

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO

BỘ Y TẾ

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

PHAN NGUYỄN TRƯỜNG THẮNG

TIÊU CHUẨN HÓA DƯỢC LIỆU, CAO ALKALOID VÀ
CAO FLAVONOID TỪ KHÔ SÂM BẮC (*Sophora
flavescens* Ait.) TRỒNG TẠI ĐẮK NÔNG

NGÀNH: KIỂM NGHIỆM THUỐC

MÃ SỐ: 62.72.04.10

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ DƯỢC HỌC

Năm 2023

Công trình được hoàn thành tại:

ĐẠI HỌC Y DƯỢC THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH

Người hướng dẫn khoa học:

Phản biện 1:

Phản biện 2

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng chấm luận án cấp trường
họp tại

vào hồi giờ ngày tháng năm

Có thể tìm hiểu Luận án tại thư viện:

- Thư viện Quốc gia Việt Nam
- Thư viện Khoa học Tổng hợp
- Thư viện Đại học

1. Giới thiệu luận án:

a. Lý do và tính cần thiết của nghiên cứu

Khổ sâm bắc (*Sophora flavescens* Ait.) được sử dụng từ lâu trong y học cổ truyền phương đông như Trung Quốc, Nhật Bản và đã được di thực về Việt Nam từ những năm 90 của thế kỷ XX. Khổ sâm bắc chữa nhiều bệnh như chóng loạn nhịp, các chứng viêm, xuất huyết tiêu hoá, lỵ và ký sinh trùng. Một số chế phẩm chứa dược liệu này được sản xuất tại Việt Nam như *Ninh tâm vương* được dùng hỗ trợ trong bệnh lý nhịp tim nhanh, *Nữ vương* hỗ trợ trong điều trị viêm nhiễm phụ khoa ở nữ giới.

Chuyên luận về *Sophora flavescens* đã được đề cập trong các ấn bản của dược điển Trung Quốc, dược điển Nhật Bản và dược điển Hồng Kông 2017 với chỉ tiêu định tính và định lượng dược liệu dựa vào 3 alkaloid chính là matrin, oxymatrin và sophoridin. Bên cạnh thành phần alkaloid, flavonoid cũng là một trong những nhóm hợp chất chính với nhiều tác dụng dược lý quý đã được chứng minh trong Khổ sâm bắc. Tuy nhiên, flavonoid vẫn chưa có trong chỉ tiêu đánh giá chất lượng của dược liệu Khổ sâm bắc, với hàm lượng cao và dược tính của flavonoid, các nhà khoa học đề nghị đưa nhóm hoạt chất này trở thành một trong những tiêu chí kiểm soát chất lượng của dược liệu này. Bên cạnh đó, một số hợp chất như kurarinon và sophoraflavanon G nằm trong nhóm này có độc tính khi dùng liều cao. Vì vậy, việc tiêu chuẩn hóa dược liệu, cao chiết alkaloid, cao chiết flavonoid sẽ giúp chuyên biệt hóa tác dụng, giảm nguy cơ gây độc cho người dùng.

Hiện nay, Dược điển Việt Nam V vẫn chưa có chuyên luận riêng về dược liệu Khổ sâm bắc, đồng thời số lượng nghiên cứu về dược liệu này tại Việt Nam còn ít gây khó khăn trong việc đánh giá

chất lượng dược liệu và chế phẩm chứa dược liệu này trong nước và ngoại nhập.

b. Mục tiêu nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện với những mục tiêu sau:

- Xây dựng quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế các alkaloid, flavonoid từ Khổ sâm bắc.
- Thiết lập chất đối chiếu các chất phân lập từ Khổ sâm bắc
- Xây dựng quy trình định tính, định lượng alkaloid, flavonoid trong Khổ sâm bắc, các cao chiết từ Khổ sâm bắc.
- Nghiên cứu thử tác dụng sinh học của các cao chiết và các chất phân lập được từ Khổ sâm bắc.
- Tiêu chuẩn hóa cao chiết và dược liệu Khổ sâm bắc.

c. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

Đối tượng nghiên cứu:

Rễ Khổ sâm bắc, các cao chiết từ rễ Khổ sâm bắc và thành phần alkaloid, flavonoid trong rễ Khổ sâm

Phương pháp nghiên cứu

- Khảo sát phương pháp chiết xuất – ngâm kiệt, cô thu hồi dung môi để chiết cao toàn phần. Chiết phân bố lỏng - lỏng để đưa ra quy trình chiết cao alkaloid và flavonoid.
- Sử dụng kết hợp các phương pháp kết tinh phân đoạn, sắc ký cột cố định, sắc ký điều chế để phân lập tinh chế alkaloid và flavonoid từ các alkaloid và cao flavonoid
- Sử dụng các phương pháp phổ nghiệm hiện đại như hồng ngoại, khối phổ và cộng hưởng từ hạt nhân để xác định cấu trúc cũng như độ tinh khiết của các 4 alkaloid và 4 flavonoid phân lập được. Từ đó thiết lập

chất đối chiếu cho 3 alkaloid và 3 flavonoid theo ISO 13528 tại tối thiểu 2 phòng thí nghiệm đạt ISO17025

- Xây dựng phương pháp sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò UV, PDA để định tính, định lượng alkaloid, flavonoid phân lập được và định tính định lượng thành phần này trong dược liệu, cao chiết Khổ sâm bắc. Ứng dụng quy trình phân tích để đánh giá động thái tích lũy của Khổ sâm bắc trồng tại Đắc Nông theo thời gian từ đó đề xuất thời điểm thu hái

- Tiêu chuẩn hóa cao toàn phần Khổ sâm bắc, cao alkaloid, cao flavonoid dựa trên kết quả đánh giá trên các lô sản xuất thực tế và liều độc tính.

- Đánh giá tác dụng chống oxy hóa, hoạt tính độc tế bào và ức chế enzym acetylcholinesterase trên *in-vitro* của cao toàn phần, cao alkaloid, cao flavonoid và các chất phân lập được.

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

1. Luận án đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 8 hoạt chất từ rễ khổ sâm: 04 alkaloid gồm matrin, oxymatrin, sophoridin và oxysophocarpin. 04 flavonoid là kurarinon, (2S)-2'-methoxykurarinon, sophoraflavanon G và isoxanthohumol.

2. Luận án thiết lập được 03 alkaloid (matrin, oxymatrin và sophoridin) và 03 flavonoid (kurarinon, isoxanthohumol, sophoraflavanon G) đạt yêu cầu CDC hóa học thứ cấp.

3. Luận án đã xây dựng và thẩm định 2 nhóm phương pháp theo ICH gồm: quy trình định tính, định lượng đồng thời 03 alkaloid trong cao toàn phần, cao alkaloid và dược liệu khổ sâm bắc bằng HPLC-PDA, quy trình định tính, định lượng đồng thời 03 flavonoid trong cao toàn phần, cao flavonoid và dược liệu khổ sâm bắc bằng HPLC-PDA.

