

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

BỘ Y TẾ

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*)

Ngành: Dược học cổ truyền

Mã số: 62720406

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

TP. Hồ Chí Minh, năm 2023

Công trình được hoàn thành tại:

Đại Học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh

Người hướng dẫn khoa học:

TS. PHẠM ĐÔNG PHƯƠNG

PGS. TS. NGUYỄN THIÊN HẢI

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ tại Hội đồng chấm luận án cấp trường
tại Đại Học Y Dược Thành Phố Hồ Chí Minh.

vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu luận án tại:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp TP. HCM
- Thư viện Đại học Y Dược TP. HCM

1. GIỚI THIỆU LUẬN ÁN

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Actisô (*Cynara scolymus* L.) được dùng để hỗ trợ điều trị các bệnh về gan, mật và hạ lipid máu. Hiện nay Actisô được trồng phổ biến ở nhiều nơi trên thế giới với quy mô và sản lượng lớn. Tại Việt Nam, Actisô được trồng nhiều ở Đà Lạt, Sa Pa, Tam Đảo nhưng các đề tài nghiên cứu về hóa thực vật còn hạn chế, các đề tài thường liên quan đến ngành chăn nuôi và nông nghiệp. Hiện nay, 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 được định hướng ưu tiên đầu tư phát triển.

Hiện nay thị trường Việt Nam và thế giới có rất nhiều chế phẩm từ Actisô. Các nghiên cứu lâm sàng cho thấy có nhiều kết quả không tương đồng và một trong những nguyên nhân được cho là do các cao chiết lá Actisô chưa được tiêu chuẩn hóa nên có sự khác biệt lớn về hàm lượng polyphenol giữa các chế phẩm. Chính vì vậy, mục đích chính của nghiên cứu là sản xuất ra các cao chiết cũng như chế phẩm đạt chất lượng tương đương hoặc cao hơn một số chế phẩm uy tín và nổi tiếng của nước ngoài (Chophytol - Rosa Pháp,...).

b. Mục tiêu nghiên cứu

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).

c. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

- ❖ **Đối tượng nghiên cứu:** Lá Actisô (giống xanh) là nguyên liệu chính dùng trong chiết xuất, phân lập, xây dựng quy trình định

lượng và nghiên cứu sản xuất cao chuẩn hóa. Việc định danh được thực hiện bởi TS. Võ Văn Chi. Các bộ phận dùng khác (hoa, thân, rễ, gân lá) của 2 giống Actisô (xanh và tím) được dùng để nghiên cứu so sánh về thành phần và tác dụng sinh học. Các mẫu được lưu tại bộ môn Dược liệu, khoa Dược, ĐH Y Dược TPHCM.

❖ **Phương pháp nghiên cứu:**

- Dược liệu được chiết xuất bằng phương pháp chiết nóng, phân lập các chất bằng sắc ký cột silica gel, sephadex và sắc ký điều chế, xác định cấu trúc các hợp chất bằng phổ MS và NMR.
- Các chất chính gồm cynarin, acid chlorogenic, cynarosid được phân lập và thiết lập chất đối chiếu theo ISO 13528 và 17025. Xây dựng quy trình định lượng bằng HPLC hoặc UPLC-PDA và thẩm định quy trình theo hướng dẫn của ICH.
- Các cao chiết và các chất tinh khiết phân lập được thử hoạt tính chống oxy bằng thử nghiệm DPPH và MDA với chứng dương và acid ascorbic và silymarin.
- Khảo sát phương pháp chiết xuất cao Actisô giàu hàm lượng cynarin và acid chlorogenic ở quy mô phòng thí nghiệm, và triển khai chiết xuất cao Actisô ở quy mô lớn (500 kg phiến lá/mẻ).
- Dựa vào công thức và quy trình bào chế đã khảo sát trước đây, áp dụng bào chế với nguyên liệu cao Actisô chuẩn hóa đã nghiên cứu và nâng cấp cỡ lô sản xuất viên nén bao phim quy mô 15.000 viên/lô. Khảo sát độ ổn định của chế phẩm.

d. Những đóng góp mới của nghiên cứu về mặt lý luận và thực tiễn

- Lần đầu cung cấp quy trình phân lập đồng thời 3 CĐC (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 công bố so sánh hoạt tính chống oxy hóa 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 từ các các bộ phận dùng của 2 giống Actisô.
- 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.

e. Bố cục của luận án

Luận án gồm 151 trang: Mở đầu 2 trang, tổng quan tài liệu 33 trang, đối tượng và phương pháp nghiên cứu 22 trang, kết quả nghiên cứu 66 trang, bản luận 25 trang, kết luận 2 trang và kiến nghị 1 trang.

Luận án có 80 bảng, 47 hình, 198 tài liệu tham khảo gồm 15 tài liệu tiếng việt, 174 tài liệu tiếng Anh và 9 trang web; 63 phụ lục thể hiện các kết quả thực nghiệm.

2. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

2.1. Thực vật học

Cynara là loài lưỡng bội ($2n = 2x = 34$) nên chúng đa dạng về kiểu gen. Lanteri và cộng sự (2012) đã báo cáo về sự đa dạng kiểu hình được tạo ra ở các thế hệ con nhờ lai hóa kiểu gen của Actisô trồng với cây Cardoon trồng và Cardoon dại. Porceddu và cộng sự (1976) đề

xuất chia các giống cây Actisô thành 4 nhóm (**Spinosi, Catanesi, Violetti, Romaneschi**) dựa vào đặc điểm hình thái của hoa đầu.

Ở Việt Nam, Actisô được người Pháp di thực từ thế kỷ 20. Hiện nay, 2 giống Actisô A80 (“giống tím”, ký hiệu **AT**) và giống A85 (“giống xanh”, **AX**) đang được trồng và nhân giống rộng rãi tại Đà Lạt. Cây Actisô có nguy cơ thoái hóa nguồn gen vì có sự suy giảm nghiêm trọng về sản lượng và chất lượng trong những năm gần đây do phương pháp nhân giống vô tính truyền thống dễ bị lây nhiễm bệnh từ cây mẹ. Hiện nay, chưa có nghiên cứu so sánh hàm lượng polyphenol chính trong 2 giống Actisô này để cung cấp cơ sở khoa học cho việc lựa chọn giống trong sản xuất chế phẩm.

2.2. Thành phần hóa học

Lá Actisô giàu polyphenol (acid phenol và flavonoid); sesquiterpen lacton (vị đắng của lá Actisô là do cynaropicrin). Polyphenol chính là các acid caffeoylquinic (CQA) gồm acid mono-CQA, di-CQA và flavonoid (cynarosid và scolymosid). Trong đó, acid chlorogenic (5-CQA) và cynarosid (flavonoid) được xem là “marker” quan trọng trong lá Actisô. Cynarin (1,3-diCQA) là hợp chất được tạo ra trong quá trình chiết xuất ở nhiệt độ cao nên chỉ có trong các cao chiết.

2.3. Tác dụng sinh học

Dịch chiết từ lá Actisô thể hiện một số tác dụng có hiệu quả trên lâm sàng trong điều trị rối loạn tiêu hóa, hỗ trợ điều trị cao lipid huyết, cao huyết áp và viêm gan nhiễm mỡ không do rượu là nhờ tác động chống oxy hóa, lợi mật và hạ lipid của các hợp chất CQA và flavonoid.

