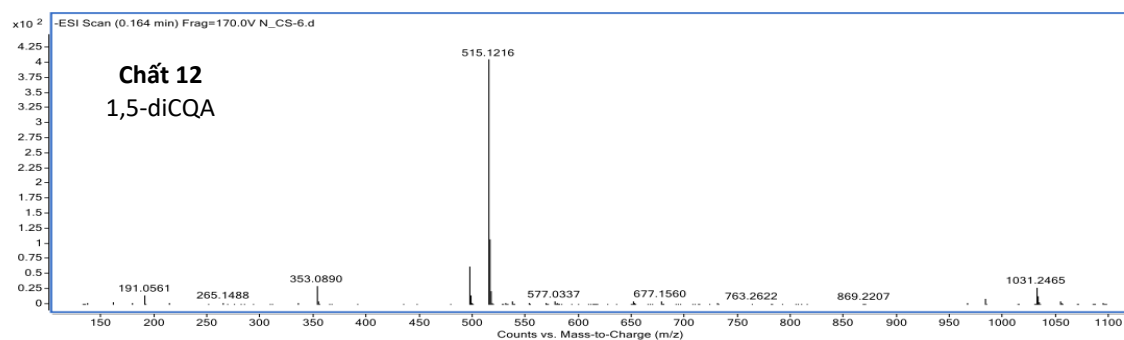
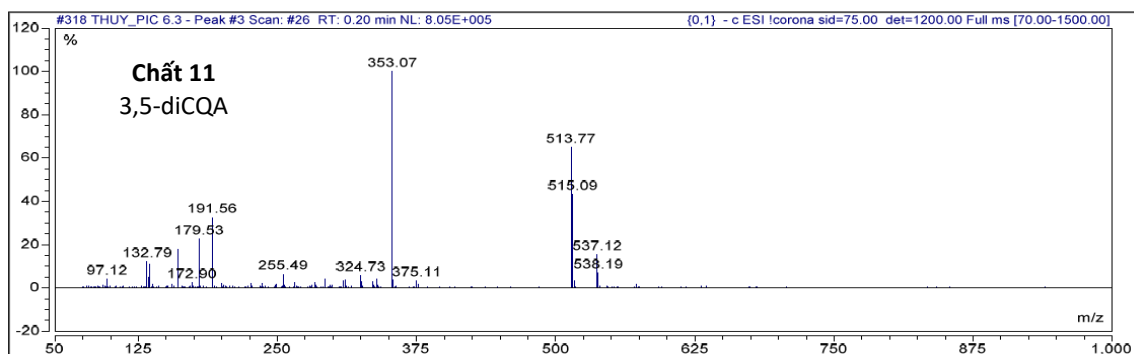
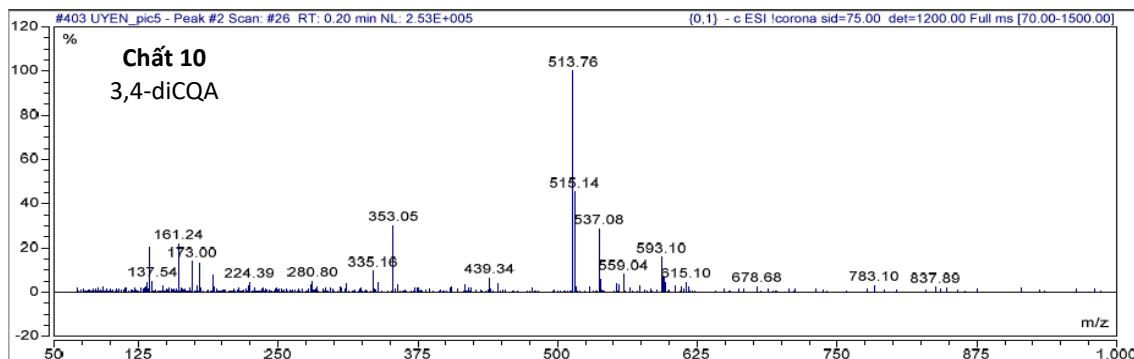
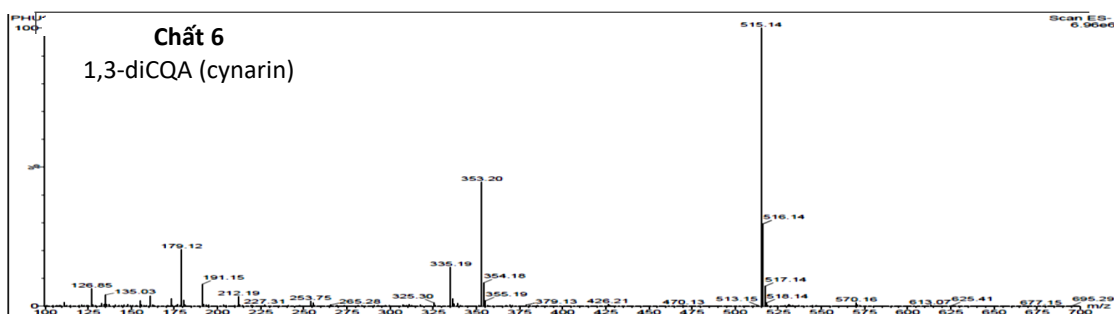
T %: Độ tro toàn phần; **Ttb:** Độ tro toàn phần trung bình

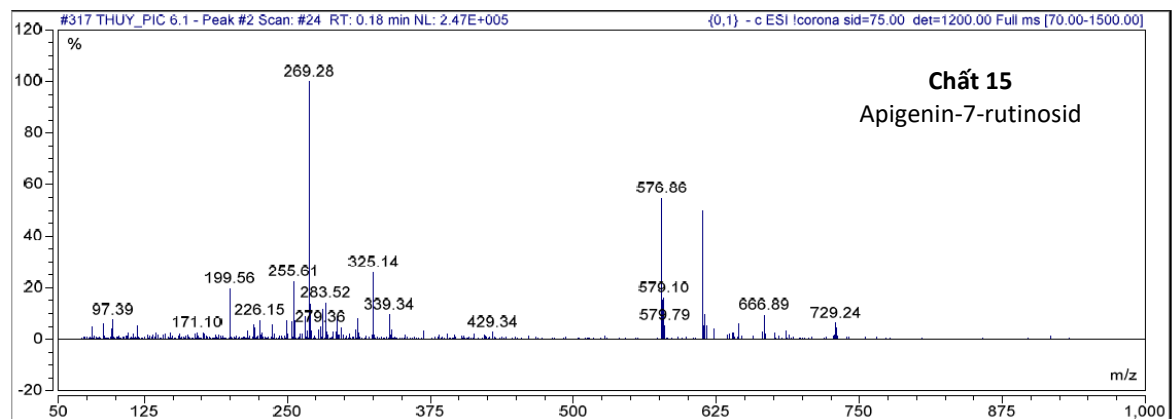
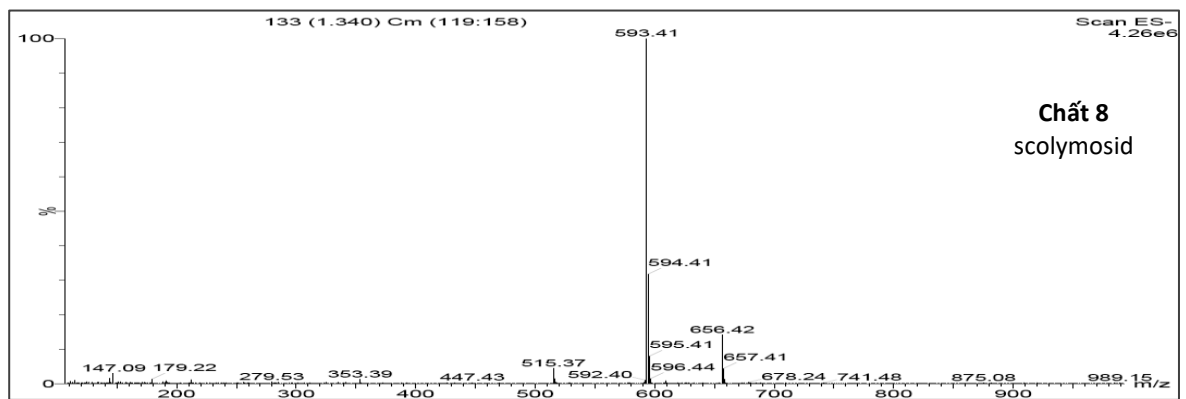
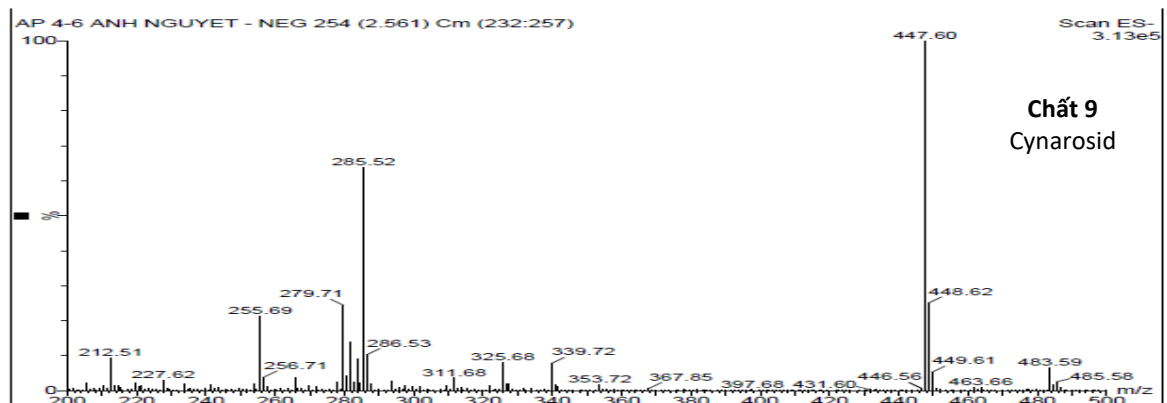
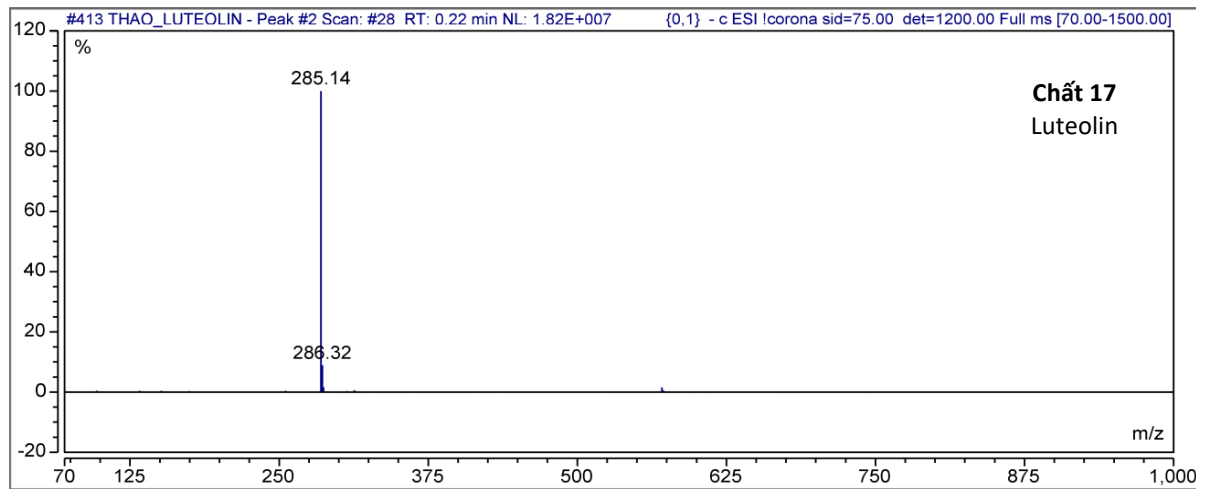
Kết quả: Độ tro toàn phần của lá Actisô xanh là 13,77 %, của lá Actisô tím là 13,86 %, đạt tiêu chuẩn trong ĐBVN 5 (< 15 %).

Phụ lục 6. PHỔ MS CỦA 5 DẪN XUẤT MONO-CQA (1, 2, 4, 5, 7)

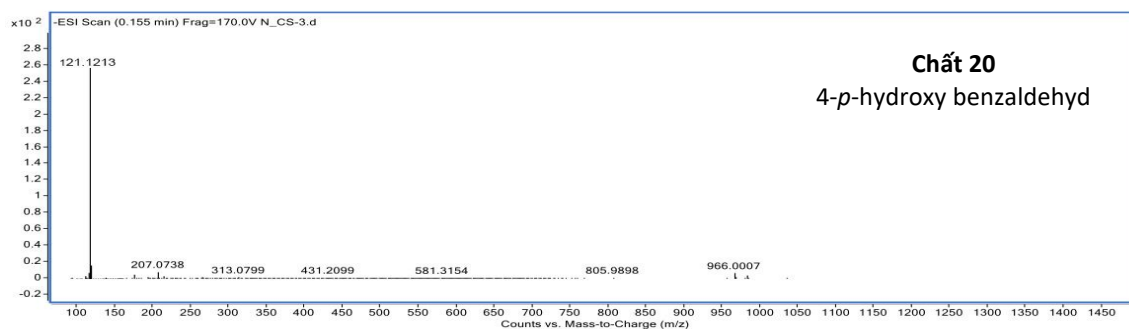
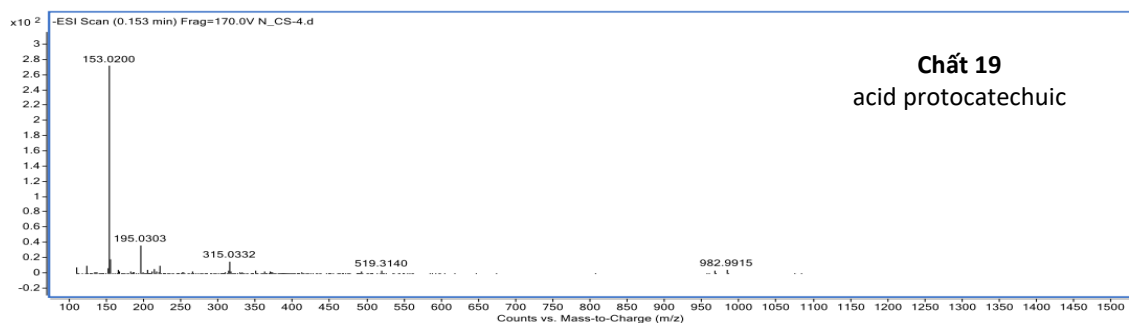
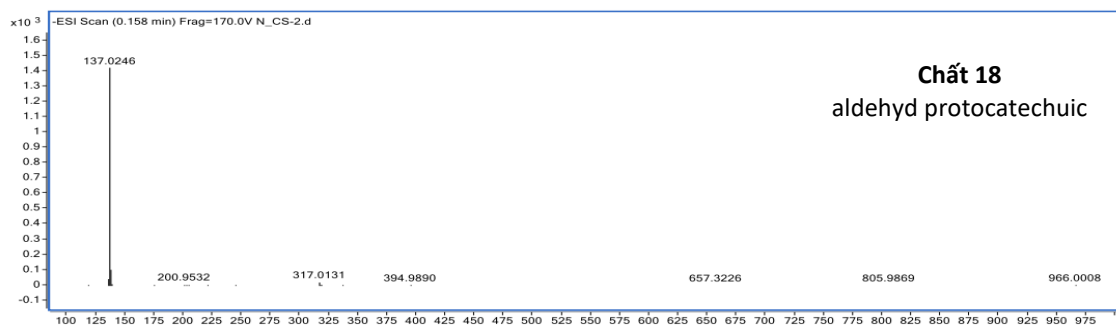
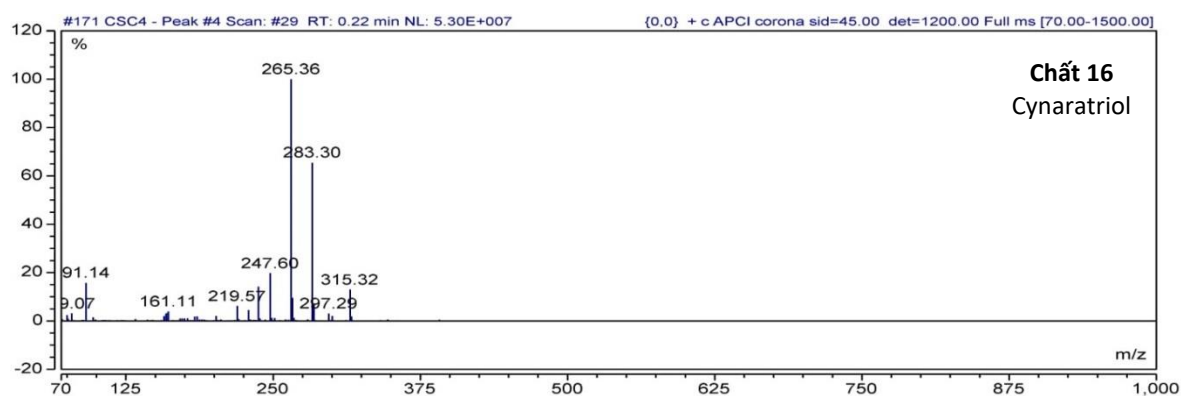
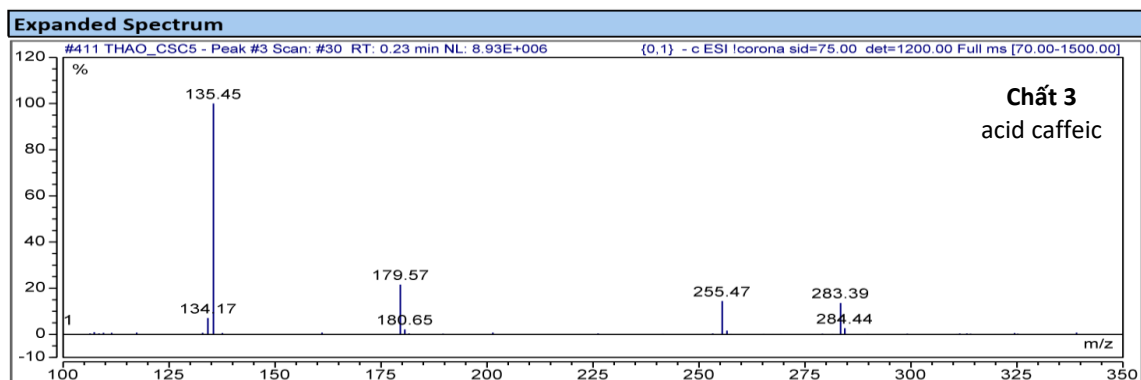


Phụ lục 7. PHỔ MS CỦA 5 DẪN XUẤT DI-CQA (6, 10, 11, 12, 13)

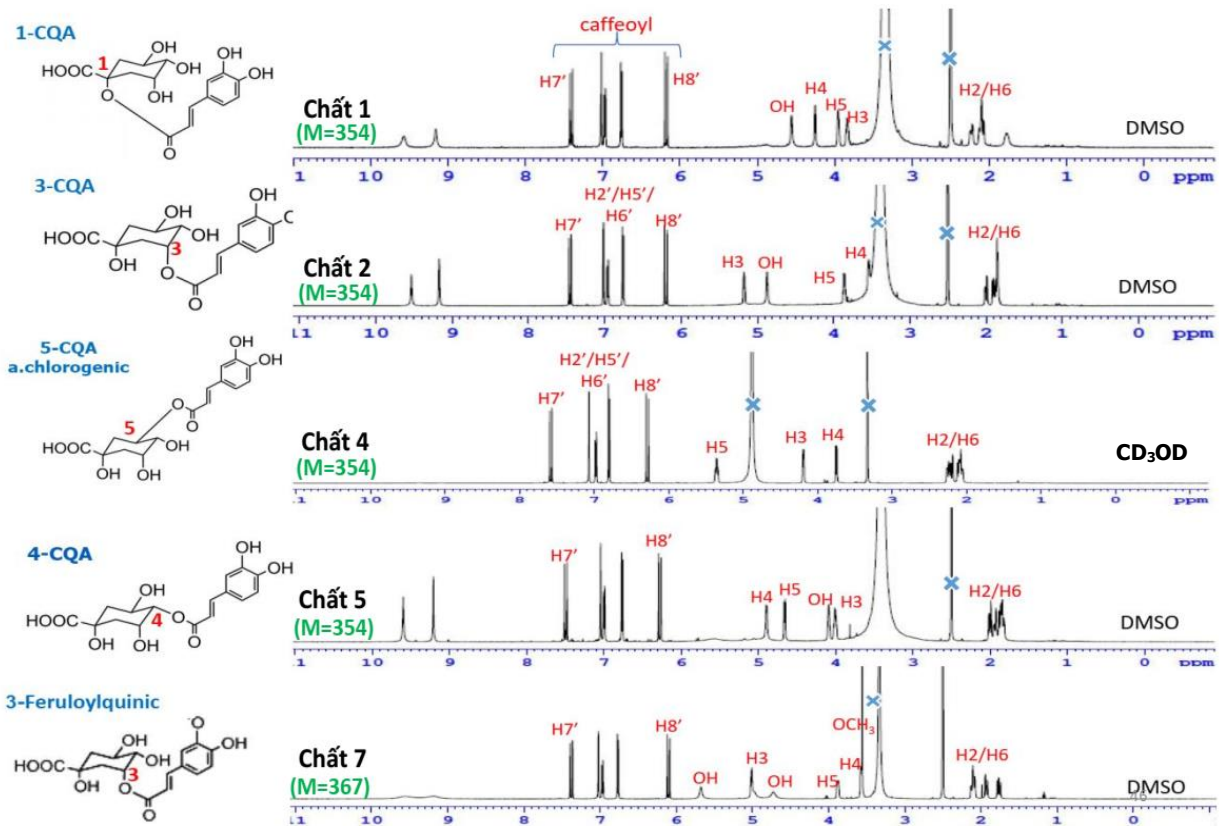
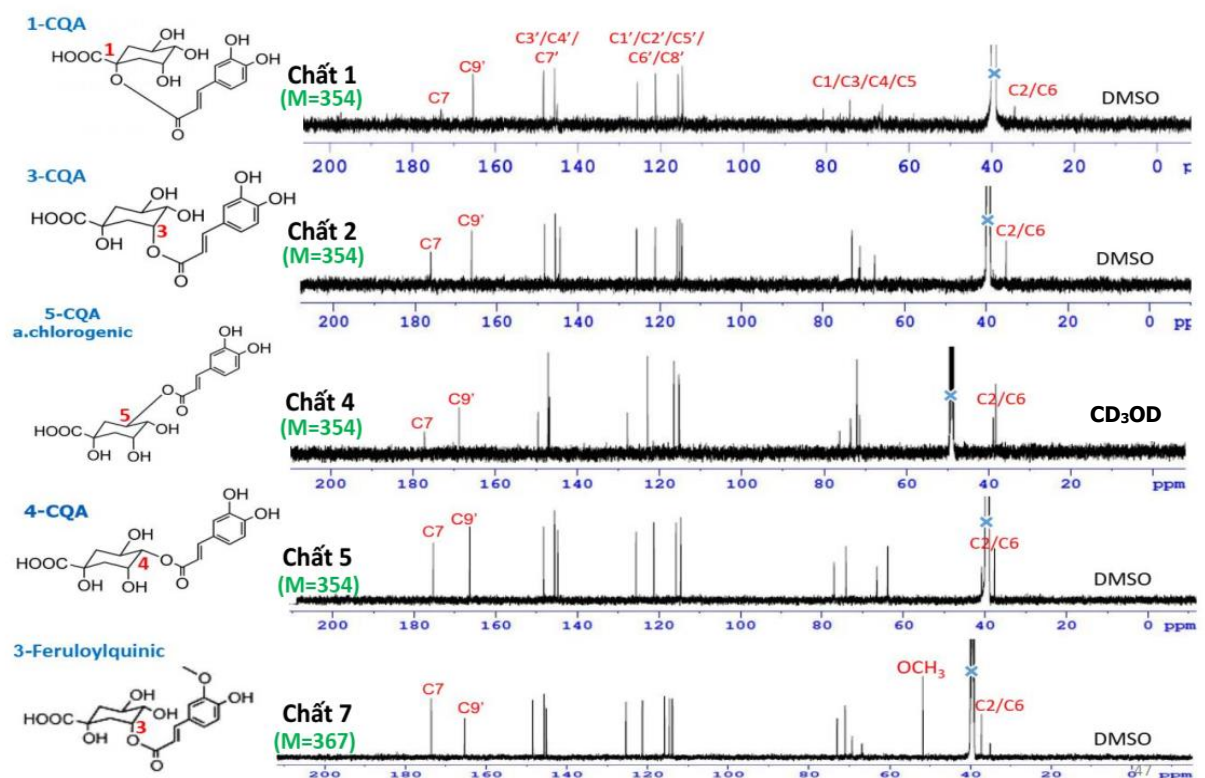


Phụ lục 8. PHỔ MS CỦA 4 FLAVONOID (8, 9, 15, 17)

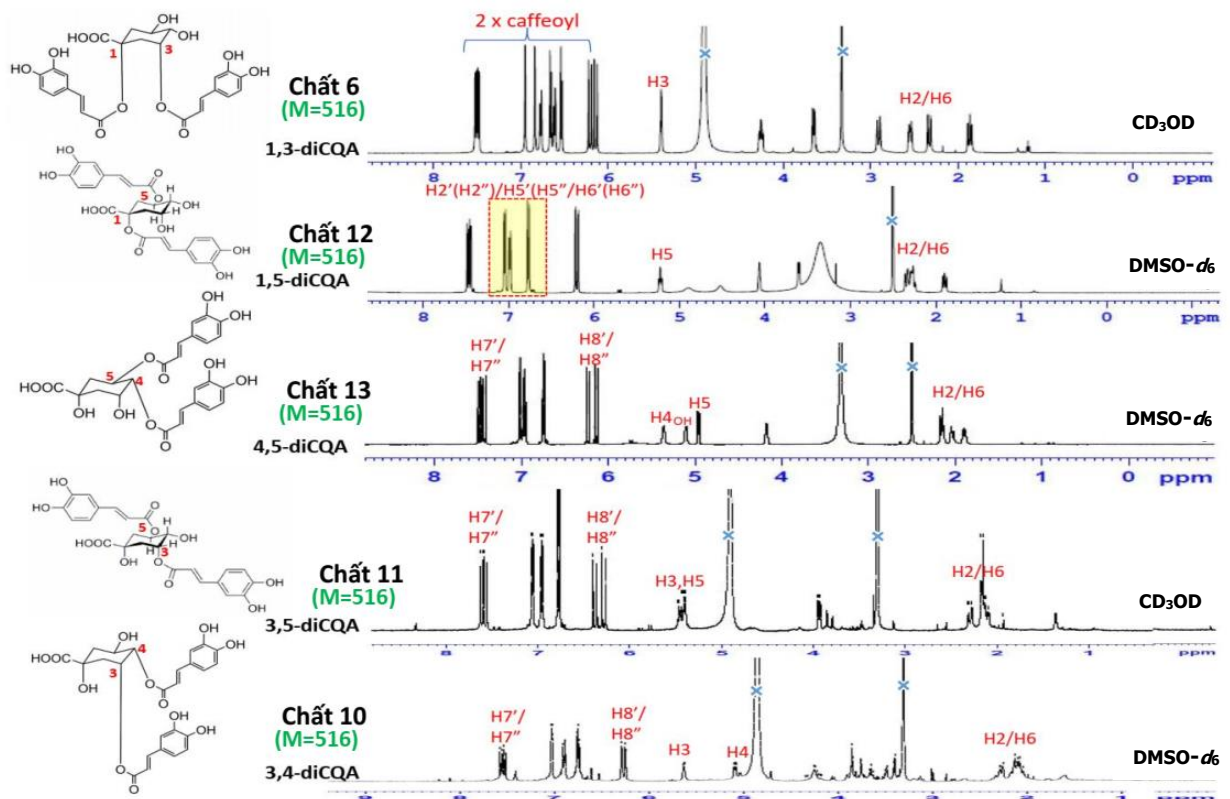
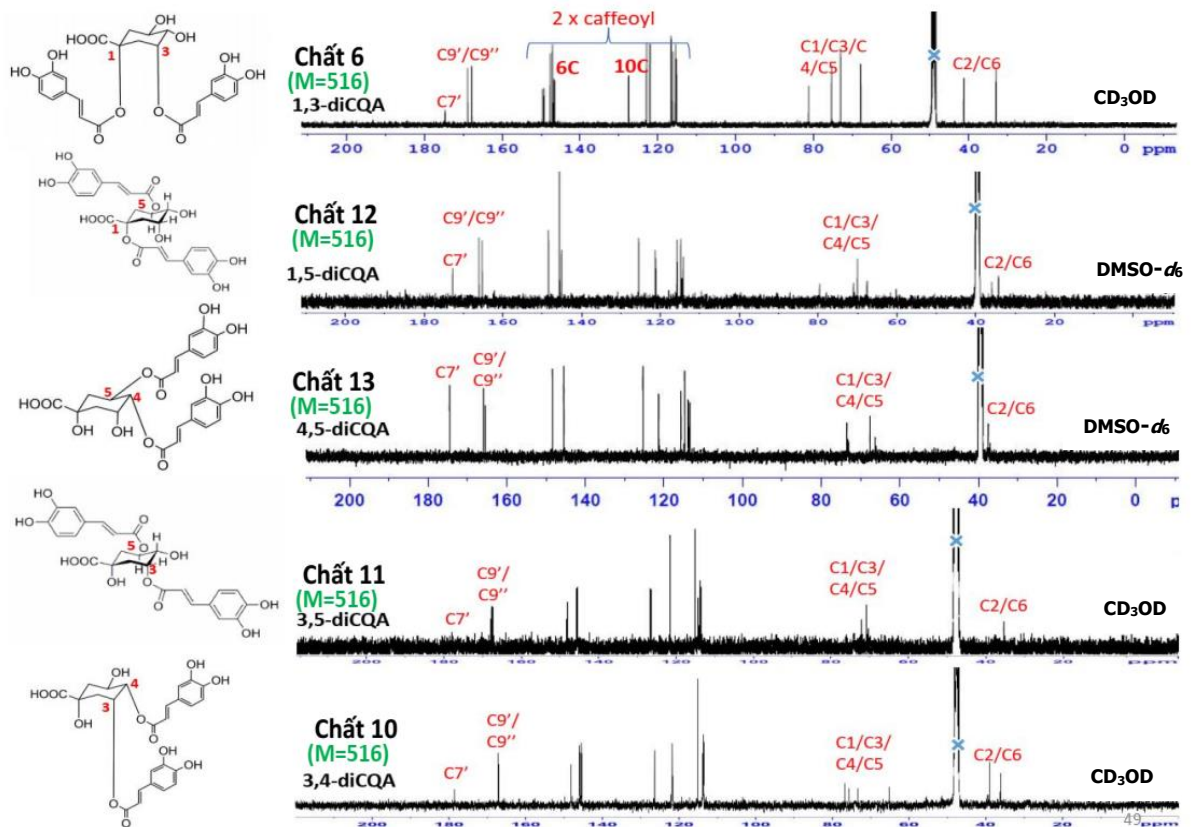
Phụ lục 9. PHỔ MS CỦA HỢP CHẤT 3, 16, 18, 19, 20

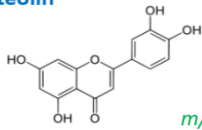
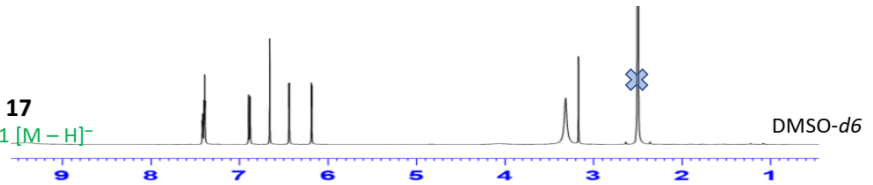
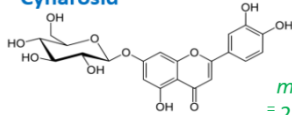
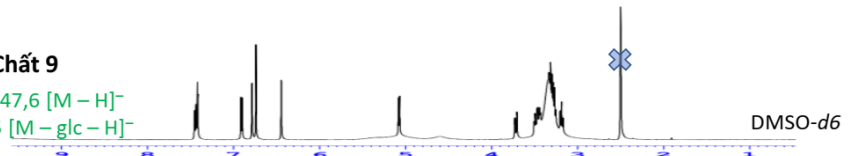
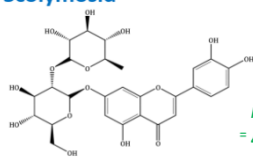
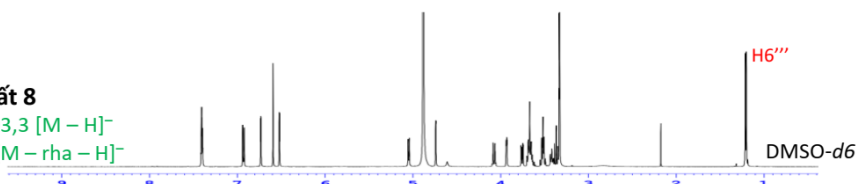
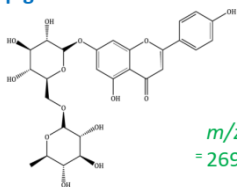
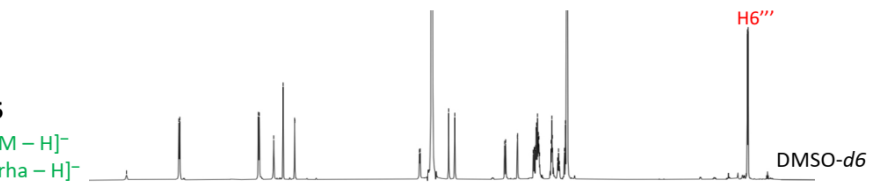


Phụ lục 10. PHỔ NMR CỦA CÁC DẪN XUẤT MONO-CQA

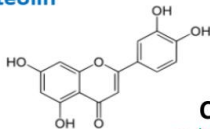
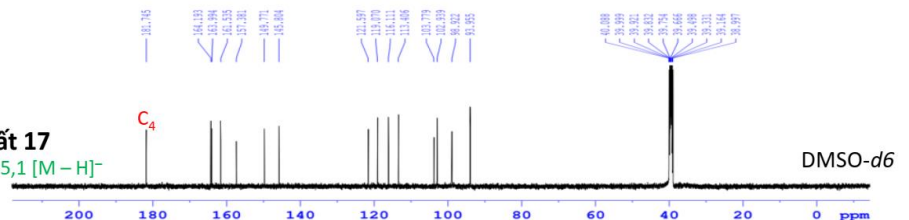
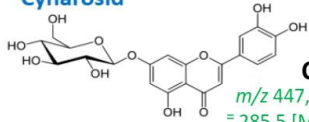
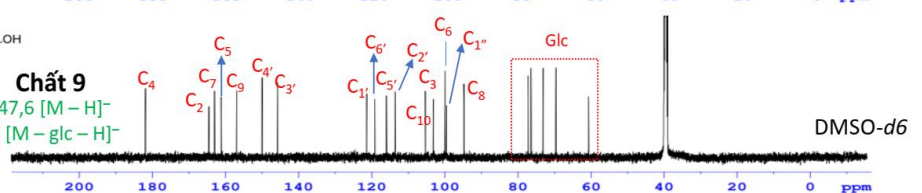
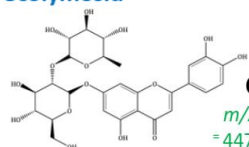
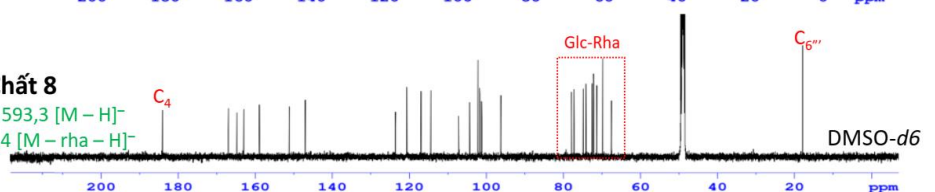
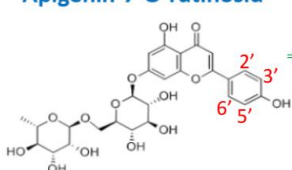
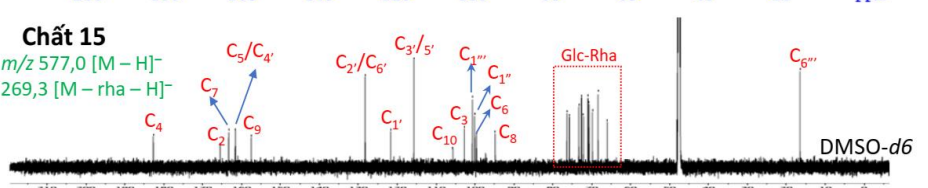
✓ Phổ ^1H -NMR✓ Phổ ^{13}C -NMR

Phụ lục 11. PHỔ NMR CỦA CÁC DẪN XUẤT DI-CQA

✓ Phổ ^1H -NMR✓ Phổ ^{13}C -NMR

Phụ lục 12. **PHỔ NMR CỦA CÁC FLAVONOID**✓ **Phổ ^1H -NMR****Luteolin****Chất 17** m/z 285,1 $[\text{M} - \text{H}]^-$ **Cynarosid****Chất 9** m/z 447,6 $[\text{M} - \text{H}]^-$
 $= 285,5$ $[\text{M} - \text{glc} - \text{H}]^-$ **Scolymosid****Chất 8** m/z 593,3 $[\text{M} - \text{H}]^-$
 $= 447,4$ $[\text{M} - \text{rha} - \text{H}]^-$ **Apigenin-7-O-rutinosid****Chất 15** m/z 577,0 $[\text{M} - \text{H}]^-$
 $= 269,3$ $[\text{M} - \text{rha} - \text{H}]^-$ 

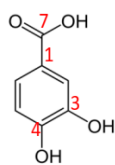
51

✓ **Phổ ^{13}C -NMR****Luteolin****Chất 17** m/z 285,1 $[\text{M} - \text{H}]^-$ **Cynarosid****Chất 9** m/z 447,6 $[\text{M} - \text{H}]^-$
 $= 285,5$ $[\text{M} - \text{glc} - \text{H}]^-$ **Scolymosid****Chất 8** m/z 593,3 $[\text{M} - \text{H}]^-$
 $= 447,4$ $[\text{M} - \text{rha} - \text{H}]^-$ **Apigenin-7-O-rutinosid****Chất 15** m/z 577,0 $[\text{M} - \text{H}]^-$
 $= 269,3$ $[\text{M} - \text{rha} - \text{H}]^-$ 

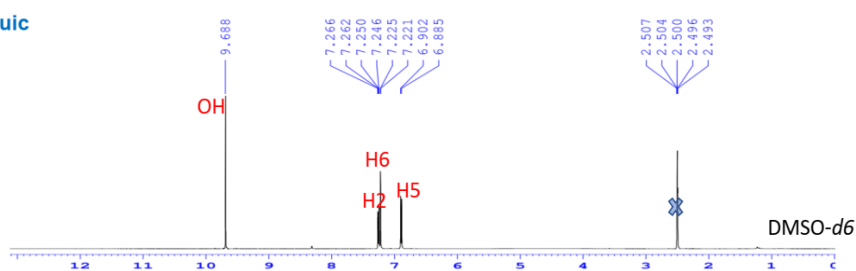
Phụ lục 13. PHỔ NMR CỦA CÁC DẪN XUẤT ACID BENZOIC

a. Phổ ^1H -NMRPhổ ^1H -NMR của dẫn xuất a. benzoic

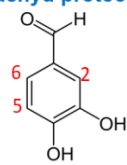
Acid protocatechuic



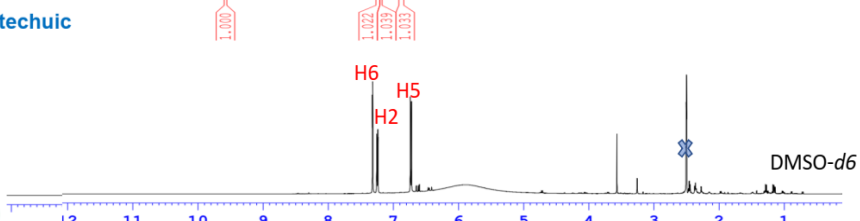
Chất 19 (M=138)



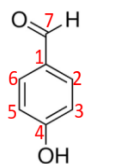
Aldehyd protocatechuic



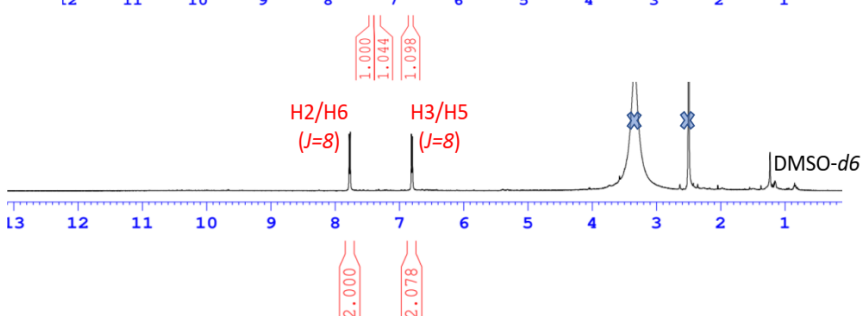
Chất 18 (M=154)



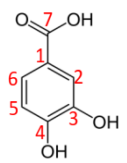
4-hydroxybenzoic



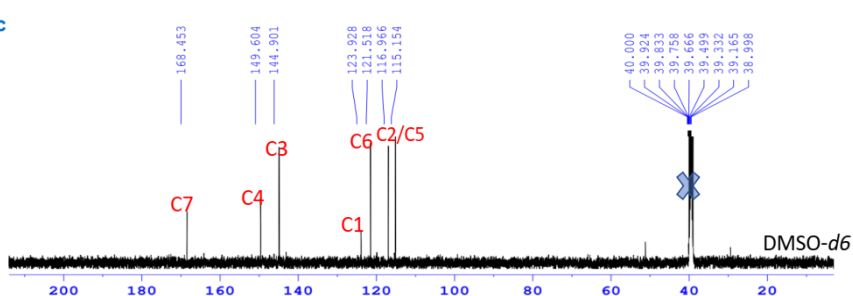
Chất 20 (M=122)

b. Phổ ^{13}C -NMR

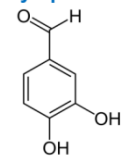
Acid protocatechuic



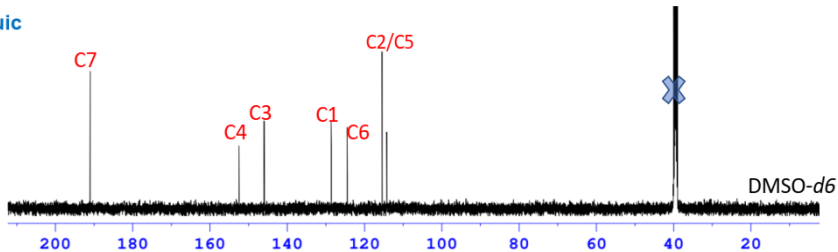
Chất 19 (M=138)



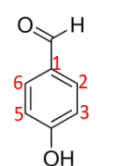
Aldehyd protocatechuic



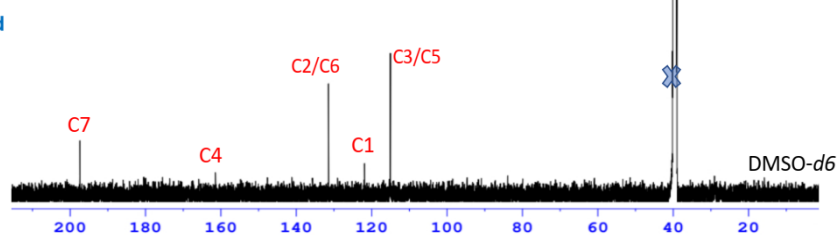
Chất 18 (M=154)



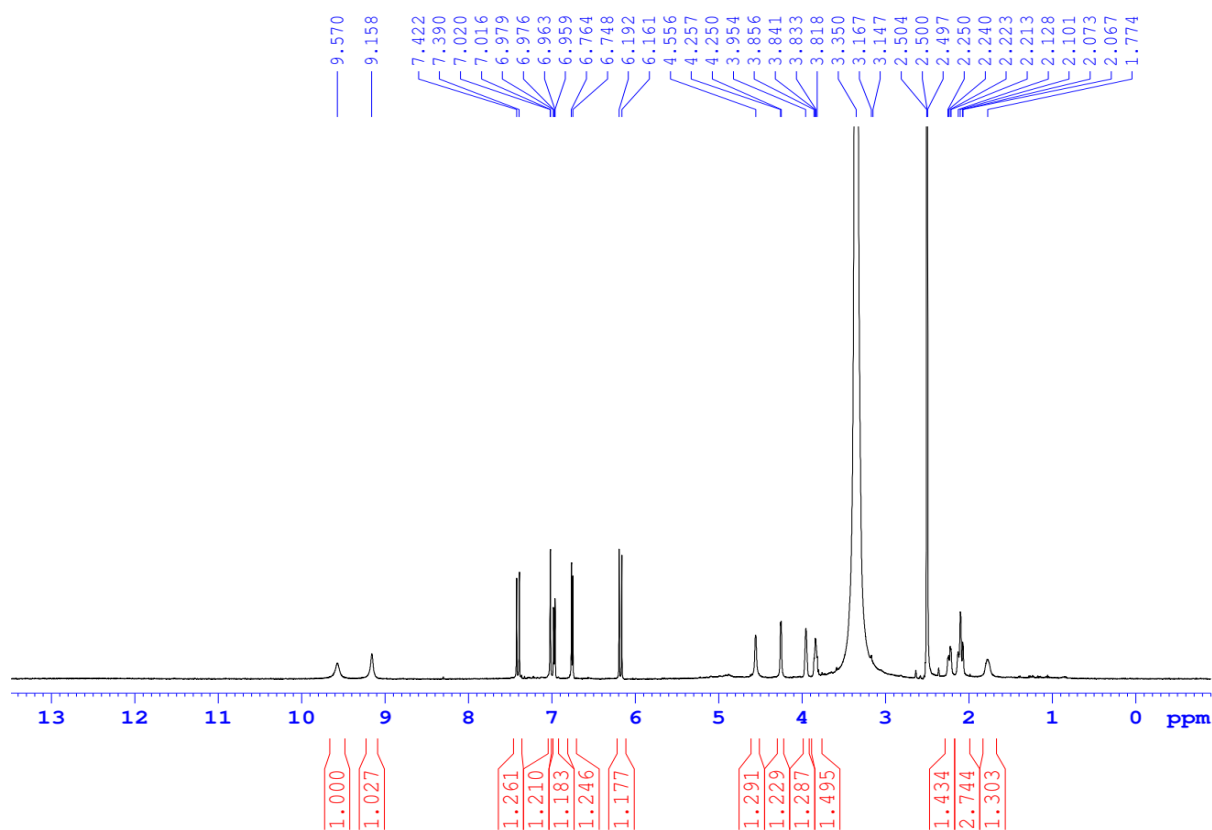
4-hydroxybenzaldehyd



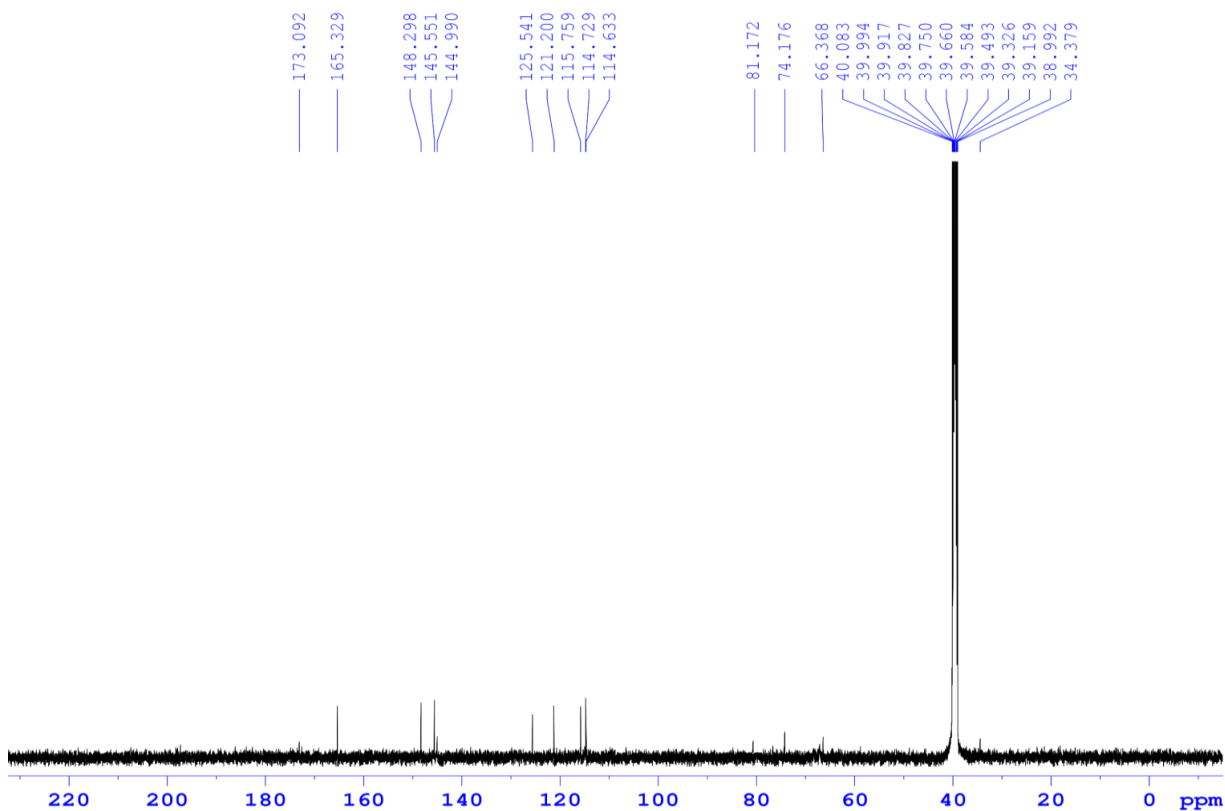
Chất 20 (M=122)



Phụ lục 14. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 1 (1-CQA)



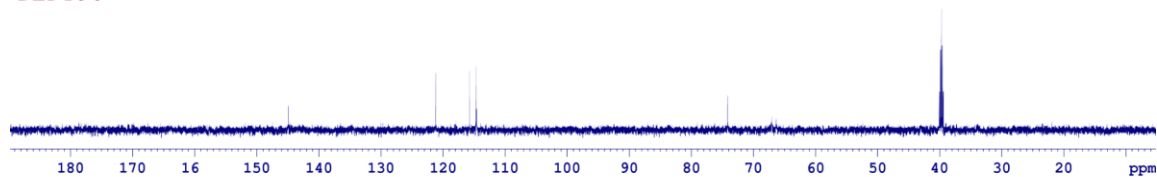
Hình PL-5. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất 1 (1-CQA)



Hình PL-6. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) của hợp chất 1 (1-CQA)

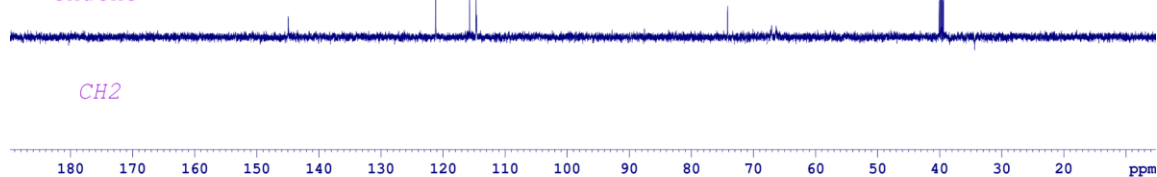
PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 1 (1-CQA)

DEPT90

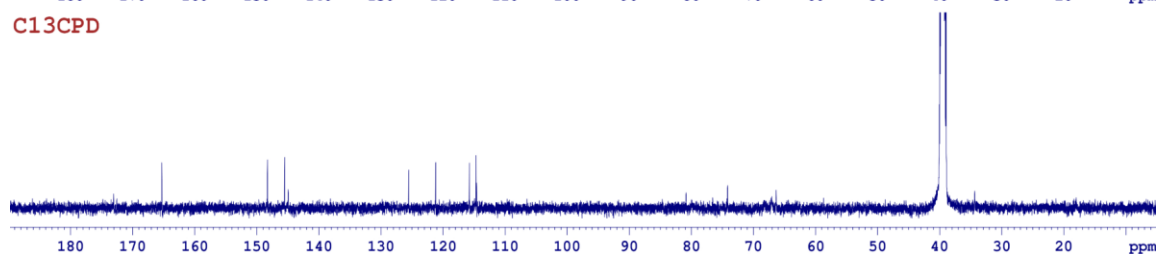
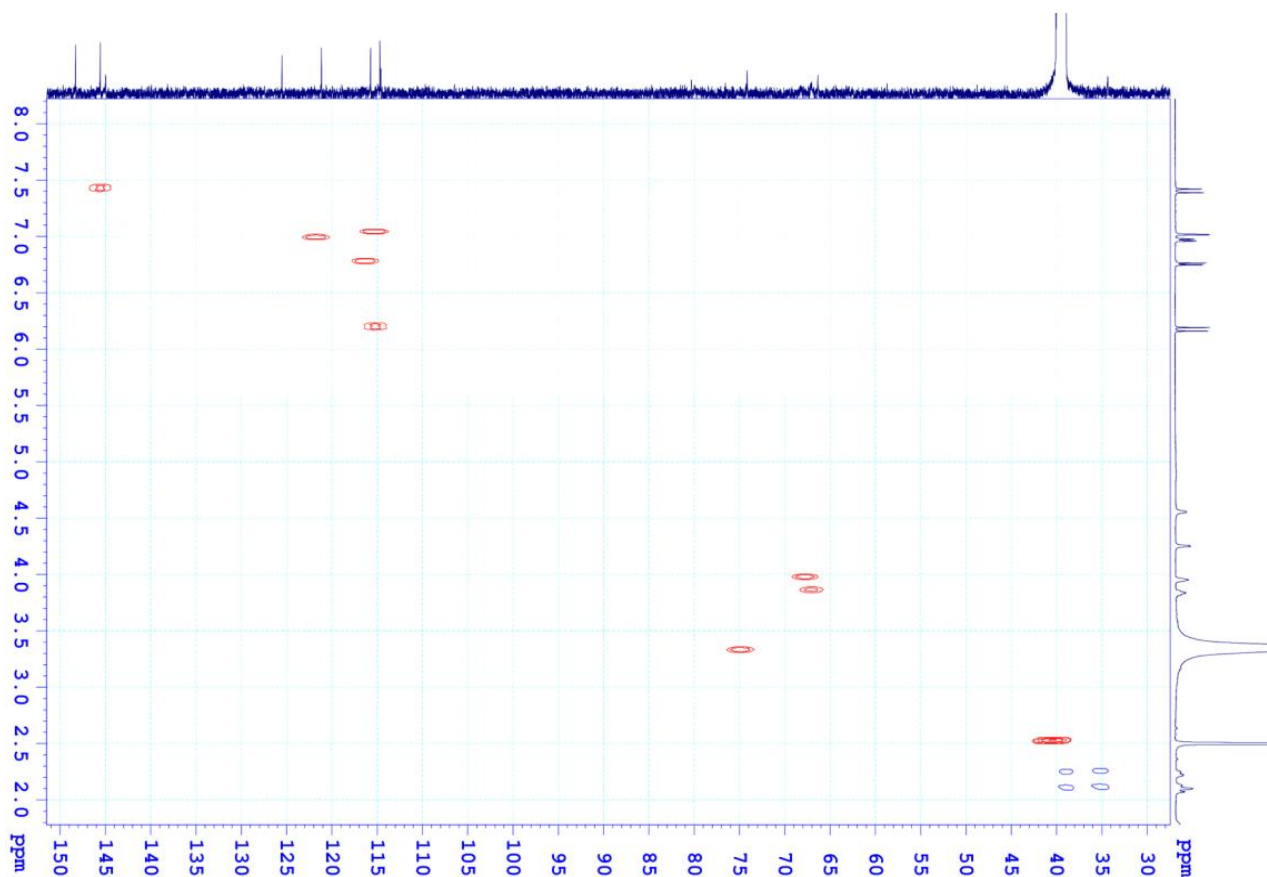


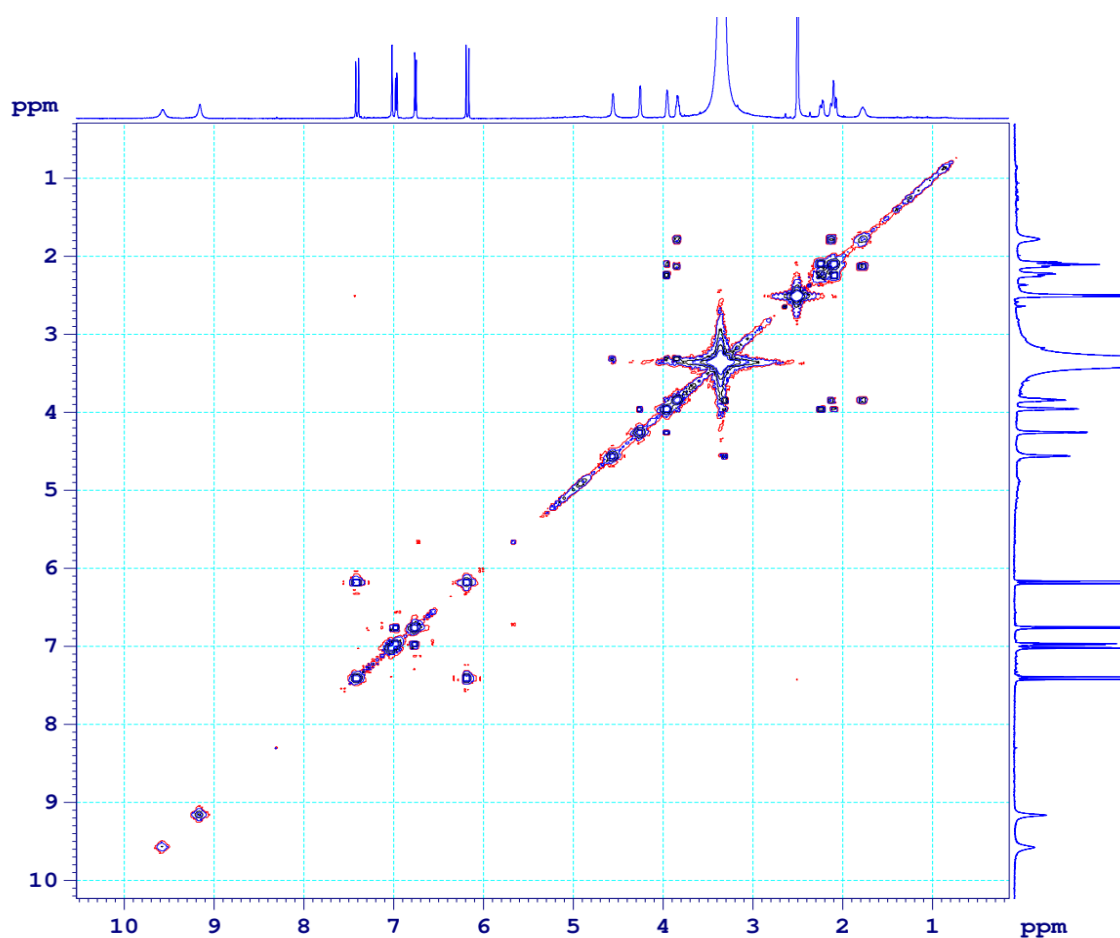
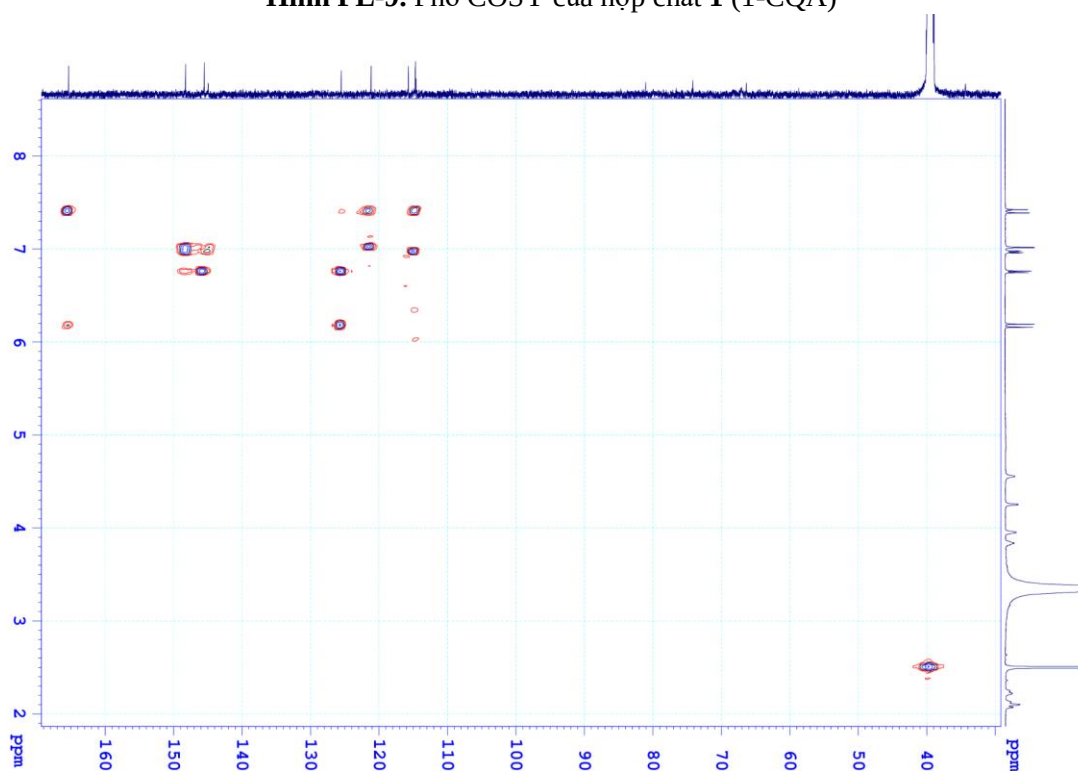
DEPT135

CH&CH3

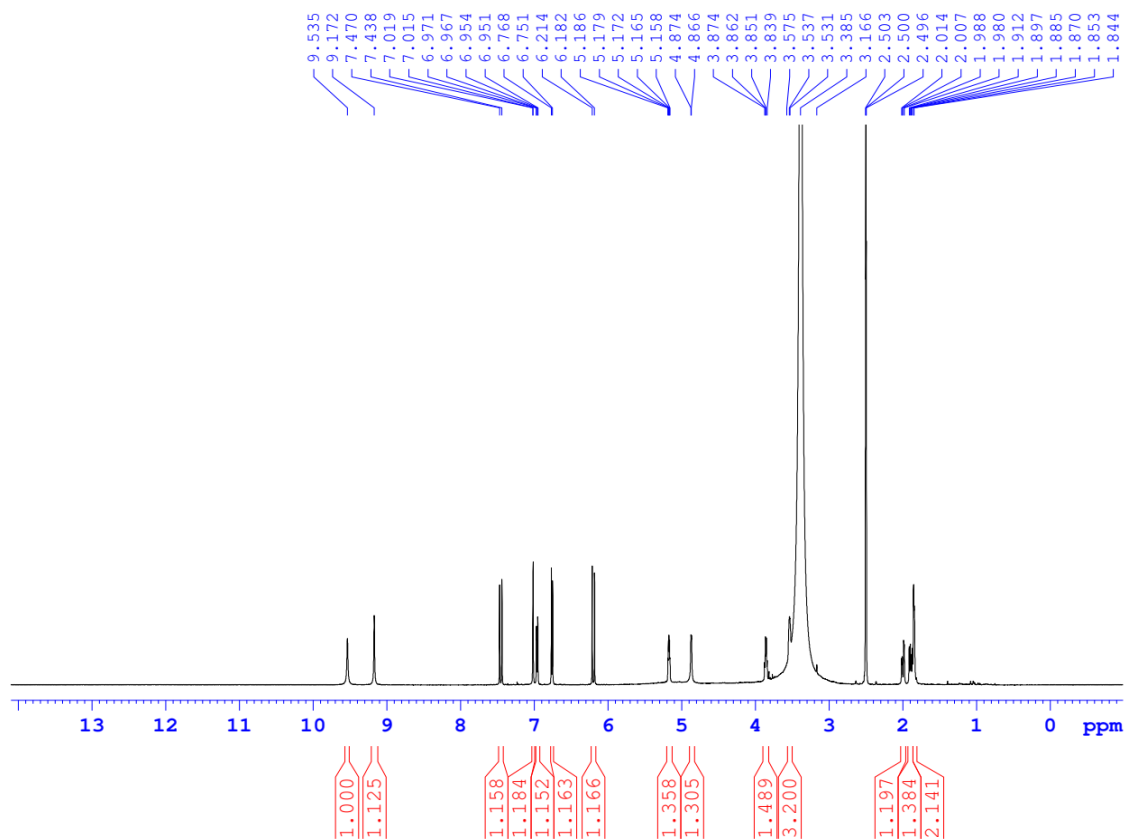


CH2

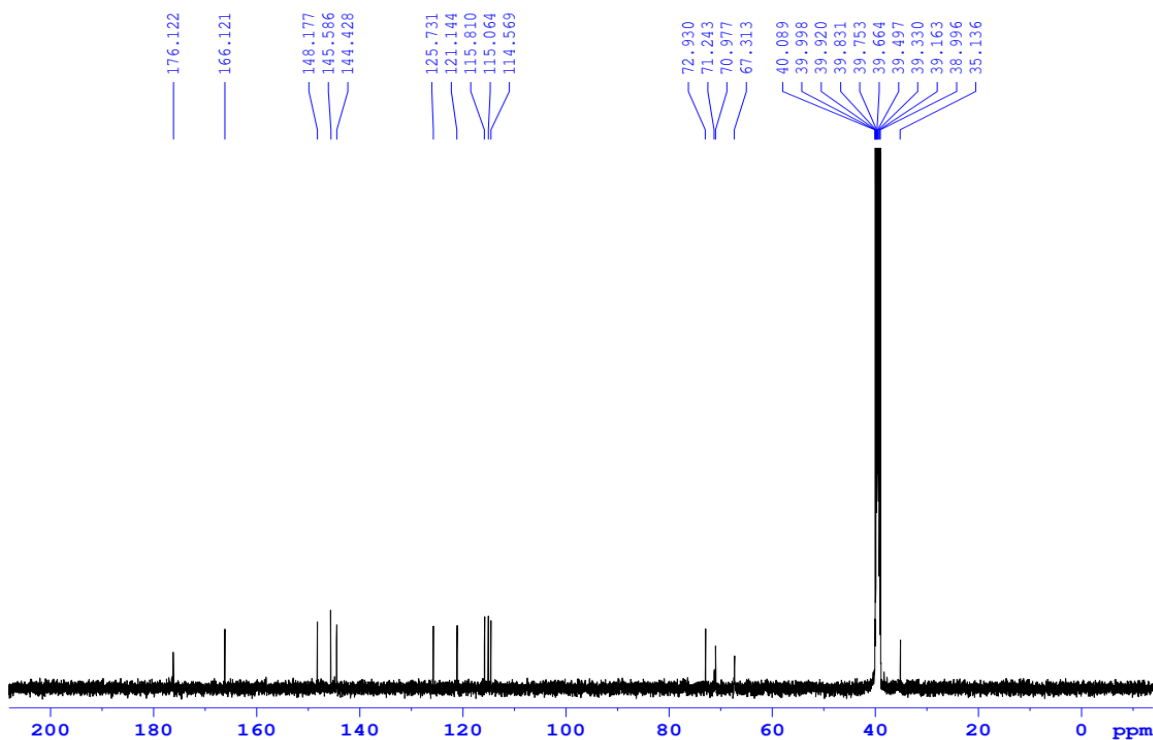
**Hình PL-7. Phổ DEPT của hợp chất 1 (1-CQA)****Hình PL-8. Phổ HSQC của hợp chất 1 (1-CQA)**

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 1 (1-CQA)**Hình PL-9.** Phổ COSY của hợp chất **1** (1-CQA)**Hình PL-10.** Phổ HMBC của hợp chất **1** (1-CQA)

Phụ lục 15. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 2 (3-CQA)



Hình PL-11. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất 2 (3-CQA)

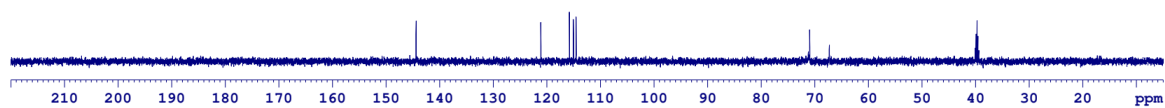


Hình PL-12. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) của hợp chất 2 (3-CQA)

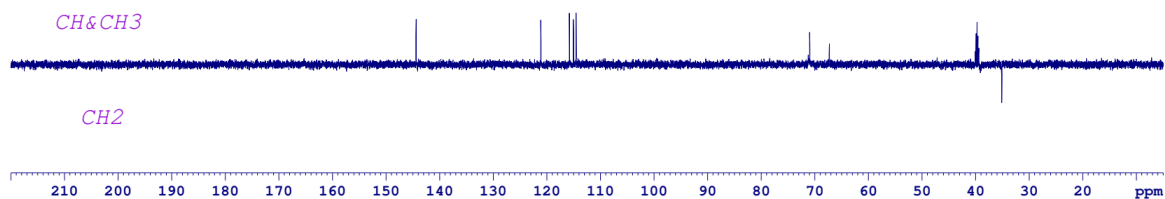
PL.23

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 2 (3-CQA)

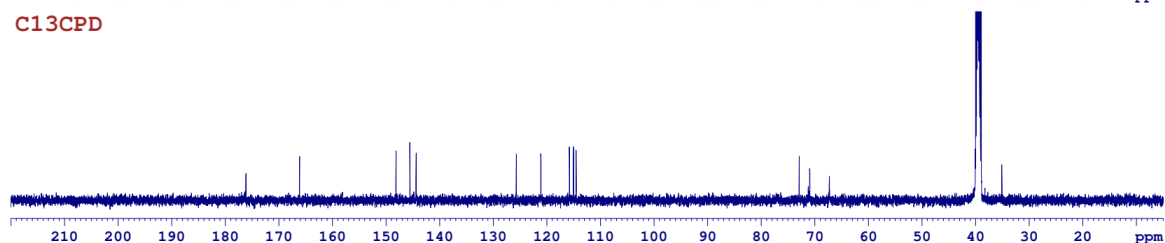
DEPT90



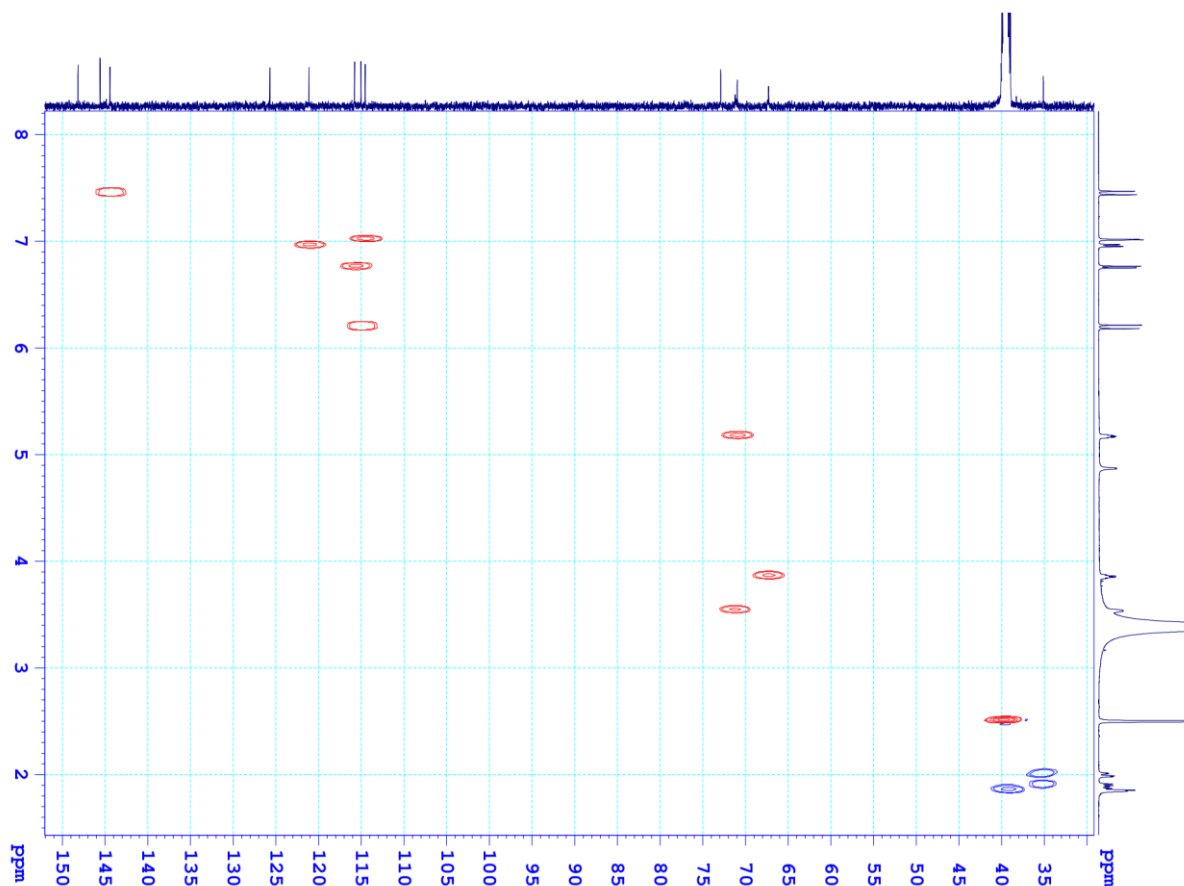
DEPT135



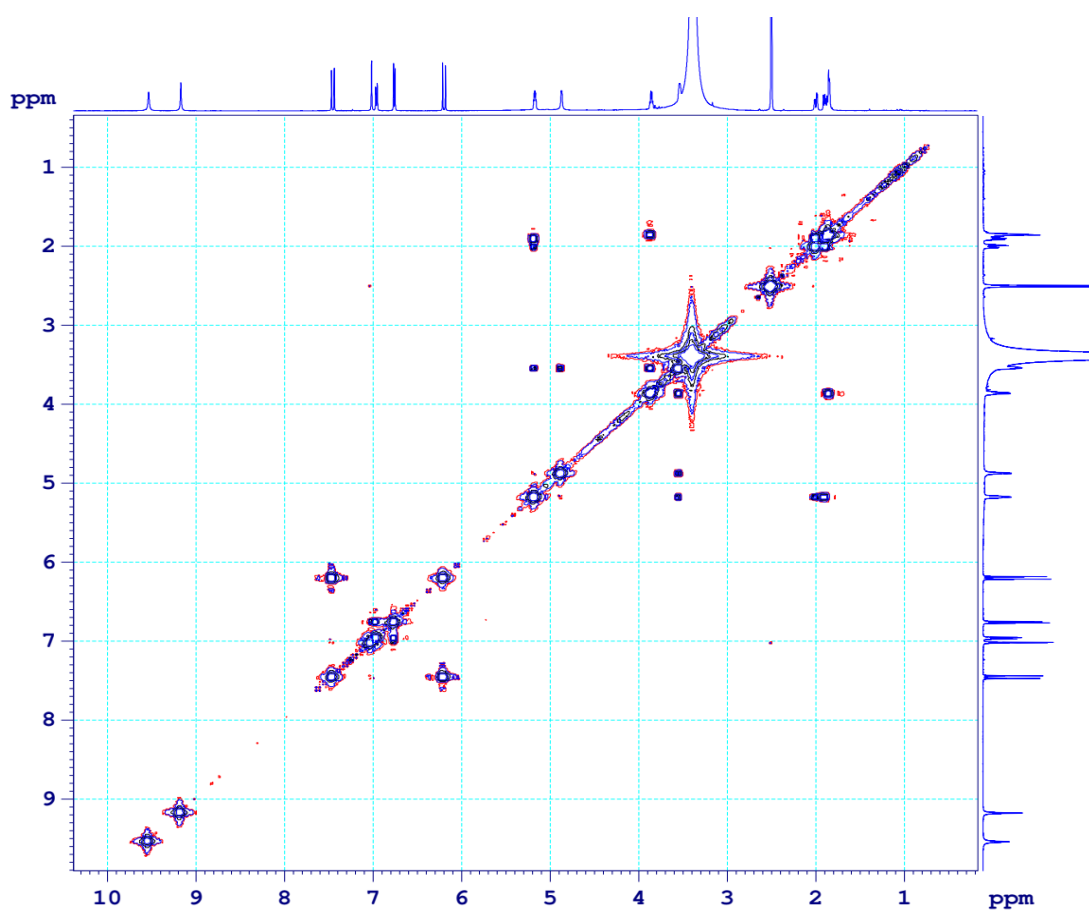
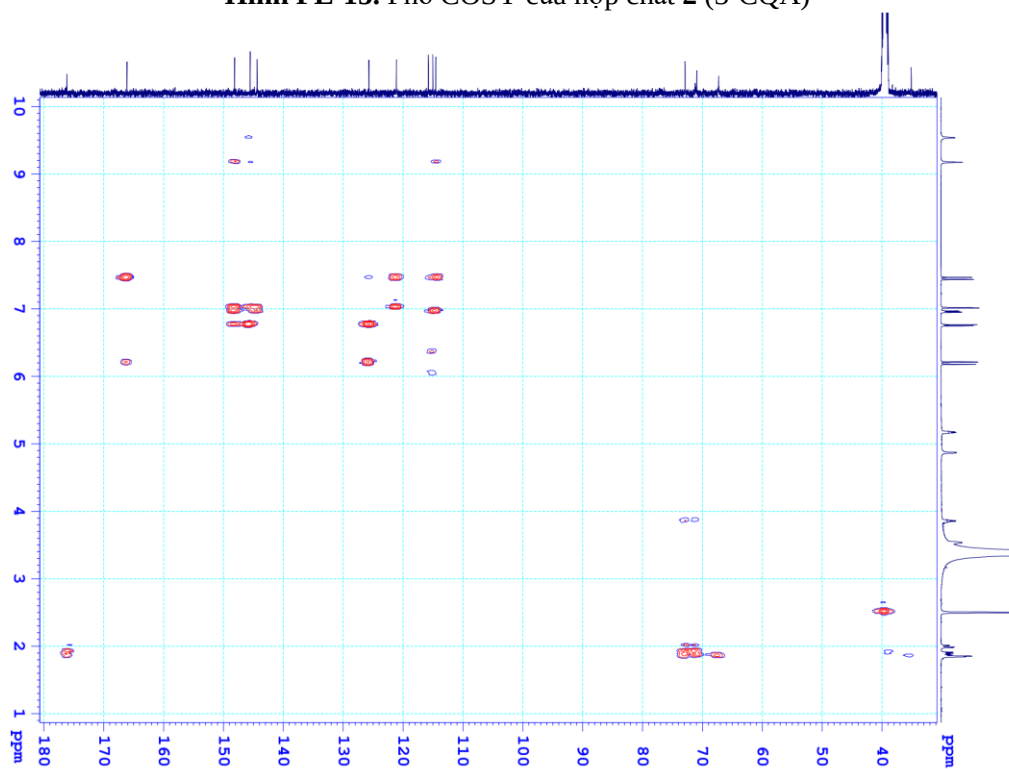
C13CPD