Đã ứng dụng các quy trình trên để ứng dụng theo dõi tích lũy hoạt chất trên 6 lô dược liệu ở các thời điểm 1,5 tháng, 3,5 tháng, 6 tháng, 12 tháng và 24 tháng. Đồng thời đã ứng dụng quy trình phân tích để hoàn chỉnh 2 quy trình chiết xuất cao alkaloid và cao flavonoid

4. Luận án đã tiến hành đánh giá hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH và MDA; hoạt tính độc tế bào ung thư vú *in vitro* trên tế bào ung thư vú người MBA-MB-231; hoạt tính ức chế enzyme acetylcholinesterase thu được 1 số kết quả khả quan như cao toàn phần ức chế 69,22% hoạt tính của enzym cetylcholinesterase; isoxanthohumol, kurarinon và sophoraflavanone G thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư vú *in vitro* trên dòng tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 sau 72 giờ xử lý; cao flavonoid thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* khi khảo sát bằng phương pháp MDA với EC_{50} là $720,57 \pm 8,71$ $\mu\text{g/ml}$; cao toàn phần, cao flavonoid và Sophoraflavanon G thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* khảo sát bằng phương pháp DPPH với giá trị EC_{50} lần lượt là $254,48 \pm 6,43$ $\mu\text{g/ml}$; $139,57 \pm 6,47$ $\mu\text{g/ml}$ và $691,58 \pm 20,83$ $\mu\text{g/ml}$.

5. Luận án đã đề xuất đưa chuyên luận Khổ sâm bắc vào Dược điển Việt Nam VI bao gồm phần mô tả, định tính (vi học, sắc ký), độ tinh khiết (độ ẩm, tạp chất, tro), hàm lượng chất chiết (nước, ethanol) và định lượng. Luận án đề xuất kiểm soát tổng hàm lượng kurarinon và sophora flavanone G để hạn chế nguy cơ độc gan ở người sử dụng. Đồng thời luận án cũng đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cho các cao toàn phần, cao alkaloid, cao flavonoid Khổ sâm bắc.

e. Bố cục của luận án: Luận án gồm 166 trang: Mở đầu 2 trang, tổng quan tài liệu 45 trang, nguyên vật liệu và phương pháp nghiên cứu 28 trang, kết quả nghiên cứu 66 trang, bàn luận 22 trang, kết luận và kiến nghị 3 trang

2. Tổng quan tài liệu

a. *Khổ sâm bắc*

Khổ sâm bắc (*Sophora flavescens* Aiton) có nguồn gốc từ Trung quốc, được nhập vào Việt Nam vào khoảng đầu những năm 1970. Bộ phận thường dùng là Rễ củ. Tính đến nay, hơn 200 hợp chất đã được phân lập và xác định cấu trúc từ loài *S. flavescens*. Alkaloid và flavonoid được coi là các thành phần hợp chất chính, bên cạnh các nhóm hợp chất khác như: triterpenoid, lignan, phenyl propanoid, coumarin, acid phenolic, ... Flavonoid trong *S. flavescens* hiện diện của đa dạng các phân nhóm: flavanon, flavanonol, flavonol, chalcon, isoflavonoid, biflavonoid với nhiều tác dụng quý như: giảm đau – kháng viêm, kháng vi sinh vật, chống khối u, điều hòa đường huyết, huyết áp... Các alkaloid bao gồm chủ yếu 4 phân nhóm: kiểu matrin, kiểu cytisin, kiểu anagyrin và kiểu sophocarpin. Điều đáng chú ý là các alkaloid đặc biệt alkaloid có cấu trúc kiểu matrin đã được xác định là thành phần có nhiều tác dụng dược lý như chống ung thư, kháng viêm gan B, viêm gan C hay chữa các bệnh về tim.

Tuy nhiên, năm 2008, viên nang Zhixue có chứa cao chiết ethanol của rễ cây *Sophora flavescens* đã được Cục Quản lý Dược và Thực phẩm Trung Quốc thu hồi vì phản ứng có hại gây độc tế bào gan nghiêm trọng, ghi nhận trên 7 ca được báo cáo trên tạp chí Hepatogastroenterology năm 2010. Cơ chế gây độc được xác định là do hai thành phần prenyl flavonoid: kurarion và sophoraflavanon G đã ức chế quá trình oxy hoá các acid béo, ức chế con đường PPAR- α , cuối cùng là tích tụ lipid trong gan và tổn thương gan. Vì vậy trong khuôn khổ luận án đã đề nghị kiểm soát 2 hợp chất ***kurarion*** và

sophoraflavanone G ở một hàm lượng cho phép trong chế phẩm nhằm hạn chế độc tính trên gan khi sử dụng.

b. Chuẩn hóa dược liệu và yêu cầu chất lượng Khổ sâm bắc theo các Dược điển hiện hành

Dược liệu Khổ sâm bắc được tiêu chuẩn hóa và đưa vào dược điển Nhật Bản (JP 18), dược điển Trung quốc (CP 2020) và dược điển Hồng Kông với tên Kushen và bộ phận dùng là rễ phơi khô.

Trong dược điển Nhật bản kiểm soát chỉ tiêu: mô tả, định tính bằng phản ứng hóa học, thử độ tinh khiết (kim loại nặng, arsenic, tạp), tro toàn phần, tro không tan trong acid mà chưa kiểm soát được hàm lượng các hoạt chất chính. Trong khi đó, dược điển Trung quốc có quy định cụ thể hơn như bổ sung định tính nhóm alkaloid, định tính bằng sắc ký lớp mỏng, hàm lượng chất chiết trong nước và định lượng (matrin và oxymatrin) bằng phương pháp sắc ký lỏng.

Chuyên luận *Sophora flavescens* trong HKCMMS bổ sung thêm các chỉ tiêu chất lượng như định tính vi học bằng vi phẫu; định tính matrin, oxymatrin, sophoridin bằng sắc ký lỏng và sắc ký lớp mỏng. Chỉ tiêu an toàn cũng bổ sung kiểm soát: dư lượng thuốc trừ sâu; Mycotoxin; dư lượng sulfur dioxit. Ngoài chất chiết được trong nước cũng bổ sung thêm chất chiết trong ethanol đồng thời định lượng sử dụng tổng alkaloid trên 3 chất đối chiếu là matrin, oxymatrin, sophoridin tính trên dược liệu khô.

c. Giới thiệu về cao dược liệu

Hiện nay Dược điển Việt Nam và các Dược điển tham chiếu hiện hành (dược điển Mỹ - USP; dược điển Anh - BP; dược điển Châu Âu - EP; dược điển Nhật - JP) và dược điển Trung Quốc - CP đều có chuyên luận chung về cao dược liệu, nhưng chỉ có EP và BP có phân biệt cao

chuẩn hóa và cao định chuẩn. **Cao chuẩn hóa (Standardized extracts)** là cao được điều chỉnh theo hàm lượng xác định của một hoặc nhiều thành phần có hoạt tính điều trị đã biết. Có thể sử dụng các tá dược trợ để điều chỉnh nồng độ dược chất mong muốn hoặc trộn các lô cao chiết với nhau. **Cao định chuẩn (Quantified extracts)** là cao được điều chỉnh theo một hoặc nhiều chất đánh dấu có hoạt tính (active markers). Hàm lượng của chất này được kiểm soát trong một phạm vi giới hạn xác định. Sự điều chỉnh được thực hiện bằng cách trộn các lô cao chiết với nhau. **Các loại cao khác (cao nguyên liệu)** là cao không được điều chỉnh theo hàm lượng cụ thể của các thành phần. Để kiểm soát chất lượng cao, có thể sử dụng một hay nhiều thành phần như chất đánh dấu phân tích (analytical markers). Các chuyên luận riêng cho các loại cao này thường đưa ra mức hàm lượng tối thiểu cho các chất đánh dấu. Không được phép sử dụng tá dược trợ để điều chỉnh hàm lượng của các thành phần được kiểm soát. Hàm lượng của thành phần cần kiểm soát trong các loại cao này phải không được thấp hơn giá trị tối thiểu được đưa ra trong phần định nghĩa của từng chuyên luận riêng.

3. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

a. Đối tượng nghiên cứu

Rễ Khổ sâm bắc (*Sophora flavescens* Ait.): được cung cấp bởi công ty BV Pharma, địa chỉ trồng tại xã Đắc Ha, huyện Đắc Glong, Đắc Nông vào tháng 09 năm 2016 và tháng 02/2017 – 02/2019. Các cao chiết và thành phần alkaloid, flavonoid từ rễ Khổ sâm bắc.

b. Phương pháp nghiên cứu

i. *Xây dựng quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế các alkaloid, flavonoid từ Khổ sâm bắc*

- Xác định tính đúng và đánh giá chất lượng chất lượng rễ Khổ sâm bắc đầu bằng nhận dạng, vi phẫu, soi bột, định tính, định lượng theo chuyên

luận *Sophora flavescens* trong Dược điển Hồng Kông; định danh gen sử dụng chiết tách bằng bộ KIT Gene JET Plant Genomic DNA Purification Mini Kit, sau đó giải trình tự bằng phương pháp Sanger trên máy 3130XL của AIB và so sánh trên DNA bằng cách tra cứu trên NCBI

- Khảo sát điều kiện chiết cao toàn phần với tác nhân làm ẩm là acid acetic 1% và HCl 1% với dung môi chiết methanol, ethanol 96% và nước. Khảo sát yếu tố loại acid và số lần chiết phân bố với ethyl acetat cho cao flavonoid. Từ dịch nước còn lại khảo sát yếu tố loại kiềm và số lần lắc phân bố với chloroform cho cao alkaloid.

- Từ cao flavonoid tách thành các phân đoạn bằng sắc ký cột chân không, các phân đoạn flavonoid sẽ được sắc ký điều chế để thu được các flavonoid có độ tinh khiết cao. Cao alkaloid được tiến hành kết tinh phân đoạn với chloroform - ether ethylic (1:7) thu được cao alkaloid kết tinh. Tiến hành kết tinh lại 2 lần nữa với kết tinh thu được. Phân đoạn kết tinh và không kết tinh sẽ được sắc ký điều chế với điều kiện sắc ký để thu được các alkaloid với độ tinh khiết cao. Các chất sau phân lập được tiến hành đánh giá độ tinh khiết trên sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng, sau đó các chất được xác định cấu trúc dựa trên các phương pháp phổ nghiệm (UV, IR, MS, NMR,..)

ii. Thiết lập chất đối chiếu

- Tiến hành lựa chọn marker dựa trên các bảng tiêu chí cụ thể, sau đó đánh giá độ tinh khiết và xây dựng tiêu chuẩn chất lượng chất đối chiếu. Tiến hành đóng lọ, đánh giá đồng nhất lô, so sánh liên phòng, xác định giá trị ấn định và độ không đảm bảo đo theo theo ISO 13528 tại tối thiểu 2 phòng thí nghiệm đạt ISO17025.

iii. Xây dựng quy trình định tính, định lượng alkaloid, flavonoid trong rễ Khổ sâm, các cao chiết từ rễ Khổ sâm

- Xây dựng và thẩm định qui trình định tính, định lượng flavonoid, alkaloid theo ICH trên các nền mẫu: rễ Khổ sâm bắc, cao toàn phần, cao flavonoid và cao alkaloid, tiến hành xây dựng phương pháp định tính, định lượng bằng phương pháp sắc ký lớp mỏng và sắc ký lỏng hiệu năng cao đầu dò PDA. Ứng dụng đánh giá sự thay đổi của nhóm alkaloid và flavonoid trên 6 lô dược liệu trồng tại Đắk Nông ở các thời điểm 1,5; 3,5; 6; 12; 24 tháng. Ứng dụng để hoàn thiện quy trình chiết xuất cao toàn phần, cao alkaloid, cao flavonoid trên quy mô lớn

iv. *Đánh giá tác dụng sinh học của cao toàn phần, cao alkaloid, cao flavonoid và các chất phân lập*

- Khảo sát hoạt tính chống oxy hóa bằng phương pháp DPPH và MDA trên mẫu thử cao toàn phần, cao alkaloid, cao flavonoid và các chất phân lập được so sánh với chuẩn là quercetin và xác định EC50

- Khảo sát hoạt tính độc tế bào ung thư vú *in vitro* tính trên tỷ lệ tế bào sống dựa vào hoạt tính của enzym succinat dehydrogenase với chứng dương doxorubicin

- Khảo sát ức chế enzym acetylcholinesterase dựa trên cơ chế cơ chất acetylthiocholin iodid bị thủy phân nhờ xúc tác của enzym acetylcholinesterase tạo thiocholin. Sản phẩm thiocholin phản ứng với thuốc thử acid 5-5'-dithiobis-2-nitrobenzoic tạo thành hợp chất acid 5-thio-2-nitro benzoic có màu vàng. Lượng hợp chất màu được tạo thành này tỷ lệ thuận với hoạt độ của enzym acetylcholinesterase

v. *Tiêu chuẩn hóa dược liệu và cao chiết*

- Đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cho chuyên luận Khổ sâm bắc với các chỉ tiêu chung theo các Dược điển hiện hành. Mức chất lượng dựa trên các dược điển hiện hành và thực tế đánh giá mẫu thử

- Đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cho cao alkaloid, cao flavonoid gồm mô tả, định tính, định lượng, tro toàn phần, kim loại nặng, giới hạn

nhiễm khuẩn. Mức chất lượng dựa trên các dược điển hiện hành quy đổi về tỉ lệ chiết xuất, liều độc tính dược công bố và thực tế đánh giá mẫu thử.

4. Kết quả

i. *Xây dựng quy trình chiết xuất, phân lập và tinh chế các alkaloid, flavonoid từ Khổ sâm bắc*

- Về cảm quan, vi học (vi phẫu và soi bột) Khổ sâm bắc có những đặc điểm như mô tả của Dược điển Hồng Kông. Kết quả định danh loài cho thấy dược liệu nghiên cứu đúng là Khổ sâm bắc (*Sophora flavescens* Ait.) với mức độ tương đồng là 99,0 % so với ngân hàng dữ liệu (NCBI). Trên sắc ký lớp mỏng với hệ dung môi: ammoniac (đđ) - nước - ethanol - ethyl acetat (1.5:1:3.5:15, tt/tt), sắc ký đồ dược liệu cho ba vết có màu sắc và R_f tương đương với vết của chuẩn matrin, oxymatrin, sophoridin. Trên sắc ký lỏng, mẫu dược liệu cũng cũng định tính đúng các chất matrin, oxymatrin, sophoridin và hàm lượng tổng alkaloid là 2,9 % đạt yêu cầu để nghiên cứu

- Từ 4,05 kg dược liệu bằng phương pháp ngâm kiệt với ethanol 96 % trong 30 giờ với tác nhân làm ẩm là acid acetic 1% thu được 66 lít dịch chiết toàn phần, cô thu hồi dung môi thu được 1097,0 g cao toàn phần.