2.4. Phân tích polyphenol trong Actisô

ĐDVN V định lượng cynarin trong *cao Actisô* bằng phương pháp UV-Vis. Tuy nhiên phương pháp này có độ chọn lọc không cao vì trong lá Actisô có các đồng phân khác đều có cùng phổ UV. Ngoài ra, ĐDVN yêu cầu định tính cynarin trong *lá Actisô*, nhưng hợp chất này

được chứng minh không có ở trong lá mà chỉ có ở cao chiết Actisô (do được tạo ra khi chiết xuất ở nhiệt độ cao). Do đó, Dược điển Anh, Pháp, Ý, Châu Âu đều không có chỉ tiêu kiểm nghiệm cynarin trong lá Actisô. Chính vì vậy, các tiêu chuẩn chất lượng cho “lá” và “cao” Actisô của DĐVN cần phải được xây dựng lại về chỉ tiêu cũng như phương pháp thử cho phù hợp với các tiêu chuẩn quốc tế.

2.5. Quy trình chiết xuất polyphenol từ lá Actisô

Eich và cộng sự (2004) đã đăng ký sáng chế (US 2004/0234674 A1) về phương pháp chiết xuất làm giàu các thành phần CQA và flavonoid từ lá Actisô như sau: Lá Actisô (tươi hoặc khô) được chiết xuất với nước hoặc với methanol, ethanol hoặc hỗn hợp dung môi này với nước, cô thu hồi dung môi, rửa dịch chiết với dung môi hữu cơ kém phân cực (alkan, alken, ete, este, hoặc dung môi có chlor), tách loại bỏ phần dung môi hữu cơ. Sau đó lắc phân bố với hỗn hợp 2-butanol và ethyl acetat, cô cần thu được **cao chiết A**. Phần dịch chiết nước còn lại thu được **cao chiết B**. **Cao chiết A** giàu các polyphenol hơn **cao chiết B**, có tác dụng ức chế sinh tổng hợp cholesterol và chống oxy hóa mạnh hơn đáng kể so với cao khác. Ngược lại, **cao chiết B** có hoạt tính chủ yếu trên chứng khó tiêu cao hơn cao chiết toàn phần.

2.6. Tổng quan về dạng bào chế

Cao khô Actisô là một trong số các cao chiết từ dược liệu đã được ứng dụng làm thuốc dược 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. 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.

3. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

3.1. Đối tượng nghiên cứu

3.1.1. Nguyên vật liệu: Lá, hoa, rễ, thân già của 2 giống cây Actisô (giống xanh và tím) được thu hái tại vườn ở phường 5, Đà Lạt từ 10/2014 đến 5/2017. Cao khô Actisô (BV Pharma). Các chế phẩm trà Actisô túi lọc được mua ở thị trường trong nước 5/2017. Các chế phẩm từ cao chiết Actisô được mua ở Việt Nam, Pháp, Mỹ, Đức (2/2020).

3.1.2. Hóa chất và dung môi: Dung môi đạt tiêu chuẩn phân tích gồm CHCl_3 , MeOH, EtOH, EtOAc, *n*-BuOH. Dung môi dùng cho HPLC/UPLC gồm ACN (Scharlau), MeOH, acid formic (Merck), acid trifluoroacetic (Prolabo). Silica gel 60 và C_{18} (40-63 μm). Chuẩn acid chlorogenic, cynarin và cynarosid (Phytolab-Đức). Silymarin (Sigma, 31K1467) và acid ascorbic (Sigma, A92902). DPPH (Sigma, STBD1145V). KCl 1,15 %; đệm phosphat 50 mM, pH=7,4 (KH_2PO_4 , K_2HPO_4); 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*).

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

Tá dược	Xuất xứ	Tá dược	Xuất xứ
Cao khô Actisô*	Cao nghiên cứu	Glyceryl behenat	Gattefossé - Pháp
Microcrystallin cellulose	Trung Quốc	Magnesi stearat	Trung Quốc
Silicon Dioxid	Grace - Đức	Vivacoat	JRS Pharma - Đức
Natri Croscarmellose	JRS Pharma - Ấn Độ	Màu nâu (Brown)	Fiorio colori - Ý
Magnesi carbonat	Scora-Pháp		

*Cao nghiên cứu chứa 2,6 % cynarin và 2,3 % acid chlorogenic (TCCS)

3.1.3. Thiết bị dùng trong nghiên cứu

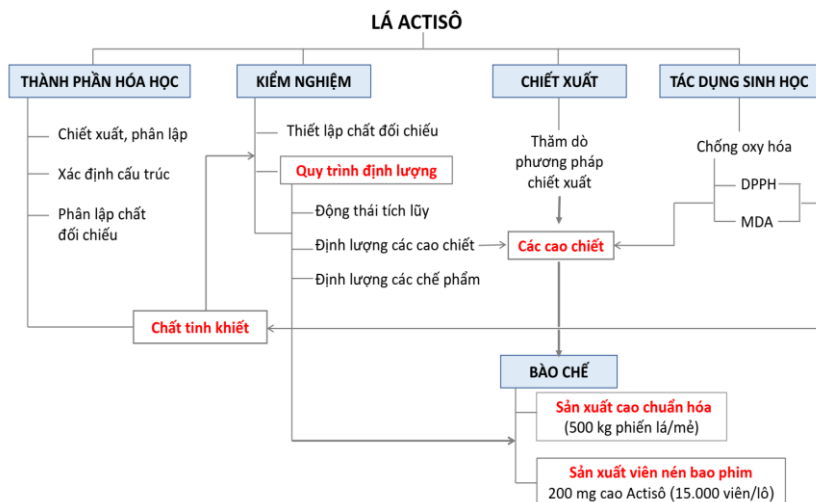
Máy đông khô; MPLC; prep-HPLC; máy đo phổ NMR, MS;

HPLC; UPLC; máy ly tâm; cột Sunfire C₁₈ (250 × 4,6 mm; 5 μm); ThermoFisher C₁₈ (100 × 2,1 mm; 2,6 μm); máy đo phổ UV, máy đo pH, máy khuấy gia nhiệt, máy nghiền đồng thể, máy đọc ELISA. Máy rửa dược liệu, nồi chiết xuất có áp lực 3.000 lít, thiết bị cô quay tuần hoàn áp suất giảm (1.000 lít/giờ), máy sấy phun sương 50 lít/giờ. Máy trộn chữ V 500 lít, đập viên 27 chày, bao phim 150 lít, đóng lọ, đo tỷ trọng, đo độ chảy, độ cứng; thử độ rã, độ mài mòn và độ hòa tan.

Nơi nghiên cứu: 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. Viện Kiểm nghiệm thuốc TP. HCM: Khoa Thiết lập chất chuẩn và chất đối chiếu. Cơ sở chiết xuất dược liệu tại phường 5, Đà Lạt; Nhà máy BV Pharma-Củ Chi.