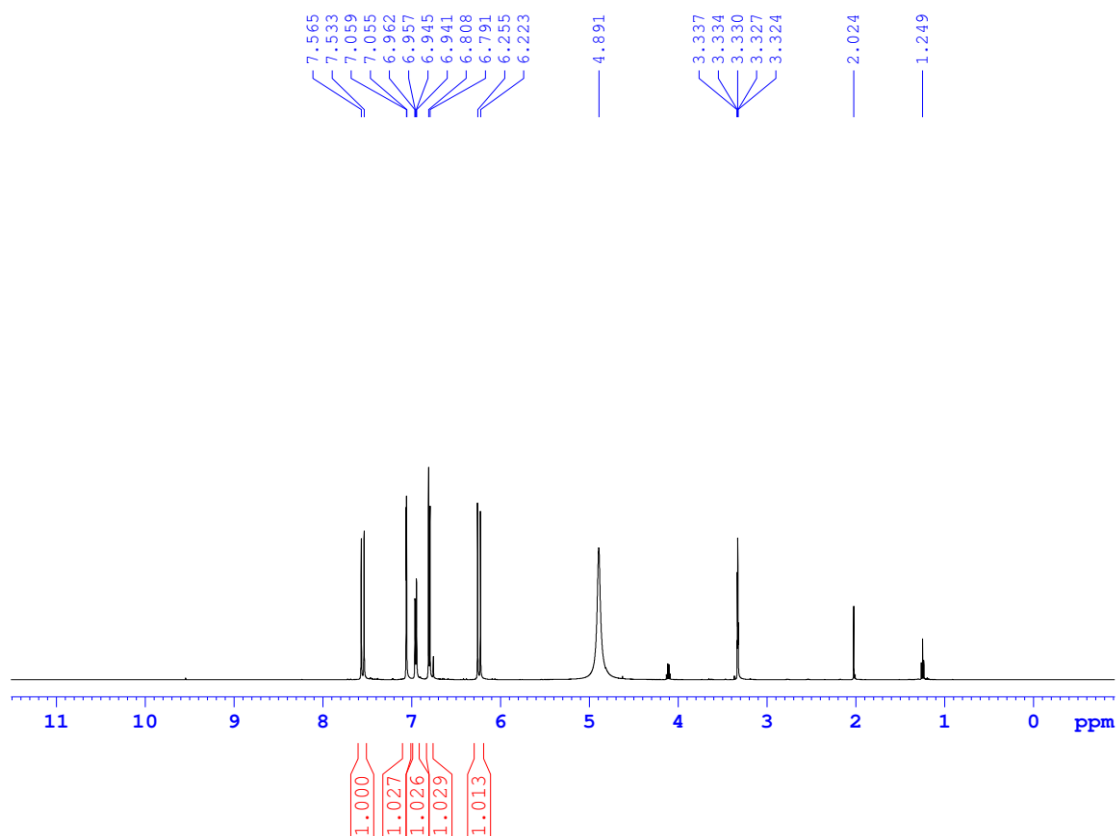
Hình PL-13. Phổ DEPT của hợp chất 2 (3-CQA)



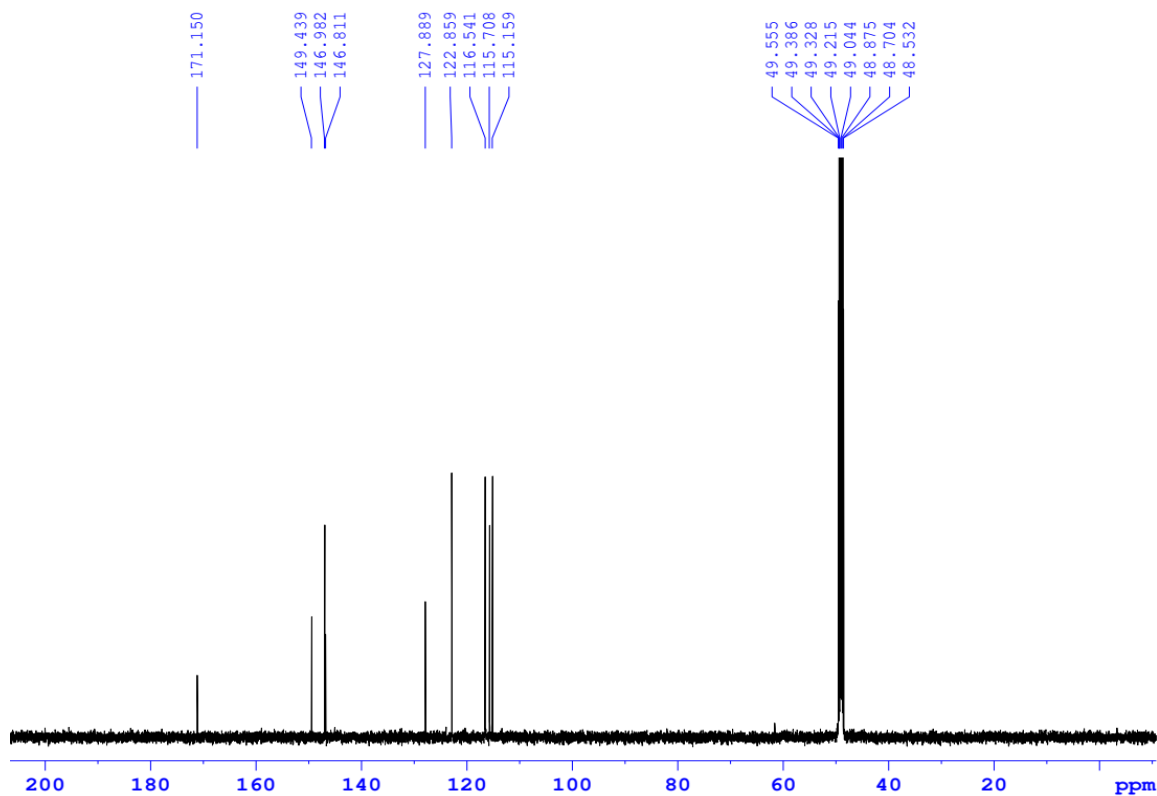
Hình PL-14. Phổ HSQC của hợp chất 2 (3-CQA)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 2 (3-CQA)**Hình PL-15.** Phổ COSY của hợp chất 2 (3-CQA)**Hình PL-16.** Phổ HMBC của hợp chất 2 (3-CQA)

Phụ lục 16. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 3 (Acid caffeic)

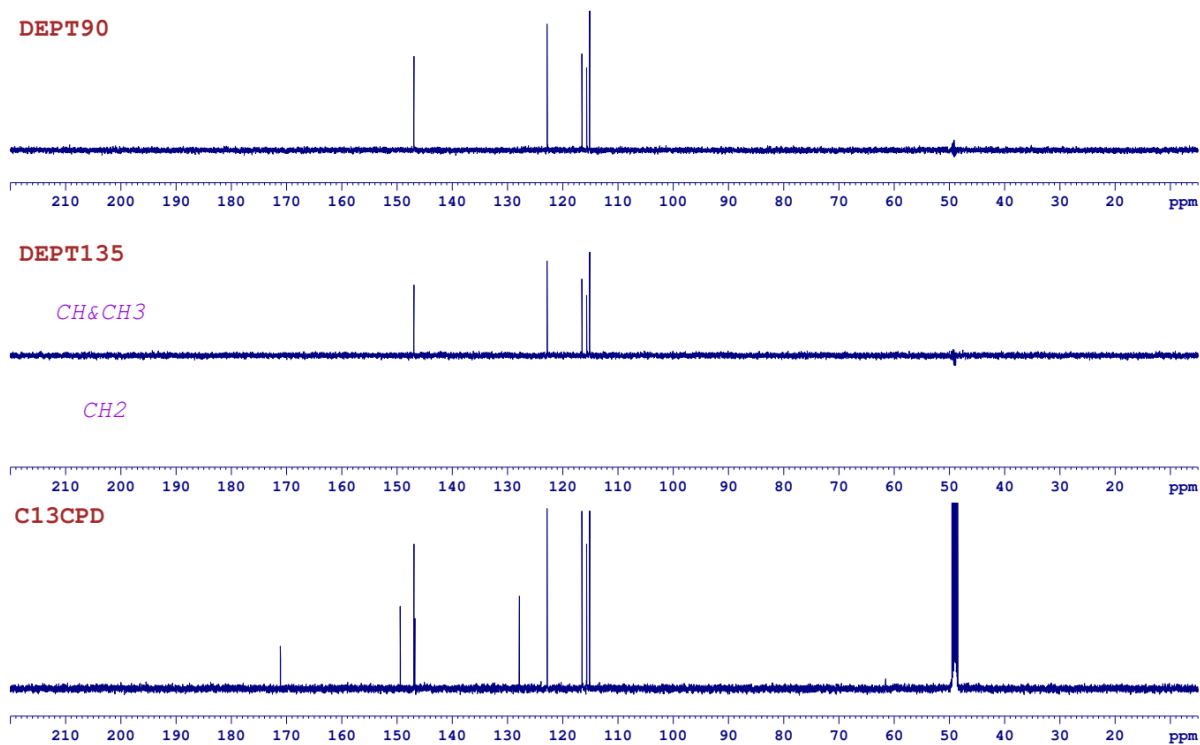


Hình PL-17. Phổ ¹H-NMR (CD₃OD; 500 MHz) của hợp chất 3 (acid caffeic)

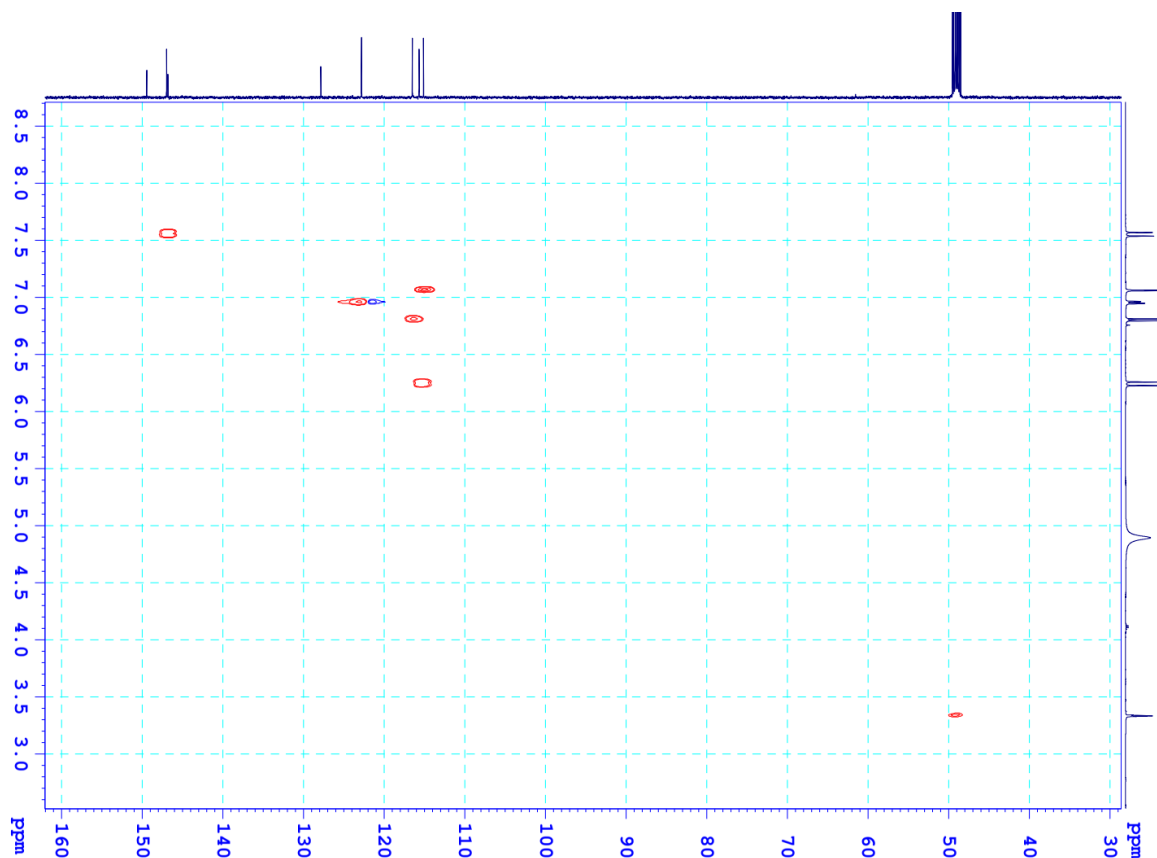


Hình PL-18. Phổ ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) của hợp chất 3 (acid caffeic)

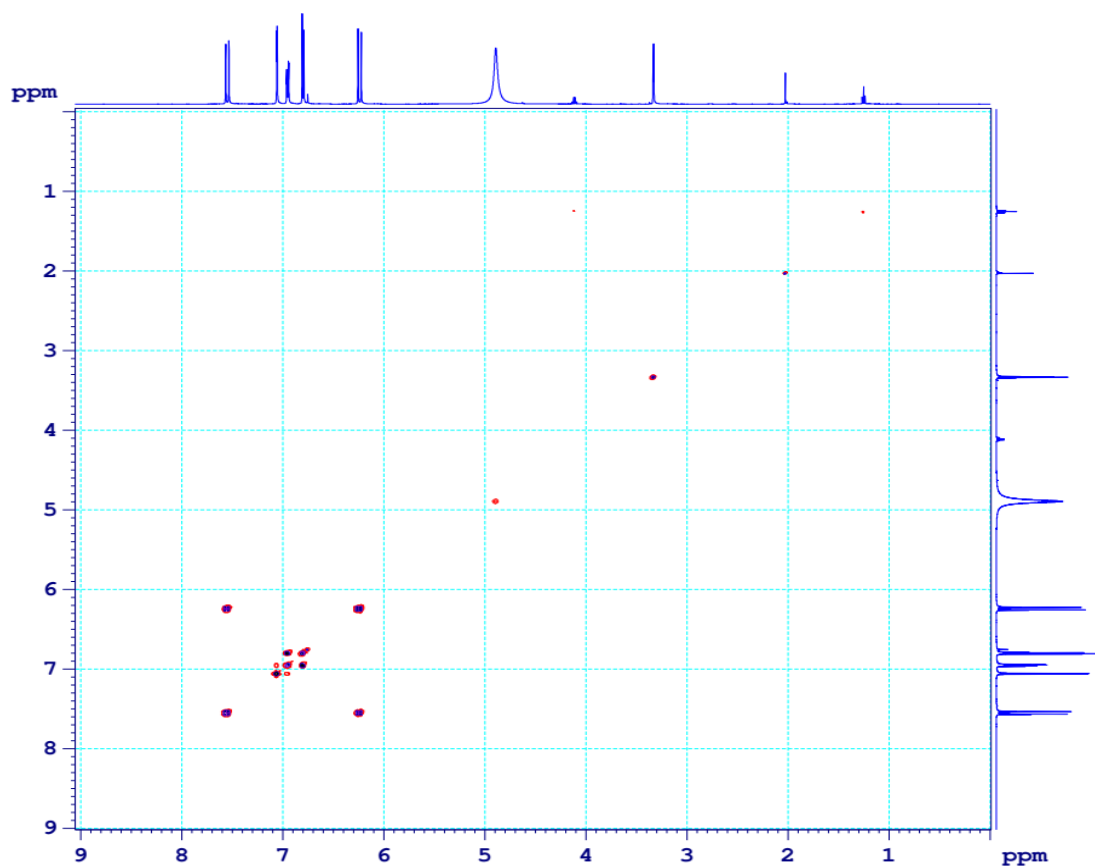
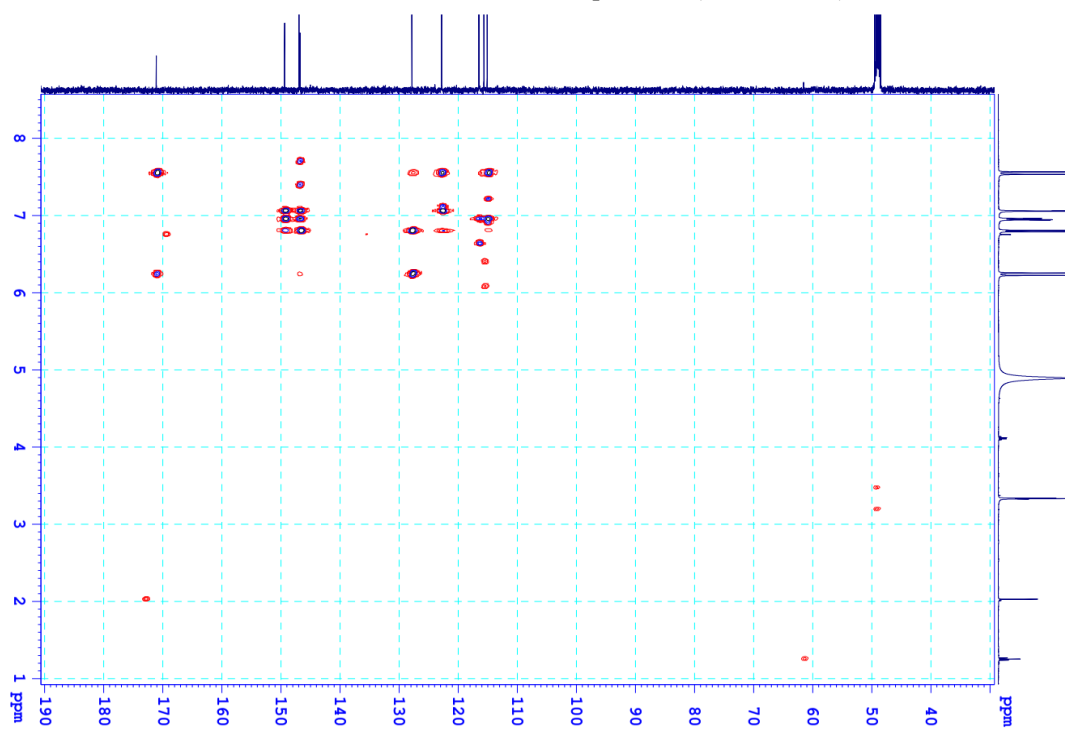
PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 3 (Acid caffeic)



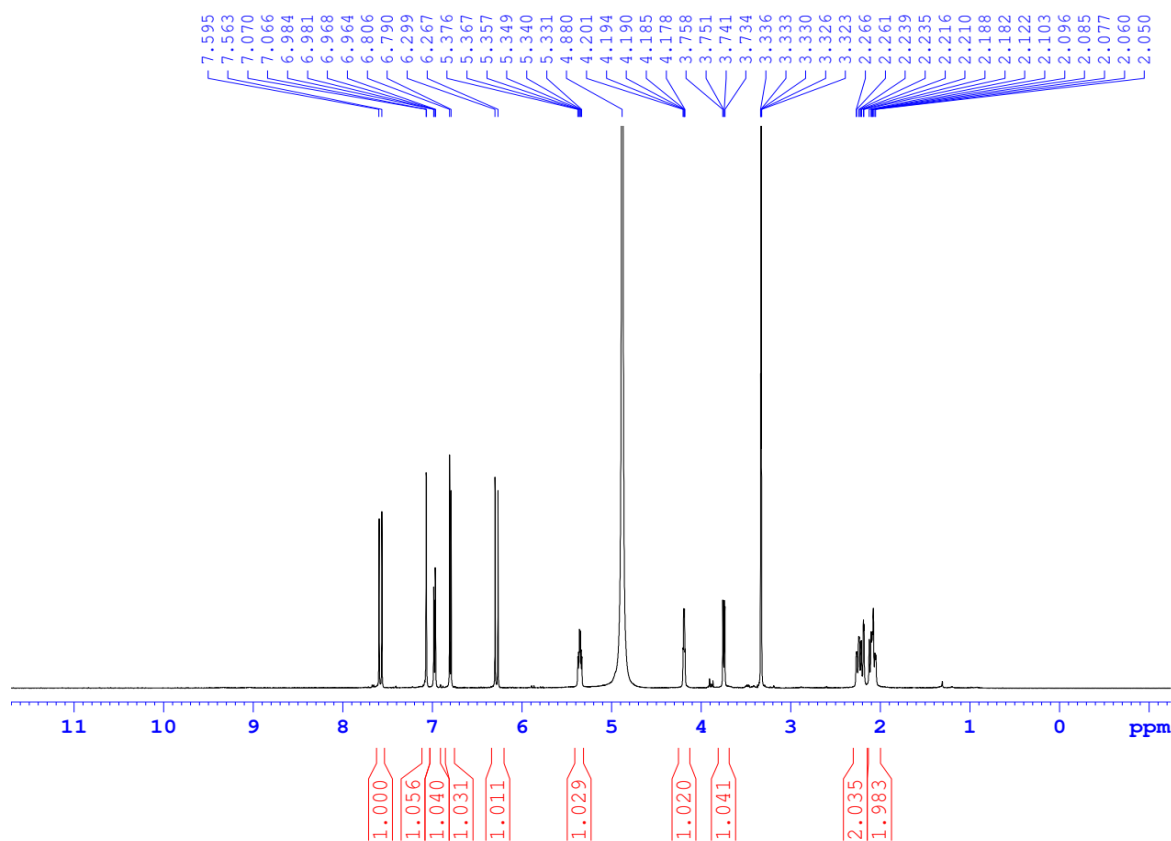
Hình PL-19. Phổ DEPT của hợp chất 3 (acid caffeic)



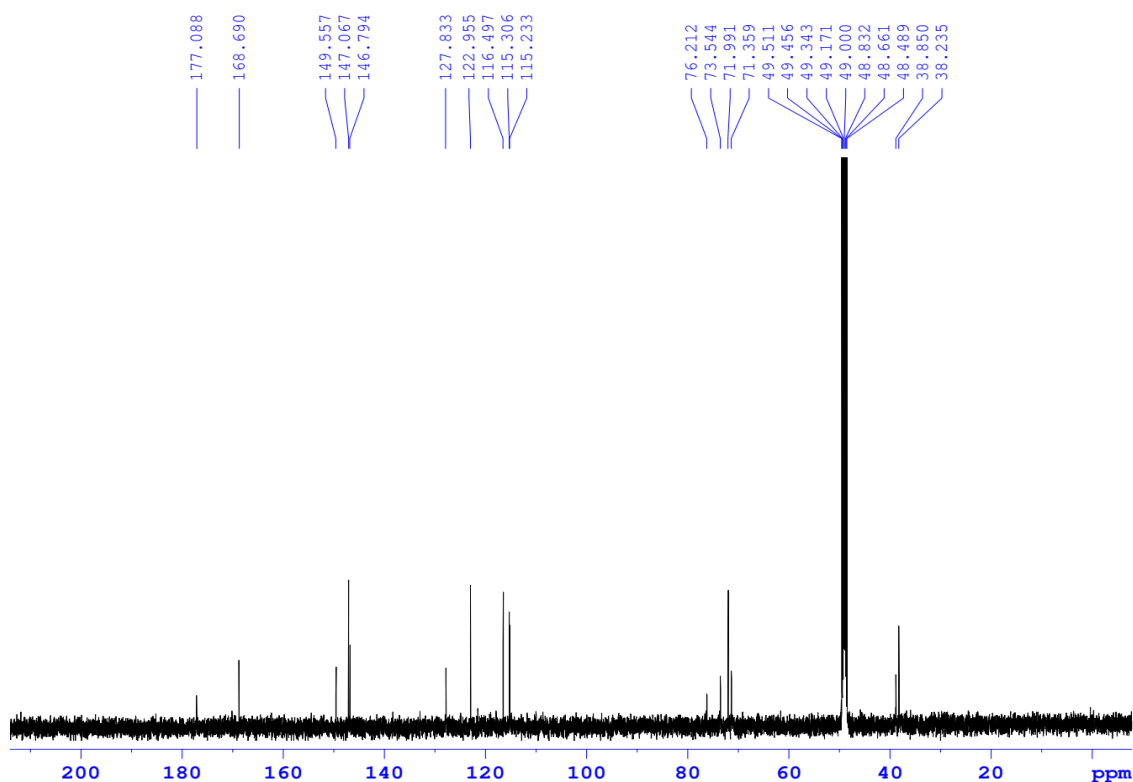
Hình PL-20. Phổ HSQC của hợp chất 3 (acid caffeic)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 3 (Acid caffeic)**Hình PL-21. Phổ COSY của hợp chất 3 (acid caffeic)****Hình PL-22. Phổ HMBC của hợp chất 3 (acid caffeic)**

Phụ lục 17. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 4 (5-CQA=acid chlorogenic)



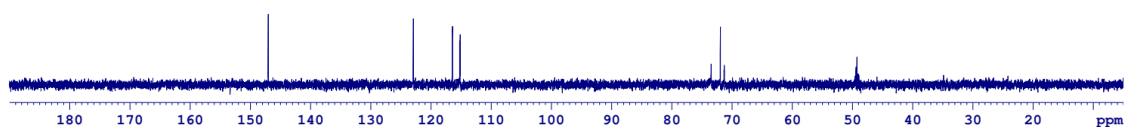
Hình PL-23. Phổ ¹H-NMR (CD₃OD; 500 MHz) của hợp chất 4 (5-CQA=acid chlorogenic)



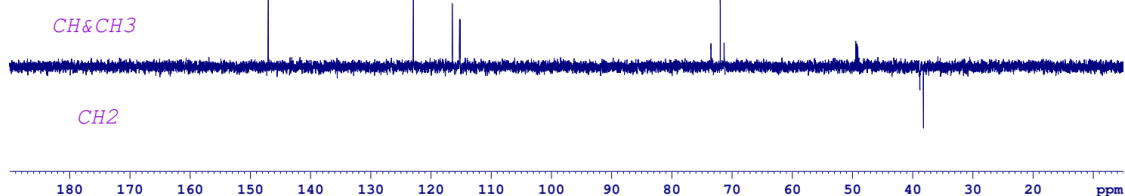
Hình PL-24. Phổ ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) của hợp chất 4 (5-CQA=acid chlorogenic)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 4 (5-CQA=acid chlorogenic)

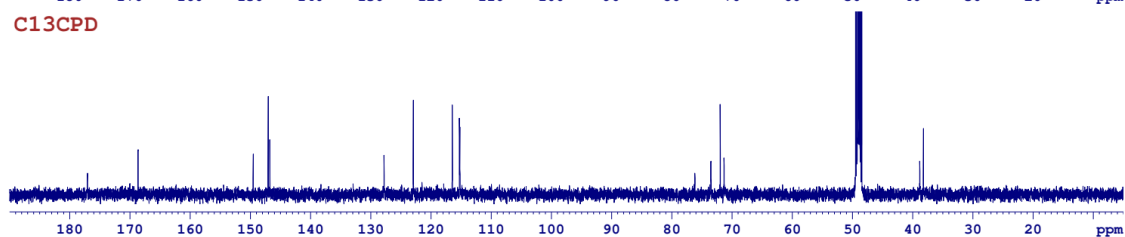
DEPT90



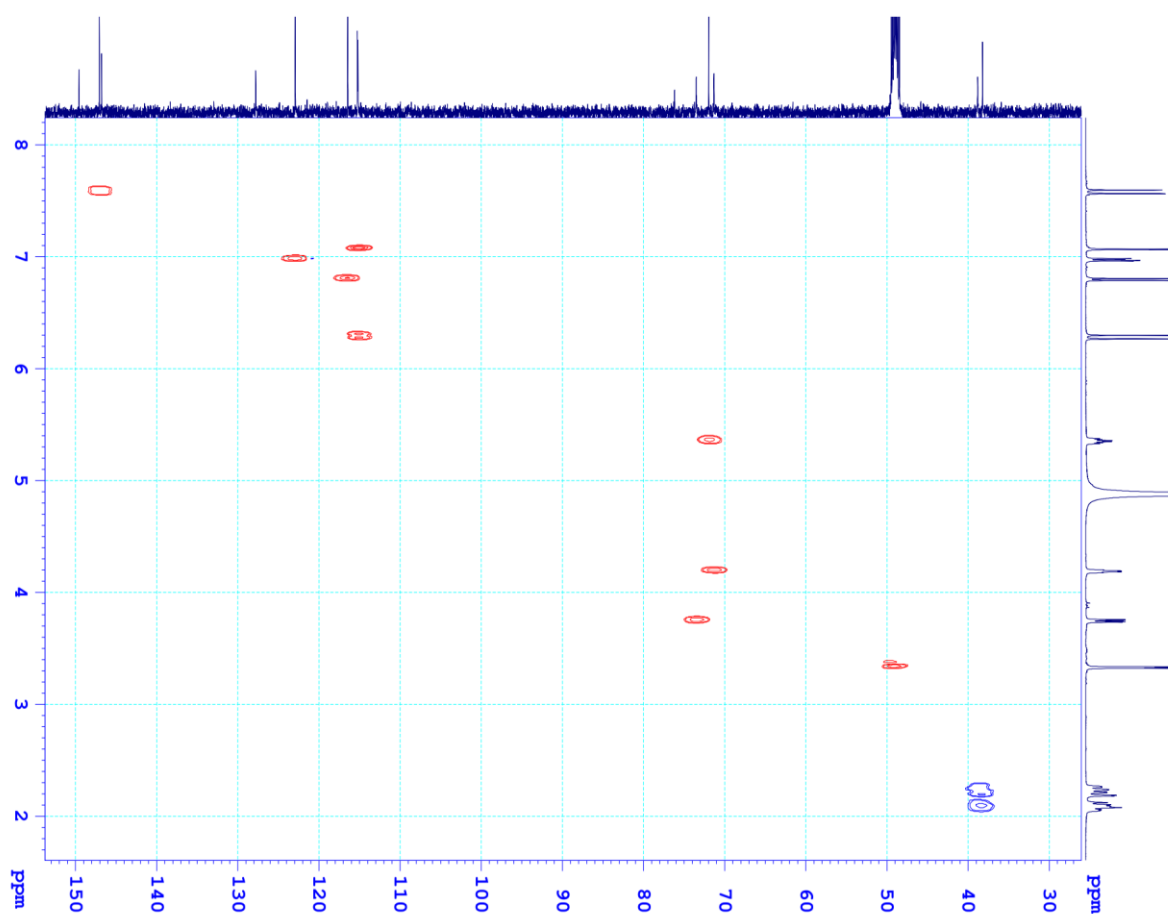
DEPT135



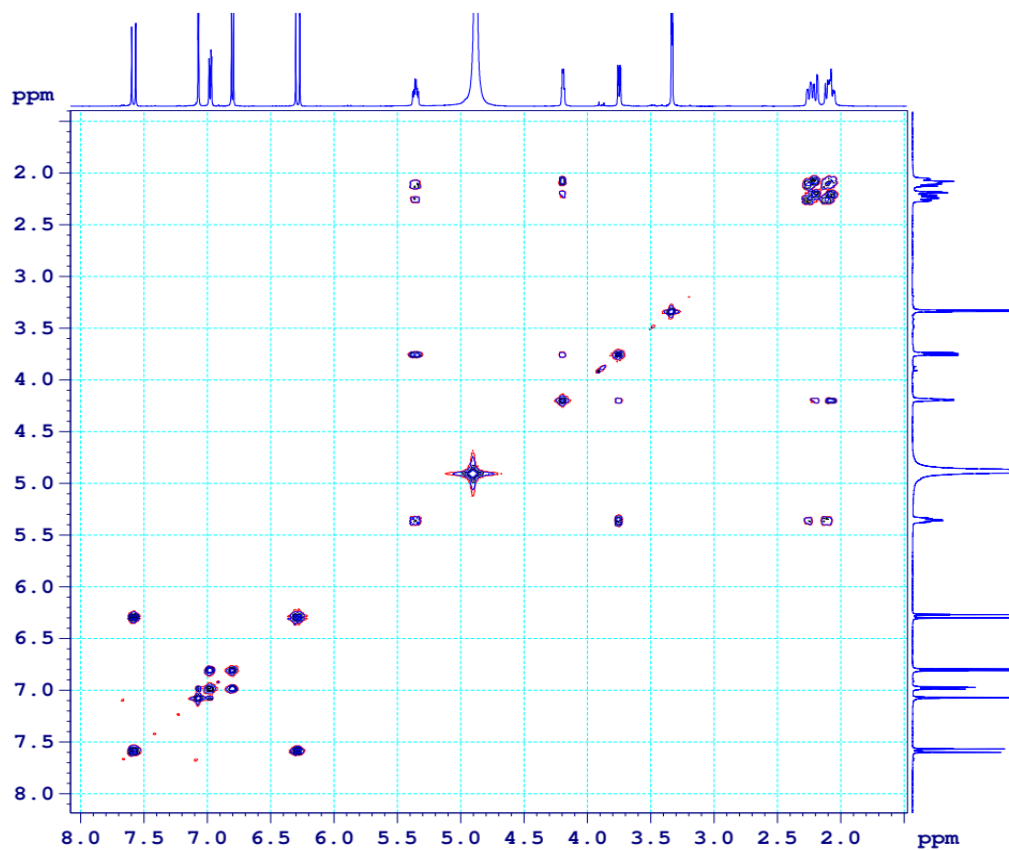
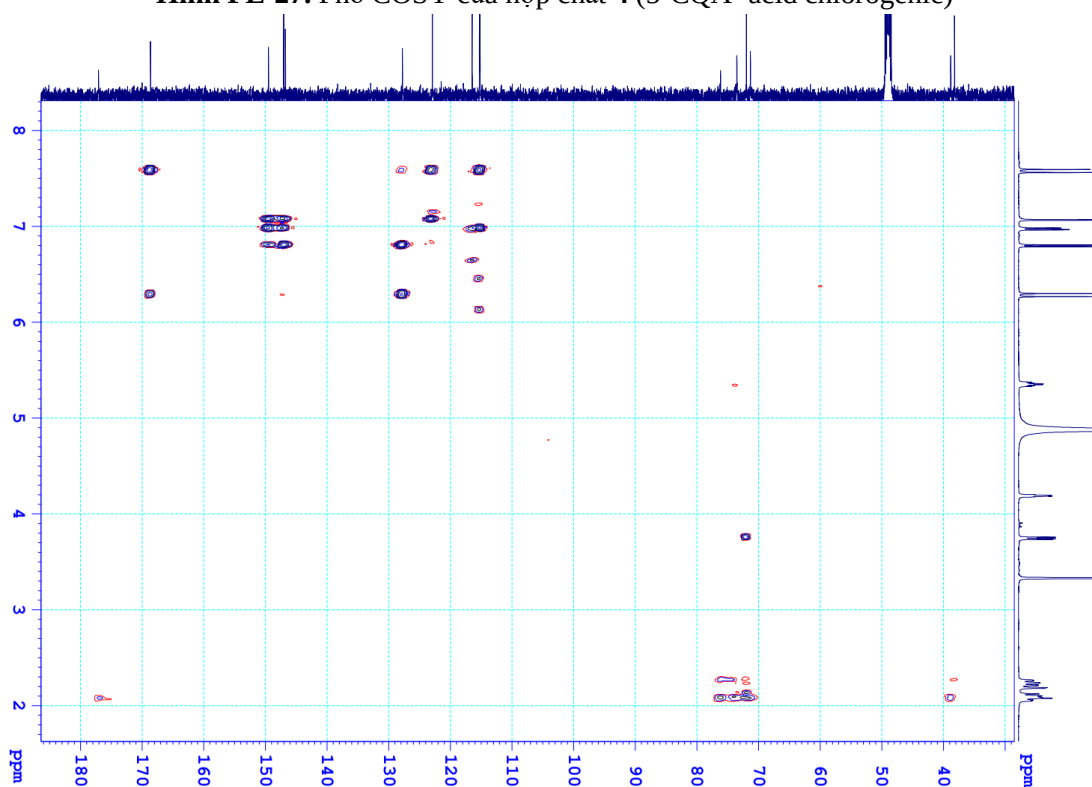
C13CPD



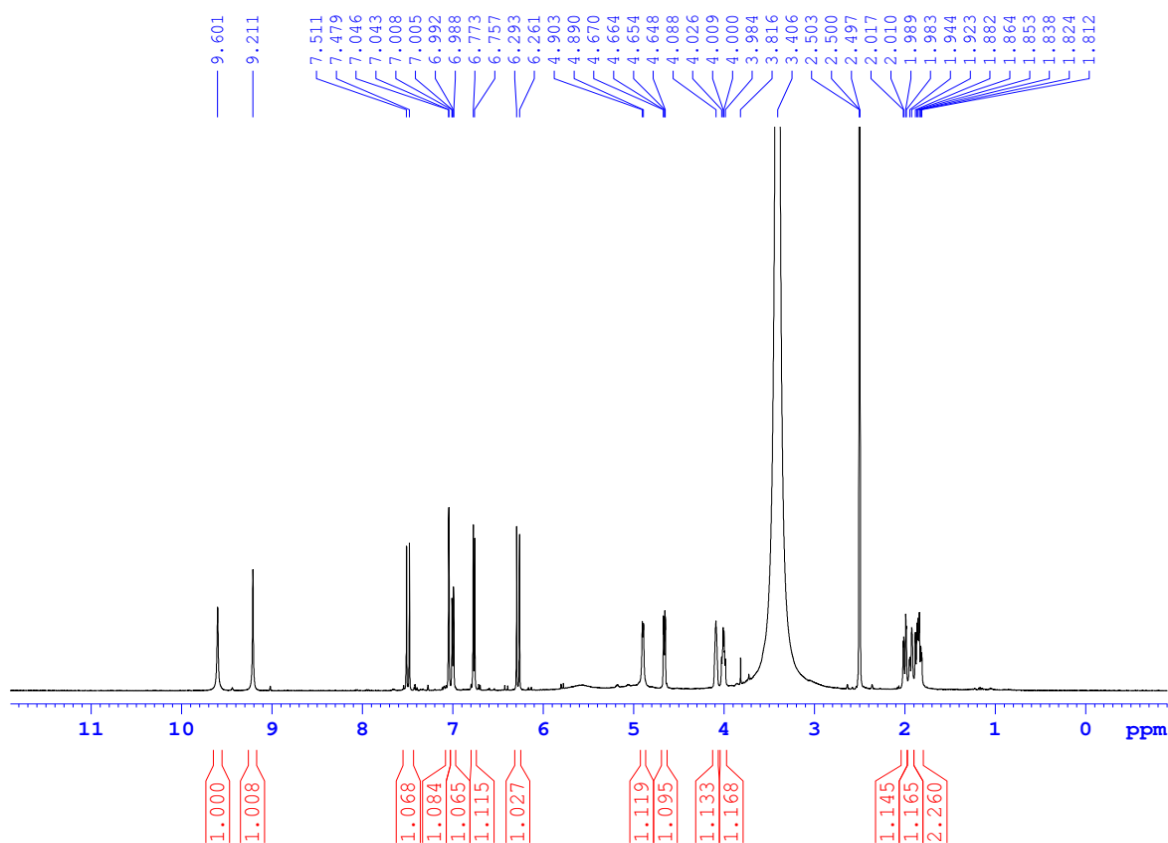
Hình PL-25. Phổ DEPT của hợp chất 4 (5-CQA=acid chlorogenic)



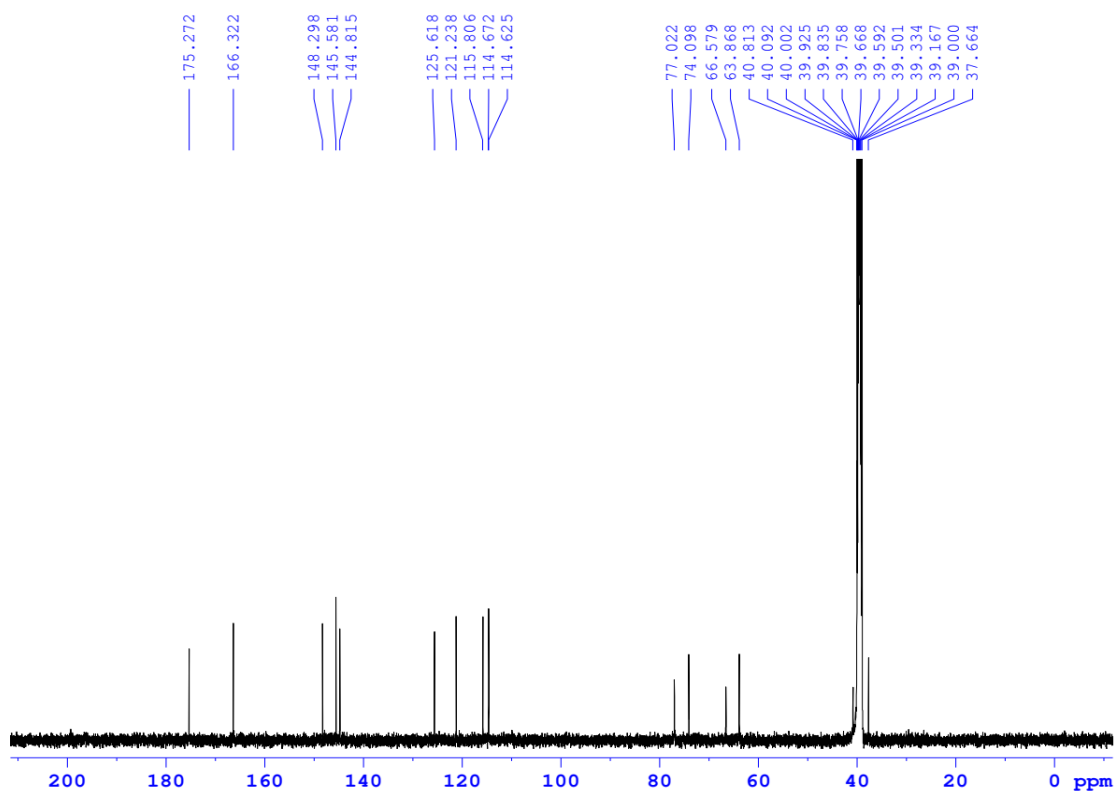
Hình PL-26. Phổ HSQC của hợp chất 4 (5-CQA=acid chlorogenic)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 4 (5-CQA = acid chlorogenic)**Hình PL-27. Phổ COSY của hợp chất 4 (5-CQA=acid chlorogenic)****Hình PL-28. Phổ HMBC của hợp chất 4 (5-CQA=acid chlorogenic)**

Phụ lục 18. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 5 (4-CQA)



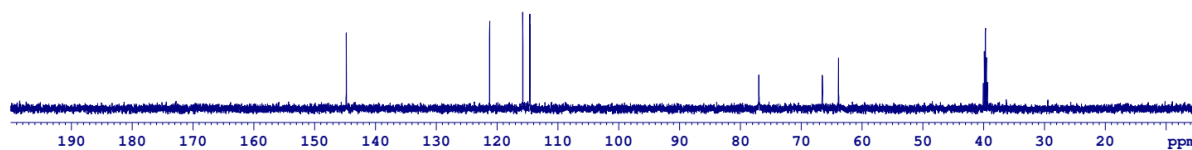
Hình PL-29. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất 5 (4-CQA)



Hình PL-30. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; 125 MHz) của hợp chất 5 (4-CQA)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 4 (4-CQA)

DEPT90



DEPT135

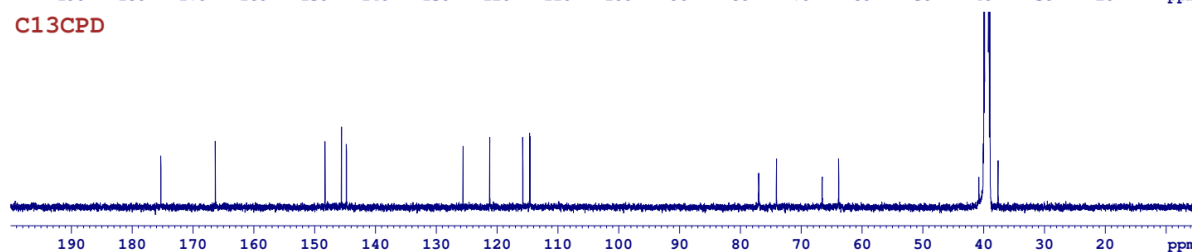
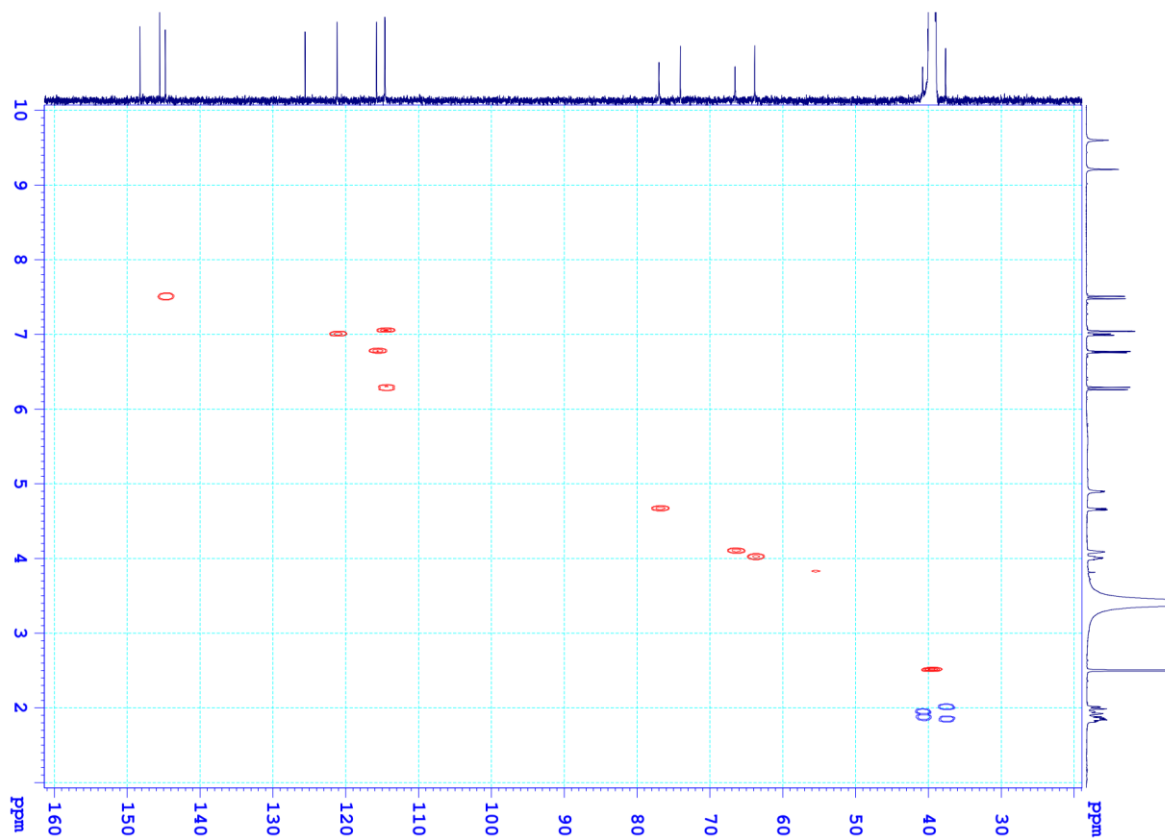
CH&CH3

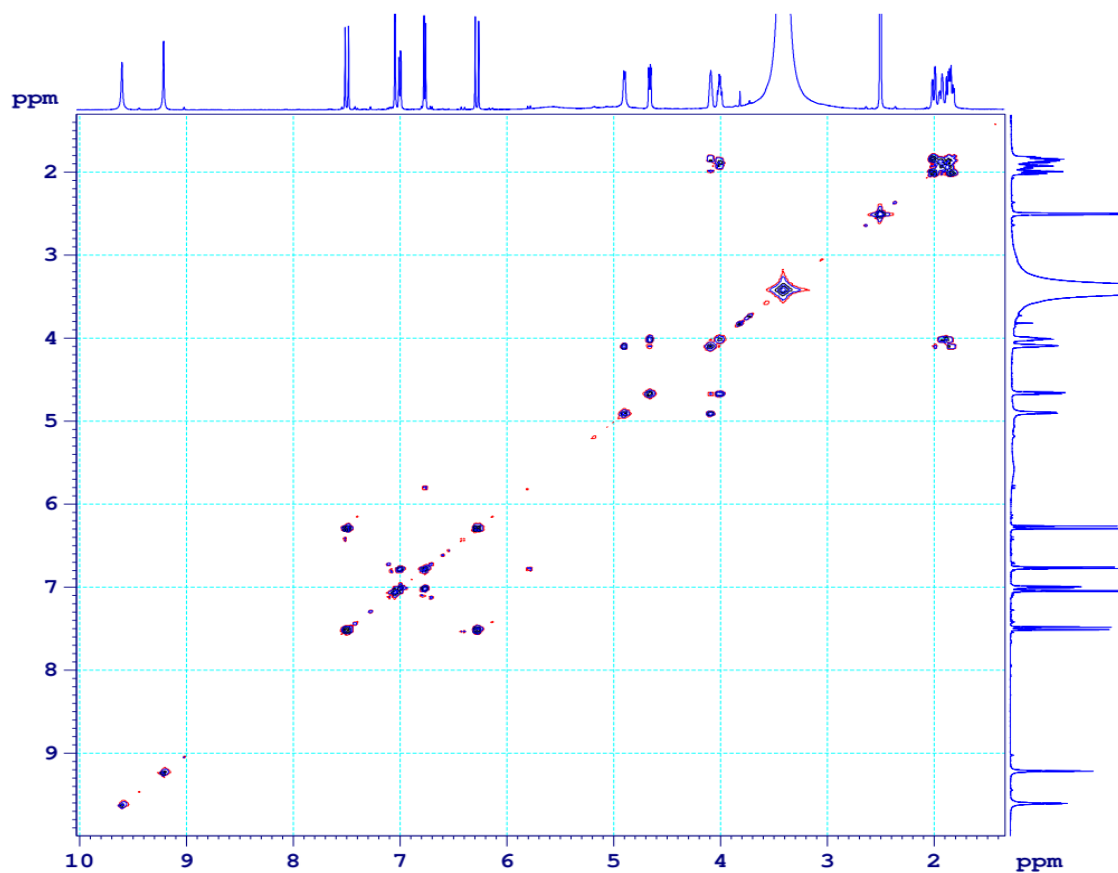
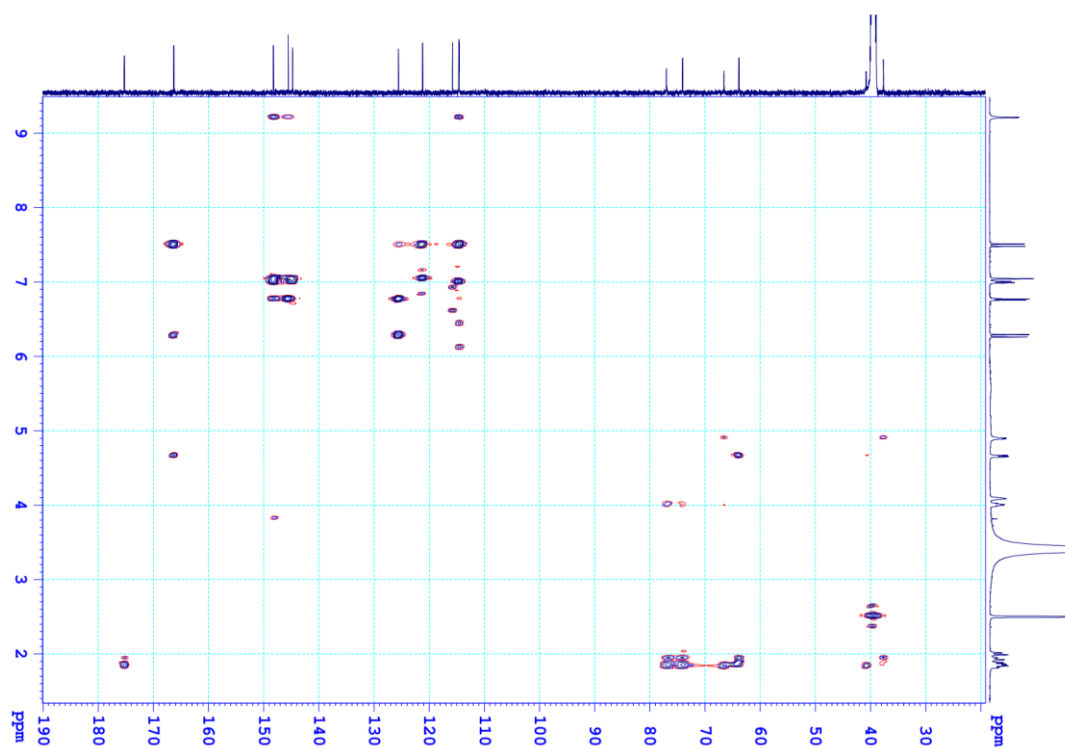


CH2

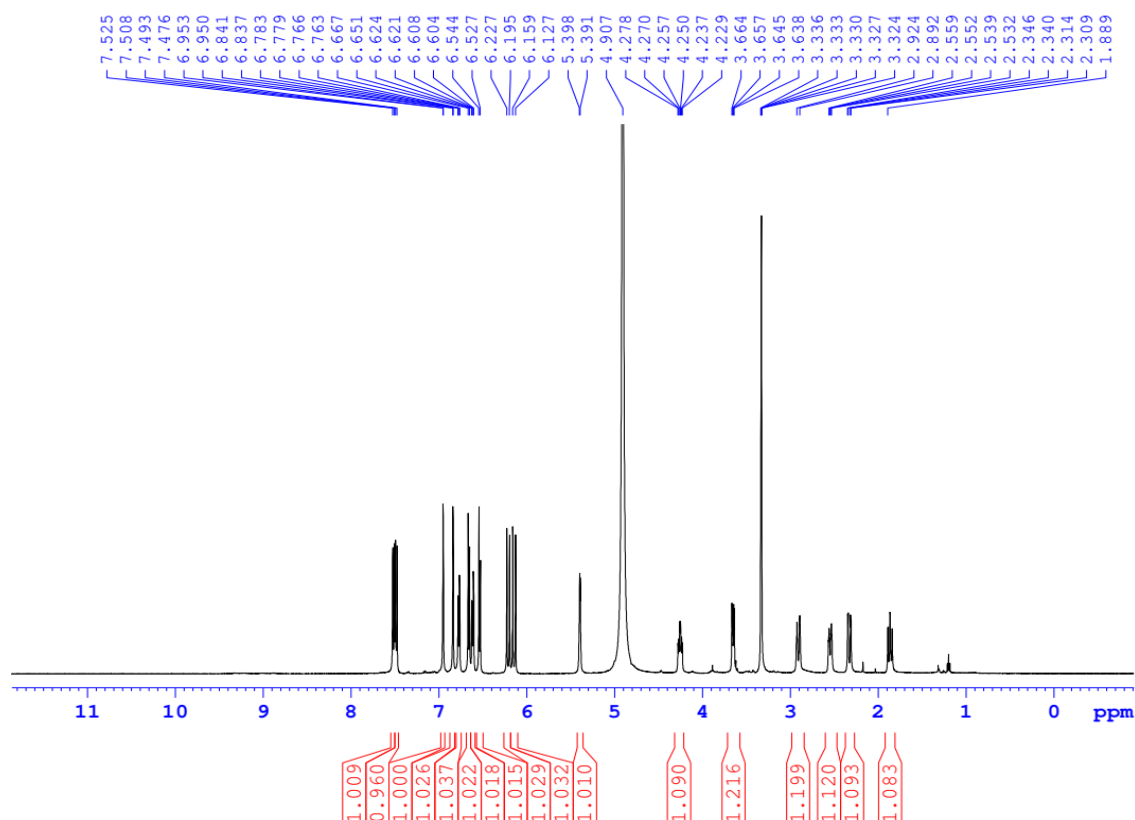


C13CPD

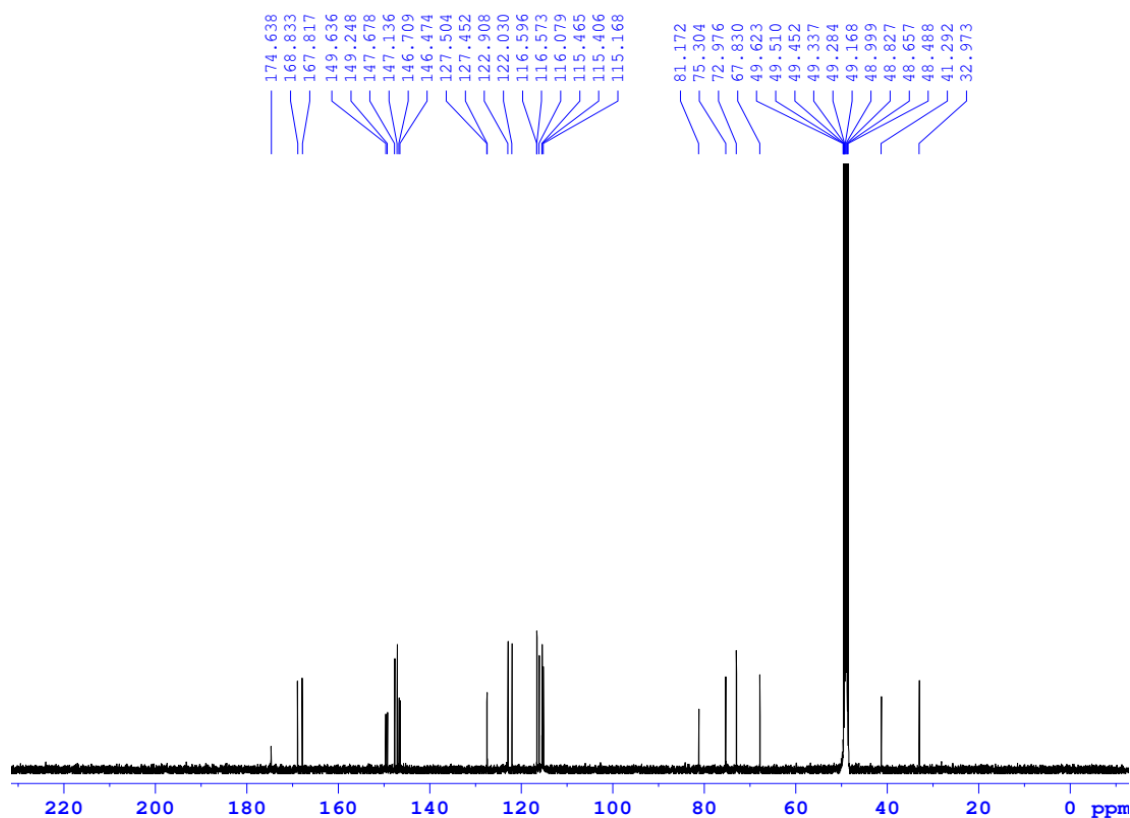
**Hình PL-31.** Phổ DEPT của hợp chất 5 (4-CQA)**Hình PL-32.** Phổ HSQC của hợp chất 5 (4-CQA)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 4 (4-CQA)**Hình PL-33.** Phổ COSY của hợp chất 5 (4-CQA)**Hình PL-34.** Phổ HMBC của hợp chất 5 (4-CQA)

Phụ lục 19. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 6 (1,3-diCQA = cynarin)



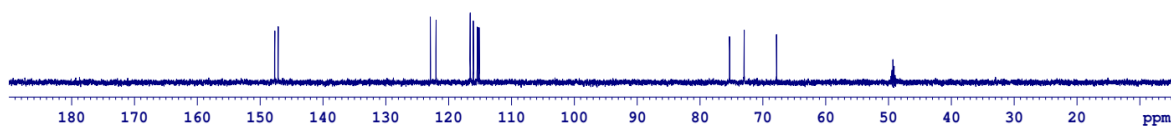
Hình PL-35. Phổ ¹H-NMR (CD₃OD; 500 MHz) của hợp chất 6 (1,3-diCQA=cynarin)



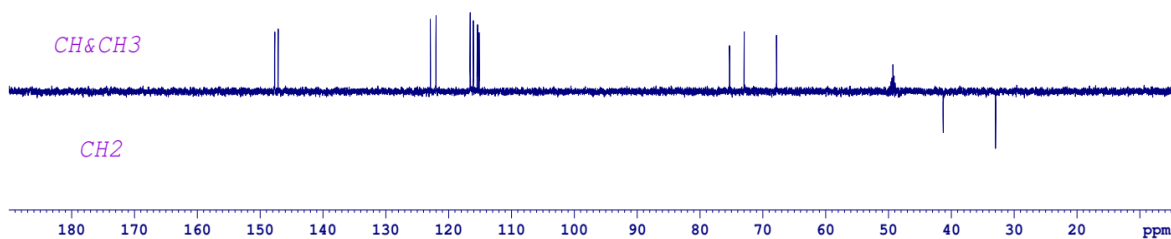
Hình PL-36. Phổ ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) của hợp chất 6 (1,3-diCQA=cynarin)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 6 (1,3-diCQA = cynarin)

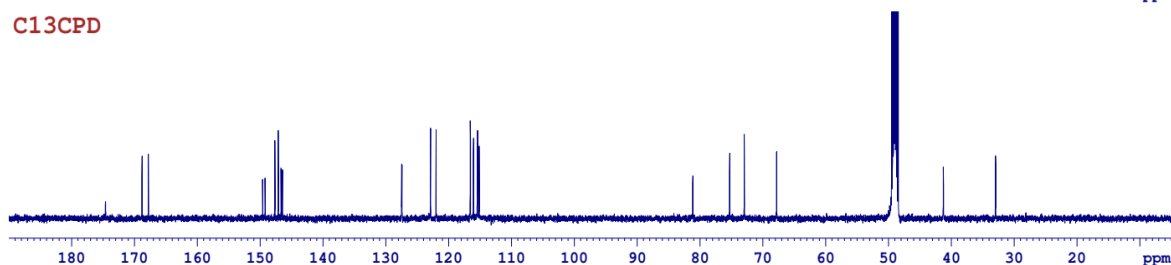
DEPT90



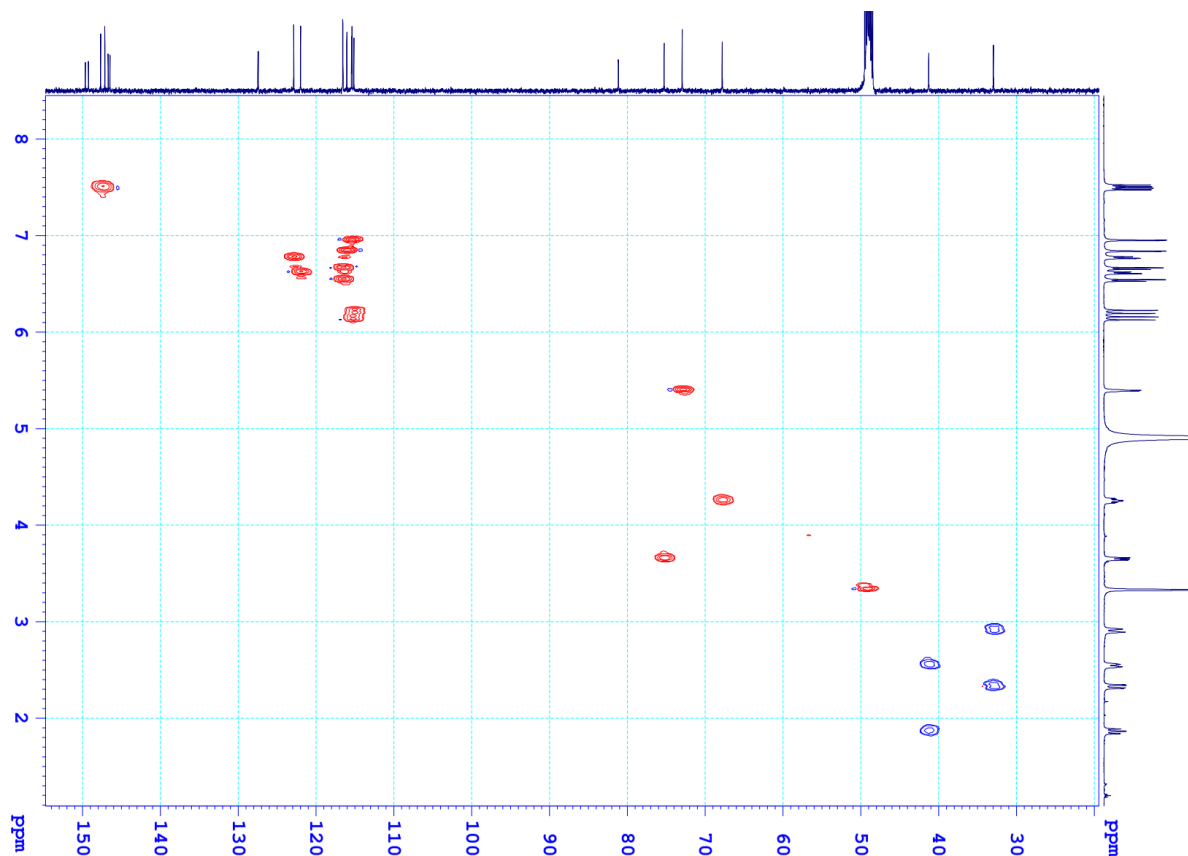
DEPT135



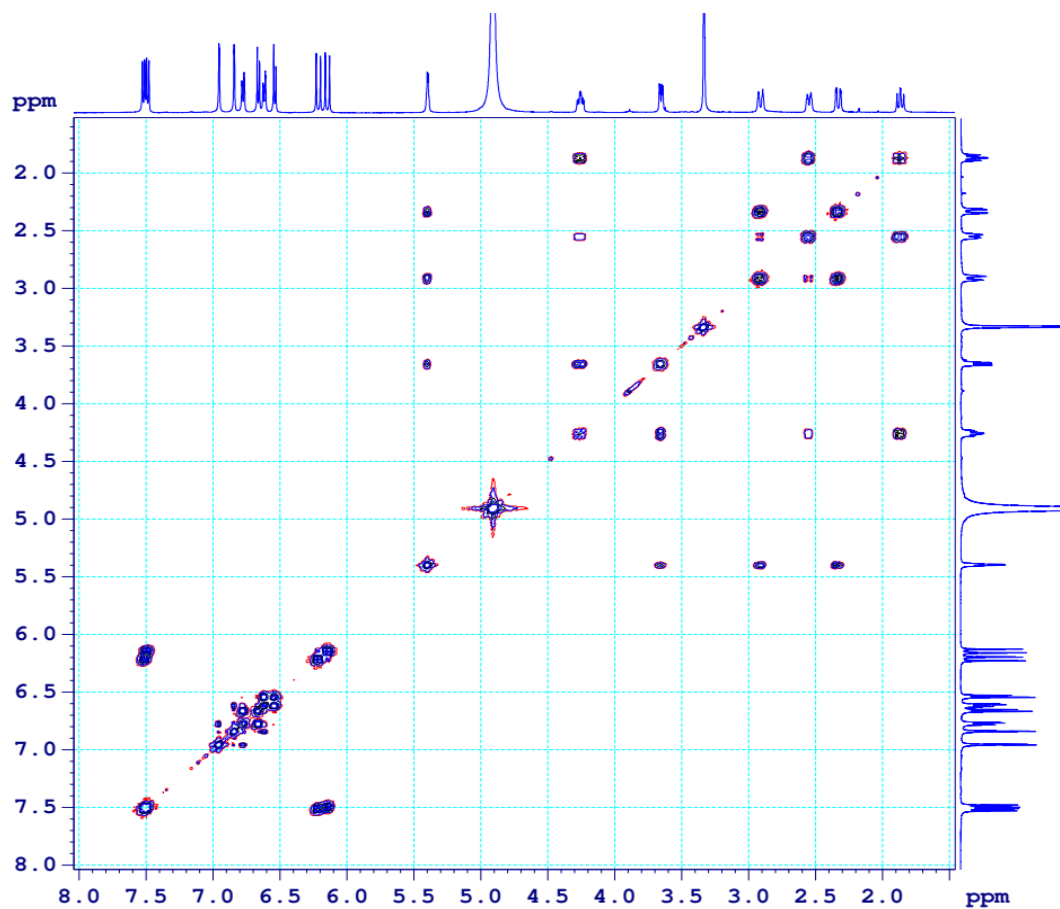
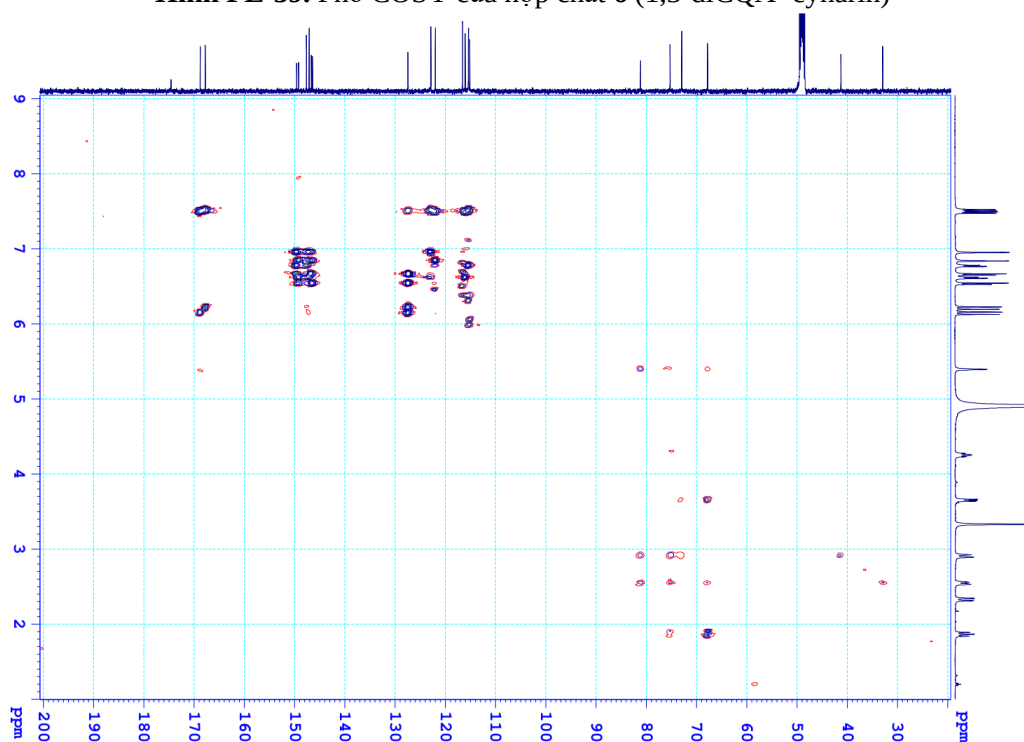
C13CPD



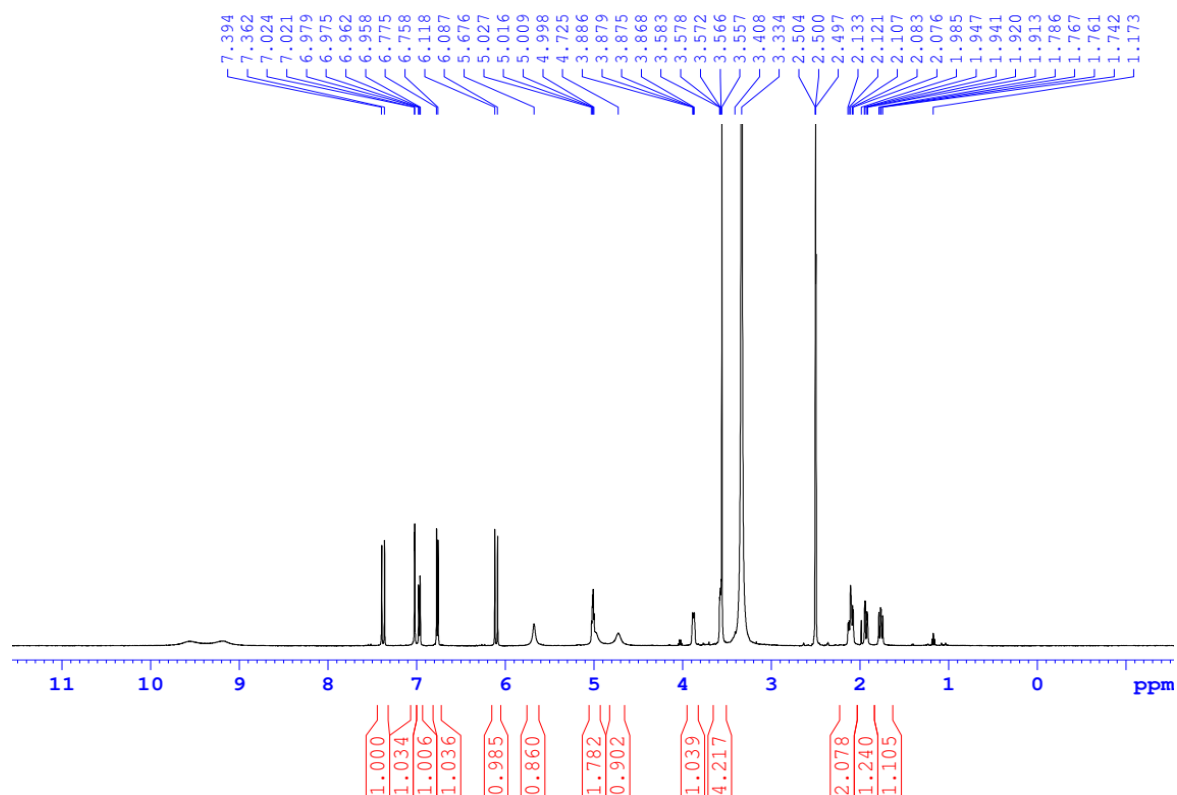
Hình PL-37. Phổ DEPT của hợp chất 6 (1,3-diCQA=cynarin)



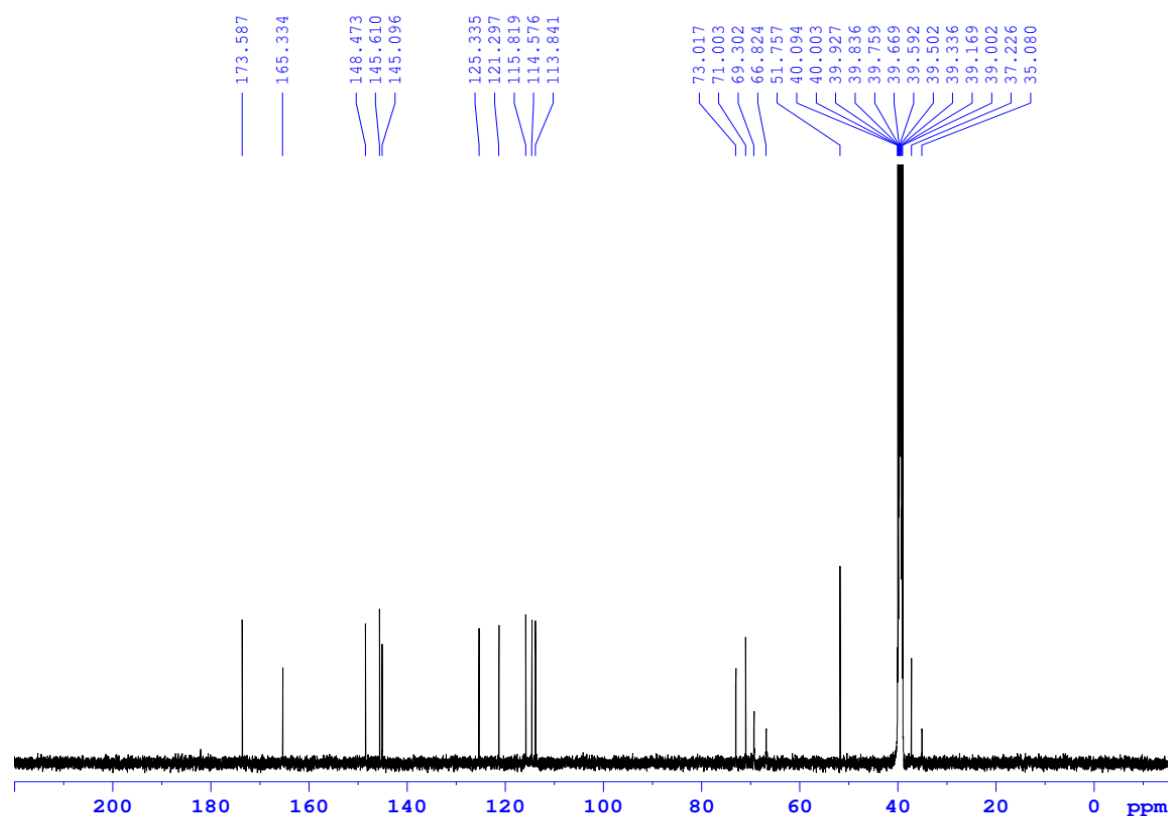
Hình PL-38. Phổ HSQC của hợp chất 6 (1,3-diCQA=cynarin)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 6 (1,3-diCQA = cynarin)**Hình PL-39.** Phổ COSY của hợp chất 6 (1,3-diCQA=cynarin)**Hình PL-40.** Phổ HMBC của hợp chất 6 (1,3-diCQA=cynarin)

Phụ lục 20. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 7 (Acid 3-feruloylquinic)