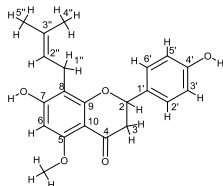
- Từ 1097,0 g cao toàn phần, tiến hành phân tán trong nước, điều chỉnh pH 2 với acid acetic, tiến hành chiết phân bố với ethyl acetat 3 lần thu được dịch, cô thu hồi dung môi thu được 207,0 g cao flavonoid. Từ dịch nước còn lại, tiến hành kiểm hóa bằng ammoniac về pH 10, tiến hành chiết phân bố với cloroform 3 lần thu được dịch, cô thu hồi dung môi thu được 42,3 cao alkaloid.

- Từ 20,05 g cao flavonoid đã điều chế tiến hành sắc ký cột chân không với dung môi rửa giải n-hexan - ethyl acetat (10:0 - 6:4), thu được 15 phân đoạn, từ phân đoạn XII, theo điều kiện sắc ký điều chế sử dụng

cột gemini C18 (250 x 21,2 mm; 10 μ m) và pha động acetonitril - nước (gradient) thu được 4 chất SF3 – SF6.

- Từ 42,3 g cao alkaloid đã điều chế tiến hành kết tinh phân đoạn, thu được phân đoạn kết tinh và không kết tinh. Từ phân đoạn kết tinh, tiến hành sắc ký điều chế với cột Gemini C18 (250 x 21,2 mm; 5 μ m), pha động methanol – acid trifloroacetic 0,015 % (6:94) thu được hai chất là A1 và A2. Từ phân đoạn không kết tinh, tiến hành sắc ký điều chế với điều kiện cột tương tự nhưng với hệ pha động methanol – acid trifloroacetic 0,015 % (gradient) thu được hai chất là A3 và A4.

- Các chất sau khi phân lập được xác định độ tinh khiết trên 3 hệ sắc ký lớp mỏng và trên sắc ký lỏng đều cho kết quả 1 vết, vì vậy các SF3, SF4, SF5, SF6 và A1, A2, A3, A4 đủ tinh khiết để tiến hành xác định cấu trúc. Cấu trúc các chất được xác định là



Isoxanthohumol (SF3)

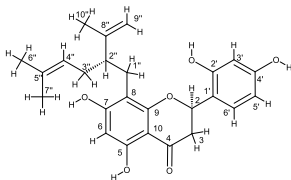
- Phổ ^{13}C -NMR: 77,8 (C-2); 44,6 (C-3); 188,2 (C-4); 161,5 (C-5); 92,7 (C-6); 159,6 (C-7); 107,4 (C-8); 161,3 (C-9); 104,5 (C-10); 129,9 (C-1'); 127,8 (C-2',6'); 115,0 (C-3',5'); 157,3 (C-4'); 21,5 (C-1''); 122,9 (C-2''); 129,6 (C-3''); 17,5 (C-4''); 25,5 (C-5''); 55,3 (OMe)

-Bột màu trắng ngà

-Phổ hấp thụ IR cho các đỉnh (ν , cm^{-1}): 3161,1; 1647,5; 1089,6

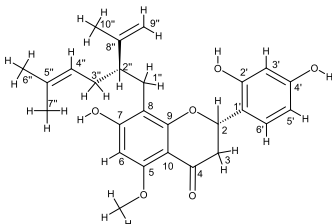
-Phổ khối ESI $^{-}$ -MS, m/z: 354,1467

-Phổ ^1H -NMR: 5,32 (1H; dd; J=2,8Hz; 12,4Hz; H-2); 2,57 (1H; dd; J=3,2Hz; 16,4Hz; H-3a); 2,94 (1H; dd; J=12,4Hz; 16,4Hz; H-3b); 6,14 (1H; s; H-6); 7,29 (2H; d; J=8,4Hz; H-2',6'); 6,77 (2H; d; J=8,4Hz; H-3',5'); 3,11 (2H; d; J=7,0Hz; H-1''); 5,09 (1H; t; J=1,2Hz; J=7,2Hz); 1,59 (3H; s; H-4''); 1,54 (3H; s; H-5''); 3,70 (3H; s; OMe)



Sophoraflavanone G (SF4)

- Phổ ^{13}C -NMR: 73,9 (C-2); 41,5 (C-3); 197,1 (C-4); 161,1 (C-5); 95,2 (C-6); 164,8 (C-7); 106,4 (C-8); 160,7 (C-9); 101,6 (C-10); 115,8 (C-1'); 155,4 (C-2'); 102,3 (C-3'); 158,3 (C-4'); 106,3 (C-5'); 127,6 (C-6'); 26,5 (C-1''); 46,3 (C-2''); 30,7 (C-3''); 123,3 (C-4''); 130,6 (C-5''); 25,4 (C-6''); 17,5 (C-7''); 147,8 (C-8''); 110,7 (C-9''); 18,6 (C-10'').



Kurarinon (SF5)

-Phổ ^{13}C -NMR: 74,0 (C-2); 44,8 (C-3); 189,4 (C-4); 160,1 (C-5); 55,7 (OMe); 92,9 (C-6); 162,5 (C-7); 107,4 (C-8); 162,9 (C-9); 104,8 (C-10); 116,8 (C-1'); 155,7 (C-2'); 102,8 (C-3'); 158,6 (C-4'); 106,7 (C-5'); 127,7 (C-6'); 27,3 (C-1''); 46,8 (C-2''); 31,2 (C-3''); 123,9 (C-4''); 131,1 (C-5''); 26,0 (C-6''); 18,0 (C-7''); 148,4 (C-8''); 111,2 (C-9''); 19,1 (C-10'').

-Bột màu trắng ngà

-Phổ hấp thụ IR cho các đỉnh (ν , cm^{-1}): 3161,1; 1647,5; 1089,6

-Phổ khối ESI⁽⁻⁾-MS, m/z: 354,1467

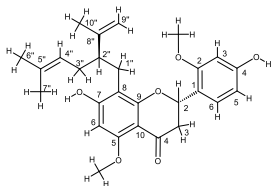
-Phổ ^1H -NMR: 5,45 (1H, dd, $J=13,2$; 2,8Hz; H-2); 3,08 (1H, dd, $J=17,2\text{Hz}; 13,2\text{Hz}$; H-3a); 2,61 (1H, dd, $J=17,2\text{Hz}; 2,8\text{Hz}$; H-3b); 5,94 (1H, s; H-6); 6,35 (1H, d, $J=2,2\text{Hz}$; H-3'); 6,26 (1H, dd, $J=2,2\text{Hz}, 8,4\text{Hz}$; H-5'); 7,22 (1H, d, $J=8,4\text{Hz}$; H-6'); 2,46 (2H, m; H-1''); 2,40 (1H, m, H-2''); 1,89 (2H, m, H-3''); 4,90 (1H, m, H-4''); 1,53 (3H, s, H-6''); 1,43 (3H, s, H-7''); 4,49 (1H, br, H-9'a); 4,56 (1H, br, H-9'b); 1,57 (3H, s, H-10'')

-Bột màu trắng ngà

-Phổ hấp thụ IR cho các đỉnh (ν , cm^{-1}): 3161,1; 1647,5; 1089,6

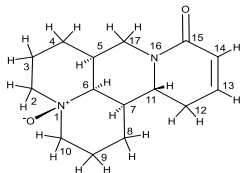
-Phổ khối ESI⁽⁻⁾-MS, m/z: 354,1467

-Phổ ^1H -NMR: 5,38 (1H, dd, $J=13,2$ Hz; 2,8 Hz; H-2); 2,78 (1H, dd, $J=13,2\text{Hz}; 13,2\text{Hz}$; H-3a); 2,44 (1H, dd, $J=2,8$ Hz; 13,6 Hz; H-3b); 3,74 (3H, s, -OMe); 6,13 (1H, s, H-6); 6,27 (1H, d, $J=2$ Hz; H-3'); 6,34 (1H, dd, $J=1,6$ Hz; 8,4 Hz; H-5'); 7,21 (1H, d, $J=8,4$ Hz; H-6'); 2,48 (2H, m, H-1''); 2,41 (1H, m, H-2''); 1,91 (2H, m, H-3''); 4,96 (1H, t, $J=6,8$ Hz; H-4''); 1,53 (3H, s, H-6''); 1,45 (3H, s, H-7''); 4,57 (1H, s, H-9'a); 4,53 (1H, s, H-9'b); 1,57 (3H, s; H-10'').