3.2. Phương pháp 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

3.2.1. Nghiên cứu thành phần hóa học

Chiết xuất: Phiến lá tươi (90 kg) được rửa sạch, hấp ở 100 °C/ 10

phút, ngâm nóng với ethanol - nước (1:1), cô đến cao lỏng, lắc phân bố với chloroform (Cf), ethyl acetat (EA), *n*-butanol (Bu) thu được 60 g cao **Cf**, 30 g cao **EA** và 90 g cao **Bu**. **Phân lập:** Bằng các phương pháp sắc ký VLC, MPLC, sephadex LH-20, tinh chế bằng semi-prep. HPLC; pha tĩnh gồm silica gel 60 và C₁₈ (40-60 µm).

Chiết xuất, phân lập chất đối chiếu (CDC): Dựa vào quy trình phân lập các chất để đưa ra phương pháp phù hợp và ổn định để phân lập các CDC (≥ 500 mg), độ tinh khiết HPLC ≥ 95 %.

Xác định cấu trúc: Bằng phổ MS và NMR, so sánh với tài liệu.

3.2.2. Nghiên cứu phân tích kiểm nghiệm

a. Thiết lập chất đối chiếu (CDC):

Theo hướng dẫn của tài liệu do ASEAN ấn bản. Định tính bằng phổ UV, IR, MS, NMR. Định lượng bằng HPLC-PDA so với chuẩn sơ cấp (CSC). Đánh giá đồng nhất lô và liên phòng thí nghiệm đạt GLP. Giá trị ấn định và công bố được xác định theo hướng dẫn của ISO 13528.

b. Xây dựng quy trình định lượng:

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

- ***Lá khô Actisô: (1) Định lượng đồng thời 3 polyphenol*** chính bằng HPLC-PDA phục vụ cho tiêu chuẩn hóa dược liệu, nghiên cứu động thái tích lũy hoạt chất và kiểm nghiệm các chế phẩm trà túi lọc.
- ***Cao khô Actisô: (2) Định lượng đồng thời 4 polyphenol*** chính bằng HPLC-PDA phục vụ cho tiêu chuẩn hóa cao chiết, bán thành phẩm và chế phẩm. ***(3) Định lượng đồng thời 12 polyphenol*** bằng UPLC-PDA nhằm so sánh TPHH trong các cao chiết của BPD (lá, gân, thân, rễ, hoa) và các chế phẩm từ cao Actisô trên thị trường trong và ngoài nước.

Các bước xây dựng quy trình định lượng bao gồm: (a) Khảo sát điều kiện sắc ký (HPLC/UPLC); (b) Khảo sát quy trình chuẩn bị mẫu thử;

(c) Đánh giá quy trình định lượng theo hướng dẫn của ICH.

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 (%); Sc (diện tích đỉnh của chuẩn); St (diện tích của thử); Cc (nồng độ của chuẩn); k (độ pha loãng); m (khối lượng cân); h (độ ẩm); p (độ tinh khiết CDC)

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

a. Mẫu thử: Cao chiết nước và cao EtOH 40 và 96 % được hòa tan trong dung môi đã khảo sát (20 % DMSO, 60 % H₂O và 20 % MeOH).

b. Phương pháp thử nghiệm HTCO:

Thử nghiệm DPPH (in vitro): DPPH 0,08 mM, bước sóng 517 nm, thời gian phản ứng 30 phút. Chứng dương (acid ascorbic, silymarin).

Thử nghiệm MDA (ex vivo): Mẫu thử phản ứng với dịch đồng thể gan. Thêm đệm phosphat, ủ hỗn hợp 60 phút và dừng phản ứng bằng TCA 10 %, ly tâm, lấy dịch trong phản ứng với acid thiobarbituric, làm lạnh và đo ở 532 nm. Chứng dương là silymarin.

$$\% \text{ HTCO} = [(\text{OD}_{\text{chứng}} - \text{OD}_{\text{thử}}) / (\text{OD}_{\text{chứng}} - \text{OD}_{\text{trắng}})] \times 100.$$

Trong đó: OD: Optical density (Độ hấp thụ). Thông qua phương trình hồi quy, xác định IC₅₀ của mẫu thử. Xử lý thống kê bằng Minitab.

3.2.4. Nghiên cứu chiết xuất cao chuẩn hóa

a. Xây dựng TCCS cho nguyên liệu lá Actisô

b. Khảo sát phương pháp chiết xuất làm tăng hàm lượng cynarin

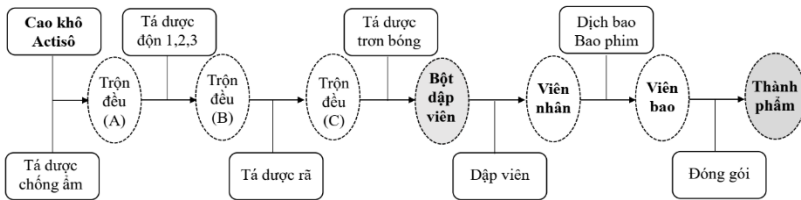
c. Nâng cấp cỡ lô cao chiết lá Actisô: 500 kg phiến lá, rửa sạch, thêm 400 lít nước, đun 100 °C ở 60 phút, rút dịch chiết và ép bã. Chiết lần 2 với 200 lít nước, 100 °C, 30 phút. Lọc và cô thành cao lỏng, sấy phun sương được cao khô nguyên chất (không độn tá dược). Thực hiện tại BV Pharma (Lâm Đồng và Củ Chi).

d. Xây dựng TCCS cho cao chiết Actisô

3.2.5. Sản xuất viên nén bao phim chứa cao Actisô (lô 15.000 viên)

a. Bào chế: Dựa vào công thức và quy trình bào chế đã khảo sát trước đây, tiến hành bào chế theo quy trình ở **Hình 2.2. Kiểm nghiệm bột dập viên** (cảm quan, độ ẩm, tốc độ chảy, góc nghỉ, định tính, định lượng). **Dập viên** (Viên tròn, 2 mặt khum, đường kính 10 mm, khối lượng trung bình 352 mg). **Kiểm tra trong quá trình dập viên** (tính chất viên, KLTB viên, độ đồng đều khối lượng, độ cứng, độ rã, độ mài mòn và định tính, định lượng, độ hòa tan). **Bao phim** (vivacoat và màu nâu tan trong nước) với lượng cồn nước (1:1) vừa đủ tạo dịch có nồng độ 10%. **Đóng gói** (lọ thủy tinh nâu, 120 viên/ lọ).

Các thông số bao phim: Nhiệt độ gió vào (55-60 °C); lưu lượng gió vào (12-16 cm³/giây); nhiệt độ gió ra (48-52 °C); lưu lượng gió ra (10-14 cm³/giây); nhiệt độ sản phẩm (42-45 °C); áp suất súng phun (2,5 bar); tốc độ bơm dịch (7-8 vòng/phút); tốc độ nồi bao (8 vòng/phút).



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

b. Kiểm tra chất lượng chế phẩm theo TCCS

c. 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.