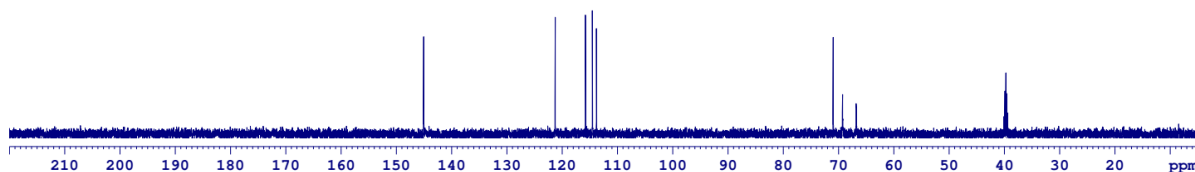
Hình PL-41. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất 7 (acid 3-feruloylquinic)



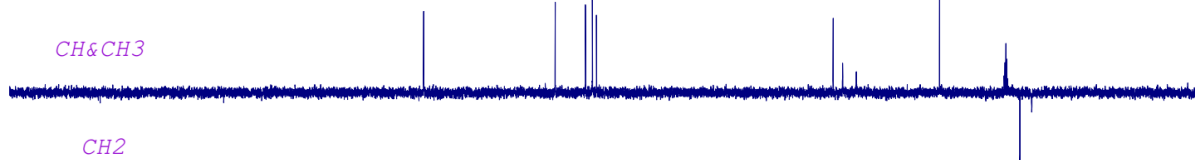
Hình PL-42. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; 125 MHz) của hợp chất 7 (acid 3-feruloylquinic)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 7 (Acid 3-feruloylquinic)

DEPT90



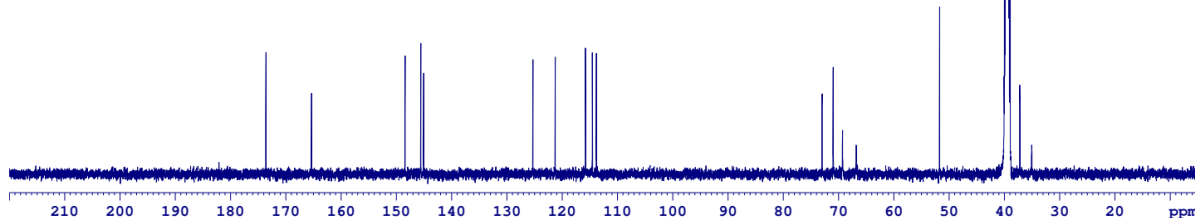
DEPT135



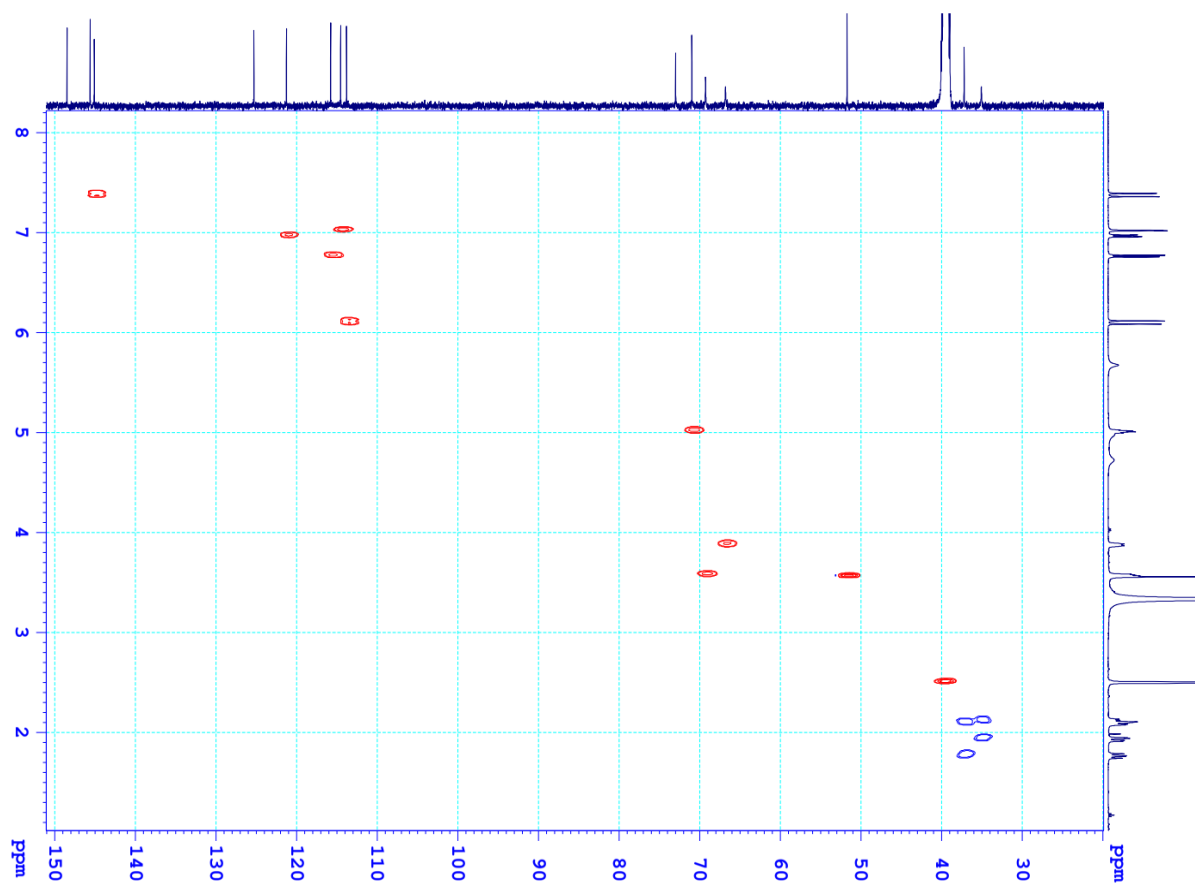
CH2



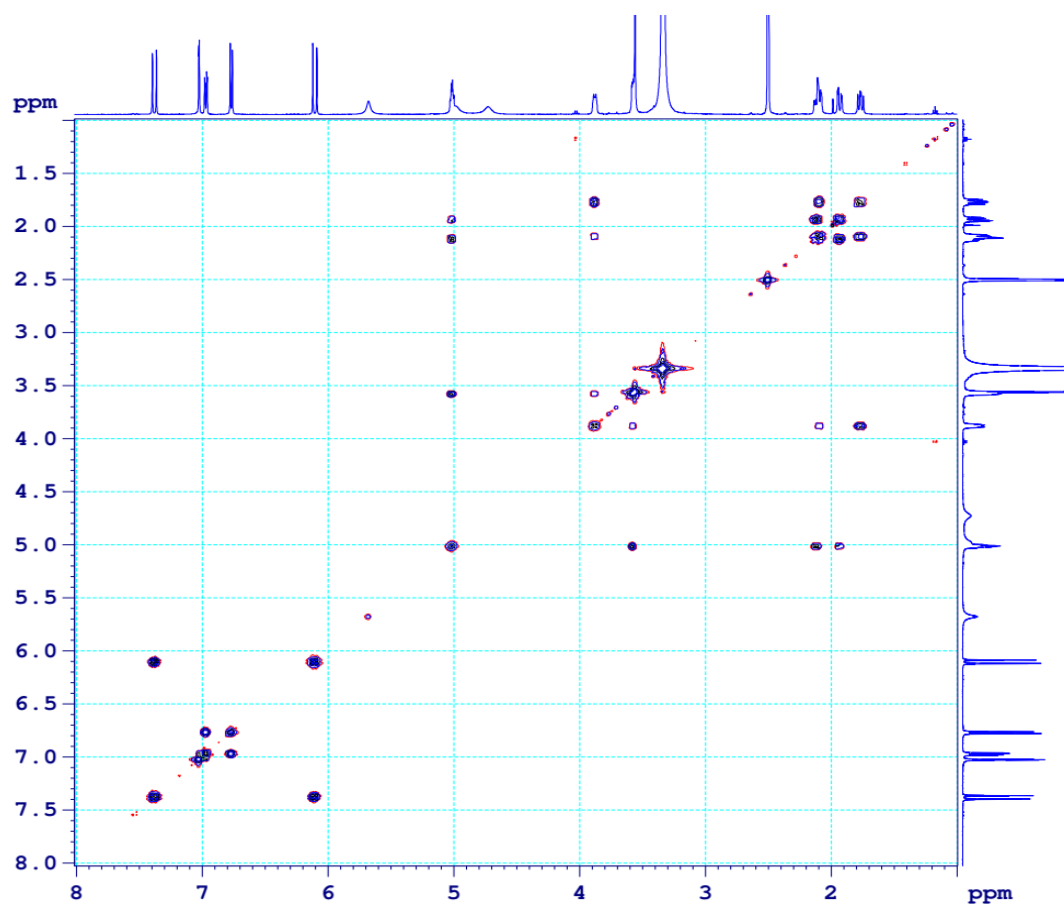
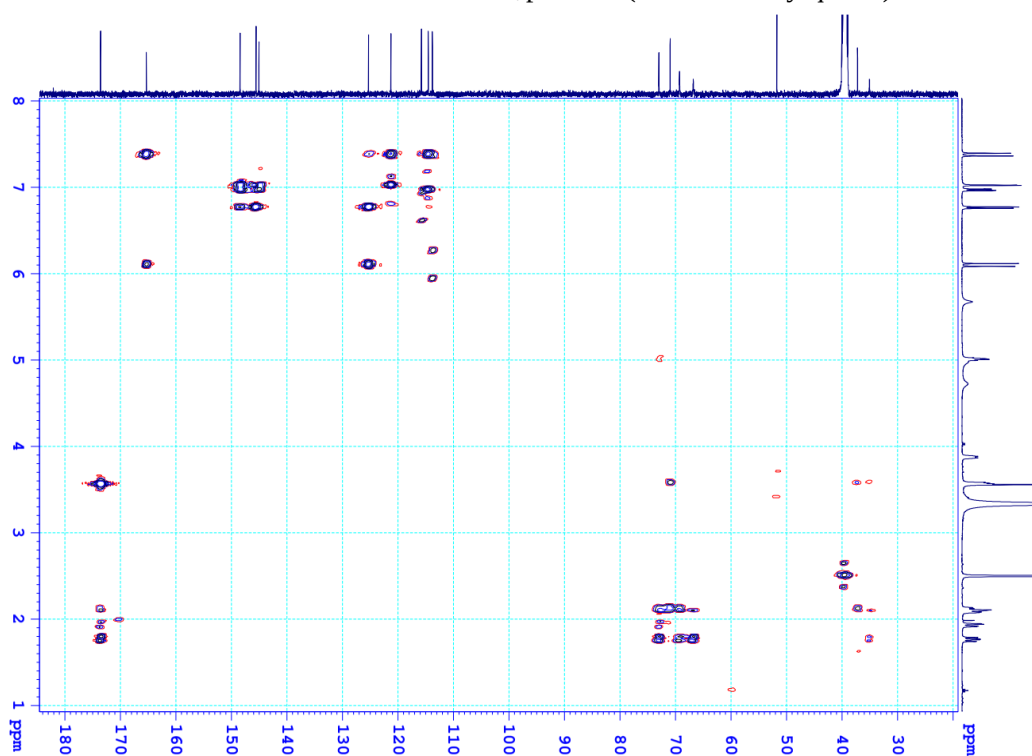
C13CPD



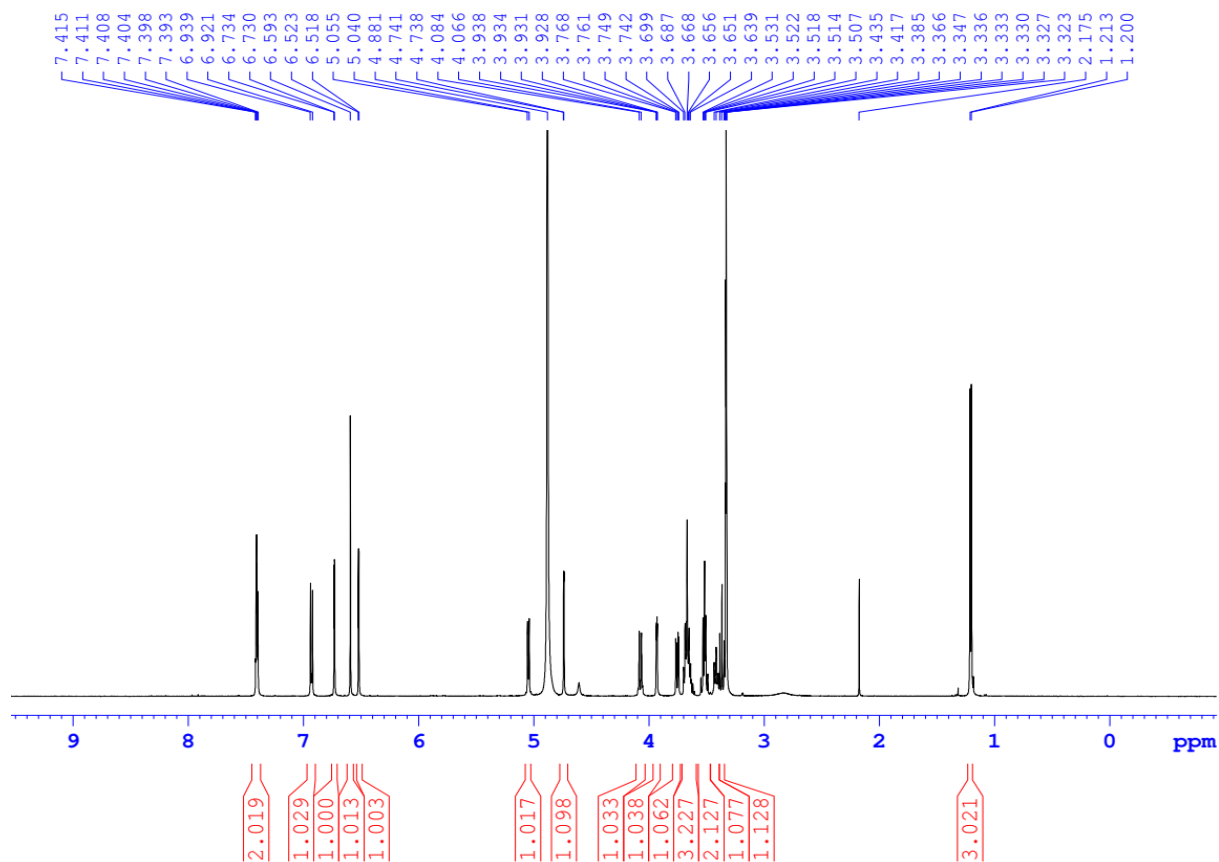
Hình PL-43. Phổ DEPT của hợp chất 7 (acid 3-feruloylquinic)



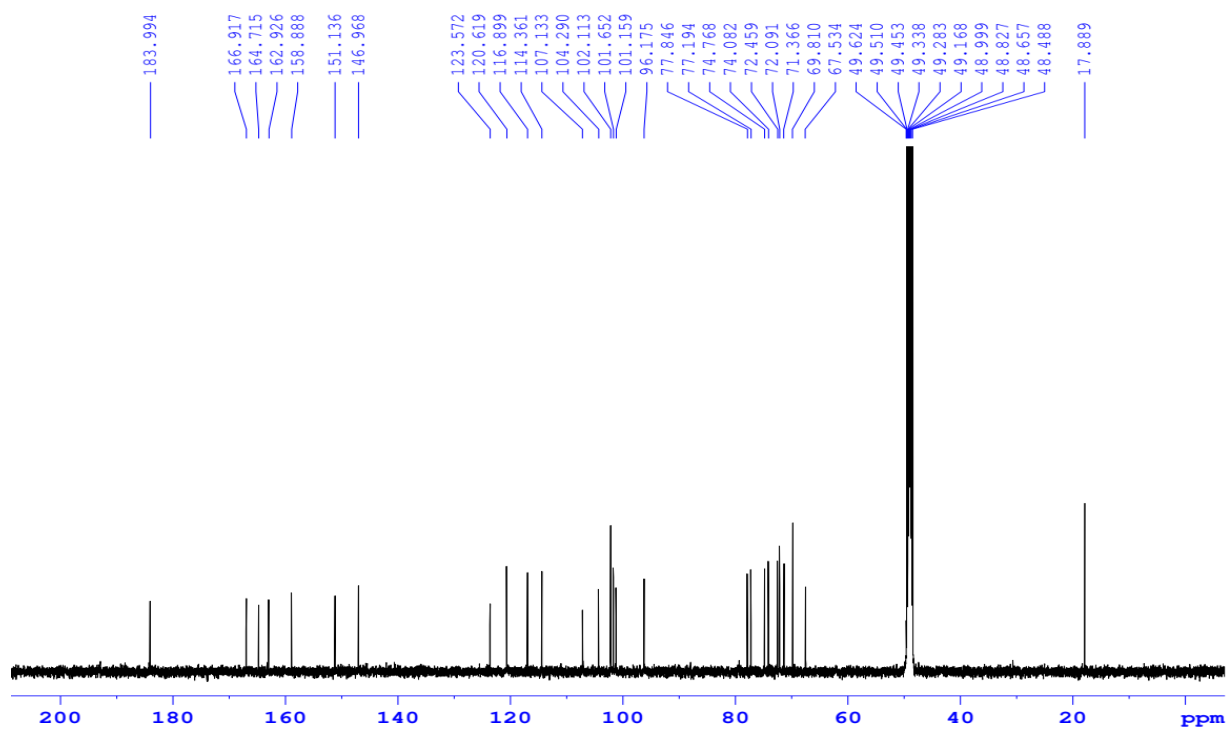
Hình PL-44. Phổ HSQC của hợp chất 7 (acid 3-feruloylquinic)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 7 (Acid 3-feruloylquinic)**Hình PL-45. Phổ COSY của hợp chất 7 (acid 3-feruloylquinic)****Hình PL-46. Phổ HMBC của hợp chất 7 (acid 3-feruloylquinic)**

Phụ lục 21. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 8 (Scolymosid)



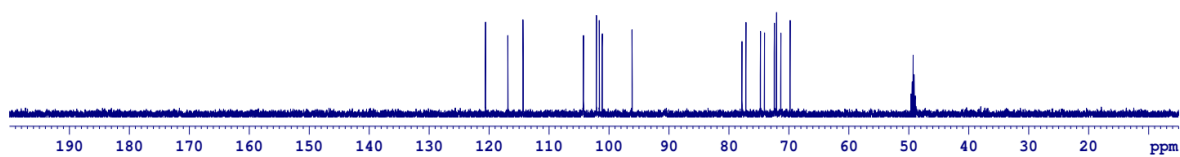
Hình PL-47. Phổ ¹H-NMR (CD₃OD; 500 MHz) của hợp chất 8 (scolymosid)



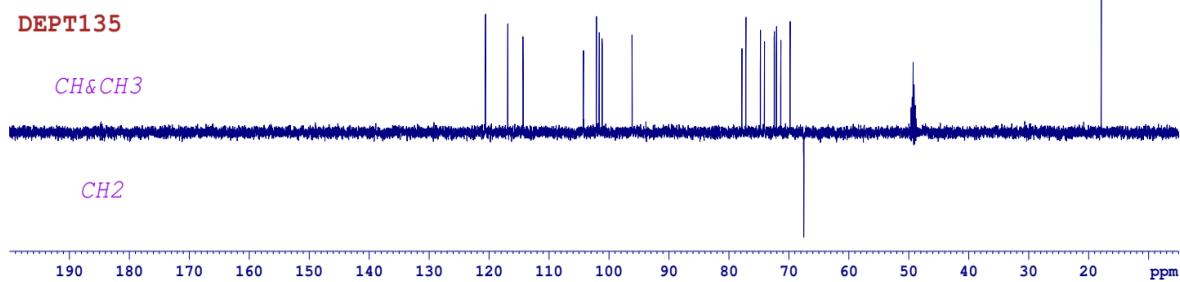
Hình PL-48. Phổ ¹³C-NMR (CD₃OD, 125 MHz) của hợp chất 8 (scolymosid)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 8 (Scolymosid)

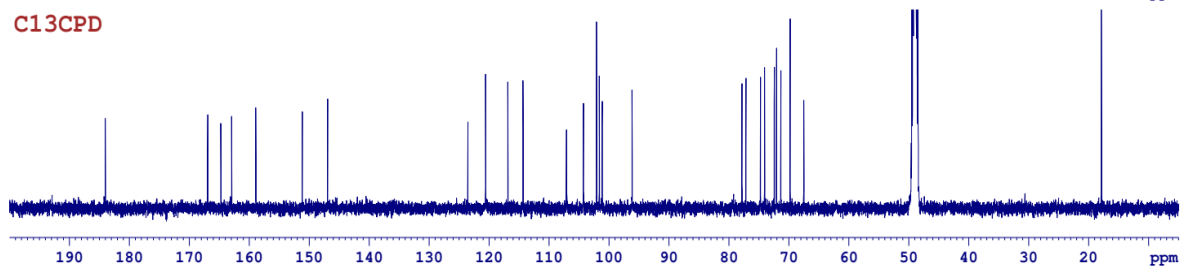
DEPT90



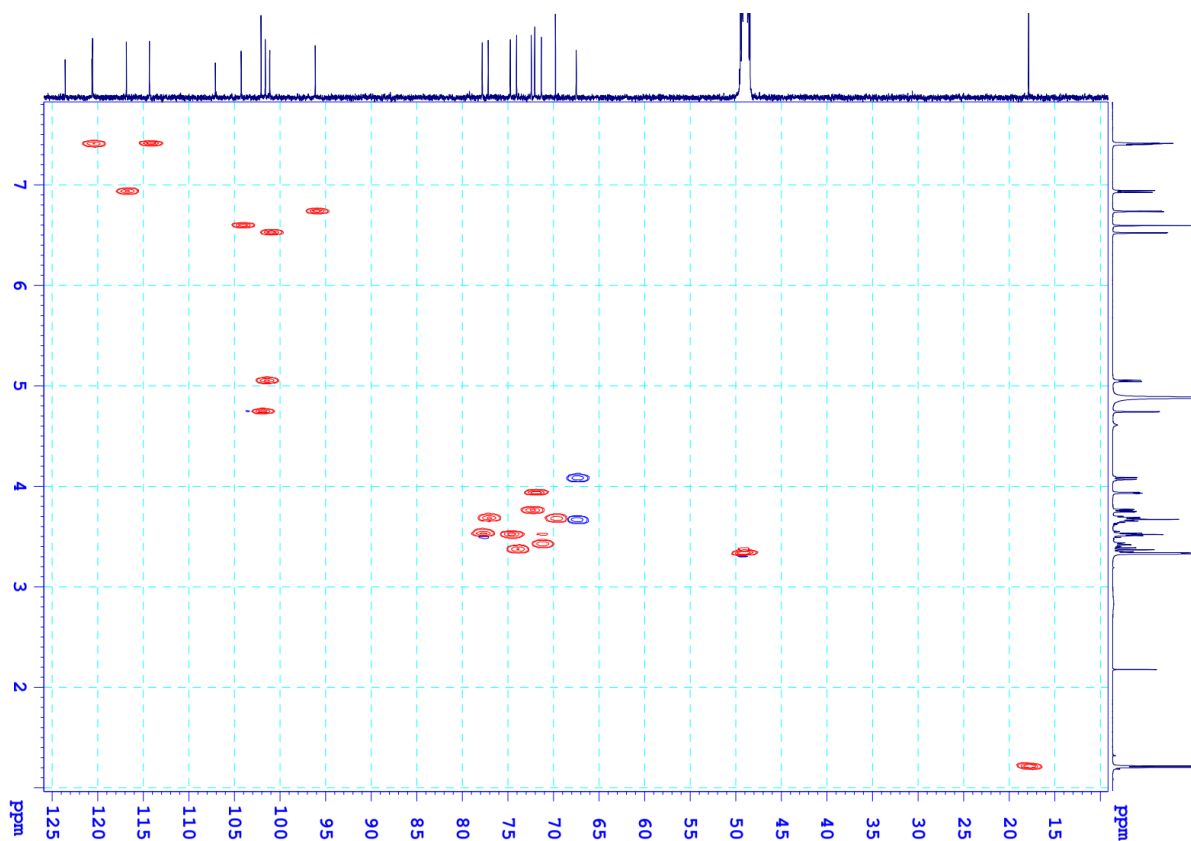
DEPT135

CH&CH₃CH₂

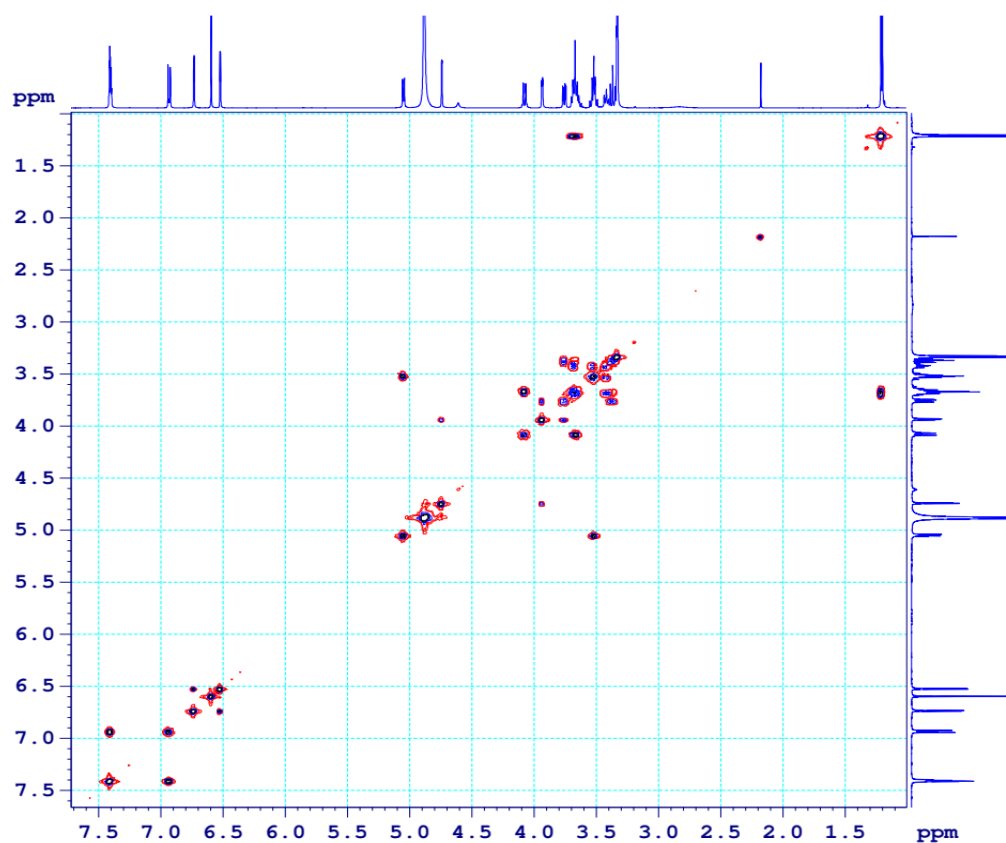
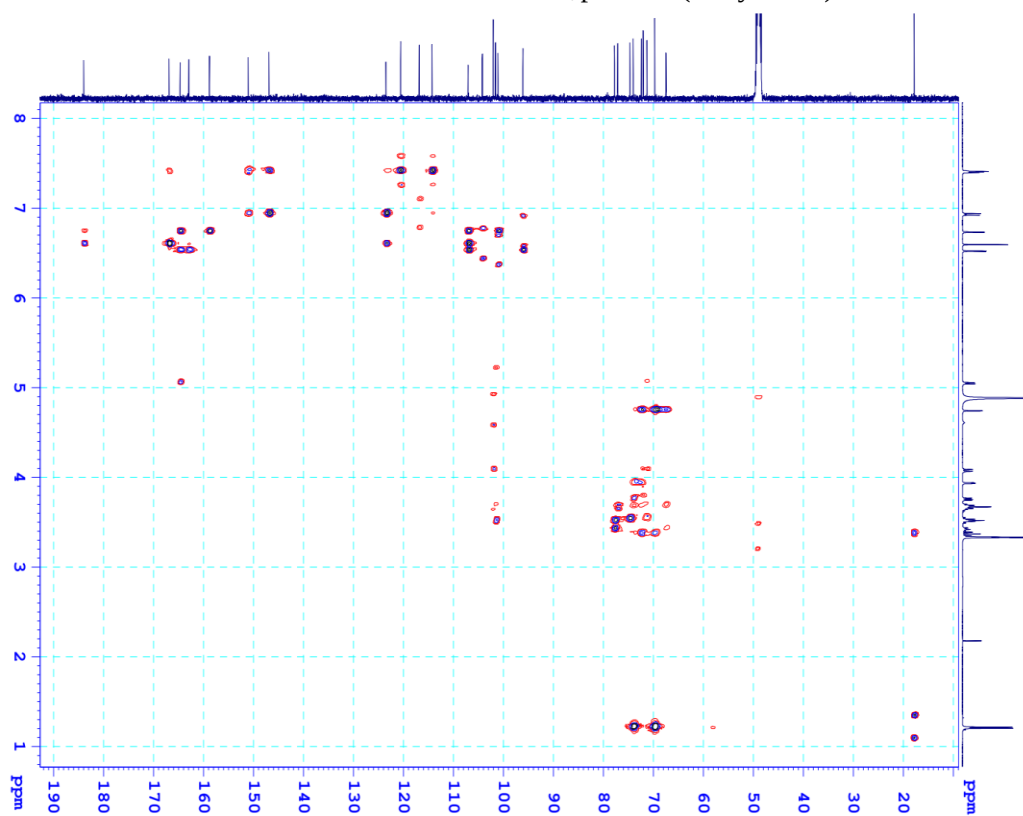
C13CPD

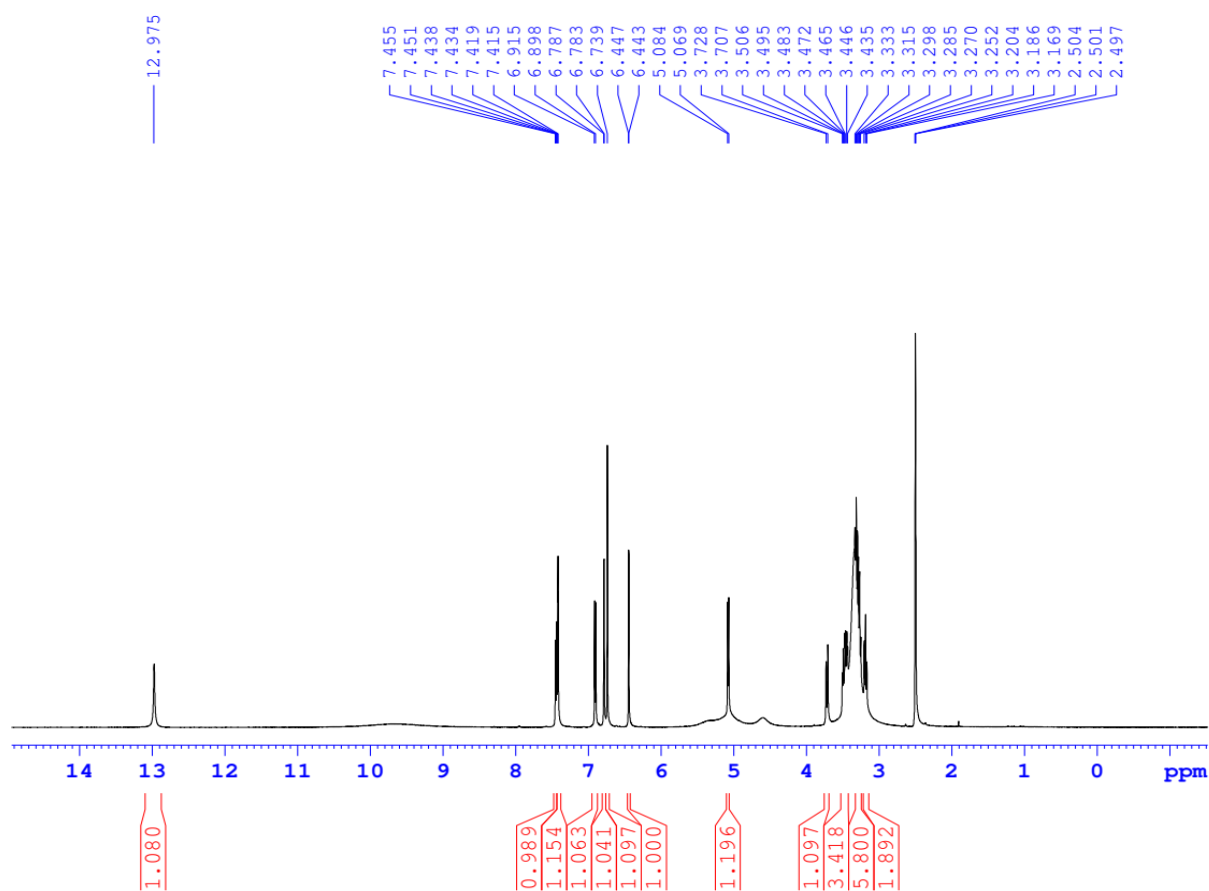
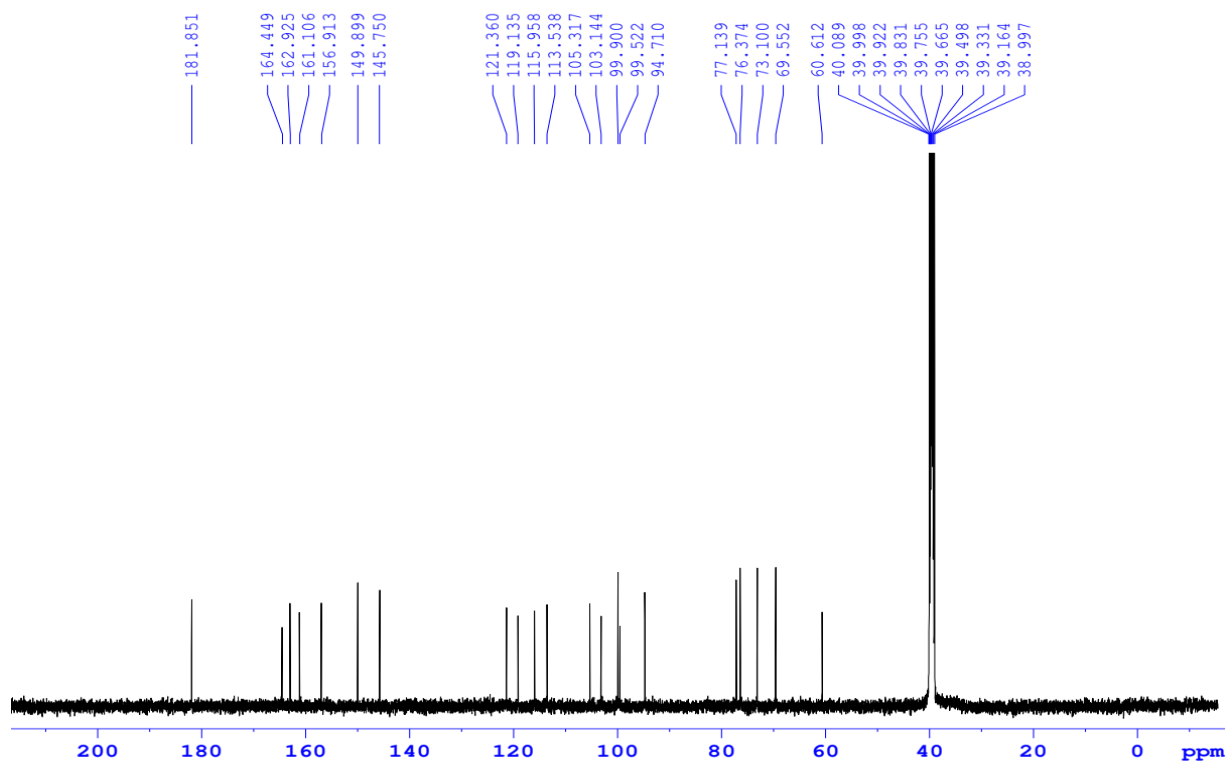


Hình PL-49. Phổ DEPT của hợp chất 8 (scolymosid)



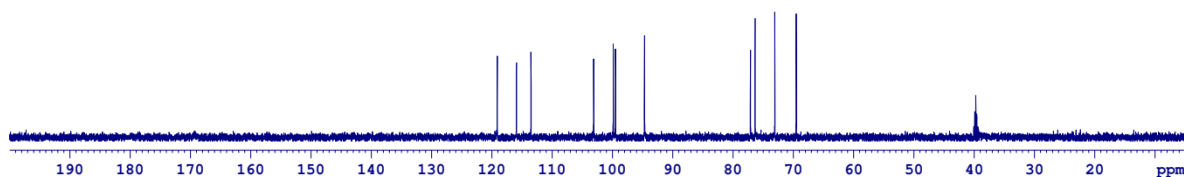
Hình PL-50. Phổ HSQC của hợp chất 8 (scolymosid)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 8 (Scolymosid)**Hình PL-51.** Phổ COSY của hợp chất **8** (scolymosid)**Hình PL-52.** Phổ HMBC của hợp chất **8** (scolymosid)

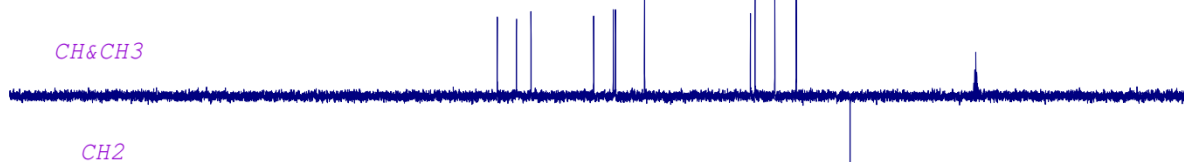
Phụ lục 22. **PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 9 (Cynarosid)**Hình PL-53. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất 9 (cynarosid)Hình PL-54. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 125 MHz) của hợp chất 9 (cynarosid)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 9 (Cynarosid)

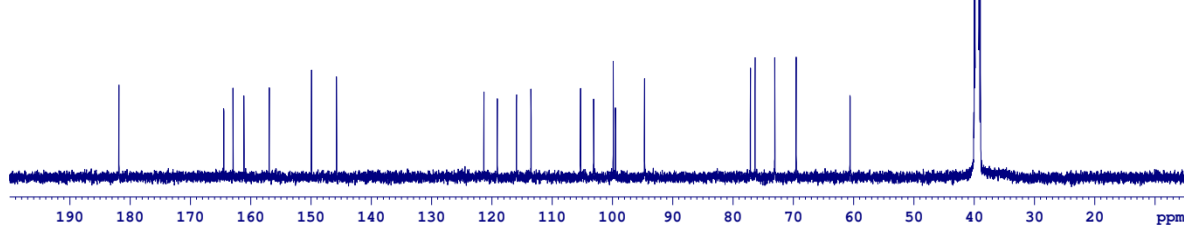
DEPT90



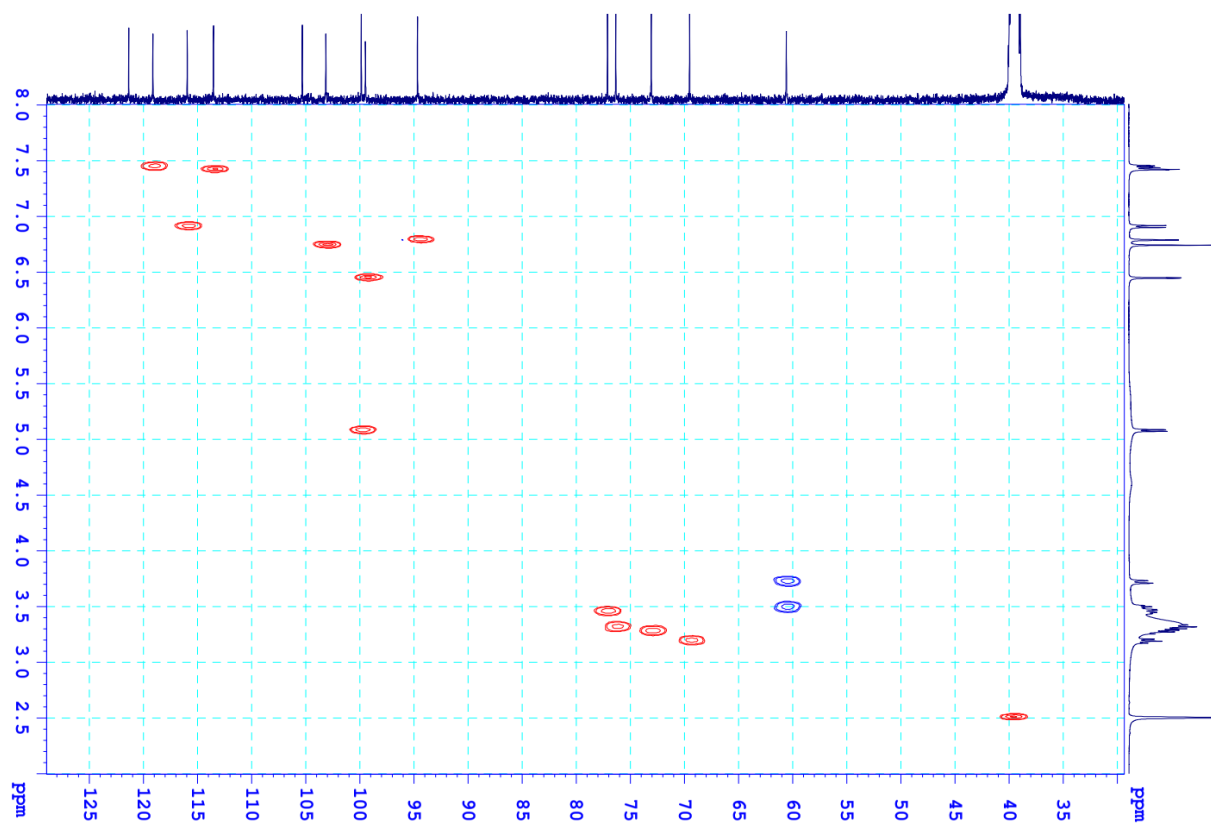
DEPT135



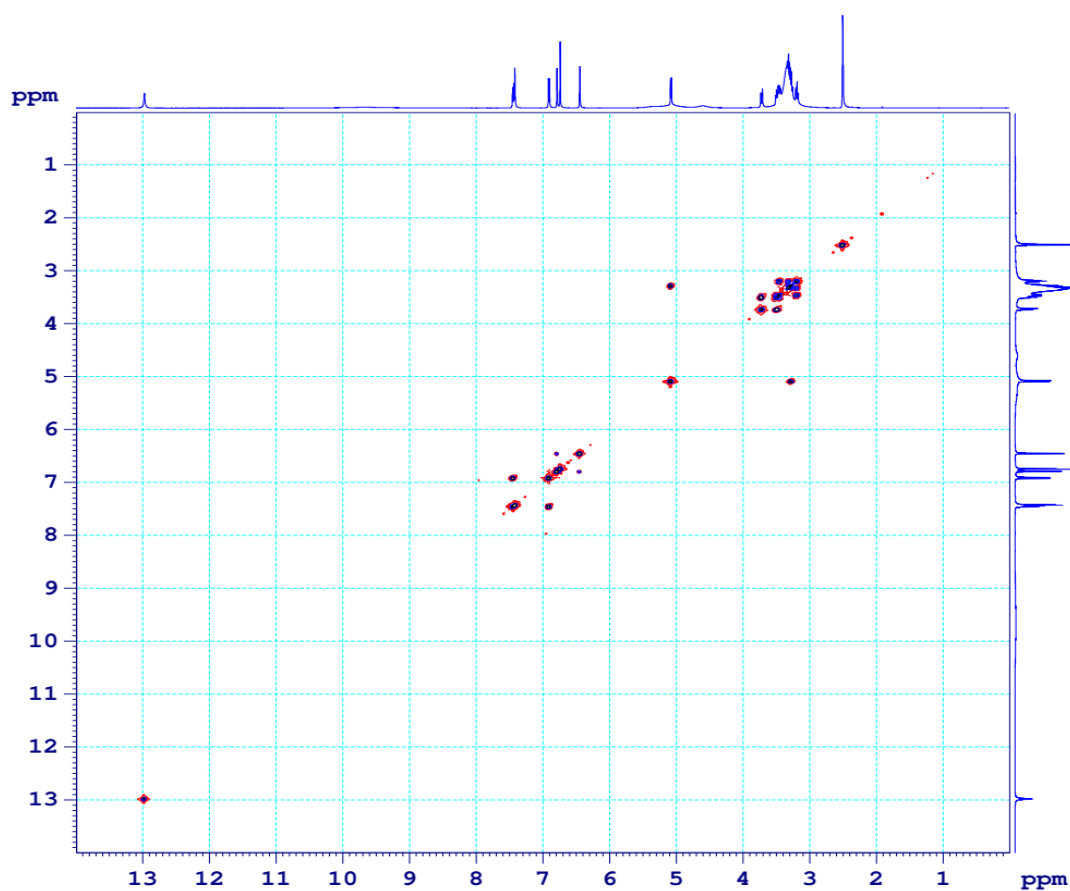
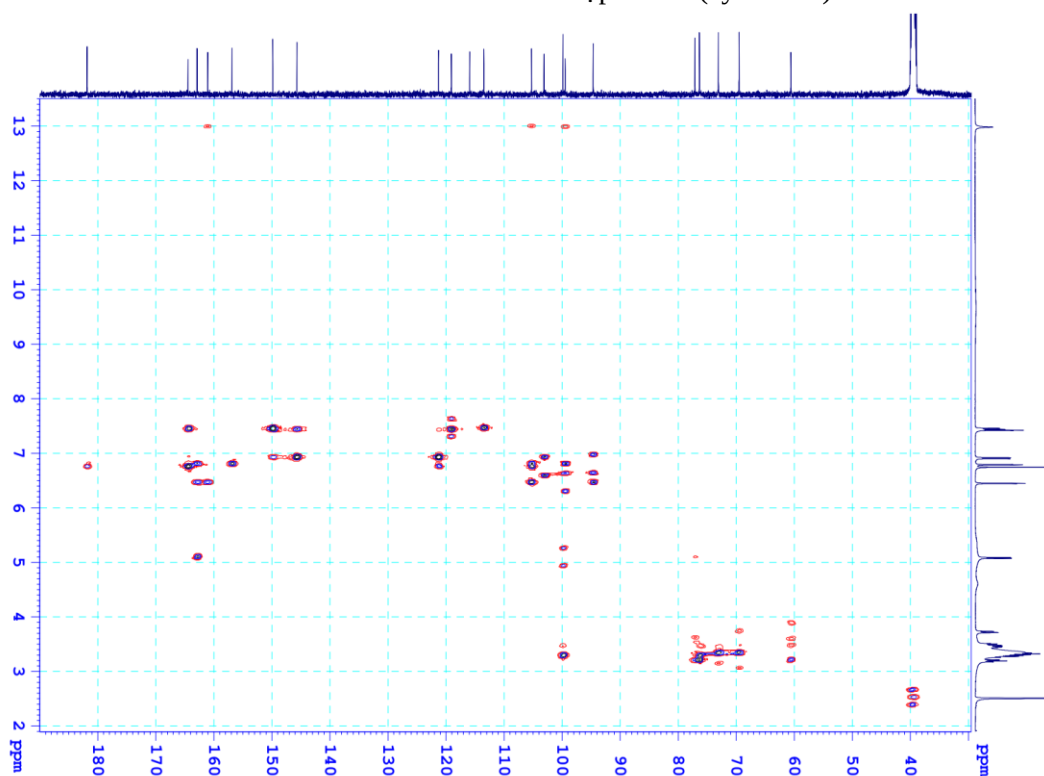
C13CPD



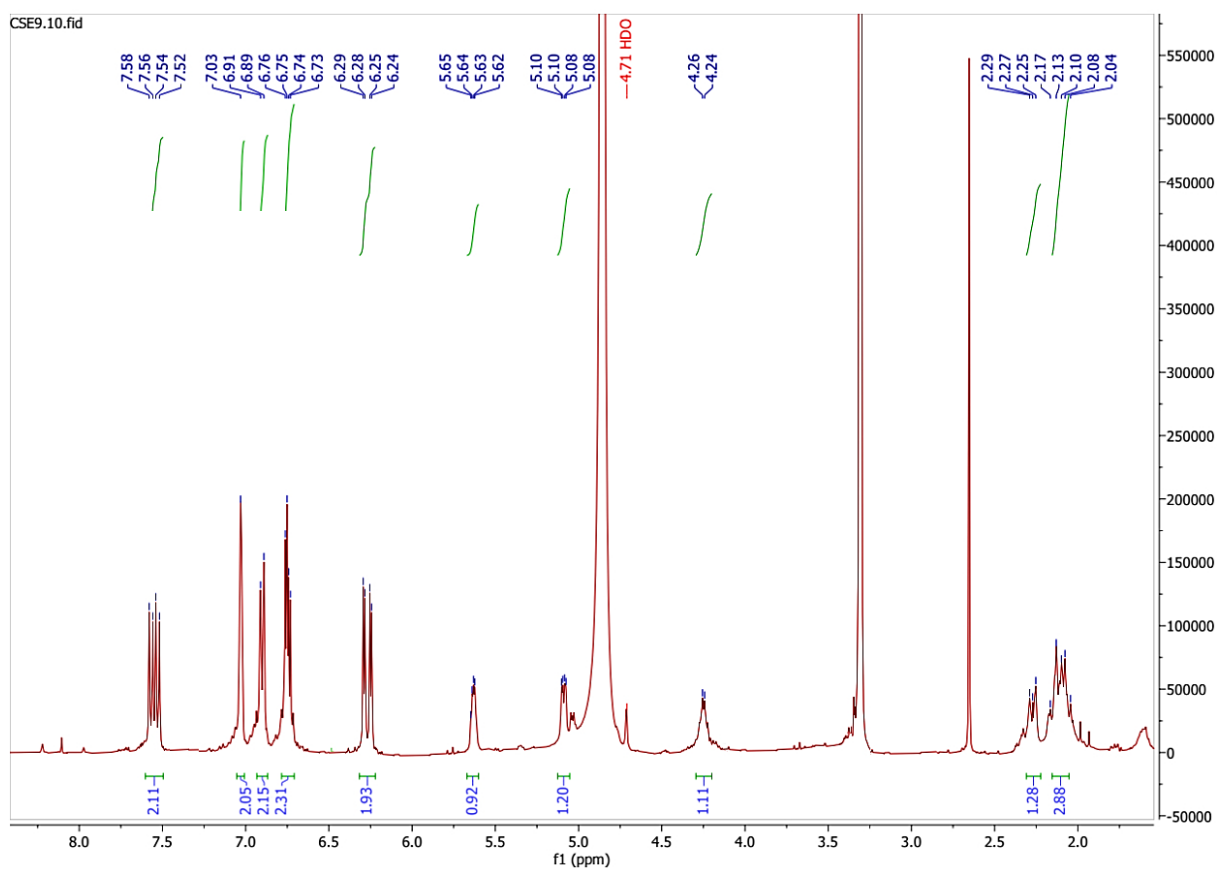
Hình PL-55. Phổ DEPT của hợp chất 9 (cynarosid)



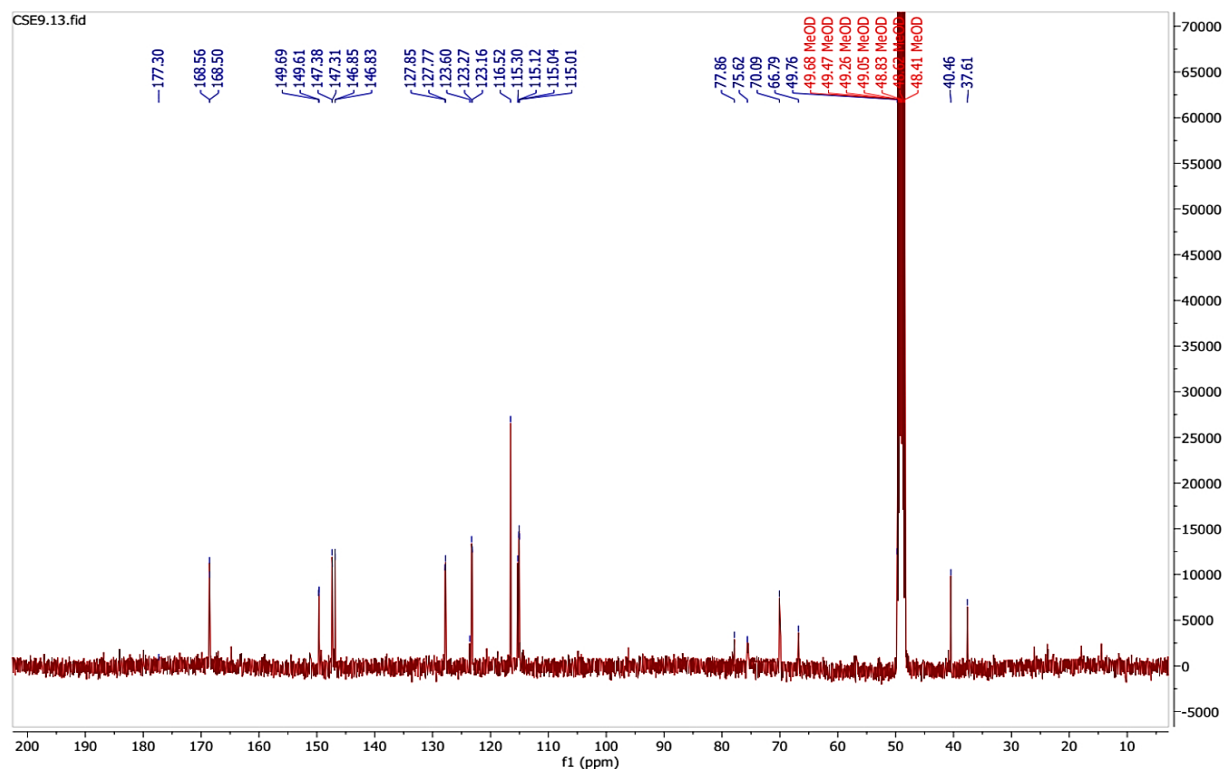
Hình PL-56. Phổ HSQC của hợp chất 9 (cynarosid)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 9 (Cynarosid)**Hình PL-57. Phổ COSY của hợp chất 9 (cynarosid)****Hình PL-58. Phổ HMBC của hợp chất 9 (cynarosid)**

Phụ lục 23. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 10 (3,4-diCQA)

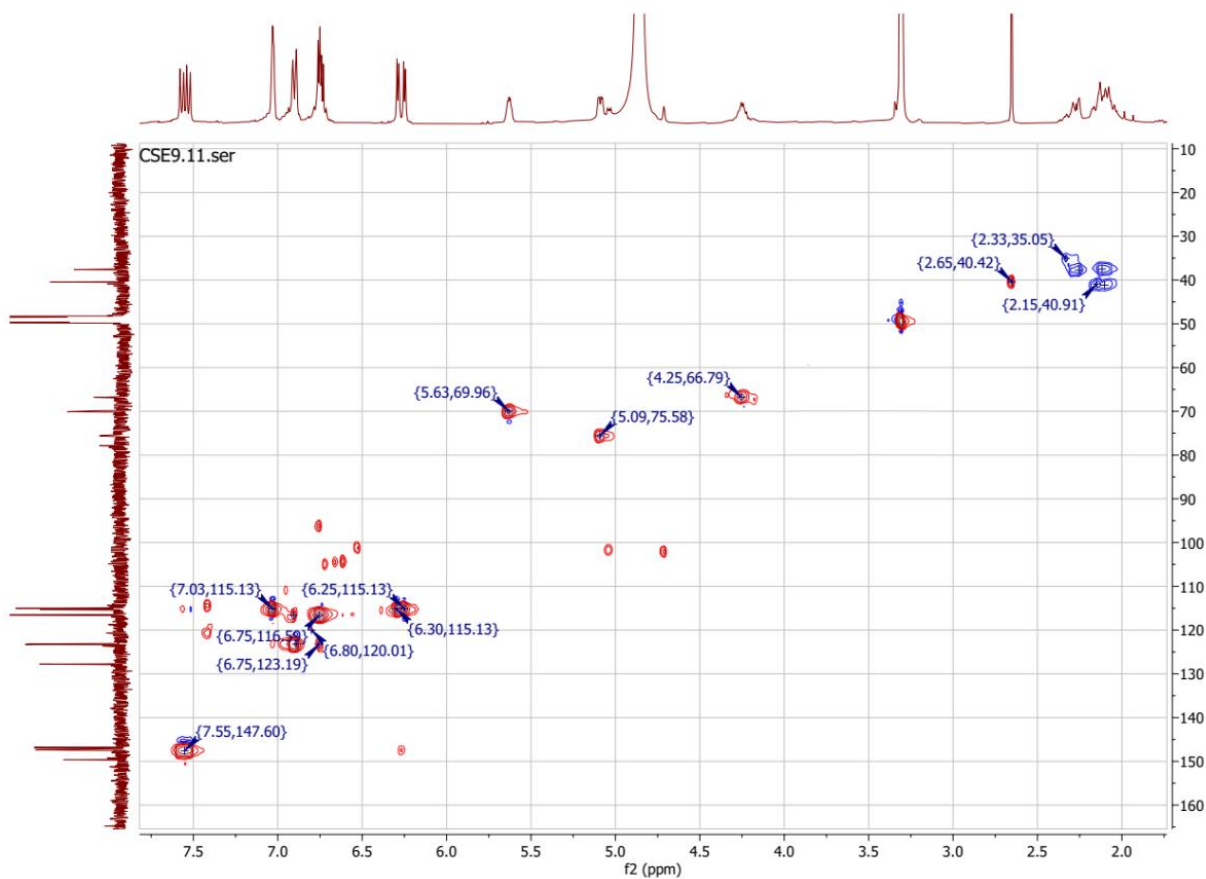


Hình PL-59. Phổ ^1H -NMR (CD_3OD ; 400 MHz) của hợp chất **10** (3,4-diCQA)

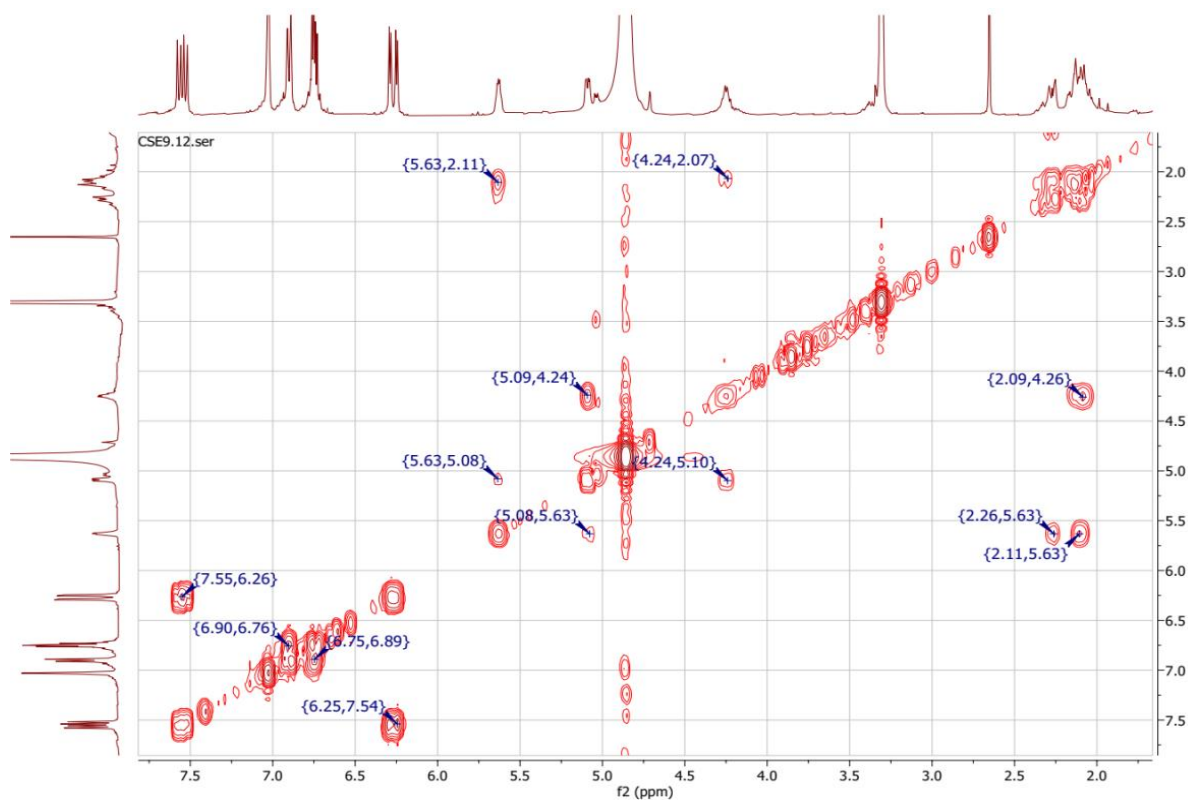


Hình PL-60. Phổ ^{13}C -NMR (CD_3OD ; 100 MHz) của hợp chất **10** (3,4-diCQA)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 10 (3,4-diCQA)

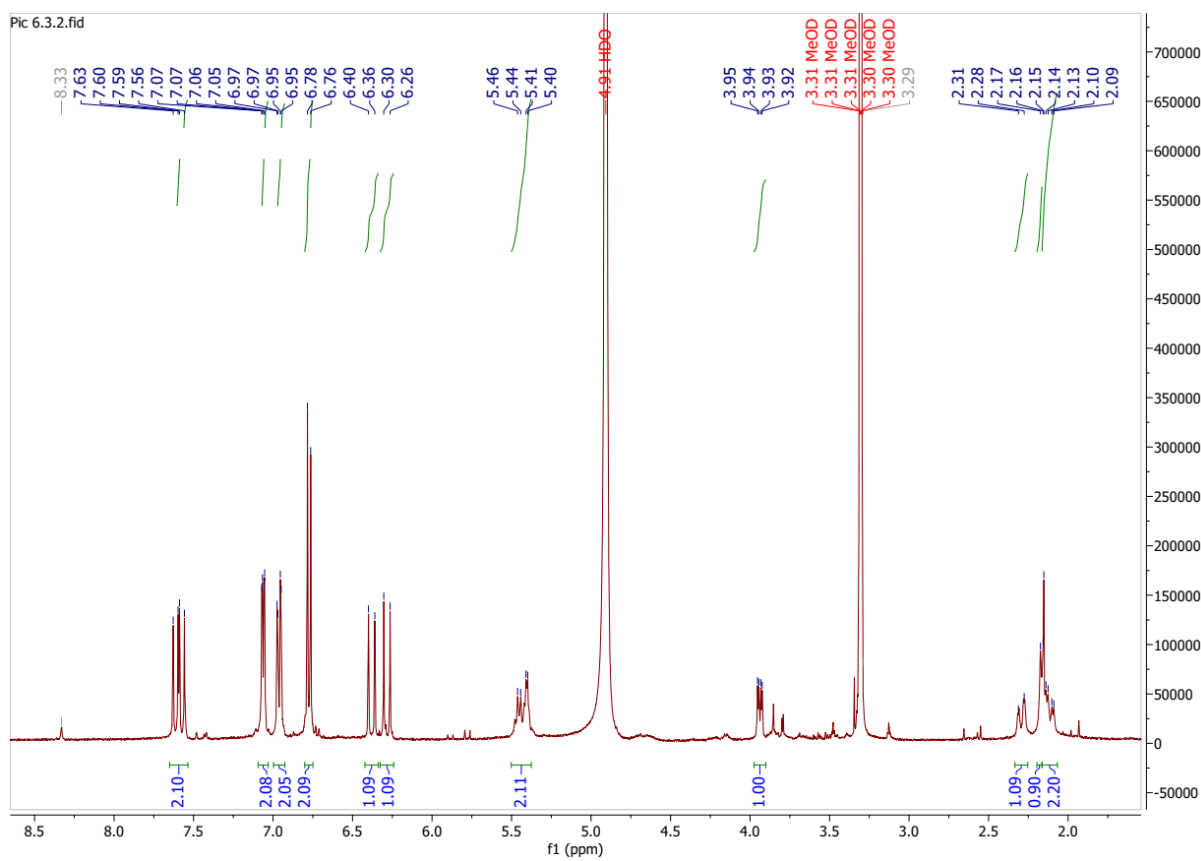


Hình PL-61. Phổ HSQC của hợp chất 10 (3,4-diCQA)

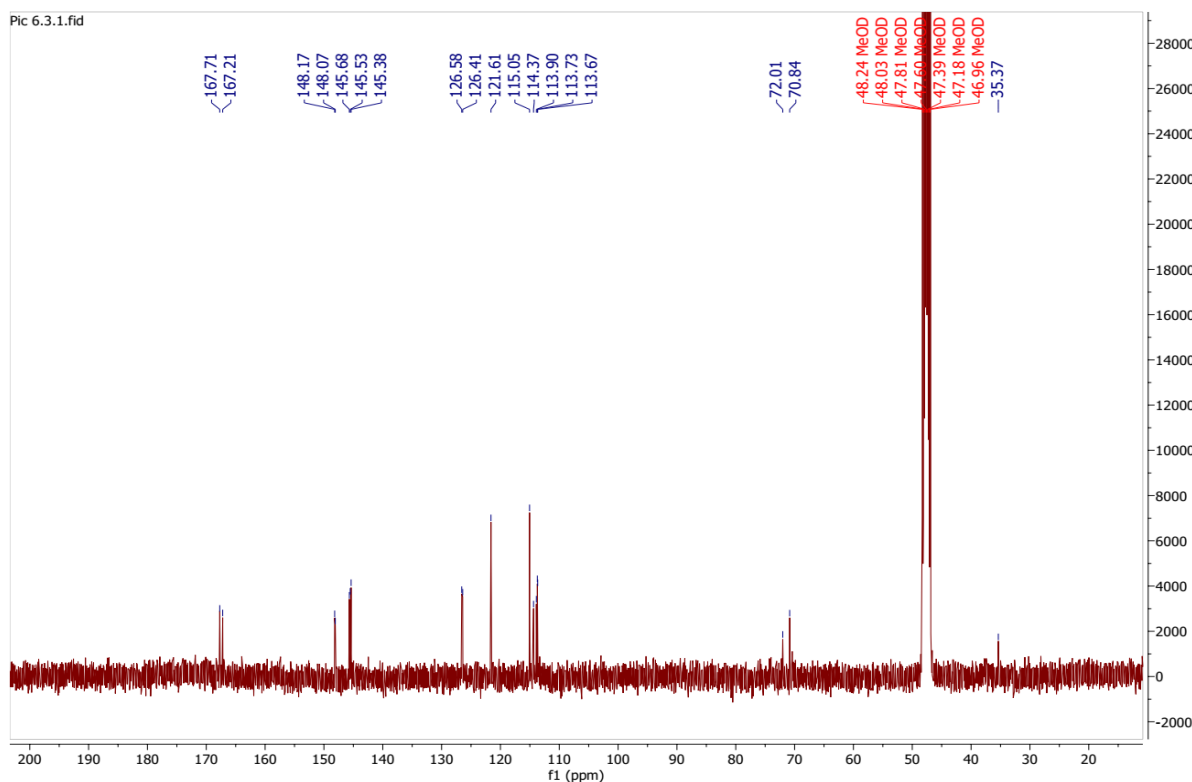


Hình PL-62. Phổ COSY của hợp chất 10 (3,4-diCQA)

Phụ lục 24. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 11 (3,5-diCQA)

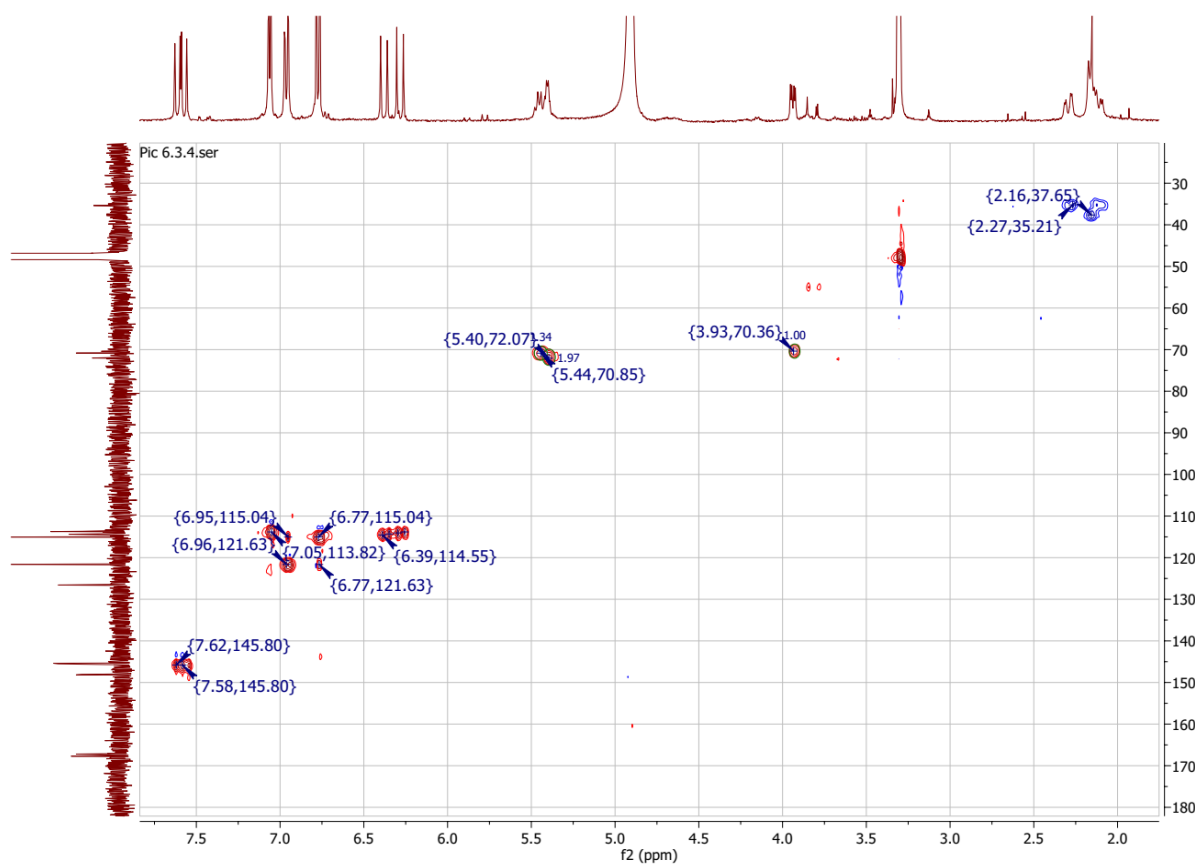


Hình PL-63. Phổ ^1H -NMR (CD_3OD ; 400 MHz) của hợp chất **11** (3,5-diCQA)

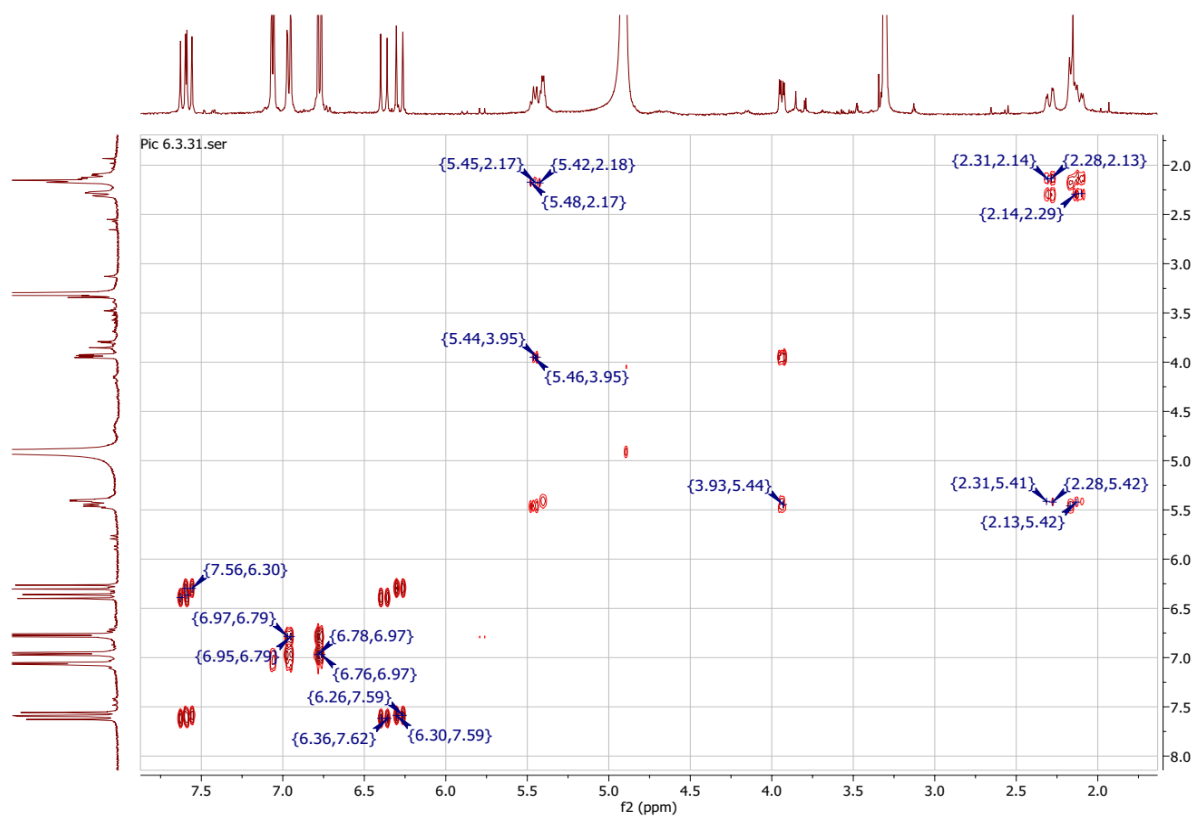


Hình PL-64. Phổ ^{13}C -NMR (CD_3OD ; 100 MHz) của hợp chất **11** (3,5-diCQA)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 10 (3,5-diCQA)

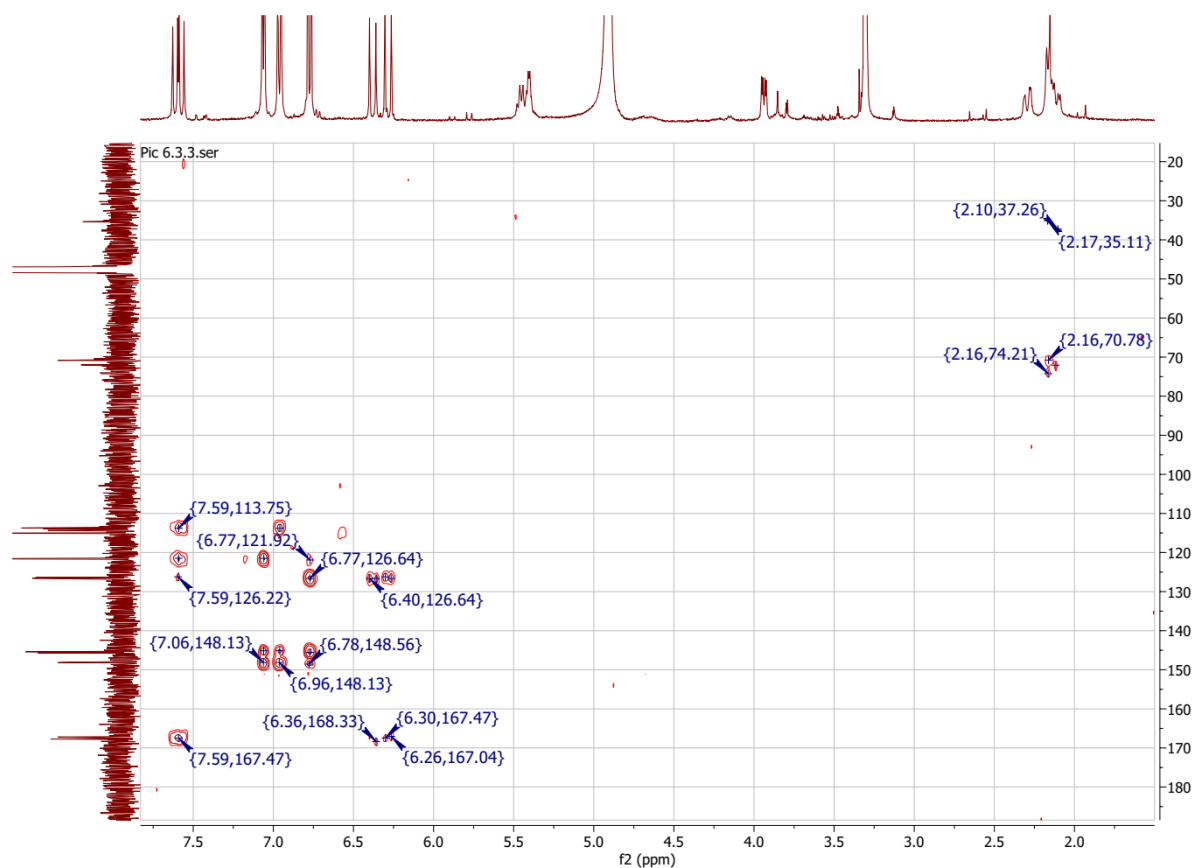


Hình PL-65. Phổ HSQC của hợp chất 11 (3,5-diCQA)