(2S)-2'-methoxykurarionon (SF6)

-Phổ ^{13}C -NMR: 73,6 (C-2); 44,6 (C-3); 189,2 (C-4); 160,1 (C-5); 55,9 (5-OMe); 93,1 (C-6); 160,9 (C-7); 107,3 (C-8); 162,8 (C-9); 104,7 (C-10); 118,0 (C-1'); 157,7 (C-2'); 55,7 (2'-OMe); 99,3 (C-3'); 159,3 (C-4'); 107,3 (C-5'); 127,8 (C-6'); 26,0 (C-1''); 46,7 (C-2''); 31,2 (C-3''); 123,9 (C-4''); 131,0 (C-5''); 26,0 (C-6''); 18,0 (C-7''); 148,4 (C-8''); 111,2 (C-9''); 19,0 (C-10'').



Oxysofocarpin (A1)

-Phổ ^{13}C -NMR: 69,0 (C-2); 17,2 (C-3); 26,2 (C-4); 33,6 (C-5); 67,1 (C-6); 40,7 (C-7); 24,9 (C-8); 17,2 (C-9); 69,3 (C-10); 51,6 (C-11); 28,9 (C-12); 137,1 (C-13); 125,0 (C-14); 166,4 (C-15); 42,6 (C-17).

-Bột màu trắng ngà

-Phổ hấp thụ IR cho các đỉnh (ν , cm^{-1}): 3161,1; 1647,5; 1089,6

-Phổ khối ESI $^{-}$ -MS, m/z: 354,1467

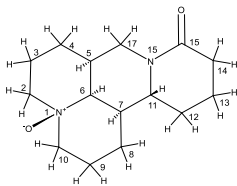
-Phổ ^1H -NMR: 5,44 (1H, d, J=11,2 Hz, H-2); 3,19 (1H, br s, H-3a); 2,84 (1H, dd, J=16,4 Hz; 3,2 Hz; H-3b); 3,71 (3H, s, -5-OMe); 6,13 (1H, s, H-6); 3,74 (3H, s, 2'-OMe); 6,45 (1H, s, H-3'); 6,41 (1H, d, J=8,4 Hz, H-5'); 7,30 (1H, d, J=8 Hz, H-5''); 2,46 (2H, m, H-1''); 2,42 (1H, m, H-2''); 1,94 (2H, sext, J=8,8 Hz, H-3''); 4,88 (1H, br t, J=6,4 Hz, H-4''); 1,54 (3H, s, H-6''); 1,44 (3H, s, H-7''); 4,57 (1H, s, H-9'a); 4,49 (1H, s, H-9'b); 1,59 (3H, s, H-10'')

-Bột màu trắng ngà

-Phổ hấp thụ IR cho các đỉnh (ν , cm^{-1}): 3161,1; 1647,5; 1089,6

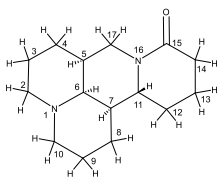
-Phổ khối ESI $^{-}$ -MS, m/z: 354,1467

-Phổ ^1H -NMR: 3,17 (1H, m, H-2a); 3,06 (1H, m, H-2b); 2,63 (1H, m, H-3); 1,93 (1H, m, H-5); 3,06 (1H, m, H-6); 2,63 (1H, m, H-9); 3,17 (1H, m, H-10a); 3,06 (1H, m, H-10b); 5,07 (1H, m, H-11); 2,70 (1H, m, H-12a); 1,93 (1H, m, H-12b); 6,44 (1H, m, H-13); 5,90 (1H, d, 8 Hz, H-14); 4,06 (1H, dd, 6 Hz, 12,5 Hz; H-17); 1,53 – 1,73 (5H, m)



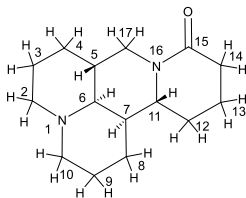
Oxymatrin (A2)

-Phổ ^{13}C -NMR: 69,6 (C-2); 17,3 (C-3); 26,2 (C-4); 34,6 (C-5); 67,3 (C-6); 42,8 (C-7); 24,8 (C-8); 17,3 (C-9); 69,2 (C-10); 53,0 (C-11); 28,6 (C-12); 18,7 (C-13); 33,0 (C-14); 170,2 (C-15); 41,8 (C-17).



Matrin (A3)

-Phổ ^{13}C -NMR: 58,4 (C-2); 22,2 (C-3); 28,1 (C-4); 36,9 (C-5); 65,1 (C-6); 42,9 (C-7); 27,3 (C-8); 21,7 (C-9); 58,3 (C-10); 54,8 (C-11); 28,8 (C-12); 19,6 (C-13); 33,4 (C-14); 172,1 (C-15); 44,6 (C-17).



Sophoridin (A4)

Bột màu trắng ngà

-Phổ hấp thu IR cho các đỉnh (ν , cm^{-1}): 3161,1; 1647,5; 1089,6

-Phổ khối ESI $^{-}$ -MS, m/z: 354,1467

-Phổ ^1H -NMR: 3,17 (2H, m, H-2); 2,62 (1H, m, H-3); 3,06 (1H, m, H-6); 2,05 (1H, m, H-8); 2,67 (1H, m, H-9); 3,08 (1H, m, H-10); 2,22 (1H, m, H-12a); 1,23 (1H, m, H-12b); 2,26 (1H, m, H-14a); 2,45 (1H, m, H-14b); 4,40 (1H, dd, 5,5 Hz; 12 Hz, H-17); 4,15 (1H, t, 12,5 Hz); 1,54 – 1,88 (9H, m).