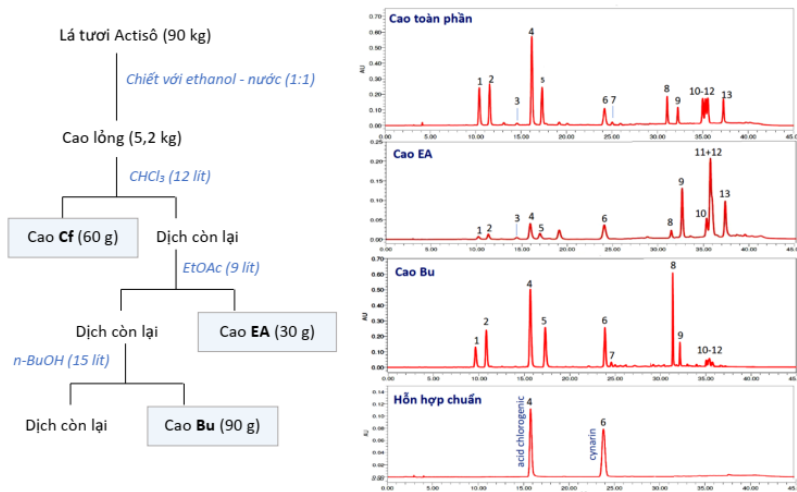
Bảng 2.9. Điều kiện đánh giá độ ổn định của chế phẩm

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

4. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

4.1. Nghiên cứu thành phần hóa học

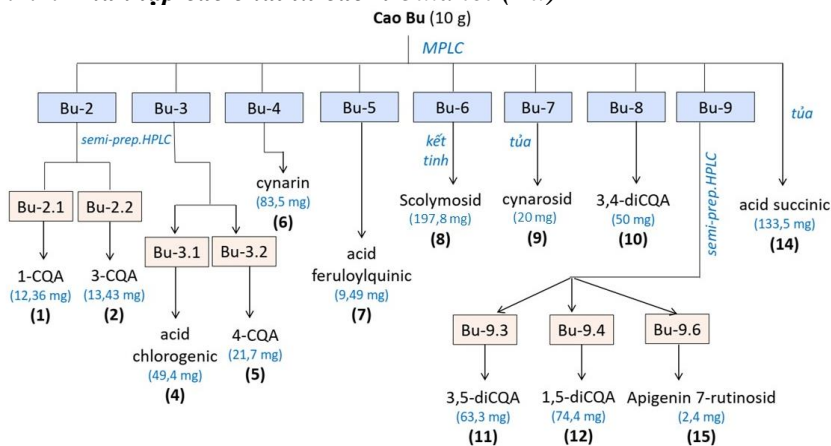
4.1.1. Chiết xuất



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

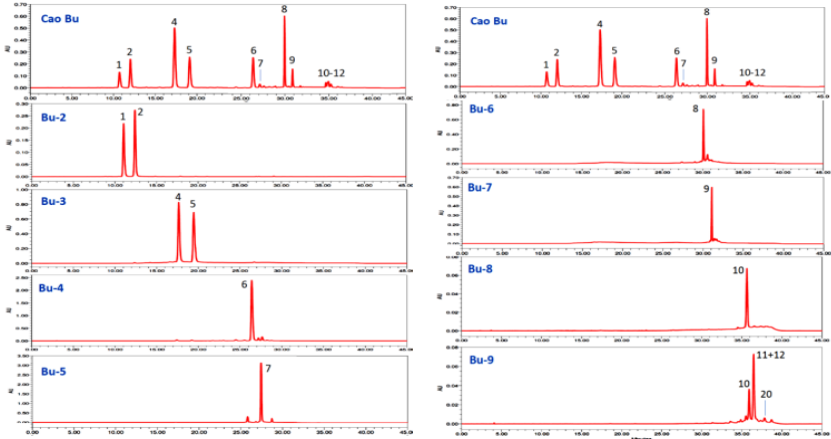
Chú thích: Các đỉnh đánh số từ 1 - 13 là các chất được phân lập của đề tài.

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



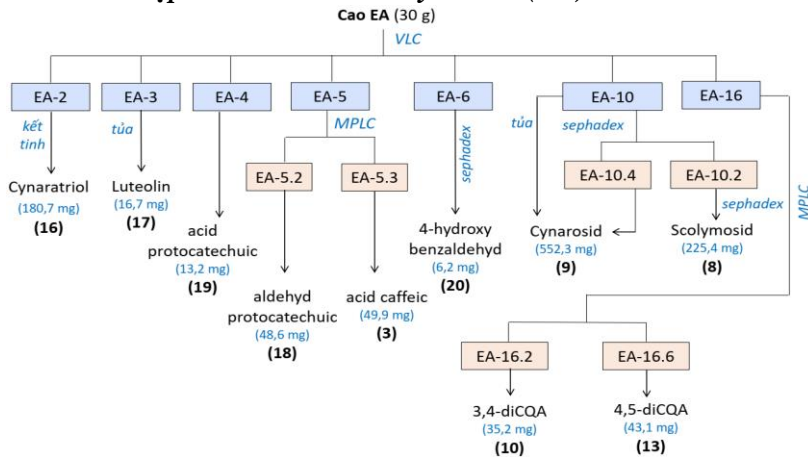
Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao Bu

Chú thích: Các chất được xác định cấu trúc bằng phổ NMR



Hình 3.3. SKĐ phân tích các phân đoạn cột MPLC của cao Bu (MPLC-Bu)

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



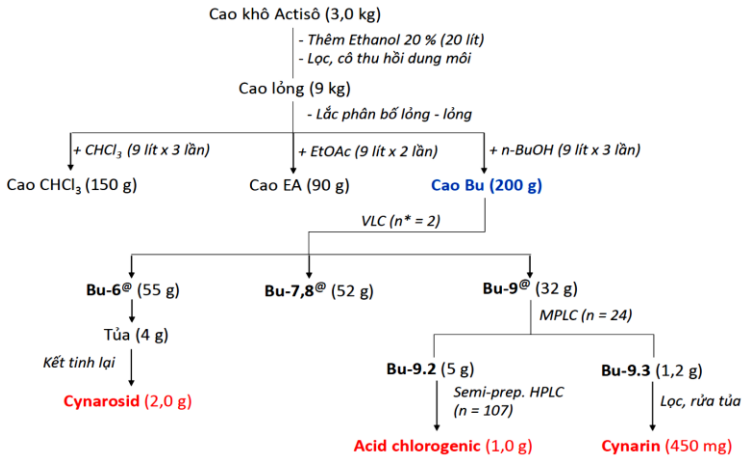
Hình 3.2. Sơ đồ phân lập các hợp chất từ cao EA

Chú thích: Các chất được xác định cấu trúc bằng phổ NMR.

4.1.4. Phân lập chất đối chiếu (CDC)

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 4.4** được lựa chọn làm nguyên liệu chiết xuất phân lập các chất CĐC.



Hình 3.3. Sơ đồ chiết xuất và phân lập các nguyên liệu CĐC

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

4.1.3. Xác định cấu trúc

Các chất phân lập đã được xác định cấu trúc bằng phổ MS và NMR, kết quả đều có sự phù hợp với các dữ liệu đã công bố (**Bảng 3.2**).