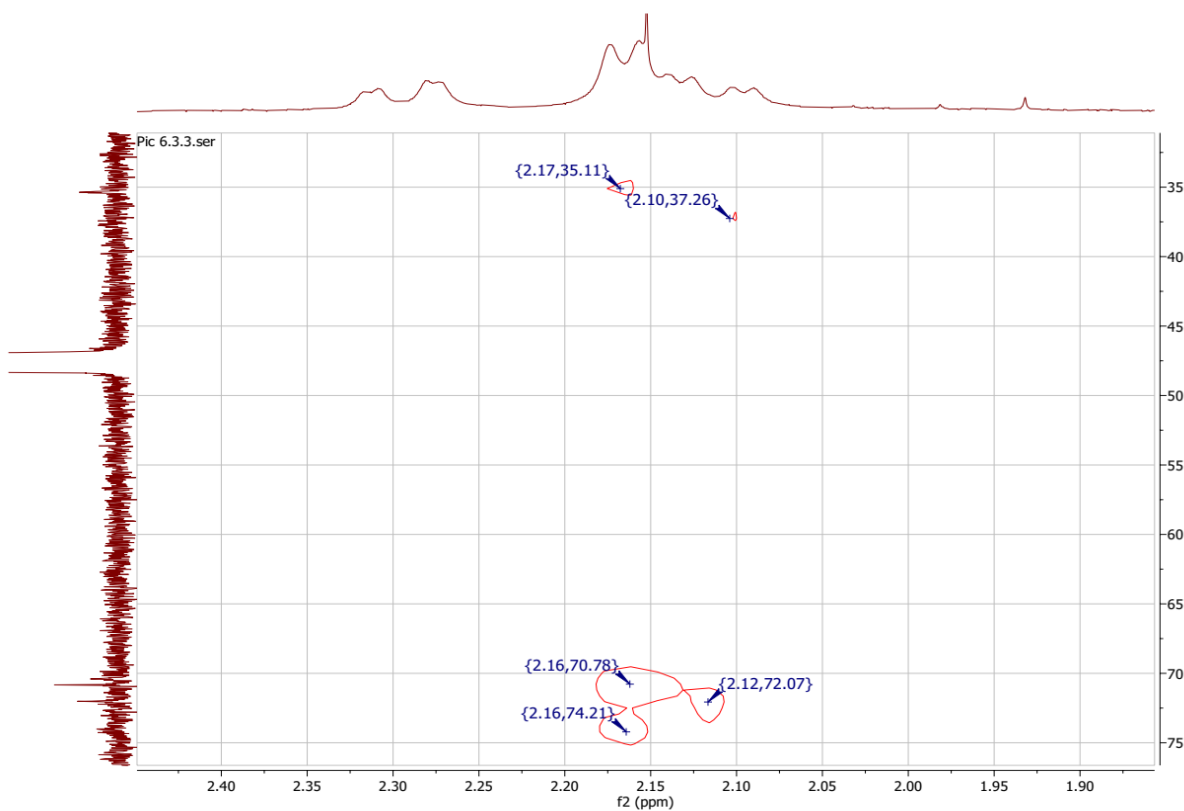


Hình PL-66. Phổ COSY của hợp chất 11 (3,5-diCQA)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 10 (3,5-diCQA)

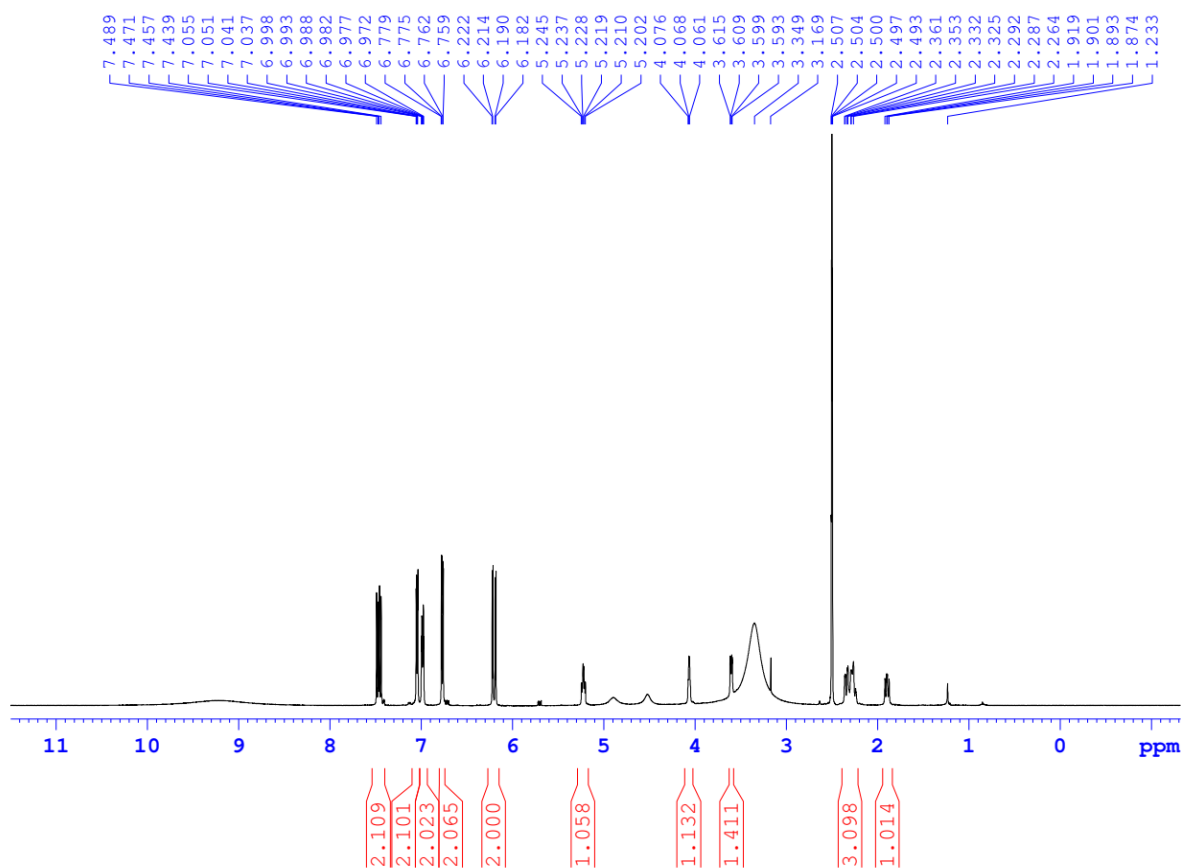


Hình PL-67. Phổ HMBC của hợp chất 11 (3,5-diCQA)

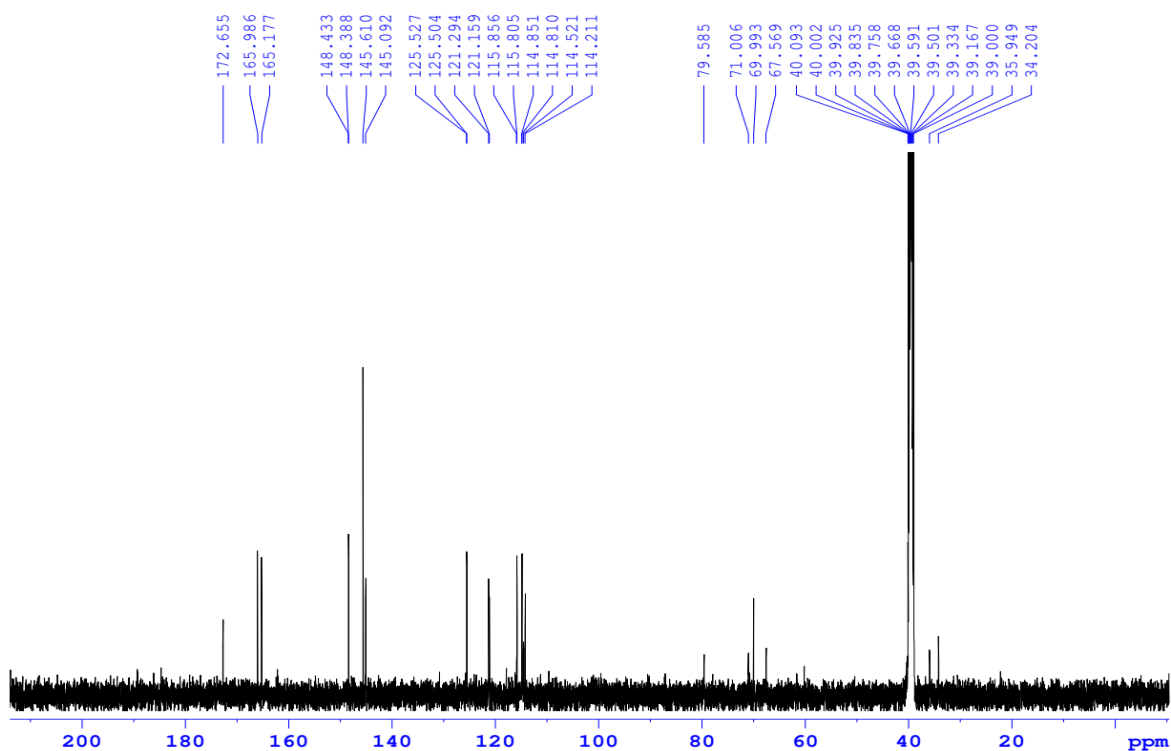


Hình PL-68. Phổ HMBC (giãn) của hợp chất 11 (3,5-diCQA)

Phụ lục 25. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 12 (1,5-diCQA)



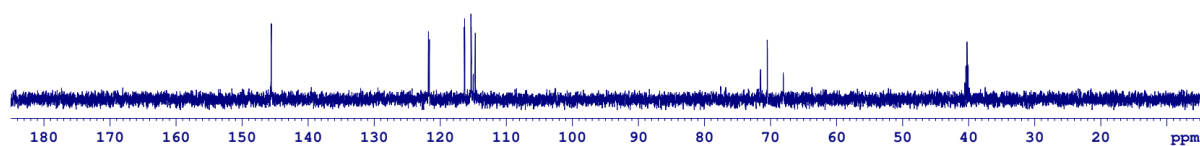
Hình PL-69. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất 12 (1,5-diCQA)



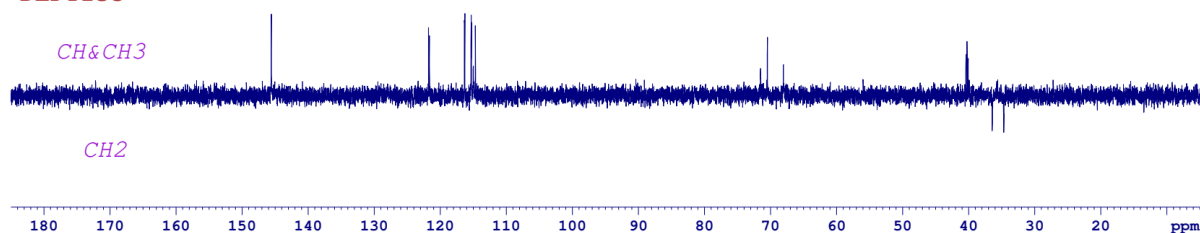
Hình PL-70. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; 125 MHz) của hợp chất 12 (1,5-diCQA)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 12 (1,5-diCQA)

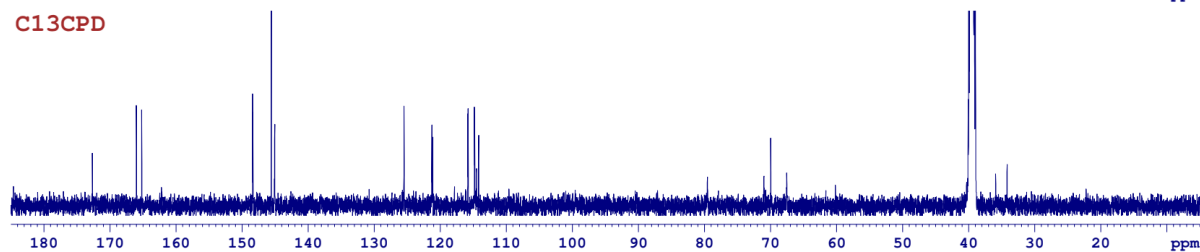
DEPT90



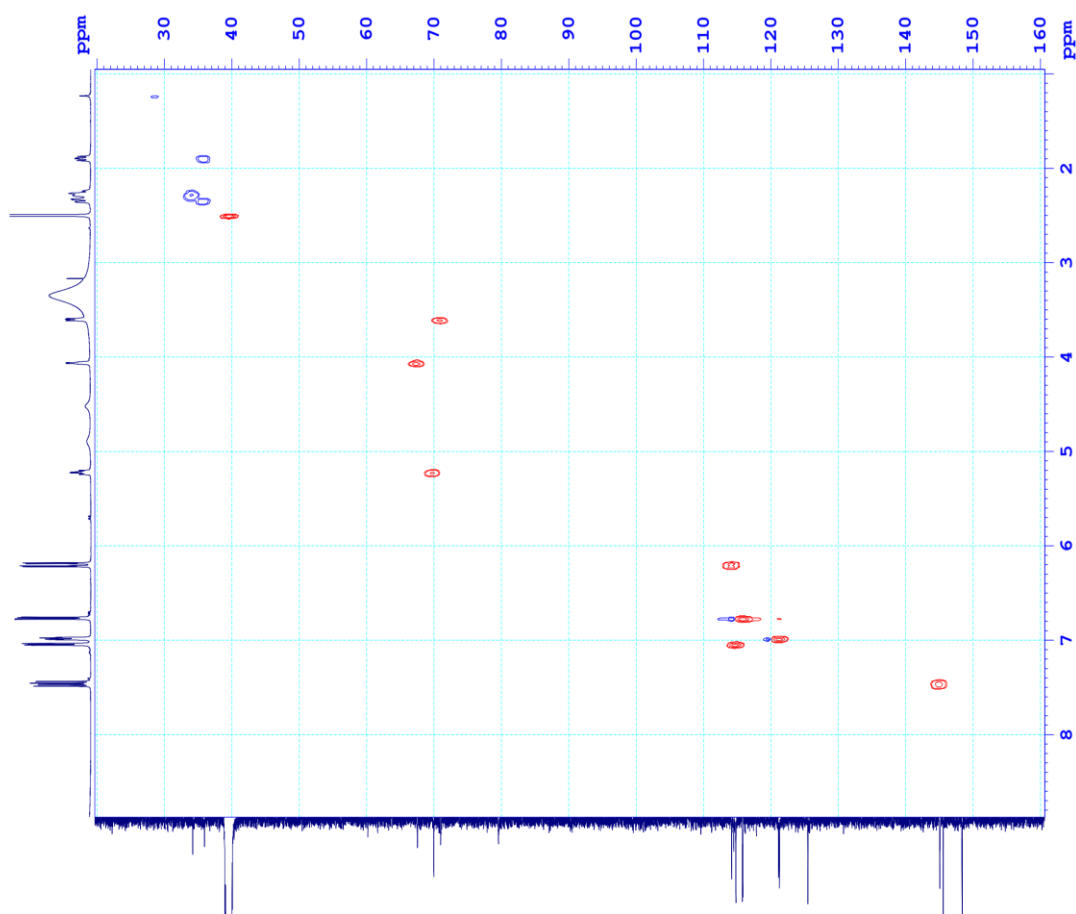
DEPT135



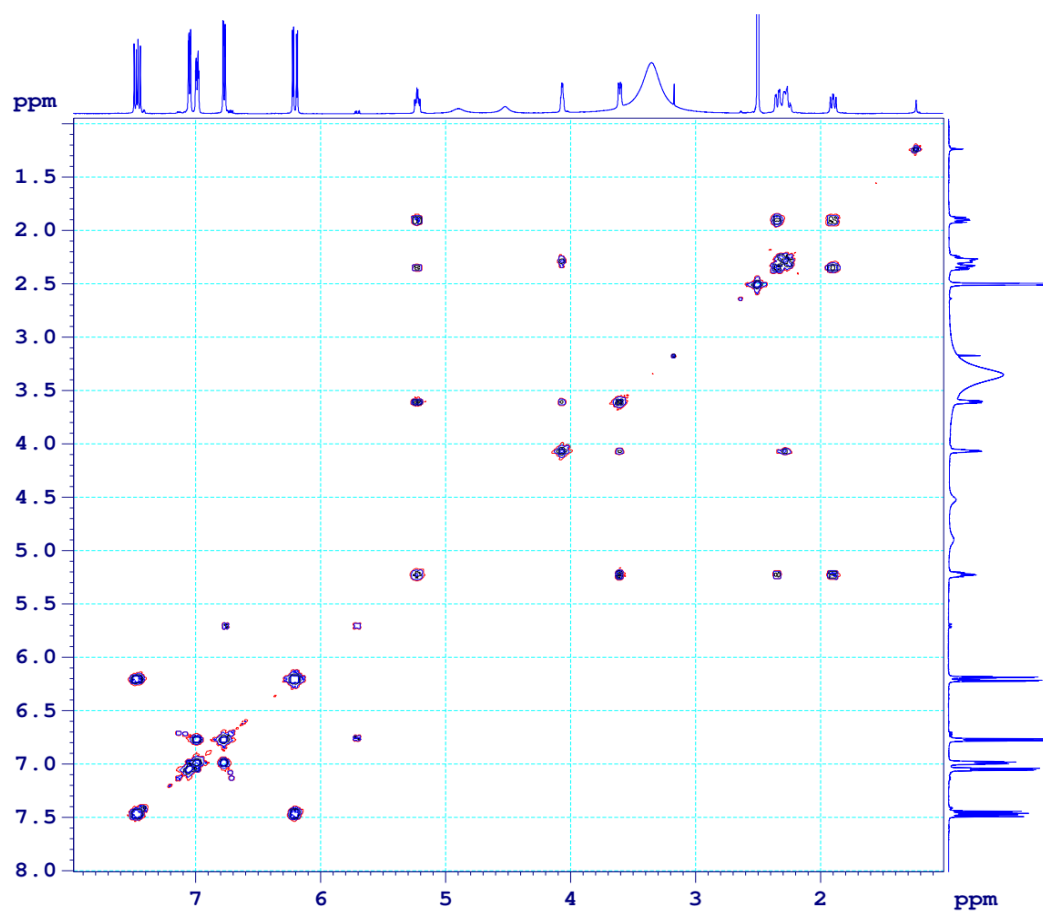
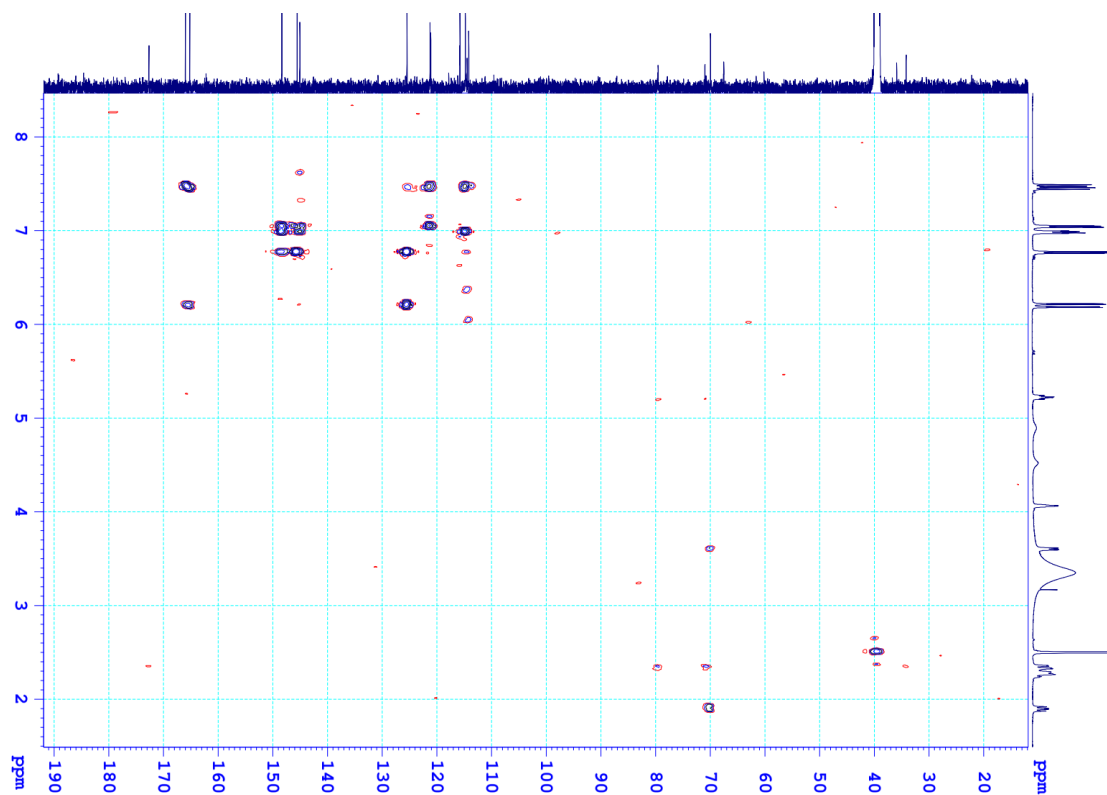
C13CPD



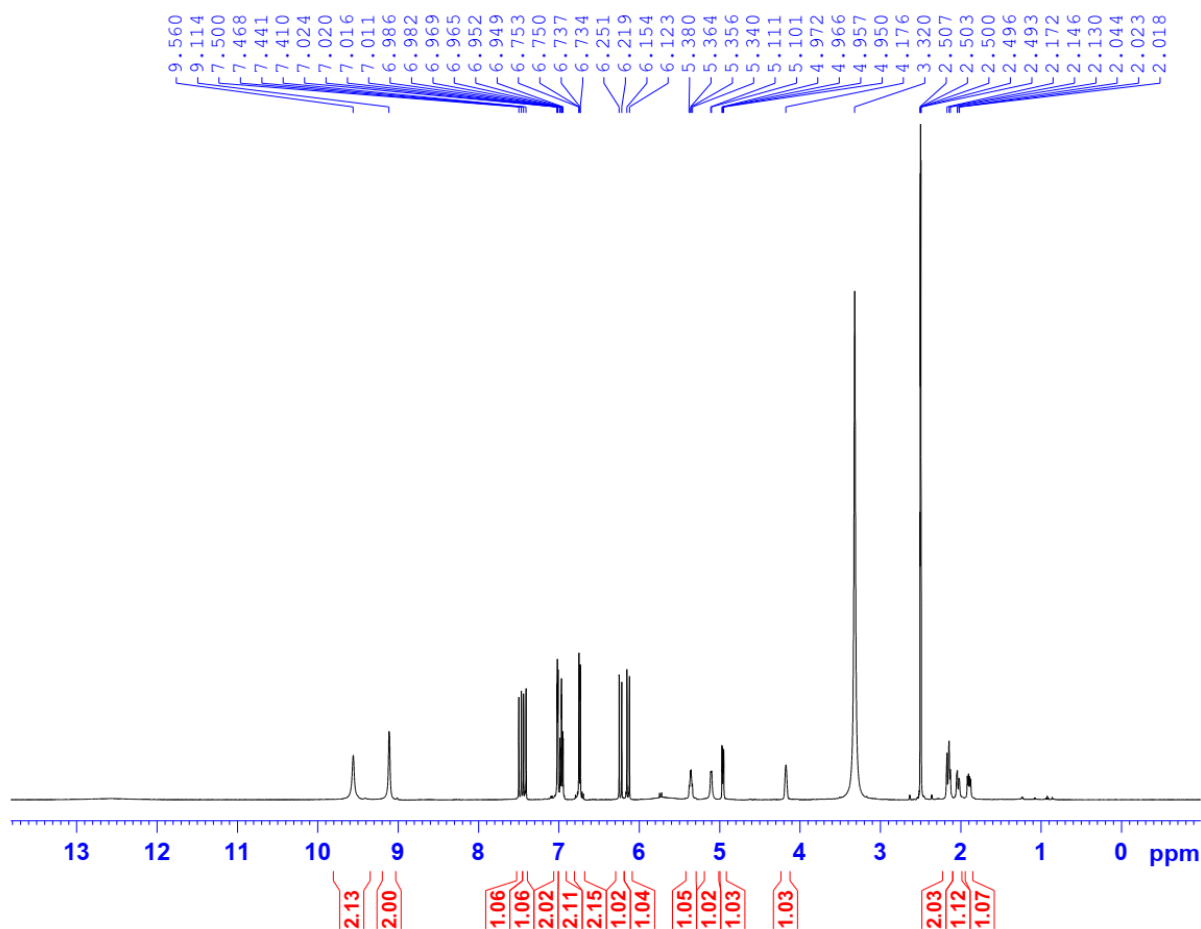
Hình PL-71. Phổ DEPT của hợp chất 12 (1,5-diCQA)



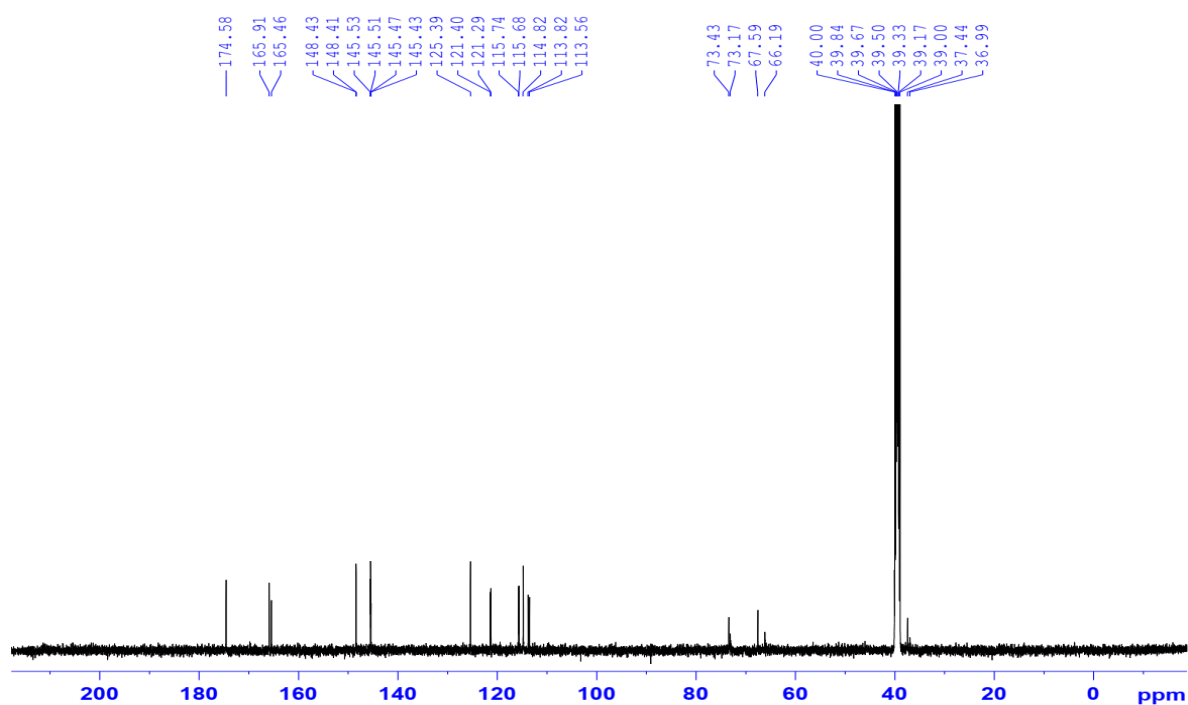
Hình PL-72. Phổ HSQC của hợp chất 12 (1,5-diCQA)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 12 (1,5-diCQA)**Hình PL-73.** Phổ COSY của hợp chất 12 (1,5-diCQA)**Hình PL-74.** Phổ HMBC của hợp chất 12 (1,5-diCQA)

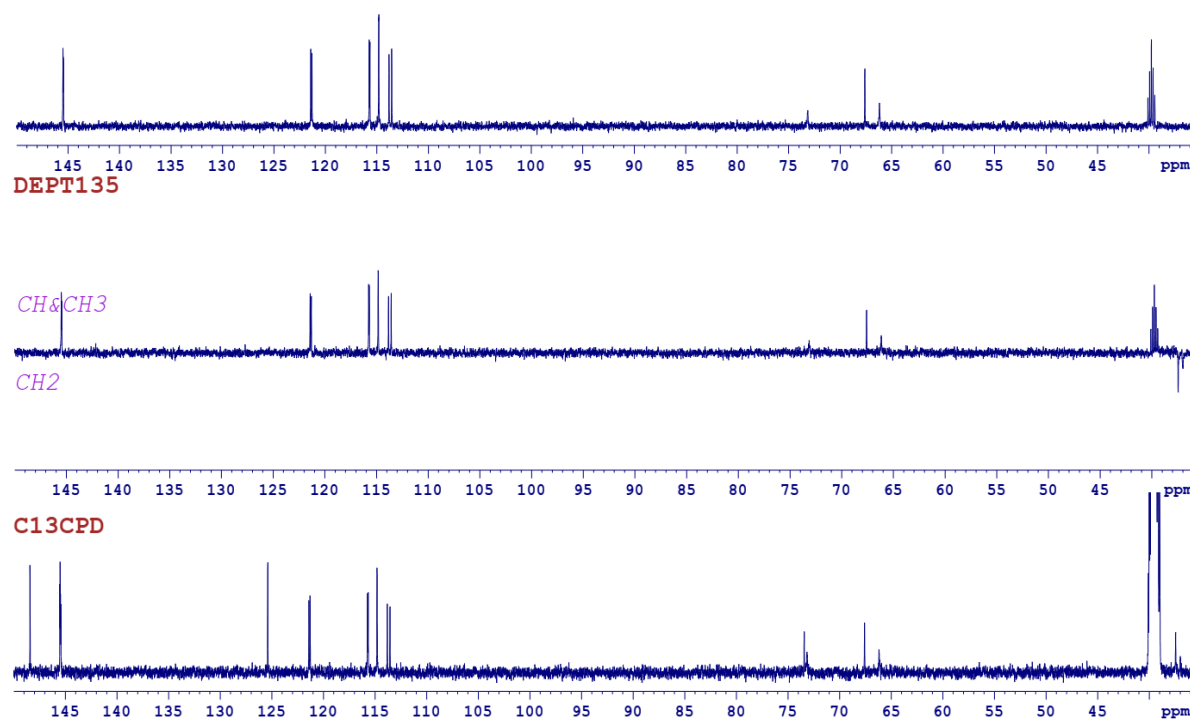
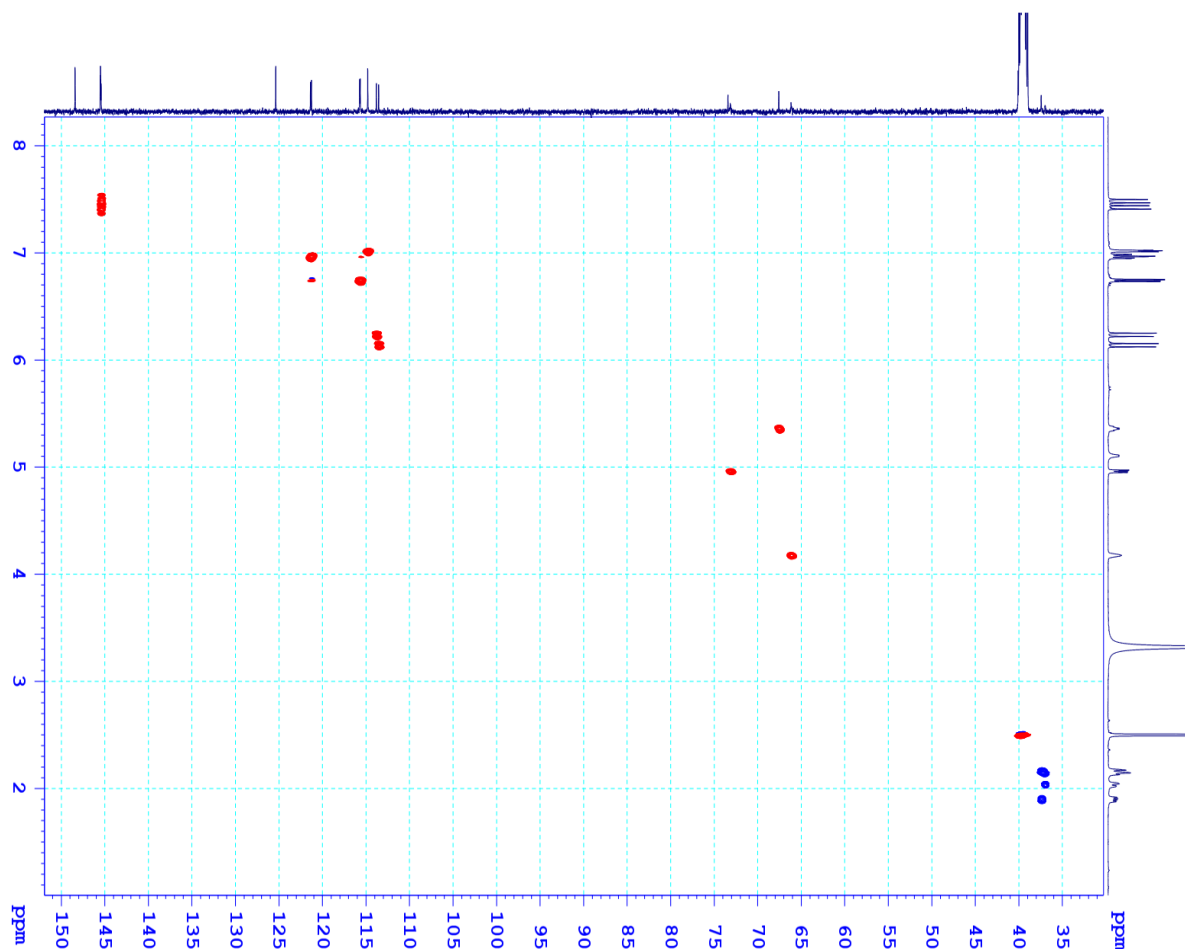
Phụ lục 26. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 13 (4,5-diCQA)

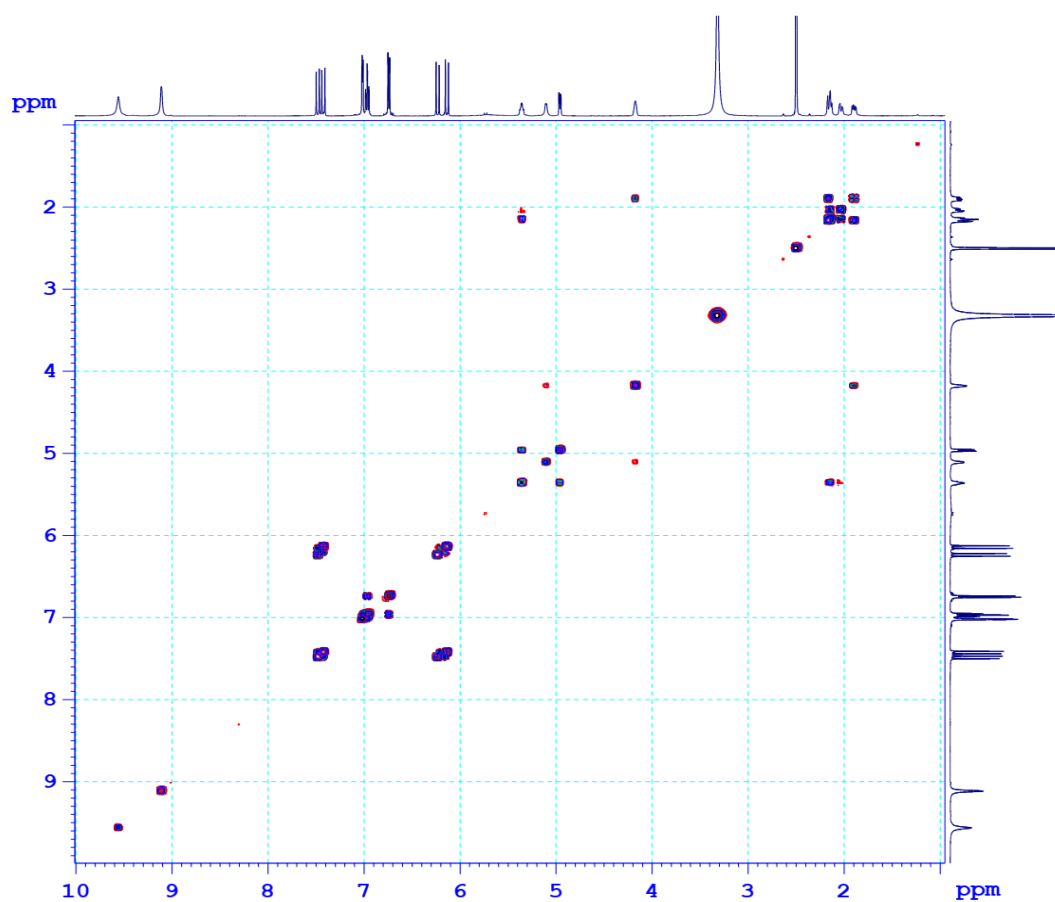
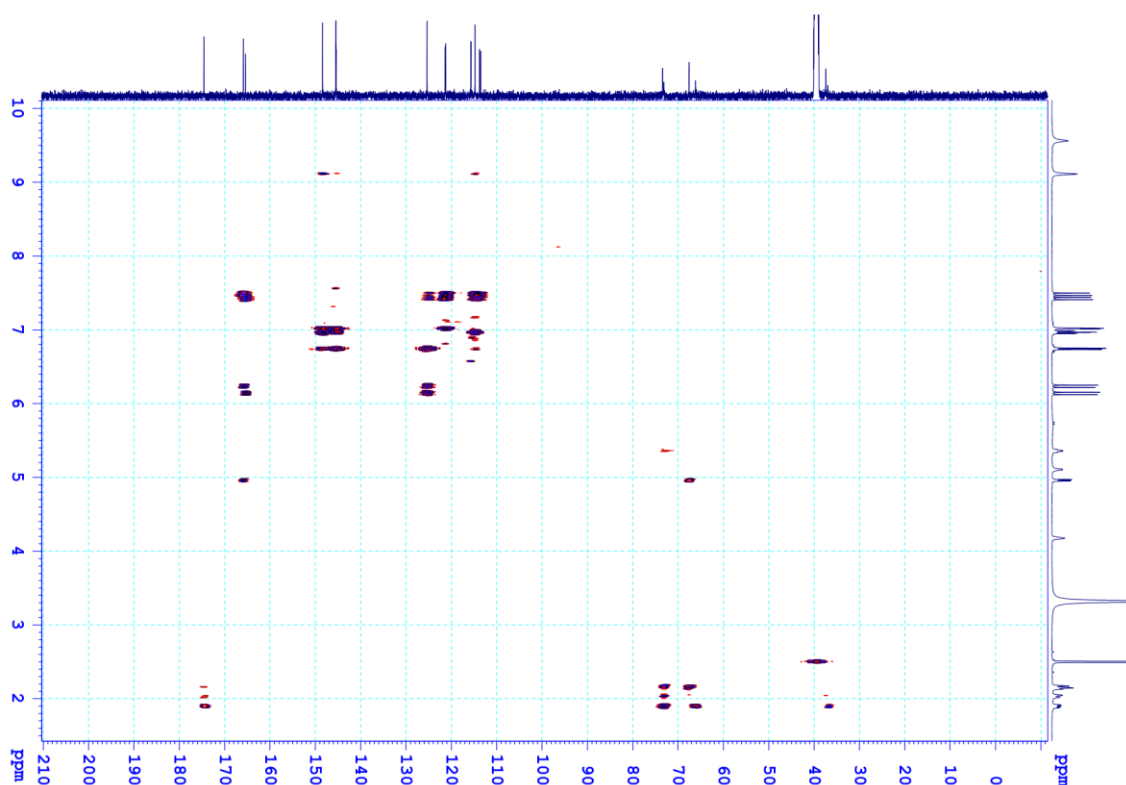


Hình PL-75. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất 13 (4,5-diCQA)

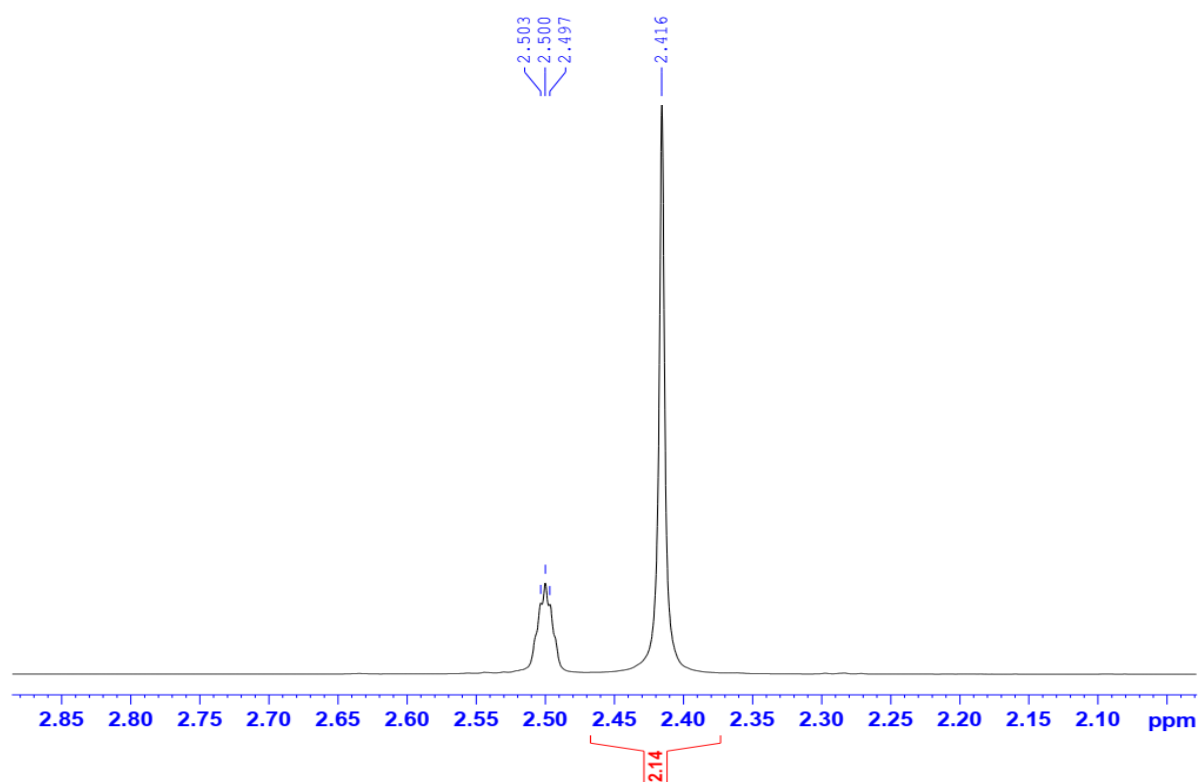


Hình PL-76. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; 125 MHz) của hợp chất 13 (4,5-diCQA)

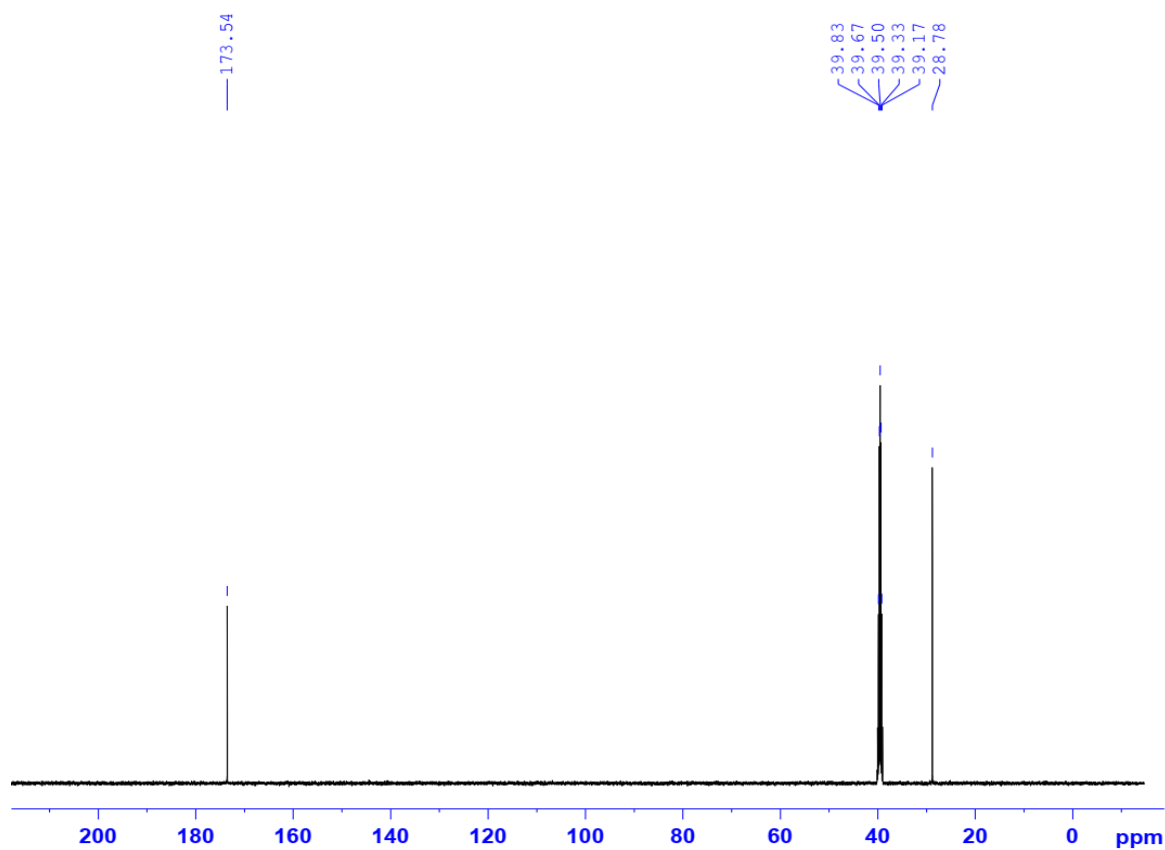
PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 13 (4,5-diCQA)**Hình PL-77.** Phổ DEPT của hợp chất **13** (4,5-diCQA)**Hình PL-78.** Phổ HSQC của hợp chất **13** (4,5-diCQA)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 13 (1,5-diCQA)**Hình PL-79.** Phổ COSY của hợp chất **13** (4,5-diCQA)**Hình PL-80.** Phổ HMBC của hợp chất **13** (4,5-diCQA)

Phụ lục 27. **PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 14 (acid succinic)**

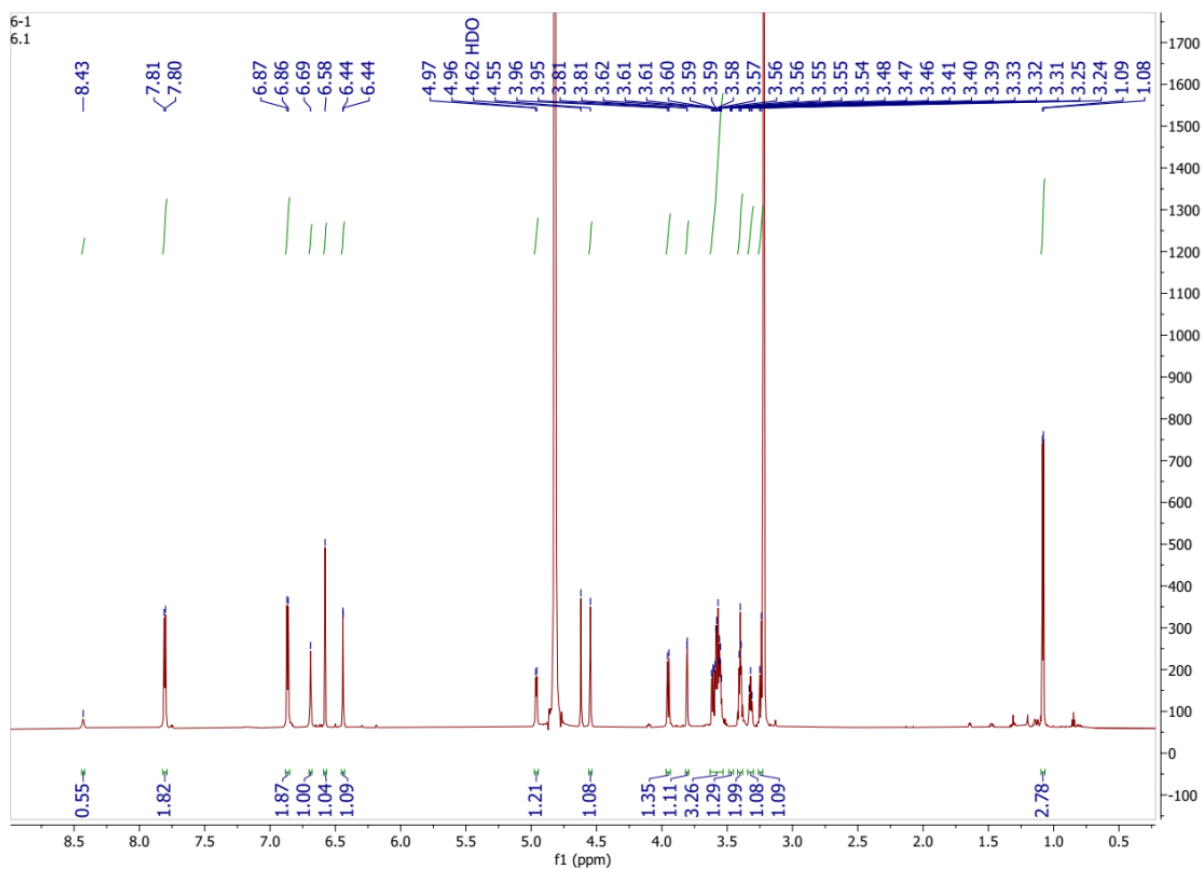


Hình PL-81. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất **14** (acid succinic)

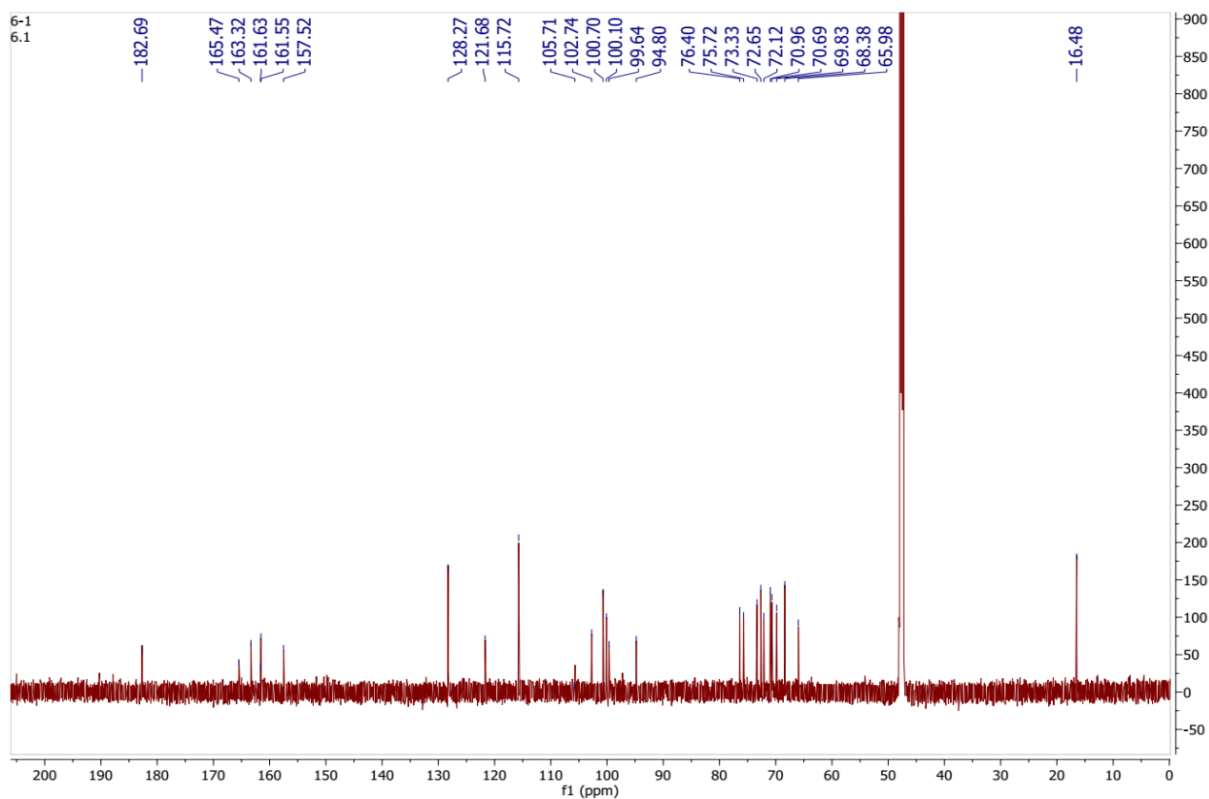


Hình PL-82. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; 125 MHz) của hợp chất **14** (acid succinic)

Phụ lục 28. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 15 (apigenin-7-rutinosid)

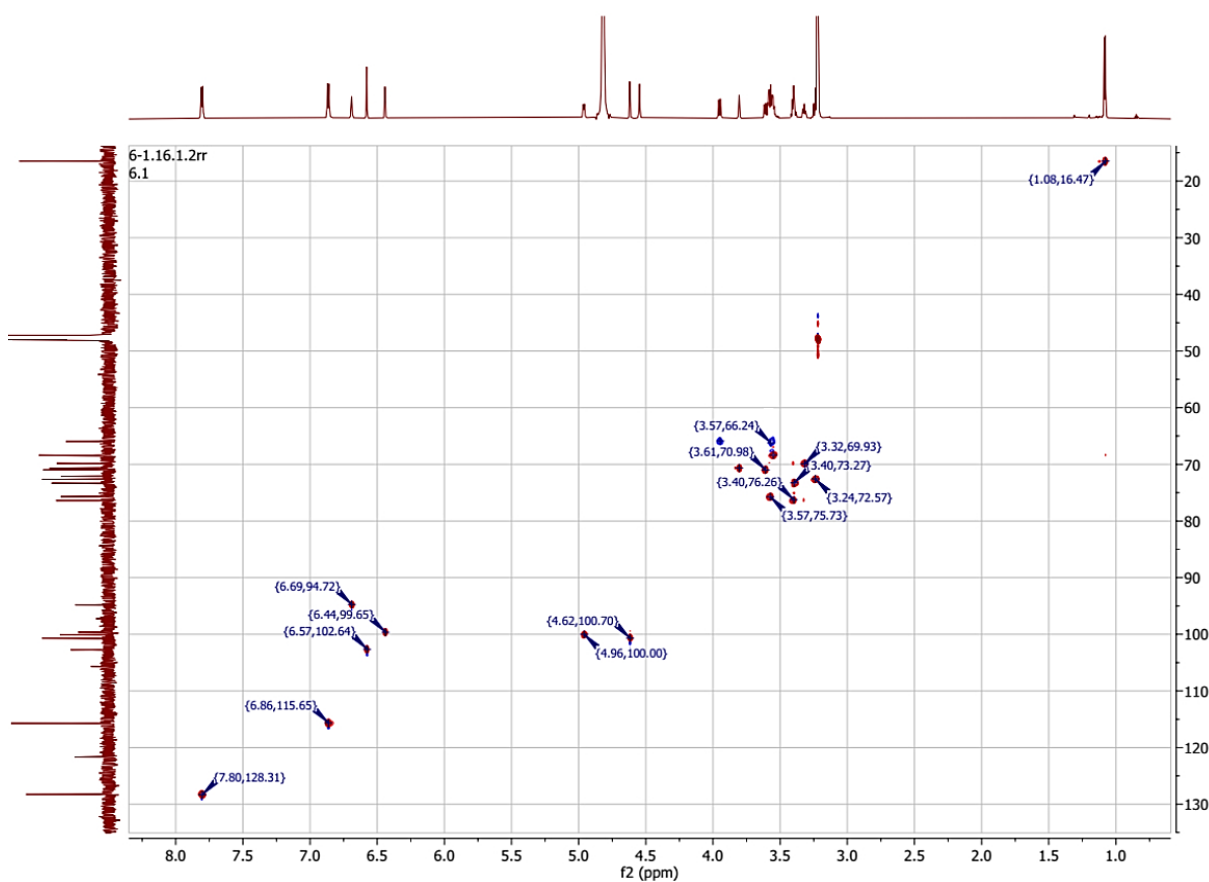


Hình PL-83. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất 15 (apigenin-7-rutinosid)

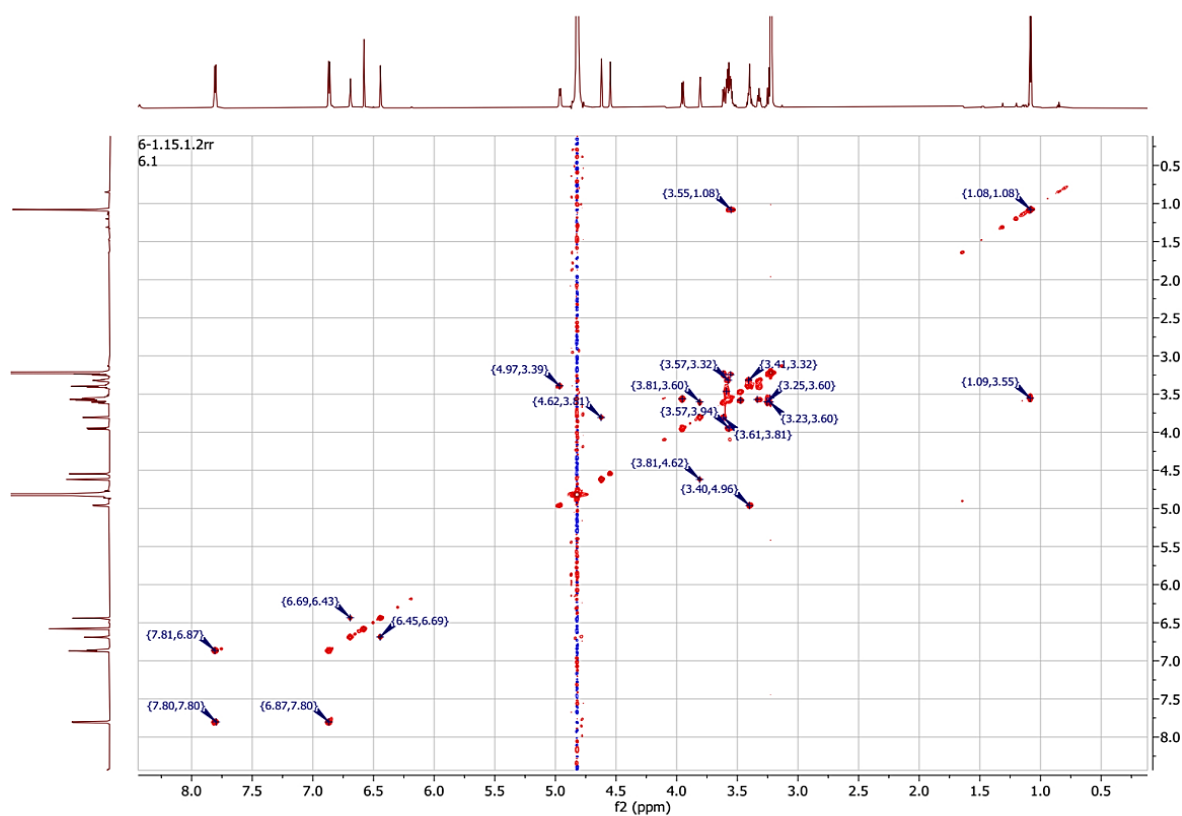


Hình PL-84. Phổ ¹³C-NMR (CD₃OD-*d*₆; 200 MHz) của hợp chất 15 (apigenin-7-rutinosid)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 15 (4,5-diCQA)

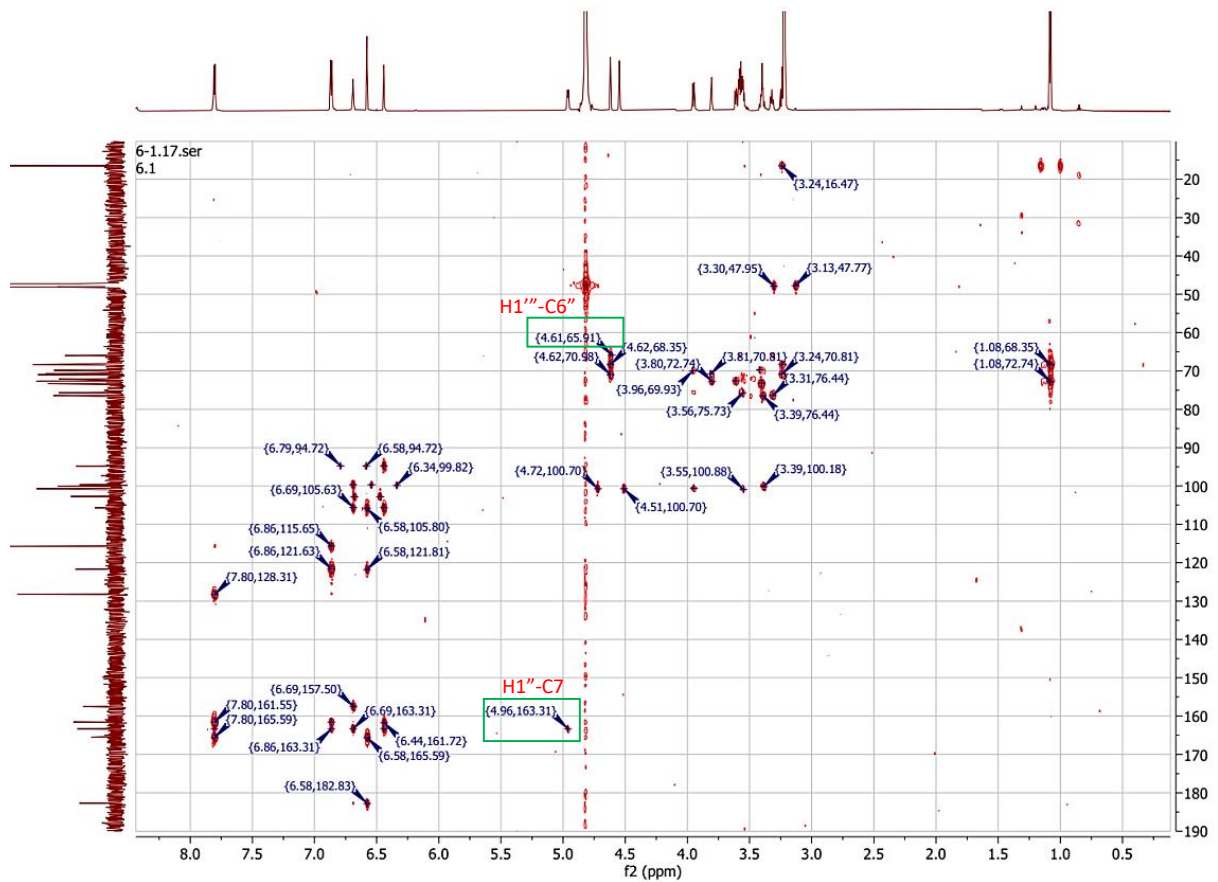


Hình PL-85. Phổ HSQC của hợp chất 15 (apigenin-7-rutinosid)

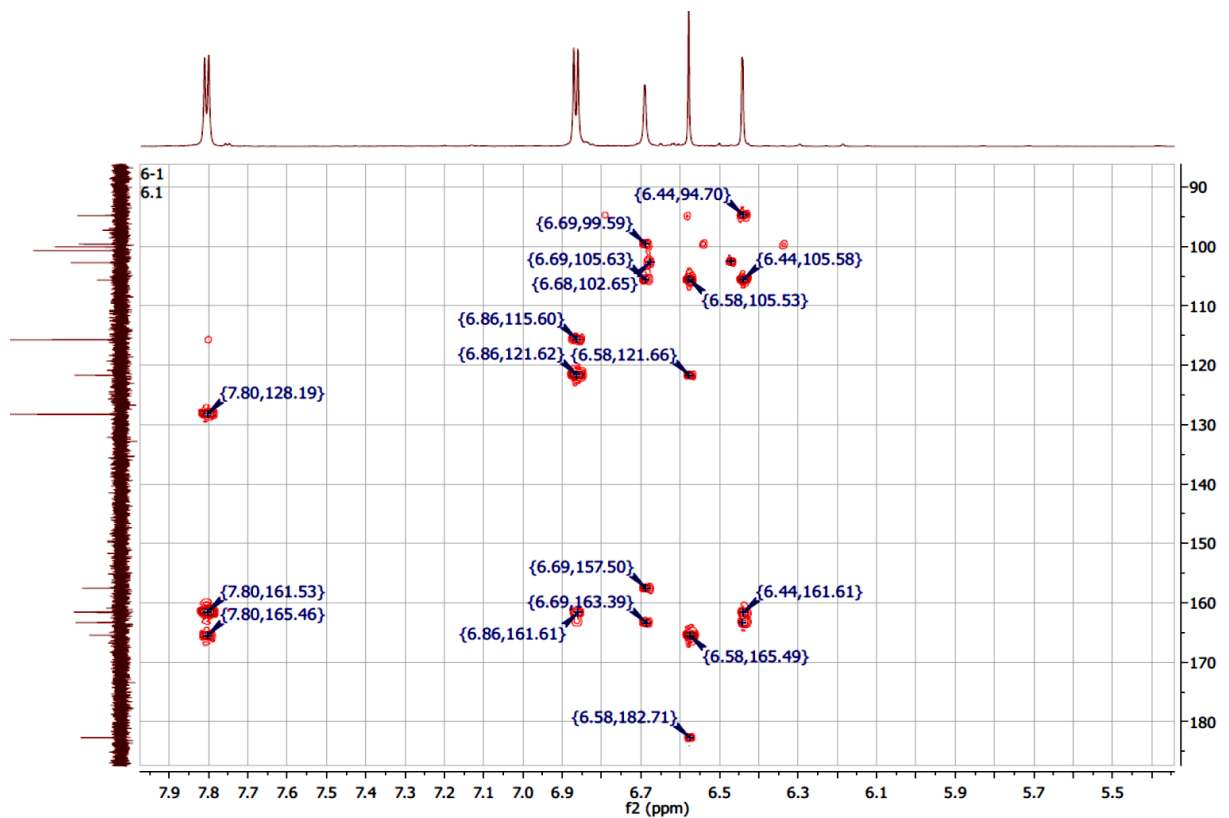


Hình PL-86. Phổ COSY của hợp chất 15 (apigenin-7-rutinosid)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 15 (1,5-diCQA)

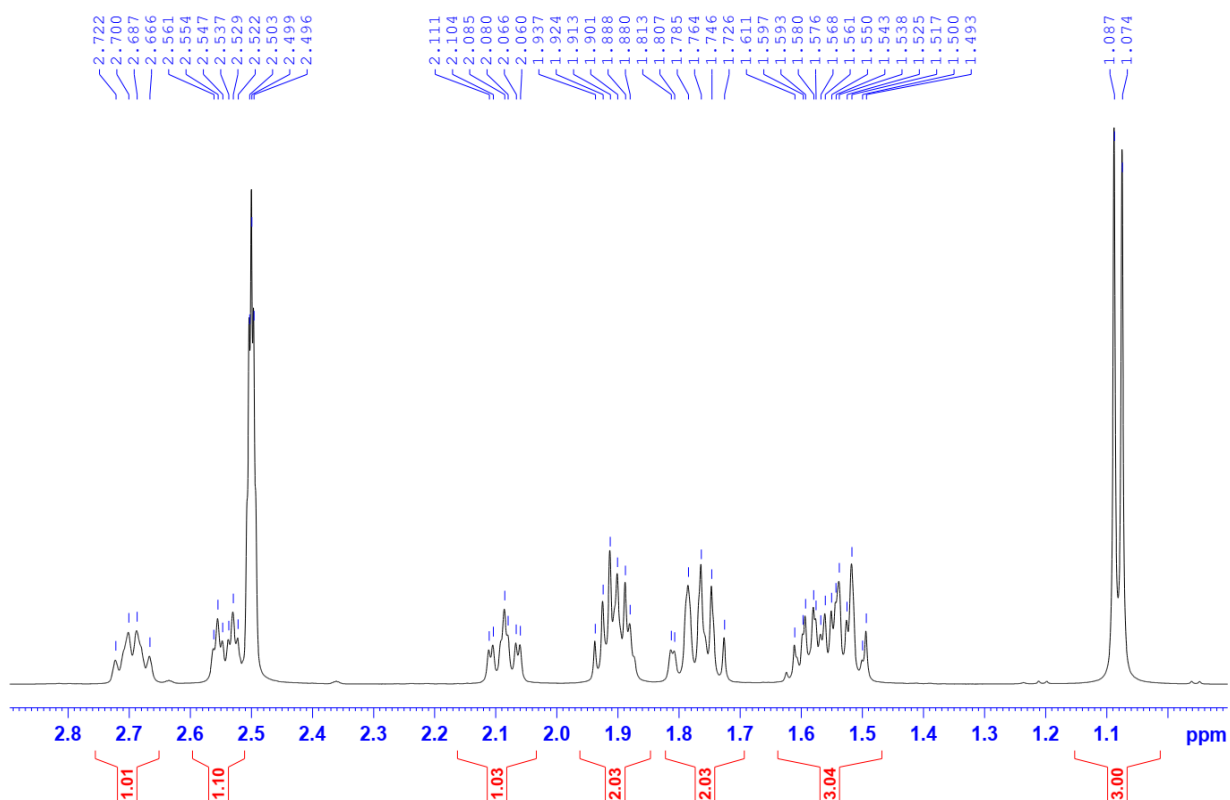


Hình PL-87. Phổ HMBC của hợp chất 15 (apigenin-7-rutinosid)

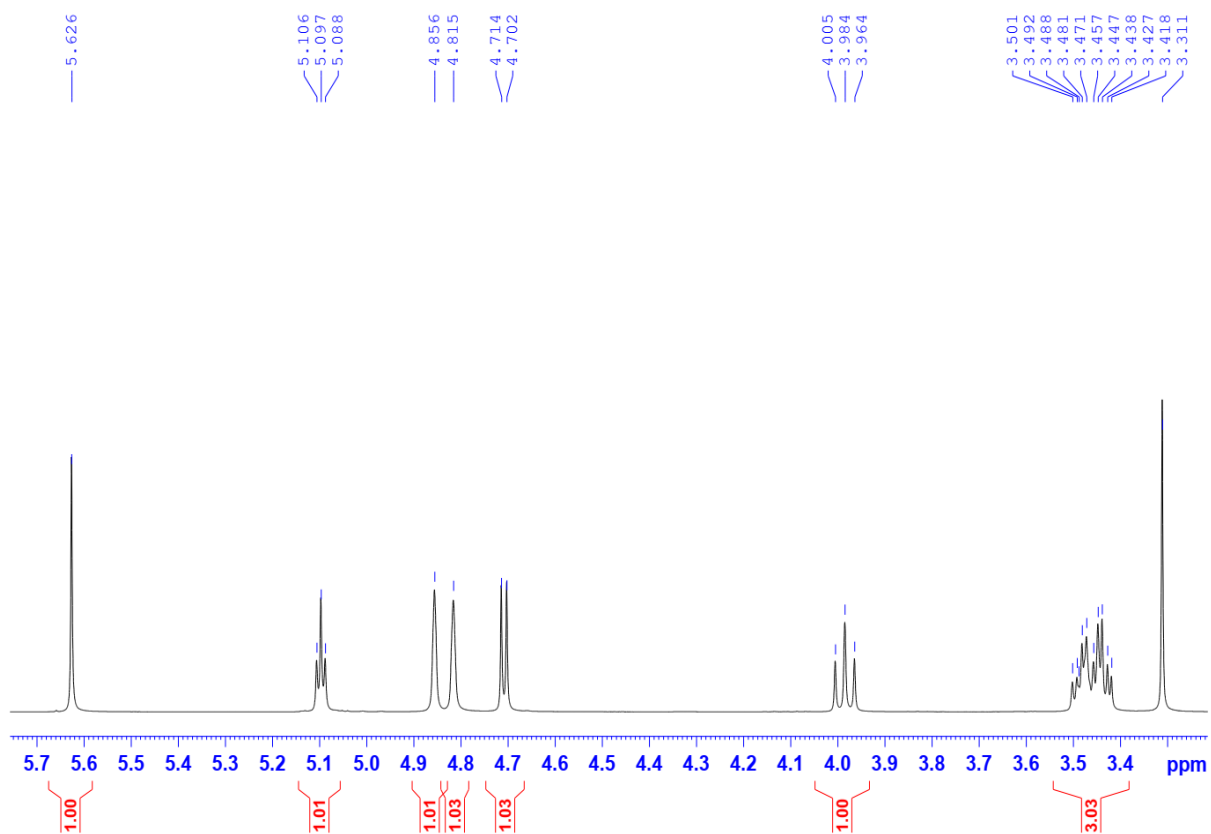


Hình PL-88. Phổ HMBC (phổ giản) của hợp chất 15 (apigenin-7-rutinosid)

Phụ lục 29. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 16 (cynaratriol)

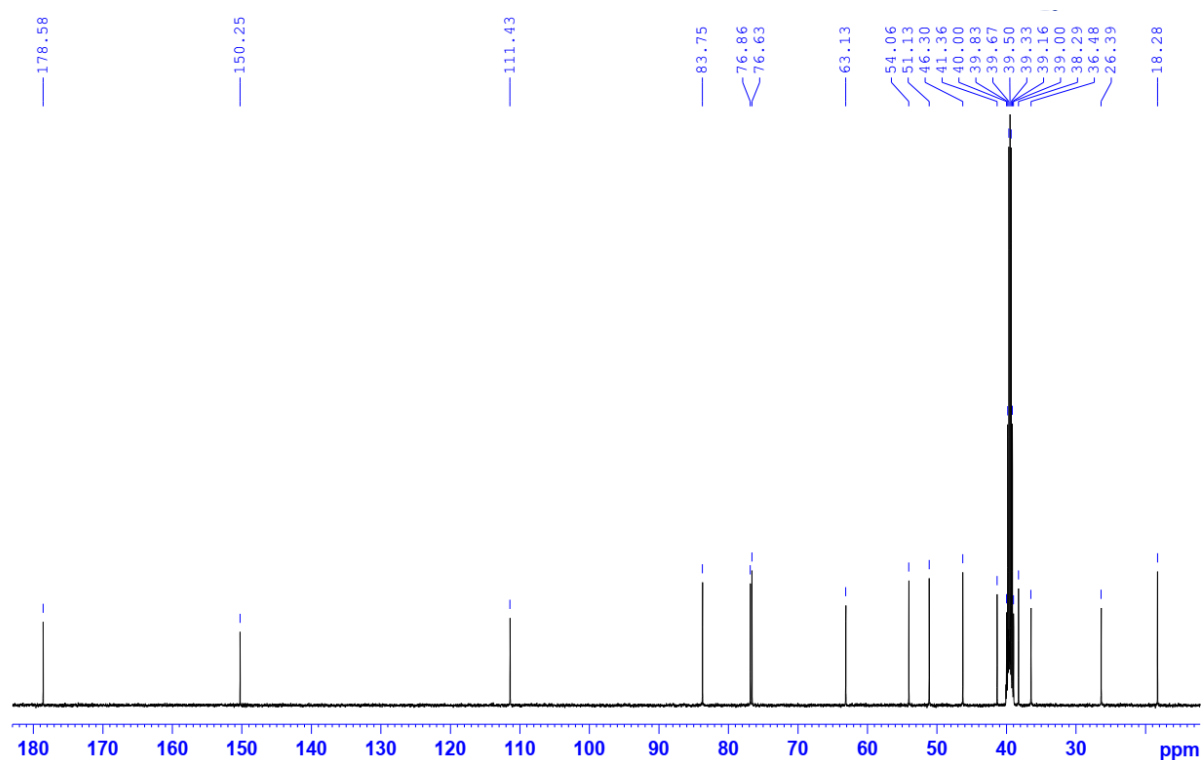


Hình PL-89. Phổ ^1H -NMR_phổ giãn 1 (DMSO- d_6 ; 500 MHz) của hợp chất **15** (cynaratriol)



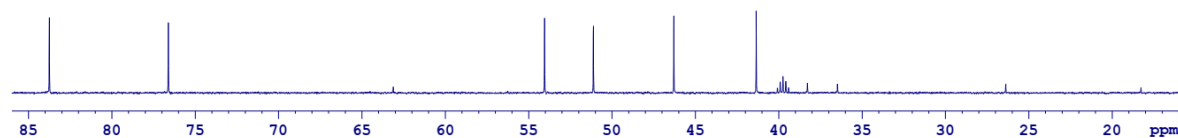
Hình PL-90. Phổ ^1H -NMR_phổ giãn 2 (DMSO- d_6 ; 500 MHz) của hợp chất **15** (cynaratriol)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 16 (cynaratriol)

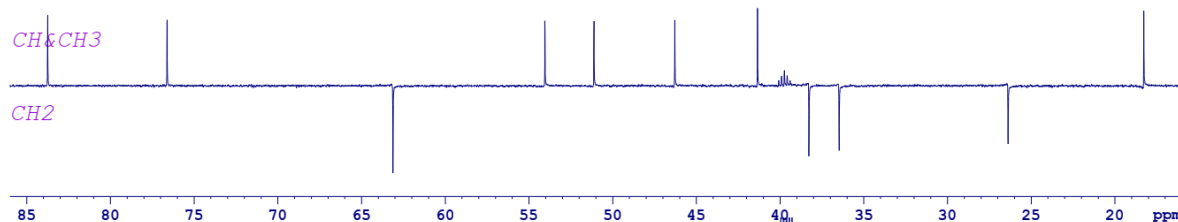


Hình PL-91. Phổ ^{13}C -NMR ($\text{DMSO}-d_6$; 125 MHz) của hợp chất 15 (cynaratriol)