-Bột màu trắng ngà

-Phổ hấp thu IR cho các đỉnh (ν , cm^{-1}): 3161,1; 1647,5; 1089,6

-Phổ khối ESI $^{-}$ -MS, m/z: 354,1467

-Phổ ^1H -NMR: 2,83 (2H, m, H-10); 3,83 (1H, m, H-11); 4,30 (1H, dd, H-17a); 3,07 (1H, t, H-17b); 3,38 – 1,97 (7H, m); 1,95 – 1,40 (14H, m)

Bột màu trắng ngà

-Phổ hấp thu IR cho các đỉnh (ν , cm^{-1}): 3161,1; 1647,5; 1089,6

-Phổ khối ESI $^{-}$ -MS, m/z: 354,1467

-Phổ ^1H -NMR: 2,08 (2H, m, H-2a); 2,79 (2H, m, H-2b); 1,96 (2H, m, H-3); 1,87 (2H, m, H-4); 1,96 (2H, m, H-5); 2,27 (2H, m, H-6); 2,08 (2H, m, H-10a);

-Phổ $^{13}\text{C-NMR}$: 57,5 (C-2); 23,6 (C-3); 28,7 (C-4); 31,5 (C-5); 63,6 (C-6); 41,7 (C-7); 22,9 (C-8); 22,9 (C-9); 50,7 (C-10); 56,7 (C-11); 30,7 (C-12); 19,5 (C-13); 33,0 (C-14); 172,6 (C-15); 48,9 (C-17). 2,79 (2H, m, H-10b); 3,42 – 3,23 (3H, m, H-11); 1,87 (2H, m, H-12); 2,27 (2H, m, H-14); 3,42 – 3,23 (3H, m); 1,86 – 1,04 (10H, m)

ii. *Thiết lập chất đối chiếu*

- Dựa trên các tiêu chí lựa chọn marker, các chất matrin, oxymatrin, sophoridin, isoxanthohumol, kurarinon và sophoraflavanon G được đánh giá bằng phương pháp $^1\text{H-NMR}$ cho thấy độ tinh khiết cao đều trên 97 %: matrin 97,54%, oxymatrin: 99,41%, sophoridin: 100,90%, Isoxanthohumol: 99,84%, kurarinon: 99,94%, sophoraflavanon G: 99,87% đủ điều kiện đánh giá chất đối chiếu.

- Quy trình định lượng marker bằng HPLC-PDA được thẩm định theo ICH từ tương thích hệ thống, độ đặc hiệu, độ lặp, độ chính xác, độ đúng, đáp ứng yêu cầu công bố tiêu chuẩn chất lượng chất đối chiếu.

- Tiến hành đồng lọ, đánh giá đồng nhất lô, đánh giá liên phòng ở 2 phòng thí nghiệm đạt GLP và ISO/IEC 17025 và sử dụng phân tích thống kê Robust analysis: Algorithm A (ISO 13528 (2015) để xác định giá trị ấn định thu được matrin (39 lọ, 97,9%), oxymatrin (48 lọ, 97,4%), sophoridin (20 lọ, 98,6%), Isoxanthohumol (36 lọ, 99,1%), kurarinon (27 lọ, 100,1%), sophoraflavanon G (10 lọ, 98,5%).

iii. *Xây dựng quy trình định tính, định lượng alkaloid, flavonoid trong rễ Khổ sâm, các cao chiết từ rễ Khổ sâm*

a. Quy trình định tính alkaloid bằng sắc ký lớp mỏng trên dược liệu, cao toàn phần và cao alkaloid với hệ dung môi triển khai: ammoniac 25% - nước – ethanol – ethyl acetat (1,5:1:3,5:15), thuốc thử phát hiện Dragendoff và quy trình định tính flavonoid bằng sắc ký lớp mỏng trên dược liệu, cao toàn phần và cao flavonoid với hệ dung môi triển khai:

cloroform – methanol – ammoniac 25% (50:10:3), phát hiện bằng UV 365 nm và thuốc thử Sắt (III) clorid 5%/ethanol cho độ đặc hiệu cao.

b. Qui trình định tính định lượng flavonoid trong dược liệu và cao chiết đạt yêu cầu thẩm định theo ICH sử dụng hệ thống Shimadzu LC-2030C 3D, đầu dò PDA, cột C18 (250 mm x 4,6mm x 5 µm), thể tích tiêm: 10 µl, tốc độ dòng: 1 ml/phút, bước sóng phát hiện: 290 nm, pha động: acetonitril(A) - nước (B) theo tỉ lệ 0-15 phút: 40%A; 15-40 phút: 40-60%A; 40-45 phút: 60-80%A; 45-50 phút: 80%A; 50-55 phút: 80-40%A; 55-60 phút: 40 %A

Kết quả thẩm định phương pháp định tính và định lượng các flavonoid trong dược liệu

Chỉ tiêu	Thông số	Isoxanthohumol	Kurarininon	Sophoraflavanon G
1. Tính đặc hiệu	Rt (phút)	12,06	22,35	32,80
	Phổ UV	Đạt	Đạt	Đạt
	Mẫu trắng	Đạt	Đạt	Đạt
2. Độ thích hợp của hệ thống	RSD _s (%)	0,77	0,80	0,79
	RSD _{IR} (%)	0,14	0,09	0,08
	Tf	1,43	1,34	1,47
	Rs		10,5	10,4
	N	3484	6157	23728
3. Đường chuẩn	Hệ số tương quan r	a = 9E+06 b = -16709 r = 0,9999	a = 6E+06 b = -6032.2 r = 0,9999	a = 6E+06 b = -9902.5 r = 0,9998
4. Độ đúng	Độ phục hồi (%)	98,67	101,04	97,45
5. Khoảng xác định (µg/ml)		14,8 – 370,5	19,8 – 495,5	19,9 – 498,0
6. Độ chính xác				
6.1. Độ lặp lại	RSD (%)	1,86	1,21	1,41
6.2. Độ chính xác trung gian	RSD (%)	1,57	1,33	1,85

Kết quả thẩm định phương pháp định tính và định lượng các flavonoid trong cao toàn phần và cao flavonoid bằng HPLC-PDA

Chỉ tiêu	Thông số	Cao toàn phần			Cao flavonoid		
		Isoxanthohumol	Kurarinon	Sophoraflavanon G	Isoxanthohumol	Kurarinon	Sophoraflavanon G
1. Tính đặc hiệu	Rt (phút)	11,095	20,687	29,287	11,342	22,112	33,828
	Phổ UV	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	Mẫu trắng	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
2. Độ thích hợp của hệ thống	RSD _S (%)	0,93	0,68	0,86	1,80	0,77	0,73
	RSD _{IR} (%)	0,22	0,11	0,17	0,41	0,13	0,26
	Rf	1,2	1,2	1,3	1,0	1,2	1,0
	R _s		17,8	17,4		19,9	12,0
	N	31411	17819	10819	11669	17688	113628
3. Đường chuẩn	Hệ số tương quan r	a = 26846 b = 3060,9 r = 0,9999	a = 18125 b = 19311 r = 0,9998	a = 21966 b = 3094,9 r = 0,9999	a = 27154 b = 5747,4 r = 0,9999	a = 18163 b = 5827,8 r = 0,9999	a = 21539 b = -51,463 r = 0,9998
4. Độ đúng	Độ phục hồi (%)	101,26	100,67	96,79	99,84	99,83	99,85
5. Khoảng xác định (µg/ml)		5,84 - 23,35	29,26 - 117,02	10,48 - 41,92	5,84 - 23,35	29,26 - 117,02	10,48 - 41,92
6. Độ chính xác							
6.1. Độ lặp lại	RSD (%)	0,84	0,71	0,47	0,88	1,88	0,69
6.2. Độ chính xác trung gian	RSD (%)	1,77	0,97	1,55	1,29	1,56	0,77

c. Quy trình định tính định lượng alkaloid trong dược liệu và cao chiết đạt yêu cầu thẩm định theo ICH sử dụng hệ thống HPLC Shimadzu LC-2030C 3D, đầu dò PDA, cột C18 (250 mm x 4,6mm x 5 μ m), thể tích tiêm: 5 μ l, tốc độ dòng: 1 ml/phút, bước sóng phát hiện: 220 nm, pha động: acetonitril(A) - hỗn hợp acid phosphoric 0,3% và triethylamin 0,3% trong nước (B) theo tỉ lệ 0-30 phút: 2%A; 30-35 phút: 2-60%A; 35-50 phút: 60%A; 50-53 phút: 60-2%A; 53-60 phút: 2%A