Bảng 3.1. Tổng kết các hợp chất phân lập từ cao EA và Bu

STT	Ký hiệu	Nhóm	KL ^a	Tên hợp chất ^c	KLPT	CTPT	HPLC %
1	1	mono-CQA	12,36	1-CQA ^b	354,1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	99,17
2	2		13,43	3-CQA ^b	354,1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	97,78
3	3		49,9	acid caffeic ^{b, h}	180,6	C ₉ H ₈ O ₄	97,53
4	4		49,4	acid chlorogenic ^b	354,1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	98,69
5	5		21,7	4-CQA ^b	354,1	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	97,16
6	7	di-CQA	9,49	3-feruloylquinic ^b	368,2	C ₁₇ H ₂₀ O ₉	99,67
7	6		83,5	cynarin	516,4	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	98,60
8	10		85,2	3,4-diCQA ^b	516,3	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	90,47
9	11		63,3	3,5-diCQA ^b	516,1	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	91,22
10	12		74,4	1,5-diCQA ^b	516,1	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	95,99
11	13	Đẫn xuất acid benzoic	43,1	4,5-diCQA ^b	516,2	C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂	96,39
12	18		48,6	aldehyd protocatechuic ^b	138,0	C ₇ H ₆ O ₃	95,99
13	19		13,2	acid protocatechuic ^b	154,0	C ₇ H ₆ O ₄	97,36
14	20		6,2	4-p-hydroxy benzaldehyd ^b	122,1	C ₇ H ₆ O ₂	95,24
15	8		245,4	scolymosid ^{b, e}	594,4	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	99,61
16	9	Flavonoid	750,1	cynarosid ^h	448,6	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	97,70
17	17		16,7	luteolin ^h	286,1	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	95,61
18	15		2,4	apigenin-7-rutinosid ^e	578,0	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	96,47

19	16	Sesquiterpen lacton	180,7	cynaratriol ^c	282,3	C ₁₅ H ₂₂ O ₅	- ^d
20	14	Acid hữu cơ	133,5	acid succinic	118,0	C ₄ H ₆ O ₄	97,21

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

^c: Các chất đã được xác định bằng phổ NMR. ^d: Không kiểm tra HPLC do kém phân cực và kém nhạy với đầu dò PDA. ^e: Trùng với các chất đã được phân lập năm 2011 của nhóm nghiên cứu.

4.2. Nghiên cứu phương pháp kiểm nghiệm

4.2.1. Thiết lập chất đối chiếu (CDC)

Bảng 3.19-3.20. Kết quả thiết lập CDC

	Chỉ tiêu đánh giá	A. chlorogenic	Cynarin	Cynarosid
Đồng nhất lô	Tổng khối lượng (mg)	1000	450	2000
	Khối lượng đóng mỗi lọ (mg)	10	10	10
	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)
Đồng nhất liên PTN	PTN 1 (%) (n = 6)	92,19-92,68	93,66-94,69	91,23-91,91
	PTN 2 (%) (n = 6)	92,10-92,86	94,07-94,72	91,27-92,09
	RSD % (n = 12)	0,28	0,31	0,32
Giá trị ấn định	Hàm lượng TB (%) (RSD) tính trên nguyên trạng *	92,39 (1,40)	94,26 (0,85)	91,53 (0,94)
	Độ lệch s	0,22	0,21	0,24
	Độ không đảm bảo đo μ	0,088	0,086	0,097

CSC (chuẩn sơ cấp); PTN (phòng thí nghiệm); *Hàm lượng so với CSC (HPLC-PDA)

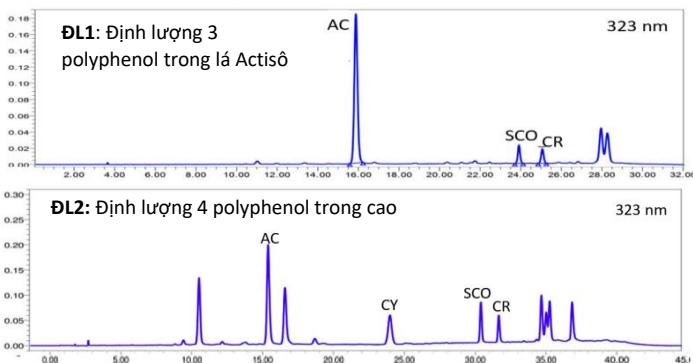
PTN 1: Khoa Thiết lập chất chuẩn – chất đối chiếu, Viện Kiểm nghiệm thuốc TPHCM

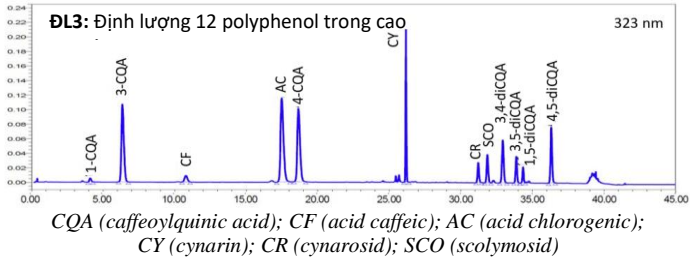
PTN 2: Khoa Vật lý đo lường, Viện kiểm nghiệm thuốc TPHCM

Xây dựng TCCS cho các CDC gồm: Cảm quan, độ tan, độ ẩm, định tính (phổ UV, IR, MS, NMR), hàm lượng % bằng HPLC-PDA.

4.2.2. Xây dựng 3 quy trình định lượng

a. Khảo sát điều kiện sắc ký:





Hình 3.12-3.15-3.18. Sắc ký đồ của 3 quy trình định lượng polyphenol trong lá và cao Actisô

ĐL 1: Cột Sunfire C_{18} (250 × 4,6 mm; 5 μ m). Pha động: ACN (A) - FA 0,1% (B). Chương trình: 8-20% A (15p); 20-25% A (3p); 25-30% A (5p); 30% A (2p); 30-95% A (1p); 95% A (5p). Tốc độ 1 ml/phút, tiêm 10 μ l. Phát hiện: 325 nm (AC) và 349 nm (SCO và CR).

ĐL 2: Cột Sunfire C_{18} (250 × 4,6 mm; 5 μ m). Pha động: ACN (A) - FA 0,1% (B). Chương trình: 8-15% A (20p); 15% A (1p); 15-30% A (9p); 30% A (5p); 30-95% A (1p); 95% A (5p). Tốc độ 1 ml/phút, tiêm 10 μ l. Phát hiện: 325 nm (AC và CY) và 349 nm (SCO và CR).

ĐL 3: Cột ThermoFisher C_{18} (100 × 2,1 mm; 2,6 μ m). Pha động: ACN (A) - TFA 0,1% (B). Chương trình: 0-3% A (20p); 3% A (2p); 3-10% A (3p); 10% A (2p); 10-12% A (2,5p); 12% A (2,5p); 12-15% A (2p); 15% A (4p); 15-90% A (4p); 90% A (3p). Tốc độ 0,8 ml/phút, tiêm 5 μ l. Phát hiện: 325 nm (mono và diCQA) và 349 nm (SCO và CR).

b. **Kết quả khảo sát điều kiện chuẩn bị mẫu thử:** **Lá khô** (0,1 g lá, 15 ml EtOH 50 %, 70 °C, siêu âm 20 phút, vớt 25 ml). **Cao khô** (20 mg cao, 1 ml MeOH 40 %, 50 °C, siêu âm 10 phút, lần 2 tương tự, vớt 5 ml).

c. **Kết quả đánh giá quy trình định lượng theo ICH:** Cả 3 quy trình đều đạt tính tương thích hệ thống, độ đặc hiệu. Khoảng tuyến tính, LOD, LOQ, độ chính xác và độ đúng được tóm tắt như sau.