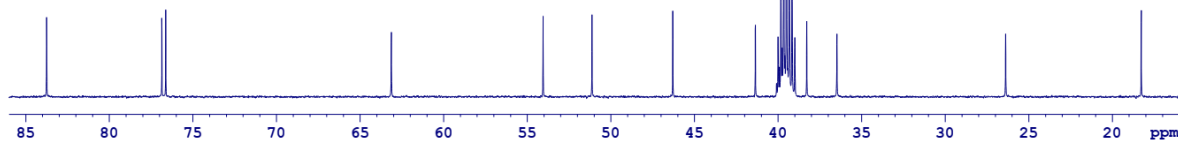
DEPT90



DEPT135

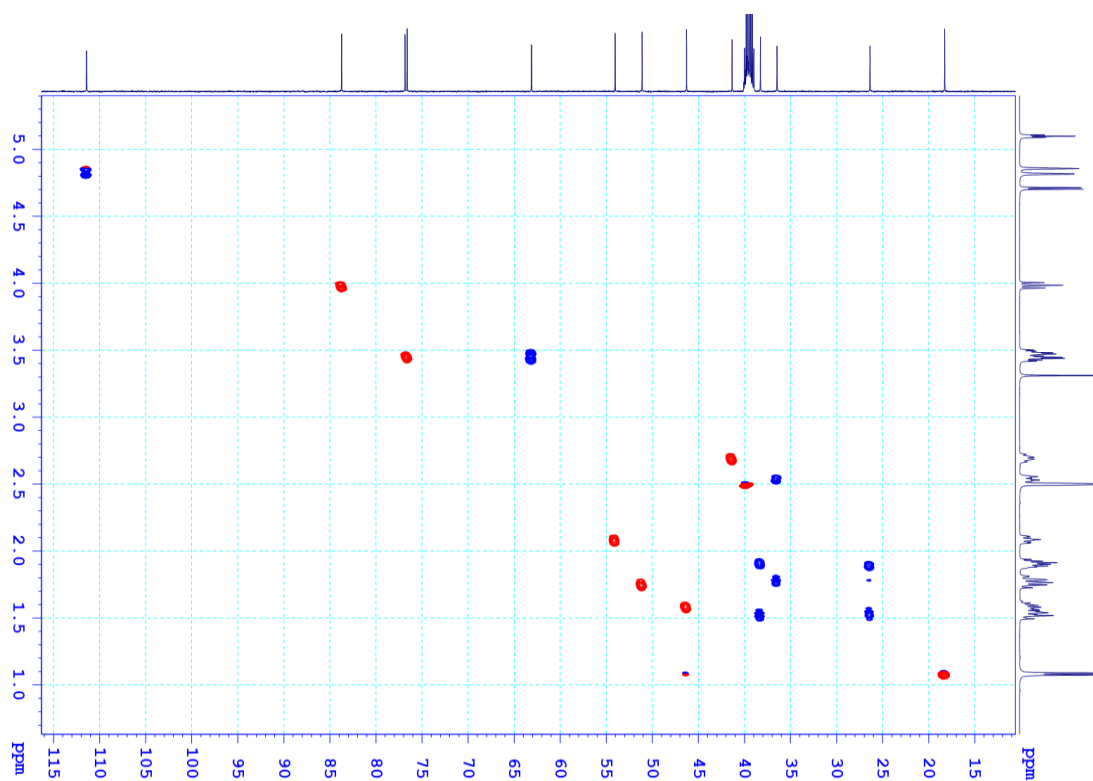


C13CPD



Hình PL-92. Phổ DEPT của hợp chất 15 (cynaratriol)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 16 (cynaratriol)

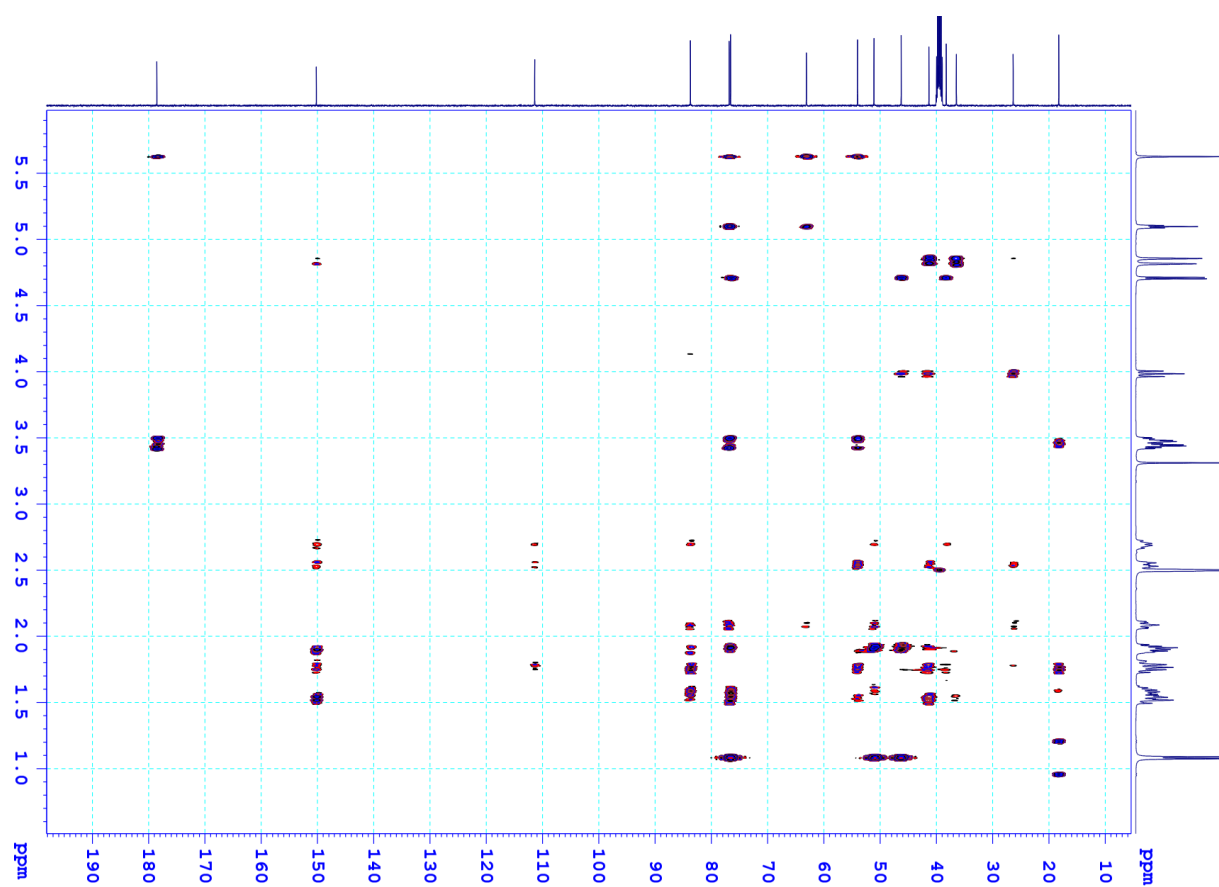


Hình PL-93. Phổ HSQC của hợp chất 16 (cynaratriol)

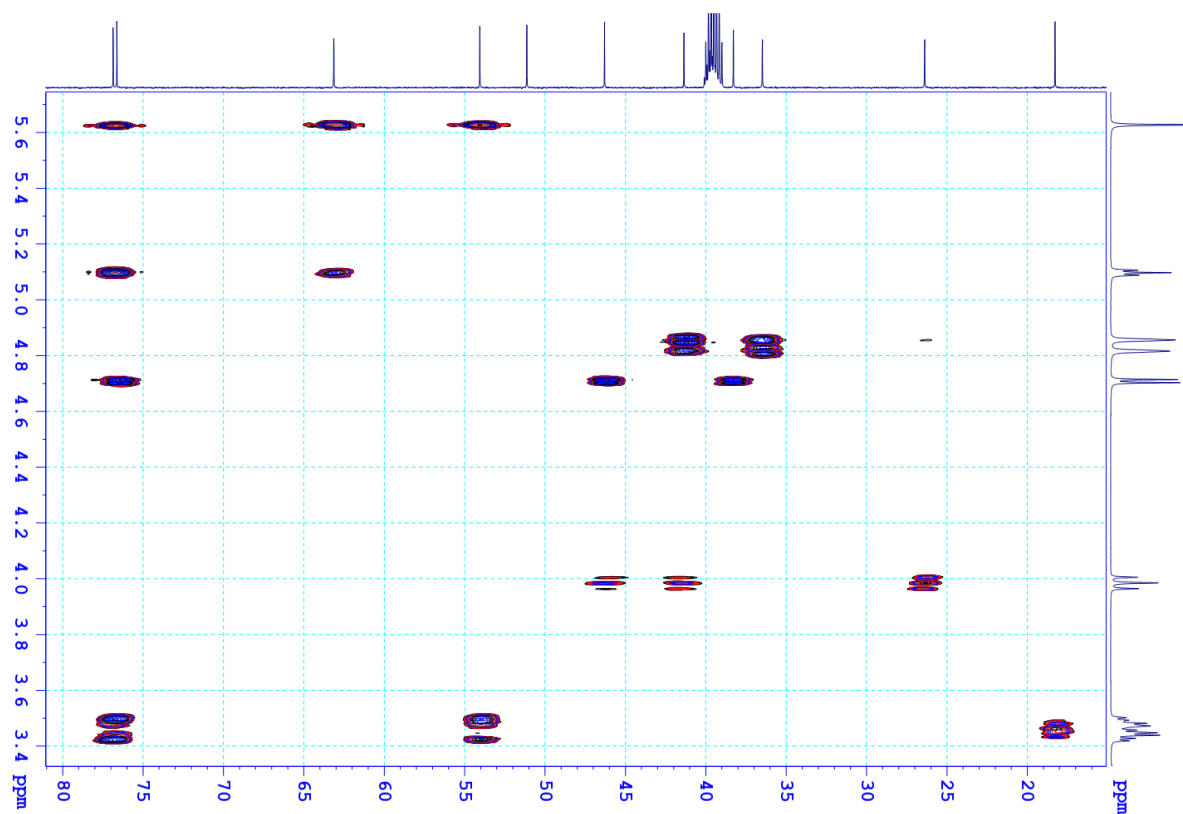


Hình PL-94. Phổ COSY của hợp chất 16 (cynaratriol)

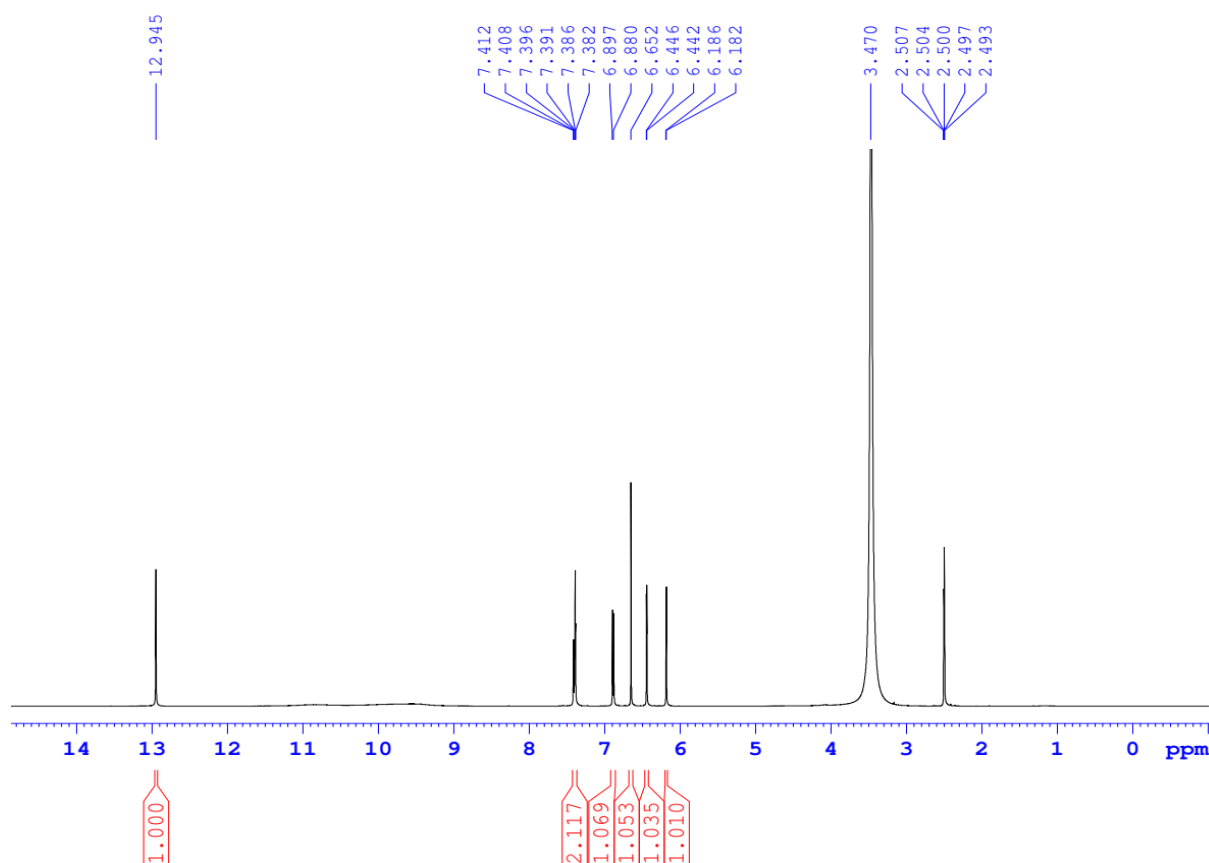
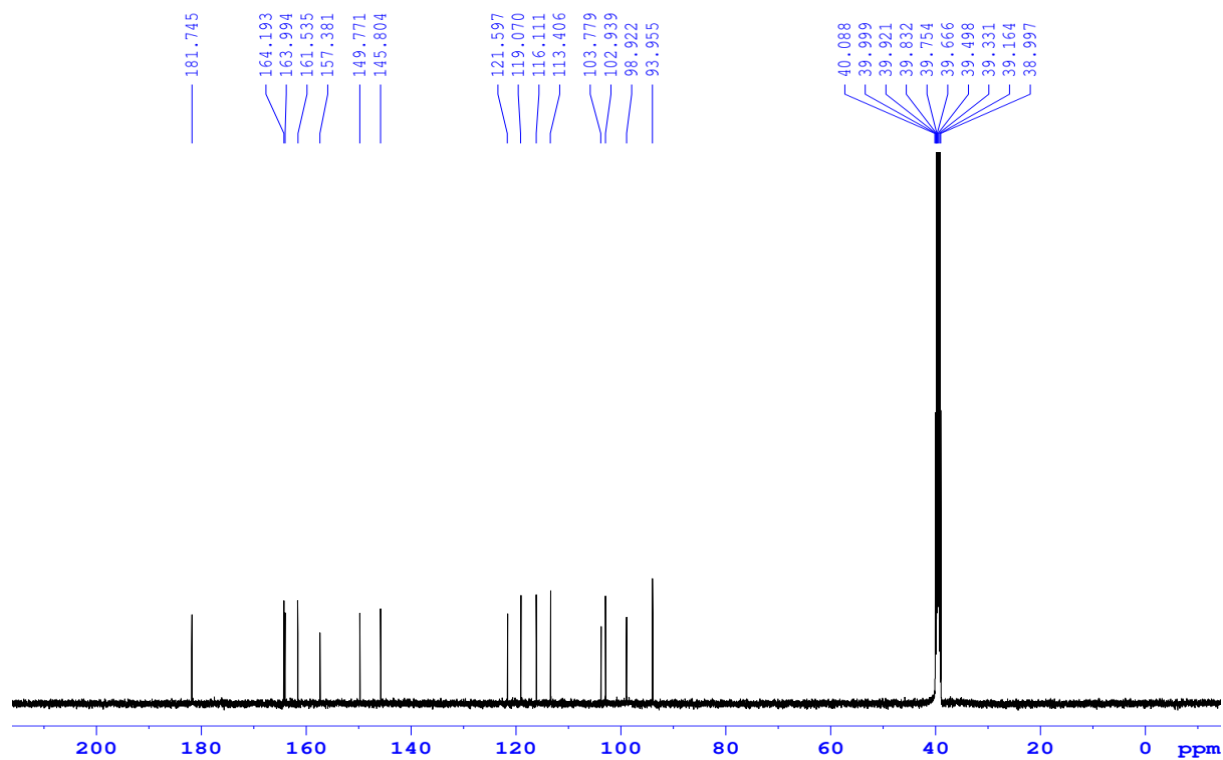
PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 16 (cynaratriol)



Hình PL-95. Phổ HMBC của hợp chất 16 (cynaratriol)

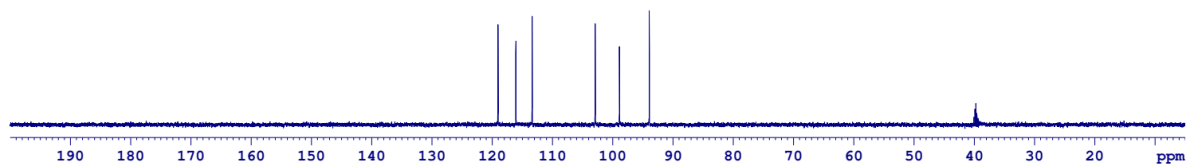


Hình PL-96. Phổ HMBC_phổ giãn của hợp chất 16 (cynaratriol)

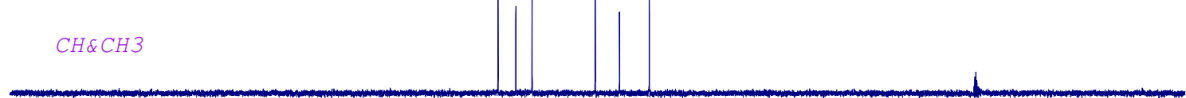
Phụ lục 30. **PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 17 (luteolin)**Hình PL-97. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất 17 (luteolin)Hình PL-98. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; 125 MHz) của hợp chất 17 (luteolin)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 17 (luteolin)

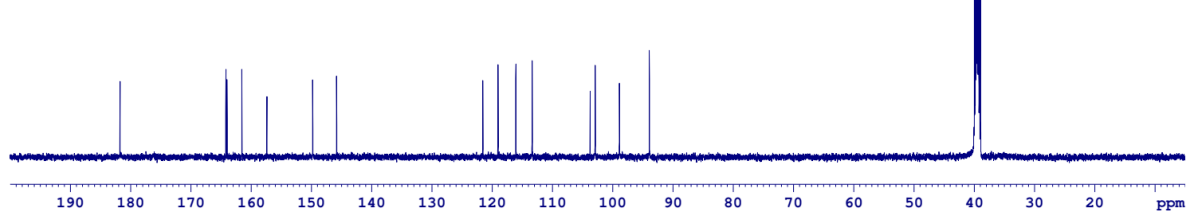
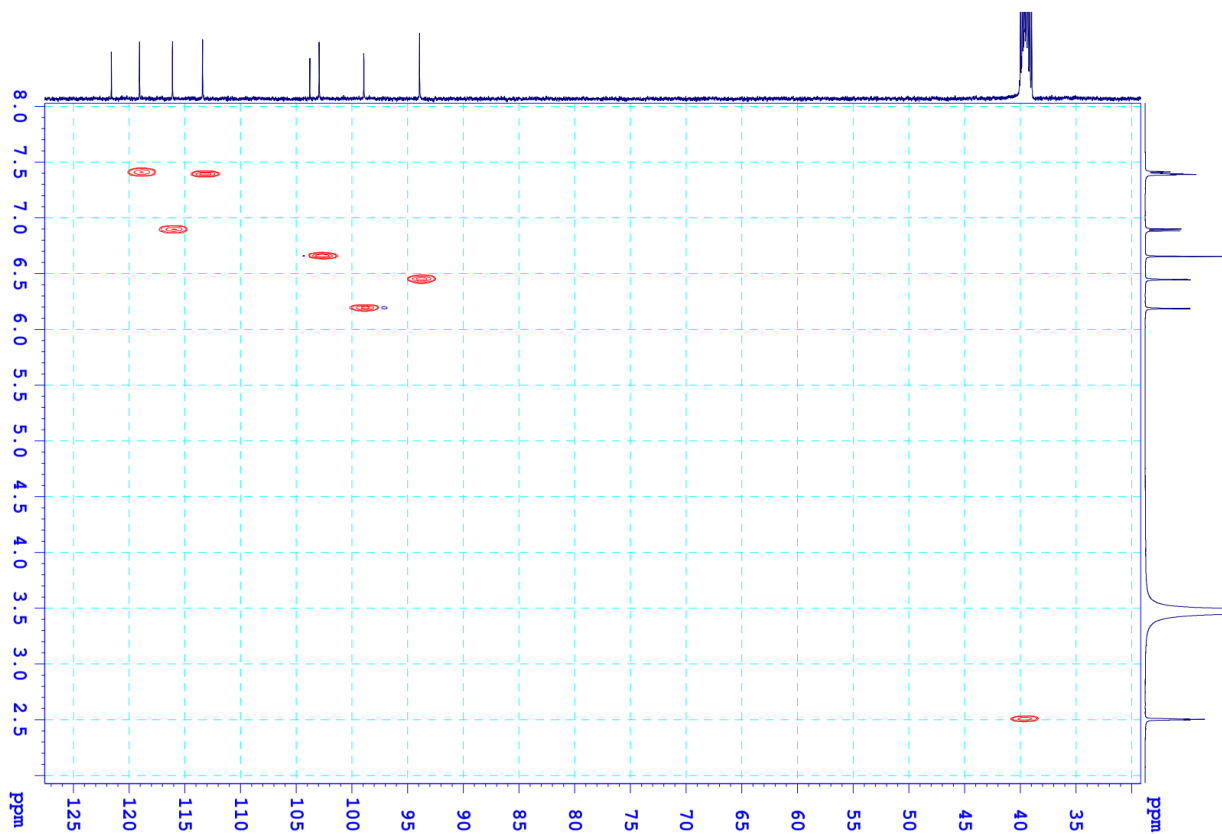
DEPT90

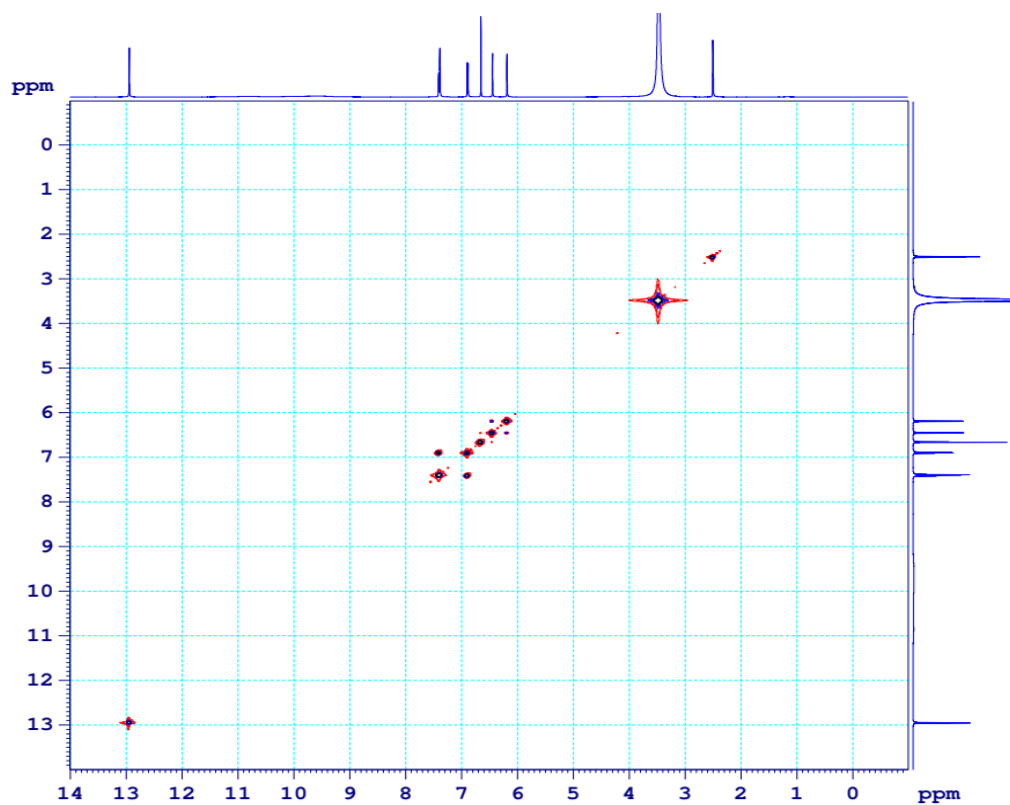
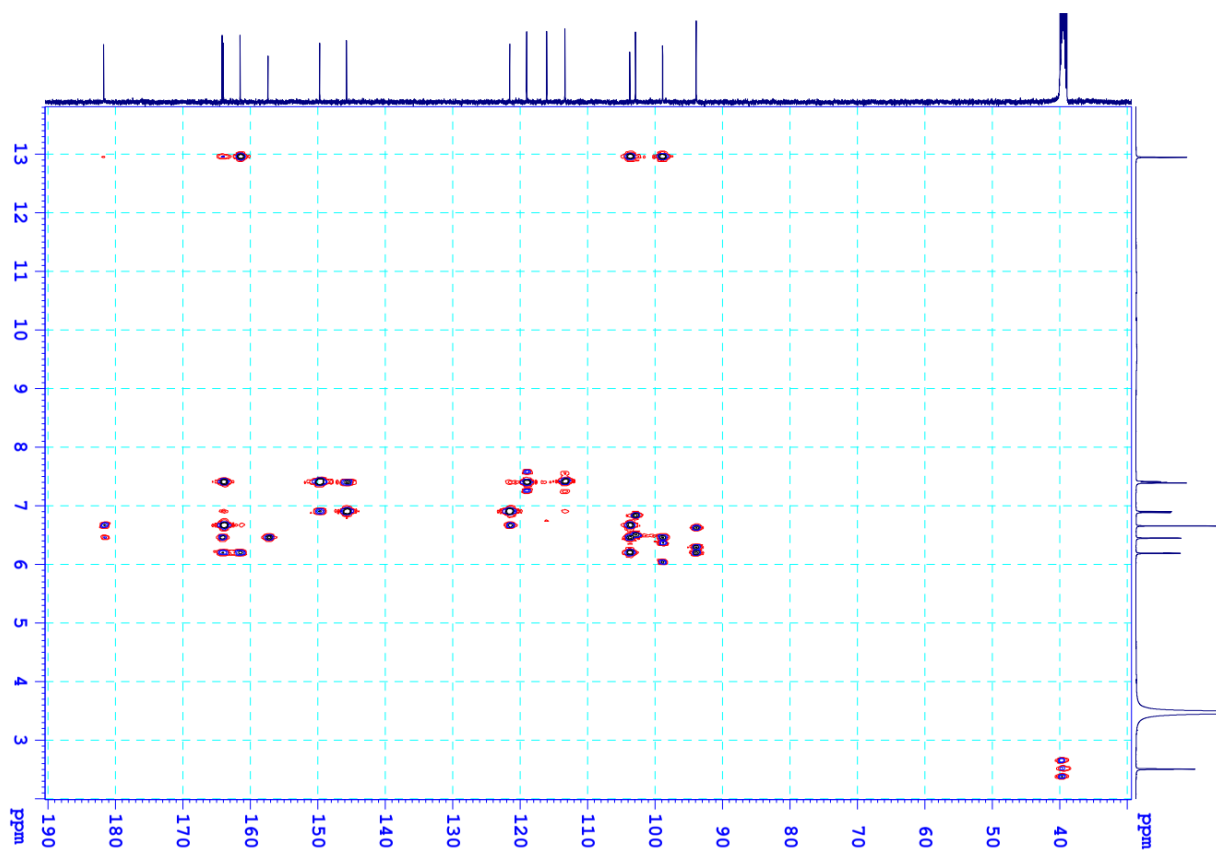


DEPT135

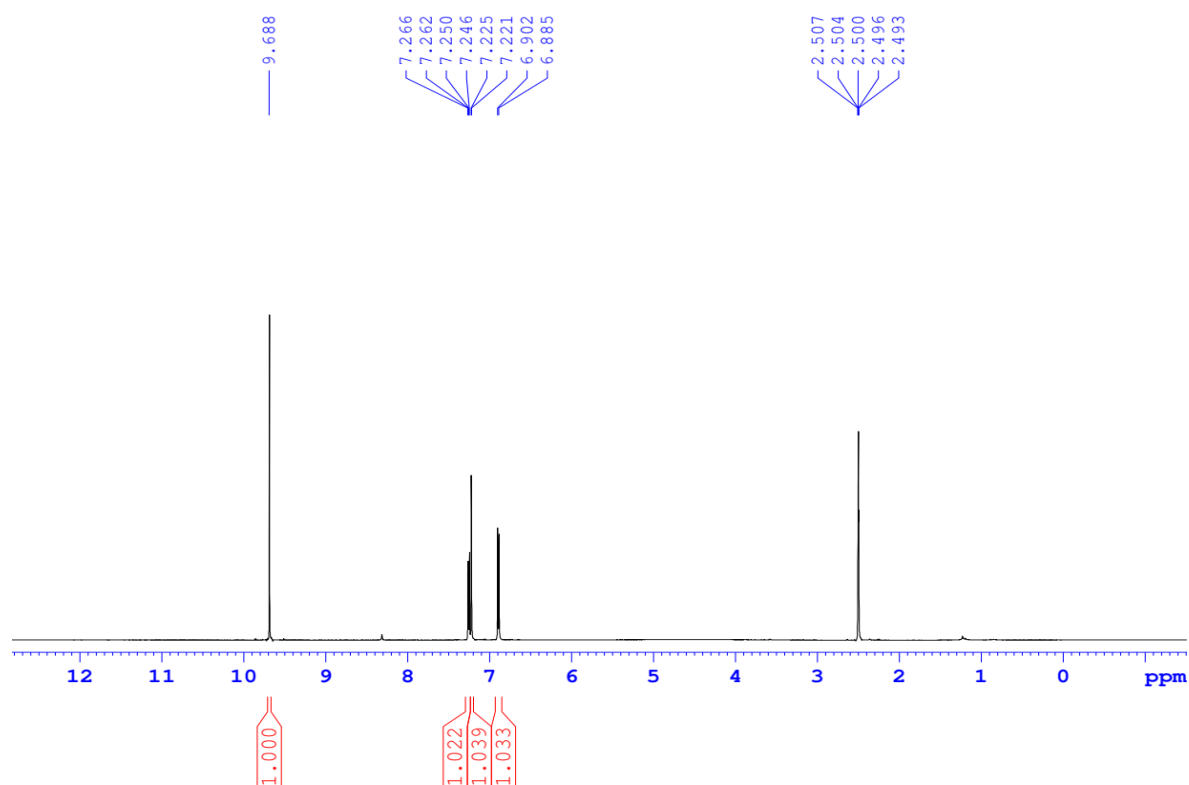
*CH&CH3**CH2*

C13CPD

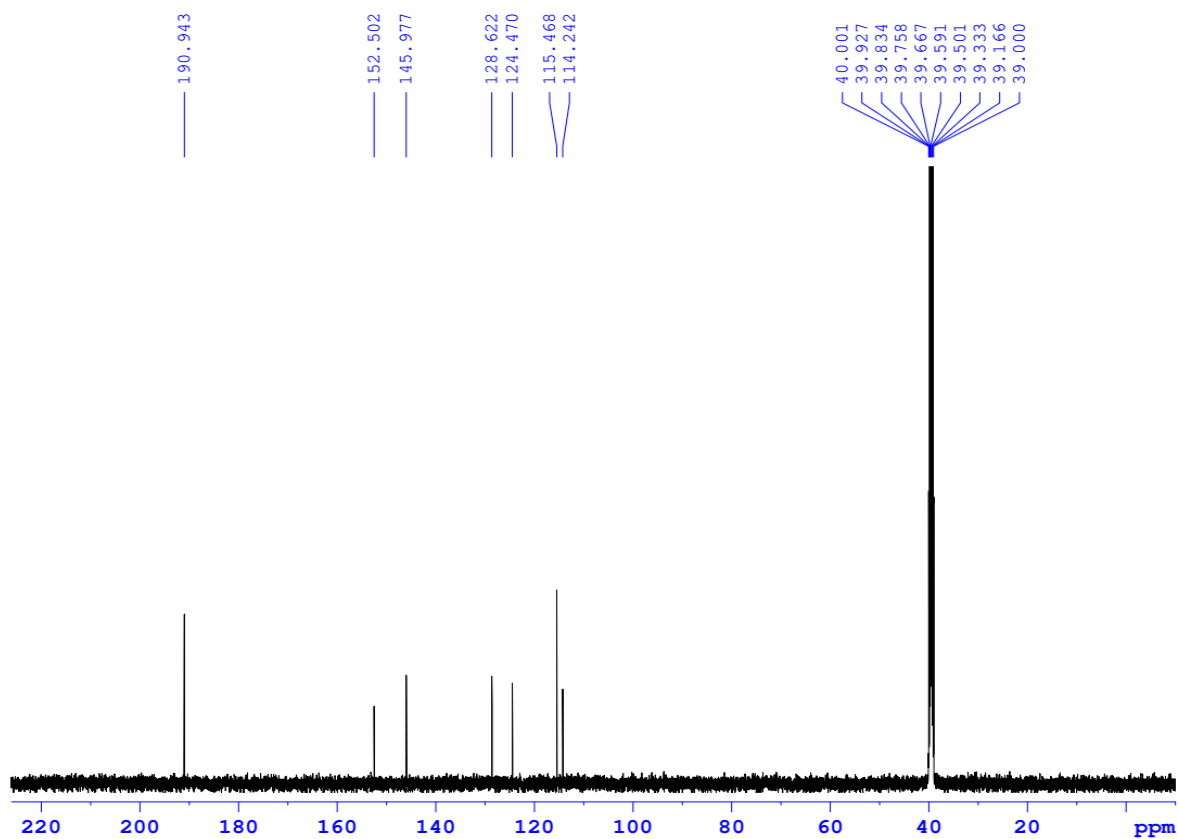
**Hình PL-99. Phổ DEPT của hợp chất 17 (luteolin)****Hình PL-100. Phổ HSQC của hợp chất 17 (luteolin)**

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 17 (luteolin)**Hình PL-101.** Phổ COSY của hợp chất 17 (luteolin)**Hình PL-102.** Phổ HMBC của hợp chất 17 (luteolin)

Phụ lục 31. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 18 (aldehyd protocatechuic)

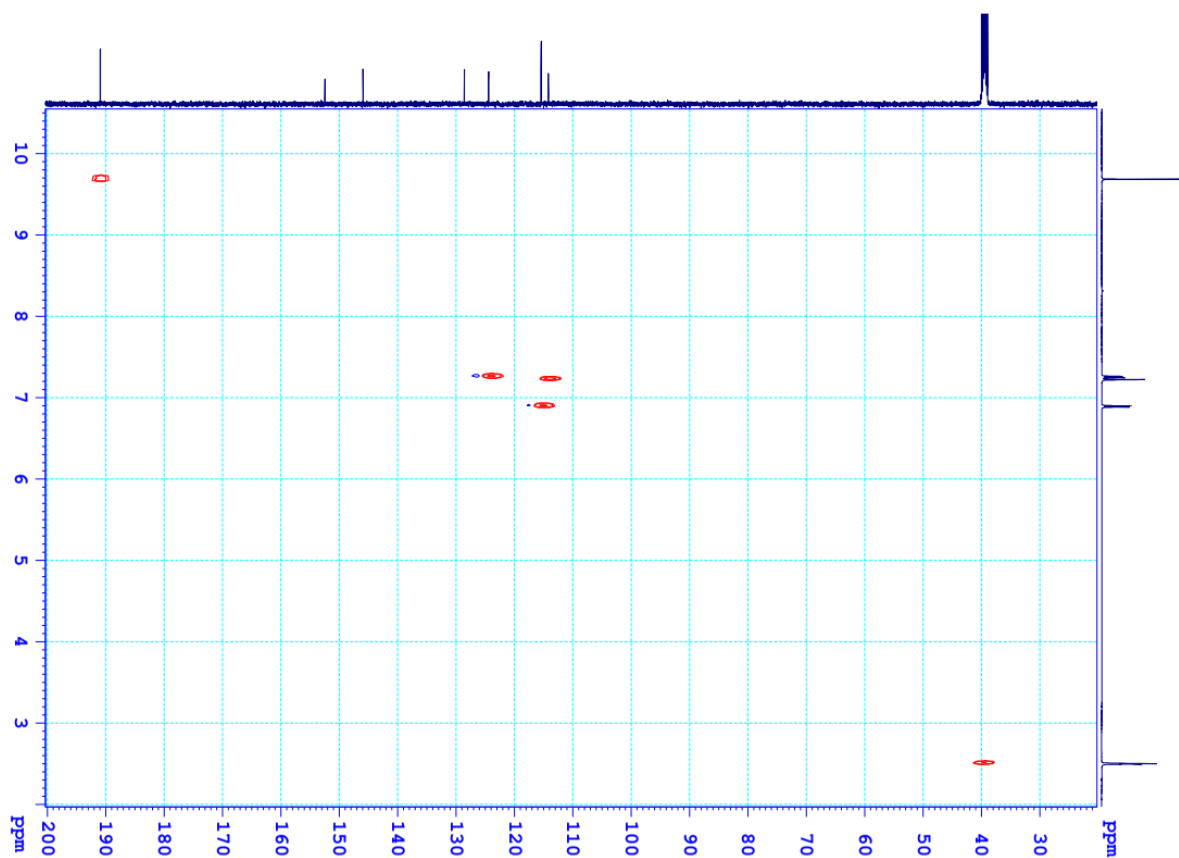


Hình PL-103. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất **18** (aldehyd protocatechuic)

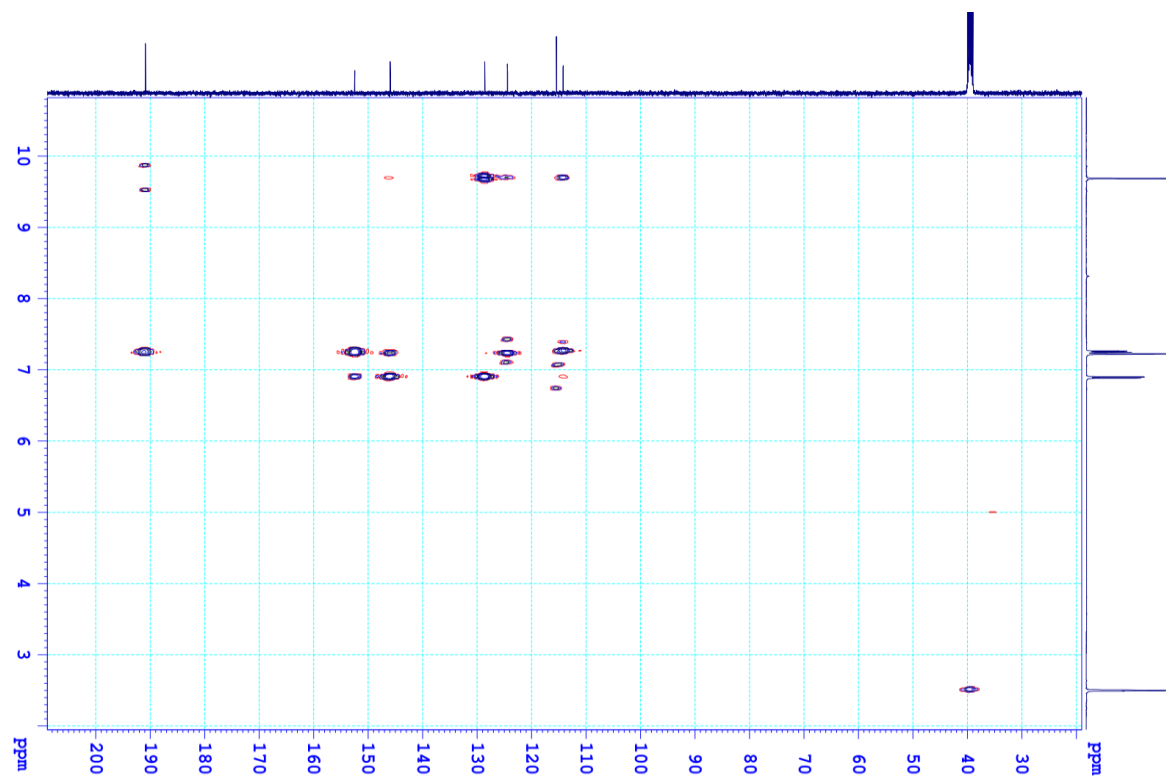


Hình PL-104. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; 125 MHz) của hợp chất **18** (aldehyd protocatechuic)

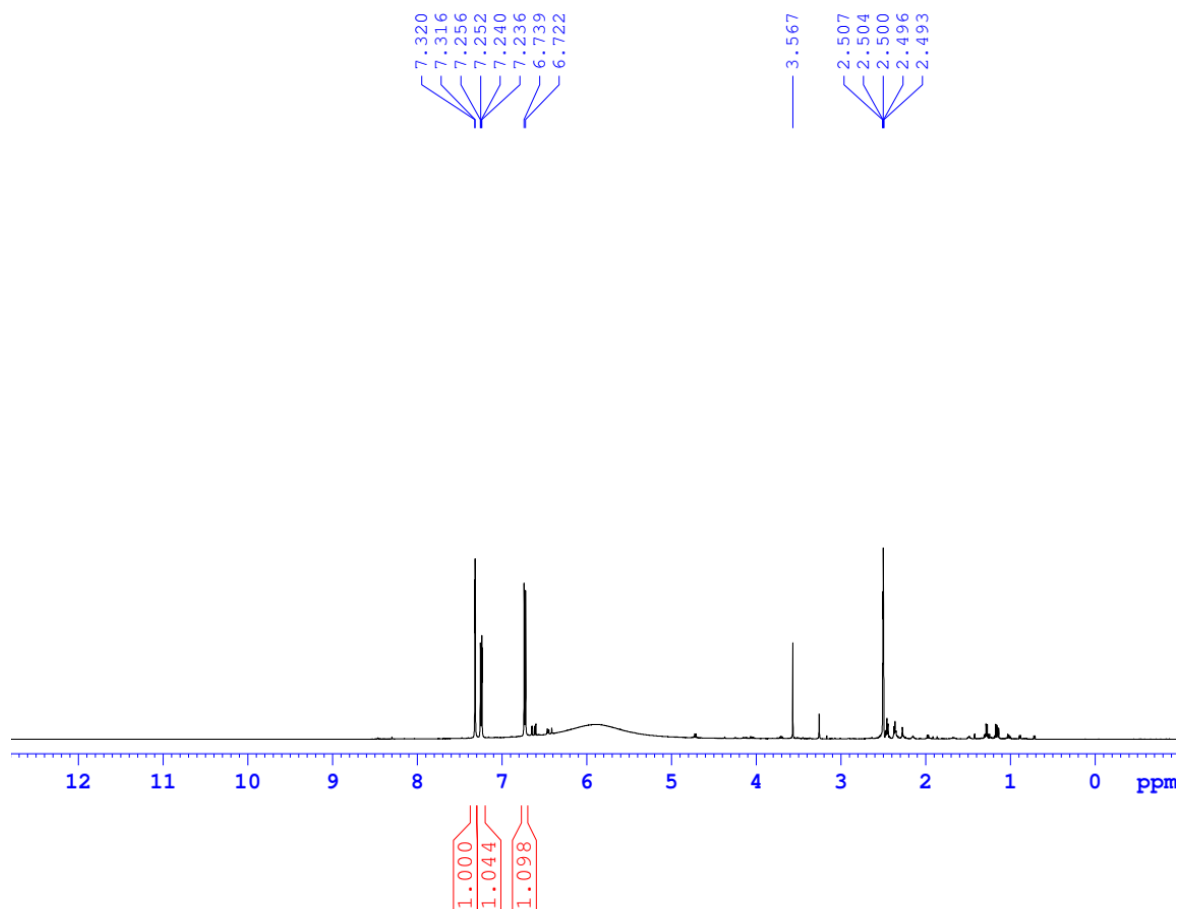
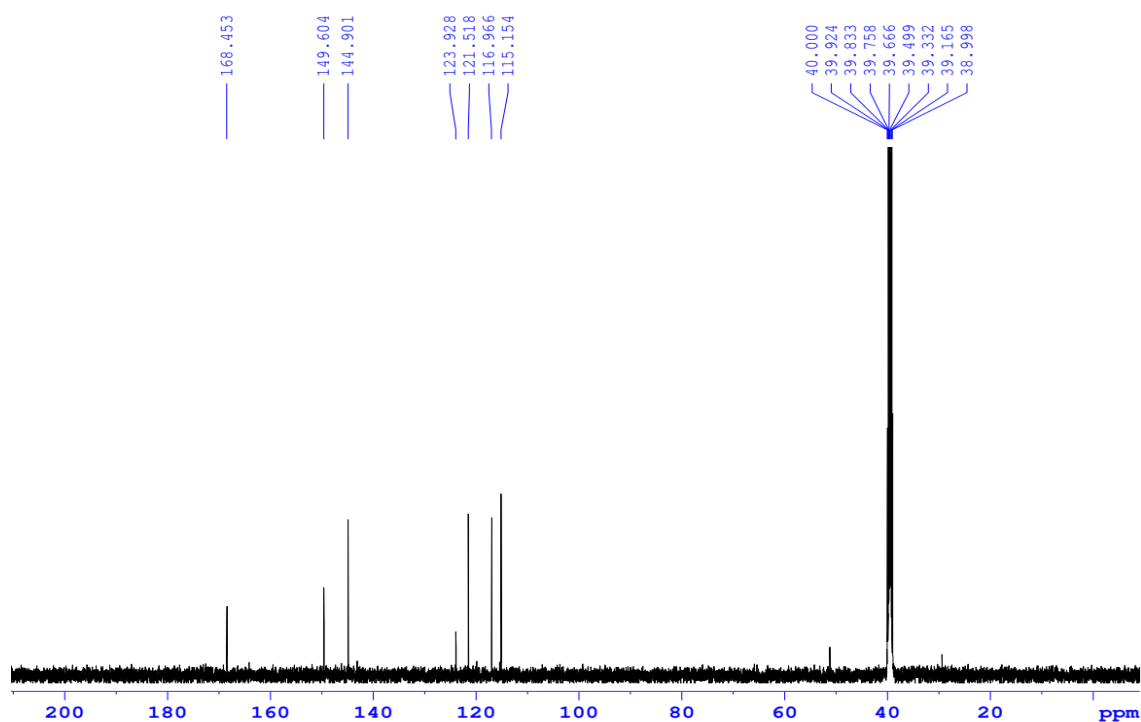
PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 18 (aldehyd protocatechuic)

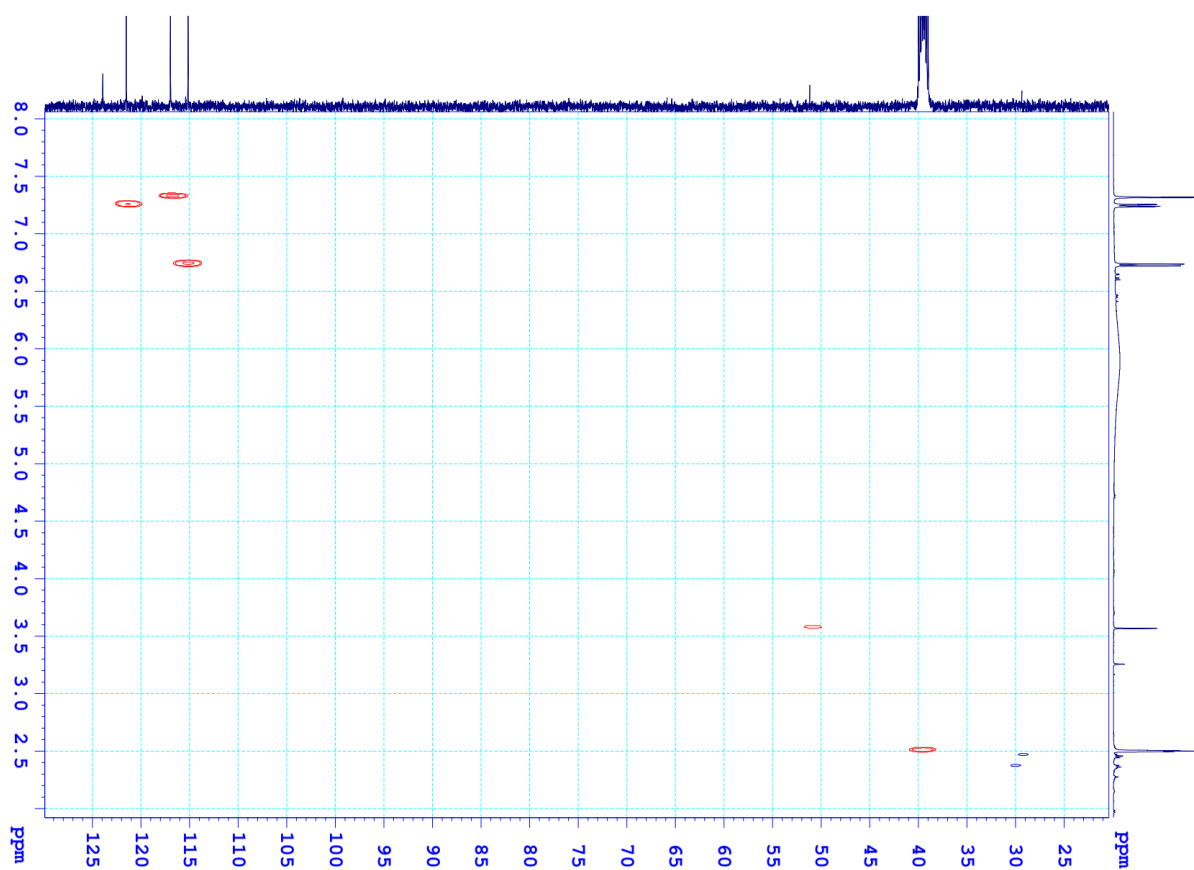
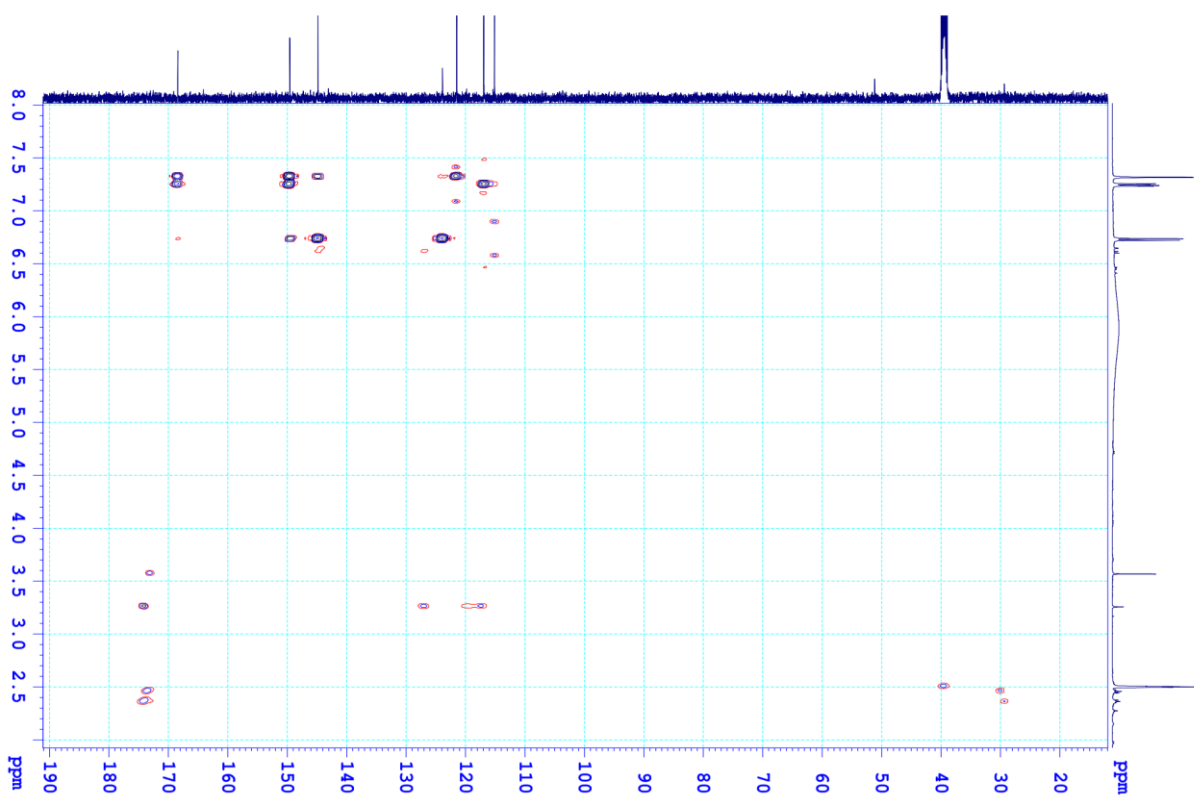


Hình PL-105. Phổ DEPT của hợp chất **18** (aldehyd protocatechuic)

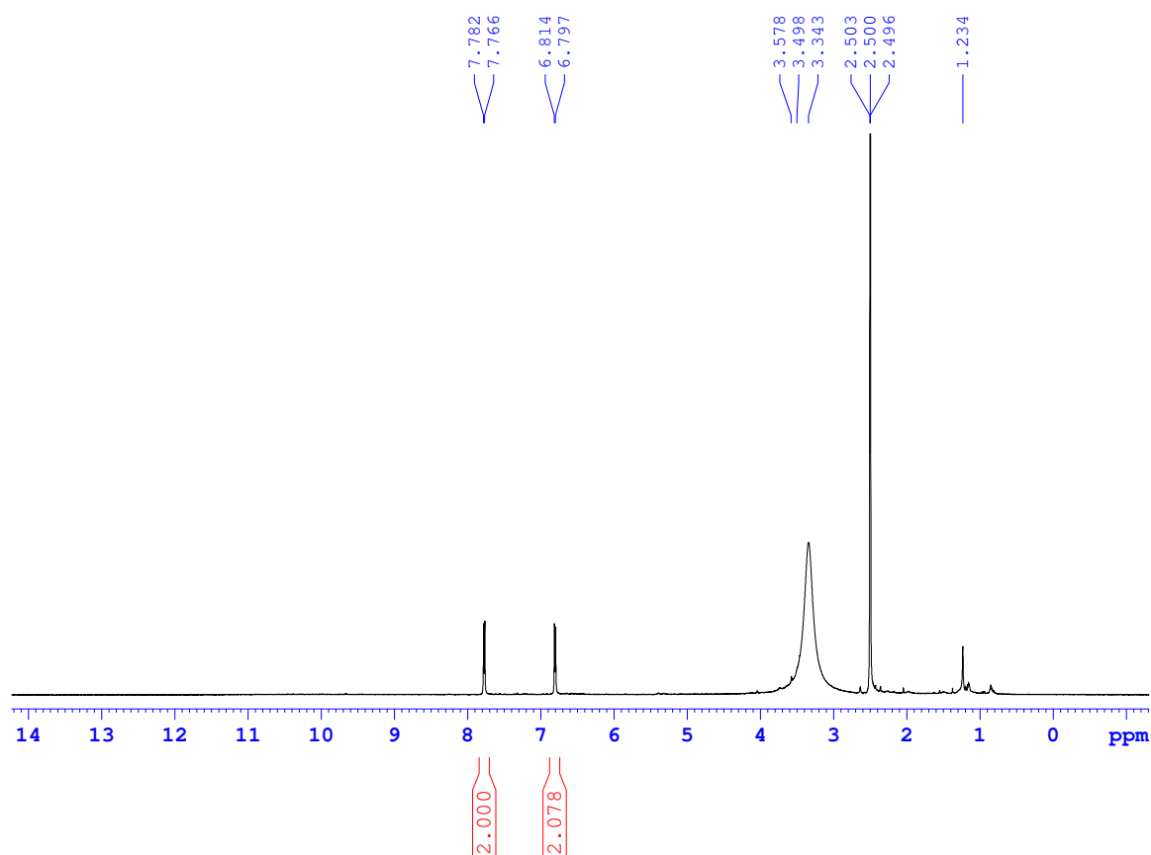


Hình PL-106. Phổ HSQC của hợp chất **18** (aldehyd protocatechuic)

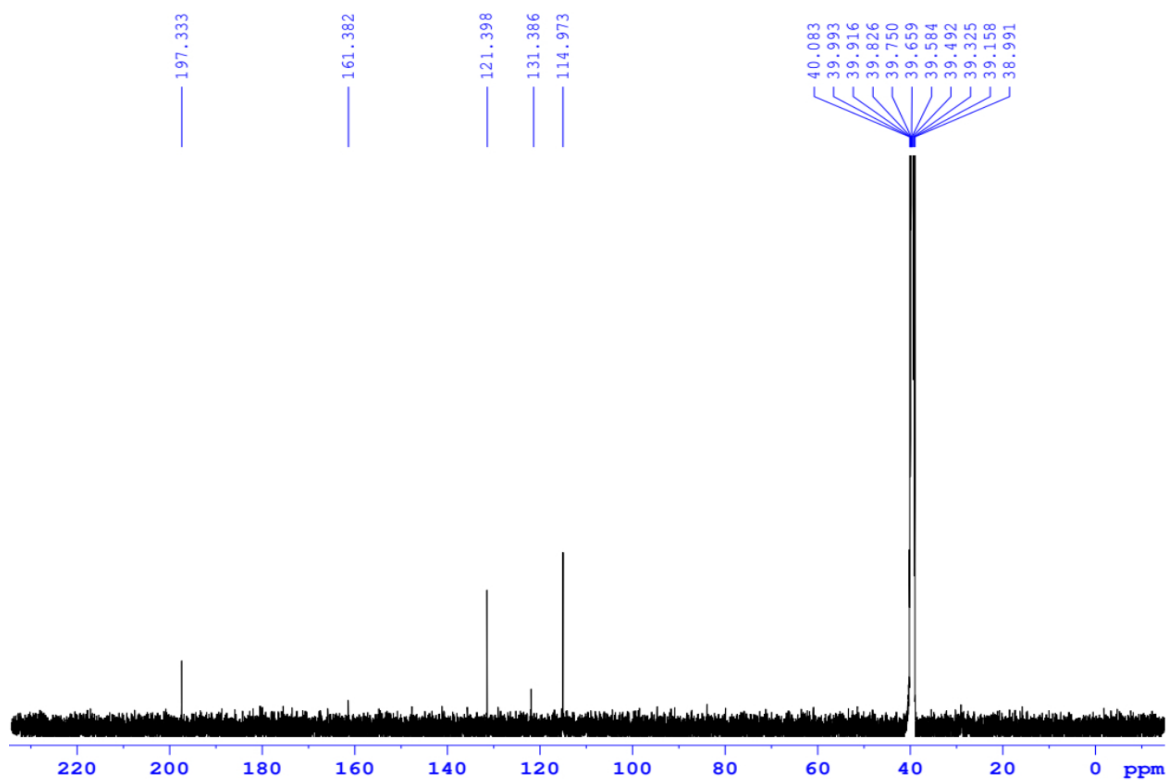
Phụ lục 32. **PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 19 (acid protocatechuic)**Hình PL-107. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất **19** (acid protocatechuic)Hình PL-108. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; 125 MHz) của hợp chất **19** (acid protocatechuic)

PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 19 (acid protocatechuic)**Hình PL-109.** Phổ DEPT của hợp chất **19** (acid protocatechuic)**Hình PL-110.** Phổ HSQC của hợp chất **19** (acid protocatechuic)

Phụ lục 33. PHỔ NMR CỦA HỢP CHẤT 20 (4-*p*-hydroxy benzaldehyd)



Hình PL-111. Phổ ¹H-NMR (DMSO-*d*₆; 500 MHz) của hợp chất **20** (4-*p*-hydroxy benzaldehyd)



Hình PL-112. Phổ ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆; 125 MHz) của hợp chất **20** (4-*p*-hydroxy benzaldehyd)

Phụ lục 34. DỰ THẢO CHUYÊN LUẬN LÁ ACTISÔ

ACTISÔ (Lá)

Folium Cynarae scolymi

Lá phơi hoặc sấy khô của cây Actisô (*Cynara scolymus* L.) họ Cúc (Asteraceae).

Mô tả

Lá nhẵn nheo, dài khoảng 1 - 1,2 m, rộng khoảng 0,5 m hay được chia nhỏ. Phiến lá xẻ thùy sâu hình lông chim, mép thùy khía răng cưa to, đỉnh răng cưa thường có gai rất nhỏ, mềm. Mặt trên lá màu nâu hoặc lục, mặt dưới màu xám trắng, lồi nhiều và những rãnh dọc rất nhỏ, song song. Lá có nhiều lông trắng vón vào nhau. Vị hơi mặn và hơi đắng.

Vi phẫu

Gân lá: Mặt trên lõm hình chữ V, mặt dưới lồi có nhiều chỗ uốn lượn. Biểu bì trên và biểu bì dưới cấu tạo bởi nhiều tế bào hình trứng hoặc gần tròn xếp liên tục đều đặn, được phủ bởi 1 lớp cutin mỏng. Tế bào biểu bì mang nhiều lông che chở đa bào một dãy, thường có 4-5 tế bào, nhiều lông dài uốn lượn, đan xen nhau; rải rác có các lông tiết đơn bào đầu tròn. Sát lớp biểu bì là mô dày góc, gồm 2-3 lớp tế bào. Mô mềm là những tế bào hình tròn, thành mỏng, kích thước không đều nhau. Có 3-5 bó libe-gỗ rời nhau, hình trứng thuôn dài, bó ở giữa lớn nhất, các bó hai bên nhỏ dần, gỗ trên - libe dưới và có mô dày bao quanh.

Phiến lá: Biểu bì trên và biểu bì dưới gồm 1 lớp tế bào hình chữ nhật dài, lớn hơn tế bào ở phần gân lá, mang nhiều lông che chở đa bào và lông tiết tương tự như ở phần gân lá. Mô mềm giậu gồm 2 hàng tế bào hình chữ nhật to thuôn dài, xếp sát nhau và thẳng góc với biểu bì trên, kể đến là mô mềm khuyết.

Bột

Mảnh biểu bì phiến lá gồm những tế bào hình nhiều cạnh, mang lỗ khí và lông che chở dài. Mạch biểu bì gân lá gồm tế bào hình chữ nhật, thành mỏng. Sợi riêng lẻ hay tập trung thành từng bó. Lông tiết đơn bào, đầu tròn. Mạch xoắn, mạch mạng, mạch vòng và mạch vạch. Mạch mô mềm. Nhiều khối nhựa màu nâu, kích thước to nhỏ không nhất định.

Định tính

A. Cân 0,2 g bột lá, cho vào bình nón, thêm 10 ml *ethanol* 96 % (TT), đun cách thủy trong 5 phút, lọc (dung dịch A).

Lấy 5 ml dung dịch A, bốc hơi trên cách thủy cho hết ethanol. Hoà lẫn còn lại trong 1 ml dung dịch *acid hydrochloric* 1 N (TT) và 4 ml *nước cất*, lọc. Thêm vào dịch lọc 1 ml *dung dịch natri nitrit* 10 % (TT), để lạnh ở 10 °C trong 20 phút. Thêm 4 ml *dung dịch natri hydroxyd* 10 % (TT), xuất hiện màu hồng cánh sen bền vững.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: *Silica gel* 60F₂₅₄

Dung môi khai triển: *Ethyl acetat* - *nước* - *acid formic* (8 : 0,5 : 0,5).

Dung dịch thử: Dung dịch A

Dung dịch đối chiếu: Dung dịch acid chlorogenic và cynarosid trong *methanol* (0,01 mg/ml)

Cách tiến hành: Chấm lên bản mỏng 15 µl dung dịch thử, 10 µl dung dịch đối chiếu. Sau khi triển khai xong, lấy bản mỏng ra để khô ở nhiệt độ phòng. Phun *dung dịch FeCl₃* 5 % (TT). Trên sắc ký đồ của dung dịch thử phải có 1 vết màu xanh đen (cynarosid); 1 vết màu xanh rêu (acid chlorogenic) có cùng trị số R_f với vết của cynarosid và acid chlorogenic trên sắc ký đồ của dung dịch đối chiếu.

Độ ẩm

Không quá 12 % (Phụ lục 9.6).

Tro toàn phần

Không quá 15 % (Phụ lục 9.8).

Tạp chất

Không được quá 0,5 % (Phụ lục 12.11)

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3)

Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1% (TT)

Dung dịch chuẩn: Hòa tan acid chlorogenic chuẩn trong *ethanol 50 % (TT)* để được dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 100 µg/ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,1 g bột dược liệu (qua rây số 355) vào bình nón 100 ml, thêm 15 ml *ethanol 50 % (TT)*, đun cách thủy ở 80 °C trong 20 phút, lọc vào bình định mức 25 ml, tráng bình nón với 8 ml *ethanol 50 % (TT)*, thêm *ethanol 50 % (TT)* vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 µm) (Cột SunFire C₁₈ là phù hợp)

Detector quang phổ tử ngoại ở bước sóng 325 nm

Tốc độ dòng: 1 ml/phút

Thể tích tiêm: 10 µl

Cách tiến hành: Tiến hành sắc ký theo dung môi như sau:

Thời gian (phút)	Acetonitril (% tt/tt)	Acid formic 0,1% (% tt/tt)
0 - 15	8 - 20	92 - 80
15 - 18	20 - 25	80 - 75
18 - 23	25 - 30	75 - 70
23 - 25	30	70
25 - 26	30 - 95	70 - 5
26 - 31	95	5
31 - 32	95 - 8	5 - 92
32 - 37	8	92

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn, dung dịch thử. Ghi nhận sắc ký đồ. Phép thử chỉ có giá trị khi độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của diện tích pic acid chlorogenic ở 6 lần tiêm lặp lại không được lớn hơn 2,0 %.

Tính hàm lượng acid chlorogenic trong dược liệu dựa vào diện tích pic trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng acid chlorogenic chuẩn.

Dược liệu phải chứa không dưới X % acid chlorogenic (C₁₆H₁₈O₉) tính theo dược liệu khô kiệt.

Chế biến

Lá được thu hái vào năm thứ nhất của thời kỳ sinh trưởng hoặc cuối mùa hoa, đem phơi hoặc sấy khô ở 50 - 60 °C. Lá cần được ổn định trước rồi mới bào chế thành dạng thuốc, có thể dùng hơi nước sôi có áp suất cao để xử lý nhanh lá. Sau đó phơi hoặc sấy khô.

Bảo quản

Đề nơi khô ráo, thoáng mát, phòng ẩm mốc.

Tính vị, quy kinh

Khô, lương. Vào các kinh can, đờm.

Phụ lục 35. DỰ THẢO CHUYÊN LUẬN CAO KHÔ ACTISÔ

CAO KHÔ ACTISÔ

Extractum Folii Cynarae scolymi siccum

Cao khô Actisô được bào chế từ lá cây Actisô (*Cynara scolymus* L.) họ Cúc (Asteraceae) theo phương pháp thích hợp, để chế phẩm có hàm lượng cynarin ổn định.

Chế phẩm phải đáp ứng các yêu cầu trong chuyên luận “Cao thuốc” (Phụ lục 1.1) và các yêu cầu sau đây:

Mô tả

Cao khô Actisô có thể chất bột vô định hình, dễ hút ẩm, màu vàng nâu sáng. Vị hơi mặn chát và hơi đắng.

Định tính

A. Hoà tan 0,5 g chế phẩm trong khoảng 20 ml *ethanol* 96 % (TT), siêu âm 15 phút, lọc, thu được dịch lọc A.

Lấy 1 ml dịch lọc A cho vào một ống nghiệm, thêm 0,1 g bột *magnesi* (TT) và 2 ml *acid hydrochloric* (TT), để yên, xuất hiện màu vàng cam đến cam.

Lấy 1 ml dịch lọc A cho vào ống nghiệm, thêm 0,5 ml dung dịch *acid hydrochloric* 1 N (TT) và 0,5 ml dung dịch *natri nitrit* 10 % (TT). Để lạnh ở 10 °C trong khoảng 20 phút. Thêm 2 ml dung dịch *natri hydroxyd* 10 % (TT), sẽ xuất hiện màu hồng bền vững.

B. Phương pháp sắc ký lớp mỏng (Phụ lục 5.4).

Bản mỏng: *Silica gel* F₂₅₄.

Dung môi khai triển: *Ethyl acetat* - *nước* - *acid formic* (8 : 0,5 : 0,5)

Dung dịch thử: Cân 50 mg cao chế phẩm, thêm 5 ml *ethanol* 60 % (TT), siêu âm, để nguội, lọc.

Dung dịch đối chiếu: Hòa tan cynarin và acid chlorogenic trong *methanol* (TT) (1 mg/ml).

Cách tiến hành: Chấm riêng biệt lên bản mỏng 15 µl dung dịch thử và 10 µl dung dịch đối chiếu. Triển khai sắc ký đến khi dung môi đi được khoảng 8 cm, lấy bản mỏng ra, để khô ở nhiệt độ phòng. Phun dung dịch *FeCl₃* 5 % (TT). Trên sắc ký đồ thu được của dung dịch thử phải có vết màu xanh rêu có trị số R_f tương đương với vết cynarin và acid chlorogenic chuẩn trong sắc ký đồ thu được của dung dịch đối chiếu.

Cẩn không tan trong nước

Hoà tan 1,0 g chế phẩm trong 50 ml *nước cất*, lọc, rửa cẩn bằng *nước cất* đến khi nước rửa không màu, thu cẩn và sấy khô ở 100 đến 105 °C đến khối lượng không đổi. Lượng cẩn không được quá 3,0 % tính theo chế phẩm khô kiệt.

pH

Dung dịch cao khô Actisô 1 % (kl/tt) trong *nước* phải có pH từ 5,0 đến 6,0 (Phụ lục 6.2).

Mất khối lượng do làm khô

Không quá 6 % (Phụ lục 9.6).

Tro toàn phần

Không quá 30,0 % (Phụ lục 9.8).

Định lượng

Phương pháp sắc ký lỏng (Phụ lục 5.3)

Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1 % (TT)

Dung dịch chuẩn: Hòa tan acid chlorogenic và cynarin chuẩn trong *methanol* (TT) để được dung dịch chuẩn có nồng độ chính xác khoảng 50 µg/ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 20 mg cao chế phẩm cho vào ống ly tâm eppendorf (1,5 ml), thêm 1 ml *methanol* 40 % (TT), trộn đều, siêu âm 10 phút ở nhiệt độ 40 °C, ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 2 phút, hút và chuyển dịch chiết vào bình định mức 5 ml. Phần cặn còn lại được chiết tiếp lần 2 với 1 ml *methanol* 40% (TT) tương tự như trên. Gộp chung dịch chiết của 2 lần chiết vào bình định mức 5 ml và điều chỉnh *methanol* 40 % (TT) vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

Điều kiện sắc ký:

Cột kích thước (25 cm × 4,6 mm) được nhồi pha tĩnh C (5 µm) (Cột SunFire C₁₈ là phù hợp)

Detector quang phổ tử ngoại ở bước sóng 325 nm

Nhiệt độ cột: 25 °C

Tốc độ dòng: 1 ml/phút

Thể tích tiêm: 10 µl

Cách tiến hành:

Tiến hành sắc ký theo dung môi như sau:

Thời gian (phút)	Acetonitril (% tt/tt)	Acid formic 0,1% (% tt/tt)
0 - 20	8 - 15	92 - 85
20 - 21	15	85
21 - 30	15 - 30	85 - 70
30 - 35	30	70
35 - 36	30 - 95	70 - 5
36 - 39	95	5
39 - 40	95 - 8	5 - 92
40 - 45	8	92

Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn, dung dịch thử. Ghi nhận sắc ký đồ. Tiêm lần lượt dung dịch chuẩn, dung dịch thử. Ghi nhận sắc ký đồ. Phép thử chỉ có giá trị khi độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của diện tích pic acid chlorogenic và cynarin ở 6 lần tiêm lặp lại không được lớn hơn 2,0 %.

Tính hàm lượng của acid chlorogenic và cynarin trong mẫu cao chiết được liệu dựa vào diện tích pic trên sắc ký đồ thu được từ dung dịch thử, dung dịch chuẩn và hàm lượng của acid chlorogenic và cynarin chuẩn.

Hàm lượng acid chlorogenic (C₁₆H₁₈O₉) không được nhỏ hơn X % và cynarin (C₂₅H₂₄O₁₂) không được nhỏ hơn Y % tính theo chế phẩm khô kiệt.

Bảo quản

Trong bao bì kín, chống ẩm. Để nơi khô, mát.

Phụ lục 36. PHIẾU KIỂM NGHIỆM CDC CYNARIN

Mã số: DC/P-QA-03/F04

BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
TP. HỒ CHÍ MINH

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc lập - Tự do - Hạnh phúc

PHIẾU PHÂN TÍCH

Mẫu phân tích: Cynarin
 Đơn vị sản xuất: Bộ môn Dược liệu
 Số lô: NC
 Số đăng ký phân tích:
 Đơn vị gửi mẫu: Nguyễn Thị Duyên Anh
 Nơi lấy mẫu: Bộ môn Dược liệu
 Người giao mẫu: Nguyễn Thị Duyên Anh
 Số lượng mẫu: 12 lọ
 Người nhận mẫu: Khoa Thiết lập Chất chuẩn và Chất đối chiếu+ VLĐL
 Ngày giao nhận mẫu: 27.7.2015
 Yêu cầu phân tích: Định lượng thành phẩm
 Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng: TCCS
 Tình trạng mẫu khi nhận: Mẫu đựng trong lọ nâu, bảo quản 2°C – 8°C

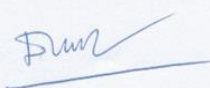
Chỉ tiêu	Mức chất lượng	Kết quả
Tính chất	Bột trắng	Đạt
Định lượng		
Khoa TLCC-CDC	Hàm lượng C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ TRÊN CHẾ PHẨM NGUYÊN TRẠNG	94,20 %
Khoa VLĐL		94,33 %

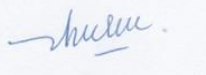
KẾT LUẬN

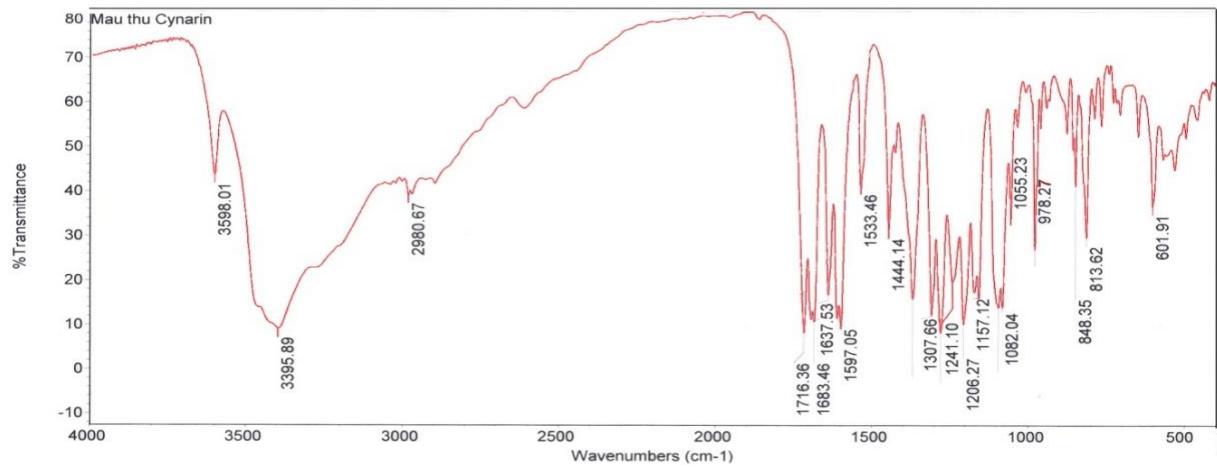
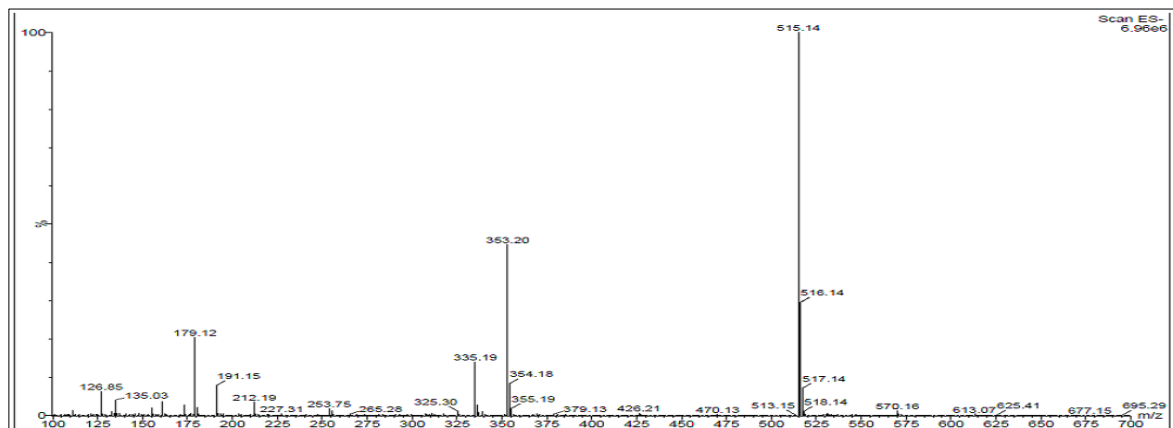
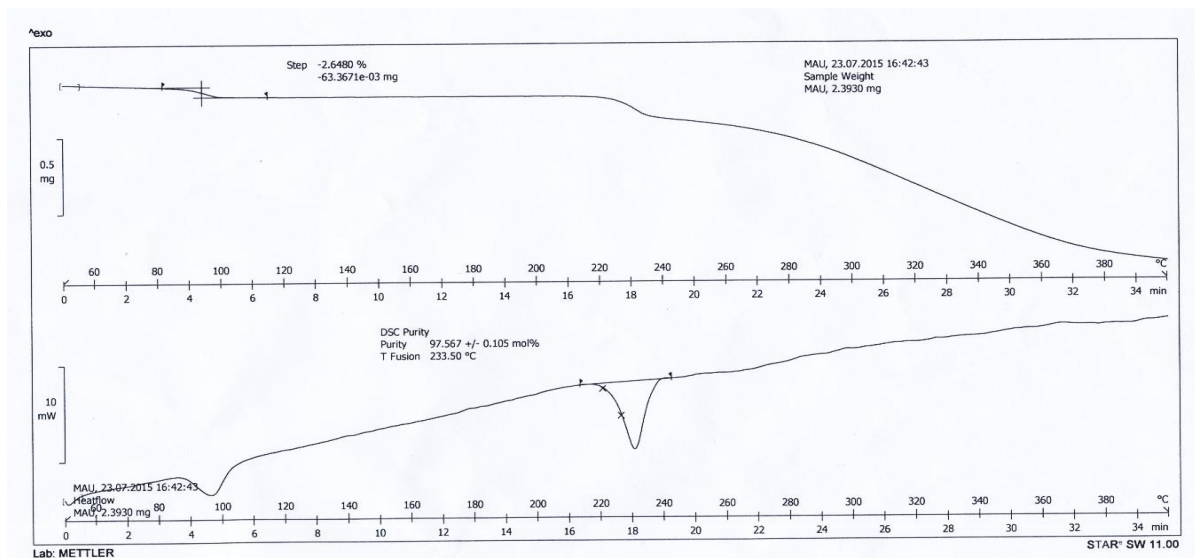
Ngày 28 tháng 07 năm 2015

Phụ trách Khoa

Kiểm nghiệm viên


 TS. Hà Diệu Ly


 TS. Lê Thị Thu Cúc

Phụ lục 37. **PHỔ IR, MS, DSC CỦA CĐC CYNARIN****Phổ IR****Phổ MS****Phân tích nhiệt vi sai DSC**

Phụ lục 38. COA (CERTIFICATE OF ANALYSIS) CỦA CHUẨN SƠ CẤP CYNARIN**PhytoLab**

PhytoLab GmbH & Co. KG, Dutendorfer Str. 5-7 91487 Vestenbergsgreuth

Cerilliant Corporation
811 Paloma Drive, Suite A
Round Rock, Texas 78665
U S A

PhytoLab GmbH & Co. KG
Dutendorfer Str. 5-7
91487 Vestenbergsgreuth
Germany
Contact:
phyproof® Reference Substances
Tel: +49(0)9163/88-395
Fax: +49(0)9163/88-456
ref-substances@phytolab.de

Date: 18.10.13

Cust.No: 91790

Certificate of analysis

Report-No.: 16056804- 99 002
Batch: 2779
Article: 89179 Cynarin
Quantity: 1 x 10 mg

Test	Unit	Limit	Testresult
Appearance, SOP 100005		powder	Conform
Color, SOP 100006		white-beige	Conform
Solubility, SOP 105001:			Conform
Methanol		soluble	Conform
Hot water		soluble	Conform
Identification (HPLC-MS/MS), SOP 204120		Conform	Conform
Identification (UV spectrum from HPLC-DAD analysis) according to specification, SOP 204311		Conform	Conform
Identification (IR-spectroscopy, Ph. Eur. 8.0, 2.2.24)/USP 36 <197>), SOP 206000		Conform	Conform
Identification (1H-NMR-spectroscopy), (sub-contracted), SOP 206010		Conform	Conform
Identification (13C-NMR-spectroscopy), (sub-contracted), SOP 206020		Conform	Conform
Purity test (TLC), SOP 211034		Conform	Conform
Water content, (coulometric titration), according to Ph.Eur.8.0, 2.5.32, (double analysis) SOP 304291:			
Mean value	%		3.6

Certificate of analysis

Report-No.: 16056804- 99 002
 Batch: 2779
 Article: 89179 Cynarin

Test	Unit	Limit	Testresult
Peakpurity, (HPLC), SOP 401367		Conform	Conform
Cynarin, (HPLC), method 3, (% AU), SOP 401526	%		99.36
Residual solvents, (headspace-GC), SOP 805765: Residual solvents	%		< 0.05
Inorganic Impurities, (ICP-MS), for reference substances, SOP 811701:			
Sodium	%		< 0.1
Potassium	%		< 0.1
Magnesium	%		< 0.1
Calcium	%		< 0.1
Aluminium	%		< 0.1
Phosphorus	%		< 0.1
Sulfur	%		< 0.1
Content*, SOP 890000	%		96

Assessment:

The above mentioned reference substance meets the specification.