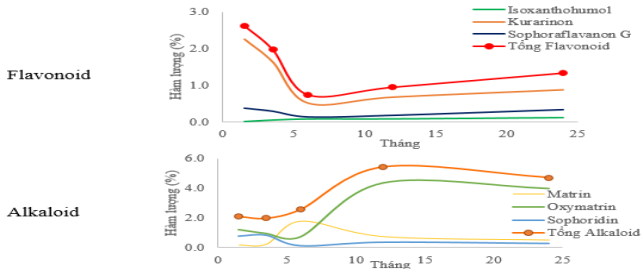
Kết quả thẩm định phương pháp định tính và định lượng các alkaloid trong dược liệu khổ sâm bắc bằng HPLC-PDA

Chỉ tiêu	Thông số	Dược liệu		
		Matrin	Sophoridin	Oxymatrin
1. Tính đặc hiệu	Rt (phút)	5,602	6,023	7,929
	Phổ UV	Đạt	Đạt	Đạt
	Mẫu trắng	Đạt	Đạt	Đạt
2. Độ thích hợp của hệ thống	RSD _S (%)	0,79	0,97	0,86
	RSD _{IR} (%)	0,05	0,15	0,05
	Tf	1,15	1,26	1,08
	Rs		2,5	5,1
	N	3654	4215	10521
3. Đường chuẩn	Hệ số tương quan r	a = 552,1 b = 23943 r = 0,995	a = 226370 b = 21423 r = 0,995	a = 536108 b = 27751 r = 0,998
4. Độ đúng	Độ phục hồi (%)	98,12	101,64	100,85
5. Khoảng xác định (μ g/ml)		39,72 – 278,02	39,63 – 277,46	39,83 – 278,87
6. Độ chính xác				
6.1. Độ lặp lại	RSD (%)	1,96	1,33	1,81
6.2. Độ chính xác trung gian	RSD (%)	1,47	1,58	1,73

Kết quả thẩm định phương pháp định tính và định lượng các alkaloid trong cao toàn phần và cao alkaloid bằng HPLC-PDA

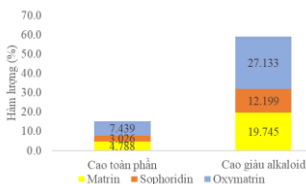
Chỉ tiêu	Thông số	Cao toàn phần			Cao alkaloid		
		Matrin	Sophoridin	Oxymatrin	Matrin	Sophoridin	Oxymatrin
1. Tính đặc hiệu	Rt (phút)	8,682	11,076	17,726	8,277	10,503	16,574
	Phổ UV	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
	Mẫu trắng	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt	Đạt
2. Độ thích hợp của hệ thống	RSD _s (%)	1,78	1,20	0,51	0,79	1,23	1,63
	RSD _{IR} (%)	1,31	1,59	1,34	1,01	1,21	1,53
	Tỷ	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
	R _s		3,7	6,6		3,8	7,2
	N	3693	3850	3132	3776	4423	3870
3. Đường chuẩn	Hệ số tương quan r	a = 6752,3 b = 28149 r = 0,9991	a = 7513,5 b = -24960 r = 0,9998	a = 11594 b = -102862 r = -0,9984	a = 6752,3 b = 28149 r = 0,9991	a = 7513,5 b = -24960 r = 0,9998	a = 11594 b = -102862 r = -0,9984
4. Độ đúng	Độ phục hồi (%)	100,24	99,55	99,72	100,27	99,02	99,63
5. Khoảng xác định (µg/ml)		71,88 - 119,80	43,00 - 71,68	136,75 - 227,90	71,88 - 119,80	43,00 - 71,68	136,75 - 227,90
6. Độ chính xác							
6.1. Độ lặp lại	RSD (%)	1,72	1,59	1,55	1,2	0,78	0,78
6.2. Độ chính xác trung gian	RSD (%)	1,27	1,23	1,86	1,18	1,23	1,34

d. Các chất có tích lũy thay đổi khá nhiều theo thời gian được biểu thị theo biểu đồ

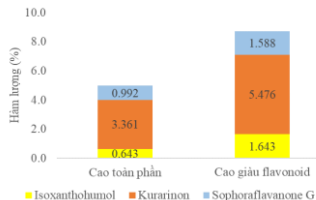


- Dựa trên quy trình định lượng đã được thẩm định luận án đã khảo sát với 2 dung môi chiết ethanol 70 % và ethanol 96 % làm ẩm với acid acetic 1%; ngâm lạnh trong 30 giờ chiết và diện tích pic của các alkaloid và flavonoid cho thấy không có sự khác biệt. Luận án chọn dung môi ethanol 70% để hoàn thiện quy trình chiết xuất cao toàn phần, cao alkaloid và cao flavonoid.

Lô	Dược liệu (kg)	Từ (g) cao toàn phần	Cao flavonoid (g)	H flavonoid tính trên khan (%)	Cao alkaloid (g)	H alkaloid tính trên khan (%)
1	2,01	280	103,5	37,34	50,9	19,01
2	2,05	270	96,0	34,65	44,2	16,44
TB				36,99		17,73



Kết quả định lượng các alkaloid trên cao toàn phần và cao alkaloid



Kết quả định lượng các flavonoid trên cao toàn phần và cao flavonoid

iv. *Đánh giá tác dụng sinh học của cao toàn phần, cao alkaloid, cao flavonoid và các chất phân lập*

- Cao toàn phần, cao flavonoid và Sophoraflavanon G thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* bằng phương pháp DPPH với giá trị EC₅₀ lần lượt là 254,48 ± 6,43 µg/ml; 139,57 ± 6,47 µg/ml và 691,58 ± 20,83 µg/ml. Mẫu đối chứng quercetin là có giá trị EC₅₀ là 8,65 ± 0,36 µg/ml. Cao flavonoid thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* bằng phương pháp MDA với EC₅₀ là 720,57 ± 8,71 µg/m, cao hơn EC₅₀ của đối chứng quercetin là 9,88 ± 0,31 µg/ml
- Cao toàn phần, cao alkaloid, cao flavonoid, matrin, oxymatrin, sophoridin không thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư vú *in vitro* trên dòng tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 sau 72 giờ xử lý; mẫu isoxanthohumol, kurarinon và sophoraflavanone G thể hiện hoạt tính độc với giá trị IC₅₀ lần lượt là 34,86 ± 0,23 µg/ml; 35,40 ± 0,47 µg/ml và 28,59 ± 0,14 µg/ml.
- Chỉ có mẫu cao toàn phần ức chế 69,22% hoạt tính của enzym AChE với IC₅₀ là 0,1077 (mg/ml).