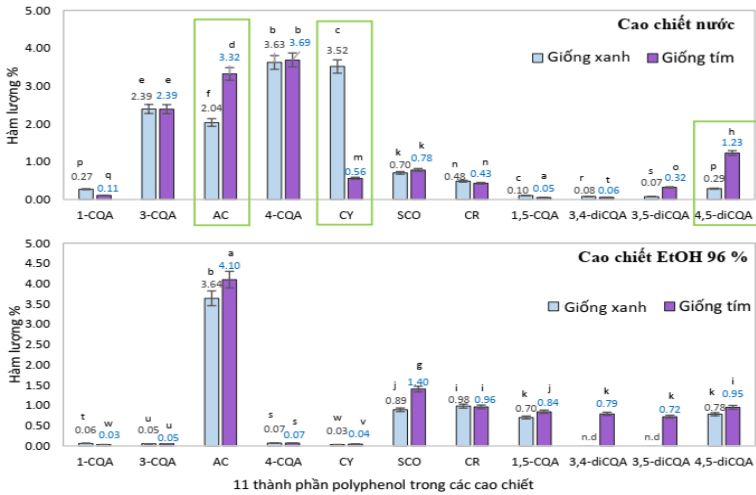
Bảng 3.27-3.29 và 3.32-3.34 và 3.38-3.40. Kết quả đánh giá theo ICH

Định lượng	Khoảng tuyến tính (μ g/ml)	LOD ^a , LOQ ^b (μ g/ml)	Độ chính xác (%RSD)		Độ đúng (%) (%RSD)
			Trong ngày	Trung gian	
QT1	1 - 200 ($R^2 > 0,998$)	^a 0,025 - 0,060 ^b 0,083 - 0,198	0,90 - 1,20	1,10 - 1,20	96,28 - 103,47 (1,3 - 3,7)
QT2	5 - 300 ($R^2 > 0,999$)	^a 0,031 - 0,125 ^b 0,103 - 0,417	1,45 - 1,88	1,73 - 2,26	93,02 - 103,97 (0,78 - 3,72)
QT3	1 - 500 ($R^2 > 0,999$)	^a 0,05 - 0,125 ^b 0,165 - 0,412	0,62 - 1,16	0,91 - 2,01	90,02 - 106,11 (0,51 - 2,78)

QT1: Định lượng AC, SCO, CR trong lá Actisô; **QT2:** Định lượng CY, AC, SCO, CR trong cao khô Actisô; **QT3:** Định lượng 12 polyphenol trong cao khô Actisô

4.2.3. Nghiên cứu động thái tích lũy

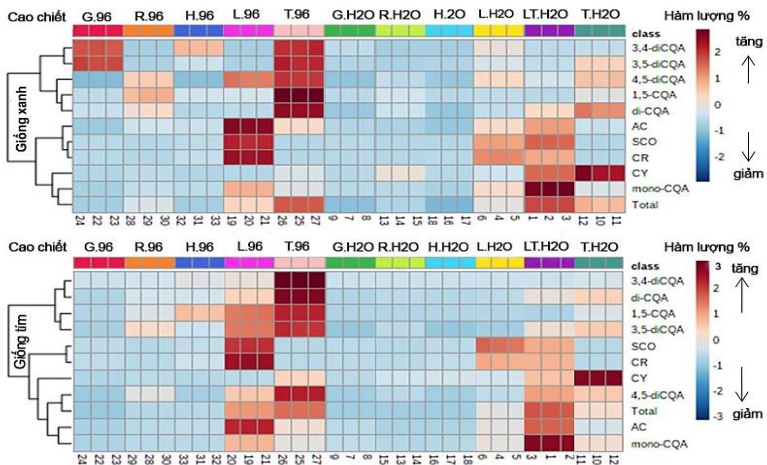
a. So sánh thành phần hoạt chất trong cao chiết của 2 giống Actisô:



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 kí tự khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$; Tukey)

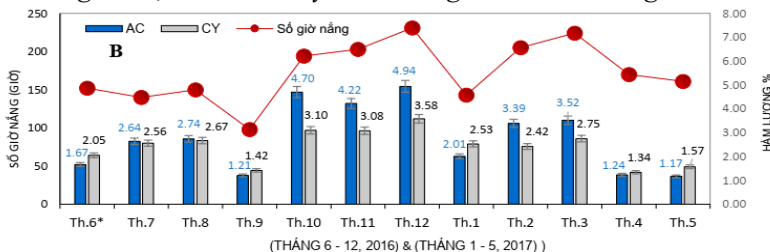
b. So sánh hoạt chất trong cao chiết từ các bộ phận của cây Actisô:



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 %).

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

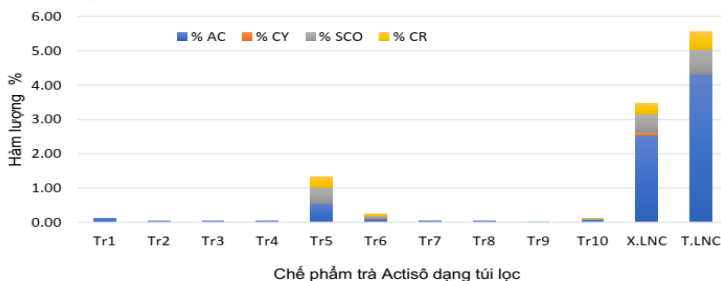


Hình 4.2. Biểu đồ hàm lượng tích lũy của AC theo thời gian thu hái và hàm lượng CY trong các cao chiết tương ứng

Số giờ nắng: Nguồn “Cục thống kê tỉnh Lâm Đồng (2012) - Niên giám thống kê năm 2017”;
*Th.6: Thu hoạch lần đầu (cây 2 tháng tuổi)

4.2.4. Định lượng các chế phẩm

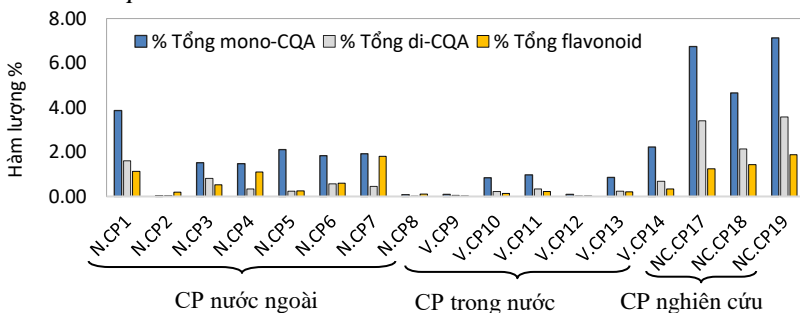
a. Các chế phẩm trà Actisô túi lọc:



Tr: Trà túi lọc Actisô; LNC: Lá Actisô nghiền cứu (Giống xanh – X.LNC và giống tím – T.LNC)

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

b. Các chế phẩm từ cao Actisô:

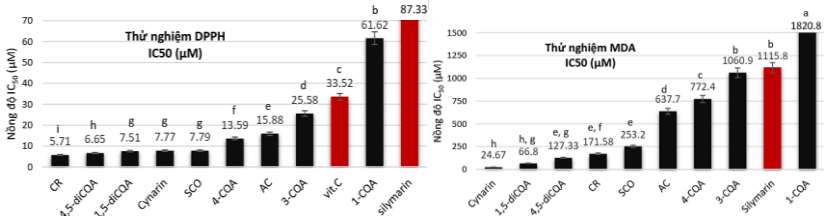


Hình 24. Biểu đồ so sánh hàm lượng % các polyphenol trong các chế phẩm Actisô

Tổng mono-CQA (1-, 3-, 5-, 4-CQA); Tổng di-CQA (1,3-, 3,4-, 3,5-, 1,5-, 4,5-diCQA); Tổng flavonoid (CR và SCO)

4.3. Tác dụng sinh học

4.3.1. Hoạt tính chống oxy hóa (HTCO) của 9 chất tinh khiết

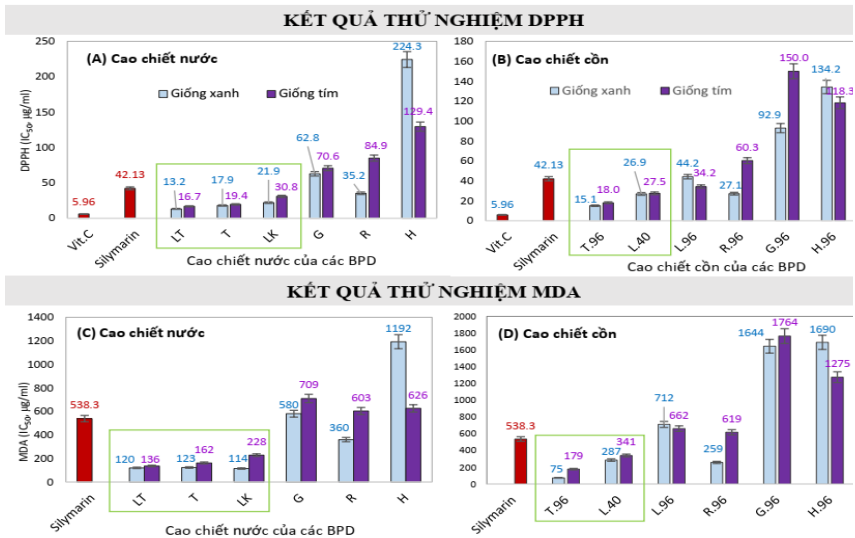


Hình 3.4. IC₅₀ μM (TB ± SD) của 9 hợp chất tinh khiết phân lập từ lá Actisô

Ghi chú: Các giá trị IC₅₀ có các ký tự theo sau khác nhau là khác biệt có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$).

- 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.

4.3.2. HTCO của các cao chiết



Hình 3.5. Biểu đồ so sánh IC₅₀ (μg/ml, n=3) của các cao chiết Actisô (giống xanh và tím)

- 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, $p < 0,05$)

4.4. Nghiên cứu chiết xuất cao Actisô

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

Từ kết quả kiểm nghiệm nguyên liệu lá Actisô ở một số mẫu thu hái tại Đà Lạt và Sapa, TCCS được đề nghị như sau:

Bảng 3.2. 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
2. Soi bột	Soi kính hiển vi	Bột có các cấu tử như mô tả
3. Độ ẩm ^a	ĐDVN V (Phụ lục 9.6)	Không quá 12 %
4. Định tính ^b	HPLC-PDA: Thực hiện theo điều kiện ở Mục 4.2.2	Có pic có t _R trùng với t _R của pic acid chlorogenic và cynarosid chuẩn
5. Độ tro ^c	ĐDVN V (Phụ lục 9.8)	Không quá 15 %
6. Tạp chất	ĐDVN V (Phụ lục 12.11)	Không quá 0,5 %
7. Định lượng ^b	HPLC-PDA: Thực hiện theo điều kiện ở Mục 4.2.2	Hàm lượng acid chlorogenic không được thấp hơn 2,5 % tính theo được liệu khô kiệt.

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

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

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

4.4.2. Kết quả khảo sát phương pháp chiết xuất cao Actisô

Bảng 3.3. 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 ± SD, n=2)	
		AC	CY
1	Quy trình 1 (QT1)	2,91 ^b ± 0,05	2,83 ^a ± 0,34
2	Quy trình 2 (QT2)	1,73 ^c ± 0,16	1,20 ^{b,c} ± 0,06
3	Quy trình 3 (QT3)	1,70 ^c ± 0,21	1,26 ^{b,c} ± 0,14
4	Quy trình 4 (QT4)	3,20 ^a ± 0,04	0,98 ^c ± 0,003
5	Quy trình 5 (QT5)	2,75 ^b ± 0,01	1,56 ^b ± 0,005

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

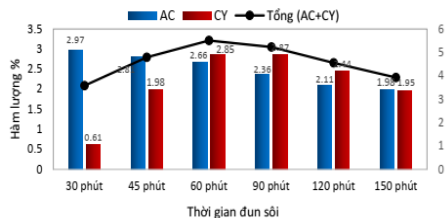
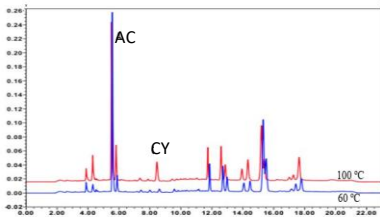
QT1: Lá tươi được đun sôi với nước

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



Hình 3.30-3.31. SKD cao chiết lá tươi ở 60 và 100 °C

Bảng 3.48. Kết quả chiết xuất cao lá Actisô thử nghiệm quy mô PTN

	Nơi thu mẫu	m 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

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

Chiết xuất 4 mẻ lá Actisô (giống xanh) trên quy mô lớn theo quy trình ở **Mục 3.2.4**. 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 (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*: Túi nhôm 1 kg hoặc 2 kg/túi, dán nhãn, bảo quản nơi mát, tránh ánh sáng.

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	NCL1.3	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;

4.4.4. Xây dựng TCCS cho cao khô Actisô

Các lô cao khô Actisô nghiên cứu (CNC1.1 - 1.3) được kiểm tra chất lượng theo TCCS đã được xây dựng dựa trên các chỉ tiêu, phương pháp của DĐVN V. Riêng chỉ tiêu định tính và định lượng được đưa vào TCCS với phương pháp thực hiện được tiến hành theo quy trình đã xây dựng.

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

Chỉ tiêu	Yêu cầu	Kết quả ^d
Mô tả:	(*)	Đúng
Định tính:		
Cynarin và acid chlorogenic bằng HPLC-PDA	Có t_R trùng với t_R của CY và AC chuẩn	Đạt
Cẩn không tan trong nước:	< 3 %	Đạt (0,31-2,03 %)
Mất khối lượng do làm khô:	≤ 6,0 %	Đạt (4,0-4,5 %)
Tro toàn phần^a:	≤ 30 ^a %	Đạt (20,8-25,1 %)
Kim loại nặng^b:	≤ 20 ppm	Đạt
Định lượng^c:		
Bảng HPLC-PDA		
- Hàm lượng (%) CY ^c (khô kiệt)	≥ 1,0 %	Đạt (1,47-2,6 %)
- Hàm lượng (%) AC (khô kiệt)	≥ 1,5 %	Đạt (1,61-2,3 %)
Độ nhiễm khuẩn^b:		
- Tổng số vi khuẩn hiếu khí /g	≤ 10.000 CFU/g	Đạt (20-2.300 CFU/g)
- Tổng số nấm men và mốc/g	≤ 100 CFU/g	Đạt (10-60 CFU/g)
- Enterobacterial/g	≤ 500 CFU/g	Đạt (<10 CFU/g)
- <i>E. coli</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>Salmonella</i> /g	Không được có	Không phát hiện

(^a) Bột vàng xám, đồng nhất, dễ hút ẩm, có mùi đặc trưng của Actisô, vị mặn, sau đắng

^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 – TCTP 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

4.5. Nghiên cứu bào chế viên nén bao phim Actisô (lô 15.000 viên)

a. Công thức và quy trình bào chế viên nén bao phim chứa 200 mg cao khô Actisô ở qui mô 450 - 3.000 viên đã được khảo sát bởi nhóm nghiên cứu (Đề tài Sở KH & Công Nghệ TP.HCM), đã được báo cáo trước đây. Công thức của viên được trình bày trong **Bảng 3.55**.