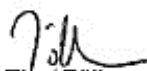
*The absolute content is calculated considering the chromatographic purity, and if available, the content of water, residual solvents and inorganic impurities according to the following formula:

$$\text{Content} = (100\% - \text{water content (\%)} - \text{residual solvents (\%)} - \text{inorganic impurities (\%)}) \times \text{chromatographic purity (\%)} / 100.$$

The chromatographic purity is checked regularly: the last analysis has been performed in April 2012.

The reference substance cannot be documented with an expiry date. The pack is closed and is recommended to be stored as indicated. The unopened product is guaranteed to fulfill the specifications of this analytical report for a period of 60 months. Once opened we can no longer guarantee the stability of the material.

Vestenbergsgrouth, 18.10.13



Dr. Tilla Zöllner

Phụ lục 39. KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ THIẾT LẬP CDC CYNARIN

Kết quả xử lý thống kê thiết lập CDC

Bảng PL-5. Kết quả định lượng cynarin tại hai phòng thí nghiệm

Số thứ tự	PTN 1	PTN 2
1	93,66	94,26
2	94,45	94,37
3	94,69	94,72
4	94,18	94,13
5	94,14	94,07
6	94,08	94,44
Trung bình	94,20	94,33

Bảng PL-6. Kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm theo ANOVA

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F_m	F_{tc}
Giữa các nhóm	0,052008	1	0,052008	0,583784	4,964603
Trong từng nhóm	0,890883	10	0,089088		
Tổng cộng	0,942892	11			

Nhận xét: $F_m = 0,584 < F_{tc} = 4,965$

Kết luận: Kết quả trung bình của 2 phòng thí nghiệm khác nhau không có nghĩa

Bảng PL-7. Kết quả tính giá trị ấn định hàm lượng cyanrin

	x^*_0	x^*_1	x^*_2	x^*_3	x^*_4
$\delta = 1,5 \times s^*$	-	0,334	0,362	0,359	0,358
$x^* - \delta$	-	93,89	93,90	93,90	93,90
$x^* + \delta$	-	94,55	94,62	94,62	94,62
Trung bình	94,27	94,26	94,26	94,26	94,26
Độ lệch s	0,293	0,213	0,211	0,211	0,210
x^* mới	94,22	94,26	94,26	94,26	94,26
s^* mới	0,222	0,242	0,240	0,239	0,239

Hàm lượng: 94,26 %

Độ lệch s: 0,210

Độ không đảm bảo đo μ : 0,086.

Kết quả chung: Hàm lượng cynarin là 94,26 % tính trên chế phẩm nguyên trạng, độ không đảm bảo đo = 0,086; độ lệch = 0,210 (n = 12).

Phụ lục 40. PHIẾU KIỂM NGHIỆM CDC CYNAROSID**Phiếu kiểm nghiệm CDC cynarosid**

Mã số: DC/P-QA-03/F02



BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
TP. HỒ CHÍ MINH
200 Cô Bắc - Q.1 - TP.HCM
☎ 38368453 - Fax: 38367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập - Tự Do - Hạnh Phúc



VILAS 108

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số : 0263/VKN-NB2016

Mẫu phân tích : Cynarosid RS
Đơn vị sản xuất : Trung tâm Sapharsen ĐHYD
Số lô : NC
Số đăng ký phân tích : 35NB0263
Đơn vị gửi mẫu : Trung tâm Sapharsen ĐHYD
Người giao mẫu : Hà Diệu Ly
Người nhận mẫu : Huỳnh Thị Ngọc Dung, Lê Trần Thái Dương
Ngày giao nhận mẫu : 22/07/2016
Yêu cầu phân tích : Định lượng thành phẩm
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng: TCCS
Tình trạng mẫu khi nhận: Mẫu đựng trong lọ nâu hàn kín, bảo quản 2°C – 8°C

- Kết quả Khoa KN Mỹ Phẩm

Chỉ tiêu	Phương pháp thử	Kết quả
Tính chất	Cảm quan	Bột màu vàng nhạt
Định lượng	HPLC	92,09 %; 91,73 %; 91,29 %; 91,38 %; 91,27 %; 91,42 % trên chế phẩm nguyên trạng
<i>Cynarosid</i>		

- Kết quả Khoa TLCC & CDC

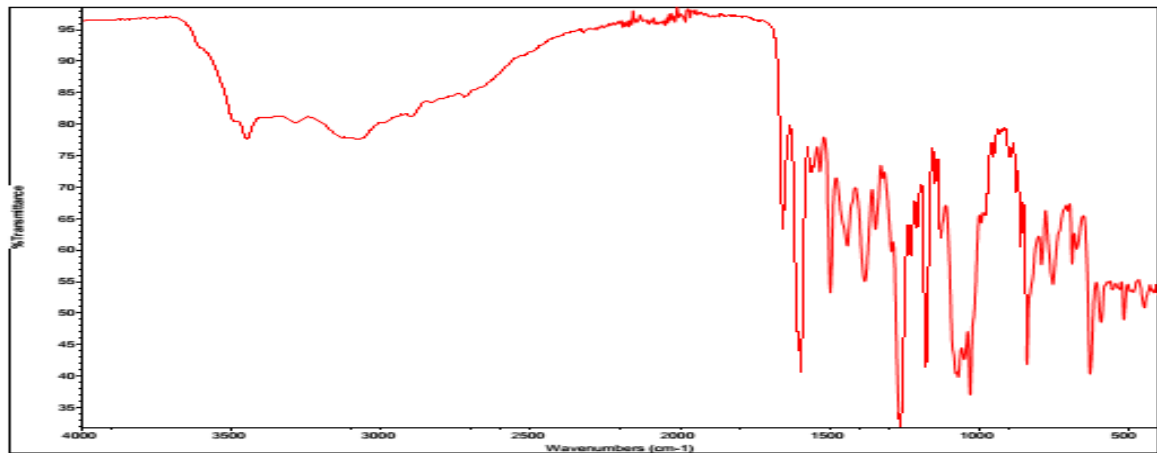
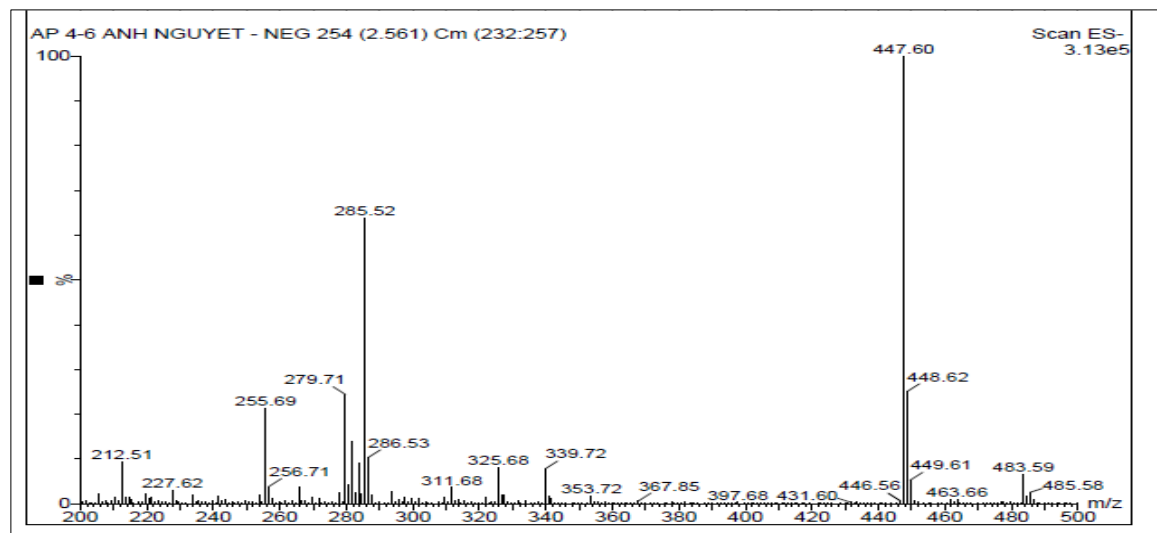
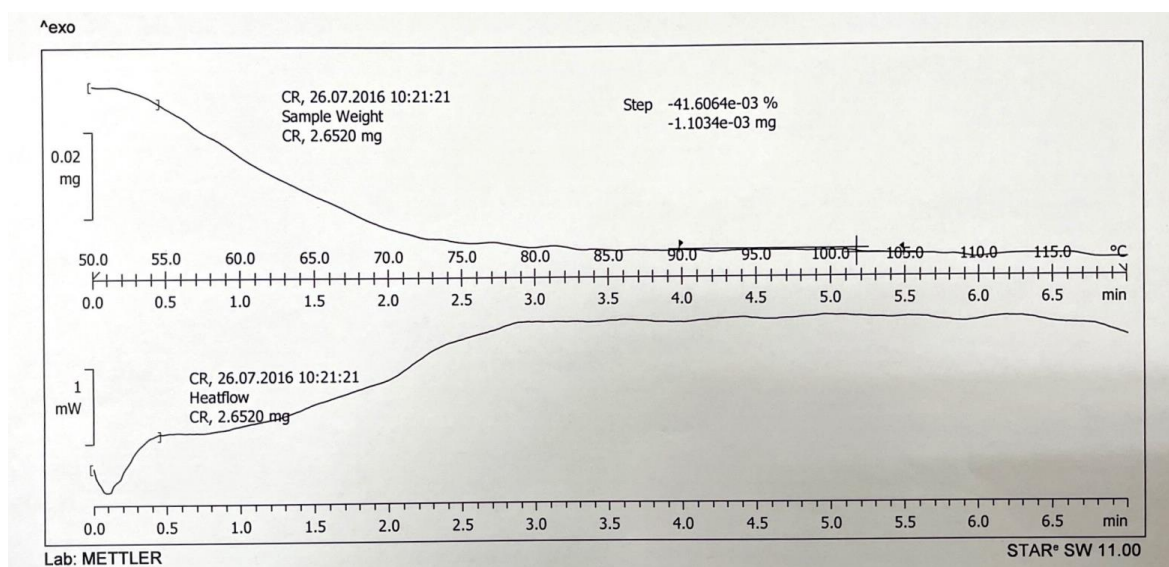
Chỉ tiêu	Phương pháp thử	Kết quả
Tính chất	Cảm quan	Bột màu vàng nhạt
Định lượng	HPLC	91,89 %; 91,66 %; 91,57 %; 91,91 %; 91,23 %; 91,32 % trên chế phẩm nguyên trạng
<i>Cynarosid</i>		

Ngày 25 tháng 07 năm 2016

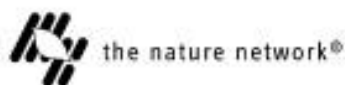
Viện Trưởng



Nguyễn Ngọc Vinh

Phụ lục 41. PHỔ IR, MS VÀ DSC CỦA CYNAROSID**Phiếu kiểm nghiệm CDC cynarosid****Phổ IR****Phổ MS****Phân tích nhiệt vi sai DSC**

**Phụ lục 42. COA (CERTIFICATE OF ANALYSIS) CỦA CHUẨN SƠ CẤP
CYNAROSID**



PhytoLab

PhytoLab GmbH & Co. KG, Dutendorfer Str. 5-7, 91487 Vestenbergsgreuth

Cerilliant Corporation
811 Paloma Drive, Suite A
Round Rock, Texas 78665
U S A

PhytoLab GmbH & Co. KG
Dutendorfer Str. 5-7
91487 Vestenbergsgreuth
Germany
Contact:
phyprool® Reference Substances
Tel: +49(0)9163/88-395
Fax: +49(0)9163/88-456
ref-substances@phytolab.de
Date: 5.05.15

Cust.No: 91790

Certificate of analysis

Report-No.: 18948311 - 99 002
Batch: 7842
Article: 89724 Luteolin 7-glucoside
Quantity: 1 x 20 mg

Test	Unit	Limit	Testresult
Appearance, SOP 100005		powder	Conform
Color, SOP 100006		yellow	Conform
Solubility, SOP 105001:			Conform
Methanol		soluble	Conform
Ethanol 96 %		soluble	Conform
Identification (HPLC-HR/MS), SOP 204125		Conform	Conform
Identification (UV spectrum from HPLC-DAD analysis) according to specification, SOP 204311		Conform	Conform
Identification (IR-spectroscopy, Ph.Eur. 8.0, 2.2.24/USP 37 <197>), SOP 206000		Conform	Conform
Identification (1H-NMR-spectroscopy), (outsourced), SOP 206010		Conform	Conform
Identification (13C-NMR-spectroscopy), (outsourced), SOP 206020		Conform	Conform
Purity test (TLC), SOP 211238		Conform	Conform
Water content, (micro determination, coulometric titration), Ph.Eur. 8.0, 2.5.32, SOP 304291: Mean value	%		2.9

Certificate of analysis

Report-No.: 18948311 - 99 002
 Batch: 7842
 Article: 89724 Luteolin 7-glucoside

Test	Unit	Limit	Testresult
Luteolin 7-glucoside, (HPLC), method 2, (AU %), SOP 400657	%	≥ 90.00	99.33
Peakpurity, (HPLC), SOP 401367		Conform	Conform
Residual solvents, (headspace-GC), SOP 805765: Residual solvents	%		< 0.05
inorganic impurities, (ICP-MS), for reference substances, SOP 811701:			
Sodium	%		< 0.1
Potassium	%		< 0.1
Magnesium	%		< 0.1
Calcium	%		< 0.1
Aluminium	%		< 0.1
Phosphorus	%		< 0.1
Sulfur	%		< 0.2
Content*, SOP 890000	%		96

Assessment:

The above mentioned reference substance meets the specification.

*The absolute content is calculated considering the chromatographic purity, and if available, the content of water, residual solvents and inorganic impurities according to the following formula:

$$\text{Content} = (100\% - \text{water content (\%)} - \text{residual solvents (\%)} - \text{inorganic impurities (\%)}) \times \text{chromatographic purity (\%)} / 100.$$

The chromatographic purity is checked regularly: the last analysis has been performed in March 2015.

The reference substance cannot be documented with an expiry date. The pack is closed and is recommended to be stored as indicated. The unopened product is guaranteed to fulfill the specifications of this analytical report for a period of 48 months. Once opened we can no longer guarantee the stability of the material.

Vestenbergsreuth, 5.05.15

Tamara Ackermann

This is a computer print and valid without signature. A signed certificate of analysis can be taken on request.

Phụ lục 43. KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ THIẾT LẬP CDC CYNAROSID**Kết quả giá trị ấn định z-score của cynarosid****Bảng PL-8. Kết quả định lượng cynarosid tại hai phòng thí nghiệm**

Số thứ tự	PTN 1	PTN 2
1	91,89	92,09
2	91,66	91,73
3	91,57	91,29
4	91,91	91,38
5	91,23	91,27
6	91,32	91,42
Trung bình	91,60	91,36

Bảng PL-9. Kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm theo ANOVA

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F _{tn}	F _{tc}
Giữa các nhóm	0,163333	1	0,163333	2,606383	4,964603
Trong từng nhóm	0,626667	10	0,062667		
Tổng cộng	0,79	11			

Nhận xét: $F_{tn} = 2,606 < F_{tc} = 4,964$

Kết luận: Kết quả trung bình của 2 phòng thí nghiệm khác nhau không có nghĩa.

➤ **Xác định giá trị công bố trên phiếu kiểm nghiệm****Bảng PL-10. Kết quả tính giá trị ấn định hàm lượng cynarosid**

	x^*_0	x^*_1	x^*_2
$\delta = 1,5 \times s^*$	-	0,40	0,41
$x^* - \delta$	-	91,13	91,13
$x^* + \delta$	-	91,93	91,93
Trung bình	91,56	91,53	91,53
Độ lệch s	0,29	0,24	0,24
x^* mới	91,495	91,53	91,53
s^* mới	0,220	0,270	0,270

Nhận xét: Sau 2 lần thay đổi, $s^* = 0,270$ không đổi, $x^* = 91,53\%$ được chọn.

Từ kết quả tính theo z-score, tất cả giá trị đều có $|z| < 2$.

- Hàm lượng: 91,53% (trên nguyên trạng).
- Độ lệch s: 0,24.
- Độ không đảm bảo đo μ : 0,097.
-

Phụ lục 44. PHIẾU KIỂM NGHIỆM CDC ACID CHLOROGENIC**Phiếu kiểm nghiệm CDC acid chlorogenic**

Mã số: DC/P-QA-03/F02



BỘ Y TẾ
VIỆN KIỂM NGHIỆM THUỐC
TP. HỒ CHÍ MINH
200 Cô Bắc - Q.1 - TP.HCM
☎ 38368453 - Fax: 38367900

CỘNG HÒA XÃ HỘI CHỦ NGHĨA VIỆT NAM
Độc Lập - Tự Do - Hạnh Phúc



VILAS 108

PHIẾU KIỂM NGHIỆM

Số : 0262/VKN-NB2016

Mẫu phân tích : Acid Chlorogenic RS
Đơn vị sản xuất : Trung tâm Sapharsen ĐHYD
Số lô : NC
Số đăng ký phân tích : 35NB0262
Đơn vị gửi mẫu : Trung tâm Sapharsen ĐHYD
Người giao mẫu : Hà Diệu Ly
Người nhận mẫu : Huỳnh Thị Ngọc Dung, Ngô Thùy An
Ngày giao nhận mẫu : 22/07/2016
Yêu cầu phân tích : Định lượng thành phẩm
Tiêu chuẩn hoặc tài liệu áp dụng: TCCS
Tình trạng mẫu khi nhận: Mẫu đựng trong lọ nâu hàn kín, bảo quản 2°C – 8°C

- Kết quả Khoa KN Mỹ Phẩm

Chỉ tiêu	Phương pháp thử	Kết quả
Tính chất	Cảm quan	Bột màu trắng ngà
Định tính	HPLC	
Định lượng		92,44 %; 92,10 %; 92,22 %;
Acid Chlorogenic		92,20 %; 92,30 %; 92,86 % trên chế phẩm nguyên trạng

- Kết quả Khoa TLCC & CDC

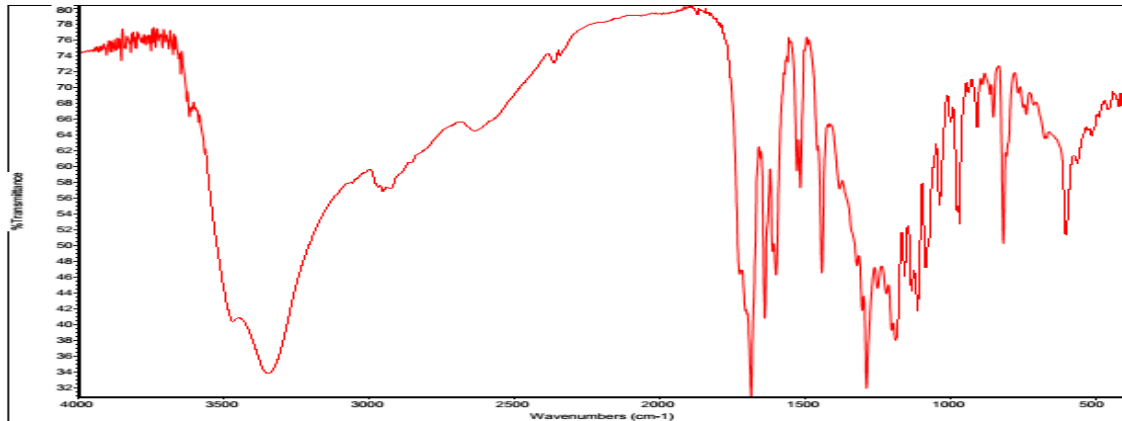
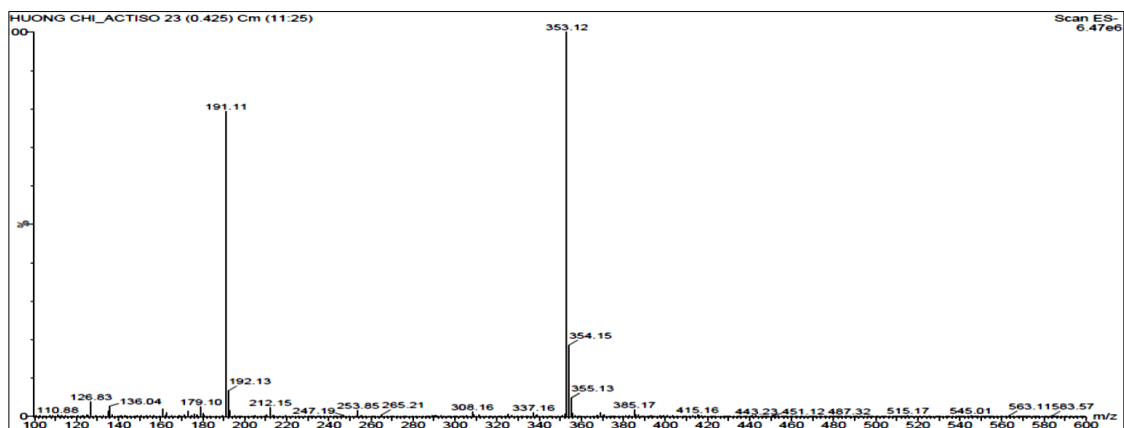
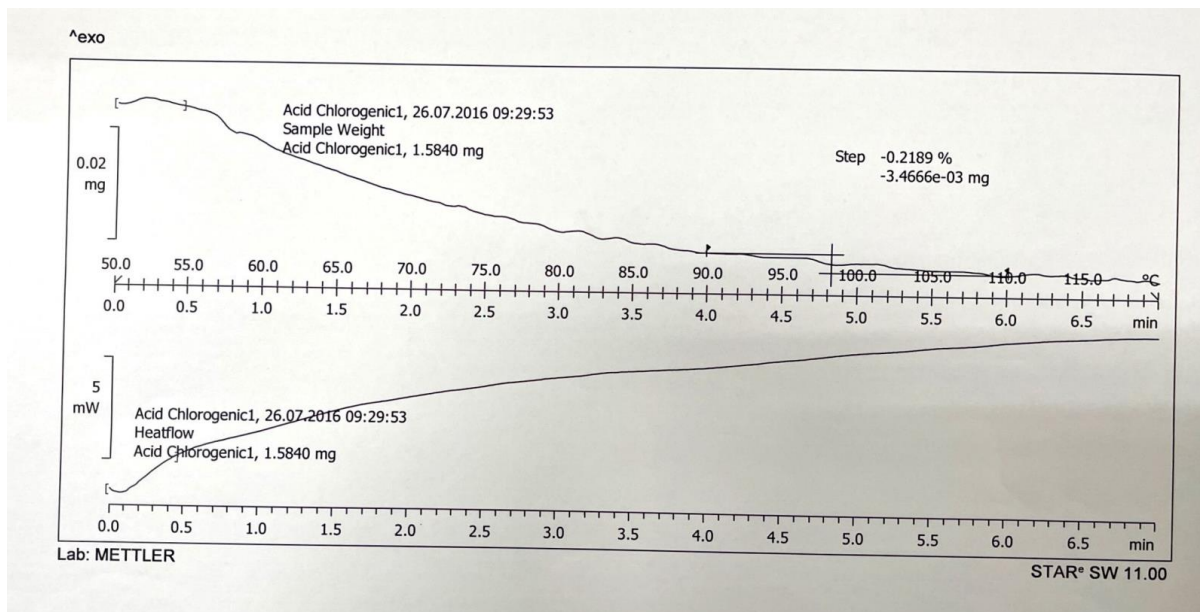
Chỉ tiêu	Phương pháp thử	Kết quả
Tính chất	Cảm quan	Bột màu trắng ngà
Định lượng	HPLC	
Acid Chlorogenic		92,55 %; 92,68 %; 92,81 %;
		92,19 %; 92,24 %; 92,42 % trên chế phẩm nguyên trạng

Ngày 25 tháng 07 năm 2016

Viện Trưởng



Nguyễn Ngọc Vinh

Phụ lục 45. PHỔ IR, MS, DSC CỦA ACID CHLOROGENIC**Phiếu kiểm nghiệm CDC acid chlorogenic****Phổ IR****Phổ MS****Phân tích nhiệt vi sai DSC**

**Phụ lục 46. COA (CERTIFICATE OF ANALYSIS) CỦA CHUẨN SƠ CẤP
ACID CHLOROGENIC**



PhytoLab

PhytoLab GmbH & Co. KG Dutendorfer Str. 5-7 91487 Vestenbergsgreuth

PhytoLab GmbH & Co. KG
Dutendorfer Straße 5-7
D-91487 Vestenbergsgreuth
Phone +49 9163 88-327
Fax +49 9163 88-456

E-Mail: michael.schwarz@phytolab.de

Analytical Report

Article: 89175 CHLOROGENIC ACID
Batch No.: 857
Report-No.: 657235.9

Sample quantity:

Test	Unit	Limits	Test Result
Appearance, SOP 100005		cryst.powder/needles	Conform
Color, SOP 100006		white	Conform
Solubility, SOP 105001:			Conform
Acetone		freely soluble	Conform
Ethanol 96 %		freely soluble	Conform
Boiling water		freely soluble	Conform
Identification (UV-spectroscopy, Ph.Eur. 5.0, 2.2.25) according to specification, SOP 204311			Conform
Identification (IR-spectroscopy, Ph. Eur. 5.0, 2.2.24) according to specification, SOP 206000			Conform
Purity test and identification (TLC), SOP 300002			Conform
Water content, (coulometric titration), according to Ph.Eur.5.0, 2.5.32, (double analysis), SOP 304291:			
Mean value	%		2.4
Chlorogenic acid, (HPLC), method 1 (330 nm, % AU), % SOP 400127		>= 95.00	98.54
Peakpurity, (HPLC), SOP 400260			Conform

Analytical Report

Article: 89175 CHLOROGENIC ACID
 Batch No.: 857
 Report-No.: 657235.9

Sample quantity:

Test	Unit	Limits	Test Result
Residual solvents, (headspace-GC), SOP 805765:			
Residual solvents	%		< 0.05
Inorganic impurities, (ICP-MS), for reference substances, SOP 811701:			
Sodium	%		< 0.10
Potassium	%		< 0.10
Magnesium	%		< 0.10
Calcium	%		< 0.10
Aluminium	%		< 0.10
Phosphorus	%		< 0.10
Sulfur	%		< 0.10
Content*, SOP 890000	%		96

Assessment:

The above mentioned reference substance meets the specification.

If mentioned in this analytical report, the content of water, residual solvents and inorganic impurities had been determined at the time of manufacturing. The chromatographic purity is checked regularly: the last analysis has been performed in September 2012.

*The absolute content is calculated considering the chromatographic purity, and if available, the content of water, residual solvents and inorganic impurities according to the following formula:

Content = (100%-water content(%)-residual solvents(%)-inorganic impurities(%)) x chromatographic purity(%) / 100

The reference substance cannot be documented with an expiry date. The pack is closed and is recommended to be stored as indicated. The unopened product is guaranteed to fulfill the specifications of this analytical report for a period of 60 months. Once opened we can no longer guarantee the stability of the material.

Vestenbergsreuth, 30.07.12

Dr. Michael Schwarz

**Phụ lục 47. KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ THIẾT LẬP CHUẨN ĐỐI CHIỀU
ACID CHLOROGENIC**

Kết quả giá trị ấn định z-score của acid chlorogenic

a. Đánh giá chất chuẩn liên phòng thí nghiệm

Bảng PL-11. Kết quả định lượng acid chlorogenic tại hai phòng thí nghiệm

Số thứ tự	PTN 1	PTN 2
1	92,55	92,44
2	92,68	92,10
3	92,81	92,22
4	92,19	92,20
5	92,24	92,30
6	92,42	92,86
Trung bình	92,48	92,35

Bảng PL-12. Kết quả đánh giá liên phòng thí nghiệm theo ANOVA

Nguồn sai số	Tổng bình phương	Bậc tự do	Bình phương trung bình	F_{tn}	F_{tc}
Giữa các nhóm	0,049408	1	0,049408	0,735663	4,964603
Trong từng nhóm	0,671617	10	0,067162		
Tổng cộng	0,721025	11			

Nhận xét: $F_{tn} = 0,736 < F_{tc} = 4,965$

Vậy, kết quả trung bình của 2 phòng thí nghiệm khác nhau không có nghĩa

b. Xác định giá trị công bố trên phiếu kiểm nghiệm

Bảng PL-13. Kết quả tính giá trị ấn định hàm lượng acid chlorogenic

	x^*_0	x^*_1	x^*_2	x^*_3
$\delta = 1,5 \times s^*$	-	0,37	0,367	0,367
$x^* - \delta$	-	92,03	92,03	92,03
$x^* + \delta$	-	92,76	92,76	92,76
Trung bình	92,42	92,39	92,39	92,39
Độ lệch s	0,26	0,22	0,22	0,22
x^* mới	92,36	92,39	92,39	92,39
s^* mới	0,22	0,24	0,245	0,245

Nhận xét: sau 3 lần thay đổi, $s^* = 0,245$ không đổi, $x^* = 92,39\%$ được chọn.

- Hàm lượng: 92,39% (trên nguyên trạng).
- Độ lệch s: 0,22
- Độ không đảm bảo đo μ : 0,088.

Phụ lục 48. **XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG 3 POLYPHENOL**

Quy trình định lượng đồng thời 3 polyphenol (AC, CR, SCO) trong lá khô Actisô

Cách tiến hành:

A. Chuẩn bị mẫu:

Dung dịch chuẩn: Hòa tan các chuẩn acid chlorogenic, cynarosid và scolymosid trong *ethanol* 50 % (TT) để được 3 dung dịch chuẩn gốc có nồng độ chính xác khoảng 1,0 mg/ml. Từ các dung dịch này, pha dãy hỗn hợp chuẩn có nồng độ 1, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 0,1 g bột dược liệu (qua rây số 355) vào bình nón 100 ml, thêm 15 ml *ethanol* 50 % (TT), đun cách thủy ở 80 °C trong 20 phút, lọc vào bình định mức 25 ml, tráng bình nón với 8 ml *ethanol* 50 % (TT), thêm *ethanol* 50 % (TT) vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

B. Điều kiện sắc ký:

Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1 % (TT)

Cột HPLC SunFire C₁₈ (25 cm × 4,6 mm, 5 µm)

Phát hiện: 325 nm (acid chlorogenic) và 349 nm (cynarosid và scolymosid)

Tốc độ dòng: 1 ml/phút

Thể tích tiêm: 10 µl

Chương trình dung môi: Tiến hành sắc ký theo chương trình như sau

Thời gian (phút)	Acetonitril (% tt/tt)	Acid formic 0,1 % (% tt/tt)
0 - 15	8 - 20	92 - 80
15 - 18	20 - 25	80 - 75
18 - 23	25 - 30	75 - 70
23 - 25	30	70
25 - 26	30 - 95	70 - 5
26 - 31	95	5
31 - 32	95 - 8	5 - 92
32 - 37	8	92

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký 6 lần đối với dung dịch chuẩn và thử. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của diện tích pic và thời gian lưu của 3 pic định lượng (acid chlorogenic, scolymosid và cynarosid) không lớn hơn 2,0 %. Độ phân giải giữa 3 pic định lượng với pic gần nhất trên sắc ký đồ dung dịch thử không được nhỏ hơn 1,5.

Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn đã pha ở trên. Vẽ đường chuẩn biểu diễn sự liên quan giữa diện tích pic định lượng (acid chlorogenic, scolymosid và cynarosid) và nồng độ các dung dịch tương ứng.

Tiến hành sắc ký dung dịch thử. Xác định các pic định lượng trên sắc ký đồ của dung dịch thử bằng cách so sánh thời gian lưu với pic của acid chlorogenic, scolymosid và cynarosid trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Thời gian lưu của 3pic định lượng trong dung dịch chuẩn và thử khác nhau không được lớn hơn 5 %.

C. Tính kết quả:

Tính hàm lượng acid chlorogenic, cynarosid và scolymosid trong dược liệu dựa vào diện tích pic của các hợp chất này trên sắc ký đồ của dung dịch thử, đường chuẩn đã lập của các chuẩn tương ứng của chúng. Hàm lượng của 3 chất định lượng được tính toàn theo công thức sau đây:

$$X = \frac{St}{a} \times \frac{k}{m(1 - h)} \times p \times 100$$

Trong đó:

X: Hàm lượng của chất định lượng có trong mẫu thử (%)

St: Diện tích đỉnh thu được của mẫu thử (µV × s)

a: Hệ số của phương trình hồi qui đường tuyến tính của chuẩn

k: Độ pha loãng của mẫu đo (ml)

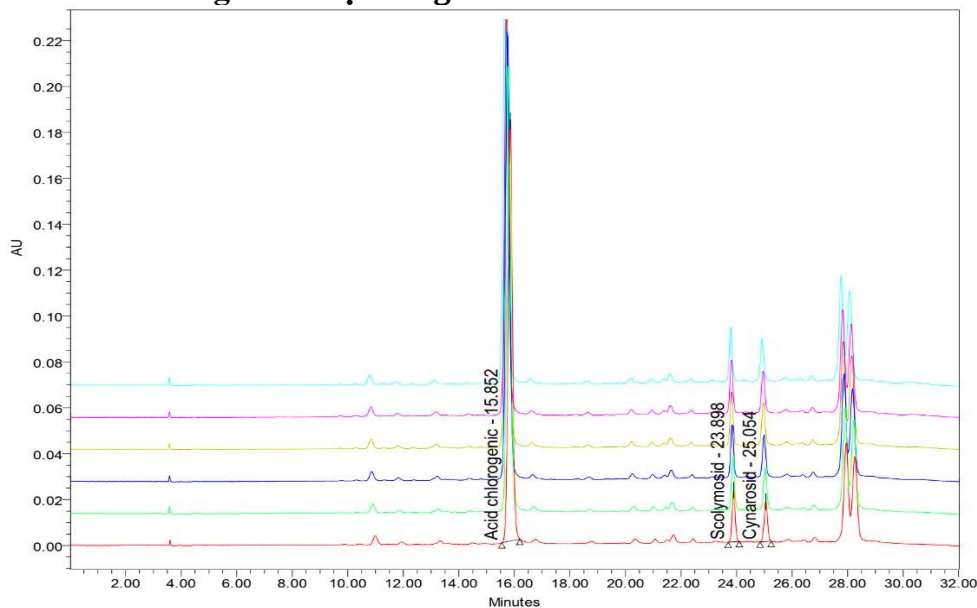
m: Khối lượng mẫu thử (dược liệu) (mg)

h: Độ ẩm của mẫu thử

p: Độ tinh khiết của chất chuẩn hoặc CDC (%)

KẾT QUẢ THẨM ĐỊNH QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG 3 POLYPHENOL

A. Khảo sát tính tương thích hệ thống



Hình PL-113. SKĐ khảo sát tính tương thích hệ thống của mẫu thử (6 lần tiêm)

Bảng PL-14. Kết quả khảo sát độ lặp lại của 6 lần tiêm mẫu thử

Component Summary For Area Channel: W2996								Component Summary For Retention Time Channel: W2996							
	SampleName	Inj	Channel	Vial	Acid chlorogenic	Scoly mosid	Cynarosid		SampleName	Inj	Channel	Vial	Acid chlorogenic (min)	Scoly mosid (min)	Cynarosid (min)
1	TTHT-Mau 1	1	W2996	1	2048146	174268	151227	1	TTHT-Mau 1	1	W2996	1	15.852	23.898	25.054
2	TTHT-Mau 1	2	W2996	1	2041812	174370	149154	2	TTHT-Mau 1	2	W2996	1	15.794	23.871	25.028
3	TTHT-Mau 1	3	W2996	1	2039329	174633	148855	3	TTHT-Mau 1	3	W2996	1	15.754	23.841	24.993
4	TTHT-Mau 1	4	W2996	1	2046584	175112	151471	4	TTHT-Mau 1	4	W2996	1	15.728	23.819	24.968
5	TTHT-Mau 1	5	W2996	1	2045527	174277	151247	5	TTHT-Mau 1	5	W2996	1	15.720	23.813	24.957
6	TTHT-Mau 1	7	W2996	1	2086408	177252	153334	6	TTHT-Mau 1	7	W2996	1	15.672	23.790	24.921
Sum					12307806.40	1049912.37	905288.25	Sum					94.521	143.033	149.922
Count					6	6	6	Count					6	6	6
Mean					2051301.07	174985.40	150881.38	Mean					15.753	23.839	24.987
Std. Dev.					17500.7538	1155.1332	1655.6047	Std. Dev.					0.0629	0.0398	0.0486
% RSD					0.8532	0.6601	1.0973	% RSD					0.3992	0.1669	0.1946

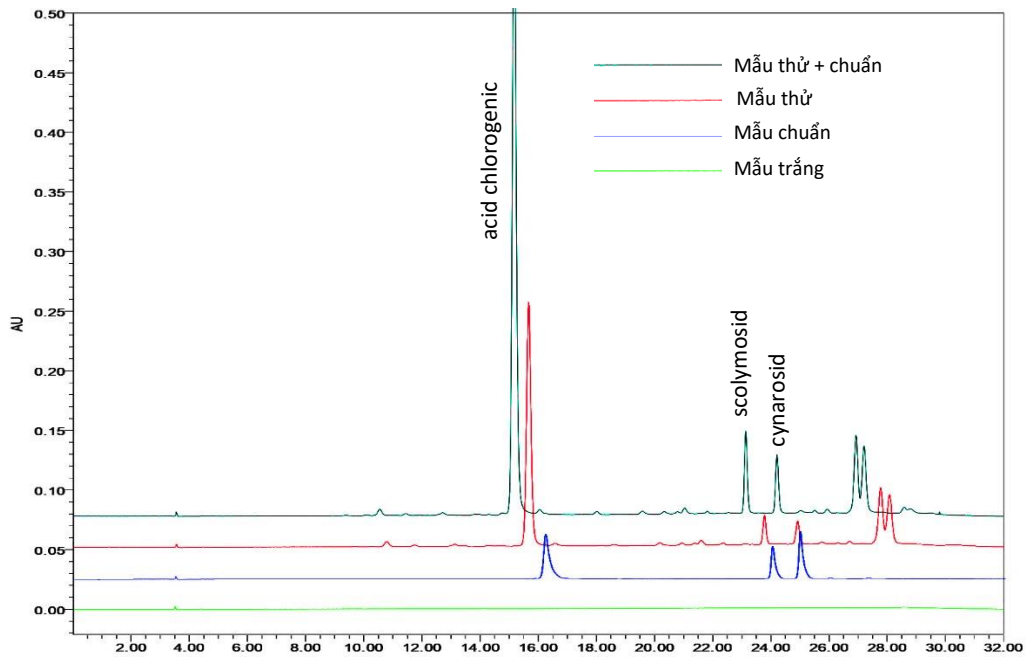
Bảng PL-15. Các thông số sắc ký của 3 pic định lượng

Peak Results									
	Name	RT	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area (μV*sec)	% Area	USP Tailing	Resolution	USP Plate Count
1	Acid chlorogenic	15.754	0.163	0.325	2039329	86.31	1.072947e+000		5.235046e+004
2	Scolymosid	23.841	0.534	0.943	174633	7.39	1.043229e+000	3.433213e+001	2.293514e+005
3	Cynarosid	24.993	0.685	1.076	148855	6.30	1.032132e+000	5.542536e+000	2.131251e+005

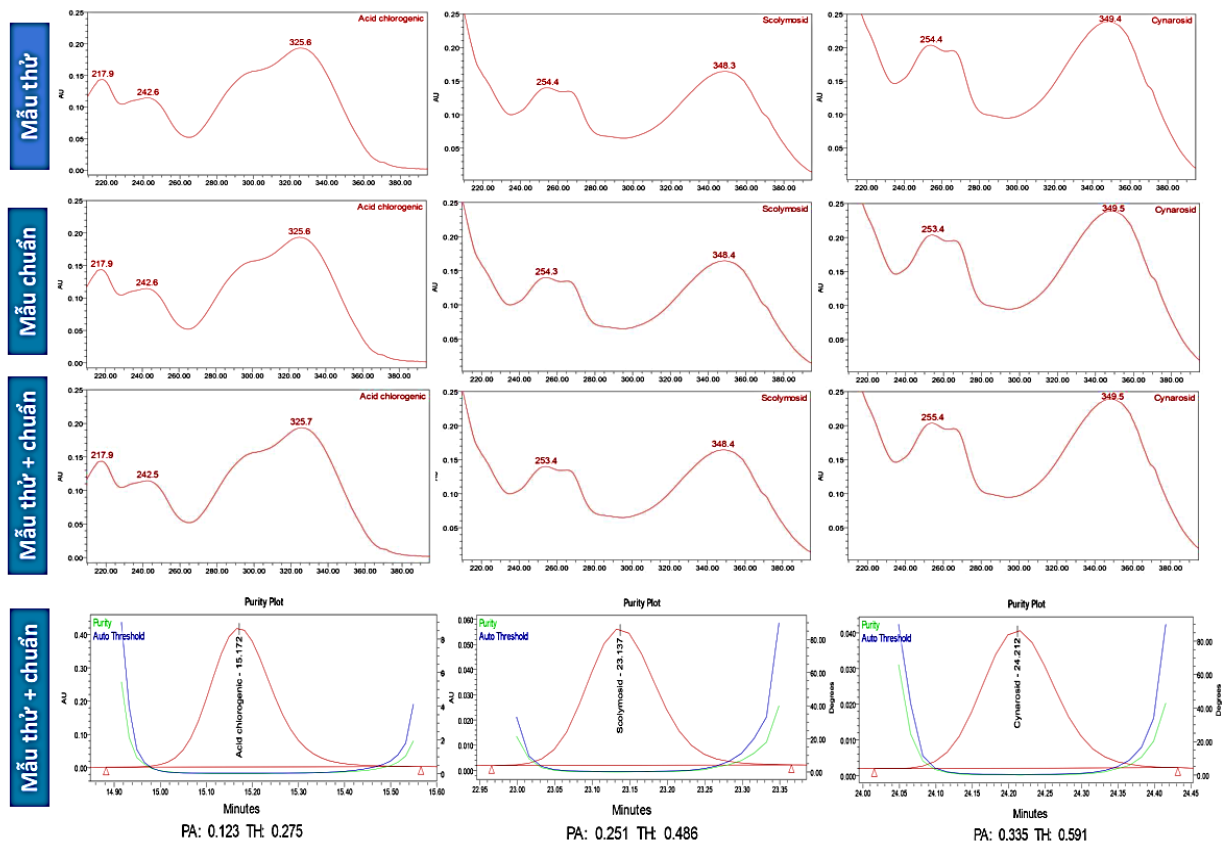
Nhận xét: Diện tích đỉnh và thời gian lưu của các pic định lượng trong mẫu thử đều có RSD < 2,0 % (**Bảng PL-14**). Tất cả 3 pic định lượng đều đạt độ tinh khiết pic với giá trị purity angle (PA) < purity threshold (PT); độ phân giải (Rs) của các pic từ 5,54 – 34,33; hệ số kéo đuôi từ 1,03 – 1,07 và số đĩa lý thuyết (N) từ 52354 – 229351 (xem **Bảng PL-15**).

Kết luận: Quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống.

b. Khảo sát tính chọn lọc



Hình PL-114. SKD khảo sát độ đặc hiệu



Hình PL-115. Kết quả khảo sát tính chọn lọc của quy trình định lượng 3 polyphenol

Nhận xét:

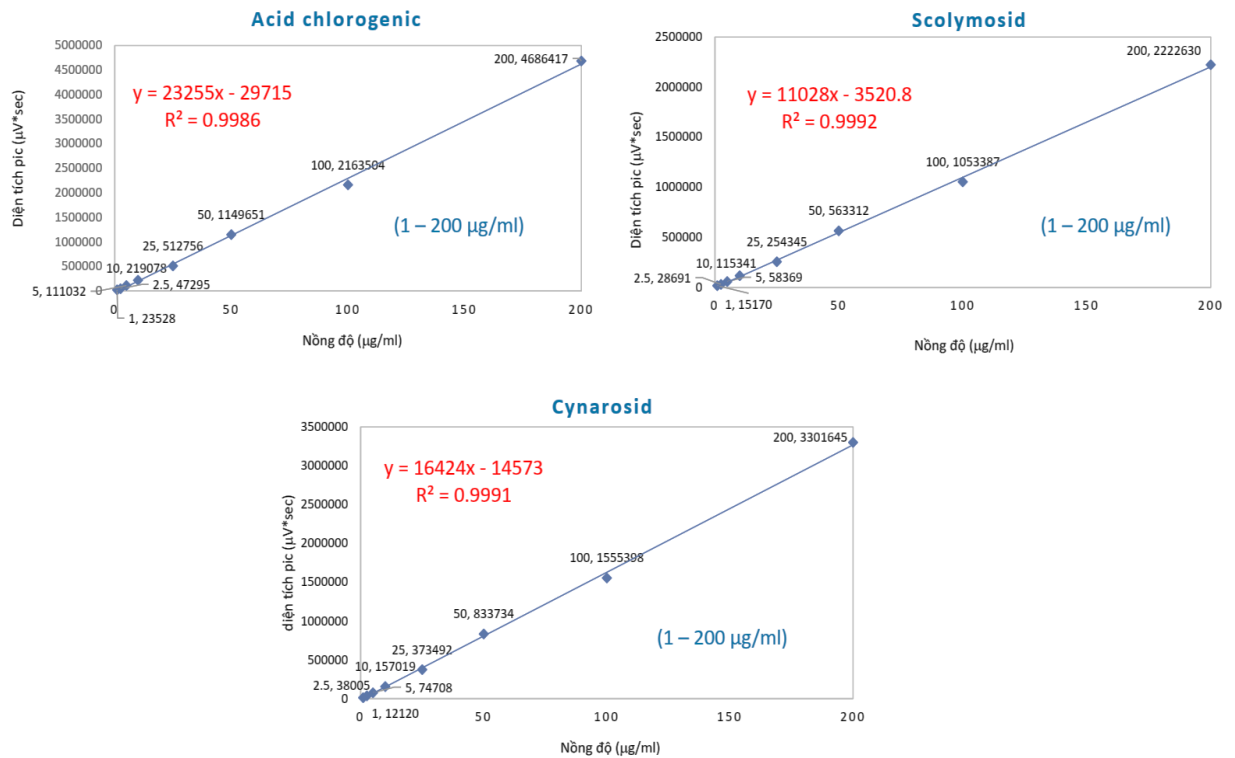
- Thời gian lưu của 3 pic cần định lượng (acid chlorogenic, scolymosid, cynarosid) trong mẫu thử tương đương thời gian lưu của mẫu đối chiếu, đồng thời mẫu trắng không có đỉnh trùng với đỉnh của thành phần cần định lượng (xem **Hình PL-114**)
- Phổ UV của acid chlorogenic, scolymosid và cynarosid trong mẫu chuẩn, mẫu thử và

thử thêm chuẩn tương đương nhau (**Hình PL-115**).

- Khi thêm 1 lượng chất đối chiếu vào mẫu thử, diện tích đỉnh của hợp chất cần định lượng tăng lên so với trước khi thêm chất đối chiếu và pic của chất cần định lượng phải đạt độ tinh khiết pic (**Hình PL-114** và **Hình PL-115**).

Kết luận: Quy trình định lượng đạt tính chọn lọc.

c. Khảo sát khoảng tuyến tính



Hình PL-116. Khoảng tuyến tính của AC, SCO và CR

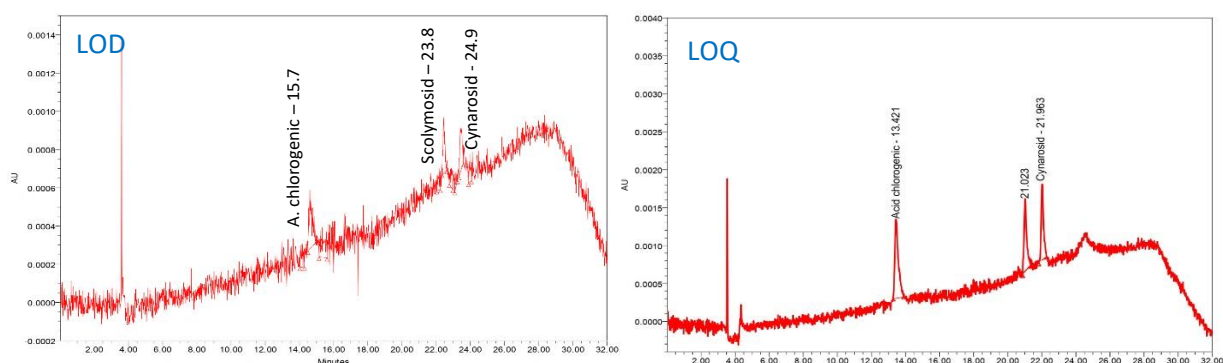
Bảng PL-16. Khoảng tuyến tính của AC, SCO, CR của quy trình định lượng 3 polyphenol

Nồng độ (ppm)	A. chlorogenic	Scolymosid	Cynarosid
200	4686417	2222630	3301645
100	2163504	1053387	1555398
50	1149651	563312	833734
25	512756	254345	373492
10	219078	115341	157019
5	111032	58369	74708
2,5	47295	28691	38005
1	23528	15170	12120
Phương trình hồi quy	$y = 23255x - 29715$	$y = 11028x - 3520.8$	$y = 16424x - 14573$
R^2	0,9986	0,9992	0,9991
Phân tích ý nghĩa của phương trình hồi quy bằng thống kê Anova			
F _{0.05}	5,9874	5,9874	5,9874

Nồng độ (ppm)	A. chlorogenic	Scolymosid	Cynarosid
F	4289,08	7532,31	7017,10
$F > F_{0,05}$: PT tương thích	Tương thích	Tương thích	Tương thích
$t_{0,05}$	2,4469	2,4469	2,4469
Giá trị t của hệ số a (t_a)	65,4911	86,7888	83,7681
Giá trị t của hệ số b (t_b)	-1,0256	-0,3396	-0,9109
$t_a > t_{0,05}$: a có ý nghĩa	Có nghĩa	Có nghĩa	Có nghĩa
$t_b < t_{0,05}$: b không ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa
Kết luận PT hồi quy	$y = 23255x$	$y = 11028x$	$y = 16424x$

Nhận xét: Từ kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của 3 polyphenol định lượng được trình bày ở **Hình PL-116** và **Bảng PL-16** có thể thấy 3 chất đối chiếu AC, SCO và CR có tính tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 1,0 – 200 ppm.

d. Khảo sát LOD và LOQ



Hình PL-117. SKĐ của 3 polyphenol định lượng tại LOD và LOQ

Bảng PL-17. LOD và LOQ của 3 polyphenol định lượng

STT	Hợp chất	LOD (µg/ml)	^a LOQ (µg/ml)
1	A. chlorogenic	0,025	0,083
2	Scolymosid	0,06	0,198
3	Cynarosid	0,06	0,198

^aGiá trị LOQ được suy ra từ LOD

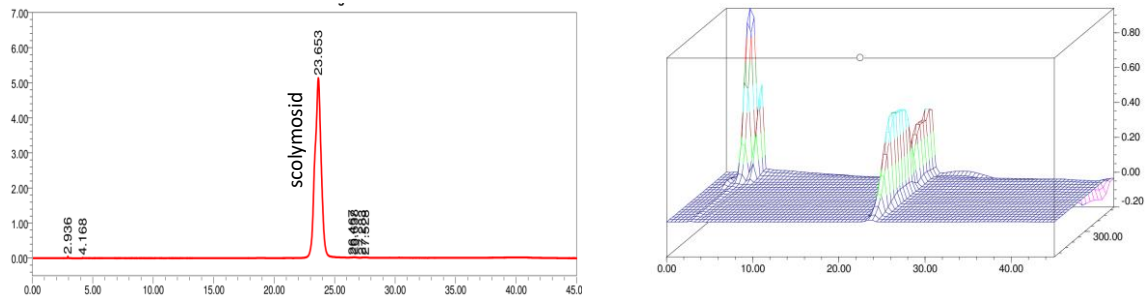
e. Độ tinh khiết của chất đối chiếu:

Bảng PL-18. Độ tinh khiết của các chất đối chiếu dùng trong định lượng 3 polyphenol

Hợp chất	A. chlorogenic ^a	Scolymosid ^b	Cynarosid ^a
Độ tinh khiết (%)	92,39	99,63	91,53

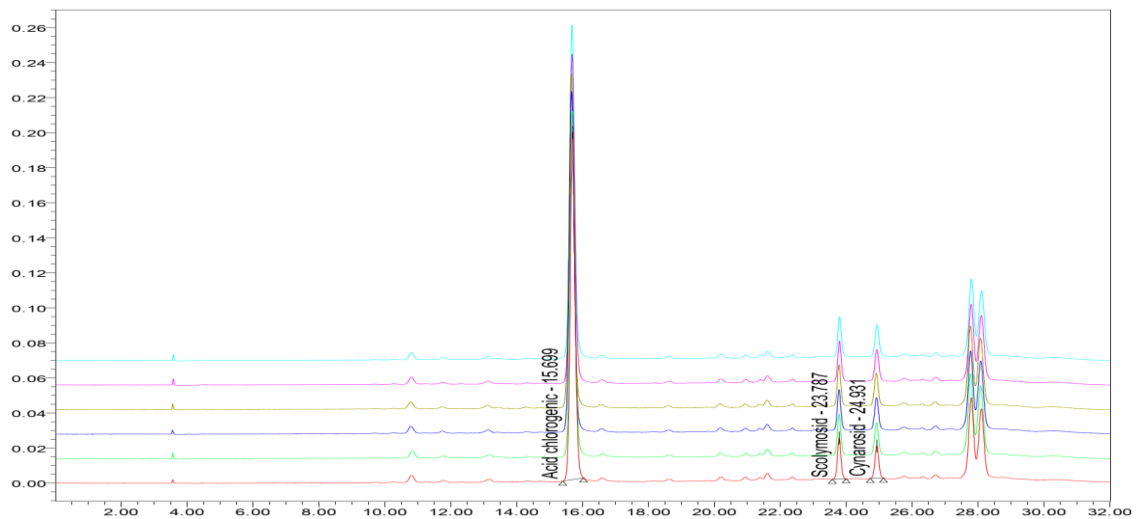
^aĐã được thiết lập CDC ở **Mục 3.2.1**; ^bĐộ tinh khiết sắc ký (HPLC-PDA)

Hợp chất scolymosid được khảo sát độ tinh khiết trên HPLC. Mẫu chuẩn được pha ở nồng độ 1.000 ppm, tiến hành phân tích ở điều kiện HPLC của quy trình định lượng 3 polyphenol đã khảo sát. Hàm lượng % của pic scolymosid được tính bằng cách qui về phần trăm trên tổng diện tích pic trên SKĐ.



	Retention Time (min)	Area (μV*sec)	% Area	% Height	% Amount	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	2.936	121688	0.09	0.71		13.106	0.442
2	4.168	42025	0.03	0.25			
3	23.653	128518267	99.63	98.48		0.237	0.252
4	26.467	32933	0.02	0.12			
5	26.638	129708	0.10	0.21		5.819	6.627
6	27.283	22497	0.02	0.07			
7	27.528	126446	0.10	0.16		7.309	8.805

f. Độ chính xác



Độ lặp lại trong ngày

Component Summary For Area
Channel: W2996

	SampleName	Inj	Channel	Vial	Acid chlorogenic	Scolymosid	Cynarosid
1	TTHT-Mau 1	6	W2996	1	2100544	179876	154613
2	DLL-Mau2	1	W2996	2	2125766	179945	153780
3	DLL-Mau3	1	W2996	3	2091951	178777	154252
4	DLL-Mau4	1	W2996	4	2081010	178810	155353
5	DLL-Mau5	1	W2996	5	2046996	175109	151475
6	DLL-Mau6	1	W2996	6	2086514	177211	155021
Sum					12532780.83	1069728.60	924494.67
Count					6	6	6
Mean					2088796.80	178288.10	154082.45
Std. Dev.					25798.5878	1846.6160	1392.4813
% RSD					1.2351	1.0357	0.9037

Độ lặp lại liên ngày

Component Summary For Area
Channel: W2996

	SampleName	Inj	Channel	Vial	Acid chlorogenic	Scolymosid	Cynarosid
1	DCXTG-Mau 1	1	W2996	1	2130589	181751	158367
2	TTHT-Mau 1	6	W2996	1	2100544	179876	154613
3	DLL-Mau2	1	W2996	2	2125766	179945	153780
4	DCXTG-Mau 2	1	W2996	2	2103846	182102	157095
5	DCXTG-Mau 3	1	W2996	3	2096671	181227	155148
6	DLL-Mau3	1	W2996	3	2091951	178777	154252
7	DLL-Mau4	1	W2996	4	2081010	178810	155353
8	DCXTG-Mau 4	1	W2996	4	2083265	178679	153710
9	DLL-Mau5	1	W2996	5	2046996	175109	151475
10	DCXTG-Mau 5	1	W2996	5	2114888	178062	155755
11	DCXTG-Mau 6	1	W2996	6	2101626	178237	156712
12	DLL-Mau6	1	W2996	6	2086514	177211	155021
Sum					25163665.47	2149786.61	1861279.64
Count					12	12	12
Mean					2096972.12	179148.88	155106.64
Std. Dev.					22231.8036	1989.4361	1796.8897
% RSD					1.0602	1.1105	1.1585

Nhận xét: Quy trình định lượng có độ lặp lại trong ngày của 3 polyphenol định lượng có RSD là 0,9 - 1,2 % và độ lặp lại liên ngày từ 1,1 - 1,2 %.

g. Độ đúng:

Bảng PL- 19. Kết quả khảo sát độ đúng của quy trình định lượng 3 polyphenol

Chất	Chuẩn thêm vào (%)	KL cân mẫu (mg)	Lượng sẵn có (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Diện tích pic ($\mu V \times s$)	KL tìm thấy (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Kết quả
Acid chlorogenic	50%	100,1	2,399	1,199	3406467	1,198	99,9	TB: 102,14
		100,0	2,397	1,198	3415272	1,210	101,0	SD: 3,01
		100,3	2,404	1,202	3477722	1,269	105,6	RSD%: 2,94
	80%	100,2	2,401	1,921	3996259	1,819	94,7	TB: 98,58
		100,1	2,399	1,919	4081297	1,911	99,6	SD: 0,32
		100,4	2,406	1,925	4128614	1,954	101,5	RSD%: 3,52
	100%	100,1	2,399	2,401	4525556	2,380	99,1	TB: 102,51
		100,0	2,397	2,399	4626944	2,489	103,8	SD: 2,97
		100,2	2,401	2,406	4658479	2,518	104,6	RSD%: 2,90
Scolymosid	50%	100,1	0,433	0,217	305810	0,221	102,09	TB: 100,80
		100,0	0,433	0,217	305406	0,220	101,69	SD: 1,90
		100,3	0,433	0,217	302297	0,214	98,62	RSD%: 1,88
	80%	100,2	0,433	0,346	360198	0,337	97,38	TB: 100,46
		100,1	0,433	0,346	370199	0,359	103,56	SD: 3,08
		100,4	0,433	0,346	365131	0,348	100,43	RSD%: 3,07
	100%	100,1	0,433	0,433	410634	0,445	102,82	TB: 99,74
		100,0	0,433	0,433	401165	0,425	98,14	SD: 2,67
		100,2	0,433	0,433	401401	0,425	98,26	RSD%: 2,67
Cynarosid	50%	100,1	0,263	0,132	255277	0,127	96,64	TB: 96,28
		100,0	0,263	0,132	253049	0,124	94,05	SD: 2,07
		100,3	0,263	0,132	256583	0,129	98,15	RSD%: 2,16
	80%	100,2	0,263	0,210	307626	0,207	98,42	TB: 96,95
		100,1	0,263	0,210	304268	0,202	95,98	SD: 1,29
		100,4	0,263	0,210	304926	0,203	96,46	RSD%: 1,33
	100%	100,1	0,263	0,263	357874	0,284	107,93	TB: 103,47
		100,0	0,263	0,263	346643	0,267	101,40	SD: 3,86
		100,2	0,263	0,263	346100	0,266	101,09	RSD%: 3,73

Kết luận: Quy trình định lượng 4 polyphenol có độ phục hồi từ **96,3 - 103,5 % (RSD = 1,3 - 3,7 %)**

ĐỘ ĐÚNG CỦA QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG 3 POLYPHENOL

Tỉ lệ thêm vào 50 %

325 nm

Peak Name: AC									
	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	USP Tailing	USP Plate Count
1	50%-1	AC	1	0.141	0.282	15.167	3406467	1.114341e+000	5.302951e+004
2	50%-2	AC	1	0.141	0.283	15.149	3415272	1.110150e+000	5.375589e+004
3	50%-3	AC	1	0.137	0.283	15.148	3477722	1.100460e+000	5.284751e+004
Mean						15.154	3433154		
Std. Dev						0.01	38847.58		
% RSD						0.07	1.13		

349 nm

Peak Name: SCO										
	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	50%-1	SCO	1	0.384	0.597	23.132	305810	3.624212e+001	1.057014e+000	2.579599e+005
2	50%-2	SCO	1	0.322	0.576	23.130	305406	3.649740e+001	1.060177e+000	2.596313e+005
3	50%-3	SCO	1	0.367	0.599	23.128	302297	3.598488e+001	1.047646e+000	2.453358e+005
Mean						23.130	304504			
Std. Dev						0.002	1922.25			
% RSD						0.008	0.63			

Peak Name: CR										
	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	50%-1	CR	1	0.369	0.659	24.214	255277	5.755243e+000	1.050518e+000	2.369796e+005
2	50%-2	CR	1	0.426	0.646	24.212	253049	5.710468e+000	1.048888e+000	2.338818e+005
3	50%-3	CR	1	0.376	0.669	24.211	256583	5.600245e+000	1.044289e+000	2.277877e+005
Mean						24.212	254969.7			
Std. Dev						0.001	1786.93			
% RSD						0.006	0.70			

Tỉ lệ thêm vào 80 %

325 nm

Peak Name: AC

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	AC	1	0.138	0.276	15.190	3996259	1.136326e+000	5.560162e+004
2	80%-2	AC	1	0.123	0.275	15.172	4081297	1.135886e+000	5.628680e+004
3	80%-3	AC	1	0.129	0.277	15.115	4128614	1.133178e+000	5.612398e+004
Mean						15.159	4068723		
Std. Dev.						0.04	67067.39		
% RSD						0.26	1.65		

349 nm

Peak Name: SCO

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	SCO	1	0.384	0.597	23.161	360198	3.674974e+001	1.080760e+000	2.587768e+005
2	80%-2	SCO	1	0.322	0.576	23.137	370199	3.701734e+001	1.098097e+000	2.607471e+005
3	80%-3	SCO	1	0.367	0.599	23.127	365131	3.721451e+001	1.073915e+000	2.619363e+005
Mean						23.141	365176			
Std. Dev.						0.02	5000.65			
% RSD						0.07	1.37			

	Peak Name: CR										
		SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
	1	80%-1	CR	1	0.381	0.618	24.248	307626	5.807726e+000	1.083463e+000	2.377542e+005
	2	80%-2	CR	1	0.335	0.591	24.212	304268	5.778491e+000	1.083929e+000	2.426796e+005
	3	80%-3	CR	1	0.382	0.597	24.200	304926	5.767350e+000	1.087019e+000	2.428004e+005
	Mean						24.220	305606.7			
	Std. Dev.						0.025	1779.47			
	% RSD						0.103	0.58			
Tỉ lệ thêm vào 100 %											
325 nm	Peak Name: AC										
		SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	USP Tailing	USP Plate Count	
	1	100%-1	AC	1	0.132	0.276	15.135	4525556	1.138895e+000	5.527406e+004	
	2	100%-2	AC	1	0.166	0.273	15.384	4626944	1.113611e+000	5.674613e+004	
	3	100%-3	AC	1	0.154	0.276	15.277	4658479	1.109476e+000	5.567963e+004	
	Mean						15.265	4603660			
	Std. Dev.						0.12	69453.23			
	% RSD						0.82	1.51			
349 nm	Peak Name: SCO										
		SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
	1	100%-1	SCO	1	0.260	0.483	23.137	410634	3.697728e+001	1.093342e+000	2.592115e+005
	2	100%-2	SCO	1	0.290	0.491	23.228	401165	3.605715e+001	1.052169e+000	2.558305e+005
	3	100%-3	SCO	1	0.297	0.493	23.192	401401	3.609767e+001	1.054503e+000	2.532342e+005
	Mean						23.185	404400			
	Std. Dev.						0.04	5400.09			
	% RSD						0.20	1.33			
	Peak Name: CR										
		SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
	1	100%-1	CR	1	0.381	0.618	24.218	357874	5.777261e+000	1.098147e+000	2.384156e+005
	2	100%-2	CR	1	0.335	0.591	24.336	346643	5.814305e+000	1.052464e+000	2.326855e+005
	3	100%-3	CR	1	0.382	0.597	24.291	346100	5.730838e+000	1.051714e+000	2.349266e+005
	Mean						24.281	350205.7			
	Std. Dev.						0.059	6646.52			
	% RSD						0.24	1.89			

Phụ lục 49. **XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG 4 POLYPHENOL**

Định lượng 4 polyphenol (AC, CY, CR, SCO) trong cao khô Actisô

Cách tiến hành:

A. Chuẩn bị mẫu:

Dung dịch chuẩn: Hòa tan các chuẩn acid chlorogenic, cynarin, cynarosid và scolymosid trong *methanol* 40 % (TT) để được 4 dung dịch chuẩn gốc có nồng độ chính xác khoảng 1,0 mg/ml. Từ các dung dịch này, pha dãy hỗn hợp chuẩn có nồng độ 5, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 20 mg cao chế phẩm cho vào ống ly tâm eppendorf (1,5 ml), thêm 1 ml *methanol* 40 % (TT), trộn đều, siêu âm 10 phút ở nhiệt độ 40 °C, ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 2 phút, hút và chuyển dịch chiết vào bình định mức 5 ml. Phần cặn còn lại được chiết tiếp lần 2 với 1 ml *methanol* 40% (TT) tương tự như trên. Gộp chung dịch chiết của 2 lần chiết vào bình định mức 5 ml và điều chỉnh *methanol* 40 % (TT) vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

B. Điều kiện sắc ký:

Pha động: Acetonitril - acid formic 0,1 % (TT)

Cột HPLC SunFire C₁₈ (25 cm × 4,6 mm, 5 µm)

Phát hiện: 325 nm (acid chlorogenic, cynarin) và 349 nm (cynarosid và scolymosid)

Tốc độ dòng: 1 ml/phút

Thể tích tiêm: 10 µl

Chương trình dung môi: Tiến hành sắc ký theo chương trình như sau

Thời gian (phút)	Acetonitril (% tt/tt)	Acid formic 0,1 % (% tt/tt)
0 - 20	8 - 15	92 - 85
20 - 21	15	85
21 - 30	15 - 30	85 - 70
30 - 35	30	70
35 - 36	30 - 95	70 - 5
36 - 39	95	5
39 - 40	95 - 8	5 - 92
40 - 45	8	92

Kiểm tra tính phù hợp của hệ thống: Tiến hành sắc ký 6 lần đối với dung dịch chuẩn và thử. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của diện tích pic và thời gian lưu của 4 pic định lượng (acid chlorogenic, cynarin, scolymosid và cynarosid) không lớn hơn 2,0 %. Độ phân giải giữa 4 pic định lượng với pic gần nhất trên sắc ký đồ dung dịch thử không được nhỏ hơn 1,5.

Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn đã pha ở trên. Vẽ đường chuẩn biểu diễn sự liên quan giữa diện tích pic định lượng (acid chlorogenic, cynarin, scolymosid và cynarosid) và nồng độ các dung dịch tương ứng.

Tiến hành sắc ký dung dịch thử. Xác định các pic định lượng trên sắc ký đồ của dung dịch thử bằng cách so sánh thời gian lưu với pic của acid chlorogenic, cynarin, scolymosid và cynarosid trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Thời gian lưu của 4 pic định lượng trong dung dịch chuẩn và thử khác nhau không được lớn hơn 5 %.

C. Tính kết quả:

Tính hàm lượng acid chlorogenic, cynarin, cynarosid và scolymosid trong cao chiết dựa vào diện tích pic của các hợp chất này trên sắc ký đồ của dung dịch thử, đường chuẩn đã lập của các chuẩn tương ứng của chúng. Hàm lượng của 4 chất định lượng được tính toán theo công thức sau đây:

$$X = \frac{St}{a} \times \frac{k}{m(1 - h)} \times p \times 100$$

Trong đó:

X : Hàm lượng của chất định lượng có trong mẫu thử (%)

St : Diện tích đỉnh thu được của mẫu thử (µV × s)

a : Hệ số của phương trình hồi qui đường tuyến tính của chuẩn

k : Độ pha loãng của mẫu đo (ml)

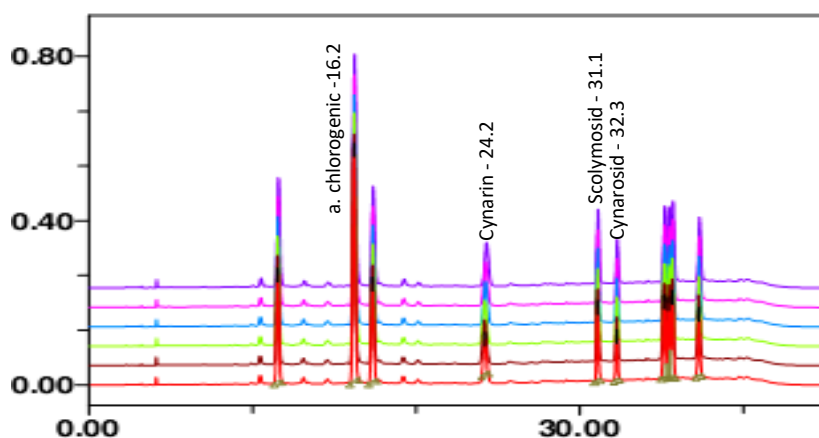
m : Khối lượng mẫu thử (cao chiết/ chế phẩm) (mg)

h : Độ ẩm của mẫu thử

p : Độ tinh khiết của chất chuẩn hoặc CDC (%)

KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG 4 POLYPHENOL

a. Khảo sát tính tương thích hệ thống



Hình PL-118. SKĐ khảo sát tính tương thích hệ thống của mẫu thử (6 lần tiêm)

Bảng PL-20. Độ lặp lại của 4 pic định lượng của 6 lần tiêm mẫu thử

Component Summary For Area
Channel: W2996

	SampleName	Inj	Channel	Vial	Acid chlorogenic	Cynarin	Scolymosid	Cynarosid
1	TTHT-Mau 1	1	W2996	1	6274700	1726994	2092629	1256606
2	TTHT-Mau 1	2	W2996	1	6241891	1738173	2090226	1256124
3	TTHT-Mau 1	3	W2996	1	6245864	1726136	2077633	1283140
4	TTHT-Mau 1	4	W2996	1	6240081	1750422	2095413	1289708
5	TTHT-Mau 1	5	W2996	1	6224640	1758936	2071235	1264437
6	TTHT-Mau 1	7	W2996	1	6253125	1730530	2108556	1267756
Sum					37480301.23	10431191.12	12535692.07	7617771.37
Count					6	6	6	6
Mean					6246716.83	1738531.83	2089282.00	1269628.50
Std. Dev.					16610.5934	13480.6711	13285.8059	13915.1853
% RSD					0.2659	0.7754	0.6359	1.0960

Bảng PL-21. Các thông số sắc ký của 4 pic định lượng trong mẫu thử

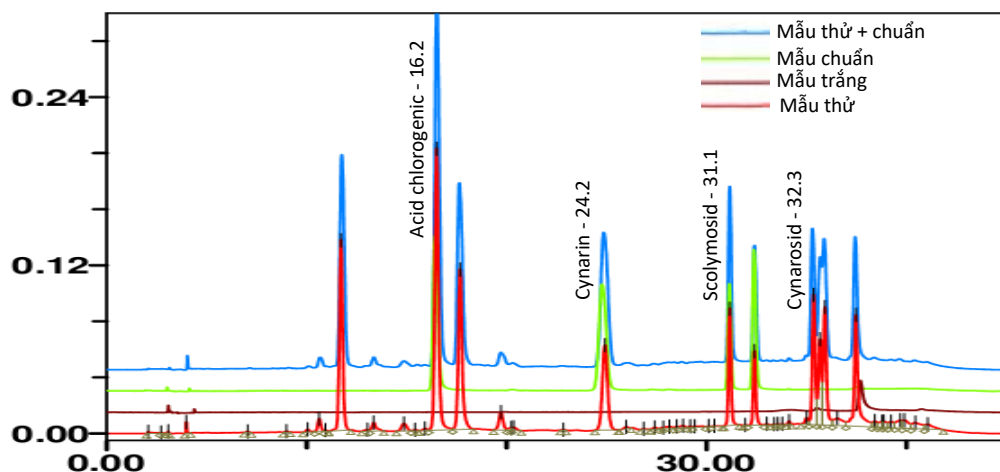
	Retention Time (min)	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Area	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	11.565	2596986	12.35	0.115	0.244		1.070492e+000	3.022033e+004
2	a. chlorogenic	6111353	29.07	0.096	0.252	1.689979e+001	1.101155e+000	4.971722e+004
3	17.352	2577312	12.26	0.342	0.245	3.954568e+000	1.067940e+000	5.642704e+004
4	cynarin	1061463	5.05	0.106	0.272	2.088313e+001	1.018054e+000	7.098029e+004
5	scolymosid	1410385	6.71	0.248	0.253	2.358931e+001	1.074591e+000	3.326213e+005
6	cynarosid	854091	4.06	0.260	0.298	5.520926e+000	1.040396e+000	3.462630e+005
7	35.181	1634234	7.77	1.001	0.245	1.268363e+001		3.361822e+005

Nhận xét: Diện tích đỉnh và thời gian lưu của các pic định lượng trong mẫu thử đều có RSD < 2,0 % (Bảng PL-20). Tất cả 4 pic định lượng đều đạt độ tinh khiết pic với giá trị purity angle

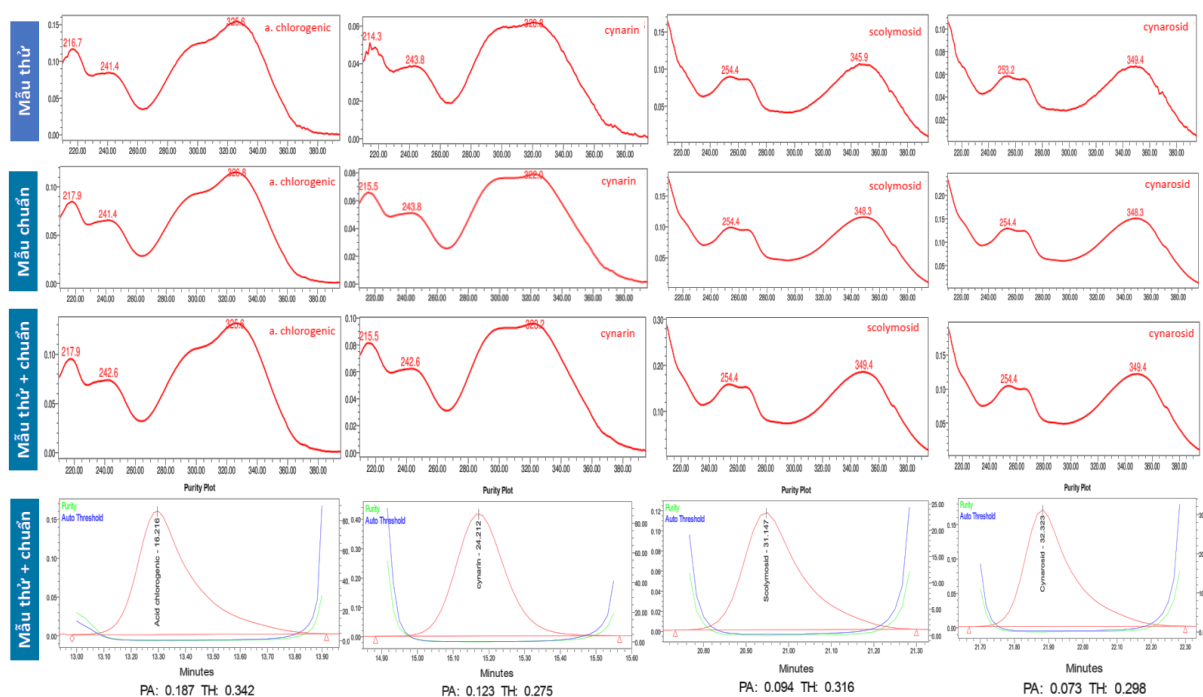
(PA) < purity threshold (PT); độ phân giải (Rs) của các pic từ 5,52 – 16,90; hệ số kéo đuôi từ 1,01 – 1,10 và số đĩa lý thuyết (N) từ 49717 – 346263 (xem **Bảng PL-21**).