v. *Tiêu chuẩn hóa dược liệu và cao chiết*

Chỉ tiêu và phương pháp thử đề xuất cho dược liệu Khổ sâm bắc

Chỉ tiêu	Kỹ thuật	Mức chất lượng
Mô tả	Cảm quan	Rễ màu vàng hoặc vàng nâu, đường kính lớn hơn 1,0 cm.
Định tính	Vị học	Soi bột, vi phẫu
	Sắc ký lớp mỏng	Phải có vết matrin, oxymatrin, sophoridin, isoxanthohumol, kurarinon, sophoraflavanon G
	HPLC	Phải cho pic tương ứng với pic matrin, oxymatrin, sophoridin, isoxanthohumol, kurarinon, sophoraflavanon G
Định lượng	HPLC	<i>Alkaloid:</i> Không ít hơn 1,9 % tổng lượng matrin, oxymatrin, sophoridin. <i>Flavonoid:</i> + <i>Isoxanthohumol:</i> Không ít hơn 0,1 %

		+Kurarinin: không quá 3,0 %.
		+Soporaflavanon G: không quá 1,0 %.
Độ tinh khiết	Mất khối lượng do làm khô	Không quá 11,0 %
	Tạp chất	Không quá 1,0 %
	Tro toàn phần	Không quá 6,0 %
	Tro không tan trong acid	Không quá 1,5 %
Hàm lượng chất chiết	Chiết trong nước	Không ít hơn 24,0 %
	Chiết trong ethanol	Không ít hơn 20,0 %

Đề xuất chỉ tiêu và mức chất lượng cho cao alkaloid

Chỉ tiêu	Yêu cầu kỹ thuật
Mô tả	Thẻ chất lỏng, sệt, màu vàng nâu, mùi thơm đặc trưng.
Định tính	Định tính sự có mặt của matrin, sophoridin, oxymatrin
Mất khối lượng do làm khô	Không quá 20 %
Định lượng	Tổng hàm lượng các alkaloid (matrin, sophoridin, oxymatrin) không được thấp hơn 32,4 %.
Tro toàn phần	Không quá 1,0 %
Cặn không tan trong nước	Không quá 5,0 %
Kim loại nặng	As không quá 1 ppm Cd không quá 1 ppm Hg không quá 1 ppm Pb không quá 1 ppm
Giới hạn nhiễm khuẩn	Đạt yêu cầu giới hạn nhiễm khuẩn cho cao thuốc, còn thuốc từ dược liệu. (Phụ lục 13.6. ĐĐVN V)

Đề xuất các chỉ tiêu và mức chất lượng cho cao flavonoid

Chỉ tiêu	Yêu cầu kỹ thuật
Mô tả	Thẻ chất đặc quánh, màu nâu đỏ.
Định tính	Định tính sự có mặt của các flavonoid isoxanthohumol, kurarinone, sophoraflavanone

	G.	
Mất khối lượng do làm khô	Không quá 20 %	
Định lượng	Isoxanthohumol: Không ít hơn 1,0 % Kurarinone: Không quá 6,0 % Sophoraflavanon G : Không quá 2,0 %	
Tro toàn phần	Không quá 1,0 %	
Kim loại nặng	As không quá 1 ppm	Cd không quá 1 ppm
	Hg không quá 1 ppm	Pb không quá 1 ppm
Giới hạn nhiễm khuẩn	Đạt yêu cầu giới hạn nhiễm khuẩn cho cao thuốc, còn thuốc từ dược liệu. (Phụ lục 13.6. ĐVN V)	

5. Kết luận

i. Luận án đã phân lập và xác định cấu trúc hóa học của 4 alkaloid và 4 flavonoid từ rễ khổ sâm. 04 alkaloid gồm matrin, oxymatrin, sophoridin và oxysophocarpin. 04 flavonoid là kurarinon, (2S)-2'-methoxykurarinon, sophoraflavanon G và isoxanthohumol. Các chất này đều có độ tinh khiết trên 95%.

ii. Đã thiết lập được 03 alkaloid (matrin, oxymatrin và sophoridin) và 03 flavonoid (kurarinon, isoxanthohumol, sophoraflavanon G) đạt yêu cầu chất đối chiếu hóa học thứ cấp

iii. Luận án đã xây dựng và thẩm định 2 nhóm qui trình theo ICH gồm: Qui trình định tính, định lượng đồng thời 03 alkaloid trong cao toàn phần, cao alkaloid và dược liệu bằng phương pháp HPLC-PDA. Qui trình định tính, định lượng đồng thời 03 flavonoid trong cao toàn phần, cao flavonoid và dược liệu bằng phương pháp HPLC-PDA. Đã ứng dụng các quy trình được thẩm định để ứng dụng theo dõi trên 6 lô dược liệu ở các thời gian 1,5

tháng, 3,5 tháng, 6 tháng, 12 tháng và 24 tháng. Đồng thời đã ứng dụng quy trình phân tích để hoàn chỉnh 2 quy trình chiết xuất cao định chuẩn alkaloid và cao định chuẩn flavonoid

iv. Luận án thu được 1 số kết quả khả quan như cao toàn phần ức chế 69,22% hoạt tính của enzym AchE; isoxanthohumol, kurarinon và sophoraflavanone G thể hiện hoạt tính độc tế bào ung thư vú *in vitro* trên dòng tế bào ung thư vú người MDA-MB-231 sau 72 giờ xử lý; Cao flavonoid thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* khi khảo sát bằng phương pháp MDA với EC_{50} là $720,57 \pm 8,71 \mu\text{g/ml}$; Cao toàn phần, cao flavonoid và Sophoraflavanon G thể hiện hoạt tính chống oxy hóa *in vitro* khảo sát bằng phương pháp DPPH với giá trị EC_{50} lần lượt là $254,48 \pm 6,43 \mu\text{g/ml}$; $139,57 \pm 6,47 \mu\text{g/ml}$ và $691,58 \pm 20,83 \mu\text{g/ml}$.

iv. Luận án đã đề xuất đưa chuyên luận Dược liệu Khổ sâm bắc vào Dược điển Việt Nam VI bao gồm phần mô tả, định tính (vi học, sắc ký), độ tinh khiết (độ ẩm, tạp chất, tro), hàm lượng chất chiết (nước, ethanol) và định lượng kiểm soát tổng hàm lượng kurarinon và sophora flavanone G để hạn chế nguy cơ độc gan ở người sử dụng. Đồng thời đề tài cũng đề xuất tiêu chuẩn chất lượng cho các cao chiết là cao toàn phần Khổ sâm bắc, cao alkaloid, cao flavonoid.

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

1. Các tác giả (2019), “Phân lập ba flavonoid trong rễ khô sâm bắc (*Sophora flavescens* Ait.)”, Tạp chí Dược học, 524, tr. 34- 39.
2. Các tác giả (2021), “Nghiên cứu xây dựng phương pháp điều chế cao định chuẩn giàu alkaloid từ khô sâm bắc (*Sophora flavescens* Ait.)”, Tạp chí y dược học, 13, tr. 74- 79.
3. Các tác giả (2022), “Nghiên cứu xây dựng phương pháp điều chế cao định chuẩn giàu flavonoid từ khô sâm bắc (*Sophora flavescens* Ait.)”, Tạp chí y dược học, 40, tr. 40- 48.
4. Tác giả/Các tác giả (2022), “Determination of Antioxidant, Cytotoxicity, and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Alkaloids Isolated from *Sophora flavescens* Ait. Grown in Dak Nong, Vietnam”, tạp chí MDPI pharmaceuticals, 15, tr. 1384