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

	Thành phần (mg)	1 viên (mg)	15.000 viên (g)	Tiêu chuẩn
Viên nhân	Cao khô Actisô (CNC1.1) (^a)	200	3.000	TCCS
	Silicon dioxit	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
Dịch bao phim	Vivacoat	15	225	USP, EP
	Màu nâu (Fioric color)	8	120	USP, EP
	Ethanol 50 % (^b)	71	1.065	TCCS
	Khối lượng viên thành phẩm	375	5.625	

^a Cao nghiên cứu có 2,3 % AC và 2,6 % CY. ^b Dung môi của dịch bao bị mất đi trong quá trình bao phim

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

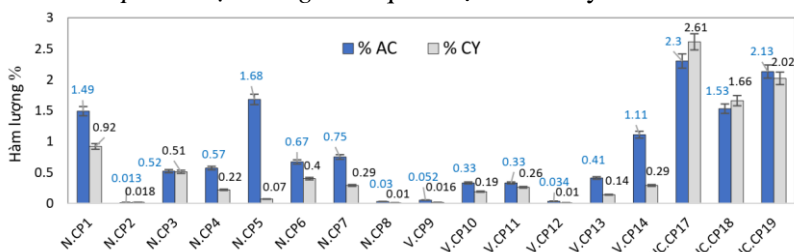
	Chỉ tiêu kiểm nghiệm	Yêu cầu	L1	L2	L3	
Bột dập viên	Cảm quan	(*)	Đạt	Đạt	Đạt	
	Độ ẩm (%)	< 4	3,21	3,25	3,26	
	Góc nghỉ (°)	< 35	32,5	32,4	32,6	
	Chỉ số nén (n = 3)		18,9	17,4	17,5	
	Tỷ số Haussner (n = 3)		1,20	1,22	1,22	
	Tốc độ chảy (g/s)	> 3,0	4,8	5,2	5,0	
Viên nhân Actisô (200 mg)	Cảm quan	(**)	Đạt	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	
	ĐBK (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	Cảm quan	(***)	Đạt	Đạt	Đạt	
	Giới hạn nhiễm khuẩn	DĐVN V	Đạt	Đạt	Đạt	
	Độ hòa tan:	AC	≥ 80	98,92	97,85	98,30
		CY		99,05	99,08	99,04
	Hàm lượng: (n = 3) %	AC	(90-110) ^b	101,95	108,69	106,52
CY		99,81		101,34	100,57	

* Bột màu vàng nâu, đồng nhất, khô toai, 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 Hàm lượng của AC và CY đo được của viên so với hàm lượng trên nhãn (chứa 5,2 mg cymarin và 4,6 mg acid chlorogenic

*b. So sánh hàm lượng CY và AC của viên nén bao phim Actisô so với các chế phẩm thị trường: Kết quả được trình bày ở **Hình 3.33**.*



Hình 3.33. Biểu đồ so sánh hàm lượng % của AC, CY trong các chế phẩm Actisô

Nhìn chung, các chế phẩm trong nước có hàm lượng % của AC và CY thấp hơn so với chế phẩm nước ngoài. 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).

c. *Khảo sát độ ổn định*: 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) (%)	≤ 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 cynarin	≥ 80	101,5	98,2	99,1	98,7	98,5
		≥ 80	100,5	99,2	98,8	99,4	98,7
7	Định lượng: (n = 3) (%) a. chlorogenic cynarin	90 -	107,84	107,54	106,74	106,04	105,48
		110	103,58	103,14	102,48	102,05	101,34

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

St t	Chỉ tiêu	Yêu cầu	Tháng				
			0	1	2	3	6
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 (%)	≤ 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 cynarin	≥ 80	101,5	100,2	99,8	99,7	99,1
		≥ 80	100,5	99,8	99,7	99,5	98,9
7	Định lượng: (n = 3) acid chlorogenic % cynarin %	90 -	107,84	107,57	107,13	107,03	106,32
		110	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; ** Max – min. Thành phần ghi trên nhãn: Viên Univerphytol chứa 5,2 mg CY và 4,6 mg AC

Viên Univerphytol 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.

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) từ 450 - 2000 mg làm nguyên liệu thiết lập chất đối chiếu (CĐC).
2. **Nghiên cứu phương pháp kiểm nghiệm:**
 - Thiết lập 3 chất đối chiếu gồm CY, AC và CR bằng cách so với CSC (HPLC-PDA), hàm lượng của 3 CĐC từ 92 - 94 %.
 - Xây dựng 3 quy trình định lượng polyphenol trong lá và cao Actisô.
 - Đề xuất 2 dự thảo về tiêu chuẩn lá và cao khô Actisô cho ĐDVN VI
 - Theo dõi động thái tích lũy hàm lượng AC trong lá Actisô theo thời gian thu hái trong năm và CY trong các cao chiết tương ứng.
 - So sánh hàm lượng 12 polyphenol trong trong các cao chiết từ các bộ phận của 2 giống cây Actisô; trong 10 chế phẩm trà túi lọc và 16 chế phẩm từ cao chiết Actisô ở trong và ngoài nước.
3. **Nghiên cứu hoạt tính chống oxy hóa (HTCO):** So sánh HTCO bằng thử nghiệm DPPH và MDA đối với 9 polyphenol phân lập và 26 cao chiết từ rễ, thân, gân lá, hoa của 2 giống Actisô.
4. **Nghiên cứu chiết xuất cao chuẩn hóa:** Khảo sát phương pháp chiết xuất làm tăng hàm lượng CY trong cao Actisô. Sản xuất cao khô chuẩn hóa Actisô (500 kg phần lá/mẻ) với hàm lượng CY và AC cao.
5. **Nghiên cứu bào chế:** Sản xuất viên nén bao phim chứa 200 mg cao Actisô (15.000 viên/lô) có hàm lượng AC và CY cao và đánh giá độ ổn định của chế phẩm.

KIẾN NGHỊ

(1) Nghiên cứu tối ưu hóa quy trình chiết xuất cao Actisô bằng phương pháp bề mặt đáp ứng. (2) Khảo sát hàm lượng AC và CY trong lá và cao chiết Actisô ở vùng trồng khác. (3) Đánh giá hàm lượng CY trong “thân xanh” và “thân đen” ở các vùng trồng khác.

DANH MỤC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CỦA TÁC GIẢ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

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), tr. 39-44
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.