Kết luận: Quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống.

b. Khảo sát tính đặc hiệu



Hình PL-119. SKĐ khảo sát tính chọn lọc của quy trình định lượng 4 polyphenol



Hình PL-120. Kết quả khảo sát tính chọn lọc của quy trình định lượng 4 polyphenol

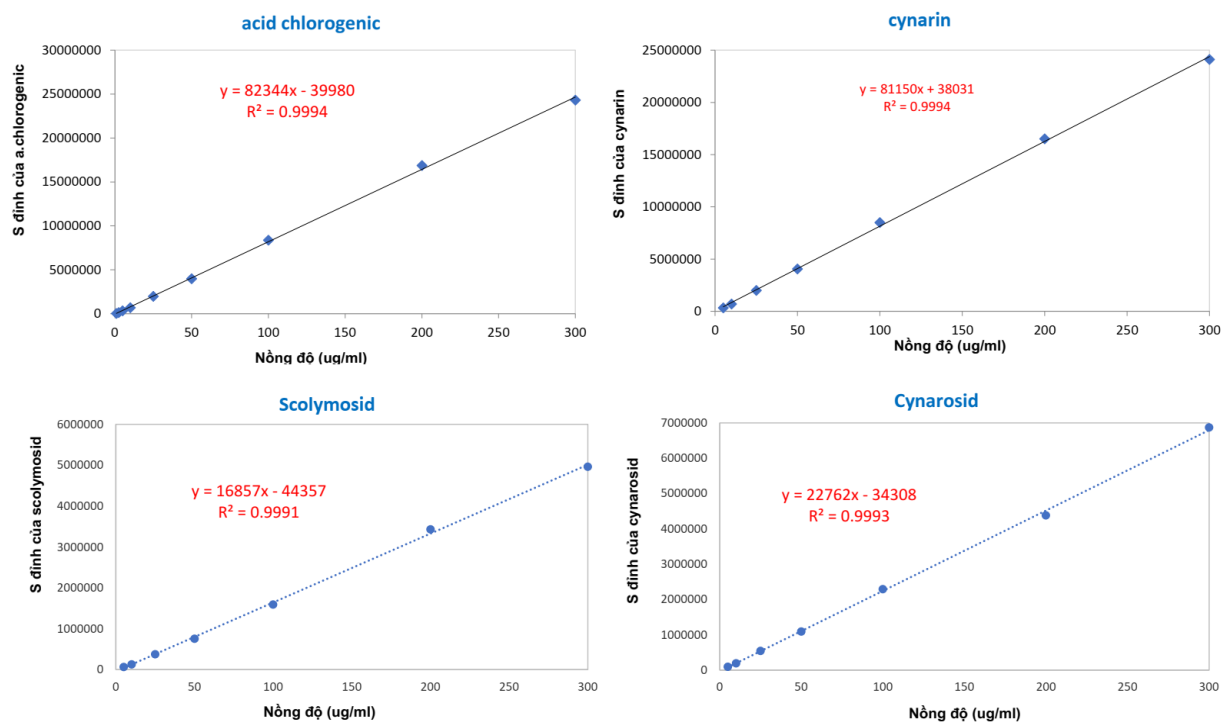
Nhận xét:

- Thời gian lưu của 4 pic cần định lượng (cynarin, acid chlorogenic, scolymosid, cynarosid) trong mẫu thử tương đương thời gian lưu của mẫu đối chiếu, đồng thời mẫu trắng không có đỉnh trùng với đỉnh của thành phần cần định lượng (xem **Hình PL-119**)
- Phổ UV của cynarin, acid chlorogenic, scolymosid và cynarosid trong mẫu chuẩn, mẫu thử và thử thêm chuẩn tương đương nhau (**Hình PL-120**).

- Khi thêm 1 lượng chất đối chiếu vào mẫu thử, diện tích đỉnh của hợp chất cần định lượng tăng lên so với trước khi thêm chất đối chiếu và pic của chất cần định lượng phải đạt độ tinh khiết pic (**Hình PL-119** và **Hình PL-119**).

Kết luận: Quy trình định lượng đạt tính chọn lọc.

c. Khảo sát khoảng tuyến tính



Hình PL-121. Khoảng tuyến tính của AC, CY, SCO và CR

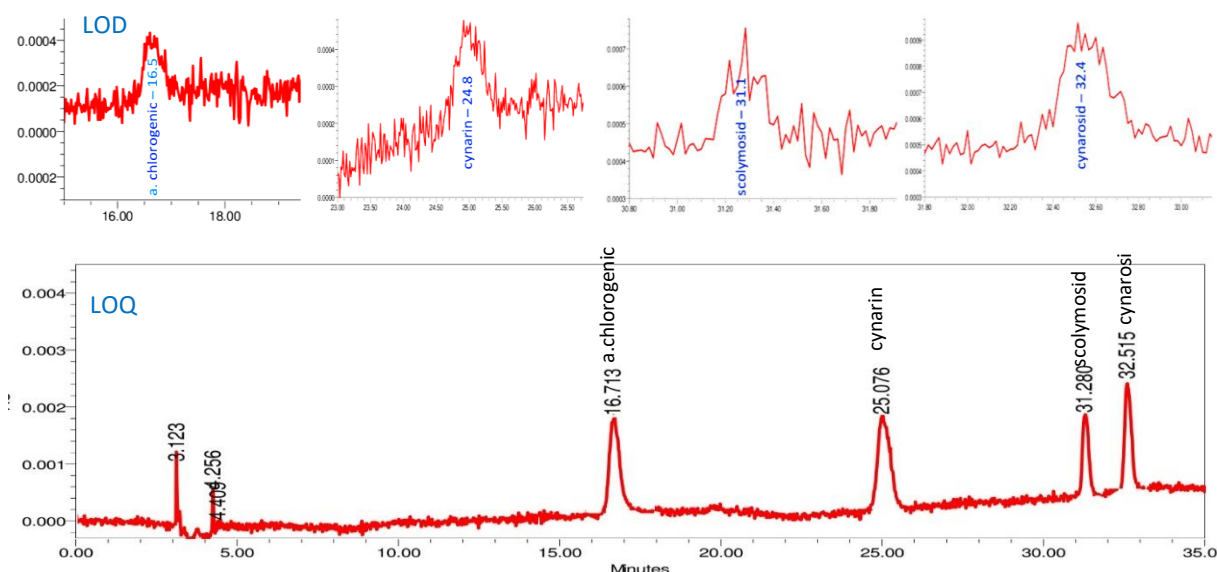
Bảng PL-22. Khoảng tuyến tính của AC, SCO, CR của quy trình định lượng 3 polyphenol

Nồng độ (ppm)	A. chlorogenic	Cynarin	Scolymosid	Cynarosid
300	24327731	24117536	4964558	6870843
200	16871621	16514684	3432392	4380562
100	8385310	8505832	1594185	2290281
50	3982207	4064295	755026	1092398
25	1978633	2007364	378729	544897
10	685327	707639	131171	191499
5	326477	342313	64574	95352
Phương trình hồi quy	$y = 82344x - 39980$	$y = 81150x - 38031$	$y = 16857x - 44357$	$y = 22762x - 34308$
R^2	0,9994	0,9994	0,9991	0,9993
Phân tích ý nghĩa của phương trình hồi quy bằng thống kê Anova				
$F_{0,05}$	6,6078	6,6078	6,6078	6,6078
F	6940,81	8520,83	5875,71	7060,93
$F > F_{0,05}$: PT tương thích	Tương thích	Tương thích	Tương thích	Tương thích
$t_{0,05}$	2,5706	2,5706	2,5706	2,5706
Giá trị t của hệ số a (t_a)	83,3115	92,3083	76,6532	84,0293
Giá trị t của hệ số b (t_b)	-0,2451	0,3024	-1,41	-0,8853

Nồng độ (ppm)	A. chlorogenic	Cynarin	Scolymosid	Cynarosid
$t_a > t_{0,05}$: a có ý nghĩa	Có nghĩa	Có nghĩa	Có nghĩa	Có nghĩa
$t_b < t_{0,05}$: b không ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa
Kết luận PT hồi quy	$y = 82344x$	$y = 81150x$	$y = 16857x$	$y = 22762x$

Nhận xét: Từ kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của 4 polyphenol định lượng được trình bày ở **Hình PL-116** và **Bảng PL-16** có thể thấy 4 chất đối chiếu AC, CY, SCO và CR có tính tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 5,0 – 300 ppm.

d. Khảo sát LOD và LOQ



Hình PL-122. SKĐ của 4 polyphenol định lượng tại LOD và LOQ

Bảng PL-23. LOD và LOQ của 4 polyphenol định lượng

STT	Hợp chất	LOD (µg/ml)	^a LOQ (µg/ml)
1	A. chlorogenic	0,125	0,417
2	Cynarin	0,125	0,417
3	Scolymosid	0,062	0,206
4	Cynarosid	0,031	0,103

^aGiá trị LOQ được suy ra từ LOD

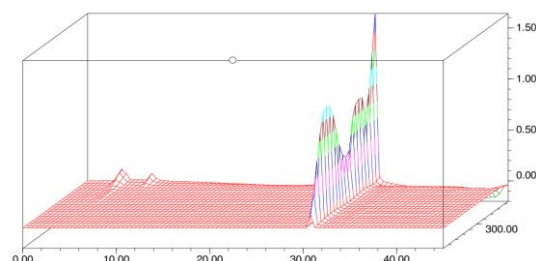
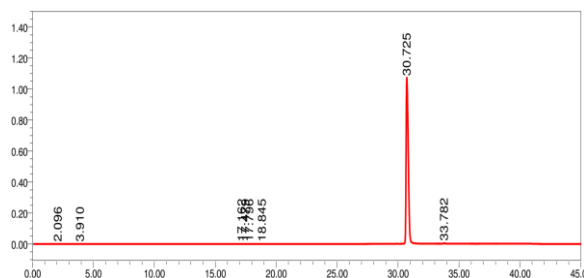
e. Độ tinh khiết của chất đối chiếu

Bảng PL-24. Độ tinh khiết của các chất đối chiếu dùng trong định lượng 4 polyphenol

Hợp chất	A. chlorogenic ^a	Cynarin ^a	Scolymosid ^b	Cynarosid ^a
Độ tinh khiết (%)	92,39	94,26	99,42	91,53

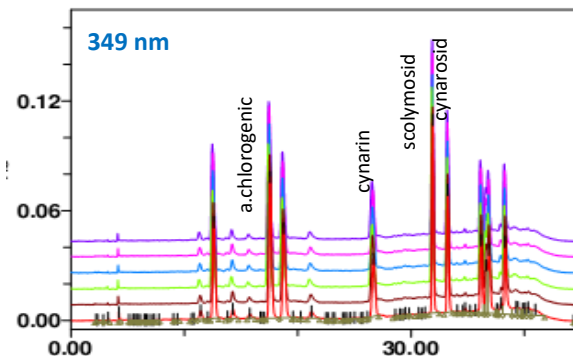
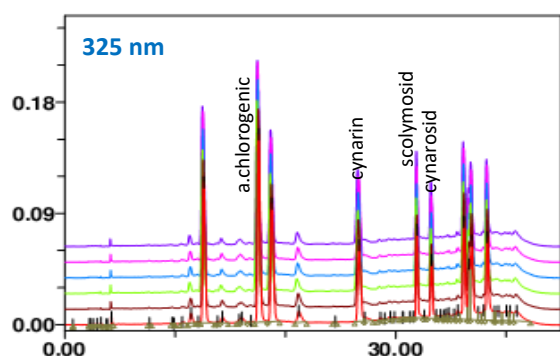
^aĐã được thiết lập CDC ở **Mục 3.2.1**; ^bĐộ tinh khiết sắc ký (HPLC-PDA)

Hợp chất scolymosid được khảo sát độ tinh khiết trên HPLC. Mẫu chuẩn được pha ở nồng độ 1000 ppm, tiến hành phân tích ở điều kiện HPLC của quy trình định lượng 3 polyphenol đã khảo sát. Hàm lượng % của pic scolymosid được tính bằng cách qui về phần trăm trên tổng diện tích pic trên SKĐ.



	Retention Time (min)	Area (μV*sec)	% Area	% Height	% Amount	Purity1 Angle	Purity1 Threshold
1	2.096	2236	0.02	0.03		3.866	4.336
2	3.910	3480	0.03	0.07		29.196	1.484
3	17.162	4737	0.04	0.03		42.643	31.537
4	17.479	3004	0.02	0.03		47.515	35.195
5	17.796	7729	0.06	0.02		61.767	90.000
6	18.845	14559	0.11	0.03		23.648	27.425
7	30.725	12976320	99.42	99.45		0.063	0.491
8	33.782	39829	0.31	0.35		2.874	2.187

f. Độ chính xác



Độ lặp lại trong ngày

Độ lặp lại liên ngày

Component Summary For Area
Channel: W2996

SampleName	Inj	Channel	Vial	Acid chlorogenic	Cynarin	Scolymosid	Cynarosid
1 DLL-Mau 1	6	W2996	1	2455886	1191544	1018712	783034
2 DLL-Mau2	1	W2996	2	2566394	1195662	1004149	761076
3 DLL-Mau3	1	W2996	3	2467284	1191996	1009261	766482
4 DLL-Mau4	1	W2996	4	2526910	1236736	1021179	781716
5 DLL-Mau5	1	W2996	5	2552964	1219032	999629	755597
6 DLL-Mau6	1	W2996	6	2476891	1222017	1043538	765551
Sum				15046329.23	7256987.60	6096468.13	4613456.67
Count				6	6	6	6
Mean				2507721.50	1209497.83	1016078.10	768909.33
Std. Dev.				47180.8749	19024.3643	15788.2988	11128.9406
% RSD				1.8814	1.5729	1.5538	1.4474

Component Summary For Area
Channel: W2996

SampleName	Inj	Channel	Vial	Acid chlorogenic	Cynarin	Scolymosid	Cynarosid
1 DLL-Mau 1	1	W2996	1	2455886	1191544	1018712	783034
2 DLL-Mau 2	1	W2996	2	2566394	1195662	1004149	761076
3 DLL-Mau 3	1	W2996	3	2467284	1191996	1009261	766482
4 DLL-Mau 4	1	W2996	4	2526910	1236736	1021179	781716
5 DLL-Mau 5	1	W2996	5	2552964	1219032	999629	755597
6 DLL-Mau 6	1	W2996	6	2476891	1222017	1043538	765551
7 DLL-Mau 7	1	W2996	1	2529156	1204198	980114	778033
8 DLL-Mau 8	1	W2996	2	2543226	1207458	970152	740989
9 DLL-Mau 9	1	W2996	3	2598542	1209898	991678	762894
10 DLL-Mau 10	1	W2996	4	2567912	1263017	1013651	734795
11 DLL-Mau 11	1	W2996	5	2522094	1246169	980145	759465
12 DLL-Mau 12	1	W2996	6	2555173	1211750	1030353	794861
Sum				30362432.47	14599417.21	12062561.11	9184493.54
Count				12	12	12	12
Mean				2530202.67	1216623.08	1005213.42	765374.42
Std. Dev.				43812.4318	22252.5977	22009.6984	17306.7556
% RSD				1.7316	1.8290	2.1896	2.2612

Nhận xét: Quy trình định lượng có độ lặp lại trong ngày của 4 polyphenol định lượng có RSD là 1,44 - 1,88 % và độ lặp lại liên ngày từ 1,73 - 2,26 %.

g. Khảo sát độ đúng:

Chất	Chuẩn thêm vào (%)	Lượng sẵn có (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Diện tích pic ($\mu V \times s$)	KL đo được (mg)	KL tìm thấy (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Kết quả
Acid chlorogenic	80 %	0,870	0,696	4957801	1,551	0,681	97,83	TB: 95,80
		0,869	0,695	4888364	1,529	0,660	94,98	SD: 1,77
		0,869	0,695	4879824	1,526	0,657	94,59	RSD: 1,85
	100 %	0,870	0,869	5427340	1,697	0,827	95,19	TB: 96,17
		0,869	0,870	5497134	1,719	0,850	97,70	SD: 1,34
		0,870	0,869	5439361	1,701	0,831	95,64	RSD: 1,39
	120 %	0,869	1,043	5955680	1,863	0,994	95,27	TB: 98,02
		0,870	1,044	6123636	1,915	1,045	100,14	SD: 2,50
		0,869	1,043	6070680	1,899	1,029	98,66	RSD: 2,55
Cynarin	80 %	0,4771	0,382	2393716	0,843	0,366	95,86	TB: 93,02
		0,4766	0,381	2353202	0,829	0,352	92,38	SD: 2,58
		0,4766	0,381	2336369	0,823	0,346	90,83	RSD: 2,77
	100 %	0,4772	0,477	2641789	0,930	0,453	95,04	TB: 97,60
		0,4769	0,477	2692623	0,948	0,471	98,79	SD: 2,23
		0,4772	0,477	2694942	0,949	0,472	98,98	RSD: 2,28
	120 %	0,4768	0,572	2997874	1,056	0,579	101,22	TB: 102,00
		0,4772	0,573	3026571	1,066	0,589	102,82	SD: 0,80
		0,4769	0,572	3010823	1,060	0,583	101,96	RSD: 0,78
Scolymosid	80 %	0,5438	0,435	2063633	0,996	0,452	103,92	TB: 103,97
		0,5431	0,434	2036592	0,983	0,440	101,19	SD: 2,81
		0,5431	0,434	2087252	1,007	0,464	106,81	RSD: 2,71
	100 %	0,5439	0,543	2305785	1,113	0,569	104,67	TB: 102,76
		0,5434	0,544	2284131	1,102	0,559	102,74	SD: 1,89
		0,5439	0,543	2262914	1,092	0,548	100,88	RSD: 1,84
	120 %	0,5433	0,652	2524989	1,218	0,675	103,55	TB: 104,50
		0,5438	0,653	2543744	1,227	0,684	104,76	SD: 0,86
		0,5435	0,652	2548158	1,230	0,686	105,20	RSD: 0,82
Cynarosid	80 %	0,3230	0,258	1559890	0,591	0,268	103,66	TB: 103,37
		0,3226	0,258	1581199	0,599	0,276	107,06	SD: 3,85
		0,3226	0,258	1528881	0,579	0,256	99,38	RSD: 3,72
	100 %	0,3230	0,323	1672297	0,633	0,310	96,15	TB: 93,94
		0,3228	0,323	1637454	0,620	0,297	92,07	SD: 2,06
		0,3230	0,323	1650497	0,625	0,302	93,61	RSD: 2,19
	120 %	0,3227	0,387	1868212	0,708	0,385	99,38	TB: 97,88
		0,3230	0,388	1861536	0,705	0,382	98,57	SD: 1,95
		0,3228	0,387	1830853	0,693	0,371	95,68	RSD: 1,99

Nhận xét: Quy trình định lượng có độ phục hồi của 4 hợp chất polyphenol như sau:

- Acid chlorogenic: 95,8 - 98,0 % (RSD = 1,39 - 2,55 %)
- Cynarin: 93,0 - 103,0 % (RSD = 0,78 - 2,77 %)
- Scolymosid: 102,7 - 104,5 % (RSD = 0,82 - 2,71 %)
- Cynarosid: 93,9 - 103,4 % (RSD = 1,99 - 3,72 %)

ĐỘ ĐÚNG CỦA QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG 4 POLYPHENOL

Tỉ lệ thêm vào 80 %

325 nm

Peak Name: AC

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	AC	1	0.096	0.252	16.211	4957801	1.689979e+001	1.101155e+000	4.971722e+004
2	80%-2	AC	1	0.102	0.283	16.209	4888364	1.654348e+001	1.102161e+000	4.577509e+004
3	80%-3	AC	1	0.098	0.261	16.215	4879824	1.632371e+001	1.107712e+000	4.684459e+004
Mean						16.211	4908663			
Std. Dev.						0.003	42768.45			
% RSD						0.02	0.87			

Peak Name: CY

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	CY	1	0.106	0.272	24.238	2393716	2.088313e+001	1.018054e+000	7.098029e+004
2	80%-2	CY	1	0.138	0.286	24.157	2353202	2.066212e+001	1.027514e+000	7.072509e+004
3	80%-3	CY	1	0.112	0.291	24.226	2336369	2.064514e+001	1.017027e+000	7.049621e+004
Mean						24.207	2361096			
Std. Dev.						0.04	29477.15			
% RSD						0.18	1.25			

349 nm

Peak Name: SCO

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	SCO	1	0.248	0.253	31.100	2063633	2.358931e+001	1.074591e+000	3.326313e+005
2	80%-2	SCO	1	0.212	0.256	31.130	2036592	2.349649e+001	1.062143e+000	3.311275e+005
3	80%-3	SCO	1	0.207	0.299	31.121	2087252	2.368479e+001	1.077658e+000	3.333145e+005
Mean						31.117	2062492			
Std. Dev.						0.015	25349.26			
% RSD						0.05	1.23			

Peak Name: CR

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	CR	1	0.260	0.298	32.283	1559890	5.520926e+000	1.040396e+000	2.462630e+005
2	80%-2	CR	1	0.224	0.257	32.276	1581199	5.512782e+000	1.041245e+000	2.392144e+005
3	80%-3	CR	1	0.287	0.312	32.255	1528881	5.601124e+000	1.042895e+000	2.457824e+005
Mean						32.271	1556657			
Std. Dev.						0.014	26308.44			
% RSD						0.045	1.69			

Tỉ lệ thêm vào 100 %

325 nm

Peak Name: AC

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	AC	1	0.105	0.304	16.217	5427340	1.612114e+001	1.105478e+000	4.857562e+004
2	100%-2	AC	1	0.102	0.371	16.221	5497134	1.625715e+001	1.102587e+000	4.625870e+004
3	100%-3	AC	1	0.113	0.326	16.231	5439361	1.635247e+001	1.105874e+000	4.789427e+004
Mean						16.223	5454612			
Std. Dev.						0.007	37312.7			
% RSD						0.04	0.68			

Peak Name: CY

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	CY	1	0.136	0.527	24.457	2641789	2.112557e+001	1.052781e+000	7.100587e+004
2	100%-2	CY	1	0.138	0.528	24.258	2692623	2.105782e+001	1.063250e+000	7.147505e+004
3	100%-3	CY	1	0.127	0.501	24.358	2694942	2.123558e+001	1.087515e+000	7.117820e+004
Mean						24.357	2676451			
Std. Dev.						0.10	30040.85			
% RSD						0.41	1.12			

349 nm

Peak Name: SCO

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	SCO	1	0.178	0.234	31.157	2305785	2.312580e+001	1.125754e+000	3.545711e+005
2	100%-2	SCO	1	0.197	0.266	31.087	2284131	2.300894e+001	1.125752e+000	3.457005e+005
3	100%-3	SCO	1	0.188	0.287	31.089	2262914	2.302575e+001	1.112475e+000	3.544715e+005
Mean						31.111	2284277			
Std. Dev.						0.04	21435.87			
% RSD						0.13	0.94			

Peak Name: CR

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	CR	1	0.251	0.301	32.257	1672297	5.457152e+000	1.145222e+000	2.554758e+005
2	100%-2	CR	1	0.264	0.311	32.276	1637454	5.552241e+000	1.145655e+000	2.478987e+005
3	100%-3	CR	1	0.267	0.305	32.285	1650497	5.547721e+000	1.147585e+000	2.645785e+005
Mean						32.273	1653416			
Std. Dev.						0.014	17603.95			
% RSD						0.044	1.06			

Tỉ lệ thêm vào 120 %

325 nm

Peak Name: AC

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	AC	1	0.112	0.314	16.255	5955680	1.624700e+001	1.112477e+000	4.758452e+004
2	120%-2	AC	1	0.122	0.376	16.247	6123636	1.654088e+001	1.115702e+000	4.754006e+004
3	120%-3	AC	1	0.124	0.347	16.243	6070680	1.668752e+001	1.110047e+000	4.733324e+004
Mean						16.248	6049999			
Std. Dev.						0.006	85866.7			
% RSD						0.04	1.42			

Peak Name: CY

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	CY	1	0.141	0.247	24.453	2997874	2.224705e+001	1.094575e+000	7.245700e+004
2	120%-2	CY	1	0.143	0.257	24.262	3026571	2.234441e+001	1.087954e+000	7.201455e+004
3	120%-3	CY	1	0.135	0.221	24.362	3010823	2.258850e+001	1.098754e+000	7.247556e+004
Mean						24.325	3011756			
Std. Dev.						0.11	14371.23			
% RSD						0.45	0.48			

349 nm

Peak Name: SCO

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	SCO	1	0.154	0.205	31.163	2524989	2.321475e+001	1.115745e+000	3.652022e+005
2	120%-2	SCO	1	0.177	0.247	31.147	2543744	2.325741e+001	1.112587e+000	3.663547e+005
3	120%-3	SCO	1	0.164	0.228	31.125	2548158	2.335470e+001	1.112689e+000	3.658778e+005
Mean						31.145	2538964			
Std. Dev.						0.02	12302.01			
% RSD						0.06	0.48			

Peak Name: CR

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	CR	1	0.247	0.312	32.257	1868212	5.568744e+000	1.135485e+000	2.558755e+005
2	120%-2	CR	1	0.265	0.315	32.288	1861536	5.575884e+000	1.132457e+000	2.552101e+005
3	120%-3	CR	1	0.277	0.317	32.294	1830853	5.547805e+000	1.140214e+000	2.547525e+005
Mean						32.279	1853534			
Std. Dev.						0.019	19923.65			
% RSD						0.061	1.07			

Phụ lục 50. **XÂY DỰNG QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG 12 POLYPHENOL**

Định lượng 12 polyphenol trong cao khô Actisô

Cách tiến hành:

A. Chuẩn bị mẫu:

Dung dịch chuẩn: Hòa tan các chuẩn acid 1-caffeoylquinic (**1-CQA**), **3-CQA**, acid caffeic (**CF**), acid chlorogenic (**AC**), **4-CQA**, cynarin (**CY**), cynarosid (**CR**), scolymosid (**SCO**), acid 3,4-dicafeoylquinic (**3,4-diCQA**); **3,5-diCQA**, **1,5-diCQA** và **4,5-diCQA** trong *methanol* 40 % (*TT*) để thu được 12 dung dịch chuẩn gốc có nồng độ chính xác khoảng 1,0 mg/ml. Từ các dung dịch này, pha dãy hỗn hợp chuẩn có nồng độ 5, 10, 20, 50, 100, 200 µg/ml.

Dung dịch thử: Cân chính xác khoảng 20 mg cao chế phẩm cho vào ống ly tâm eppendorf (1,5 ml), thêm 1 ml *methanol* 40 % (*TT*), trộn đều, siêu âm 10 phút ở nhiệt độ 40 °C, ly tâm ở tốc độ 12.000 vòng/phút trong 2 phút, hút và chuyển dịch chiết vào bình định mức 5 ml. Phần cặn còn lại được chiết tiếp lần 2 với 1 ml *methanol* 40 % (*TT*) tương tự như trên. Gộp chung dịch chiết của 2 lần chiết vào bình định mức 5 ml và điều chỉnh *methanol* 40 % (*TT*) vừa đủ đến vạch, lắc đều, lọc qua màng lọc 0,45 µm.

B. Điều kiện sắc ký:

Chương trình dung môi:

Pha động: Acetonitril (ACN) - acid trifluoroacetic (TFA) 0,1 %
Cột ThermoFisher C₁₈ (10 cm × 2,1 mm; 2,6 µm)
Detector PDA: 325 nm (**mono-CQA và di-CQA**); 349 nm (**SCO, CR**)
Tốc độ dòng: 0,8 ml/phút
Thể tích tiêm: 5 µl
Nhiệt độ cột: 35 °C

Thời gian (phút)	Acetonitril (% tt/tt)	Acid formic 0,1 % (% tt/tt)
0	0	100
20	3	97
22	3	97
25	10	90
27	10	90
29,5	12	88
32	12	88
34	15	85
38	15	85
39	90	10
42	90	10
43	0	100

Kiểm tra tính phù hợp hệ thống: Tiến hành sắc ký 6 lần đối với dung dịch chuẩn và thử. Độ lệch chuẩn tương đối (RSD %) của diện tích pic và thời gian lưu của 12 pic định lượng không lớn hơn 2,0 %. Độ phân giải giữa 12 pic định lượng với pic gần nhất trên SKĐ dung dịch thử không được nhỏ hơn 1,5.

Tiến hành sắc ký với dung dịch chuẩn đã pha ở trên. Vẽ đường chuẩn biểu diễn sự liên quan giữa diện tích của 12 pic định lượng và nồng độ các dung dịch tương ứng.

Tiến hành sắc ký dung dịch thử. Xác định các pic định lượng trên sắc ký đồ của dung dịch thử bằng cách so sánh thời gian lưu với pic của 12 chất định lượng trên sắc ký đồ của dung dịch chuẩn. Thời gian lưu của 12 pic định lượng trong dung dịch chuẩn và thử khác nhau không được lớn hơn 5 %.

C. Tính kết quả:

Tính hàm lượng của 12 hợp chất định lượng trong mẫu thử dựa vào diện tích pic của các hợp chất này trên sắc ký đồ của dung dịch thử, đường chuẩn đã lập của các chuẩn tương ứng của chúng. Hàm lượng của 12 chất định lượng được tính theo công thức dưới đây. Các pic định lượng nếu không có chuẩn thì hàm lượng có thể được tính dựa vào đường tuyến tính của các đồng phân tương ứng (các mono-CQA được tính hàm lượng theo chuẩn AC, các di-CQA có thể được tính hàm lượng theo chuẩn CY).

Trong đó:

X: Hàm lượng của chất định lượng có trong mẫu thử (%)

St: Diện tích đỉnh thu được của mẫu thử (µV × s)

a: Hệ số của phương trình hồi qui đường tuyến tính của chuẩn

k: Độ pha loãng của mẫu đo (ml)

m: Khối lượng mẫu thử (cao chiết/ chế phẩm) (mg)

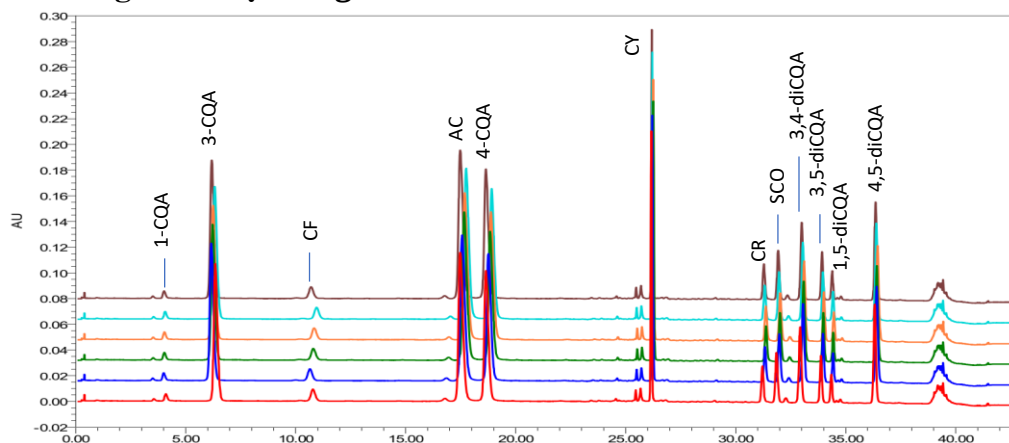
h: Độ ẩm của mẫu thử

p: Độ tinh khiết của chất chuẩn hoặc CDC (%)

$$X = \frac{St}{a} \times \frac{k}{m(1 - h)} \times p \times 100$$

KẾT QUẢ ĐÁNH GIÁ QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG 12 POLYPHENOL

a. Tính tương thích hệ thống



Hình PL-123. SKĐ khảo sát tính tương thích hệ thống của mẫu thử (6 lần tiêm)

Ghi chú: CQA (caffeoylquinic acid); CF (acid caffeic); AC (acid chlorogenic);
CY (cynarin); CR (cynarosid); SCO (scolymosid).

Bảng PL-25. Kết quả khảo sát tính tương thích hệ thống của mẫu thử

Component Summary For Area Channel: PDA Spectrum													
	SampleName	1-CQA	3-CQA	CF	AC	4-CQA	CY	CR	SCO	3,4-diCQA	3,5-diCQA	1,5-diCQA	4,5-diCQA
1	TTHT	46485	1259407	121139	1645049	1328070	763895	191058	294700	491672	243745	128857	571698
2	TTHT	46444	1263803	121005	1631561	1321055	764609	193075	296509	494569	244997	128896	574058
3	TTHT	46340	1261197	121814	1640039	1327397	762294	192299	294528	490403	243304	128639	574186
4	TTHT	46445	1263947	121207	1640266	1323013	763352	193507	294758	492360	245632	128606	572876
5	TTHT	46453	1261176	123944	1642848	1327069	764634	192428	295283	492707	244034	128739	572292
6	TTHT	46705	1264515	121843	1642769	1329177	764489	191576	294814	490567	244610	128393	571999
Mean		46478.7	1262341.1	121825.3	1640422.2	1325963.4	763878.4	192323.7	295098.5	492046.3	244386.9	128688.3	572851.6
Std. Dev.		121.03	2035.60	1096.92	4722.01	3189.01	923.55	909.69	735.41	1544.31	858.31	184.75	1058.72
% RSD		0.26	0.16	0.90	0.29	0.24	0.12	0.47	0.25	0.31	0.35	0.14	0.18

Bảng PL-26. Các thông số sắc ký của 12 pic định lượng trong mẫu thử

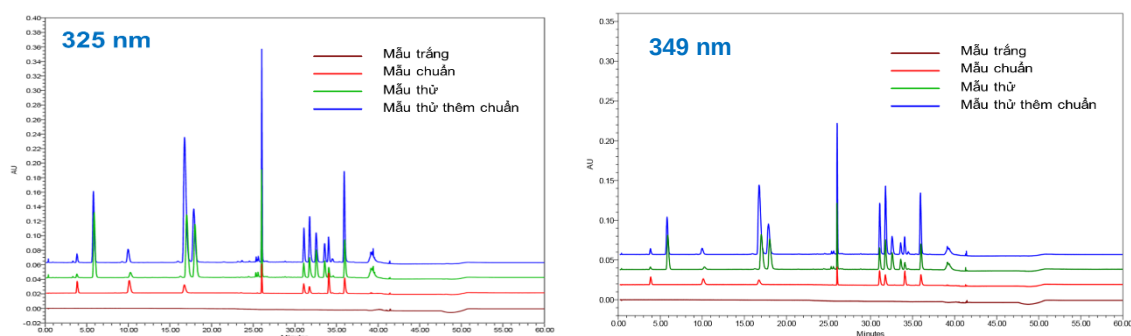
	Name	Retention Time (min)	Purity 1 Angle	Purity 1 Threshold	Area (μV*sec)	Height (μV)	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	1-CQA	4.095	0.964	8.913	46485	5444		1.17	5142
2	3-CQA	6.348	0.072	0.771	1259407	106588	8.44	1.27	6499
3	CF	10.788	0.822	6.206	117937	8821	13.30	1.08	14347
4	AC	17.476	0.061	0.748	1645049	115332	18.32	1.39	33974
5	4-CQA	18.646	0.086	0.801	1328070	100743	3.26	1.31	45039
6	CY	26.161	0.120	0.549	763895	210120	34.21	1.12	1211920
7	CR	31.215	0.822	1.271	191058	27880	37.11	1.08	480265
8	SCO	31.852	0.246	0.992	294700	38644	3.38	1.08	402198
9	3,4-diCQA	32.927	0.253	1.173	491672	58619	5.15	1.07	358662
10	3,5-diCQA	33.872	0.558	1.788	243745	36396	4.83	1.04	602270
11	1,5-diCQA	34.347	1.098	2.703	128857	21849	2.90	1.00	799274
12	4,5-diCQA	36.315	0.228	0.931	571698	76514	11.36	1.11	553358

Nhận xét: Diện tích đỉnh của các pic định lượng trong mẫu thử đều có RSD < 1,0 % (Bảng PL-25). Tất cả 12 pic định lượng đều đạt độ tinh khiết pic với giá trị purity angle (PA) < purity

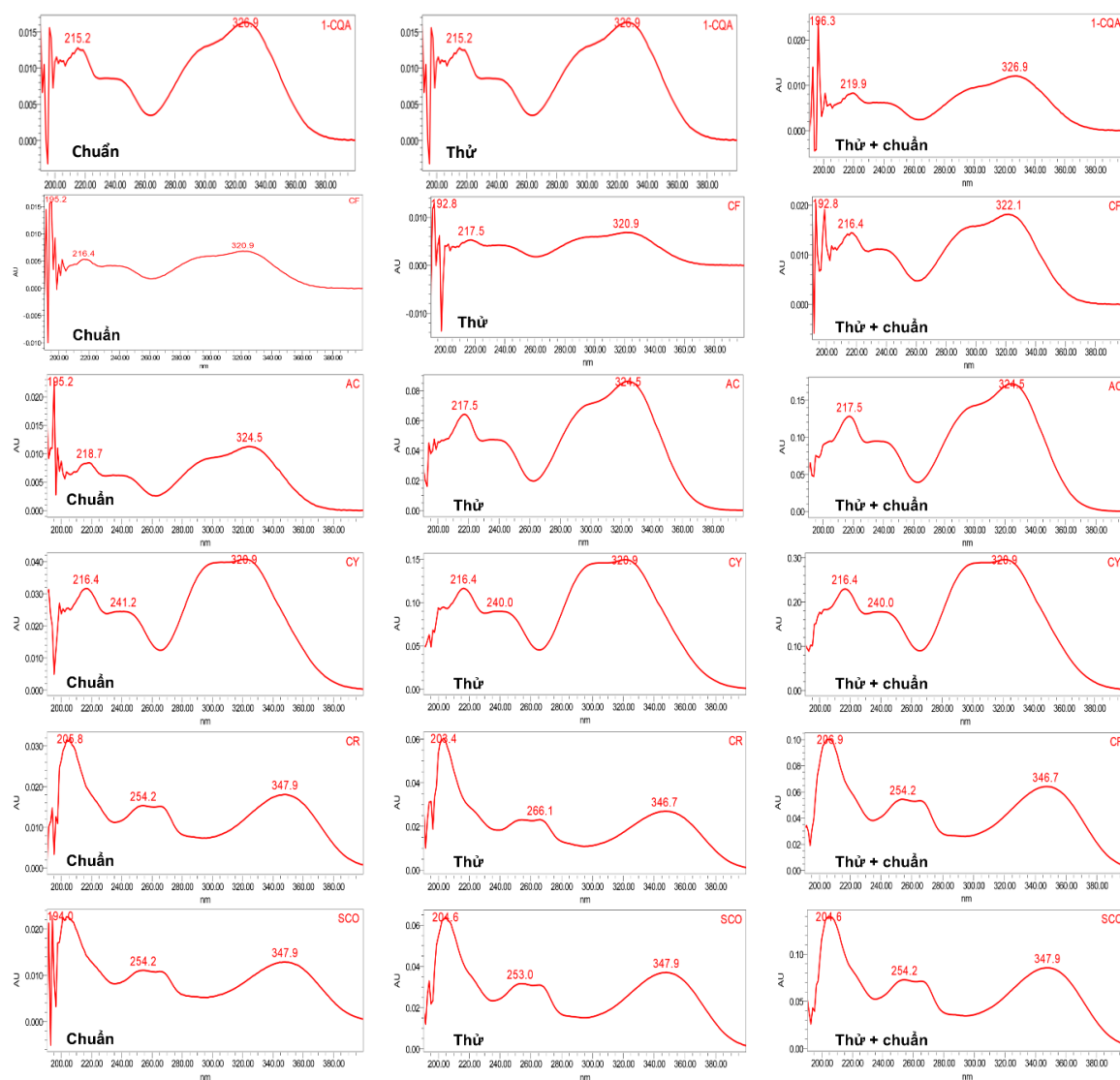
threshold (PT); độ phân giải (Rs) của các pic từ 3,26 – 37,11; hệ số kéo đuôi từ 1,00 – 1,39 và số đĩa lý thuyết (N) từ 5142 – 1211920 (xem **Bảng PL-26**).

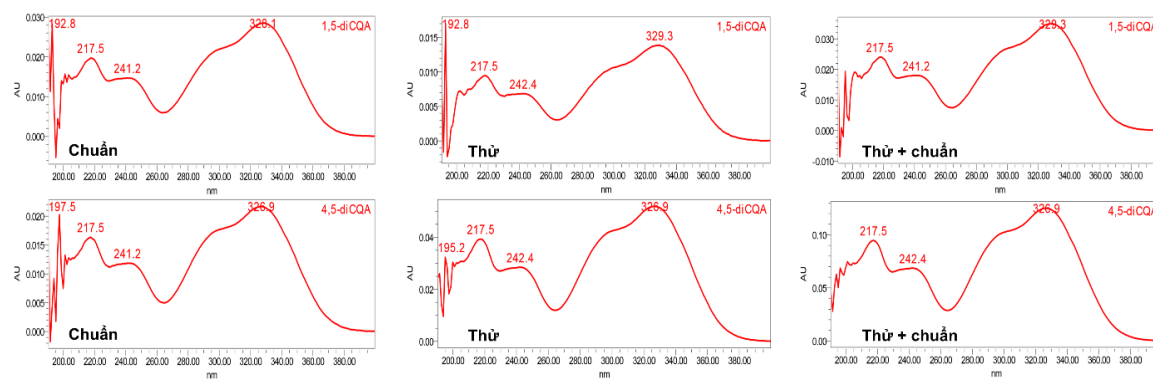
Kết luận: Quy trình định lượng đạt tính tương thích hệ thống.

d. Khảo sát tính chọn lọc

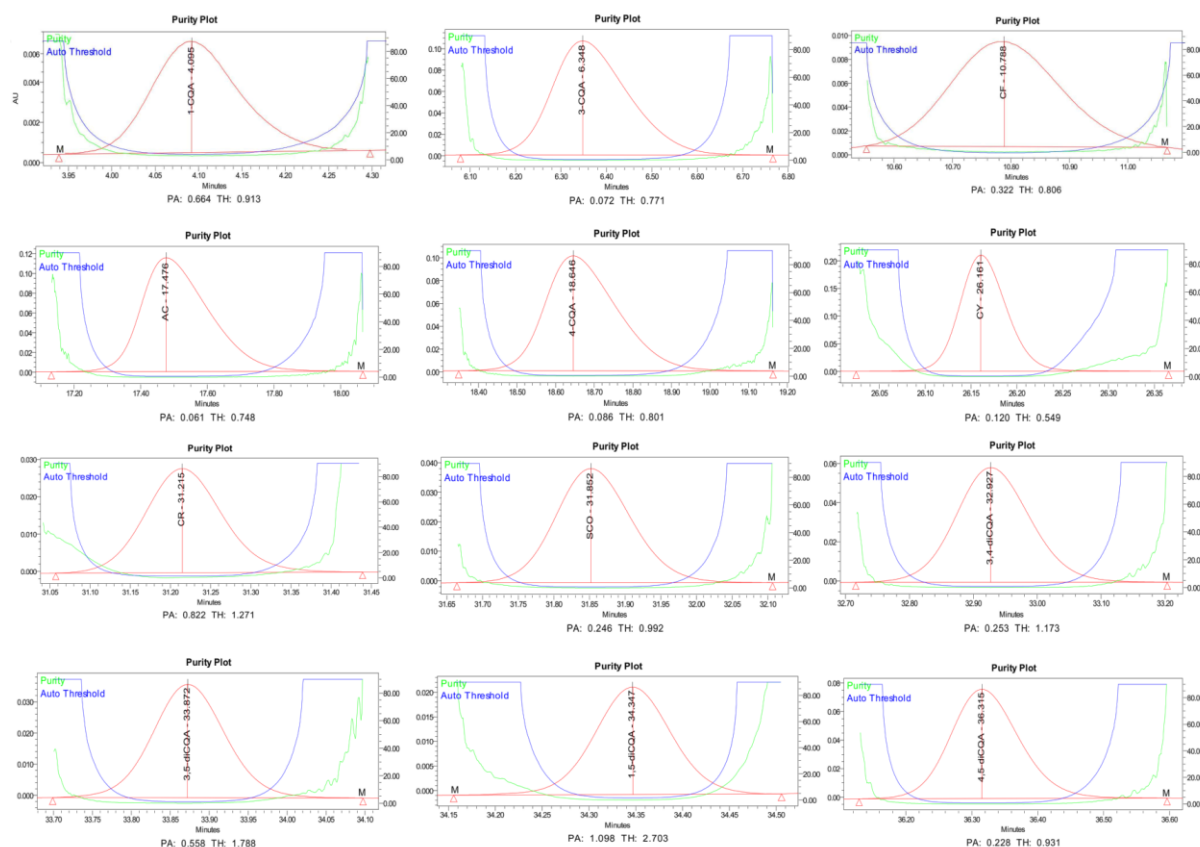


Hình PL-124. Sắc ký đồ khảo sát tính chọn lọc





Hình PL-125. Phổ UV khảo sát tính chọn lọc của các chất trong mẫu thử



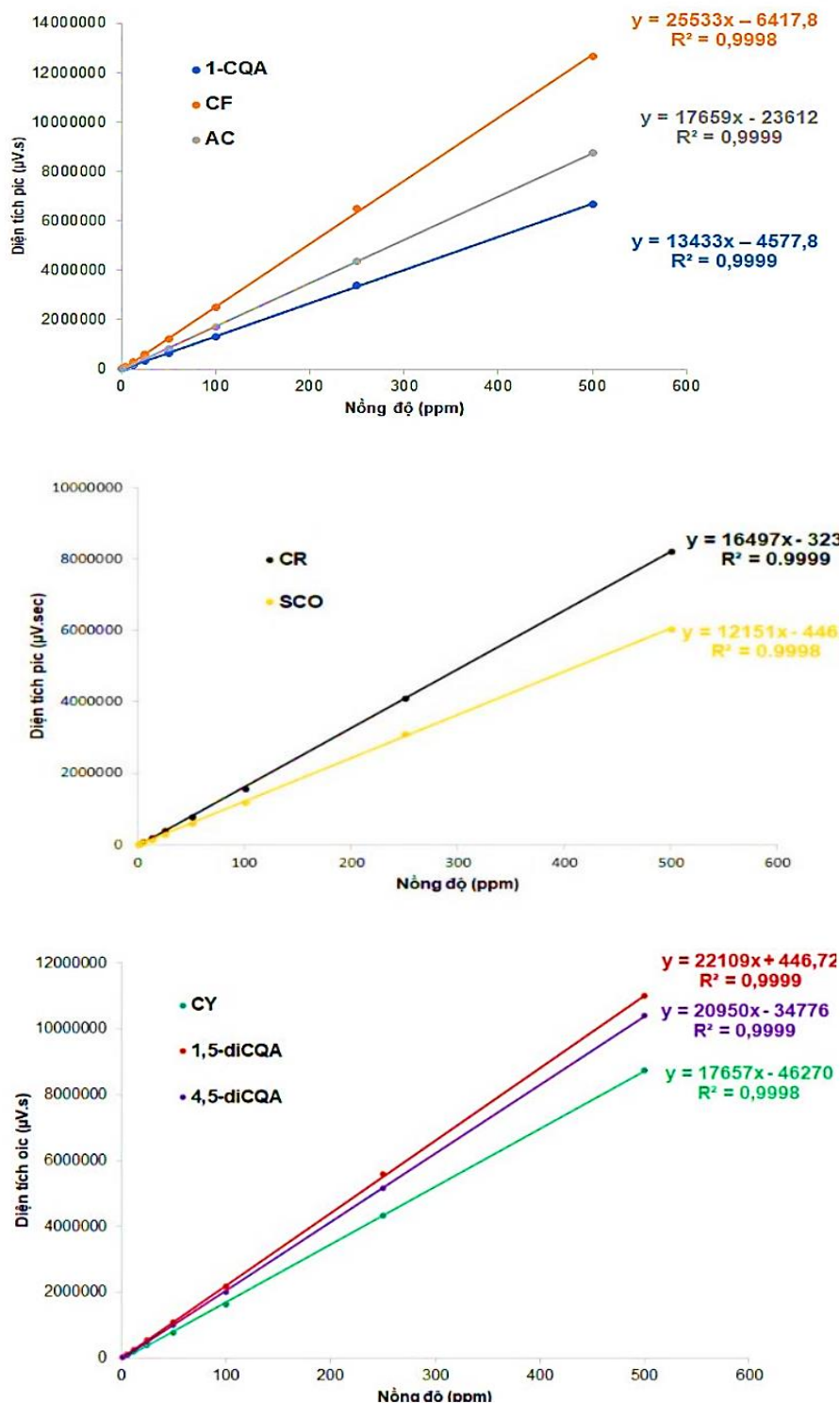
Hình PL-126. Kết quả khảo sát tính chọn lọc của quy trình định lượng 12 polyphenol

Nhận xét:

- Thời gian lưu của 12 pic cần định lượng trong mẫu thử tương đương thời gian lưu của mẫu đối chiếu, đồng thời mẫu trắng không có đỉnh trùng với đỉnh của thành phần cần định lượng (xem **Hình PL-125**)
- Phổ UV của 12 pic định lượng trong mẫu chuẩn, mẫu thử và thử thêm chuẩn tương đương nhau (**Hình PL-126**).
- Khi thêm 1 lượng chất đối chiếu vào mẫu thử, diện tích đỉnh của hợp chất cần định lượng tăng lên so với trước khi thêm chất đối chiếu và pic của chất cần định lượng phải đạt độ tinh khiết pic (**Hình PL-125** và **Hình PL-126**).

Kết luận: Quy trình định lượng đạt tính chọn lọc.

c. Khảo sát khoảng tuyến tính



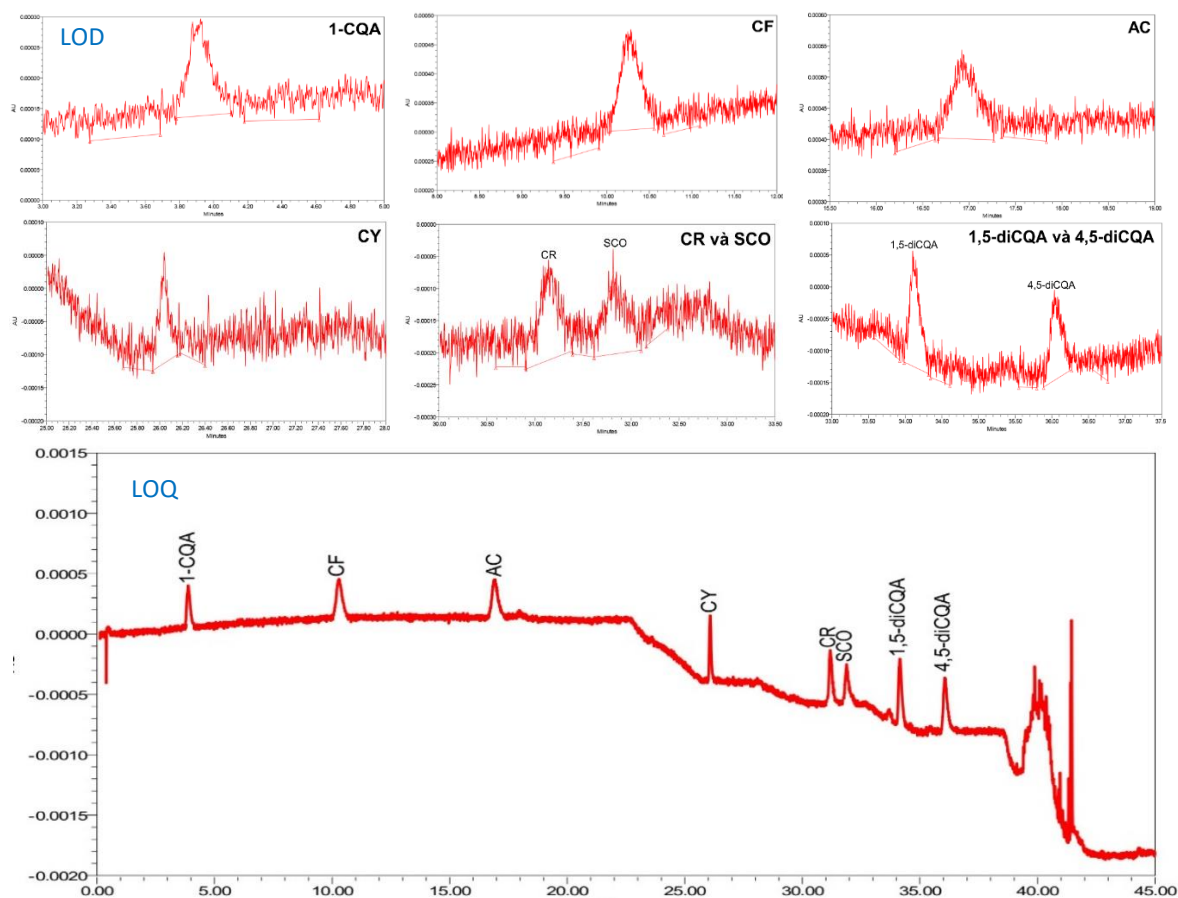
Hình PL-127. Đường tuyến tính của 8 chất đối chiếu dùng để định lượng 12 polyphenol

Nhận xét: Từ kết quả khảo sát khoảng tuyến tính của 8 polyphenol định lượng được trình bày **Hình PL-127** và **Bảng PL-27** có thể thấy 4 chất đối chiếu AC, CY, SCO và CR có tính tuyến tính trong khoảng nồng độ từ 5,0 – 300 ppm.

Bảng PL-27. Tổng hợp kết quả khảo sát đường tuyến tính và phân tích phương trình hồi quy của các chất

Nồng độ (ppm)	1-CQA	CF	AC	CY	CR	SCO	1,5-diCQA	4,5-diCQA
500	6699111	12700380	8802131	8806573	8221800	6040206	11017581	10465954
250	3385042	6513343	4415501	4361589	4107491	3106078	5602279	5169866
100	1327605	2520057	1704258	1621414	1560130	1192687	2216377	2013027
50	660582	1253567	846975	810515	768154	588967	1103964	1006807
25	325561	614745	416129	400720	382011	293511	540297	490165
12.5	162112	300915	202775	197912	182038	141492	267025	240012
5	64560	116137	75915	76533	70904	57275	97565	87519
1	12425	20361	8362	14301	13634	8751	17902	14598
Phương trình tương quan hồi quy	$y = 13433x - 4577,8$	$y = 25533x - 6417,8$	$y = 17659x - 23612$	$y = 17657x - 46270$	$y = 16497x - 32379$	$y = 12151x - 4462$	$y = 22109x + 446,72$	$y = 20950x - 34776$
R²	0,9999	0,9998	0,9999	0,9998	0,9999	0,9998	0,9999	0,9999
F_{0.05}	5,9874							
F	170236,0418	35470,7875	156013,5530	27611,3974	63542,2374	27779,7164	84439,4371	106832,2827
F > F_{0.05}: phương trình tương thích	Tương thích	Tương thích	Tương thích	Tương thích	Tương thích	Tương thích	Tương thích	Tương thích
t_{0.05}	2.4469							
Giá trị t của hệ số a	412,5967	188,3369	394,9855	166,1668	252,0759	166,6725	290,5846	326,8521
t_a > t_{0.05}: a có ý nghĩa	Có ý nghĩa	Có ý nghĩa	Có ý nghĩa	Có ý nghĩa	Có ý nghĩa	Có ý nghĩa	Có ý nghĩa	Có ý nghĩa
Giá trị t của hệ số b	-0,6968	-0,2346	-2,6172	-2,1577	-2,4516	-0,3033	0,0291	-2,6886
t_b < t_{0.05}: b không có ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa	Không ý nghĩa
Kết luận phương trình tuyến tính	y = 13433x	y = 25533x	y = 17659x	y = 17657x	y = 16497x	y = 12151x	y = 22109x	y = 20950x

d. Giới hạn phát hiện (LOD) và giới hạn định lượng (LOQ)



Hình PL-128. Sắc ký đồ của các chất tại LOD và LOQ

Bảng PL-28. Nồng độ của LOD và LOQ của các chất

STT	Hợp chất	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
1	1-O-caffeoylquinic	0,125	0,4125
2	Acid caffeic	0,125	0,4125
3	Acid chlorogenic	0,125	0,4125
4	Cynarin	0,05	0,165
5	Cynarosid	0,0625	0,2063
6	Scolymosid	0,0625	0,2063
7	1,5-dicaffeoylquinic	0,0625	0,2063
8	4,5-dicaffeoylquinic	0,0625	0,2063

^a Giá trị LOQ được suy ra từ LOD

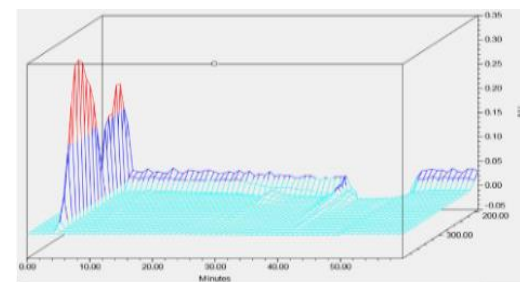
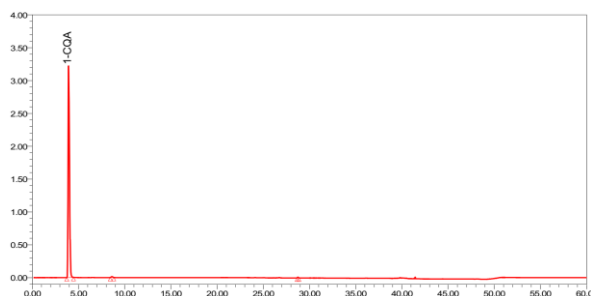
e. Độ tinh khiết của chất đối chiếu

Bảng PL-29. Kết quả độ tinh khiết trên UPLC-PDA của các chất đối chiếu

Chất	^b 1-CQA	^b CF	^a AC	^a CY	^a CR	^b SCO	^b 1,5-diCQA	^b 4,5-diCQA
Độ tinh khiết (%)	99,44	99,21	98,52	93,77	99,35	97,43	96,27	93,48

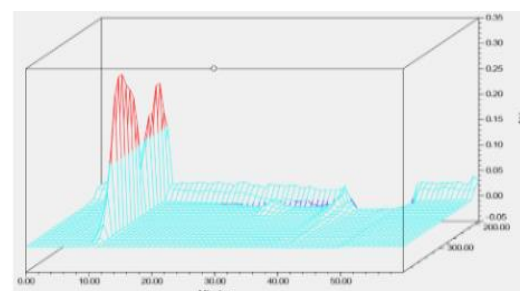
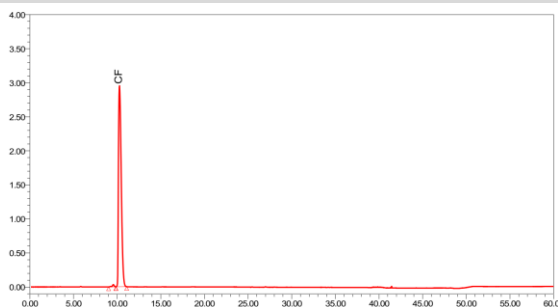
^aĐã được thiết lập CDC ở Mục 3.2.1; ^bĐộ tinh khiết sắc ký (HPLC-PDA)

Acid 1-caffeoylquinic



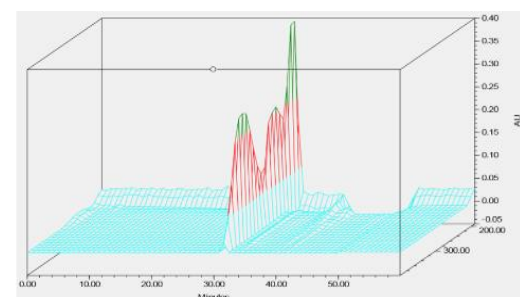
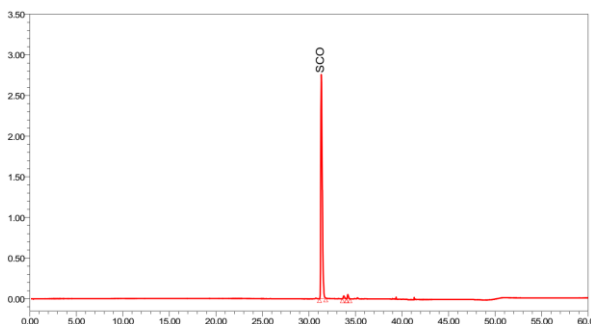
	Name	Retention Time (min)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Area	Height (μV)	Resolution	K Prime	USP Tailing	USP Plate Count
1	1-CQA	3.928	0.664	0.913	33841096	99.44	322078		13.08	1.45	3142
2		8.606	11.857	90.000	131053	0.38	11031	15.40	29.85	1.17	10848
3		28.749	15.630	90.000	59097	0.17	9066	79.82	102.04	1.14	476478

Acid caffeic



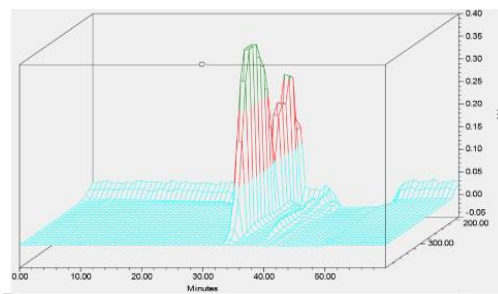
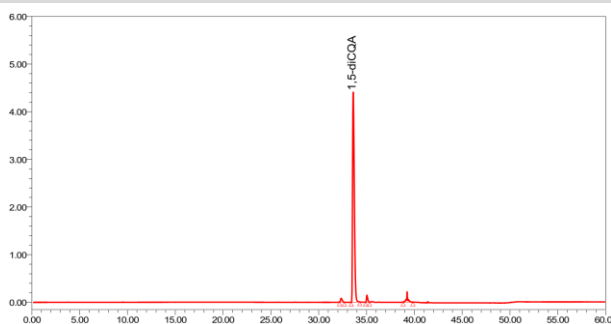
	Name	Retention Time (min)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Area	Height (μV)	Resolution	K Prime	USP Tailing	USP Plate Count
1		9.561	9.332	10.504	512097	0.78	30243		33.27	0.76	10722
2	CF	10.270	0.089	0.328	65110171	99.21	2905225	1.50	35.81	1.28	5061

Scolymosid



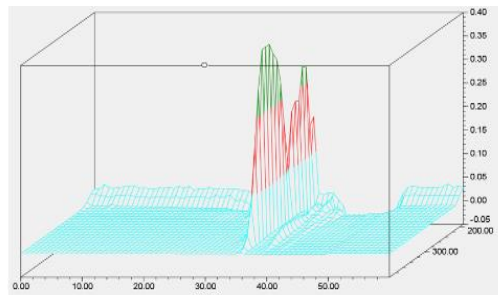
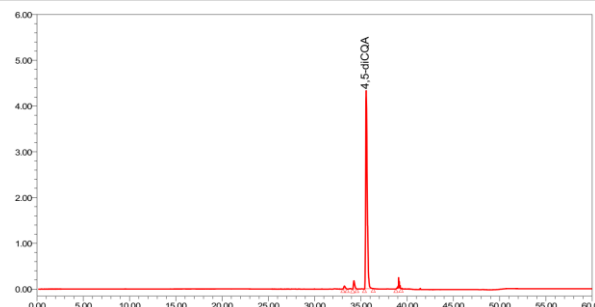
	Name	Retention Time (min)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)	% Area	Height (μV)	Resolution	K Prime	USP Tailing	USP Plate Count
1	SCO	31.328	0.043	0.256	30922737	97.43	2715598		111.29	1.61	173705
2		33.745	1.040	1.361	362180	1.14	31627	8.70	119.95	1.36	235976
3		34.175	1.086	1.318	452013	1.42	51362	1.81	121.49	1.33	363880

Acid 1,5-dicaffeoylquinic



	Name	Retention Time (min)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area (μV*sec)	% Area	Height (μV)	Resolution	K Prime	USP Tailing	USP Plate Count
1		32.357	1.192	1.844	9162307	1.55	812029		114.98	1.39	161971
2	1,5-diCQA	33.607	0.025	0.266	551920575	96.27	41420711	3.82	119.45	1.60	158057
3		35.039	0.893	1.198	12172596	2.06	1412832	5.12	124.59	1.46	374848
4		39.245	14.646	1.610	17102535	2.89	2112368	30.48	139.66	0.94	7130823

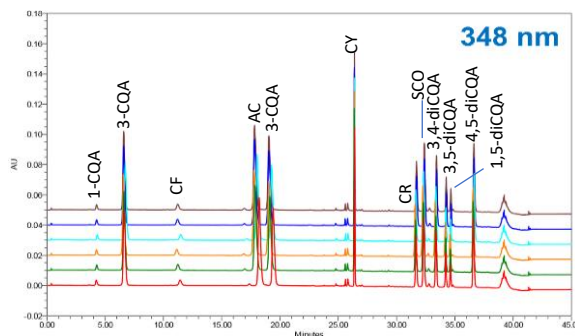
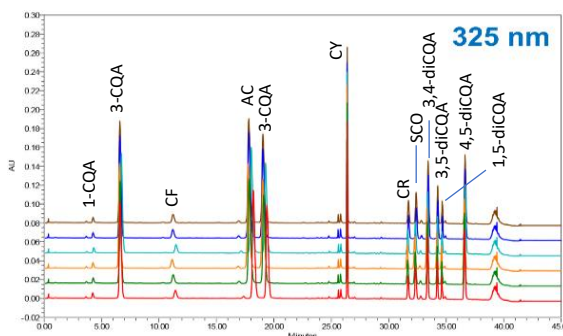
Acid 4,5-dicaffeoylquinic



	Name	Retention Time (min)	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	Area (μV*sec)	% Area	Height (μV)	Resolution	K Prime	USP Tailing	USP Plate Count
1		33.223	0.840	1.181	711564	1.30	61328		118.08	1.34	177364
2		34.248	0.386	0.558	1717886	3.18	118013	3.71	121.75	1.54	265158
3	4,5-diCQA	35.576	0.025	0.243	51163209	93.48	4133094	4.70	126.51	1.75	199956
4		39.083	2.311	0.681	1135747	2.07	241327	19.25	139.08	0.93	7915728

Hình PL-129. Kết quả khảo sát độ tinh khiết của các chất đối chiếu

e. Khảo sát độ lặp lại



Hình PL-130. Sắc ký đồ khảo sát độ lặp lại

Ghi chú: CQA (caffeoylquinic acid); CF (acid caffe); AC (acid chlorogenic); CY (cynarin); SCO (scolymosid); CR (cynarosid)

❖ **Độ lặp lại trong ngày:**

	SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area
1	DLL-2	1-CQA	4.239	45192	1	DLL-2	3-CQA	6.626	1236229	1	DLL-2	CF	11.432	123123	1	DLL-2	AC	18.211	1621101
2	DLL-3	1-CQA	4.275	45125	2	DLL-3	3-CQA	6.614	1244394	2	DLL-3	CF	11.236	125224	2	DLL-3	AC	17.858	1644219
3	DLL-4	1-CQA	4.259	45934	3	DLL-4	3-CQA	6.566	1256788	3	DLL-4	CF	11.140	125668	3	DLL-4	AC	17.769	1648129
4	DLL-6	1-CQA	4.328	45349	4	DLL-6	3-CQA	6.725	1248936	4	DLL-6	CF	11.482	123693	4	DLL-6	AC	18.030	1635204
5	DLL-7	1-CQA	4.266	45369	5	DLL-7	3-CQA	6.594	1234827	5	DLL-7	CF	11.215	125545	5	DLL-7	AC	17.812	1625124
6	DLL-8	1-CQA	4.264	45046	6	DLL-8	3-CQA	6.595	1231393	6	DLL-8	CF	11.230	124782	6	DLL-8	AC	17.818	1606110
Mean			4.272	45336	Mean			6.620	1242093	Mean			11.289	124673	Mean			17.916	1629981
Std. Dev.			0.03	318.96	Std. Dev.			0.06	9692.26	Std. Dev.			0.14	1041.98	Std. Dev.			0.17	15694.72
% RSD			0.71	0.70	% RSD			0.83	0.78	% RSD			1.20	0.84	% RSD			0.95	0.96

	SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area
1	DLL-2	4-CQA	19.406	1311930	1	DLL-2	CY	26.396	754546	1	DLL-2	CR	31.681	198241	1	DLL-2	SCO	32.338	284930
2	DLL-3	4-CQA	19.115	1325005	2	DLL-3	CY	26.363	758917	2	DLL-3	CR	31.641	199012	2	DLL-3	SCO	32.305	290316
3	DLL-4	4-CQA	19.030	1326788	3	DLL-4	CY	26.372	761362	3	DLL-4	CR	31.603	201593	3	DLL-4	SCO	32.257	294363
4	DLL-6	4-CQA	19.272	1322155	4	DLL-6	CY	26.391	757790	4	DLL-6	CR	31.652	198876	4	DLL-6	SCO	32.315	262952
5	DLL-7	4-CQA	19.042	1315253	5	DLL-7	CY	26.378	750959	5	DLL-7	CR	31.723	196925	5	DLL-7	SCO	32.396	282370
6	DLL-8	4-CQA	19.047	1306067	6	DLL-8	CY	26.391	745904	6	DLL-8	CR	31.711	196086	6	DLL-8	SCO	32.379	286787
Mean			19.152	1317866	Mean			26.382	754913	Mean			31.669	198455	Mean			32.332	288620
Std. Dev.			0.15	8127.06	Std. Dev.			0.01	5707.02	Std. Dev.			0.05	1914.78	Std. Dev.			0.05	4704.44
% RSD			0.80	0.62	% RSD			0.05	0.76	% RSD			0.14	0.96	% RSD			0.16	1.63

	SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area
1	DLL-2	3,5-diCQA	33.380	494181	1	DLL-2	3,5-diCQA	34.222	238319	1	DLL-2	1,5-diCQA	34.624	128038	1	DLL-2	4,5-diCQA	36.600	584716
2	DLL-3	3,4-diCQA	33.368	497147	2	DLL-3	3,5-diCQA	34.219	238773	2	DLL-3	1,5-diCQA	34.623	128106	2	DLL-3	4,5-diCQA	36.580	592771
3	DLL-4	3,4-diCQA	33.318	494111	3	DLL-4	3,5-diCQA	34.184	239949	3	DLL-4	1,5-diCQA	34.595	128226	3	DLL-4	4,5-diCQA	36.577	595631
4	DLL-6	3,4-diCQA	33.372	499659	4	DLL-6	3,5-diCQA	34.230	238745	4	DLL-6	1,5-diCQA	34.639	127602	4	DLL-6	4,5-diCQA	36.651	589673
5	DLL-7	3,4-diCQA	33.441	492714	5	DLL-7	3,5-diCQA	34.281	236419	5	DLL-7	1,5-diCQA	34.675	125923	5	DLL-7	4,5-diCQA	36.647	587071
6	DLL-8	3,4-diCQA	33.422	491233	6	DLL-8	3,5-diCQA	34.260	235368	6	DLL-8	1,5-diCQA	34.655	125698	6	DLL-8	4,5-diCQA	36.636	582784
Mean			33.384	494841	Mean			34.233	237928	Mean			34.635	127265	Mean			36.615	588774
Std. Dev.			0.04	3087.23	Std. Dev.			0.03	1700.73	Std. Dev.			0.03	1149.06	Std. Dev.			0.03	4879.56
% RSD			0.13	0.62	% RSD			0.10	0.71	% RSD			0.08	0.90	% RSD			0.09	0.83

Nhận xét: RSD của diện tích pic của 12 pic định lượng đạt từ 0,62 – 0,96 %

❖ **Độ chính xác trung gian:**

	SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area
1	DCXTG-1	1-CQA	3.780	45761	1	DCXTG-1	3-CQA	5.689	1236987	1	DCXTG-1	CF	9.752	121982	1	DCXTG-1	AC	16.111	1622835
2	DCXTG-2	1-CQA	3.779	45589	2	DCXTG-2	3-CQA	5.689	1234196	2	DCXTG-2	CF	9.752	122692	2	DCXTG-2	AC	16.102	1619671
3	DCXTG-3	1-CQA	3.780	45554	3	DCXTG-3	3-CQA	5.696	1233467	3	DCXTG-3	CF	9.786	120410	3	DCXTG-3	AC	16.154	1607374
4	DCXTG-4	1-CQA	3.781	44662	4	DCXTG-4	3-CQA	5.708	1209451	4	DCXTG-4	CF	9.812	117843	4	DCXTG-4	AC	16.294	158949
5	DCXTG-6	1-CQA	3.752	44983	5	DCXTG-6	3-CQA	5.631	1216507	5	DCXTG-6	CF	9.626	119748	5	DCXTG-6	AC	15.910	1590390
6	DCXTG-7	1-CQA	3.748	46048	6	DCXTG-7	3-CQA	5.632	1261595	6	DCXTG-7	CF	9.657	122130	6	DCXTG-7	AC	16.028	1646192
7	DLL-2	1-CQA	4.239	45192	7	DLL-2	3-CQA	6.626	1236229	7	DLL-2	CF	11.432	123123	7	DLL-2	AC	18.211	1621101
8	DLL-3	1-CQA	4.275	45125	8	DLL-3	3-CQA	6.614	1244394	8	DLL-3	CF	11.236	125224	8	DLL-3	AC	17.858	1644219
9	DLL-4	1-CQA	4.259	45934	9	DLL-4	3-CQA	6.566	1256788	9	DLL-4	CF	11.140	125668	9	DLL-4	AC	17.769	1648129
10	DLL-6	1-CQA	4.328	45349	10	DLL-6	3-CQA	6.725	1248936	10	DLL-6	CF	11.482	123693	10	DLL-6	AC	18.030	1635204
11	DLL-7	1-CQA	4.266	45369	11	DLL-7	3-CQA	6.594	1234827	11	DLL-7	CF	11.215	125545	11	DLL-7	AC	17.812	1625124
12	DLL-8	1-CQA	4.264	45046	12	DLL-8	3-CQA	6.595	1231393	12	DLL-8	CF	11.230	124782	12	DLL-8	AC	17.818	1606110
Mean			4.021	45384	Mean			6.147	1237063	Mean			10.510	122737	Mean			17.008	1621358
Std. Dev.			0.26	411.16	Std. Dev.			0.50	14861.37	Std. Dev.			0.82	2470.69	Std. Dev.			0.96	20092.03
% RSD			6.54	0.91	% RSD			8.06	1.20	% RSD			7.81	2.01	% RSD			5.64	1.24

	SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area
1	DCXTG-1	4-CQA	17.160	1313873	1	DCXTG-1	CY	25.899	750175	1	DCXTG-1	CR	30.826	192547	1	DCXTG-1	SCO	31.458	290300
2	DCXTG-2	4-CQA	17.143	1302453	2	DCXTG-2	CY	25.889	748579	2	DCXTG-2	CR	30.813	191047	2	DCXTG-2	SCO	31.447	291978
3	DCXTG-3	4-CQA	17.189	1306128	3	DCXTG-3	CY	25.886	748225	3	DCXTG-3	CR	30.805	191281	3	DCXTG-3	SCO	31.440	291884
4	DCXTG-4	4-CQA	17.344	1283957	4	DCXTG-4	CY	25.945	733960	4	DCXTG-4	CR	30.903	187810	4	DCXTG-4	SCO	31.560	284583
5	DCXTG-6	4-CQA	16.930	1290949	5	DCXTG-6	CY	25.834	734706	5	DCXTG-6	CR	30.716	187545	5	DCXTG-6	SCO	31.343	286359
6	DCXTG-7	4-CQA	17.057	1326800	6	DCXTG-7	CY	25.891	764505	6	DCXTG-7	CR	30.818	196983	6	DCXTG-7	SCO	31.467	297898
7	DLL-2	4-CQA	19.406	1311930	7	DLL-2	CY	26.396	754546	7	DLL-2	CR	31.681	198241	7	DLL-2	SCO	32.338	284930
8	DLL-3	4-CQA	19.115	1325005	8	DLL-3	CY	26.363	758917	8	DLL-3	CR	31.641	199012	8	DLL-3	SCO	32.305	290316
9	DLL-4	4-CQA	19.030	1326788	9	DLL-4	CY	26.372	761362	9	DLL-4	CR	31.603	201593	9	DLL-4	SCO	32.257	294363
10	DLL-6	4-CQA	19.272	1322155	10	DLL-6	CY	26.391	757790	10	DLL-6	CR	31.652	198876	10	DLL-6	SCO	32.315	292952
11	DLL-7	4-CQA	19.042	1315253	11	DLL-7	CY	26.378	750959	11	DLL-7	CR	31.723	196925	11	DLL-7	SCO	32.396	282370
12	DLL-8	4-CQA	19.047	1306067	12	DLL-8	CY	26.391	745904	12	DLL-8	CR	31.711	196086	12	DLL-8	SCO	32.379	286787
Mean			18.145	1310946	Mean			26.136	750802	Mean			31.241	194829	Mean			31.892	289560
Std. Dev.			1.06	13820.72	Std. Dev.			0.26	9566.76	Std. Dev.			0.45	4634.87	Std. Dev.			0.46	4595.47
% RSD			5.85	1.05	% RSD			0.99	1.27	% RSD			1.44	2.38	% RSD			1.45	1.59

	SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area		SampleName	Peak Name	RT	Area
1	DCXTG-1	3,4-diCQA	32.287	485476	1	DCXTG-1	3,5-diCQA	33.340	242715	1	DCXTG-1	1,5-diCQA	33.867	129863	1	DCXTG-1	4,5-diCQA	35.767	577095
2	DCXTG-2	3,4-diCQA	32.274	484930	2	DCXTG-2	3,5-diCQA	33.325	241667	2	DCXTG-2	1,5-diCQA	33.852	129210	2	DCXTG-2	4,5-diCQA	35.754	574328
3	DCXTG-3	3,4-diCQA	32.259	486817	3	DCXTG-3	3,5-diCQA	33.313	241629	3	DCXTG-3	1,5-diCQA	33.843	129105	3	DCXTG-3	4,5-diCQA	35.741	577817
4	DCXTG-4	3,4-diCQA	32.400	474714	4	DCXTG-4	3,5-diCQA	33.433	237402	4	DCXTG-4	1,5-diCQA	33.941	126970	4	DCXTG-4	4,5-diCQA	35.800	571556
5	DCXTG-6	3,4-diCQA	32.144	476207	5	DCXTG-6	3,5-diCQA	33.210	237132	5	DCXTG-6	1,5-diCQA	33.755	126186	5	DCXTG-6	4,5-diCQA	35.661	572926
6	DCXTG-7	3,4-diCQA	32.280	494049	6	DCXTG-7	3,5-diCQA	33.330	245454	6	DCXTG-7	1,5-diCQA	33.851	130674	6	DCXTG-7	4,5-diCQA	35.713	584095
7	DLL-2	3,4-diCQA	33.380	494181	7	DLL-2	3,5-diCQA	34.222	238319	7	DLL-2	1,5-diCQA	34.624	128038	7	DLL-2	4,5-diCQA	36.600	584716
8	DLL-3	3,4-diCQA	33.368	497147	8	DLL-3	3,5-diCQA	34.219	238773	8	DLL-3	1,5-diCQA	34.623	128016	8	DLL-3	4,5-diCQA	36.580	582771
9	DLL-4	3,4-diCQA	33.318	494111	9	DLL-4	3,5-diCQA	34.184	239949	9	DLL-4	1,5-diCQA	34.595	128226	9	DLL-4	4,5-diCQA	36.577	595631
10	DLL-6	3,4-diCQA	33.372	499659	10	DLL-6	3,5-diCQA	34.280	239745	10	DLL-6	1,5-diCQA	34.639	127602	10	DLL-6	4,5-diCQA	36.651	589673
11	DLL-7	3,4-diCQA	33.441	492714	11	DLL-7	3,5-diCQA	34.281	236419	11	DLL-7	1,5-diCQA	34.675	125923	11	DLL-7	4,5-diCQA	36.647	587071
12	DLL-8	3,4-diCQA	33.422	491233	12	DLL-8	3,5-diCQA	34.260	235366	12	DLL-8	1,5-diCQA	34.655	125968	12	DLL-8	4,5-diCQA	36.636	582784
Mean			32.829	489270	Mean			33.779	239464	Mean			34.243	127597	Mean			36.177	582539
Std. Dev.			0.58	7849.96	Std. Dev.			0.48	2927.71	Std. Dev.			0.41	1580.67	Std. Dev.			0.46	7903.62
% RSD			1.78	1.60	% RSD			1.41	1.22	% RSD			1.20	1.24	% RSD			1.27	1.36

Bảng PL-30. Kết quả khảo sát độ lặp lại và hàm lượng của 12 hợp chất polyphenol trong cao khô Actisô

Mẫu	KL cân (mg)	1-CQA	3-CQA	CF	AC	4-CQA	CY	CR	SCO	3,4-diCQA	3,5-diCQA	1,5-diCQA	4,5-diCQA
Diện tích pic (µV.s)													
1	20,01	45192	1236229	123123	1621101	1311930	754546	269651	397532	494181	238319	128038	584716
2	20,01	45125	1244384	125224	1644219	1325005	758917	267712	398115	497147	238773	128106	592771
3	20,02	45934	1256788	125668	1648129	1326788	761362	271580	401193	494111	239949	128226	595631
4	20,08	45349	1248936	123693	1635204	1322155	757790	267577	396529	499659	238745	127602	589673
5	20,05	45369	1234827	125545	1625124	1315253	750959	265062	391608	492714	236419	125923	587071
6	20,00	45046	1231393	124782	1606110	1306067	745904	262922	389683	491233	235366	125698	582784
TB		45336	1242093	124673	1629981	1317866	754913	267417	395777	494841	237929	127266	588774
SD		318,82	9692,16	1042,00	15694,71	8127,03	5706,66	3104,35	4311,90	3067,28	1700,58	1148,77	4879,56
RSD %		0,71	0,78	0,84	0,96	0,62	0,76	0,96	1,63	0,62	0,71	0,90	0,83
Hàm lượng (%)													
1	20,01	0,088	1,819	0,126	2,386	1,931	1,057	0,428	0,841	0,692	0,334	0,143	0,685
2	20,01	0,088	1,831	0,128	2,420	1,950	1,063	0,425	0,842	0,696	0,335	0,143	0,695
3	20,02	0,090	1,849	0,129	2,424	1,952	1,066	0,431	0,848	0,692	0,336	0,143	0,698
4	20,08	0,088	1,832	0,126	2,398	1,939	1,058	0,424	0,836	0,698	0,333	0,142	0,689
5	20,05	0,088	1,814	0,128	2,387	1,932	1,050	0,420	0,827	0,689	0,331	0,140	0,687
6	20,00	0,088	1,813	0,128	2,365	1,923	1,046	0,418	0,825	0,689	0,330	0,140	0,683
TB		0,088	1,826	0,127	2,397	1,938	1,057	0,424	0,837	0,693	0,333	0,142	0,689
SD		0,001	0,014	0,001	0,022	0,011	0,008	0,005	0,009	0,004	0,002	0,001	0,006
RSD%		0,92	0,755	0,960	0,934	0,589	0,717	1,140	1,076	0,530	0,695	1,038	0,849
Phân tích kết quả													
P = 0,95; t = 2,57 Giá trị e là:		0,002	0,035	0,003	0,058	0,029	0,019	0,012	0,023	0,009	0,006	0,004	0,015
Hàm lượng (mg/g)		0,88 ±	18,26±	1,27 ±	23,97 ±	19,38 ±	10,57±	4,24±	8,37 ±	6,93 ±	3,33±	1,42 ±	6,89 ±
TB ± SD		0,01	0,14	0,01	0,22	0,11	0,08	0,05	0,09	0,04	0,02	0,01	0,06

Ghi chú: Giá trị hàm lượng của 3- và 4-CQA được tính theo AC (5-CQA); giá trị hàm lượng của 3,4- và 3,5-diCQA được tính theo CY (1,5-diCQA)

Nhận xét: Độ lặp lại của quy trình định lượng có giá trị RSD % từ 0,54 - 1,17%.

g. Khảo sát độ đúng

Bảng PL-31. Độ đúng của quy trình định lượng 12 polyphenol trong cao khô Actisô

Chất	Chuẩn thêm vào	Lượng sẵn có (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Diện tích pic (µV*s)	Lượng đo được (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Kết quả
Acid 1-caffeoylquinic	80%	0,0177	0,014	82261	0,030	0,0127	89,54	TB: 90,02
		0,0178	0,014	82542	0,031	0,0128	90,06	SD: 0,45
		0,0177	0,014	82529	0,031	0,0128	90,46	RSD%: 0,51
	100%	0,0178	0,018	94084	0,035	0,0170	95,81	TB: 95,22
		0,0178	0,018	93331	0,035	0,0168	94,54	SD: 0,64
		0,0177	0,018	93663	0,035	0,0169	95,33	RSD%: 0,67
	120%	0,0177	0,021	103936	0,038	0,0207	97,47	TB: 100,41
		0,0177	0,021	106479	0,039	0,0217	101,80	SD: 2,54
		0,0178	0,021	106723	0,040	0,0217	101,95	RSD%: 2,53
Acid caffeic	80%	0,0252	0,020	236970	0,046	0,0209	103,53	TB: 103,07
		0,0252	0,020	235717	0,046	0,0206	102,32	SD: 0,65
		0,0252	0,020	236796	0,046	0,0208	103,36	RSD%: 0,63
	100%	0,0252	0,025	266179	0,052	0,0265	105,36	TB: 106,34
		0,0252	0,025	269344	0,052	0,0271	107,59	SD: 0,46
		0,0252	0,025	266856	0,052	0,0267	106,09	RSD%: 0,43
	120%	0,0252	0,030	296315	0,058	0,0324	107,17	TB: 106,11
		0,0252	0,030	293359	0,057	0,0318	105,27	SD: 0,97
		0,0251	0,030	293854	0,057	0,0319	105,88	RSD%: 0,91
Acid chlorogenic	80%	0,4776	0,382	3002851	0,838	0,3600	94,22	TB: 94,75
		0,4776	0,382	3009425	0,839	0,3619	94,70	SD: 0,56
		0,4776	0,382	3018121	0,842	0,3643	95,34	RSD%: 0,59
	100%	0,4776	0,478	3298584	0,920	0,4425	92,65	TB: 91,94
		0,4781	0,478	3274517	0,913	0,4353	91,05	SD: 0,81
		0,4772	0,477	3286322	0,917	0,4396	92,12	RSD%: 0,88
	120%	0,4776	0,573	3652740	1,019	0,5413	94,44	TB: 93,49
		0,4776	0,573	3605469	1,006	0,5281	92,14	SD: 1,20
		0,4769	0,572	3635843	1,014	0,5373	93,89	RSD%: 1,28
Cynarin	80%	0,2105	0,168	1390848	0,369	0,1588	94,27	TB: 95,61
		0,2105	0,168	1403540	0,373	0,1621	96,27	SD: 0,16
		0,2105	0,168	1403627	0,373	0,1622	96,29	RSD%: 1,21
	100%	0,2105	0,211	1559521	0,414	0,2036	96,69	TB: 96,12
		0,2107	0,211	1561653	0,415	0,2039	96,76	SD: 1,06
		0,2103	0,210	1543785	0,410	0,1996	94,90	RSD%: 1,10
	120%	0,2105	0,253	1701061	0,452	0,2412	95,45	TB: 95,66
		0,2105	0,253	1707169	0,453	0,2428	96,09	SD: 0,37
		0,2102	0,252	1698402	0,451	0,2408	95,44	RSD%: 0,39
Cynarosid	80%	0,0850	0,068	493863	0,149	0,0637	107,05	TB: 91,40
		0,0850	0,068	489314	0,147	0,0624	91,74	SD: 2,54
		0,0850	0,068	482461	0,145	0,0603	88,71	RSD%: 2,78
	100%	0,0850	0,085	543790	0,164	0,0788	92,70	TB: 94,40
		0,0851	0,085	554114	0,167	0,0818	96,16	SD: 1,73
		0,0849	0,085	547902	0,165	0,0801	94,35	RSD%: 1,83
	120%	0,0850	0,102	599388	0,180	0,0955	93,67	TB: 95,09
		0,0850	0,102	610421	0,184	0,0988	96,93	SD: 1,66
		0,0848	0,102	601940	0,181	0,0964	94,69	RSD%: 1,75

Chất	Chuẩn thêm vào	Lượng sẵn có (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Diện tích pic ($\mu V*s$)	Lượng đo được (mg)	Lượng thêm vào (mg)	Tỷ lệ phục hồi (%)	Kết quả
Scolymosid	80%	0,1641	0,131	744482	0,299	0,1344	102,34	TB: 102,81
		0,1641	0,131	747901	0,300	0,1357	103,39	SD: 0,53
		0,1641	0,131	745699	0,299	0,1349	102,71	RSD%: 0,51
	100%	0,1641	0,164	838422	0,336	0,1720	104,82	TB: 103,57
		0,1643	0,164	825868	0,331	0,1668	101,56	SD: 1,76
		0,1640	0,164	835597	0,335	0,1711	104,34	RSD%: 1,70
	120%	0,1641	0,197	933947	0,374	0,2103	106,80	TB: 105,07
		0,1641	0,197	916378	0,367	0,2033	103,22	SD: 1,79
		0,1639	0,197	924609	0,371	0,2068	105,18	RSD%: 1,70
1,5-diCQA	80%	0,0285	0,023	236575	0,050	0,0214	93,82	TB: 94,88
		0,0285	0,023	238978	0,050	0,0219	96,05	SD: 1,11
		0,0285	0,023	237591	0,050	0,0216	94,76	RSD%: 1,17
	100%	0,0285	0,029	268310	0,057	0,0281	98,54	TB: 97,90
		0,0286	0,029	266787	0,056	0,0278	97,22	SD: 0,66
		0,0285	0,029	267241	0,056	0,0279	97,95	RSD%: 0,68
	120%	0,0285	0,034	297921	0,063	0,0344	100,38	TB: 101,07
		0,0285	0,034	299799	0,063	0,0348	101,54	SD: 0,61
		0,0285	0,034	298949	0,063	0,0346	101,29	RSD%: 0,60
4,5-diCQA	80%	0,1366	0,109	1062099	0,236	0,0993	90,81	TB: 91,74
		0,1366	0,109	1061505	0,236	0,0991	90,69	SD: 1,71
		0,1366	0,109	1076406	0,239	0,1024	93,71	RSD%: 1,87
	100%	0,1366	0,137	1192277	0,265	0,1282	93,81	TB: 95,26
		0,1368	0,137	1206039	0,268	0,1311	95,85	SD: 1,26
		0,1365	0,136	1205323	0,268	0,1312	96,12	RSD%: 1,33
	120%	0,1366	0,164	1293225	0,287	0,1506	91,85	TB: 92,59
		0,1366	0,164	1300013	0,289	0,1521	92,77	SD: 0,67
		0,1364	0,164	1301015	0,289	0,1525	93,17	RSD%: 0,73

Nhận xét: Quy trình định lượng có độ phục hồi của 8 hợp chất polyphenol như sau

- Acid 1-caffeoylquinic: 90,0 - 100,4% (RSD = 0,5 - 2,5 %)
- Acid caffeic: 103,1 - 106,3 % (RSD = 0,4 - 0,9 %)
- Acid chlorogenic: 91,9 - 94,7 % (RSD = 0,6 - 1,3 %)
- Cynarin: 95,6 - 96,1 % (RSD = 0,4 - 1,2 %)
- Cynarosid: 91,4 - 95,1 % (RSD = 1,7 - 2,8 %)
- Scolymosid: 102,8 - 105,1 % (RSD = 0,5 - 1,7 %)
- Acid 1,5-dicafeoylquinic: 94,9 - 101,1 % (RSD = 0,6 - 1,2 %)
- Acid 4,5-di-cafeoylquinic: 91,7 - 95,3 % (RSD = 0,7 - 1,9 %)

ĐỘ ĐÚNG CỦA QUY TRÌNH ĐỊNH LƯỢNG 12 POLYPHENOL

Tỉ lệ thêm vào 80 %

325 nm

Peak Name: 1-CQA											
	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	USP Tailing	USP Plate Count	
1	80%-1	1-CQA	1	0.525	25.848	3.973	82261	13.24	1.25	3527	
2	80%-2	1-CQA	1	0.532	28.848	3.825	82542	12.71	1.26	3770	
3	80%-3	1-CQA	1	0.595	29.241	3.866	82529	12.86	1.21	3947	
Mean						3.888	82444				
Std. Dev.						0.08	158.87				
% RSD						1.97	0.19				

Peak Name: CF											
	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	CF	1	0.256	14.188	10.249	236970	35.73	10.72	1.21	9473
2	80%-2	CF	1	0.291	16.107	9.876	235717	34.40	11.03	1.18	9384
3	80%-3	CF	1	0.333	16.691	9.958	236796	34.69	11.07	1.21	9401
Mean						10.028	236494				
Std. Dev.						0.20	678.78				
% RSD						1.95	0.29				

Peak Name: AC											
	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	AC	1	0.033	1.640	16.542	3002851	58.29	13.72	1.51	17831
2	80%-2	AC	1	0.031	1.976	16.153	3009425	56.90	13.77	1.52	16568
3	80%-3	AC	1	0.035	1.955	16.218	3018121	57.13	13.66	1.51	16704
Mean						16.304	3010132				
Std. Dev.						0.21	7659.77				
% RSD						1.28	0.25				

Peak Name: CY											
	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	CY	1	0.027	1.094	25.977	1390848	92.11	29.21	1.34	700118
2	80%-2	CY	1	0.028	1.276	25.957	1403540	92.04	30.19	1.34	696676
3	80%-3	CY	1	0.026	1.282	25.960	1403627	92.05	29.91	1.34	702422
Mean						25.964	1399338				
Std. Dev.						0.01	7352.71				
% RSD						0.04	0.53				

Peak Name: 1,5-diCQA											
	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	1,5-diCQA	1	0.159	8.144	33.975	236575	120.78	2.00	1.25	345164
2	80%-2	1,5-diCQA	1	0.153	10.034	34.023	238978	120.94	2.01	1.25	357656
3	80%-3	1,5-diCQA	1	0.159	10.262	34.006	237591	120.88	2.00	1.25	351830
Mean						34.001	237715				
Std. Dev.						0.02	1206.42				
% RSD						0.07	0.51				

Peak Name: 4,5-diCQA											
	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	4,5-diCQA	1	0.054	2.410	35.866	1062099	127.55	7.80	1.42	300865
2	80%-2	4,5-diCQA	1	0.054	3.108	35.916	1061505	127.73	7.80	1.41	290626
3	80%-3	4,5-diCQA	1	0.051	2.827	35.906	1076406	127.69	7.86	1.40	300355
Mean						35.896	1066670				
Std. Dev.						0.03	8436.83				
% RSD						0.07	0.79				

349 nm

Peak Name: CR											
	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	CR	1	0.167	4.976	31.016	493863	110.17	28.00	1.31	265930
2	80%-2	CR	1	0.179	6.604	31.043	489314	110.27	28.03	1.31	260693
3	80%-3	CR	1	0.180	6.857	31.024	482461	110.20	28.16	1.31	264353
Mean						31.028	488546				
Std. Dev.						0.01	5739.666				
% RSD						0.04	1.17				

Peak Name: SCO											
	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	80%-1	SCO	1	0.967	4.199	31.694	744482	112.60	2.71	1.38	223976
2	80%-2	SCO	1	0.985	5.099	31.729	747901	112.73	2.73	1.39	223837
3	80%-3	SCO	1	0.979	5.051	31.706	745699	112.64	2.72	1.39	222477
Mean						31.710	746028				
Std. Dev.						0.02	1733.05				
% RSD						0.06	0.23				

Tỉ lệ thêm vào 100 %

325 nm

Peak Name: 1-CQA

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	1-CQA	1	0.470	29.430	3.834	94084	12.74	1.27	3809
2	100%-2	1-CQA	1	0.467	29.835	3.828	93331	12.72	1.26	3849
3	100%-3	1-CQA	1	0.484	30.378	3.825	93663	12.71	1.28	3733
Mean						3.829	93693			
Std. Dev.						0.00	377.46			
% RSD						0.11	0.40			

Peak Name: CF

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	CF	1	0.299	16.404	9.871	266179	34.38	10.95	1.21	9209
2	100%-2	CF	1	0.272	16.557	9.836	269344	34.25	10.96	1.20	9045
3	100%-3	CF	1	0.304	16.396	9.836	268656	34.25	10.98	1.23	9191
Mean						9.848	267460				
Std. Dev.						0.02	1666.40				
% RSD						0.21	0.62				

Peak Name: AC

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	AC	1	0.032	2.096	16.098	3298584	56.70	13.41	1.53	15609
2	100%-2	AC	1	0.030	2.104	16.083	3274517	56.64	13.37	1.53	15176
3	100%-3	AC	1	0.031	2.028	16.059	3286322	56.56	13.44	1.55	15541
Mean						16.080	3286474				
Std. Dev.						0.02	12034.02				
% RSD						0.12	0.37				

Peak Name: CY

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	CY	1	0.026	1.301	25.941	1559521	91.98	29.80	1.35	700755
2	100%-2	CY	1	0.024	1.280	25.949	1561653	92.01	29.86	1.36	697981
3	100%-3	CY	1	0.026	1.300	25.944	1543785	91.99	30.03	1.35	696785
Mean						25.945	1554986				
Std. Dev.						0.00	9759.39				
% RSD						0.02	0.63				

Peak Name: 1,5-diCQA

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	1,5-diCQA	1	0.142	10.019	33.979	268310	120.79	2.01	1.24	342931
2	100%-2	1,5-diCQA	1	0.141	10.289	33.937	266787	120.64	1.98	1.24	333012
3	100%-3	1,5-diCQA	1	0.144	9.941	33.980	267241	120.79	1.99	1.24	342564
Mean						33.965	267446				
Std. Dev.						0.02	782.28				
% RSD						0.07	0.29				

Peak Name: 4,5-diCQA

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	4,5-diCQA	1	0.049	2.840	35.875	1192277	127.58	7.80	1.42	299498
2	100%-2	4,5-diCQA	1	0.048	2.806	35.812	1206039	127.36	7.67	1.41	299814
3	100%-3	4,5-diCQA	1	0.047	2.815	35.869	1205323	127.56	7.76	1.42	297925
Mean						35.852	1201213				
Std. Dev.						0.03	7747.30				
% RSD						0.10	0.64				

Peak Name: CR

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	CR	1	0.165	6.491	31.003	543790	110.12	28.20	1.30	268270
2	100%-2	CR	1	0.167	6.208	30.985	554114	110.06	28.05	1.30	270159
3	100%-3	CR	1	0.164	6.579	31.004	547902	110.13	28.15	1.31	266430
Mean						30.997	548602				
Std. Dev.						0.01	5197.17				
% RSD						0.03	0.95				

Peak Name: SCO

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	100%-1	SCO	1	0.895	4.963	31.677	838422	112.54	2.71	1.38	226539
2	100%-2	SCO	1	0.897	4.954	31.649	825868	112.44	2.68	1.38	228333
3	100%-3	SCO	1	0.886	5.062	31.679	835597	112.54	2.70	1.38	224612
Mean						31.668	833296				
Std. Dev.						0.02	6586.04				
% RSD						0.05	0.79				

349 nm

Tỉ lệ thêm vào 120 %

325 nm

Peak Name: 1-CQA

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	1-CQA	1	0.429	28.050	3.836	103936	12.75	1.23	3829
2	120%-2	1-CQA	1	0.398	29.019	3.815	106479	12.68	1.26	3650
3	120%-3	1-CQA	1	0.424	29.563	3.912	106723	13.02	1.22	3394
Mean						3.855	105713			
Std. Dev.						0.05	1543.57			
% RSD						1.32	1.46			

Peak Name: CF

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	CF	1	0.238	17.407	9.874	296315	34.39	10.96	1.22	9140
2	120%-2	CF	1	0.261	17.672	9.804	293359	34.14	10.78	1.23	8879
3	120%-3	CF	1	0.244	17.448	10.384	293854	36.22	10.57	1.21	8628
Mean						10.020	294509				
Std. Dev.						0.32	1583.36				
% RSD						3.16	0.54				

Peak Name: AC

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	AC	1	0.028	2.130	16.083	3652740	56.64	13.19	1.55	14769
2	120%-2	AC	1	0.028	2.11E	16.015	3605469	56.40	13.29	1.56	15040
3	120%-3	AC	1	0.033	2.016	17.054	3635843	60.12	13.79	1.55	17272
Mean						16.384	3631351				
Std. Dev.						0.58	23953.31				
% RSD						3.55	0.66				

Peak Name: CY

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	CY	1	0.026	1.404	25.952	1701061	92.02	29.84	1.36	683265
2	120%-2	CY	1	0.022	1.397	25.948	1707169	92.00	30.15	1.36	687053
3	120%-3	CY	1	0.027	1.283	25.949	1698402	92.01	27.74	1.35	705453
Mean						25.950	1702210				
Std. Dev.						0.00	4495.02				
% RSD						0.01	0.26				

Peak Name: 1,5-diCQA

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	1,5-diCQA	1	0.122	9.970	33.999	297921	120.86	1.99	1.24	352335
2	120%-2	1,5-diCQA	1	0.127	10.271	33.989	299799	120.82	1.99	1.24	348334
3	120%-3	1,5-diCQA	1	0.131	10.339	33.831	298949	120.26	1.99	1.25	299697
Mean						33.940	298889				
Std. Dev.						0.09	940.51				
% RSD						0.28	0.31				

Peak Name: 4,5-diCQA

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	4,5-diCQA	1	0.048	2.955	35.886	1293225	127.62	7.77	1.41	297237
2	120%-2	4,5-diCQA	1	0.041	3.040	35.876	1300013	127.59	7.77	1.41	298996
3	120%-3	4,5-diCQA	1	0.049	2.820	35.719	1301015	127.03	7.57	1.42	302440
Mean						35.827	1298084				
Std. Dev.						0.09	4237.91				
% RSD						0.26	0.33				

Peak Name: CR

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	CR	1	0.156	6.675	31.028	599388	110.21	27.90	1.30	262508
2	120%-2	CR	1	0.144	6.506	31.023	610421	110.19	27.97	1.31	263486
3	120%-3	CR	1	0.148	6.231	30.878	601940	109.68	27.81	1.33	275070
Mean						30.976	603916				
Std. Dev.						0.08	5775.64				
% RSD						0.27	0.96				

Peak Name: SCO

	SampleName	Peak Name	Injection	Purity1 Angle	Purity1 Threshold	RT	Area	K Prime	Resolution	USP Tailing	USP Plate Count
1	120%-1	SCO	1	0.813	5.243	31.700	933947	112.62	2.68	1.40	225269
2	120%-2	SCO	1	0.805	5.296	31.696	916378	112.61	2.68	1.39	224596
3	120%-3	SCO	1	0.791	4.644	31.524	924609	111.96	2.65	1.38	236741
Mean						31.640	924978				
Std. Dev.						0.10	8790.18				
% RSD						0.32	0.95				

349 nm

Phụ lục 51. NGUYÊN LIỆU DÙNG TRONG NGHIÊN CỨU ĐỘNG THÁI TÍCH LŨY

Nguyên liệu (Các bộ phận dùng của cây Actisô)



Lá tươi



Phiến lá khô



Thân và rễ



Giống xanh (AX)



Giống tím (AT)

Hoa

Phụ lục 52. ĐỊNH LƯỢNG CÁC CHẾ PHẨM TRÀ TÚI LỌC ACTISÔ**Thông tin các chế phẩm trong nước****Bảng PL-32. Một số chế phẩm trà túi lọc trên thị trường Việt Nam**

STT	Chế phẩm	Kí hiệu	Độ ẩm	Thành phần
1	HP	Tr1	12,16	Lá Actisô
2	HD	Tr2	8,57	70 % Actisô, 30 % Sâm
3	DG	Tr3	5,26	Actisô, Cỏ ngọt 5 %
4	VT	Tr4	7,06	Actisô (40 % rễ, 40 % thân, 10 % hoa), Cam thảo
5	LDX	Tr5	6,52	Lá Actisô
6	LDD	Tr6	7,54	Cao Actisô, Lá Actisô, Thảo quyết minh
7	TC	Tr7	7,09	Hoa Actisô
8	TA	Tr8	7,69	60 % Hoa, 20 % thân, 20 % rễ Actisô
9	BC	Tr9	6,93	Rễ, thân Actisô
10	TB	Tr10	6,18	Actisô (Thân, lá 50 %, rễ 35 %, hoa 7 %), Cỏ ngọt 8 %

Bảng PL-33. Một số chế phẩm từ Actisô trên thị trường

STT	Chế phẩm	Kí hiệu	Độ ẩm	Dạng bào chế Quy cách đóng gói	Thành phần	Năm sx
1	JF	N.CP1	5,15	Viên nang cứng 180 viên/chai	500 mg cao Actisô, tá dược	2019
2	SL	N.CP2	5,16	Viên nang cứng 180 viên/chai	600 mg cao Actisô, tá dược	2018
3	RP	N.CP3	5,65	Viên bao đường 245 mg 30 viên x 2 vỉ	200 mg cao Actisô, tá dược	2017
4	COV	N.CP4	5,62	Viên bao đường 245 mg 30 viên x 2 vỉ	200 mg cao chiết Actisô, tá dược	2019
5	HD	N.CP5	6,45	Nang cứng	350 mg cao Actisô	2020
6	LW	N.CP6	3,28	Nang cứng	700 mg cao Actisô	2021
7	BT	N.CP7	2,45	Nang cứng	550 mg cao Actisô	2020
8	HB	N.CP8	5,36	Nang cứng	400 mg cao Actisô	2019
9	CI	V.CP9	3,08	Viên bao 245 mg Lọ 60 viên	Cao khô Actisô 100 mg Cao khô Chi tử 100 mg Cao khô Mã đề 100 mg	2019
10	HG	V.CP10	5,96	Ống uống 10 ống x 10 ml	Cao khô Actisô 280mg Tá dược vừa đủ 10 ml	2020
11	ND	V.CP11	2,06	Ống uống 10 ống x 10 ml	100% cao lòng Actisô	2020
12	TU	V.CP12	2,68	Ống uống 10 ống x 10 ml	Cao đặc Lá Atisô 900 mg Nước vừa đủ 10 ml	2020
13	LDO	V.CP13	2,78	Ống uống 10 ống x 10 ml	Cao đặc thân, rễ Actisô 300 mg Cao đặc Lá Actisô 200 mg Phụ liệu (Cỏ ngọt, nước) vđ 10 ml	2019
14	LDU	V.CP14		Ống uống 10 ống x 10 ml	Cao đặc Actisô 0,2 g Tá dược vừa đủ 10 ml	2020
15	LDD	V.CP15	11,29	Cao đặc. Gói 100 g	Cao đặc 100%	2019
16	TPM	V.CP16	11,59	Cao mềm. Lọ 130 g	Lá tươi Actisô 23,34g Cỏ ngọt 0,20g. Phụ liệu	2020
17	L1	NC.CP17	8,42	Viên bao phim 375 mg	Cao khô Actisô 200mg Tá dược vừa đủ 1 viên	2016
18	L2	NC.CP18	8,47			2016
19	L3	NC.CP19	8,04			2016

Phụ lục 53. THÔNG TIN CHẾ PHẨM NƯỚC NGOÀI CHỨA CAO ACTISÔ

Thông tin các chế phẩm nước ngoài



Ký hiệu: **N.CP1**

NSX: Mỹ

Quy cách: Viên nang cứng

Thành phần: 500 mg cao Actisô

Hàm lượng: 5 % CQA toàn phần

Liều dùng: 1 viên/ngày



Ký hiệu: **N.CP2**

NSX: Mỹ

Quy cách: Viên nang cứng

Thành phần: 600 mg cao Actisô

Hàm lượng: 5 % CQA toàn phần

Liều dùng: 2 viên/ngày



Ký hiệu: **N.CP3 và N.CP4**

NSX: Pháp (mua tại Pháp-CP3; mua tại Việt Nam-CP4)

Quy cách: Viên bao đường

Thành phần: 200 mg cao Actisô

Liều dùng: 3 - 6 viên/ngày



Ký hiệu: **N.CP5**

NSX: Đức

Quy cách: Viên nang cứng

Thành phần: 350 mg cao Actisô

Hàm lượng: 2,5 % cynarin

Liều dùng: 3 viên/ngày



Ký hiệu: **N.CP6**

NSX: Đức

Quy cách: Viên nang cứng

Thành phần: 700 mg cao Actisô

Hàm lượng: 2,5 % cynarin

Liều dùng: 2 viên/ngày



Ký hiệu: **N.CP7**

NSX: Đức

Quy cách: Viên nang cứng

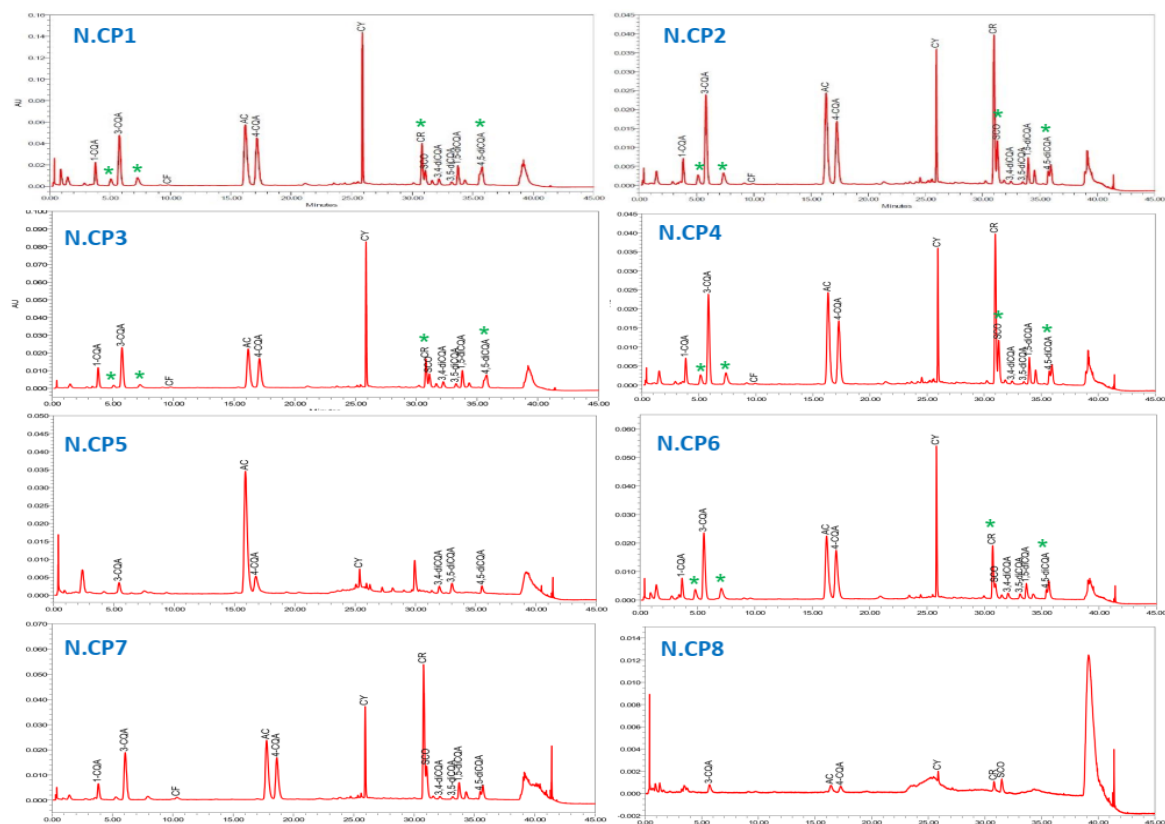
Thành phần: 350 mg cao Actisô

Hàm lượng: 2,5 % cynarin

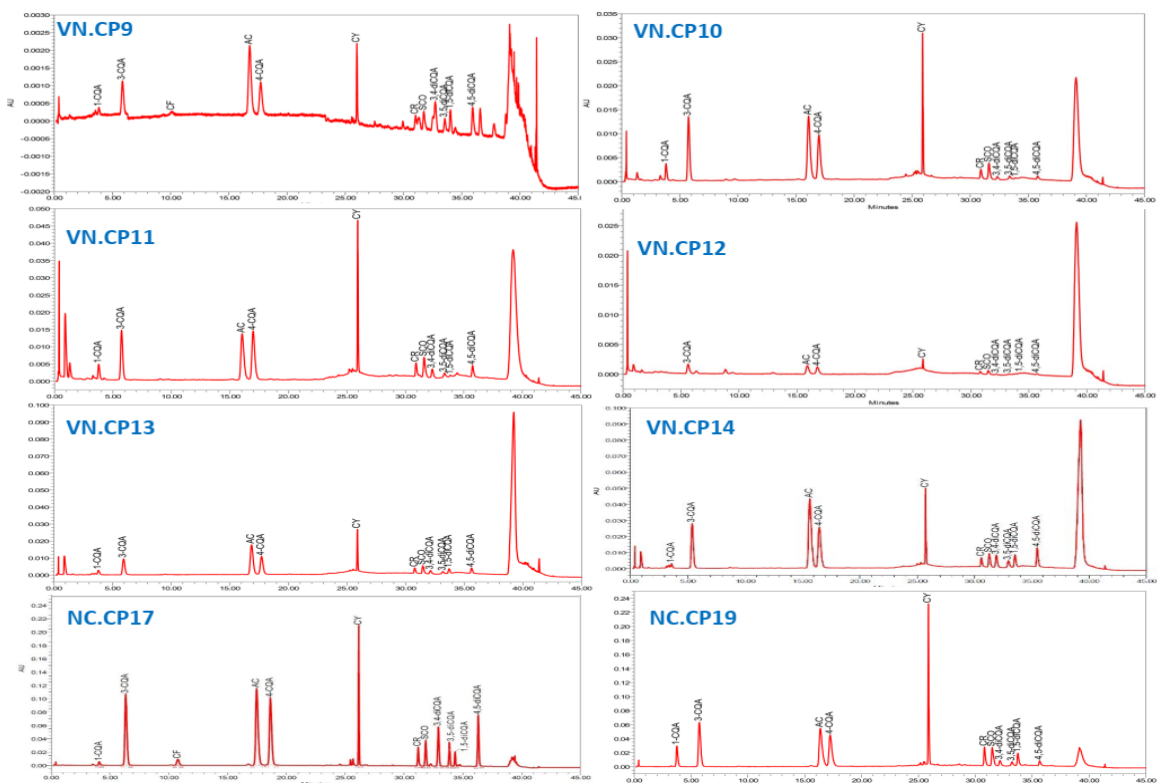
Liều dùng: 3 viên/ngày

Phụ lục 54. SKĐ ĐỊNH LƯỢNG CHẾ PHẨM CHỨA CAO CHIẾT ACTISÔ

✓ Các chế phẩm nước ngoài (N.CP1 – N.CP8)

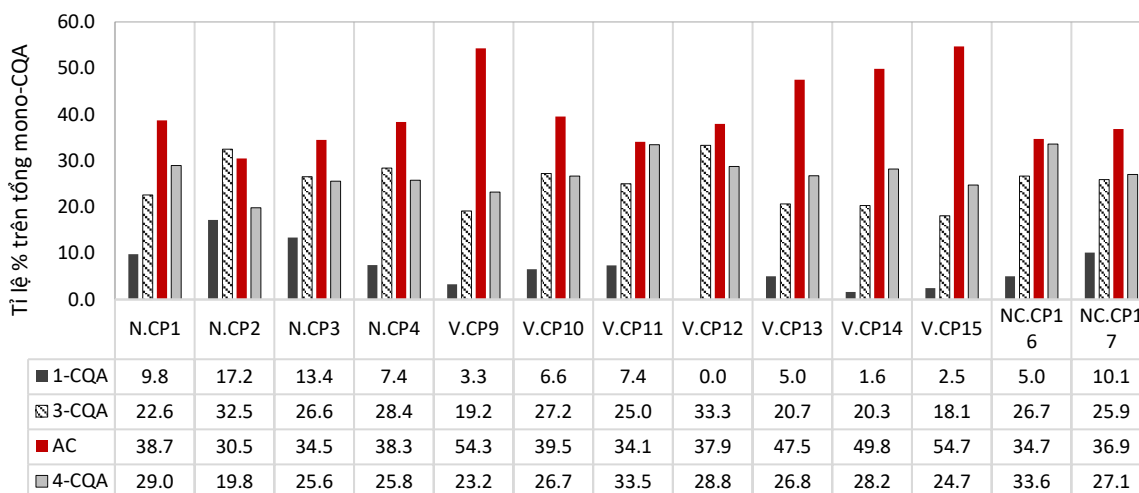


✓ Các chế phẩm trong nước (V.CP9 – 14) và 2 chế phẩm nghiên cứu

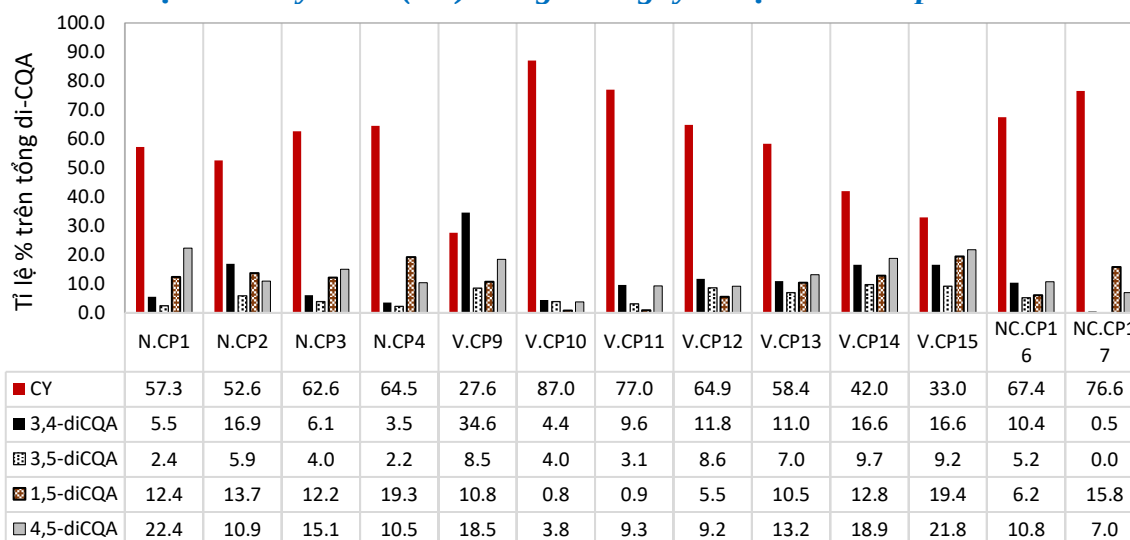


Phụ lục 55. ĐỊNH LƯỢNG POLYPHENOL TRONG CHẾ PHẨM CHỨA CAO ACTISÔ

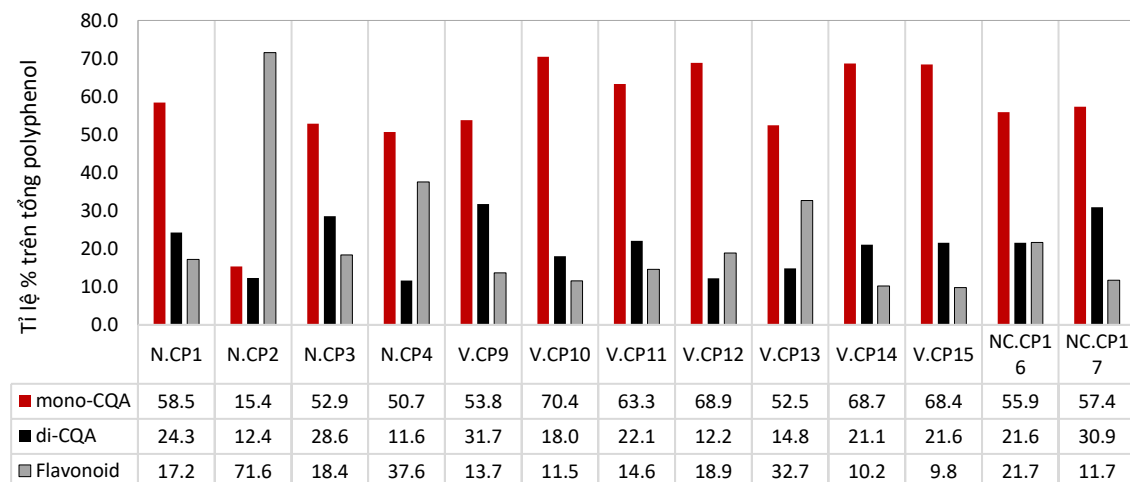
Tỉ lệ % của acid chlorogenic (AC) trong các nguyên liệu của chế phẩm:



Tỉ lệ % của cynarin (CY) trong các nguyên liệu của chế phẩm:



Tỉ lệ % của polyphenol trong các nguyên liệu của chế phẩm:



Phụ lục 56. THÔNG TIN CÁC CAO CHIẾT THỬ NGHIỆM

Các cao chiết thử nghiệm sinh học

Bảng PL-34. Khối lượng và độ ẩm của các cao chiết thử nghiệm sinh học

STT	Cao chiết	Khối lượng được liệu (g)	Độ ẩm được liệu %	Khối lượng cao chiết (g)	Độ ẩm cao chiết %	Hiệu suất chiết %
1	ALT.H ₂ O	150	-	7,93	9,33	-
2	ILT.H ₂ O	150	-	7,84	9,80	-
3	AL.H ₂ O	20	10,61	6,41	7,48	21,61
4	IL.H ₂ O	20	10,57	6,65	10,29	32,28
5	AG.H ₂ O	60	13,60	7,96	7,37	6,71
6	IG.H ₂ O	60	11,85	16,01	8,23	17,78
7	AT.H ₂ O	15	11,76	3,38	8,22	15,12
8	IT.H ₂ O	20	11,70	3,14	4,72	5,46
9	AR.H ₂ O	20	11,49	5,25	10,46	23,67
10	IR.H ₂ O	20	10,64	9,62	12,17	55,73
11	AH.H ₂ O	20	12,82	4,64	10,67	18,98
12	IH.H ₂ O	20	13,92	3,29	7,12	7,79
13	AL.96	20	10,61	4,14	5,85	10,45
14	IL.96	20	12,09	3,40	10,98	15,30
15	AG.96	20	13,60	3,81	6,03	7,60
16	IG.96	20	11,85	3,07	5,79	6,78
17	AT.96	20	11,76	2,36	10,92	10,88
18	IT.96	20	11,70	4,62	8,34	15,85
19	AR.96	20	11,49	3,19	10,41	14,31
20	IR.96	20	10,64	4,09	4,42	7,26
21	AH.96	20	12,82	2,05	7,59	5,71
22	IH.96	20	13,92	2,50	9,36	8,09
23	AL.40	20	10,61	6,88	7,06	21,69
24	IL.40	20	12,09	6,04	10,48	25,82

Cao chiết lá tươi (ALT và ILT): 150 g phần lá tươi được chiết với 500 ml nước sôi (lần 1) và 200 ml nước sôi (lần 2).

Cao chiết BPD khác (lá, rễ, thân, gân lá, hoa): 20 g dược liệu khô được chiết với 100 ml lần 1 với dung môi (nước sôi hoặc ethanol 40, 96 %) và 50 ml dung môi tương tự ở lần 2.

Phụ lục 57. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM DPPH CỦA 9 CHẤT TINH KHIẾT

Bảng PL-35. Dãy nồng độ của 9 chất tinh khiết và chứng dương trong thử nghiệm DPPH (µg/ml)

Mẫu STT	1- CQA	3- CQA	AC	4- CQA	CY	SCO	CR	1,5- diCQA	4,5- diCQA	Vit.C	Silymarin
1	40	17,5	10	10	7,5	7,5	5	7,5	5	10	100
2	20	15	7,5	7,5	5	5	4	5	2,5	8	75
3	10	10	5	5	2,5	1	3	2,5	1	4	40
4	5	5	1	1	1	0,5	1	1	0,5	1,6	30
5	1	1	0,5	0,5	0,5	0,25	0,5	0,5	0,25	0,4	20

Bảng PL-36. % HTCO của các cao chiết, chất tinh khiết và chứng dương theo nồng độ

Nồng độ		1	2	3	4	5
Mẫu						
Chất tinh khiết	1-CQA	88,91±0,004	45,95±0,002	25,15±0,003	15,75±0,003	5,62±0,004
	3-CQA	91,52±0,002	79,84±0,002	63,52±0,005	28,06±0,001	3,91±0,001
	AC	83,77±0,001	64,63±0,004	45,88±0,002	13,62±0,000	9,82±0,002
	4-CQA	92,79±0,002	79,02±0,003	52,85±0,002	11,86±0,007	12,77±0,003
	CY	84,43±0,002	65,65±0,017	33,25±0,003	17,51±0,006	11,02±0,004
	SCO	77,03±0,005	56,82±0,001	14,11±0,001	8,77±0,002	2,79±0,002
	CR	85,31±0,001	74,57±0,002	61,80±0,007	18,85±0,002	14,35±0,007
	1,5-diCQA	85,89±0,001	63,83±0,011	35,58±0,007	20,21±0,002	14,58±0,004
	4,5-diCQA	71,74±0,010	34,21±0,006	17,88±0,002	9,62±0,002	4,87±0,002
Chứng dương	Vit.C	80,60±0,003	67,58±0,007	35,97±0,004	14,73±0,002	5,11±0,000
	Silymarin	80,64±0,001	70,02±0,006	46,15±0,003	40,36±0,001	35,21±0,002

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Hợp chất	N	Mean	Grouping
silymarin	3	87.337	A
1-CQA	3	61.623	B
Vit.C	3	33.523	C
3-CQA	3	25.5817	D
AC	3	15.8800	E
4-CQA	3	13.5919	F
SCO	3	7.7883	G
CY	3	7.7657	G
1,5-diCQA	3	7.5067	G
4,5-diCQA	3	6.6533	H
CR	3	5.7123	I

Means that do not share a letter are significantly different.

Hợp chất	N	Mean	StDev	95% CI
1-CQA	3	61.623	0.630	(61.301, 61.944)
1,5-diCQA	3	7.5067	0.0306	(7.1852, 7.8282)
3-CQA	3	25.5817	0.1218	(25.2602, 25.9032)
4-CQA	3	13.5919	0.0208	(13.2704, 13.9134)
4,5-diCQA	3	6.6533	0.1617	(6.3318, 6.9748)
AC	3	15.8800	0.0794	(15.5585, 16.2015)
CR	3	5.7123	0.0642	(5.3908, 6.0338)
CY	3	7.7657	0.1139	(7.4442, 8.0872)
SCO	3	7.7883	0.0564	(7.4668, 8.1098)
silymarin	3	87.337	0.542	(87.015, 87.658)
Vit.C	3	33.523	0.186	(33.202, 33.845)

Pooled StDev = 0.268509

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
HC	10	2136.27	213.627	29630.57	0.000
Error	22	1.6	0.07		
Total	32	2136.43			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
0.268509	99.99%	99.99%	99.98%

Phụ lục 58. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM MDA CỦA 9 CHẤT TINH KHIẾT

Bảng PL-37. Dãy nồng độ của 9 chất tinh khiết và chứng dương trong thử nghiệm MDA (µg/ml)

Mẫu STT	1- CQA	3- CQA	AC	4- CQA	CY	SCO	CR	1,5- diCQA	4,5- diCQA	Silymarin
1	200	100	25	50	2,5	10	10	10	10	100
2	300	200	50	100	5,0	25	25	20	25	200
3	500	250	75	150	10	50	50	40	50	400
4	600	350	125	250	20	100	100	60	100	600
5	700	450	150	300	30	200	150	80	150	800

Bảng PL-38. %HTCO của các cao chiết, chất tinh khiết và chứng dương theo nồng độ

Nồng độ		1	2	3	4	5
Mẫu						
Chất tinh khiết	1-CQA	1,65±0,01	14,07±0,03	33,98±0,03	45,66±0,02	57,78±0,02
	3-CQA	18,56±0,03	28,89±0,03	33,23±0,02	46,26±0,04	59,43±0,04
	AC	9,88±0,02	13,32±0,01	17,66±0,02	31,44±0,03	34,28±0,03
	4-CQA	6,59±0,01	15,72±0,02	27,84±0,03	42,07±0,04	59,28±0,04
	CY	10,01±0,02	30,34±0,04	44,84±0,03	69,06±0,05	80,27±0,04
	SCO	9,57±0,03	16,14±0,02	25,41±0,02	30,94±0,04	81,76±0,03
	CR	17,24±0,04	21,08±0,01	37,18±0,04	61,68±0,02	83,48±0,02
	1,5-diCQA	19,66±0,02	31,05±0,03	57,83±0,03	72,51±0,03	87,32±0,03
	4,5-diCQA	0,23±0,001	15,60±0,02	42,82±0,04	75,28±0,03	87,24±0,04
Chứng dương	Silymarin	7,18±0,002	19,48±0,03	34,51±0,04	59,34±0,03	70,05±0,04

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Hợp chất	N	Mean	Grouping
1-CQA	3	1820.8	A
Silymarin	3	1115.8	B
3-CQA	3	1060.9	B
4-CQA	3	772.4	C
AC	3	637.7	D
SCO	3	253.20	E
CR	3	171.58	E F
4,5-diCQA	3	127.33	F G
1,5-diCQA	3	66.80	G H
CY	3	24.670	H

Means that do not share a letter are significantly different.

Hợp chất	N	Mean	StDev	95% CI
1-CQA	3	1820.8	75.9	(1782.6, 1859.0)
1,5-diCQA	3	66.80	2.19	(28.57, 105.03)
3-CQA	3	1060.9	36.4	(1022.7, 1099.2)
4-CQA	3	772.4	36.5	(734.1, 810.6)
4,5-diCQA	3	127.33	5.30	(89.10, 165.56)
AC	3	637.7	29.7	(599.5, 675.9)
CR	3	171.58	6.39	(133.35, 209.81)
CY	3	24.670	0.812	(13.557, 62.897)
SCO	3	253.20	6.49	(214.97, 291.43)
Silymarin	3	1115.8	25.7	(1077.6, 1154.0)

Pooled StDev = 31.7412

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-Value	P-Value
Tên HC	9	9426630	1047403	1039.60	0.000
Error	20	20150	1008		
Total	29	9446781			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
31.7412	99.79%	99.69%	99.52%

Phụ lục 59. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM DPPH CỦA CÁC CAO CHIẾT**Bảng PL-39. Dãy nồng độ của các mẫu cao chiết nước trong thử nghiệm DPPH ($\mu\text{g/ml}$), $n=2$**

Mẫu STT	Lá xanh							Lá tím						
	X.LT	X.L	X.G	X.T	X.R	X.H	X.CNC	T.LT	T.L	T.G	T.T	T.R	T.H	T.CNC
1	30	40	100	30	70	250	30	30	50	100	30	125	250	50
2	20	30	70	20	50	200	20	20	30	70	20	100	125	30
3	10	20	30	10	30	150	10	15	20	50	10	50	100	10
4	5	10	10	5	10	50	5	10	10	30	5	20	50	5
5	2,5	2,5	5	2,5	5	10	2,5	5	2,5	5	2,5	5	10	2,5

Bảng PL-40. Dãy nồng độ của các mẫu cao chiết EtOH trong thử nghiệm DPPH ($\mu\text{g/ml}$), $n=2$

Mẫu STT	Lá xanh						Lá tím					
	X.L40	X.L96	X.G96	X.T96	X.R96	X.H96	T.L40	T.L96	T.G96	T.T96	T.R96	T.H96
1	50	70	125	30	50	250	50	70	250	30	125	200
2	30	50	100	20	40	125	30	50	125	20	100	125
3	20	30	50	10	30	50	20	30	50	10	50	100
4	10	10	10	5	10	10	10	10	10	5	10	50
5	2,5	5	5	2,5	5	5	2,5	5	5	2,5	5	10

Bảng PL-41. Phương trình hồi quy và IC_{50} ($\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$, $n=2$) của cao chiết nước của AX và AT

Giống	STT	Mẫu thử	Phương trình hồi quy	R^2	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
Lá xanh	1	X.LT	$y = 2,624x + 6,153$	0,997	$16,71 \pm 0,160$
	2	X.L	$y = 2,094x + 4,833$	0,993	$21,56 \pm 0,165$
	3	X.G	$y = 0,722x + 5,025$	0,999	$60,57 \pm 1,410$
	4	X.T	$y = 2,512x + 4,993$	0,996	$17,91 \pm 0,277$
	5	X.R	$y = 1,172x + 8,248$	0,990	$35,61 \pm 0,131$
	6	X.H	$y = 0,209x + 3,480$	0,998	$45,41 \pm 0,200$
	7	X.CNC	$y = 2,251x + 4,947$	0,999	$20,05 \pm 0,609$
Lá tím	8	T.LT	$y = 3,204x - 7,817$	0,980	$18,04 \pm 0,128$
	9	T.L	$y = 1,449x + 5,354$	0,981	$30,80 \pm 0,172$
	10	T.G	$y = 0,622x + 6,081$	0,995	$70,60 \pm 0,938$
	11	T.T	$y = 2,351x + 4,309$	0,996	$19,43 \pm 0,074$
	12	T.R	$y = 0,551x + 3,610$	0,991	$84,19 \pm 0,254$
	13	T.H	$y = 0,342x + 5,687$	0,982	$129,56 \pm 1,11$
	14	T.CNC	$y = 1,488x + 5,784$	0,998	$29,70 \pm 0,208$
Chứng dương	15	Vitamin C	$y = 7,952x + 2,624$	0,998	$5,96 \pm 0,021$
	16	Silymarin	$y = 0,589x + 23,24$	0,993	$45,41 \pm 0,200$

Bảng PL-42. Phương trình hồi quy và IC₅₀ (µg/ml ± SD, n=2) của cao chiết EtOH của AX và AT

Giống	STT	Mẫu thử	Phương trình hồi quy	R ²	IC ₅₀ (µg/ml)
Lá xanh	1	X.L96	y = 1,013x + 5,215	0,989	44,20±0,038
	2	X.G96	y = 0,526x - 0,763	0,991	96,61±1,838
	3	X.T96	y = 2,813x + 7,620	0,996	15,06±0,077
	4	X.R96	y = 1,527x + 8,371	0,998	27,26±0,420
	5	X.H96	y = 0,322x + 5,572	0,988	137,68±0,888
	6	X.L40	y = 1,585x + 7,247	0,992	26,96±0,164
Lá tím	7	T.L96	y = 1,184x + 9,445	0,980	34,24±0,602
	8	T.G96	y = 0,287x + 6,980	0,982	149,95±1,318
	9	T.T96	y = 2,389x + 6,900	0,999	18,04±0,166
	10	T.R96	y = 0,702x + 7,950	0,987	59,86±0,284
	11	T.H96	y = 0,401x + 2,548	0,992	118,17±0,797
	12	T.L40	y = 1,670x + 4,108	0,999	27,49±0,715

Bảng PL-43. %HTCO của các cao chiết và chứng dương theo nồng độ

Nồng độ		1	2	3	4	5	
Mẫu							
Cao nước	Lá xanh	X.LT	83,9±0,010	59,4±0,009	34,6±0,002	18,9±0,002	11,2±0,001
		X.L	85,87±0,013	70,63±0,009	48,9±0,007	23,69±0,003	9,8±0,006
		X.G	77,18±0,007	55,9±0,014	26,26±0,017	13,56±0,007	7,65±0,002
		X.T	80,02±0,007	54,83±0,009	31,94±0,007	18,81±0,001	8,96±0,017
		X.R	87,67±0,003	68,12±0,005	48,46±0,002	18,48±0,003	12,02±0,002
		X.H	54,94±0,005	45,58±0,004	36,14±0,009	13,94±0,005	5,02±0,008
	X.CNC	71,77±0,016	51,03±0,021	27,66±0,007	16,16±0,004	10,09±0,006	
	Lá tím	T.LT	84,87±0,009	57,86±0,016	46,89±0,017	23,35±0,003	4,28±0,004
		T.L	80,55±0,000	46,89±0,007	28,69±0,011	22,70±0,009	10,95±0,002
		T.G	68,33±0,001	48,10±0,025	38,41±0,006	26,71±0,007	7,62±0,001
		T.T	76,18±0,003	49,36±0,003	26,91±0,006	17,83±0,003	9,96±0,004
		T.R	67,72±0,002	63,01±0,001	29,91±0,005	13,80±0,006	7,00±0,004
		T.H	88,11±0,004	55,3±0,003	39,66±0,007	22,84±0,009	5,70±0,010
	T.CNC	79,11±0,004	52,44±0,012	20,54±0,005	12,21±0,001	9,73±0,004	
Cao EtOH	Lá xanh	X.L40	83,96±0,003	58,87±0,007	39,83±0,007	22,56±0,003	9,42±0,003
		X.L96	73,88±0,001	56,73±0,003	40,19±0,001	14,82±0,005	7,71±0,007
		X.G96	64,34±0,014	54,54±0,011	21,41±0,013	5,56±0,004	2,86±0,005
		X.T96	90,11±0,002	66,9±0,008	35,8±0,002	21,53±0,001	13,67±0,005
		X.R96	85,82±0,007	67,73±0,010	54,64±0,011	23,96±0,008	15,92±0,002
		X.H96	83,37±0,007	50,99±0,004	24,11±0,003	6,08±0,004	4,81±0,003
	Lá tím	T.L40	87,63±0,009	54,46±0,014	36,86±0,026	21,4±0,007	8,1±0,002
		T.L96	87,55±0,005	72,67±0,014	50,55±0,013	19,98±0,006	11,92±0,002
		T.G96	75,78±0,010	47,54±0,002	25,04±0,006	8,17±0,003	4,64±0,002
		T.T96	78,57±0,006	54,65±0,006	31,15±0,005	18,36±0,001	13,08±0,003
		T.R96	91,3±0,001	81,36±0,008	48,19±0,003	15,35±0,004	7,24±0,003
		T.H96	80,63±0,006	53,36±0,006	46,48±0,007	23,02±0,008	4,03±0,004
Chứng dương	Vit.C	80,60±0,003	67,58±0,007	35,97±0,004	14,73±0,002	5,11±0,000	
	Silymarin	80,64±0,001	70,02±0,006	46,15±0,003	40,36±0,001	35,21±0,002	

Phụ lục 60. KẾT QUẢ THỬ NGHIỆM MDA CỦA CÁC CAO CHIẾT

Bảng PL-44. Dãy nồng độ của các mẫu cao chiết nước trong thử nghiệm MDA ($\mu\text{g/ml}$) (n=2)

Mẫu STT	Lá xanh							Lá tím						
	X.LT	X.L	X.G	X.T	X.R	X.H	X.CNC	T.LT	T.L	T.G	T.T	T.R	T.H	T.CNC
1	50	50	100	25	100	250	200	50	50	200	50	200	400	300
2	75	75	300	50	150	500	300	75	100	400	100	300	600	400
3	125	100	500	75	200	1000	400	125	150	800	150	400	800	500
4	150	125	700	100	250	1250	700	150	200	1000	200	450	1000	600
5	200	200	1000	125	350	1750	800	175	300	1200	300	500	1400	800

Bảng PL-45. Dãy nồng độ của các mẫu cao chiết EtOH trong thử nghiệm MDA ($\mu\text{g/ml}$) (n=2)

Mẫu STT	Lá xanh						Lá tím					
	X.L40	X.L96	X.G96	X.T96	X.R96	X.H96	T.L40	T.L96	T.G96	T.T96	T.R96	T.H96
1	50	300	250	50	50	250	50	300	500	25	100	500
2	100	400	500	100	100	500	100	400	1500	50	200	750
3	150	500	750	125	150	750	150	500	2000	100	300	1000
4	250	600	1000	150	200	1000	250	600	2500	125	400	1500
5	350	800	1500	200	250	1500	300	700	3500	150	500	1750

Bảng PL-46. Phương trình hồi quy và IC_{50} ($\mu\text{g/ml} \pm \text{SD}$, n=2) của cao chiết nước của AX và AT

Giống	STT	Mẫu thử	Phương trình hồi quy	R^2	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
AX	1	X.LT	$y = 0,0008x^2 + 0,1382x + 16,553$	0,9897	135,59
	2	X.L	$y = -0,0013x^2 + 0,6793x - 10,544$	0,9806	114,00
	3	X.G	$y = -5\text{E-}05x^2 + 0,104x + 6,4983$	0,9979	580,04
	4	X.T	$y = -0,0003x^2 + 0,559x - 14,203$	0,9904	122,97
	5	X.R	$y = 0,0002x^2 + 0,0652x + 0,5415$	0,9998	360,32
	6	X.H	$y = -7\text{E-}06x^2 + 0,0477x + 3,0808$	0,9876	1192,22
	7	X.CNC	$y = -0,0001x^2 + 0,2409x - 35,789$	0,9856	434,48
AT	8	T.LT	$y = 0,0007x^2 + 0,2881x + 5,4252$	0,9867	119,83
	9	T.L	$y = 1\text{E-}05x^2 + 0,1682x + 11,168$	0,989	227,78
	10	T.G	$y = -3\text{E-}06x^2 + 0,0447x + 19,803$	0,9802	709,32
	11	T.T	$y = -0,0006x^2 + 0,3974x + 1,3887$	0,9979	161,90
	12	T.R	$y = -6\text{E-}05x^2 + 0,1583x - 23,641$	0,9873	603,03
	13	T.H	$y = -2\text{E-}05x^2 + 0,0974x - 3,1045$	0,982	625,58
	14	T.CNC	$y = -5\text{E-}05x^2 + 0,1533x - 30,383$	0,9823	671,36
Chứng dương	15	Silymarin	$y = -2\text{E-}05x^2 + 0,1097x - 3,2544$	0,9886	538,3

Bảng PL-47. %HTCO của các cao chiết và chứng dương theo nồng độ

		Nồng độ	1	2	3	4	5
Mẫu							
Cao nước	AX	X.LT	26,73±0,06	28,78±0,12	48,75±0,12	53,74±0,14	75,77±0,23
		X.L	19,79±0,04	32,29±0,13	44,05±0,13	59,52±0,21	69,79±0,15
		X.G	16,74±0,03	32,45±0,07	48,02±0,14	55,80±0,14	63,73±0,24
		X.T	1,74±0,06	10,25±0,04	24,95±0,04	37,72±0,23	50,68±0,21
		X.R	9,86±0,07	15,41±0,02	23,66±0,02	32,62±0,15	54,12±0,12
		X.H	16,25±0,05	22,01±0,03	46,53±0,15	50,96±0,26	65,29±0,11
		X.CNC	12,33±0,04	23,49±0,04	36,71±0,06	80,32±0,24	86,49±0,22
	AT	T.LT	22,77±0,12	29,46±0,02	49,26±0,21	69,79±0,14	75,00±0,13
		T.L	21,00±0,14	25,26±0,12	37,30±0,12	46,55±0,03	62,26±0,04
		T.G	27,46±0,15	40,23±0,41	49,49±0,25	62,26±0,07	72,25±0,04
		T.T	19,76±0,08	36,25±0,12	47,08±0,27	59,45±0,12	70,27±0,06
		T.R	4,11±0,05	22,00±0,06	31,53±0,02	33,00±0,17	39,24±0,01
		T.H	35,01±0,16	42,98±0,03	61,74±0,08	76,22±0,11	91,29±0,27
		T.CNC	13,07±0,12	21,29±0,07	28,78±0,22	42,58±0,05	61,82±0,08
Cao EtOH	AX	X.L40	3,64±0,02	16,39±0,03	17,72±0,04	39,74±0,42	61,42±0,06
		X.L96	8,11±0,04	13,90±0,04	26,45±0,02	39,19±0,45	64,86±0,21
		X.G96	5,80±0,01	6,48±0,006	20,48±0,01	26,96±0,13	43,69±0,11
		X.T96	41,70±0,12	55,21±0,02	67,25±0,02	70,04±0,09	81,50±0,12
		X.R96	6,32±0,02	13,68±0,01	29,32±0,04	36,24±0,04	48,72±0,07
		X.H96	15,04±0,13	22,11±0,03	26,47±0,01	28,87±0,05	44,96±0,05
	AT	T.L40	19,05±0,11	26,19±0,04	30,95±0,05	37,86±0,11	47,62±0,04
		T.L96	3,94±0,01	21,33±0,06	31,72±0,04	42,11±0,02	54,66±0,01
		T.G96	6,79±0,02	35,01±0,02	60,27±0,12	77,55±0,17	93,50±0,17
		T.T96	7,85±0,03	15,70±0,01	24,38±0,11	31,40±0,02	43,53±0,05
		T.R96	8,42±0,07	19,10±0,12	29,62±0,32	35,94±0,06	50,68±0,03
		T.H96	4,70±0,01	24,52±0,04	30,25±0,20	55,21±0,04	68,72±0,01
		Chứng dương	Silymarin	7,18±0,02	19,48±0,10	34,51±0,04	44,87±0,07

Bảng PL-48. Phương trình hồi quy và IC₅₀ (µg/ml ± SD, n=2) của cao chiết EtOH của AX và AT

Giống	STT	Mẫu thử	Phương trình hồi quy	R ²	IC ₅₀ (µg/ml)
Lá xanh	13	X.L96	$y = -3E-05x^2 + 0,1404x - 34,774$	0,9865	712,18
	14	X.G96	$y = 2E-06x^2 + 0,0319x - 7,8498$	0,9912	1644,02
	15	X.T96	$y = -0,0005x^2 + 0,4055x + 22,394$	0,9855	75,02
	16	X.R96	$y = -4E-05x^2 + 0,2263x - 5,9336$	0,9953	259,03
	17	X.H96	$y = 6E-06x^2 + 0,0118x + 12,924$	0,9929	1689,92
	18	X.L40	$y = 0,0002x^2 + 0,1212x - 1,3242$	0,9875	287,3
Lá tím	19	T.L96	$y = -7E-05x^2 + 0,1946x - 48,175$	0,9915	662,26
	20	T.G96	$y = -4E-06x^2 + 0,045x - 16,945$	0,981	1764,38
	21	T.T96	$y = 0,0006x^2 + 0,1455x + 4,7593$	0,9911	178,92
	22	T.R96	$y = 4E-05x^2 + 0,0483x + 4,8018$	0,9898	618,73
	23	T.H96	$y = -1E-05x^2 + 0,0742x - 28,36$	0,9867	1275,23
	24	T.L40	$y = 2E-05x^2 + 0,0948x + 15,301$	0,9871	341,43

Phụ lục 61. KẾT QUẢ XỬ LÝ THỐNG KÊ CỦA THỬ NGHIỆM (DPPH VÀ MDA)
CỦA CÁC CAO CHIẾT

Phân tích thống kê ANOVA – 1 yếu tố theo phương pháp Tukey

A. So sánh IC₅₀ của các cao chiết trong thử nghiệm DPPH

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Mẫu	N	Mean	Grouping	Mẫu thử	N	Mean	StDev	95% CI
AH.H2O	3	224.25	A	AG.96	3	92.89	5.26	(91.04, 94.74)
IG.96	3	149.95	B	AG.H2O	3	62.757	0.768	(60.909, 64.605)
AH.96	3	134.207	C	AH.96	3	134.207	1.288	(132.359, 136.055)
IH.H2O	3	129.41	C	AH.H2O	3	224.25	4.36	(222.40, 226.09)
IH.96	3	118.313	D	AL.40	3	26.890	0.248	(25.042, 28.738)
AG.96	3	92.89	E	AL.96	3	44.1800	0.0608	(42.3320, 46.0280)
IR.H2O	3	84.917	F	AL.H2O	3	21.913	0.304	(20.065, 23.761)
IG.H2O	3	70.617	G	ALT.H2O	3	13.1800	0.0854	(11.3320, 15.0280)
AG.H2O	3	62.757	H	AR.96	3	27.113	0.569	(25.265, 28.961)
IR.96	3	60.290	H	AR.H2O	3	35.220	0.347	(33.372, 37.068)
AL.96	3	44.1800	I	AT.96	3	15.0633	0.1320	(13.2153, 16.9114)
Silymarin	3	42.133	I	AT.H2O	3	17.913	0.479	(16.065, 19.761)
AR.H2O	3	35.220	J	IG.96	3	149.95	2.28	(148.11, 151.80)
IL.96	3	34.243	J	IG.H2O	3	70.617	1.634	(68.769, 72.465)
IL.H2O	3	30.833	J K	IH.96	3	118.313	1.310	(116.465, 120.161)
IL.40	3	27.477	K	IH.H2O	3	129.41	1.79	(127.56, 131.25)
AR.96	3	27.113	K	IL.40	3	27.477	1.152	(25.629, 29.325)
AL.40	3	26.890	K L	IL.96	3	34.243	1.042	(32.395, 36.091)
AL.H2O	3	21.913	L M	IL.H2O	3	30.833	0.230	(28.985, 32.681)
IT.H2O	3	19.4333	M N	ILT.H2O	3	16.713	0.277	(14.865, 18.561)
IT.96	3	18.040	M N O	IR.96	3	60.290	0.857	(58.442, 62.138)
AT.H2O	3	17.913	M N O	IR.H2O	3	84.917	0.446	(83.069, 86.765)
ILT.H2O	3	16.713	N O	IT.96	3	18.040	0.285	(16.192, 19.888)
AT.96	3	15.0633	N O	IT.H2O	3	19.4333	0.1274	(17.5853, 21.2814)
ALT.H2O	3	13.1800	O	Silymarin	3	42.133	0.258	(40.285, 43.981)
Vit.C	3	5.9033	P	Vit.C	3	5.9033	0.0351	(4.0553, 7.7514)

Means that do not share a letter are significantly different.

Pooled StDev = 1.59513

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-	P-
Mẫu thử	25	216416	8656.64	3402.18	0.000
Error	52	132	2.54		
Total	77	216548			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
1.59513	99.94%	99.91%	99.86%

B. So sánh IC₅₀ của các cao chiết trong thử nghiệm MDA

Tukey Pairwise Comparisons

Grouping Information Using the Tukey Method and 95% Confidence

Mẫu thử	N	Mean	Grouping	Mẫu thử	N	Mean	StDev	95% CI
IG.96	3	1764.4	A	AG.96	3	1644.0	55.6	(1617.1, 1670.9)
AH.96	3	1689.9	B	AG.H2O	3	580.0	18.0	(553.1, 606.9)
AG.96	3	1644.0	B	AH.96	3	1689.9	52.7	(1663.0, 1716.8)
IH.96	3	1275.2	C	AH.H2O	3	1192.2	61.0	(1165.3, 1219.1)
AH.H2O	3	1192.2	D	AL.40	3	287.30	10.76	(260.41, 314.19)
AL.96	3	712.2	E	AL.96	3	712.2	21.7	(685.3, 739.1)
IG.H2O	3	709.32	E	AL.H2O	3	114.00	2.79	(87.11, 140.89)
IL.96	3	662.26	E F	ALT.H2O	3	119.83	3.90	(92.94, 146.72)
IH.H2O	3	625.58	F G	AR.96	3	259.03	3.80	(232.14, 285.92)
IR.96	3	618.73	F G	AR.H2O	3	360.32	10.10	(333.43, 387.21)
IR.H2O	3	603.03	F G H	AT.96	3	75.02	3.47	(48.13, 101.91)
AG.H2O	3	580.0	G H	AT.H2O	3	122.97	3.04	(96.08, 149.86)
Silymarin	3	537.633	H	IG.96	3	1764.4	22.7	(1737.5, 1791.3)
AR.H2O	3	360.32	I	IG.H2O	3	709.32	12.57	(682.43, 736.21)
IL.40	3	341.43	I	IH.96	3	1275.2	35.0	(1248.3, 1302.1)
AL.40	3	287.30	I J	IH.H2O	3	625.58	9.72	(598.69, 652.47)
AR.96	3	259.03	J	IL.40	3	341.43	14.32	(314.54, 368.32)
IL.H2O	3	227.78	J K	IL.96	3	662.26	14.55	(635.37, 689.15)
IT.96	3	178.92	K L	IL.H2O	3	227.78	4.76	(200.89, 254.67)
IT.H2O	3	161.90	K L	ILT.H2O	3	135.59	2.93	(108.70, 162.48)
ILT.H2O	3	135.59	L M	IR.96	3	618.73	9.90	(591.84, 645.62)
AT.H2O	3	122.97	L M	IR.H2O	3	603.03	12.59	(576.14, 629.92)
ALT.H2O	3	119.83	L M	IT.96	3	178.92	6.20	(152.03, 205.81)
AL.H2O	3	114.00	L M	IT.H2O	3	161.90	7.31	(135.01, 188.79)
AT.96	3	75.02	M	Silymarin	3	537.633	0.833	(510.742, 564.524)

Means that do not share a letter are significantly different.

Pooled StDev = 23.1890

Analysis of Variance

Source	DF	Adj SS	Adj MS	F-	P-
Mẫu thử	24	19517370	813224	1512.33	0.000
Error	50	26886	538		
Total	74	19544256			

Model Summary

S	R-sq	R-sq(adj)	R-sq(pred)
23.1890	99.86%	99.80%	99.69%

Phụ lục 62. MỐI TƯƠNG QUAN GIỮA HÀM LƯỢNG VÀ POLYPHENOL TRONG CAO CHIẾT ACTISÔ

Bảng PL-49. Hệ số tương quan Pearson (r) trong thử nghiệm HTCO và định lượng TPHH của các mẫu cao chiết Actisô trên 36 mẫu thử nghiệm

	DPPH	MDA	CY	1,5-CQA	TPC	AC	SCO	CR
DPPH	1	0.996	-0.610	-0.374	-0.835	-0.611	-0.472	-0.465
MDA	0.996	1	-0.606	-0.382	-0.813	-0.591	-0.457	-0.449
CY	-0.610	-0.606	1	0.805	0.834	0.041	0.041	0.102
1,5-CQA	-0.374	-0.382	0.805	1	0.154	-0.238	-0.367	-0.367
TPC	-0.835	-0.813	0.834	0.154	1	0.559	0.822	0.821
AC	-0.611	-0.591	0.041	-0.238	0.559	1	0.939	0.888
SCO	-0.472	-0.457	0.041	-0.367	0.822	0.939	1	0.989
CR	-0.465	-0.449	0.102	-0.367	0.821	0.888	0.989	1

Hàm lượng hoạt chất (%); DPPH (IC_{50} , $\mu g/ml$); MDA (IC_{50} , $\mu g/ml$)

Giá trị hệ số tương quan Pearson (r) được phân tích trên phần mềm online MetaboAnalyst 5.0

Bảng PL-50. Hệ số tương quan Pearson (r) trong thử nghiệm HTCO và định lượng TPHH của các mẫu cao chiết Actisô trên 72 mẫu thử nghiệm

	DPPH	MDA	Total	AC	SCO	CR	CY	1,5-CQA
DPPH	1	0.86	-0.68	-0.57	-0.47	-0.45	-0.53	-0.40
MDA	0.86	1	-0.68	-0.46	-0.32	-0.32	-0.64	-0.45
Total	-0.68	-0.68	1	0.89	0.85	0.85	0.64	0.24
AC	-0.57	-0.46	0.89	1	0.96	0.90	0.24	-0.08
SCO	-0.47	-0.32	0.85	0.96	1	0.96	0.23	-0.16
CR	-0.45	-0.32	0.85	0.90	0.96	1	0.31	-0.07
CY	-0.53	-0.64	0.64	0.24	0.23	0.31	1	0.77
1,5-CQA	-0.40	-0.45	0.24	-0.08	-0.16	-0.07	0.77	1